



DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS

INFLUENCIA DE LA LÍNEA GERMINAL 6a EN LA TENDENCIA DE LAS CADENAS LIGERAS λ6 A LA AGREGACIÓN AMILOIDE

TESIS

Como Parte De Los Requisitos Para Obtener El Grado Académico De

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

LUIS DEL POZO YAUNER

Comité Tutoral:

- DR. BALTAZAR BECERRIL LUJÁN (Asesor)
- Dr. DANIEL A. FERNÁNDEZ VELASCO
- DR. EDUARDO HORJALES REBOREDO

CUERNAVACA, MOR. MARZO DE 2008



Universidad Nacional Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor. El presente trabajo se realizó bajo la asesoría del Dr. Baltazar Becerril Luján, en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en Cuernavaca, Morelos.

El comité tutoral estuvo conformado por:

DR. BALTAZAR BECERRIL LUJÁN (Asesor) Dr. DANIEL A. FERNÁNDEZ VELASCO DR. EDUARDO HORJALES REBOREDO

Durante el desarrollo del trabajo, el autor fue becario del Programa de Becas para Estudios de Posgrado en la UNAM (DGEP-UNAM) y recibió el apoyo del proyecto de CONACyT número D44122-Q.

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo que me brindaron.

Al Dr. Baltazar Becerril, Dr. Daniel A. Fernández, Dr. Eduardo Horjales, Dra.
 Adela Rodríguez, Dra. Susana López, Dr. Armando Gómez-Puyou, Dr.
 Alejandro Alagón, por su asesoría, comentarios y recomendaciones.

Al M. en C. Leopoldo Güereca, Lic Rosalba Sánchez, Dr. Ernesto Ortiz, Dra.
Rosana Sánchez, M. en C. Timoteo Olamendi, Dra. Lidia Riaño, Dr. Enrique
Rudiño, Dr. Fernando Zamudio, Dr. Cesar Batista, Dra. Alejandra Hernández,
Dra. Deyanira Fuentes, Dra. Consuelo García, por su trascendental
contribución a la realización de este trabajo

A los miembros de la Unidad de Docencia del Instituto de Biotecnología, UNAM, por toda la ayuda y asesoría.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, por los buenos momentos compartidos.

Dedico este trabajo a:

Lety, Mariana, Luis Javier, Sandy, Nidia, Pedro y Pedritín.

<u>Índice.</u>

Resumeni
Abstractii
Índice generaliii
Índice de tablasiv
Índice de figurasv
1. INTRODUCCIÓN1
2. ANTECEDENTES
2. 1 La amiloidosis derivada de las cadenas ligeras de inmunoglobulinas
(AL)5
2. 2 Propiedades estructurales del precursor AL5
2. 3 Factores y condiciones asociados a la agregación amiloide de las cadenas
ligeras6
2. 3. 1 El origen monoclonal y la secreción en estado libre 6
2. 3. 2 Los isotipos κ y λ
2. 3. 3 La secuencia y la estabilidad termodinámica del V $_{\rm L}$
2. 3. 4 Influencia del segmento de gen de V _L . El locus 6a10
3. HIPOTESIS14
4. OBJETIVOS15
4. 1 Objetivo General15
4. 2 Objetivos Específicos15
5. MATERIALES Y METODOS16
5.1 Síntesis y expresión de los genes de los rV $_{\rm L}$ 6aJL2, AR y sus variantes16
5. 1. 1 Diseño y síntesis del gen del rV _L 6aJL216
5. 1. 2 Diseño y síntesis del gen del rV $_{\rm L}$ AR17
5. 1. 3 Síntesis de las variantes del rV $_{L}$ 6aJL2 por mutagénesis sitio-dirigida17
5. 1. 4 Expresión y purificación del rV $_{L}$ 6aJL2 y sus variantes
5. 1. 4. 1 Extracción de la fracción periplásmica e identificación de la proteína
recombinante18
5. 1. 4. 2 Separación cromatográfica de la proteína recombinante
5. 2 Determinación de la estabilidad termodinámica de los rV _L $\lambda 6$ 20
5. 3 Experimentos de fibrilogénesis <i>in vitro</i> 20
5. 3. 1 La fibrilogénesis <i>in vitro</i> a partir del precursor soluble20
5. 3. 1. 1 Sistema de fibrilogénesis <i>in vitro</i> A21

5. 3. 1. 2 Sistema de fibrilogénesis in vitro B22
5. 4 Experimento de fibrilogénesis in vitro con adición de semillas22
5. 4. 1 Preparación de los agregados fibrilares22
5. 4. 2 Producción de las semillas amiloides22
5. 4. 3 Preparación de las soluciones de los monómeros solubles23
5. 4. 4 Experimento de extensión se semillas23
5. 5 Apagamiento de la fluorescencia intrínseca con acrilamida23
5. 6 Análisis de la distribución y naturaleza de las mutaciones somáticas en las
secuencias λ624
5. 7 Identificación de péptidos pro-fibrilogénicos en los VL $\lambda 6$ 25
5. 7. 1 Fibrilogénesis <i>in vitro</i> de las proteínas $\lambda 6$ en presencia de tripsina 25
5. 7. 2 Análisis al microscopio electrónico
5. 7. 3 Análisis de la composición de los agregados fibrilares producidos
durante la fibrilogénesis in vitro de las proteínas $\lambda 6$ en presencia de tripsina26
5. 7. 3. 1 Colección de los agregados y análisis cromatográfico de los péptidos
componentes26
5. 7. 3. 2 Identificación de los péptidos componentes de las fracciones
cromatográficas27
5. 7. 4 Proteólisis extensa con pepsina de los agregados fibrilares formados por
péptidos de las proteínas $\lambda 6$, producidos por proteólisis con tripsina27
5. 7. 4. 1 Obtención de los agregados fibrilares27
5. 7. 4. 2 Proteólisis extensa con pepsina de los agregados fibrilares de
péptidos de las rV _L $\lambda 6$ 28
5. 7. 4. 3 Identificación de los péptidos componentes de las fracciones
cromatográficas28
5. 7. 5 Identificación de regiones del V _L $\lambda 6$ con secuencia
profibrilogénica28
5. 8 Recursos usados en los análisis estructurales
6. RESULTADOS Y DISCUSION
6. 1 Características de la secuencia, expresión y purificación de los dominios
variables recombinantes (rV _L) $\lambda 6$ modelos
6. 1. 1 Características de secuencia de los rV _L λ 6 modelos
6. 1. 2 Expresión y purificación de los rV_ λ 6 modelos

6. 2 Estabilidad termodinámica de los dominios variables recombinantes (rVL)
λ632
6. 2. 1 Frecuencia de la variación Gly25 en las secuencias $\lambda 6$
6. 2. 2 Influencia de la mutación Arg25Gly en la estabilidad termodinámica de
6aJL240
6. 3 Fibrilogénesis <i>in vitro</i> de los dominios variables recombinantes (rV _L) λ 640
6. 3. 1 Cinética de fibrilogénesis in vitro determinada en presencia de ThT
(Sistema A)40
6. 3. 2 Fibrilogénesis <i>in vitro</i> en ausencia de ThT (Sistema B)42
6. 3. 3 Propiedades espectroscópicas y características ultra-microscópicas de
los agregados fibrilares $\lambda 6$ 44
6. 3. 3. 1 Emisión de fluorescencia en presencia de Tioflavina T44
6. 3. 3. 2 Absorción de luz en presencia de rojo Congo
6. 3. 3. 3 Espectro de dicroismo circular
6. 3. 3. 4 Microscopía electrónica de trasmisión
6. 4 Cinética de extensión de fibras del V $_{L}$ 6aJL2. Influencia de la mutación
Arg25Gly
6. 5 De cómo 6aJL2 nos ayuda a estimar la contribución del segmento de gen
6a al problema $\lambda 6$
6. 5. 1 Influencia de la variación alélica Arg25Gly61
6. 6 Consecuencias de la sustitución de Phe2 en la estructura, la estabilidad
termodinámica y la cinética de fibrilogénesis in vitro del dominio 6aJL264
6. 7 Influencia de las mutaciones en las posiciones 7 y 8 sobre la estructura del
segmento amino-terminal del V _L 69
6. 8 Las mutaciones somáticas en las cadenas ligeras $\lambda 6$. Su contribución
potencial a la amiloidogenicidad74
6. 8. 1 Frecuencia y diversidad de las mutaciones en las secuencias $\lambda 675$
6. 8. 2 Residuos conservados en las secuencias $\lambda 6$
6. 8. 3 Sitios hipervariables en las secuencias $\lambda 6$
6. 8. 4 Mutaciones que potencialmente modifican las propiedades biofísicas
generales del V _L λ 688
6. 8. 4. 1 Solubilidad
6. 8. 4. 2 Punto isoeléctrico (p.l.)

6.8.5 Mutaciones con potencial efecto sobre la estabilidad termodinámica del
dominio
6. 8. 5. 1 Mutaciones que suprimen interacciones salinas
6.8.6 Mutaciones que sustituyen residuos componentes del núcleo apolar del
V _L 93
6. 8. 7 Mutaciones que sustituyen residuos Pro y Gly con función
estructural97
6. 9 Identificación de péptidos fibrilogénicas en los V _L $\lambda 6$ 99
6. 9. 1 Fibrilogénesis <i>in vitro</i> en presencia de tripsina
6. 9. 2 Identificación de los péptidos fibrilogénicos
6. 9. 3 Análisis de la resistencia de los agregados fibrilares a la proteólisis con
pepsina 102
6. 9. 4 Identificación de secuencias pro-fibrilogénicas en los V _L λ 6 106
7. Conclusiones
8. Perspectivas
9. Referencias Bibliográficas115
10. Anexos
11. Otras publicaciones.

Resumen.

La amiloidosis AL es la forma sistémica de amiloidosis más frecuente en los países occidentales y se caracteriza por la deposición extracelular de una cadena ligera de inmunoglobulina en forma de agregados fibrilares insolubles. Varios estudios han reportado que las cadenas ligeras codificadas por el segmento de gen 6a, único componente del subgrupo de dominio variable $\lambda 6$. están casi invariablemente asociadas a la deposición amiloide. Se ha sugerido una posible relación entre la estabilidad termodinámica de la estructura codificada en la línea germinal 6a y el alto potencial fibrilogénico de las cadenas ligeras $\lambda 6$. Para investigar esta relación, en este trabajo se determinó la estabilidad termodinámica y la cinética de fibrilogénesis in vitro de un dominio variable recombinante (rV_L) , designado 6aJL2, el cual contiene la secuencia codificada en la línea germinal de los segmentos de genes 6a y JL2. Asimismo, se estudió una mutante de 6aJL2 que posee Gly en la posición 25 en lugar de Arg; esta sustitución se encuentra en aproximadamente el 25% de las cadenas ligeras $\lambda 6$ y presumiblemente representa una variante alotípica del locus 6a. En este trabajo también se estudió la frecuencia y el patrón de distribución de las mutaciones somáticas en las cadenas ligeras $\lambda 6$, tanto de origen amiloide como policional y se consideró su potencial efecto sobre la estructura y la estabilidad de estas proteínas. Finalmente, se estudió el potencial fibrilogénico in vitro de los fragmentos peptídicos producidos mediante proteólisis parcial con tripsina de 6aJL2 y otras proteínas $\lambda 6$.

Notablemente, la proteína 6aJL2 fue más estable y menos fibrilogénica que las cadenas ligeras amiloidogénicas κ y λ cuyos parámetros termodinámicos han sido reportados. En contraste, la mutante 6aJL2-R25G fue menos estable y más fibrilogénica que la silvestre y similar a varias cadenas ligeras amiloidogénicas previamente estudiadas. Los resultados de este trabajo sugieren que la alta tendencia de las cadenas ligeras λ 6 a la agregación amiloide no puede ser explicada exclusivamente por la estabilidad termodinámica de la estructura codificada en el segmento de gen *6a*. Las evidencias obtenidas indican que diversos factores, como la variación alotípica antes referida, la acumulación de mutaciones somáticas y el potencial fibrilogénico de segmentos discretos de la secuencia *6a* de línea germinal,

contribuyen significativamente a la proclividad de las proteínas $\lambda 6$ a la deposición fibrilar.

Palabras clave: amiloidosis, fibras, cadenas ligeras, lambda, dominio variable, subgrupo, línea germinal.

Abstract.

Light chain-associated (AL) amyloidosis is a monoclonal plasma-cell disorder characterized by the extracellular deposition of light chain variable domain-related fragments as insoluble amyloid fibrils. Notably, it has been observed that proteins encoded by the λ variable light chain (V_L) gene segment *6a* are invariably associated with amyloid deposition. The purpose of this work was to gain insight into the contribution of this gene segment to the amyloidogenicity of $\lambda 6$ light chains. We have determined the thermodynamic stability and kinetics of *in vitro* fibrillogenesis of a recombinant V_L protein, designated 6aJL2, which contains the predicted sequences encoded by the *6a* and *JL2* germline genes. Additionally, we studied several 6aJL2 mutants at positions 2, 7, 8 and 25. Of particular interest was the substitution Arg25Gly, which was found to be present in near 30% of all amyloid-associated $\lambda 6$ light chains. We also studied the frequency and distribution of somatic mutations in a set of 123 $\lambda 6$ sequences of both, AL and polyclonal origin. Finally, we studied the fibrillogenic potential of products of the partial proteolysis of several $\lambda 6$ proteins by trypsin.

Remarkably, the 6aJL2 protein was more stable than all known amyloidogenic κ and λ light chains for which stability parameters are available. Conversely, the mutated 6aJL2-R25G molecule was considerably less stable and more fibrillogenic than was the native 6aJL2.

Our studies have substantiated the relationship between $\lambda 6$ protein folding instability and increased fibrillogenic potential and supports the hypothesis that local destabilization of the N-terminal loop of light chains results in an increased propensity for fibrillogenesis. Furthermore, we have shown that the inherent capacity of $\lambda 6$ light chains to form amyloid fibrils cannot be explained exclusively by thermodynamic instability of the germline-encoded V_L $\lambda 6$ domain. Rather, other factors (*e.g.*, somatic mutations and the allocation of the profibrillogenic sequences) contribute to the predilection of these molecules to be virtually exclusively associated with AL amyloidosis.

Keywords: amyloidosis, fibril, light chain, lambda, variable domain, subgroup, germline.

1. INTRODUCCIÓN.

Las amiloidosis son enfermedades degenerativas del hombre y los animales, hereditarias o adquiridas, causadas por alteraciones del plegamiento de un grupo particular de proteínas, las cuales, bajo ciertas condiciones forman agregados fibrilares insolubles que se depositan en el espacio extracelular como componentes de una sustancia denominada *"amiloide"*.¹⁻³

Las amiloidosis se clasifican como "*localizadas*" o "*sistémicas*" dependiendo de si los depósitos de amiloide se distribuyen exclusivamente en un único órgano o tipo de tejido o si son detectados en varios órganos y/o estructuras corporales. La deposición amiloide generalmente se acompaña de daño del, o de los órganos afectados y la aparición con el tiempo de síntomas y signos de su disfunción, lo cual define la identidad clínica de la enfermedad.¹⁻³

Como antes se mencionó, el componente primordial de los depósitos de amiloide son agregados fibrilares de una proteína específica y/o sus fragmentos. Actualmente se conocen alrededor de veinticinco proteínas diferentes capaces de formar este tipo de agregados *in vivo*. A estas proteínas se les denomina "precursores de amiloide" y es muy significativo que no compartan similitud de secuencia ni de estructura.¹⁻⁴

Otras moléculas de naturaleza diversa, como los glucosaminoglicanos heparán sulfato y dermatán sulfato, el proteoglicano Perlecán, la ApoE y el componente sérico P del amiloide son también componentes de los depósitos, en los que se encuentran en asociación estrecha con los agregados fibrilares. A estas se les denomina "moléculas accesorias" y se cree que pueden proveer sitios de anclaje en la matriz extracelular para los agregados fibrilares, estabilizar las fibras maduras y/o disminuir su susceptibilidad a la degradación proteolítica; también se cree que, en algunos casos pueden contribuir a la citotoxicidad de los agregados.⁵ Los amiloides, al margen de su diversidad química, poseen un conjunto de propiedades morfológicas -microscópicas y sub-microscópicas-, tintoriales y espectroscópicas, comunes.⁶ Por ejemplo, producen una característica birrefringencia verde manzana cuando son teñidos con rojo Congo y observados al microscopio de luz polarizada.⁷ También muestran afinidad por colorantes de

tioflavina (T y S), con los que forman complejos que emiten fluorescencia específica.⁸ Al microscopio electrónico, los amiloides están formados por manojos de fibras no ramificadas, de aspecto recto y rígido, de longitud variable -en promedio de 1000 Å a 16,000 Å- pero con diámetro en el orden de 75 a 100 Å.9 Los análisis de difracción de rayos X de fibras amiloides obtenidas tanto ex vivo como de procedimientos in vitro han demostrado que, con independencia de su origen, estos agregados producen un patrón de difracción similar, denominado "^β cruzado", que se caracteriza por reflexiones perpendiculares, situadas alrededor de los 4.7 Å en la dirección meridional y alrededor de los 10-12 Å en la dirección ecuatorial. Este patrón indica que la proteína o el péptido amiloidogénico está integrado en una estructura compuesta de hojas β intermoleculares que se extienden paralelamente al eje longitudinal de la fibra, mientras que las hebras que las forman se orientan perpendicularmente a éste eje (Figura 1). Las reflexiones meridionales en 4.7 Å corresponden al espaciado de las hebras β adyacentes, lo cual está determinado por las distancias de interacción por enlaces de H de los elementos del esqueleto peptídico. Las reflexiones ecuatoriales a los 10-12 Å, de aspecto más difuso, corresponden a la separación cara-cara de las hojas β , lo cual puede variar en función del tamaño y la forma de empaquetamiento de las cadenas laterales de los residuos orientados hacia el espacio entre éstas. Estas últimas reflexiones sólo se presentarán si la unidad estructural básica de la fibra posee dos o más hojas β .¹⁰⁻¹⁴

Eiste abundante evidencia experimental que indica que la amiloidogénesis ocurre a través de un proceso de ganancia de un estado de plegamiento total o parcialmente diferente del nativo, el cual puede ser alcanzado a través de vías diferentes, dependiendo de la proteína implicada. El curso de este fenómeno patológico es influido por diversos factores y/o condiciones, tanto dependientes de la proteína precursora, como contribuidos por el microambiente donde ésta se agrega.¹⁵⁻¹⁸

Un hallazgo común a varias amiloidosis es el fraccionamiento proteolítico de la proteína precursora como condición asociada a la agregación amiloide. Los

productos de la proteólisis son generalmente fragmentos que tienen una mayor propensión a la agregación fibrilar que la molécula íntegra del precursor.¹⁹⁻²¹



Fig. 1. Estructura tridimensional de la fibra amiloide del péptido $A\beta_{1-42}$.¹⁸³

A. Conformación de tipo "hebra β-asa-hebra β" adoptada por la cadena polipeptídica entre los residuos 18 y 42 (LVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA). El segmento entre los residuos 1-17 -no representado en la figura- adopta una conformación irregular. La asociación en registro de las unidades polipeptídicas forma un par de hojas β paralelas intermoleculares que se extienden lo largo del eje mayor de la fibra -indicado por la flecha-, mientras las hebras β que las forman se orientan perpendicularmente a este eje. Los caracteres N y C indican la dirección amino → carboxilo del péptido. **B.** Ordenamiento espacial de las cadenas laterales de los residuos 18-42 en la estructura de la fibra. Se aprecia la interdigitación de las cadenas laterales orientadas hacia el espacio entre ambas hojas β. Las flechas señalan a los dos residuos de Phe contiguos en la secuencia. La figura fue generada usando las coordenadas del PDB 2BEG y el programa de visualización PyMOL[®].

Otro factor estrechamente relacionado a la agregación amiloide son las mutaciones, de las que se han identificado decenas, asociadas frecuentemente a formas hereditarias de amiloidosis. En muchos casos hay evidencias claras de que, o son la causa directa de la agregación, o modifican el curso clínico de la

enfermedad, ya sea incrementando su severidad y/o acortando el tiempo de aparición de los síntomas.²²⁻²⁴

El estudio sistemático del efecto de las mutaciones sobre las propiedades biofísicas de los precursores de amiloide permitió reconocer la relación entre la estabilidad termodinámica y la amiloidogénesis.^{15-18,22-24} Sin embargo, algunas líneas de evidencias indican que las mutaciones también podrían promover la agregación a través de su influencia en otras propiedades de la molécula, como la solubilidad, las propiedades ácido-básicas, la distribución de cargas de su superficie, así como la propensión de ciertas regiones a adoptar estructura secundaria de tipo β .^{25,26}

En algunas formas de amiloidosis de aparición esporádica, la proteína precursora no posee mutación alguna ni ha sufrido escisión proteolítica, lo cual indica que este tipo de modificaciones no son la única causa de agregación amiloide. En algunas de estas formas de amiloidosis, la alteración de la vía normal de catabolismo del precursor y el subsecuente incremento de su concentración sistémica, parecen iniciar la cadena de eventos que da lugar a la formación de los depósitos.^{1,2}

La demostración de que algunos precursores pueden adoptar estados de plegamiento no nativo bajo condiciones que disminuyen su estabilidad termodinámica y promueven su agregación fibrilar *in vitro* ha dado lugar a la teoría sobre los intermediarios semi-plegados como componentes claves de la cinética de agregación amiloide, la cual ha constituido el paradigma central en este campo en los últimos 15 años.^{15-18,27-32}

La amiloidogénesis es un proceso complejo, en el que, además de las causales antes mencionadas, influyen probablemente muchos otros factores, como los estados que cursan con insuficiencia de los mecanismos celulares de control del plegamiento de las proteínas y de remoción de los agregados que estas tienden a formar cuando no se pliegan correctamente. Las mutaciones que alteran el funcionamiento de proteínas relacionadas al metabolismo y/o la fisiología de los precursores de amiloide también han sido señaladas como parte de las causas moleculares de este grupo de enfermedades.^{1,2,15-18,22,23,33,34}.

2. ANTECEDENTES.

2. 1 La amiloidosis derivada de las cadenas ligeras de inmunoglobulinas (AL).

La forma sistémica de amiloidosis más común en los países occidentales es la amiloidosis AL.^{35,36} En esta enfermedad, el componente fibrilar de los depósitos amiloides está formado por fragmentos de una cadena ligera, que generalmente contienen el dominio variable (V_L) o éste más una porción del dominio constante (C_L), aunque no es infrecuente encontrar que la cadena ligera completa también forma parte de los depósitos.^{37,38}

Los órganos más frecuentemente afectados son los riñones y el corazón, aunque el hígado, los sistemas nerviosos periférico y autónomo, el tracto gastrointestinal y el bazo, entre otros órganos y sistemas, también suelen estar involucrados ³⁹⁻⁴². La evolución de esta enfermedad es generalmente fatal. El tiempo de sobrevida medio de los pacientes sin tratamiento es de apenas 10-14 meses a partir del diagnóstico³⁶ y se extiende a 24-48 meses para aquellos bajo tratamiento en instituciones especializadas.⁴³

2. 2 Propiedades estructurales del precursor AL.

Las cadenas ligeras de inmunoglobulinas son proteínas de alrededor de 214 residuos de aminoácidos, los cuales se pliegan en dos dominios independientes, el variable (V_L) y el constante (C_L).^{44,45} El motivo estructural de ambos dominios es el "sándwich β ", típico de las inmunoglobulinas.^{46,47}

El gen de una cadena ligera se forma por la combinación de tres segmentos de genes que se localizan dispersos en el genoma. Estos segmentos de genes son el de dominio variable (V_L), el segmento de unión (J_L) y el de dominio constante (C_L). Los segmentos de genes V_L y J_L codifican alrededor de 97 y 12 residuos, respectivamente, de los aproximadamente 112-114 que constituyen el V_L. El segmento de gen de C_L codifica los residuos del dominio correspondiente (Figura 2).^{44,48,49}

Las cadenas ligeras se dividen en dos tipos, κ y λ , en razón de la secuencia del C_L. Estos grupos son divididos adicionalmente en subgrupos de dominio variable (subgrupos de V_L) en dependencia de la secuencia de los primeros 21-23

residuos. A nivel genético, estos subgrupos son familias de segmentos de genes de V_L relacionados por eventos de duplicación génica relativamente recientes, por los que guardan alta similitud de secuencia. Se han identificado 4 subgrupos κ y 10 subgrupos λ .^{44,48,49}

2. 3 Factores y condiciones asociados a la agregación amiloide de las cadenas ligeras.

2. 3. 1 El origen monoclonal y la secreción en estado libre.

Típicamente, la cadena ligera amiloidogénica es producida en exceso y en estado libre, por una clona de células plasmáticas que típicamente infiltra la médula ósea en grado modesto, entre el 5 y el 10%. El término "estado libre" significa que la proteína es secretada como una molécula independiente y no formando parte de un anticuerpo completo.³⁷⁻⁴⁰ La secreción en estado libre parece ser una condición necesaria, pero no suficiente para que la deposición amiloide suceda. Se ha demostrado que la presencia de una cadena ligera monoclonal en estado libre en el suero y/o la orina de individuos aparentemente sanos de edad avanzada (\geq 80 años) es un hallazgo relativamente frecuente. Sin embargo, sólo una fracción minoritaria de estos llega a padecer de amiloidosis AL⁵⁰⁻⁵².

2. 3. 2. Los isotipos κ y λ .

Las cadenas ligeras amiloidogénicas son con mayor frecuencia de tipo λ . La proporción de los isotipos κ : λ entre las cadenas ligeras amiloidogénicas es 1:3, inverso a la relación 2:1 que caracteriza a la población de linfocitos B de sangre periférica de individuos normales⁵²⁻⁵⁴.



Fig. 2. Estructura genética de las cadenas ligeras. La contribución de los segmentos de genes V_L (azul), J_L (verde) y C_L (rojo) a la estructura del gen de la cadenas ligera se representa en la parte superior de la figura. El número aproximado de residuos y la región de los dominios variable (V_L) y constante (C_L) que codifica cada uno de estos segmentos se muestra usando el mismo código de colores. El modelo estructural corresponde a la cadena ligera del Fab $\lambda 1$ New (PDB 7FAB) y fue generado mediante el programa de visualización PyMOL.

2. 3. 3. La secuencia y la estabilidad termodinámica del V_L.

Estudios publicados a inicios de la década de los noventa aportaron evidencias claras sobre el papel determinante de la secuencia del V_L en el comportamiento patológico de las cadenas ligeras.^{55,56} Alan Solomon y col. demostraron que las cadenas ligeras amiloidogénicas forman con mucha mayor frecuencia que las no amiloidogénicas, depósitos tisulares en ratones de laboratorio, muy similares a los depósitos amiloides observados en los humanos. Significativamente, este comportamiento sólo fue observado al inocular la cadena ligera completa o, sobre todo, el V_L aislado, pero no el C_L.^{55,56}

También se ha demostrado que la propensión a la agregación fibrilar *in vitro* de las cadenas ligeras correlaciona inversamente con la estabilidad termodinámica del V_L .⁵⁷⁻⁶¹ Como regla, las cadenas ligeras amiloidogénicas tienden a ser menos estables que las no amiloidogénicas de su mismo subgrupo de V_L .⁵⁷⁻⁶¹

A diferencia del resto de los precursores de amiloide, las cadenas ligeras se caracterizan por la alta diversidad de su estructura primaria, en particular del V_L.⁶²⁻ ⁶⁴ El origen de esta variabilidad es doble. El primario es el proceso de unión combinatoria de los segmentos génicos de V_L y J_L, que acontece durante la formación del gen funcional de la cadena ligera.^{44,48,49} El segundo, es el proceso de hipermutación somática que ocurre en los centros germinales de los ganglios linfáticos, posterior a la activación del linfocito B por el antígeno.⁶⁵⁻⁶⁸ Durante la hipermutación somática, la secuencia del dominio variable, tanto de la cadena ligera como pesada del anticuerpo, es modificada por la introducción de cambios puntuales, fundamentalmente Regiones Determinantes en las de Complementaridad (CDRs) con el antígeno, aunque también ocurren fuera de éstas. Además de los cambios por sustitución, la eliminación o inserción de uno o más residuos son comunes.⁶⁵⁻⁶⁸ Una fracción de estas mutaciones puede incrementar la afinidad del reconocimiento del antígeno por el anticuerpo, lo cual se asocia a una mayor probabilidad de sobrevivencia del linfocito B portador.^{66,68} Sin embargo, las mutaciones somáticas también pueden desestabilizar el plegamiento nativo del V₁ y por esa vía incrementar el potencial fibrilogénico de la cadena ligera.57-61

La agregación fibrilar de las cadenas ligeras también puede ser favorecida *in vitro* por condiciones que desestabilizan su plegamiento nativo, como la adición de desnaturalizantes químicos - urea o cloruro de guanidinio (GdnHCl)-, pH ácido, alta presión hidrostática y temperatura alta.^{59,60,69-77.} Este efecto no sólo se ha demostrado en las cadenas ligeras amiloidogénicas, también en las no amilodogénicas, más estables. ^{59,60,74-77} Estos hallazgos han dado lugar a la hipótesis termodinámica, la cual postula que la agregación amiloide ocurre como consecuencia de cambios en el plegamiento nativo de las cadenas ligeras que son favorecidos por las mutaciones somáticas que disminuyen su estabilidad

termodinámica o por condiciones ambientales que ejercen un efecto similar.^{57-61,69-} ⁷⁷ En base a esta hipótesis se ha sugerido que especies parcialmente plegadas del precursor son un componente clave del mecanismo de agregación fibrilar.⁵⁷⁻ ^{61,70-77} Sin embargo, la naturaleza de los cambios estructurales que promueven la agregación no ha sido determinada a nivel atómico. Al presente, solo han sido publicado estudios que describen los cambios estructurales globales, asociados a la fibrilogénesis.⁷³⁻⁷⁷ Fink y col. estudiaron el efecto del pH ácido y diferentes concentraciones del desnaturalizante GdnHCI en la cinética de agregación del dominio variable recombinante (rV_L) Sma, el cual posee la secuencia de una proteína amiloidogénica perteneciente al subgrupo KIV.^{73,76,77} Mediante diversos métodos espectroscópicos e hidrodinámicos, los investigadores demostraron que la agregación fibrilar es promovida por condiciones en las cuales una fracción mayor de las moléculas del rV₁ Sma adopta una conformación relativamente compacta, pero caracterizada por una pérdida sustancial de elementos de las estructuras secundaria y terciaria, propias de su estado nativo. En adición a este intermediario no nativo, propenso a la agregación fibrilar, un segundo intermediario, de conformación similar a la nativa, fue detectado en condiciones y concentración de GdnHCI. Se observó que el menos severas de pH intermediario de conformación semejante a la nativa mostró propensión a formar principalmente agregados amorfos, más que fibrilares. Basados en estos hallazgos, los autores postularon que un estado caracterizado por una mayor pérdida de la estructura nativa favorece más los reordenamientos topológicos que requiere la incorporación de la molécula en la estructura polimérica de la fibra amiloide que los estados intermediarios más ordenados, con estructura similar a la nativa, lo cual es coherente con la hipótesis termodinámica. 32,73,76,77

La capacidad de la proteína amiloidogénica κ IV Sma de formar agregados amorfos –no fibrilares- en ciertas condiciones *in vitro* había sido demostrada en un estudio previo.⁷² Esta capacidad también ha sido comprobada en otras proteínas, incluyendo la cadena ligera κ I no amiloidogénica Rei.^{69,78} Los resultados experimentales obtenidos en estos estudios indican que, tanto los componentes del microambiente molecular, como características de la secuencia de regiones discretas de la molécula, pueden favorecer en forma específica una de las diferentes vías de agregación de estas proteínas.^{69,72,78} La trascendencia de estos hallazgos tiene que ver con la diversidad de enfermedades asociadas a la deposición de las cadenas ligeras que han sido descritas.^{39,40,79} En la enfermedad por deposición de cadenas ligeras (LCDD, por sus siglas en ingles) los agregados son de aspecto finamente granular al ME y están asociados a la membrana basal del glomérulo renal.^{39,40,79} En el síndrome de Fanconi los agregados son fundamentalmente intracelulares y de naturaleza cristalina.^{39,40,79} En la nefropatía del mieloma, la cadena ligera se agrega en la luz de los túbulos renales en forma de estructuras cilíndricas.^{39,40,79} Como ya se mencionó, en la amiloidosis AL la morfología de los agregados es fibrilar.^{35,36,39,40} Como ha sido afirmado antes, las cadenas ligeras son un arquetipo de la relación entre las variaciones en la estructura y las propiedades patogénicas de las proteínas.⁶⁴

2. 3. 4. Influencia del segmento de gen de V_L. El locus 6a.

Hace más de 20 años A. Solomon y col. reportaron los primeros hallazgos, sugerentes de una asociación entre el subgrupo de V_L λ 6 y la amiloidosis AL.⁸⁰ Esas primeras observaciones fueron posteriormente confirmadas por varios estudios independientes.⁸¹⁻⁸⁵ La frecuencia reportada del subgrupo λ 6 en cuatro diferente series de pacientes con el diagnóstico de amiloidosis por cadenas ligeras λ varía entre 16 y 41 %,⁸¹⁻⁸⁵ lo cual contrasta con su baja frecuencia de expresión (2%) en el repertorio de linfocitos B λ de sangre periférica.^{84,86} Además de la alta prevalencia del subgrupo λ 6 en la amiloidosis, se ha encontrado que, con la única excepción de la proteína Jto, todas las cadenas ligeras monoclonales λ 6 obtenidas de pacientes con discrasias de células plasmáticas han estado implicadas en alguna forma de deposición amiloide.^{61,81} Notablemente, y a diferencia de lo observado para otras familias de cadenas ligeras, en aproximadamente el 70% de los casos de amiloidosis causados por una proteína λ 6, los depósitos AL se limitan exclusiva o principalmente al tejido renal.^{83,84}

La alta propensión a la agregación amiloide, que pareciera ser inherente a la secuencia $\lambda 6$, debe tener su origen, al menos parcialmente, en el segmento de gen de V_L *6a*. Este segmento génico es el único componente del subgrupo $\lambda 6$, por

lo que codifica los primeros 99 residuos de todas las cadenas ligeras que pertenecen a este subgrupo^{49,87} (Figura 2).

Como parte de los esfuerzos para identificar el origen del comportamiento proamiloidogénico de las proteínas $\lambda 6$, en los años 90s se determinó la estructura cristalográfica de dos dominios variables recombinantes (rV_L) λ 6; las proteínas Jto y Wil⁸⁸, y adicionalmente se determinaron su estabilidad termodinámica y el potencial fibrilogénico *in vitro*.⁶¹ El rV_L Jto posee la secuencia de la única cadena ligera $\lambda 6$ no amiloidogénica reportada hasta el presente. Esta proteína fue obtenida de un individuo con nefropatía asociada al mieloma múltiple, pero sin signos clínicos ni histopatológicos de amiloidosis.⁶¹ El rV_L Wil posee la secuencia de una cadena ligera obtenida a partir de los depósitos amiloides de un individuo con el diagnóstico de amiloidosis AL.⁶¹ Los estudios termodinámicos demostraron que Jto es más estable que Wil, tanto a la desnaturalización térmica como con GdnHCl.⁶¹ Si bien ambas proteínas mostraron la capacidad de formar agregados fibrilares similares al amiloide en condiciones de pH y fuerza iónica comparables a las fisiológicas, Jto lo hizo con una cinética mucha más lenta que Wil, lo cual está en correspondencia con su mayor estabilidad termodinámica.⁶¹ El análisis comparativo de sus estructuras cristalográficas aportó información que permitió explicar las diferencias en estabilidad termodinámica de estas dos proteínas. Se encontró que dos de las mutaciones que caracterizan el V_L de Jto (Ala30aAsp y Ser68Arg) dan lugar a una interacción salina⁸⁸, la cual se ha demostrado que contribuye con aproximadamente 1.6 kcal mol⁻¹ a la estabilidad del dominio.^{89,90} Adicionalmente, se identificaron un conjunto de elementos estructurales, que son característicos de las cadenas ligeras $\lambda 6$, que pudieran estar relacionados con la predisposición patogénica de estas proteínas.⁸⁸

El segmento de gen *6a* depositado en el VBASE (http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk) es único entre los segmentos de genes de V_L humanos por codificar Phe en la posición 2 y Arg en la posición 25.^{49,86} Se encontró que en la estructura nativa de Wil y Jto ambos residuos están cercanos espacialmente e interactúan a través de la cadena lateral. Una interacción similar entre los residuos de las posiciones 2 y 25 no ha sido descrita en ninguna otra inmunoglobulina humana.⁸⁸

Significativamente, ha sido reportada una secuencia genómica del segmento de gen 6a que codifica Gly en lugar de Arg en la posición 25.⁸⁷ Los datos disponibles indican que esta secuencia es una variante alotípica del locus *6a*. En base a la información estructural disponible, es posible predecir que esta variación pudiera tener consecuencias para la estructura y/o la estabilidad termodinámica del V_L $\lambda 6.^{86}$ Sin embargo, esto no ha sido comprobado, ni se ha establecido cuan frecuente es esta variante en las cadenas ligeras $\lambda 6$ amiloidogénicas.

Otra característica estructural casi exclusiva de la secuencia $\lambda 6$ – presente también en el subgrupo $\lambda 5^{91}$ - es la inserción de dos residuos en la Región Marco 3 (FR-3), que por alineamiento de secuencia fueron inicialmente situados entre las posiciones 66 y 67. Mediante la comparación de las estructuras cristalográficas de Jto y Wil con las de cadenas ligeras $\lambda 1$ y $\lambda 2$ se comprobó que los dos residuos extras se sitúan más apropiadamente entre las posiciones 68 y 69 –corresponden a los residuos Ser68A y Ser68B.⁸⁸ Esta doble inserción extiende el asa del FR-3 que está en contacto con la Región Determinante de Complementariedad con el antígeno número 1 (CDR-1).⁸⁸

La relevancia de estos atributos estructurales de las proteínas λ 6 para su comportamiento pro-amiloidogénico no ha sido establecida.

En conclusión, si bien estos estudios contribuyeron a una mejor comprensión de las bases moleculares de la agregación fibrilar amiloide de las cadenas ligeras, no aportaron una explicación a la alta amiloidogenicidad asociada a las cadenas ligeras $\lambda 6.^{88}$

El propósito de este trabajo es estimar la contribución de la línea germinal 6a a la alta tendencia de las cadenas ligeras $\lambda 6$ a la agregación amiloide, a partir del estudio de las propiedades estructurales y biofísicas del dominio codificado parcialmente por este segmento de gen.

Con este propósito, se determinaron la estabilidad termodinámica y el potencial fibrilogénico *in vitro* de una proteína modelo, denominada 6aJL2, la cual es un rV_L con secuencia de la línea germinal de los segmentos de genes 6a y J_L2. Dados los antecedentes antes mencionados, se determinó la influencia de la mutación Arg25Gly en las propiedades de 6aJL2 y se estudió su frecuencia en las cadenas

ligeras $\lambda 6$, tanto amiloidogénicas como provenientes del repertorio policional. Mediante mutagénesis sitio-dirigida, fueron producidas variantes de la proteína 6aJL2 por sustitución de los residuos Phe2, Pro7 e His8. Como antes se mencionó, la Phe2 está involucrada en contactos con la Arg25. El análisis de las estructuras critalográficas de las proteínas $\lambda 6$ nos permitió identificar a los residuos Pro7 e His8 como potencialmente importantes para la conformación del segmento N-terminal y la estabilidad del V λ 6. El estudio de estas mutantes permitió comprender mejor las bases estructurales del V_L λ 6 y establecer postulados sobre la potencial implicación de regiones particulares de esta estructura en el mecanismo de agregación fibrilar in vitro de las cadenas ligeras. Adicionalmente, se estudió el patrón de distribución y la naturaleza de las mutaciones somáticas observadas en las secuencias $\lambda 6$ depositadas en los bancos de secuencia y se evaluó la potencial contribución de alguno de estos cambios al comportamiento pro-amiloidogénico de estas proteínas. Finalmente, se estudió la distribución en la estructura del V_L λ 6, de segmentos con secuencias específicas reconocidas como promotores de la agregación fibrilar, y se evaluó su contribución a la estructura de los agregados fibrilares.

Con el objetivo de establecer un contexto apropiado para el análisis de los resultados experimentales, se incluyeron en el estudio tres proteínas $\lambda 6$ recombinantes, los rV_L Jto, Wil y AR, que poseen la secuencia de moléculas $\lambda 6$ obtenidas de pacientes. Los rV_L Jto y Wil ya fueron citados antes. El rV_L AR, cuyo gen fue construido durante el desarrollo de este trabajo, posee la secuencia de una cadena ligera amiloidogénica obtenida a partir de muestras de tejidos de un individuo enfermo.⁹² Las proteínas Wil y AR se diferencian, entre otras particularidades, en el residuo que ocupa la posición 25, que en Wil es Arg y en AR es Gly.

3. HIPÓTESIS.

Ha sido bien documentada la relación inversa entre la estabilidad termodinámica y el potencial fibrilogénico de las cadenas ligeras. Basados en este antecedente y teniendo en cuenta que el segmento de gen *6a* contribuye mayoritariamente a la secuencia del V_L λ 6, postulamos que la elevada tendencia de las cadenas ligeras λ 6 a la agregación amiloide es consecuencia directa de la baja estabilidad termodinámica de la estructura codificada en este segmento de gen. Anticipamos que un V_L con secuencia de la línea germinal *6a* debe caracterizarse por ser poco estable termodinámicamente y poseer alto potencial fibrilogénico *in vitro*, comparable a las cadenas ligeras amiloidogénicas del subgrupo λ 6. Además, en correspondencia con la complejidad del fenómeno de la agregación amiloide, planteamos que otras características de la secuencia del segmento de gen *6a*, no directamente relacionadas a la estabilidad termodinámica de la estructura en él codificada, contribuyen al comportamiento amiloidogénico de las proteínas λ 6.

4. OBJETIVOS.

4. 1 Objetivo General.

Estimar la contribución de la línea germinal 6a a la tendencia de las cadenas ligeras $\lambda 6$ a la agregación amiloide e identificar elementos de secuencia y estructurales, codificados en este segmento de gene, potencialmente relacionados al mecanismo molecular de agregación fibrilar *in vitro* de estas proteínas.

4. 2 Objetivos Específicos.

- Sintetizar y expresar el gen 6ajl2, y purificar el producto de su expresión, así como sintetizar y expresar variantes de este gen que sean de interés para el objetivo general del proyecto.
- 2. Determinar la estabilidad termodinámica y el comportamiento fibrilogénico *in vitro* del dominio 6aJL2, así como de sus variantes.
- 3. Establecer el patrón de distribución de las mutaciones somáticas en las cadenas ligeras $\lambda 6$ y evaluar su potencial influencia estructural.
- 4. Identificar regiones del dominio variable $\lambda 6$ con secuencias pro-fibrilogénicas y evaluar su contribución a la agregación fibrilar.

5. MATERIALES Y METODOS

5. 1 Síntesis y expresión de los genes de los rV_L 6aJL2, AR y sus variantes.

5. 1. 1 Diseño y síntesis del gen del rV_L 6aJL2.

La secuencia de 333 nucleótidos del gene *6ajl2* se diseñó mediante la combinación, en dirección 5´ \rightarrow 3´, del segmento de gen de V λ *6a* (295 nucleótidos) y el segmento J λ *jl2* (38 nucleótidos). Ambas secuencias se tomaron de la base de datos VBASE (Ig variable region gene database, <u>http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk</u>).⁴⁹ La secuencia completa del gen *6ajl2* es como sigue:

5'→AAT TTT ATG CTG ACT CAG CCC CAC TCT GTG TCG GAG TCT CCG GGG AAG ACG GTA ACC ATC TCC TGC ACC CGC AGC AGT GGC AGC ATT GCC AGC AAC TAT GTG CAG TGG TAC CAG CAG CGC CCG GGC AGT TCC CCC ACC ACT GTG ATC TAT GAG GAT AAC CAA AGA CCC TCT GGG GTC CCT GAT CGG TTC TCT GGC TCC ATC GAC AGC TCC TCC AAC TCT GCC TCC CTC ACC ATC TCT GGA CTG AAG ACT GAG GAC GAG GCT GAC TAC TAC TGT CAG TCT TAT GAT AGC AGC AAT <u>CAT GTG GTA TTC GGC GGA</u> *GGG ACC AAG CTG ACC GTC CTA*→ 3' (En negritas y cursiva la secuencia del segmento de gene *jl*2)

La secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante 6aJL2, deducida a partir de su gen, (código de una letra) es la siguiente:

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQR PSGVPDRFSGSIDSSSNSASLTISGLKTEDEADYYCQSYDSSN<u>H</u>VVFGGGTKLTV L (En negritas y cursiva la secuencia codificada por el segmento de gene *jl*2).

En el punto de unión de ambos segmentos de genes se genera el codón CAT que codifica para His, la cual ocupa la posición 95a, según el sistema de numeración de Kabat.⁶²

La síntesis del gen *6ajl2* se describe en detalle en el Anexo 2. Brevemente, ésta se realizó mediante reacción en cadena de la polimerasa de ADN (PCR), en modo recursivo⁹³, usando la estrategia diseñada por Stevens P. W., et al.⁹⁴ Para este propósito se usaron 10 oligonucleótidos sintéticos de entre 48 y 61 bases, los cuales poseen regiones de secuencia complementaria de alrededor de 15 nucleótidos (Ver Anexo 2). El diseño de los oligonucleótidos se realizó mediante el

programa de computación OLIGO v4.0, para Mac, y se sintetizaron en la Unidad de Síntesis Química de nuestro instituto. El producto de PCR se purificó mediante eletroforesis en gel de agarosa y se digirió con las enzimas de restricción *Sfil* y *Not*l (New England Biolabs, Inc., Beverly, MA, USA) y se ligó en el vector de expresión pSyn1,⁹⁵ previamente digerido con ambas enzimas.⁹⁵ El producto de la reacción de ligación se transfirió a células electrocompetentes de *E.* coli W3110 mediante eletroporación; luego las células se cultivaron en medio selectivo YT2X sólido suplementado con ampicilina 200 µg/ml. A partir de colonias crecidas en medio selectivo se purificaron vectores recombinantes y sus insertos se secuenciador automático disponible en el laboratorio. El vector recombinante con la secuencia del gen *6ajl2* insertada se nombró pSyn1-6aJL2 y se usó para transformar células electrocompetentes de E. coli W3110, las cuales se usaron en los ensayos de expresión.

5. 1. 2 Diseño y síntesis del gen del rV_L AR.

La secuencia reportada de la cadena ligera λ 6 amiloidogénica AR fue obtenida por secuenciación directa de la proteína.⁹² A partir de la secuencia reportada, se diseñaron 10 oligonucleótidos sintéticos que cubren la secuencia del dominio variable de AR de 111 residuos (Ver Anexo 4). Para la síntesis del gen *ar* se usó la misma estrategia descrita para *6ajl2*. El vector recombinante con la secuencia del gene *ar* se nombró pSyn1-AR y se usó para transformar células electrocompetentes de E. coli W3110, las cuales se usaron en los ensayos de expresión.

5. 1. 3 Síntesis de las variantes del rV_L 6aJL2 por mutagénesis sitio-dirigida.

Se sintetizaron mutantes del gen del rV_L 6aJL2 por sustitución de los residuos Phe2, Pro7, His8, Arg25, Gly100, Lys103 y Thr105. Las mutantes sencillas producidas fueron Phe2Ala, Phe2Ser, Phe2Leu, Phe2Pro, Phe2Trp, Pro7Ser, His8Ser, His8Pro, Arg25Gly, Gly100Trp, Lys103Trp y Thr105Trp. Además, se sintetizaron las siguientes mutantes dobles: Phe2Ser-His8Pro, Phe2Leu-His8Pro y Pro7Ser-His8Ser. Las mutantes se sintetizaron mediante reacciones de PCR en

las que se usaron oligonucleótidos sintéticos mutagénicos. La estrategia usada es la misma descrita en el anexo 2 para la mutante 6aJL2-R25G.

5. 1. 4 Expresión y purificación del rV_L 6aJL2 y sus variantes.

La metodología usada en la expresión de los rV_L λ 6 se describe en detalle en el anexo 2. En breve, esta se realizó en medio líquido YT2X suplementado con ampicilina 200 µg/ml, en el que se cultivaron células de la cepa de E. coli W3110 transformadas por electroporación con el vector pSyn1-6aJL2, o el vector de una de las variantes de esta construcción. Las células se cultivaron a 37 °C, con agitación constante (250 r.p.m.) hasta que la densidad del cultivo, medido como la A₆₀₀, alcanzó el intervalo de 1.2-1.5 U. A. La expresión del rV_L 6aJL2 se indujo mediante la adición de 0.8-1.0 mM de IPTG (Promega, Madison, WI, USA). Posteriormente, el cultivo se incubó toda la noche a 20 °C, con agitación constante de 100 r.p.m. Los rV_L λ 6 Wil y Jto se expresaron bajo el control del promotor T7 en células de *E*. coli BL21(DE3) transformadas con los vectores recombinantes *pET-SW* y *pET-JTO*, respectivamente, donados por el Dr. Alan Solomon (The University of Tennessee Medical Center/Post-Graduate School of Medicine, Knoxville, Ten, USA).

Tanto el vector pSyn1 como el pET27b+ codifican para la secuencia peptídica señal *pel-B*, por lo que la proteína recombinante producida en ambos sistemas de expresión se acumula en el espacio periplásmico bacteriano, de donde es necesario extraerla.

5. 1. 4. 1 Extracción de la fracción periplásmica e identificación de la proteína recombinante.

La extracción de la fracción periplásmica, procedimiento que se realizó según un método reportado previamente,⁹⁴ se describe en detalle en el Anexo 2.

Luego de cada ensayo de expresión, se estimó la concentración de la proteína recombinante en el extracto periplásmico mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en sistema discontinuo (gel concentrador 5% de T, gel separador 15% de T) y en condiciones nativas. Para identificar la proteína recombinante en el gel, se realizó inmuno-detección con el anticuerpo monoclonal murino 55-5F5,

que reconoce un epítope específico de las cadenas ligeras $\lambda 6$ (Ver material suplementario en línea del Anexo 2).⁹⁶ Este anticuerpo monoclonal también fue obtenido como donativo del grupo del Dr. A. Solomon.

5. 1. 4. 2 Separación cromatográfica de la proteína recombinante.

La estrategia de purificación se describe en detalle en el Anexo 2. En breve, esta constó de dos pasos. En el primero se precipitó la proteína recombinante, disuelta en el extracto periplásmico, por adición de sulfato de amonio hasta alcanzar 74.5% de saturación. La fracción proteica precipitada se resuspendió y se dializó toda la noche en 100 volúmenes de amortiguador de fosfato de Na 25 mM, pH 7.5 más NaCl 150 mM. El segundo paso de purificación se realizó mediante cromatografía de exclusión molecular en una columna semi-preparativa de Sephacryl S-100 HR formato 26/60, instantada en un sistema EKTA-Basic (Amersham-Biosciences AB, Uppsala, Sweden). En la separación cromatográfica se usó el mismo amortiguador de diálisis a un flujo de 2.5 ml/min. Durante la cromatografía se colectaron fracciones de 5 ml; la elución de los diferentes componentes de la muestra se registró mediante la medición de la A₂₈₀ del eluato. Las fracciones contaniendo la proteína $\lambda 6$ recombinante se identificaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en sistema discontinuo, complementada con inmuno-detección con el anticuerpo monoclonal murino 55-5F5, como se mencionó previamente. La identidad de la proteína recombinante purificada se corroboró mediante espectrometría de masas ESI-IT, en un espectrómetro de masas LCQ equipado con una fuente nanospray (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

La concentración de las soluciones de proteínas purificadas se determinó espectrofotométricamente a 280 nm, diluyéndolas en amortiguador de fosfato de Na 20 mM, pH 7.5 más 6.5 M de GdnHCI. El cálculo de la concentración se realizó a partir del coeficiente de extinción molar (ε) de cada proteína a la longitud de onda especificada, estimado a partir de la secuencia de amino ácidos por el programa de computación "PROPARAM", disponible en la página web Expassy (http://ca.expasy.org).

5. 2 Determinación de la estabilidad termodinámica de los rV λ 6.

La estabilidad termodinámica del rV_L 6aJL2 y sus variantes, así como de AR se determinó mediante desnaturalización con GdnHCI y temperatura. El procedimiento usado en los experimentos termodinámicos se describe en detalle en el apartado de Materiales y Métodos del Anexo 2.

5. 3 Experimentos de fibrilogénesis in vitro.

La fibrilogénesis *in vitro* del rV_L 6aJL2 y de sus variantes se estudió mediante dos tipos de experimentos, dependiendo del objetivo planteado. Los experimentos de fibrilogénesis a partir del precursor soluble se realizaron para evaluar la capacidad de las proteínas para formar los núcleos a partir de los cuales se ensamblan las fibras.^{61,97} Para evaluar la cinética de la extensión de las fibras, se realizaron experimentos de fibrilogénesis con adición de "semillas".

5. 3. 1 La fibrilogénesis in vitro a partir del precursor soluble.

La cinética de fibrilogénesis a partir del precursor soluble se estudió mediante dos sistemas experimentales, los cuales son modificaciones de metodologías reportadas por otros autores.^{61,97} Estos sistemas difieren esencialmente por la presencia o no del colorante tioflavina T (ThT) en la muestra durante el desarrollo del experimento, lo cual determina la relación temporal entre el avance de la agregación fibrilar y la medición de la señal que permite estimar ésta, que en este caso es la fluorescencia de ThT.⁸ Uno de los sistemas, que denominamos "A", se basó en la metodología descrita por Wall et al⁶¹. En este sistema, el ThT es incorporado a la solución de la proteína desde el inicio, lo que permite observar la progresión de la fibrilogénesis en tiempo real, midiendo constantemente la variación de la fluorescencia de ThT. Este sistema tiene la desventaja de la posible interferencia del ThT en otros analisis que pudieran realizarse para caracterizar en más detalle los agregados fibrilares. Para evitar esta posible desventaja, se usó un segundo sistema de fibrilogénesis in vitro, que denominaremos "B", el cual es una modificación de una metodología también diseñada por Wall et al⁹⁷. Los agregados producidos en este sistema se estudiaron mediante varios métodos espectroscópicos y por microscopía electrónica.

5. 3. 1. 1 Sistema de fibrilogénesis in vitro A.

Se prepararon 3 ml de una dilución 100 μ g/ml (8.3 μ M) de proteína en PBS, pH 7.5 más 20 µM de ThT (Sigma-Aldrich Chemie Gmbh, Steinheim, Germany), conteniendo 0.05% de azida de Na. Inmediatamente antes de iniciar el experimento, la solución se pasó por un filtro Millex GV con membrana de 0.22 µm de poro nominal (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) y se incubó por 5 minutos a 37 °C. Seguidamente, se transfirieron 2.7 ml de la solución a una cubeta plástica para fluorescencia de 3.2 ml de capacidad y 1 cm de paso de luz, colocada en el porta-cubetas de un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50B (Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Durante el experimento la solución se agitó constantemente mediante una microbarra magnética de 2 mm x 7 mm, cubierta de Teflón. La velocidad de rotación de la microbarra magnética se ajustó al nivel "bajo", una de las dos opciones que permite el programa de computación que controla el sistema. La temperatura de la solución se mantuvo a 37 °C ± 0.5 °C mediante un baño de agua termoregulado, el cual se conectó al sistema de recirculación del porta-cubetas. La temperatura de la muestra se midió constantemente, sumergiendo en la solución un termo-sonda DigiSense YSI 400, conectado a un termómetro termistor de marca Cole-Parmer, modelo DigiSense TermologR (Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, IL, USA). La cinética de la formación de los agregados fibrilares se determinó midiendo la variación en el tiempo de la intensidad de fluorescencia del ThT, la cual se registró excitando la muestra a 450 nm y registrando la emisión a 482 nm.⁸ El ancho de los slits de excitación y emisión fue de 2.5 nm y 5.0 nm, respectivamente. La frecuencia de registro fue cada 15-30 segundos, dependiendo del experimento, integrándose las mediciones de 2 segundos. Cada cinética se continuó hasta que el valor de intensidad de fluorescencia superó las 1000 cuentas (límite de lectura del equipo) o cuando la curva alcanzó la fase de meseta. Durante el experimento la cubeta fue sellada con una pieza de Parafilm, para evitar la evaporación excesiva de la solución.

5. 3. 1. 2 Sistema de fibrilogénesis in vitro B.

La preparación de la solución de ensayo se realizó de manera similar a lo descrito para el sistema A, con la excepción de que a está no se adicionó ThT y que la concentración de proteína fue de 200 µg/ml (16.6 µM). El diseño y desarrollo de este tipo de experimento, así como los métodos espectroscópicos y de microscopía electrónica usados para analizar los agregados producidos, se describen en detalle en el apartado de Materiales y Métodos del Anexo 2.

5. 4 Experimento de fibrilogénesis in vitro con adición de semillas.

Se realizaron experimentos de fibrilogénesis con adición de semillas para estudiar la cinética de la agregación de las proteínas λ 6 en fibras preformadas. Este tipo de experimento se denomina de extensión homóloga.

5. 4. 1 Preparación de los agregados fibrilares.

Se prepararon alícuotas de 2-3 ml de diluciones con 2 mg/ml de las proteínas λ6 en PBS, pH 7.4 más azida de Na 0.05%. Las diluciones se transfirieron a tubos estériles de poliestireno con tapa de 17 x 100 mm y se incubaron a 37 °C por 36-48 horas, con agitación orbital constante de 250 r.p.m. Una vez concluida la incubación, se transfirieron la suspensiones de agregados a tubos plásticos con tapa de 2.0 ml (Eppendorf) y se centrifugaron a 13,000 r.p.m. por 45 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y el sedimento se lavó dos veces con 2 ml de PBS, pH 7.4 . En cada ocasión, los agregados se sedimentaron por centrifugación, según las condiciones descritas. Finalmente, el sedimento se resuspendió en 500 μL de PBS. La concentración de proteína de cada suspensión de fibras se determinó mediante el método Micro BCA [™] Protein Assay Reagent Kit (Pierce, Rockford, IL, USA), usando el procedimiento sugerido por el fabricante.

5. 4. 2 Producción de las semillas amiloides.

Las semillas amiloides son fragmentos de fibras producidos por sonicación. A partir de las suspensiones de fibras se prepararon diluciones de 240 μ g/ml en PBS, pH 7.5, las cules se sonicaron en un aparato modelo Branson Sonifier 450 usando una punta de 2 mm (Branson Ultrasonics Co., Danbury, CT, USA). Cada suspensión se sonicó dos veces, por aproximadamente 10 segundos, con un

período de reposo de 30 segundos. El sistema se ajustó al nivel 35 de potencia. Durante el proceso las muestras se mantuvieron en hielo.

5. 4. 3 Preparación de las soluciones de los monómeros solubles.

Las soluciones de proteína fueron centrifugadas a 100,000 r.p.m. (aprox. 400,000 g) durante 60 min a 4 °C, usando un rotor TLA 100.4 en una ultracentrífuga Beckman Optima TL120. El sobrenadante se removió cuidadosamente y se calculó su concentración de proteína mediante el método Micro BCA [™] Protein Assay Reagent Kit, como se describe antes.

5. 4. 4 Experimento de extensión se semillas.

Se prepararon diluciones compuestas por 10 volúmenes de solución de monómero (240 μ g/ml) y 1 volumen de suspensión de semillas (240 μ g/ml). La concentración final del monómero soluble y las semillas fue de 218 (18 μ M) y 21.8 μ g/ml (1.8 μ M de monómeros en estado fibrilar), respectivamente. Las mezclas se mantuvieron en hielo desde su preparación hasta el momento de dispensarlas en las placas de ensayo.

Los experimentos se realizaron en placas de ELISA de 96 pocillos de fondo plano. Se usaron placas COSTAR[®] estériles, de poliestireno de muy baja capacidad de adsorción de proteína (Ultra Low Cluster, Corning Incorporated, USA). En cada pocillo se dispensaron 3 μ L de solución 1 mM de ThT en PBS, pH 7.5 y 100 μ L de la mezcla monómero-semilla. La concentración final de ThT fue de 33 μ M. Después de dispensadas las muestras, las placas se incubaron por 3-5 min a 37 °C, e inmediatamente se registró la fluorescencia de ThT de cada pocillo, excitando la muestra a 450 nm y midiendo la intensidad de la emisión a 485 nm. Posteriormente las muestras se incubaron por 12 horas a 37 °C, sin agitación, y se midió la fluorescencia de ThT cada 15 minutos, como se describe antes.

5. 5 Apagamiento de la fluorescencia intrínseca con acrilamida.

Se prepararon diluciones con 25 μ g/ml de las proteínas en estado soluble o fibrilar, en PBS pH 7.4. Las soluciones de proteína se filtraron previamente por membrana 0.22 μ m de poro nominal. 3.0 ml de la muestra se transfirieron a una cubeta de cuarzo de 3.5 ml para fluorescencia (Cole-Parmer Instrument Co., Vernon Hills, IL, USA), conteniendo una micro-barra magnética de 2 mm x 7 mm cubierta de Teflón. La muestra fue colocada en el porta-cubetas de un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS 50B, cuyo sistema de recirculación se mantuvo conectado a un baño de agua termoregulado, ajustado a 25 °C. A la muestra experimental se le adicionaron sucesivamente alícuotas de 35 μ L de una solución fresca de acrilamida 3.0 M en PBS pH 7.4. Luego de dejar mezclar la solución por aproximadamente 1 min, se registró el espectro de emisión de fluorescencia intrínseca, excitando a 295 nm y midiendo la emisión de fluorescencia en el intervalo de 310 nm a 410 nm. Los slits de excitación y emisión fueron 2.5 nm y 5 nm, respectivamente. La intensidad de fluorescencia se ajustó por el efecto de la dilución, debido a la adición de acrilamida. El valor de la constante de apagamiento dinámico, o de Stern-Volmer (K_{SV}) se obtuvo del ajuste de los datos experimentales con la ecuación:⁷⁵

$$F_0/F=(1 + K_{SV}[A])\exp(K_{ST}[A])$$
 (1)

Donde F_0 y F representan la intensidad de fluorescencia en ausencia y presencia de acrilamida, respectivamente, [A] es la concentración de acrilamida y K_{ST} representa la constante de apagamiento estático.

5. 6 Análisis de la distribución y naturaleza de las mutaciones somáticas en las secuencias λ 6.

Se compilaron las secuencias de cadenas ligeras λ 6 humanas depositadas en los bancos de secuencia SwissProtein and GeneBank, para lo cual se usaron varios descriptores, como "lambda", "lambda 6", "light chain", "amyloidogenic", "amyloid", etc, tanto de forma individual como combinados. Las secuencias de nucleótidos recuperadas fueron comparadas con la del segmento de gen de V_L *6a* para descartar las pertenecientes a otros subgrupos de V λ y las identificadas como pertenecientes al subgrupo λ 6 fueron traducidas a aminoácidos. El origen de cada secuencia –natural o sintético, amiloide o policional- fue establecido a partir de la información de referencia depositada para cada una. Los genes sintéticos fueron descartados. Las mutaciones se identificaron mediante alineamiento de las secuencias compiladas con la secuencia de la proteína 6aJL2, para lo cual se usó el programa ClustalX, disponible en la página web Expassy (http://ca.expasy.org).
El término "Frecuencia de Mutaciones" (FM) se calculó acorde a la siguiente ecuación:

$$FM = (C/N) \times 100 \tag{2}$$

Donde C es el número de cambios observados en una posición particular y N es el número de secuencias analizadas. Nótese que algunas secuencias carecen de la región amino-terminal y/o carboxilo-terminal, debido a que la información no fue obtenida, por lo que N no siempre es 123.

El término "Variabilidad" (V) se calculó acorde a la siguiente ecuación:

$$V = (R/19)x100$$
 (3)

Donde R es el número de residuos diferentes al codificado en la línea germinal, encontrados en una posición particular. El número 19 representa el número de opciones posibles, es decir, aminoácidos diferentes al codificado en la línea germinal.

5.7 Identificación de péptidos pro-fibrilogénicos en los V_L λ 6.

5. 7. 1 Fibrilogénesis *in vitro* de las proteínas λ 6 en presencia de tripsina.

Se prepararon diluciones con 3.0 mg/mL (249 μ M) de las proteína λ 6 en amortiguador bicarbonato de amonio 60 mM, pH 8.0 más 0.05% de azida de Na., las cuales se filtraron por membrana 0.22 μ m de poro nominal. Se tomaron dos alícuotas de 1 ml de cada solución y se depositaron en tubos plásticos con tapa de 1.5 ml. Las muestras se incubaron aproximadamente 5 minutos a 37 °C e inmediatamente se le adicionó a uno de los tubos suficiente cantidad de una solución 0.5 mg/ml de tripsina, grado secuencia (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) hasta alcanzar la relación masa:masa (m:m) de 1:200 entre la enzima y la proteína λ 6. Al segundo tubo se le adicionó igual cantidad de PBS, pH 7.4. Las muestras se incubaron inmediatamente a 37 °C con agitación constante de 500 r.p.m. en un agitador orbital con termorregulación Thermomixer Compact (Eppendorf AG, Hamburg, Germany).

A tiempos pre-establecidos se tomaron alícuotas de 20 μ L de cada muestra y se mezclaron con 550 μ L de solución de ThT 10 μ M en PBS, pH 7.4. A la mezcla se le registró el espectro de emisión de fluorescencia excitando a 450 nm y registrando la emisión entre 460 nm y 510 nm. Los slits de excitación y emisión

fueron 5.0 nm y 10.0 nm, respectivamente. La medición de la fluorescencia se realizó en una cubeta de cuarzo para fluorescencia de 0.6 ml de capacidad, en un espectrofluorímetro Perkin-Elmer LS-50B. Típicamente, las muestras se incubaron por 7 a 12 horas. Al concluir el experimento, los agregados fueron analizados al microscopio electrónico

5. 7. 2 Análisis al microscopio electrónico (M.E.)

Se realizó según el procedimiento descrito en el Anexo 2.

5. 7. 3 Análisis de la composición de los agregados fibrilares producidos durante la fibrilogénesis *in vitro* de las proteínas λ 6 en presencia de tripsina.

5. 7. 3. 1 Colección de los agregados y análisis cromatográfico de los péptidos componentes.

Luego de concluido el período de incubación, las muestras se transfirieron al hielo para detener la progresión de la proteólisis y posteriormente se centrifugaron a 14,000 r.p.m por 5 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante fue desechado y el sedimento se lavó dos veces con dos volúmenes de PBS, pH 7.4. En cada paso de lavado los agregados se sedimentaron por centrifugación en las condiciones descritas. Luego de descartar cuidadosamente el sobrenadante del segundo paso de centrifugación, el sedimento se resuspendió en 200 µl de una solución 7 M de GdnHCl en amortiguador de fosfato de Na 20 mM pH 7.4. Las muestras se incubaron por 10-20 minutos a 60 °C y posteriormente se centrifugaron a 14,000 r.p.m por 20 minutos a temperatura ambiente, para eliminar los agregados no redisueltos. Se tomaron cuidadosamente 150 µl del sobrenadante, teniendo cuidado de no arrastrar el sedimento, el cual se almacenó a 4 °C, hasta su posterior análisis. Previo al análisis cromatográfico, las muestras fueron incubadas a 37 °C por 30-40 min en presencia de Ditiotreitol (DTT) 10 mM, con agitación constante. Se tomaron 100 µl de la solución y se invectaron a una columna cromatográfica de fase reversa C18 analítica (Grace/Vydac, Cat. N. 218TP53), instalada en un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) Waters 600 Controller, equipado con un detector Waters 2487. La equilibró previamente con agua tetradestilada más ácido columna se trifluoroacético (TFA) 0.12% (amortiguador A); la elusión de los componentes de la muestra se realizó mediante un gradiente de 0% a 60% de acetonitrilo más 0.1% de TFA (amortiguador B) en 60 minutos. El flujo de la fase móvil fue de 1 ml/min. Los componentes eluidos se detectaron midiendo la A_{230nm}, ajustando la sensibilidad del detector a 0.4 U.A. Las fracciones de interés se colectaron manualmente, se secaron al vacío en un roto-evaporador Speed-Vac (Savant Instruments, Inc., Farmingdale, USA) y se almacenaron a -30 °C hasta su posterior análisis.

5. 7. 3. 2 Identificación de los péptidos componentes de las fracciones cromatográficas.

Los péptidos contenidos en las fracciones cromatograficas se identificaron mediante dos procedimientos analíticos. Uno fue la secuenciación de los primeros 4-6 residuos del extremo N-terminal mediante el método de Edman, en un secuenciador automático Beckman LK 3000 Series, disponible en el laboratorio. El segundo método fue la determinación de la masa molecular y la secuencia mediante espectrometría de masa (MS-MS). Este último análisis se realizó en la Unidad de Proteómica de nuestro instituto.

5. 7. 4 Proteólisis extensa con pepsina de los agregados fibrilares formados por péptidos de las proteínas λ 6, producidos por proteólisis con tripsina.

5. 7. 4. 1 Obtención de los agregados fibrilares.

Se prepararon alícuotas de 500 μ l de diluciones con 3 mg/ml (249 μ M) de las proteínas λ 6 (6aJL2, 6aJL2-R25G, Wil y AR) en amortiguador bicarbonato de amonio 60 mM, pH 8.0 más azida de Na 0.05%. Durante la preparación, a cada dilución se le adicionó suficiente cantidad de una solución con 0.5 mg/ml de tripsina para alcanzar a una relación m:m de 1:200 entre la enzima y el monómero. Las muestra se incubaron por 16 horas, según las condiciones descritas en el apartado 5. 7. 1. El carácter fibrilar de los agregados se corroboró mediante la medición de la fluorescencia de ThT y el análisis al M.E., como se describe en los acápites previos. Concluida la incubación, los agregados se colectaron y lavaron con PBS, pH 7.5 como se describe en el acápite 5. 7. 3. 1; con la única excepción de que, luego del segundo paso de lavado-centrifugación, los agregados se resuspendieron en 400 μ l de agua bidestilada más 0.05% de azida de Na. La

concentración de las suspensiones de agregados se determinó espectrofotométricamente a 280 nm, diluyendo 40 μ l en 360 μ l de solución 7.0 M de GdnHCI. Para el cálculo de la concentración se usó el ϵ^{280} de cada proteína, acorde a lo descrito antes.

5. 7. 4. 2 Proteólisis extensa con pepsina de los agregados fibrilares de péptidos de las rV_L λ 6.

Se prepararon diluciones con 1 mg/ml de cada agregado fibrilar en amortiguador Glicina 50 mM, pH 2.0. Las diluciones se incubaron por 10 minutos a 37 °C e inmediatamente se les adicionó suficiente cantidad de una solución de pepsina con 0.5 mg/ml (Sigma P6887) para alcanzar la relación m:m enzima:monómero de 1:20. Las muestras se incubaron nuevamente a 37°C con agitación de 500 r.p.m., en un agitador orbital con termorregulación Thermomixer Compact. Luego de 54 horas de incubación, se detuvo la reacción con la adición de suficiente volumen de solución de Tris-base 1.0 M para elevar el pH de la solución por arriba de 6.0. Los agregados se colectaron y analizaron como se describe en el acápite 5. 7. 3. 1.

5. 7. 4. 3 Identificación de los péptidos componentes de las fracciones cromatográficas.

Los péptidos contenidos en las fracciones cromatograficas se identificaron mediante los procedimientos mencionados en el acápite 5. 7. 3. 2.

5. 7. 5 Identificación de regiones del V_L λ 6 con secuencia profibrilogénica.

Se identificaron regiones del Vλ6 cuya secuencia satisface el patrón propuesto por López de la Paz & Serrano⁹⁸ para un hexapéptido fibrilogénico:

 $\label{eq:product} $$ {P}_1-{PKRHW}_2-{VLSWFNQ}_3-{ILTYWFN}_4-{FIY}_5-{PKRH}_6. $$$

donde "{X}_n" y "[X]_n" significan que el residuo *X* es, respectivamente, prohibido y permitido en la posición *n*. El patrón se representa con el código de una letra para aminoácidos y acorde al formato exigido por el programa computacional PATTINPROT, disponible en la página web Expassy (<u>http://ca.expasy.org</u>), el cual se usó para el análisis de las proteínas λ 6 y de los 31 segmentos de gen de V_L λ reportados en el VBASE.

5. 8 Recursos usados en los análisis estructurales.

En los análisis estructurales realizados en este trabajo se usaron las estructuras cristalográficas del rV_L 6aJL2 y sus mutantes 6aJL2-Phe2Ser y 6aJL2-Pro7Ser. La estructura cristalográfica de 6aJL2 (Simetría cristalográfica i4211) fue determinada por el grupo del Dr. Eduardo Horjales Reboredo (Instituto de Biotecnología, UNAM) y está en proceso de ser depositada en el Protein Data Bank.

La estructura cristalográfica de la mutante 6aJL2-Phe2Ser está en proceso de refinamiento y fue obtenida a través de colaboración con el grupo del Dr. Alan Solomon.

La estructura cristalográfica de la mutante 6aJL2-Pro7Ser fue determinada por el grupo de la Dra. Adela Rodríguez (Instituto de Química, UNAM) y ya fue depositada en el PDB. Su clave de identificación es 3B5G.

El cálculo del área relativa accesible al solvente (ASA) se realizó mediante el programa ASAView, disponible en la página web: (http://gibk26.bse.kyutech.ac.jp/jouhou/shandar/netasa/asaview/)

<u>Referencia:</u> **ASAView: Solvent Accessibility Graphics for proteins.** Shandar Ahmad, M. Michael Gromiha, Hamed Fawareh and Akinori Sarai *BMC Bioinformatics* (2004) 5:51

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6. 1 Características de la secuencia, expresión y purificación de los dominios variables recombinantes (rV_L) λ 6 modelos.

6. 1. 1 Características de secuencia de los rV_L λ 6 modelos.

La fig. 3 muestra la comparación de la secuencia de la proteína modelo 6aJL2 con la de las proteínas λ 6 Wil, AR y Jto. Las proteínas 6aJL2, Wil y Jto poseen Arg en la posición 25; la proteína AR posee Gly en la misma posición, como la mutante 6aJL2-R25G. Las proteínas Wil, Jto y AR poseen 11, 10 y 14 mutaciones, respectivamente, en comparación a 6aJL2. El análisis de la secuencia de estas proteínas indica que el segmento de gen J $_{\lambda}$ involucrado en el evento de recombinación que dio lugar a sus genes es el *jl*2. Wil y Jto poseen un residuo de Gly en la posición 108 (sistema de numeración de Kabat), el cual no es codificado por el segmento de gen *jl*2, por lo que no fue incluido en la secuencia de 6aJL2.



Fig. 3. Comparación de la secuencia deducida del rV λ 6 6aJL2 con la de las proteínas Wil, Jto, AR y 6aJL2-R25G. Los residuos que difieren de los codificados en el gen *6ajl2* están indicados y los que coinciden se representan con un punto. El sistema de numeración, así como la definición de las Regiones Determinantes de Complementariedad con el antígeno (CDRs) y las Regiones Marco (FRs) son los propuestos por Kabat el at.⁶² Los dos residuos insertados en el FR-3 (Ser68A y ser68B), característicos de las cadenas ligeras humanas λ 6, están subrayados. Las regiones codificadas por los segmentos de genes *6a* (1-95) y *jl*2 (96-107) están indicadas por flechas. Nótese que en la posición 95a, las proteínas 6aJL2, 6aJL2-R25G y AR, pero no Wil ni Jto, poseen insertado un residuo de His. Este residuo resulta de la combinación de los segmentos de genes *6a* y *jl*2 (Ver Materiales y Métodos).

6. 1. 2 Expresión y purificación de los rV_L λ 6 modelos.

El sistema de expresión usado en este trabajo, basado en el vector pSyn1 y la cepa de E. coli W3110, y las condiciones de cultivo descritas en Materiales y Métodos, permitieron producir entre 15 y 20 mg de proteína pura por litro de cultivo de los rV_L 6aJL2 y 6aJL2-R25G. Rendimiento comparable se obtuvo para algunas de las mutantes de las posiciones 2 y 7, como Phe2Pro y Pro7Ser. Otras, como Phe2Ala, se expresaron con menor eficiencia, lográndose entre 2 y 4 mg de proteína pura por litro de cultivo. En general se observó una correlación inversa entre la estabilidad termodinámica de la proteína y el rendimiento de su expresión. Sin embargo, algunas proteínas con similar estabilidad, como las mutantes Phe2Ser y Phe2Ala, mostraron rendimientos muy diferentes. La primera se expresó con rendimiento significativamente mayor que la segunda. Por otra parte, el sistema de expresión usado en las proteínas Wil y Jto, basado en el vector pET27b+ y la cepa de E. coli BL21(DE3) (Novagen, Inc., Madison, WI, USA) fue muy superior al sistema pSyn1-W3110, tanto en el rendimiento de la expresión como en el número de contaminantes que acompañan a la proteína recombinante en el extracto periplásmico. La expresión de los rV_L 6aJL2 y 6aJL2-R25G en el sistema pET27b-BL21(DE3)-YT2X-Kanamicina permitió rendimientos del orden de ≥50 mg de proteína por litro de cultivo. Este sistema hizo posible la expresión de ambas proteínas en medio mínimo enriquecido con Glucosa-C¹³ y NH₄Cl-N¹⁵, con rendimientos de 20-30 mg de proteína pura por litro de cultivo. Esto permitió realizar estudios de NMR de ambas proteínas (Para 6aJL2-R25G ver Anexo 3). Además del sistema vector-cepa-medio de cultivo, los otros dos factores que determinaron altos rendimientos en la expresión de las proteínas $\lambda 6$ fueron la inducción a densidades del cultivo superiores a A_{600} =1.2 U.A. y la incubación por más de 12 horas pos-inducción, a 20 °C con agitación constante de 100 r.p.m. La estrategia de purificación usada en este trabajo fue sencilla y relativamente económica y permitió obtener el producto recombinante con no menos del 95 % de pureza.

6. 2 Estabilidad termodinámica de los dominios variables recombinantes $(rV_L) \lambda 6$.

Como se describe en Materiales y Métodos, la estabilidad termodinámica de las proteínas 6aJL2, 6aJL2-Arg25Gly y AR se determinó mediante desnaturalización térmica y con cloruro de guanidina (GdnHCI). La desnaturalización de las proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R25G, inducida por ambos agentes y seguida por la variación de la intensidad de fluorescencia intrínseca, fue totalmente reversible, como se infiere de la total recuperación del valor inicial de intensidad de fluorescencia luego de regresar la temperatura de las muestras a la ambiente o diluir el desnaturalizante. Las curvas de desnaturalización obtenidas por ambos procedimientos mostraron una única transición cooperativa, por lo que se analizaron acorde al modelo de dos estados (Fig. 4).⁹⁹



Fig. 4. Curvas de desnaturalización con GdnHCI (A) y temperatura (B) de las proteínas V λ 6. (A) 6aJL2 (\Box), 6aJL2-R25G (Δ) y AR (\bigcirc) fueron diluidas a 50 µg/ml en amortiguador fosfato de Na 20 mM, pH 7.5, y equilibradas toda la noche en presencia de concentraciones crecientes de GdnHCI. Posteriormente, se midió la intensidad de fluorescencia intrínseca a 350 nm de cada muestra. (ver Materiales y Métodos). Las líneas representan el ajuste no lineal de los datos con la ecuación (1) y (2) del Anexo 2. (B) Las proteínas fueron diluidas a 50 µg/ml en amortiguador PBS, pH 7.5, y sometidas a un incremento continuo de la temperatura (2.4 °C min⁻¹) durante el cual se registró la variación de la intensidad de fluorescencia intrínseca a 350 nm. Los parámetros termodinámicos calculados a partir de las curvas se presentan en la Tabla I.

Proteína	Desnatura	lizació	n por calor	Desnaturaliz	zación con G	dnHCl		Fibrilogénesis in vitro			
	$\Delta \mathbf{G}_{25}^{\circ} \mathbf{c}^{a}$	T_m^b	ΔH_m^{b}	ΔG_{H2O}	- <i>m</i>	C _m	AAG ⁻ (kcal/mol)	Sistema A	Sistema B		
	(kcal/mol)	(°Ĉ)	(kcal/mol)	(kcal/mol)	(kcal/mol)	(M)	(rcai/1101)	t_{lag} (min) ^d	<i>t</i> _{lag} (min) ^d	<i>k</i> (min ⁻¹) ^e	
6aJL2	5.2	49.9	86.2	5.1±0.5	3.6	1.41	-	900	833 ± 10	0.007	
R25G	3.8	44.2	77.2	3.7±0.1	3.8	0.95	1.7	90	122 ± 1	0.030	
AR	1.4	33.2	-	N.D.	N.D	0.44	3.5/1.9	83	111 ± 6	0.018	
Wil ^f	3.0	38.3	80.0	2.2±0.9	2.3	0.83	2.1	50	159 ± 14	0.020	
Jto ^f	4.6	45.2	87.0	4.3±1.0	3.5	1.22	0.7	233	335 ± 11	0.016	
F2S	3.5	43.8	73.6	2.9±0.5	3.3	0.87	1.9	67	N.D.	N.D.	
F2A	No Reversible	44.3	No Reversible	2.2±0.3	2.5	0.87	1.9	125	N.D.	N.D.	
F2L	3.9	45.7	76.1	3.7±0.2	3.4	1.09	1.2	267	N.D.	N.D.	
F2P	3.5	43.6	73.7	2.1±0.3	2.9	0.71	2.5	133	N.D.	N.D.	
F2W	4.3	46.0	81.3	3.6±0.5	3.4	1.04	1.3	N.D.	N.D.	N.D.	
P7S	3.7	43.0	79.5	2.5±0.5	3.0	0.84	2.1	50	N.D.	N.D.	
H8P	4.4	50.1	84.8	4.5±0.4	3.0	1.48	-0.3	1000	N.D.	N.D.	
F2S-H8P	3.7	45.3	74.5	2.8±0.3	2.8	0.98	1.5	70	N.D.	N.D.	
F2L-H8P	4.1	47.8	76.5	5.5±0.8	5.0	1.1	1.1	270	N.D.	N.D.	
H8S	5.0	49.5	84.4	4.5±0.4	3.5	1.28	0.5	500	N.D.	N.D.	
P7S-H8S	3.8	43.7	79.4	N.D.	N.D.	N.D.	-	130	N.D.	N.D.	

Tabla I. Parámetros que describen la desnaturalización al equilibrio y la cinética de la fibrilogénesis *in vitro* de las proteínas λ6.

^a Calculado acorde a Pace *et al* y usando la Eq. 3 del Anexo 2. (Ver ref. 24 del Anexo 2)

^b Calculado de la representación de ΔG vs T.

^c Diferencia de estabilidad relativo a 6aJL2:

$$\Delta\Delta G_{desp} = (m^{6aJL2} \times C_m^{mut}) - (m^{6aJL2} \times C_m^{6aJL2})$$

^d Calculado mediante la extrapolación a las abscisas de la región lineal de la fase hiperbólica.⁶¹

^e Calculado del ajuste no-lineal, de mínimos cuadrados, de los datos experimentales, de acuerdo a la ecuación F_{ThT}= A/(1+exp[-*k*(t-ti)]) (Ver Materiales y Métodos en Anexo 2).

^f Los datos termodinámicos de Wil y Jto fueron tomados de la referencia 61.

N.D. No determinado.

La desnaturalización térmica de la proteína AR fue reversible, lo cual permitió calcular el Δ G del proceso; en contraste, no fue posible determinar el valor de Δ G de su desnaturalización con GdnHCI, pues debido a su baja estabilidad termodinámica a 25 °C, la región de pre-transición de su curva de desnaturalización fue prácticamente inexistente (Fig. 4). Los parámetros termodinámicos calculados para las tres proteínas, así como los previamente reportados para Wil y Jto, se muestran en la tabla I.

Contrario a lo esperado, 6aJL2 resultó ser significativamente más estable que los dominios $\lambda 6$ amiloidogénicos AR y Wil, y que Jto, como lo indican sus correspondientes valores de $\Delta G_{25}^{\circ}C$ y de $\Delta G_{H_{20}}$. También los valores de C_m y T_m de 6aJL2 (1.42 M y 49.9 °C, respectivamente) son mayores que los reportados y/o determinados para los tres dominios $\lambda 6$ de referencia (ver tabla I).⁶¹ La diferencia de estabilidad ($\Delta\Delta G_{desp}$) de AR, Wil y Jto a la desnaturalización con GdnHCl, con respecto a 6aJL2, calculada acorde a la ecuación [$\Delta\Delta G_{desp}$ =(m^{6aJL2} x C_m^{mut})-(m^{6aJL2} x C_m^{6aJL2})]⁵⁹ es de 3.5, 2.1 y 0.7 kcal mol⁻¹, respectivamente.

Llama la escasa estabilidad termodinámica del rV_L AR, que como se mencionó antes, posee la secuencia de una cadena ligera $\lambda 6$ amiloidogénica.⁹² El valor de su T_m (33.2 °C) es menor en varios grados que la temperatura media corporal. Acorde a su curva de desnaturalización térmica, la fracción de sus moléculas en estado no nativo a la temperatura corporal es superior al 90%. Esta proteína es aún menos estable que Wil, que hasta donde conocemos, es la cadenas ligeras amiloidogénicas menos estable reportada.⁵⁷⁻⁶¹ Este hallazgo confirma la tendencia de las cadenas ligeras amiloidogénicas a ser termodinámicamente inestables⁵⁷ ^{59,61}. Por otra parte, hace surgir la interrogante sobre cómo la proteína AR, que acorde a sus parámetro termodinámicos se plegaría con mucha dificultad a la temperatura corporal, pudo sobrevivir a los sistemas de control del plegamiento de las células plasmáticas, los cuales, se supone, deben eliminar a las moléculas que están plegadas inadecuadamente, o no pueden plegarse.¹⁰⁰⁻¹⁰² Se ha demostrado que la chaperona BiP, miembro de la familia Hsp70, se une a las moléculas de cadena ligeras durante su síntesis, o inmediatamente después de ésta.¹⁰³ Algunos reportes indican que las cadenas ligeras que se pliegan estable y eficientemente,

se disocian del complejo con BiP y son secretadas de la célula, mientras que las que son inestable y/o se pliegan muy lentamente permanecen unidas a la chaperona en estado reducido.¹⁰⁴ Se demostró que cuando la cadena ligera no amiloidogénica Len (kIV)⁵⁹ es expresada en células COS, sus moléculas son rápidamente oxidadas y subsecuentemente secretadas de la célula.¹⁰⁵ En contraste, la proteína amiloidogénica Sma (kIV)⁵⁹ es retenida en estado reducido en el retículo endoplásmico por un tiempo prolongado.¹⁰⁵ Se observó que una fracción de sus moléculas fueron retro-traslocadas al citoplasma, donde fueron ubiquitinadas y degradadas por la vía del proteosoma y otra parte fue condensada en forma de un agregosoma perinuclear, cuya degradación fue posteriormente promovido a través de la sobre-expresión de la chaperona citosólica Hsp70.¹⁰⁵ Ambas proteínas, Len y Sma, provienen del mismo segmento de gen de V_L, pero en virtud de las diferencias de secuencias dependientes de las mutaciones somáticas, poseen diferente estabilidad termodinámica. Len, como se verá más adelante, es significativamente más estable que Sma.⁵⁹ Estas observaciones indican que el sistema de control del plegamiento puede, en condiciones normales, reconocer y eliminar a las cadenas ligeras inestables, potencialmente amiloidogénicas. Sin embargo, la capacidad de los sistemas de control en el linfocito B puede ser excedida en condiciones de sobre-expresión de cadenas ligeras inestables y/o propensas a agregarse, como ocure en la amiloidosis AL. En relación a esta posibilidad, recientemente fue identificado un grupo de genes cuyo perfil de expresión diferencia a las células plasmáticas involucradas en la amiloidosis AL de las implicadas en mieloma múltiple y de las de individuos normales¹⁰⁶. Este tipo de variaciones pudiera estar asociado a algún grado de disfunción de los sistemas de control del plegamiento en los clones AL, lo cual pudiera explicar la secreción de proteínas tan inestable como AR.

6. 2. 1 Frecuencia de la variación Gly25 en las secuencias λ 6.

Se encontró que en 32 (26%) de las 123 secuencias de cadenas ligeras λ 6 depositadas en los bancos de secuencia, la posición 25 es ocupada por Gly (Fig. 5 y Tabla II). Gly25 se presenta en el 30% (15 de 49 secuencias) y el 23% (17 de 74 secuencias) de las proteínas amiloidogénicas y de las secuencias de origen

policional, respectivamente, que integran el conjunto analizado (Tabla II). La variación alotípica Arg25Gly parece estar asociada a la posición 43, donde se alternan los residuos Ser y Ala (Ver Fig. 5). En 80 secuencias, la posición 43 es ocupada por Ala y en 36 lo es por Ser –residuo codificado en la línea germinal 6a depositada en el VBASE.

-	Sequencias λ6	AL (%)	Policlonales (%)
Total	123 (%)	49 (40.0)	74 (60)
Arg25	88 (71.6)	34 (70)	54 (73)
Gly25	32 (26)	15 (30)	17 (23)
Otros residuos en 25	2V,1C (2.4)	-	3 (~4)

Tabla II. Frecuencia de la variante alotípica Gly 25^{87} en las secuencias $\lambda 6$ se origen amiloide (AL) y policional. Los datos expuestos fueron tomados del alineamiento presentado en la Fig. 5.

	5	15	25	35	45	55	65	75	85	95	102
12	NFMLTOPHSV	SESPGKTVTI	SCTRSSGSIA	SNYVOWYOOR	PGSSPTTVIY	EDNORPSGVP	DRFSGSIDSS	SNSASLTIS	GLKTEDEADY	YCOSYDSSNH	-VVFGGGTKL
	L			NH	F	DH	V.T.			HN	-Q
0966	S		P	F	AS	K				E-	-W
0967					RAL	R	Υ			$F\ldots F\ldots H$	Q.
24181	Y			TS	I.F	L			R	GK-	-QLR.
24182			N							TNI.	-W
24183			G	GD	AS	D				F.NN	-L
4187				.T	RAF	E	T.		ES	FDNS-	-Q
188					S.NSA				M	SG	I
.90				N	A.S	S	T.			G	-W
37		I	Y		A	D.S	T		E	NNI-	-W
838				A.F		KE				E.R	
341			T			T.K				G	I
342				DYF		S	R.		H.	HG.S-	-W.I
357	D	N	T		A.F.L			S		FADFT-	I
359	D		N		.A				<u>.</u>	TNI.	-W
549			N		NI	V			E	NN	-QI
50				TS	I.F	L			R	GK-	-QLR.
51			G	GD	AS	D				F.NN	-L
53			• • • • • • • • • • •	N	A.S	S	T.			G	-W
4	D				S.NSA				MK	SG	I
3	D			N	H		•••••		A	TKL	-W.SR.
0		• • • • • • • • • • •		DYF		s	R.		H.	HG	-W.I
0	QSAA	• • • • • • • • • • •		.T	RAF	E	T.		ES	FDNS-	-Q
9	V		N.G	L.	AS.MF	.SD	AR.	· · · · · · · · · ·	Q	ETT	-GR.
3.7	F.R	· · · · · · · · · · · · · · ·			A.S	GA	• • • • • • • • • • •	.1	• • • • • • • • • • •	FDT.	
6		· · · · · · · I · ·	•••••	• • • • • • • • • • •	A	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	• • • • • • • • • • •		• • • • • • • • • • •	Y	-ALQ.
<u>_</u>	• • • • • • • • • • •		N		·····S···	G	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	F.NIT.	
3		A		KS		K	•••••	• • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	R
0	§Q.C	• • • • • • • • • • •	1N	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	A.S	· · D · · · · · · ·	· · · · · · · · · · · · · · · ·	• • • • • • • • • •	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	A.P	-w
13	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •		· Y · · · · · · · ·	•••••	ĸ	· · · F · · · · · · ·	•••••		гчттт	- Y T V
A	 D	••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	.ıL.	A	·····	R.	· · · · · · · · V ·	L		-w
	Uu	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	D.T	GI		T		• • • • • • • • • •	Q		-w
-	.п.ть	M	T.D	R	GAL	Д, X	IN F [.]		IND.T.M.	гL С	-w
_	 D		v		AS		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	•••••			
-	u	F		Dof	A	D	D.	A		N.NH.	v
-	····	.GE	GG		AN	.NE		• • • • • • • • • •		N	
00	·	.GI	sg.g.D	TINT	AA	ĸ	R.	• • • • • • • • •	E.	AFHSL	
30		RQ.	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	м	AM	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	•••••	• • • • • • • • •		F.N.K-	
<u>∠</u>	ח	•••••	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		A		Г.	• • • • • • • • •	к	N	
22	ח		V.	v.D	A	D.DSA	MV			EN	
04	• • • • • • • • • • •	• • • • • • • • • • •			A		T.	••••••	к	· · · · · · N	
<u>, D</u>	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	•••••		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	A.IN	U	••••••	••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	• • • • • • • • • • •	K-	
20	R		V.	v.D	A	D.DSA	M	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	• • • • • • • • • • •	FN	
559					A					••••••••••••••••••••••••••••••••••••••	

AF462681			G	Τ	A					IG	N.I
AF462678			GN	Τ	A	.I.E	V			FR	-G
AF462669		.GI	GR	s	A.NI.M.	.N			M	F.D.TN	QGR.
AF462661			G	.H	AI			T		N	-W
AF115356	D		G	N	AM					F.N.K-	

<u>B</u>

6aJL2	NFMLTQPHSV	SESPGKTVTI	SCTRSSGSIA	SNYVQWYQQR	PGSSPTTVIY	EDNQRPSGVP	DRFSGSIDSS	SNSASLTIS	GLKTEDEADY	YCQSYDSSNH	-VVFGGGTKL
Jto	N		N.D		A.I		AR.			AR	R.
Z37374	D				A					Q	
Z37375					A					Q	
Z37376					A					I-	-W
Z37379			NG		A	K				DTK-	-M
Z37380					A		N.	C		KL	-W
Z84949	V.N	.AG	NR	ADHRR.	F	D	YW.		Q.DE.	FTF.RD	-LIA
Z85269					A						
Z85145		N.	G	FH	VI	L	R.			G.T-	
Z85001	S			.SP	A	.YR		.K-F	RF	H.DRAG	II.A
L40553		I.			RLV.	RA.		.TLAIPQS	N	F.HPS	
L40554		EGS.		H	G	KKL		s	A	H.NFHP	-W
L40589		Q			A		I.	S		LMMAAL-	-G
L40591		I		G	KL	RR		.KTL	D.DTG.	CM.LA	T
AY190823					V	D			Q	G	-W
AF386245					A					K-	-L
AF386160										T-	
AF386145											-T
AF386138					A						-LGC
AF063770	T.I			.DF	A	Y	F			S.TT	-QR.
AF063733		.GT	T	FL.	AI					TR.P	-AR.
AF063721		F	V		A	TYI.	R.	A	RD		I
AF063714		EV.			AA	DR	T.	AI	RA	S.GSS	T.
AF063699					A					G.TF	-YTV
AF060128			N	.D	I			N		I-	-WV
AF018265		L	AG			F	T.			E.P	-W
AF103724		S.	Y	F	RA	K	T.				-Q
AF103717		G	TF.	NT		SR	A	.D		S.RDYQ	R.
AF103712		I			A	T				G.L-	L
AJ578357	QSV	P			A		V			SY	-W
AJ426366										P	RWQ.
AJ426364										T-	-WQ.
AJ426322		A									-HGA
AB064195											
AB064194					A						
AB064193					A			.D		Q	
AB064191				s	A.I	T			Q	AY.	-W
AB064190					A	D.G				FD.	-GA

AB064189					AL	D	F	–		FHDTK-	-QM
AB064229					A			–			-W
AB064232					A			–		Q	
AB064234					AM			–			
AB064235					A			–			-W
AJ241392			II		A	${\tt V} \ldots \ldots \ldots $	I.	–		LIY	$-W \dots V$
AJ241410		E		K.	RIF	K		–		H	
AJ496503										\dots L	-W
AJ578301		.GQ	A	NSFL.	$\dots T \dots F$	D	V.G.	V	I	FATI-	MQ.
AJ578358				\mathtt{NT}			V		A	TNTQ	
L41061	E	L	AG			F	T.			E.P	-W
Z84834			D		A					Q	
Z84864				C	A					ENS	-W
AJ241413				N.F						T-	-R
<u>AF103665</u>		I.	N	N.F	A		V			G.TP	-W.L
AF386105										•••••	
<u>Z37378</u>			G	F	A	.N.R				NRN	
Z84905		N.	G.G		ATF	DA	T.		M	S.GNFY	-R
<u>z85003</u>			G		A.A				RN.	F.TTR-	L
<u>z85002</u>	K	A	G		A.S						-W
AF063753			G.G	FE	.D.V.SI.V.	D		.Y	E		
AF047253			G	D	AS	H	P	FF		F.NH	-SI
AF047251			G		A					T.Q	-G
AF047250			G	F	A					NS-	LW
AF047249			G	.K	T			FF		T.Q	-G
AF127129			G		A.M	RK	R.			E	
AB064196			G		A					Q	
AB064192			G		A	SE			Q	GV	-W
AB064028			GT		RA	A.D				L	-W
AJ233716	E		G	D	AL.	.A	GT.		E	F.G	
AF047252			G	D			FV		.P	FQ	
AF103680		.GQ	GTG.N	.SF	AH	HR	V	AL.		TT.Q	-AH.
AJ410919			G	.Y	I	H	E			N.Q	G
AF047263		.GR	SVNT.N		.DNA.NIF	D	I.	FF	SP	HDTT-	I
AF047264	F.	.G	SVNN		.DNA.NIF	D	FI.	\dots -F \dots F	SP	HDTT-	I
AJ276098			C	.I		G				N	

Fig. 5. Alineamiento de las 123 secuencias λ6 compiladas de los bancos de secuencias (GenBank, IMGT, SwissProt), que incluyen (A) 49 cadenas ligeras amiloidogénicas (AL) y (B) 74 secuencias de proteínas policionales (con la única excepción de Jto, que es una proteína monocional no amiloidogénica). El alineamiento fue realizado con el programa ClustalX, basado en la secuencia de 6aJL2, las secuencias se agruparon acorde al residuo que ocupa la posición 25. Nótese que en 15 de las secuencias AL y en 17 de las policionales, este residuo es Gly. En el alineamiento se muestran únicamente los primeros 110 residuos (Posiciones 1-104, según numeración de Kabat⁶²). Un punto representa identidad con la secuencia de 6aJL2 y un guion representa una brecha en la secuencia.

6. 2. 2 Influencia de la mutación Arg25Gly en la estabilidad termodinámica de 6aJL2.

Los experimentos de desnaturalización al equilibrio de la proteína 6aJL2-R25G demostraron que la substitución Arg25Gly disminuye significativamente la estabilidad del dominio 6aJL2 (Fig. 4). Los valores de ΔG_{H2O} (3.8 kcal mol¹) y ΔG_{25oC} (3.7 kcal mol¹) de 6aJL2-R25G son inferiores a los correspondiente de la silvestre. También son inferiores los valores de C_m (0.95 M) y T_m (44.2 °C). La diferencia de estabilidad ($\Delta\Delta G_{desp}$) de la variante 6aJL2-R25G con respecto a la silvestre, calculada acorde a la ecuación referida antes,⁵⁹ es de 1.7 kcal mol⁻¹. (Tabla I). La buena correspondencia observada entre el valor de ΔG calculado mediante desnaturalización caotrópica y por temperatura, tanto de 6aJL2 como de su variante R25G sugiere que los valores de ΔCp estimados para la desnaturalización térmica de ambas proteínas por el método teórico de Milardi y col.,¹⁰⁷ son adecuados.

6. 3 Fibrilogénesis *in vitro* de los dominios variables recombinantes (rV_L) λ 6.

6. 3. 1 Cinética de fibrilogénesis in vitro determinada en presencia de ThT (Sistema A).

Se ha propuesto un modelo de polimerización dependiente de nucleación para explicar la cinética de la fibrilogénesis *in vitro* de varias proteínas globulares –incluyendo a las cadena ligeras de inmunoglobulinas humanas.^{61,71,108} Este modelo propone dos fases: 1) Nucleación y 2) Extensión. Durante la primera fase, como su nombre lo indica, se forman núcleos a través de un proceso termodinámicamente no favorecido, que supone repetidos eventos de asociación de los monómeros solubles.¹⁰⁸ Una vez formados estos, la adición secuencial de los monómeros se favorece termodinámicamente, iniciándose la fase de extensión. Esta se caracteriza por el rápido incremento de la masa de agregados fibrilares, reflejándose en el aumento exponencial de la señal usada para seguir su formación.¹⁰⁸

El tiempo transcurrido hasta la formación de los núcleos se denomina tiempo de latencia (t_{lag}) y, dado que el proceso de fibrilogénesis es dependiente de nucleación, refleja la capacidad fibrilogénica de la proteína.^{61,71,108}. Mientras más corto es el t_{lag} mayor es esta capacidad.

Una propiedad común de los agregados amiloides es la afinidad por colorantes de tioflavina (S o T), con los cuales forman complejos que emiten fluorescencia, típicamente con el máximo alrededor de 480 nm.⁸ Esta propiedad ha sido usada para diseñar ensayos *in vitro* que permiten determinar la cinética de la fibrilogénesis, tanto de proteínas globulares como péptidos.^{8,61,97,109}

La fig. 6 muestra la fibrilogénesis *in vitro* de las proteínas λ 6, a 100µg/ml (8.3 µM) en presencia de 20 µM de ThT en PBS. Como lo indica el incremento de la fluorescencia de ThT en función del tiempo, todas las proteínas formaron agregados fibrilares con una cinética que se ajusta al modelo de polimerización dependiente de nucleación. Sin embargo, se observaron diferencias de una proteína a otra (Fig. 6 y Tabla I).



Fig. 6. Fibrilogénesis *in vitro* de los rV_L λ 6 6aJL2, 6aJL2-R25G, Wil, AR y Jto en el sistema A (Ver Materiales y Métodos). Las curvas representan la variación de la intensidad de fluorescencia de ThT a 482nm, excitando la muestra a 450 nm. Las flechas indican la duración del período de latencia (t_{lag}), calculado acorde al procedimiento propuesto en la referencia 61. En el recuadro se presenta el t_{lag} calculado para cada proteína.

La fibrilogénesis *in vitro* de 6aJL2 se caracterizó por un tiempo de latencia (t_{lag}) de aproximadamente 900 minutos (15 horas) lo cual es más de un orden de magnitud mayor que el tiempo medido para la proteína Wil (50 min., 0.8 horas) y casi cuatro veces el t_{lag} de Jto (233 min., 3.9 horas). La proteína AR se agregó con un tiempo de latencia de aproximadamente 83 min. (1.4 horas), comparable a Wil.

La mutación Arg25Gly incrementó significativamente el potencial fibrilogénico de 6aJL2. El t_{lag} de la mutante 6aJL2-R25G fue de 90 min (1.5 horas), un orden de magnitud menor que el de la silvestre.

También se observaron diferencias en relación a la pendiente de la fase de extensión, que refleja la velocidad de la reacción de agregación, así como en el valor de fluorescencia de ThT alcanzado al final de esta fase, indicativo de la cantidad de agregados fibrilares acumulados. La extensión de las fibras de 6aJL2-R25G, Jto y Wil fue más rápida que en AR y 6aJL2. Sin embargo, la cantidad de agregados acumulados al final de la extensión fue

similar en AR, Wil y 6aJL2 (Fig. 6). Estas diferencias probablemente reflejan la termodinámica de la fase de extensión de las fibras y/o el desigual aporte de la nucleación heterogénea en cada caso.⁶¹

6. 3. 2 Fibrilogénesis in vitro en ausencia de ThT (Sistema B).

La fibrilogénesis in vitro de las proteínas $\lambda 6$ se estudió mediante un segundo sistema experimental que no requiere de la presencia inicial de ThT en las soluciones de ensayo (Ver Materiales y Métodos). En este sistema, que denominamos B, la formación de los agregados fibrilares fue evaluada paralelamente en alícuotas tomadas a diferentes tiempos, a las que se les adicionó ThT y se les determinó la intensidad de fluorescencia. Concluido el experimento, se determinó la naturaleza amiloide de los agregados mediante diferentes métodos (absorción de luz en presencia de rojo Congo, dicroísmo circular y microscopía electrónica de transmisión).¹⁰⁹ La Fig. 7 muestra la cinética de la agregación fibrilar de las proteínas $\lambda 6$ en el sistema B. En la tabla I se muestran los valores que describen la cinética de cada proteína, calculados según se describe en Materiales y Métodos. Similar a lo observado en el experimento de fibrilogénesis en tiempo real (sistema A), la cinética de agregación en ausencia de ThT se ajustó al modelo de polimerización dependiente de nucleación.61,71,108 En general, se observó aceptable correspondencia entre los valores de t_{lag} calculados en ambos sistemas. En el sistema B, como en el A, las proteínas Wil, AR y 6aJL2-R25G mostraron mayor capacidad fibrilogénica que 6aJL2, cuyo t_{lag} fue entre 5 y 7 veces más largo que el de éstas. El comportamiento de Jto fue intermedio en ambos sistemas. Notablemente, la cinética de la mutante 6aJL2-R25G mostró la fase de extensión más rápida, con una k =0.030 min⁻¹, más de 4 veces mayor que el valor correspondiente a la silvestre (k = 0.007 min⁻¹ ¹). En el sistema B, la fase de extensión de AR se caracterizó por una pendiente más acentuada que en el sistema de fibrilogénesis A. Esto indicaría que la velocidad de formación de los agregados fibrilares de AR fue mayor en ausencia de ThT (comparar figs. 6 y 7). La posibilidad de que la extensión de las fibras de esta proteína sea inhibida parcialmente por la presencia de ThT debe ser evaluada en el futuro.



Fig. 7. Fibrilogénesis *in vitro* de los rV_L λ 6 6aJL2, 6aJL2-R25G, Wil, AR y Jto a 200 µg/mL (16.6µM) en PBS, incubados a 37°C con agitación consante (Sistema B). Para cada proteína se representa la media ± una desviación estándar de la intensidad de fluorescencia de ThT a 482 nm, determinada a muestras triplicadas. La línea sólida representa el ajuste no lineal, por mínimos cuadrados, de los datos acorde a la ecuación F_{ThT}= A/(1+exp[-*k*(t-ti)]) (Ver Materiales y Métodos en Anexo 2).

Se observó correlación inversa entre los valores de t_{lag} y *k* calculado a partir del experimento en el sistema B (Fig. 8). Las proteínas que mostraron mayor eficiencia de nucleación, también extendieron más eficientemente sus fibras. Similar correlación ha sido reportada para la fibrilogénesis espontánea de varios péptidos y proteínas.¹¹⁰



Fig. 8. Correlación entre el tiempo de latencia (t_{lag}) y la constante de velocidad (k) de la fase de extensión de la fibrilogénesis *in vitro* de las proteínas $\lambda 6$, determinados en el sistema B. El t_{lag} fue calculado mediante la extrapolación a las abscisas de la región lineal de la fase hiperbólica.⁶¹ La *k* fue calculada del ajuste no-lineal, de mínimos cuadrados, de los datos experimentales, de acuerdo a la ecuación F_{ThT}= A/(1+exp[-*k*(t-ti)]).

6. 3. 3 Propiedades espectroscópicas y características ultra-microscópicas de los agregados fibrilares λ 6.

Concluidos los experimentos de fibrilogénesis *in vitro* en ausencia de ThT (sistema B), la morfología de los agregados fue analizada mediante microscopía electrónica de transmisión. Adicionalmente, a las muestras finales se les registraron espectros de emisión de fluorescencia en presencia de ThT, de absorción de luz en presencia de rojo Congo y de dicroísmo circular. El objetivo primario fue corroborar la naturaleza amiloide de los agregados.⁶

6. 3. 3. 1 Emisión de fluorescencia en presencia de Tioflavina T.

Como se muestra en la figura 9 y también se infiere de las Figs. 6 y 7, los agregados formados por las proteínas λ 6 unen ThT y emiten fluorescencia, en la mayoría de los casos, con máximo situado alrededor de los 480 nm, lo cual es característico de los complejos formados por la unión de ThT a las fibras amiloides.^{8,109} La excepción son los agregados de la mutante 6aJL2-Arg25Gly, cuyo máximo de emisión de fluorescencia en presencia de ThT está desplazado hacia el azul, situándose alrededor de los 475 nm (Fig. 9). Este corrimiento se acompaña del incremento substancial del rendimiento cuántico de los complejos fluorescentes, como lo sugiere el análisis de diluciones de igual concentración de los agregados fibrilares λ 6 colectados al final del experimento de fibrilogénesis (Fig. 9B).



Fig. 9. Espectros de emisión de fluorescencia de diluciones con 20 μ g/ml de los agregados fibrilares λ 6 en PBS en presencia 10 μ M de Tioflavina T (ThT). Los agregados fueron producidos en los experimentos de fibrilogénesis *in vitro* en el sistema B. (A) Valores normalizados y (B) absolutos de la intensidad de fluorescencia.

Las diferencias en las propiedades de fluorescencia en presencia de ThT de los agregados fibrilares de 6aJL2-R25G con respecto a los de la silvestre pueden reflejar diferencias estructurales entre estas fibras. Datos experimentales recientemente publicados sugieren que las moléculas de ThT se unen a las fibras amiloides de forma tal que su eje mayor queda orientado paralelamente al eie longitudinal de estas.¹¹¹⁻¹¹³ Acorde a uno de los modelos propuestos, las moléculas de ThT se acomodan en "canales" que se forman en la superficie de las fibras como consecuencia del ordenamiento espacial alternado de las cadenas laterales de los residuos que forman la estructura β cruzada (ver Fig. 1).¹¹¹ Los autores de este modelo atribuyen el incremento de la fluorescencia a la configuración plana que adoptan las moléculas de ThT una vez que han accedido a las ranuras o canales antes mencionados. cuyo ancho de entre 6.5 y 7 Å permite el acceso de una sola molécula del colorante.^{111,114} Este modelo predice que habrá heterogeneidad en las propiedades de fluorescencia de los agregados en presencia de ThT, dependiendo de las diferencias en la secuencia de las proteínas precursoras, sobre todo si estas afectan la estructura β cruzada. La razón es que las dimensiones de los canales antes mencionados, donde se alojan las moléculas de ThT, están determinadas por el volumen y la estructura de las cadena laterales de los residuos que los delimitan.¹¹¹ Un modelo alternativo, basado en estudios espectroscópicos y de modelado molecular, propone que la unión del ThT a la fibra requiere de una cavidad mayor, de aproximadamente 8.4 Å de ancho y suficientemente larga como para acomodar dos moléculas de ThT asociadas cara-cara, lo cual sería una condición para que el cambio en las propiedades de fluorescencia del ThT sea inducido. En este caso, serían las diferencias en el microambiente molecular, dependientes de los residuos que forman la cavidad, las que explicarían variaciones en las propiedades de fluorescencia de los complejos de ThT con fibras de diferente origen.¹¹⁴ Además del efecto de la secuencia, pueden esperarse variaciones dependientes del área de la superficie fibrilar disponible para la unión del ThT, la cual puede variar en dependencia del grado de complejidad de la estructura fibrilar madura. Como se explicará más adelante, las fibras amiloides se ensamblan in vitro a través de un proceso jerárquica, que se inicia con la formación de los protofilamentos -en cuya superficie es sugerida la formación de los canales de unión del ThT antes mencionados. ^{115,116} La forma en que se asocien los protofilamentos puede determinar que cierta parte de su superficie no sea accesible a las moléculas de ThT. Como consecuencia, dependiendo de la cantidad de protofilamentos en estado libre, de la forma en que se asocien para formar las fibras maduras, de la secuencia de la proteína precursora y la estructura que adopta en el estado fibrilar –todo lo cual podría afectar el ambiente de los sitios de unión del ThT-, pueden esperarse variaciones en las propiedades de fluorescencia de los complejos con el ThT.¹¹¹⁻¹¹⁴

6. 3. 3. 2 Absorción de luz en presencia de rojo Congo.

Los espectros de absorción de luz visible en presencia de rojo Congo registrados a los agregados de las proteínas λ 6 se muestran en la Fig. 10. En presencia del colorante se observó el incremento marcado de la absorción de luz en el intervalo de 475 nm a 600 nm y el desplazamiento del máximo de absorción de 500 nm, típico del espectro de absorción del rojo Congo en ausencia de agregados fibrilares, a 540 nm, característico de los complejos formados por la unión del rojo Congo a las fibras amiloides.¹¹⁷ La mayor absorción de luz de la muestra de 6aJL2-Arg25Gly en presencia de rojo Congo indica mayor cantidad de agregados fibrilares. Sin embargo, esta diferencia no es comparable a la observada en la fluorescencia de ThT, lo cual sugiere que, si bien en la muestra de la mutante hay mayor cantidad de material fibrilar, éste tiene propiedades diferentes de fluorescencia al unir ThT con respecto a la silvestre (Ver Anexo 2).



Fig. 10. Espectros de absorción de rojo Congo en presencia de los agregados fibrilares λ 6 obtenidos en el experimento de fibrilogénesis *in vitro* en el sistema B. Los espectros de absorción se registraron acorde al procedimiento descrito en Materiales y Métodos del Anexo 2. Como referencia se incluye el espectro del rojo Congo en presencia de la proteína 6aJL2-R25G en estado soluble.

6. 3. 3. 3 Espectro de dicroísmo circular.

En la Fig. 11 se muestran los espectros de dicroísmo circular de la forma soluble y fibrilar de las proteínas λ 6. El espectro de la forma soluble se caracteriza por dos mínimos, uno menor alrededor de los 230 nm y el otro con valores de elipticidad más negativos, situado alrededor de los 216 – 218 nm. Este patrón coincide, en lo general, con lo reportado para las cadenas ligeras y otras proteínas ricas en estructura β .^{73,75,118-120} La señal de dicroísmo circular de los agregados fibrilares es significativamente más intensa que la de las proteínas en estado soluble y se caracteriza por un único mínimo alrededor de 222 nm (Fig.11). Este patrón ha sido interpretado como expresión de la formación de hojas β intermoleculares extensas.^{75,119-121} Los espectros registrados tanto a la forma soluble como fibrilar de AR, si bien en lo general poseen las características antes descritas para cada estado, son particularmente de poca intensidad, lo cual pudiera reflejar diferencias en la proporción de los diferentes elementos de estructura secundaria con respecto a los estados homólogos de las otras proteínas.

6. 3. 3. 4 Microscopía electrónica de trasmisión.

En la Fig. 12 se muestran micrografías electrónicas tomadas a las muestras de las proteínas λ6 luego de concluidos los experimentos de fibrilogénesis *in vitro* en ausencia de ThT. En todas las muestras se observan numerosos cúmulos de agregados formados por manojos de fibras no ramificadas, de longitud variable, de aspecto generalmente recto, que en algunos casos tienen cierta apariencia de rigidez. El grosor de las fibras varía, pero en general se sitúa en el intervalo de 6 a 8 nm. Si bien todos los agregados comparten las características generales de los agregados fibrilares amiloides,⁹ se observan entre ellos importantes diferencias morfológicas, principalmente en cuanto a la longitud de las fibras, el número de protofibrillas que las componen y el grado de torcimiento de estas. Los agregados de 6aJL2 están compuestos mayoritariamente de una mezcla de fibrillas aisladas de alrededor 6 nm de grosor (flecha roja Fig 12 A1) y fibras más gruesas, de aproximadamente 8 nm (flecha blanca Fig. 12 A1). Estas últimas están formadas generalmente por dos protofibrillas asociadas lateralmente, aunque en algunos casos se trenzan. Algunas fibras de 6aJL2 miden cientos de nm (flecha blanca Fig. 12 A1), en general, tienden a ser más largas que las de las otras proteínas.



Fig. 11. (A) Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de diluciones con 200 μg/ml de las proteínas 6aJL2 (círculos negros), 6aJL2-R25G (triángulos amarillos) y AR (cuadros grises) en PBS. Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de la forma fibrilar (círculos rojos) y soluble (cuadros negros) de las proteínas (B) Jto, (C) 6aJL2, (D) 6aJL2-R25G, (E) AR y (F) Wil. Los espectros de las formas agregadas fueron registrados al concluir la fibrilogénesis, acorde al procedimiento descrito en Materiales y Métodos del Anexo 2.

En contraste, las fibras de la mutante 6aJL2-Arg25Gly son más cortas y dan la impresión de estar formadas por protofibrillas muy trenzadas (Fig. 12 B1-B3) Las características observadas en las fibras de Wil y Jto coinciden en general con las reportadas previamente.⁶¹ Los agregados fibrilares de Jto tienden a ser más largos y menos trenzados que los de Wil (Fig. 12 D1-D3 y E1-E3). Las fibras de la proteína AR, como las de Wil y 6aJL2-R25G, están formados por fibrillas muy trenzadas (Fig. 12 C1), aunque tienden a ser más largas. Una parte de esta heterogeneidad podría reflejar el estadio de cada muestra en la vía de formación de los agregados. Sin embargo, abundante evidencia experimental indica que la heterogeneidad es una propiedad consistente en la fibrilogénesis, tanto de las proteínas globulares como de péptidos.¹²¹⁻¹²⁵ Se ha demostrado que puede inducirse en los agregados de una misma proteína dependiendo de las condiciones experimentales (concentración, pH, temperatura, fuerza iónica, etc.) usadas. También se ha observado que los cambios en la morfología de las fibras.¹²¹⁻¹²⁵

Algunas evidencias indican que las diferencias en la morfología de las fibras reflejan su estructura interna, incluyendo a la red de interacciones por puentes de H, uniones salinas y apolares que le confiere estabilidad.¹²⁵

Se ha sugerido que, similar a como parece ocurrir en el plegamiento de algunas proteínas, la formación de los agregados fibrilares amiloides a partir de los monómeros solubles parece ocurrir a través de múltiples vías, con varios intermediarios, algunos inter-convertibles, y más de un producto final.¹²⁵

Se ha propuesto un modelo jerárquico para explicar la formación de las fibras maduras de las cadenas ligeras *in vitro*, el cual se ha demostrado que es aplicable en lo general a otros polipéptidos fibrilogénicos.^{115,116,126} Este modelo propone al protofilamento de 2.4 nm de grosor como la unidad básica de la fibra AL. La asociación de dos de estos protofilamentos da lugar a una protofibrilla, de alrededor de 4 nm. La asociación de dos protofibrillas da lugar a una fibra de tipo I, cuyo diámetro es de 8-9 nm. Este modelo también propone que tres filamentos pueden trenzarse para dar lugar a una estructura de alrededor de 6 nm, la cual se clasifica como fibra de tipo II. Las dimensiones de las fibras de clase I y II coinciden básicamente con las de las fibras formadas por las proteínas $\lambda 6$ (Fig. 12).¹¹⁵





B1

C1





Fig. 12. Análisis al M.E. de los agregados fibrilares de las proteínas λ6 formados en los experimentos de fibrilogénesis *in vitro* en el sistema B. 6aJL2 (A1-A4), 6aJL2-R25G (B1-B3), AR (C1), Wil (D1-D4) y Jto (E1-E4). Al concluir el experimento de fibrilogénesis, se tomaron alícuotas que se secaron sobre una rejilla de Cu recubierta de Formvar. Las muestras fueron contrastadas con acetato de uranilo 3-4% y observadas en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM900 a 80 kV.

En varias micrografías se observan formas de apariencia esférica, de diámetro diverso, aunque generalmente de alrededor de 30 nm (flechas azules en Fig. 12 A1), las cuales en algunos casos están asociadas físicamente a las fibras. Este tipo de cúmulos fue más abundante en los estadios tempranos de la fibrilogénesis, observándose incluso antes de que fueran detectables formas fibrilares. Por lo general, mostraron tendencia a disminuir en número y tamaño en la medida que la fibrilogénesis alcanzó la fase de platea tardía, lo cual es consistente con la idea que son componentes de la vía cinética de formación de los agregados fibrilares. Sin embargo, dado que también se observaron en las muestras incubadas durante 48 horas o más (Fig. 12), es posible que su incorporación a las estructuras fibrilares no sea completa, es decir, una parte de estos cúmulos pudiera representar agregados que estarían fuera de la vía fibrilogénica principal.¹²⁵ Se han

reportado agregados de forma no fibrilar, algunos de apariencia similar a los observados en este trabajo, y otros con forma anular¹²⁷, que suelen acompañar a los agregados fibrilares producidos *in vitro* por las cadenas ligeras y otras proteínas fibrilogénicas, incluyendo la transtiretina.^{77,125,128} Se ha sugerido que representan formas prefibrilares, que pudieran contribuir a la actividad citotóxica asociada a los agregados amiloides.^{125,128,129} Algunas evidencias apuntan a que una propiedad inherente a estas formas prefibrilares, incluyendo a ciertos estados oligoméricos solubles, es la de insertarse en la membrana celular y formar seudo-poros, que alterarían la permeabilidad de éstas y en consecuencia, la capacidad de la célula de regular la composición de su medio interno.¹²⁹⁻¹³² Si los cúmulos no fibrilares observados en las muestras de 6aJL2 y otras proteínas λ 6, como Wil, son relevantes para la patogenia de la amiloidosis AL, resta por ser establecido.

En resumen, los datos obtenidos de los análisis espectroscópicos y al ME sugieren que las fibras formadas por las proteínas λ 6 son heterogéneas desde el punto de vista estructural y morfológico, lo cual probablemente se relaciona con diferencias en la estructura y la estabilidad del estado nativo.

6. 4 Cinética de extensión de fibras del V_L 6aJL2. Influencia de la mutación Arg25Gly.

El modelo de polimerización dependiente de nucleación propuesto para explicar la cinética de la fibrilogénesis *in vitro* a partir del precursor soluble, ¹⁰⁸ anticipa que los eventos que ocurren durante la fase de nucleación afectan la cinética de la fase de extensión. Para estudiar selectivamente la cinética de esta última fase se han diseñado experimentos de fibrilogénesis con adición de "semillas".¹³³ En este tipo de experimento se adiciona a la solución de la proteína precursora una cantidad controlada de sus agregados fibrilares fragmentados por sonicación, también llamados "semillas", los cuales hacen la función de núcleos.¹³³ Como resultado, la fase de latencia es suprimida; típicamente, se observa el incremento de la fluorescencia de ThT –o de otra señal usada en el análisis- desde el inicio del ensayo, hasta alcanzar gradualmente un valor máximo, el cual representa el estado de equilibrio.¹³³

Para evaluar de una forma más completa el potencial fibrilogénico *in vitro* de los dominios 6aJL2 y 6aJL2-R25G, se realizaron experimentos de extensión de fibras con la adición de

semillas (ver Materiales y Métodos), en los que también fueron estudiadas las proteínas $\lambda 6$ Wil, Jto y AR. En la fig. 13 se muestra un resultado típico de estos experimentos.



Fig. 13. (A) Fibrilogénesis *in vitro* con adición de semillas de las proteínas (\bigcirc) 6aJL2, (\square) 6aJL2-R25G, (\triangle) Wil, (\bigtriangledown) Jto y (\diamondsuit) AR. Las líneas sólidas representan el ajuste de los datos experimentales mediante la ecuación $F_{ThT}=A(1-e^{-kx})$, donde F_{ThT} significa la fluorescencia de ThT, A es el valor de fluorescencia asintótico y k (s⁻¹) es la constante de velocidad del proceso de extensión. (B) La constante de pseudo-primer orden de la extensión fibrilar fue calculada mediante el ajuste lineal de los valores ln(A-F_t). F_t es el valor de fluorescencia de ThT al tiempo *t* (s).

En correspondencia con lo esperado, las muestras control -monómeros solubles sin semillas y semillas sin monómeros solubles- no mostraron variación significativa de la fluorescencia de ThT. En contraste, todas las muestras de monómeros solubles en presencia de semillas mostraron incremento de la fluorescencia sin evidente fase de latencia, indicativo de la formación de agregados fibrilares a expensas de las semillas presentes en las muestras. La velocidad de extensión de las fibras, entendida como la variación de la fluorescencia de ThT en función del tiempo, fue diferente de una proteína a otra. Consistentemente, la velocidad de extensión de las fibras 6aJL2-R25G fue mayor que la de la silvestre. De acuerdo al valor de intensidad de fluorescencia al punto final del experimento, que correlaciona con la cantidad de agregados fibrilares acumulados, la cantidad de estos fue alrededor de 2.5 veces mayor en las muestras de 6aJL2-R25G que en las de 6aJL2 (Tabla III).

Proteína	A _{ThT} ^a (%)	<i>k</i> [⊳] (s⁻¹) x 10⁻⁵
6aJL2 ^d	100	4.90 ± 0.02
R25G ^d	262	7.03 ± 0.05
Wil	94	8.05 ± 0.05
Jto	160	6.03 ± 0.06
AR	277	7.37 ± 0.07

Tabla III. Parámetros que describen la cinética de la extensión de las fibras amiloides $\lambda 6$ en los experimentos de fibrilogénesis con adición de semillas.

^a A_{ThT} representa el valor de fluorescencia asintótico normalizado con respecto a 6aJL2.

 ^{b}k (s⁻¹) es la constante de velocidad del proceso de extensión.

^d Media de seis experimentos independientes.

Las proteínas amiloidogénicas Wil y AR mostraron diferente capacidad para extender sus fibras. La fracción de los monómeros solubles de Wil que se polimerizó fue similar a la estimada para 6aJL2; en contraste, la proteína AR se comportó similar a la mutante 6aJL2-R25G. Jto mostró un comportamiento intermedio (Fig. 13 y Tabla III). La validez de estas afirmaciones se basa en la suposición de que no hay diferencias marcadas en la capacidad de unión de ThT de los agregados fibrilares $\lambda 6$ obtenidos por extensión, ni en el rendimiento cuántico de los complejos fluorescentes que forman. La Fig. 14 muestra los espectros de emisión de fluorescencia de ThT en presencia de 17 µg/ml de fibras de las proteínas 6aJL2 y 6aJL2-R25G, obtenidas por extensión de semillas en condiciones similares a las usadas en el experimento mostrado en la fig. 13. Se observó que las fibras de extensión de 6aJL2 emiten aproximadamente un 30% más de fluorescencia en presencia de ThT que las de la mutante 6aJL2-R25G. El máximo de emisión de fluorescencia de ambas fibras por extensión se sitúa alrededor de 480 nm, a diferencia de los agregados fibrilares de 6aJL2-R25G obtenidos por agitación, cuyo máximo de emisión se sitúa alrededor de 475 nm (comparar las fig. 9 y 14). Las diferencias observadas no obstante no contradicen la aparente mayor capacidad de la proteína 6aJL2-R25G para extender sus fibras, en comparación con la silvestre.

La Fig. 15 muestra micrografías electrónicas de los agregados por extensión de 6aJL2 y su variante R25G, así como los de AR. Las fibras de extensión de 6aJL2-R25G son largas y su grosor es de alrededor de 5 nm, similares a las fibras de 6aJL2 (flechas rojas en Fig. 15 A y

B). Fibras similares también se observan en la micrografía de AR (flechas rojas en Fig. 15C).
Este hallazgo contrasta con las diferencias observadas entre los agregados de estas proteínas obtenidos por agitación (Fig. 13, B1-B3).



Fig. 14. Espectros de emisión de fluorescencia de Tioflavina T (ThT) 10 μ M en presencia de 17 μ g/ml de las fibras producidas por extensión de semillas de las proteínas (\Box) 6aJL2 y (Δ) 6aJL2-R25G, diluidas en PBS.



Fig. 15. Análisis al M.E. de los agregados fibrilares de las proteínas λ 6 formados en los experimentos de extensión de semillas. 6aJL2 (A), 6aJL2-R25G (B) y AR (C).

En la micrografía de AR también se observan fibras más gruesas, de aproximadamente 10 nm (flechas blancas en Fig. 15C), algunas de las cuales están asociadas en parejas (flechas azules en Fig. 15C).

El desconocimiento del mecanismo molecular de la agregación fibrilar amiloide complica la interpretación cuantitativa de los experimentos de extensión de fibras por sembrado de semillas. Los estudios realizados con diferentes proteínas y péptidos, incluyendo a las cadenas ligeras, han demostrado que la extensión de las fibras amiloides se ajusta a un modelo cinético de primer orden, es decir, los monómeros solubles se adicionan uno a uno al extremo de la fibra en crecimiento.^{133,134} La velocidad de la extensión fibrilar depende tanto de la concentración de monómeros solubles como del número de extremos fibrilares disponibles para la adición de éstos. Sin embargo, en ausencia de procedimientos drásticos que puedan fragmentar las fibras en crecimiento, como la agitación enérgica, se asume que el número de extremos fibrilares disponibles no varía apreciablemente durante el experimento. Por lo anterior, la contribución de esta variable a la cinética del proceso queda incluida en la constante de seudo-primer orden que describe la proporcionalidad entre la velocidad de la extensión y la concentración de monómeros solubles.^{133,134} Este acercamiento fue usado para determinar la constante de velocidad (k) de la extensión de las fibras de las proteínas $\lambda 6$. Ésta se calculó a partir del ajuste lineal de los valores de ln[A-Ft] en función del tiempo (Ver Materiales y Métodos y Fig. 13B). La k es expresión de la eficiencia o rapidez con que ocurre la extensión fibrilar. Se encontró que la k de la mutante 6aJL2-R25G ($k_{R25G} = 7.0 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) fue mayor que la de la silvestre ($k_{6aJL2} = 4.9 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) y similar a la calculada para la proteína amiloidogénica AR ($k_{AR} = 7.3 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$) (Tabla III). Sin embargo, fue la proteína Wil la que mostró un valor de k mayor en las condiciones experimentales establecidas ($k_{Wil} = 8 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$). El valor de k de la extensión de Jto fue intermedio con respecto a 6aJL2-R25G y 6aJL2 (Tabla III y Fig. 13).

Acorde al modelo cinético propuesto, se asume que la extensión de las fibras amiloides procede hasta que se alcanza una concentración de monómeros solubles, denominada crítica, o de equilibrio $[M]_e$, a la cual se igualan las velocidades de asociación y disociación de estos, por lo que la velocidad del proceso se hace cero. ¹³³⁻¹³⁶ Debido a que el número de extremos aceptores aportados por las fibras no varía durante el proceso, la velocidad de la extensión estaría determinada por el valor de *k* y por la concentración efectiva del

monómero, la cual sería la diferencia entre la concentración a t = 0 menos el valor de [M]_e. La [M]_e ha sido considerada expresión de la termodinámica de la extensión y se ha estimado, mediante cuantificación directa, en el intervalo de 0.2-1.0 μ M para el péptido A β_{1-40} .^{136,137} Este valor equivale a la K_d de la fibra y corresponde a un Δ G para la reacción de extensión de -9 kcal mol⁻¹, comparable al Δ G_{pleg} de una proteína monomérica. Se ha demostrado que el valor de [M]_e puede ser modificado por cambios en la secuencia de la molécula. Por ejemplo, la de la variante S26P del péptido A β_{1-40} es de entre 6.8 y 8.1 μ M, lo cual indica una reacción de extensión de extensión termodinámicamente menos favorecida que para la molécula silvestre.¹³⁶

Acorde a esta interpretación, la proteína Wil, sería la más eficiente de las proteínas $\lambda 6$ estudiadas en extender sus fibras (Tabla III). Sin embargo, su estado fibrilar estaría termodinámicamente menos favorecido que el de otras proteínas, como 6aJL2-R25G, AR y Jto, como lo sugiere la menor cantidad de sus agregados fibrilares acumulados al equilibrio, indicativo de un valor de [M]_e mayor. En línea con este razonamiento, la mutación Arg25Gly parece incrementar tanto la eficiencia de 6aJL2 para extender sus fibras y como la estabilidad de estas. El mayor valor de *k* de 6aJL2-R25G sugiere que los cambios que la mutación R25G promueve en la estructura y la termodinámica de la molécula de algún modo son favorables para el mecanismo de agregación fibrilar (Ver Anexos 1 y 2). En este contexto, se observó que el valor de k correlaciona inversamente con la estabilidad termodinámica de los monómeros $\lambda 6$ (Fig. 16). En contraste, no se observó correspondencia significativa entre k y A_{ThT}, valor de fluorescencia asintótico indicativo de la cantidad de agregados fibrilares acumulados al equilibrio (Tabla III y Fig 13). La correlación observada entre el valor de *k* y la estabilidad del monómero está en armonía con la hipótesis termodinámica de la agregación fibrilar.

La posición de AR en el sistema de coordenadas representado en la Fig. 16 podría tener varias explicaciones. Una es que a 37 °C el equilibrio de AR está completamente desplazado al estado totalmente desplegado, condición que podría favorecer menos la extensión de las fibras que estados con estructura más compacta. Estos últimos serían más abundantes a temperaturas cercanas a la T_m . Una explicación alternativa, no excluyente, es que a la temperatura experimental las fibras de AR sean inestables, desensamblándose parcialmente. Relación similar a la observada en este experimento ha sido reportada para la lisozima.¹³⁸



Fig. 16. Correlación entre la *k* de la extensión de fibras por adición de semillas y los parámetros (A) C_m, (B) ΔG_{H2O} , (C) T_m y (D) ΔG_{25oC} , que describen la estabilidad termodinámica de las proteínas λ . (\Box) 6aJL2, (\bigcirc) Jto, (\triangle) 6aJL2-R25G, (\bigtriangledown) Wil y (\diamondsuit) AR. Los datos termodinámicos fueron tomados de la tabla I y la *k* de la tabla III.

Se observó que a tiempos relativamente largos la extensión de las fibras de Wil y AR y menos pronunciadamente de 6aJL2-R25G, se desvían del modelo cinético de seudoprimer orden (Fig. 13B). Coincide que estas tres proteínas son las menos estables termodinámicamente, lo cual sugeriría como una posible explicación, la nucleación espontánea de los monómeros solubles. Sin embargo, el comportamiento de los controles no apoya esta posibilidad. Otra posible explicación podría relacionarse a cambios en la estructura de las fibras, que modificaran la cinética de la extensión y/o su unión con el ThT. En este contexto, debe hacerse notar que no se ha establecido si la longitud de las fibras influye en la cinética y/o termodinámica de la extensión. Surge la interrogante de si las diferencias observadas en la cantidad de agregados fibrilares acumulados al equilibrio reflejan diferencias en la [Me] entre las proteínas λ 6 o están determinadas por la diferente capacidad de las fibras λ 6 para crecer. Se necesita estudiar más detalladamente la extensión de las fibras λ 6 para responder debidamente esta interrogante.

En resumen, se observó correspondencia entre los resultados obtenidos en los experimentos de sembrado de semilla y los de fibrilogénesis *in vitro* a partir del precursor soluble (Sistema B). En ambos experimentos, las proteínas Wil y 6aJL2-R25G manifestaron la mayor

eficiencia de extensión de las fibras, expresada ésta en el valor *k* del proceso, y 6aJL2 fue la menos eficiente. También en ambos experimentos las proteínas Wil y 6aJL2 mostraron fases de extensión relativamente breves. Llama la atención que en ambos tipos de experimentos las proteínas con Gly25 (6aJL2-R25G y AR) mostraran mayor capacidad para extender sus fibras que las que poseen Arg25 (6aJL2, Jto y Wil).

6. 5 De cómo 6aJL2 nos ayuda a estimar la contribución del segmento de gen 6a al problema λ 6.

La naturaleza de la contribución del segmento de gen 6a a la anormal proclividad de las cadenas ligeras λ 6 a la deposición amiloide debe evaluarse en términos de cómo y en qué medida este factor genético contribuye a las propiedades globales del V_L λ 6, en particular a aquellas que se han identificado como importantes para la agregación fibrilar. Numerosos estudios han demostrado que la estabilidad termodinámica determina el potencial fibrilogénico *in vitro* de las cadenas ligeras.^{52,56-61,70-78} En este trabajo y en otros previos se ha demostrado que la duración de la fase de latencia de la fibrilogénesis de las cadenas ligeras correlaciona inversamente con su estabilidad termodinámica.^{57,59-61,70,71,73-78} También ha sido bien documentada la tendencia de las cadenas ligeras amiloidogénicas a ser inestables.^{57,59-61}

Basado en estos antecedentes se postuló que la proteína modelo 6aJL2, que posee la secuencia de la línea germinal *6a,* debería caracterizarse por ser de baja estabilidad termodinámica y alto potencial fibrilogénico, comparable a las cadenas ligeras amiloidogénicas λ 6 Wil⁶¹ y AR. Tal hipótesis aporta una explicación sencilla y directa al comportamiento pro-amiloidogénico, casi inherente, de las proteínas λ 6.

Contrario a lo esperado, el rV_L 6aJL2 resultó termodinámicamente más estable y menos propenso a la agregación fibrilar *in vitro* que las proteínas Wil y AR (Fig. 4, 6 y 7). En adición y más relevante aún, esta proteína resultó más estable y menos fibrilogénica que la proteína Jto y también más estable que virtualmente todas las cadenas ligeras amiloidogénicas cuyos parámetros termodinámicos han sido reportados.^{57,59-61} En la Fig. 17 se presenta la distribución en un eje de coordenadas de varias cadenas ligeras λ y κ , tanto amiloidogénicas como no amiloidogénicas, de acuerdo a sus valores de ΔG_{unf} y C_m. Los parámetros termodinámicos de 6aJL2 son cuantitativamente superiores a los de las proteínas

amiloidogénicas. Sin embargo, también se hace evidente que 6aJL2 es sustancialmente menos estable que las proteínas κ 4 Len y κ 1 Rei, las cuales son los prototipos de cadenas ligeras no amiloidogénicas.^{57,59}



Fig. 17. Comparación de los parámetros de estabilidad, Δ*G*_{unf} y C_m, reportados para proteínas κ y λ. Los valores de 6aJL2 (☆) y 6aJL2-R25G (★) fueron tomados de la tabla I. Los datos de las cadenas ligeras amiloidogénicas $[V_{\lambda}6 \text{ Wil}^{61} (\blacktriangle), V\kappa 1 \text{ Bif}^{60} (♥), V\kappa 4 \text{ Rec}^{59} (♠), V\kappa 4 \text{ Sma}^{59} (♠)] y no amiloidogenicas [κ1 Gal⁶⁰ (□), Vλ6 Jto⁶¹ (∇), κ2 Rei⁵⁷ (△), κ4 Len⁵⁹ (♦), MM-κ1¹⁸⁴ (O)] fueron reportados previamente.$

La secuencia de la proteína Len difiere en dos posiciones con respecto a su línea germinal, incluyendo el segmento J κ y en sólo una con respecto al segmento de gen de V κ B3, el único componente del subgrupo $\kappa 4$.⁵⁷ Estudios de mutagénesis sitio-específica indican que estas mutaciones influyen marginalmente en la estabilidad termodinámica de Len,⁵⁷ lo cual sugiere que el V_L de línea germinal κ 4 es tan estable como Len (7.7 kcal mol⁻¹) y más estable que su homólogo 6aJL2. Notablemente, las dos únicas proteínas amiloidogénicas κ 4 que han sido estudiadas hasta el presente, Sma y Rec, son menos estables que 6aJL2.⁵⁷ Si asumimos que la proteína Len representa una referencia aproximada de la estabilidad termodinámica de la línea germinal κ 4, entonces la línea germinal λ 6 representaría una condición de mayor riesgo de deposición amiloide que su homólogo κ 4. El $\Delta\Delta G_{desp}$ de las proteínas Rec y Sma con respecto a Len es de 4.4 y 2.6 kcal mol⁻¹,⁵⁷ mayor que la diferencia de 2.1 kcal mol⁻¹ calculada entre Wil y de 6aJL2 (Tabla I). Dicho de otro modo, el camino a recorrer, en términos de acumulación de mutaciones desestabilizantes, hasta alcanzar la condición termodinámica compatible con la agregación fibrilar *in vivo*, sería más largo para las
proteínas κ 4 que para las λ 6, debido a la menor estabilidad termodinámica relativa de la línea germinal de estas últimas. En este contexto, es trascendente que dos estudios independientes hayan encontrado que las cadenas ligeras λ 6 amiloidogénicas poseen en promedio menos mutaciones somáticas que las homólogas pertenecientes a otros subgrupos de V_L λ y κ . En conclusión, la estabilidad termodinámica de la línea germinal λ 6, representada en la proteína modelo 6aJL2, no explica el comportamiento patológico de las proteínas λ 6. Sin embargo, su relativa cercanía a la región donde se distribuyen las cadenas ligeras amiloidogénicas, como se representa en la Fig. 17, sí podría representar una condición de riesgo.

6. 5. 1 Influencia de la variación alélica Arg25Gly.

A diferencia de Wil, que se originó de una proteína semejante a 6aJL2, AR aparentemente tuvo su origen en una proteína con Gly25, como la mutante 6aJL2-R25G.^{86,87,92} La sustitución Arg25Gly disminuye en 1.7 kcal mol⁻¹ la estabilidad termodinámica de 6aJL2 (Fig. 4 y Tabla I) e incrementa sustancialmente su potencial fibrilogénico in vitro, en términos tanto de la capacidad de la proteína para formar núcleos como para extender sus fibras (Figs. 6, 7 y 13). Por sus parámetros termodinámicos, la mutante 6aJL2-R25G se compara a la proteína amiloidogénica κ 4 Rec e incluso es menos estable que la amiloidogénica κ 4 Sma y que la proteína $\lambda 6$ no amiloidogénica Jto (Fig. 17).^{57,61} Estas características sugieren un mayor riesgo de deposición amiloide para las cadenas ligeras derivadas de la línea germinal λ 6 con la variación alotípica Gly25, en comparación a las derivadas de 6aJL2. Esta condición podría incrementarse ulteriormente como consecuencia de las mutaciones somáticas. Las propiedades de la proteína amiloidogénica AR parecen apoyar esta hipótesis. AR es sustancialmente menos estable que Wil,⁶¹ sin embargo, el $\Delta\Delta G_{desp}$ de esta proteína con respecto a 6aJL2-R25G es de 1.9 kcal mol⁻¹, ligeramente menor que el calculado para Wil con respecto a 6aJL2 (Tabla I). Aunque llamativa por su notable efecto termodinámico, la variación alotípica Arg25Gly no parece ser el factor determinante de la amiloidogenicidad de las cadenas ligeras $\lambda 6$, pues sólo está presente en una fracción de éstas (Fig. 5 y Tabla 2). Sin embargo, no puede descartarse que influya en la evolución clínica de los pacientes, en términos de la localización tisular de los depósitos, la cantidad de éstos y/o el inicio y severidad de los síntomas de disfunción orgánica. Esta posibilidad representa un campo de investigación muy atractivo.

El efecto de la mutación Arg25Gly en la estabilidad de 6aJL2 puede explicarse a partir de las relaciones estructurales de Arg25 en el estado nativo de la proteína. En Wil⁸⁸, Jto⁸⁸ y 6aJL2, los residuos Arg25 y Phe2 se sitúan espacialmente cercanos y orientados de tal forma que se establece interacción entre el anillo aromático de Phe2 y el grupo guanidinio de Arg25 (Fig. 18).



Fig. 18. Motivos estructurales de las cadenas ligeras $\lambda 6$. (A) Residuos que forman la cavidad apolar (Leu4, Arg25, Asp92 y Val97) en la cual se sitúa la cadena lateral de Phe2 en la estructura de Jto (Cadena A PDB 1CD0). Los residuos se representan en forma de bastones, en el interior de la representación semi-transparente de esferas llenas, y se identifican con el código de una letra. (B) Estructura del asa CDR-1 y conformación de los residuos de las posiciones 2, 4 y 25 en Jto (gris) y en la cadena ligera $\lambda 1$ Kol (Cadena A PDB 2FB4).

Este tipo de interacción, que se denomina catión- π e involucra las cadenas laterales de un residuo aromático y uno básico, es relativamente frecuente en las proteínas, estimándose en una cada 77 residuos.^{139,140} Se postula que su contribución a la estabilidad del plegamiento está en el orden de -2.9 ± 1.4 kcal/mol, aunque estudios recientes sugieren que, en algunos casos, pudiera ser menor.¹³⁹⁻¹⁴¹ La supresión de la interacción catión- π entre Arg25 y Phe2 probablemente explique parte de la disminución en estabilidad asociado a la mutación Arg25Gly. También pudiera estar contribuyendo a este efecto la eliminación de una red de interacciones por puente de H que establece Arg25 con residuos del asa CDR-1.⁸⁸ La implicación de Arg25 en las interacciones que definen la estructura del CDR-1 también podría ser parte de la explicación de las diferencias entre 6aJL2 y su mutante 6aJL2-Arg25Gly. Como consecuencia de las restricciones que impone la voluminosa cadena lateral

de Arg25 a la conformación del CDR-1, esta asa adopta un tipo de plegamiento no helicoidal en las proteínas λ 6 Jto y Wil, diferente a lo descrito para otras cadenas ligeras λ . El reconocimiento de las bases estructurales de este plegamiento y sus diferencias con los patrones descritos para el CDR-1 de otras cadenas ligeras demostró que representa una nueva clase de estructura canónica. Los argumentos a favor de esta propuesta fueron publicados, y el artículo de referencia se anexa a este documento (ver Anexo 1).

De acuerdo al modelo de las estructuras canónicas de los anticuerpos,^{142,143} la sustitución Arg25Gly en las cadenas ligeras λ 6 debe inducir el plegamiento helicoidal del CDR-1, lo cual influiría en la conformación de otras regiones del dominio. En la estructura nativa de Jto, y Wil, la cadena lateral de Phe2 se acomoda en una cavidad cuyas paredes la forman los residuos Leu4, Val97, los metilenos de la cadena lateral de Arg25 y parte de la cadena lateral de Asp92 (Fig. 18A).⁸⁸

El posicionamiento de Phe2 en esta cavidad contribuye a que el segmento N-terminal, entre los residuos 1 y 3, adopte una conformación extendida, diferente a la que caracteriza al segmento correspondiente en las cadenas ligeras λ 1 Rhe y Kol (Fig. 18B).

En estas últimas proteínas, el asa CDR-1, de igual longitud que en las proteínas λ6, se pliega en forma helicoidal debido a que poseen Gly en la posición 25.^{142,143} La superposición de las estructuras de Kol y Jto demuestra que el espacio que ocupa la cadena lateral de Phe2 en Jto está parcialmente ocupado en Kol por el CDR-1 (Fig. 18B). Postulamos que una consecuencia similar resulta de la sustitución Arg25Gly en la proteína 6aJL2, es decir, el plegamiento helicoidal del CDR-1 en esta proteína desplazaría a Phe2 de la posición que ocupa en 6aJL2, lo cual modificaría la conformación del segmento N-terminal (residuos 1-14). Como se analizará en detalle más adelante, este segmento participa en una red de interacciones que involucra a residuos de diferentes partes del dominio. El desplazamiento de Phe2 de su posición probablemente desfavorezca algunas de estas interacciones, lo cual explicaría la disminución de estabilidad del dominio y el aumento de su propensión a agregarse en forma fibrilar.

La interacción catión- π entre los residuos 2 y 25 está presente en las cadenas ligeras λ 4 del axolotl mexicano (*Ambystoma mexicanum*)¹⁴⁴ y del ratón silvestre (*Mus spretus*),¹⁴⁵ con las cuales las proteínas λ 6 humanas comparten la misma estructura canónica para el CDR-1 (Anexo 1). En las proteínas del axolotl y el ratón silvestre, los residuos implicados son Tyr2-

Arg25 y Phe2-Arg25, respectivamente. Esto apunta a que la interacción catión- π 2-25 apareció tempranamente en los homólogos de λ 6 y ha sido conservada a lo largo de la evolución, hasta el humano, lo cual sugiere que es importante para la estructura y/o la función de esta familia de cadenas ligeras. Debe hacerse notar que λ 6 no comparte esta interacción con ninguna otra cadena ligera humana.^{86,88}

6. 6 Consecuencias de la sustitución de Phe2 en la estructura, la estabilidad termodinámica y la cinética de fibrilogénesis *in vitro* del dominio 6aJL2.

Para comprender mejor las bases estructurales del aporte de la interacción Phe2-Arg25 a la estabilidad del V_L λ 6, se construyeron mutantes de 6aJL2 por sustitución de Phe2 por Ala, Ser, Leu, Pro y Trp. Como podría esperarse, estas mutaciones disminuyeron la estabilidad termodinámica de 6aJL2, tanto a la desnaturalización térmica como por GdnHCI, aunque el efecto dependió del residuo sustituto (Tabla I, Fig. 19). Las mutantes menos estables a la desnaturalización con GdnHCI fueron Phe2Pro ($\Delta G_{H2O} = 2.1$ kcal mol⁻¹ y C_m = 0.71M) y Phe2Ala ($\Delta G_{H2O} = 2.2$ kcal mol⁻¹ y C_m = 0.87 M) y las más estables fueron Phe2Leu ($\Delta G_{H2O} = 3.7$ kcal mol⁻¹ y C_m = 1.09M) y Phe2Trp ($\Delta G_{H2O} = 3.6$ kcal mol⁻¹ y C_m = 1.04M). El $\Delta \Delta G_{desp}$ estimado para las mutantes de Phe2 con respecto a 6aJL2 varió entre 1.2 y 2.5 kcal mol⁻¹ (Tabla I).

Las proteínas menos estables a la desnaturalización térmica fueron Phe2Ser ($\Delta G_{25oC} = 3.5$ kcal mol⁻¹ y T_m = 43.8 °C) y Phe2Pro ($\Delta G_{25oC} = 3.5$ kcal mol⁻¹ y T_m = 43.6 °C) y la más estable Phe2Trp ($\Delta G_{25^{\circ}C} = 4.3$ kcal mol⁻¹ y T_m = 46.0 °C). La mutante Phe2Leu ($\Delta G_{25oC} = 3.9$ kcal mol⁻¹ y T_m = 45.7 °C) fue sólo ligeramente menos estable que Phe2Trp. La desnaturalización por calor de Phe2Ala fue parcialmente reversible, lo cual impidió calcular el $\Delta G_{25^{\circ}C}$, sin embargo, el valor de la T_m aparente (44.3 °C) fue ligeramente superior a los correspondientes de Phe2Ser y Phe2Pro.



Fig. 19. Curvas de desnaturalización con GdnHCI (A) y temperatura (B) de las proteínas V λ 6. (A) 6aJL2 (\Box), 6aJL2-R25G (\triangle) F2S (\diamondsuit) y F2P (\bigcirc). Las líneas representan el ajuste no lineal de los datos de intesidad de fluorescencia intrínseca a 350 nm con la ecuación (1) y (2) del Anexo 2. (B) Las curvas representan la variación de la intensidad de fluorescencia intrínseca a 350 nm en función de la temperatura. Los parámetros termodinámicos calculados a partir de las curvas se presentan en la Tabla I.

En general, la correspondencia entre el valor de Δ G calculado por desnaturalización térmica y por desnaturalización caotrópica no fue tan buena en estas mutantes como lo observado en la proteínas 6aJL2 y su mutante 6aJL2-R25G. Esta diferencia puede tener varios orígenes, como la no equivalencia termodinámica de las formas totalmente desplegadas que se obtienen para las mutantes por ambas vías. Sin embargo, es más probablemente se deba a una elección incorrecta del mecanismo de desnaturalización y/o la estimación inexacta del Δ Cp.^{61,99}

El aminoácido Trp guarda cierta semejanza con Phe en cuanto a sus características de polaridad y naturaleza aromática de su cadena lateral. Ello puede explicar que Phe2Trp sea una de las mutantes más estables. Notablemente, en la estructura cristalográfica de la mutante Phe2Ser, el segmento amino terminal adopta una conformación diferente a la que posee en 6aJL2 y en Jto⁸⁸ y similar a la observada en la proteína λ 1 Kol (Figs. 18B y 20). En la mutante Phe2Ser, el extremo de este segmento está flexionado en dirección al solvente, lo cual permite que la cadena lateral de Met3 se oriente en dirección opuesta y se sitúe en el espacio que normalmente ocupa la Phe2. Esta conformación expone al hidroxilo de Ser2 al solvente, con cuyas moléculas de agua puede interactuar favorablemente.



Fig. 20. (A) Segmento de la estructura de 6aJL2, donde se muestra otra vista de la cavidad apolar que ocupa Phe2. (B) Segmento correspondiente de la mutante de 6aJL2 por sustitución de Phe2 por Ser. Nótese que la cadena lateral del residuo 3 (Met) ocupa el lugar que originalmente ocupaba la cadena lateral de Phe2.

Las mutantes Phe2Leu y Phe2Trp poseen estabilidad termodinámica comparable a 6aJL2-Arg25Gly y superior a las mutantes Phe2Ser y Phe2Pro. Una posible explicación de estas diferencias podría ser que en las mutantes por Leu y Trp, sea el residuo de la posición 2 el que ocupa la cavidad apolar descrita y no Met3, como en Phe2Ser. Para comprobar esta hipótesis, se realizó un experimento de apagamiento de fluorescencia con acrilamida en el que se comparó el comportamiento de la mutante Phe2Trp, con respecto a mutantes puntuales por Trp de los residuos Gly100, Lys103 y Thr105 (Ver Materiales y Métodos). Las posiciones 100, 103 y 105 se localizan en la hebra β borde G y acorde a la estructura cristalográfica de 6aJL2, están orientadas hacia el solvente. En correspondencia con la información estructural, la constante de Stern-Volmer (K_{SV}), que refleja la dependencia de la fluorescencia con respecto a la concentración del apagador, es varias veces superior en el estado soluble que en el fibrilar en las mutantes por Trp de las posiciones 100, 103 y 105. Esto significa que el Trp mutante está expuesto al solvente en el estado soluble, pero muy poco expuesto en el estado fibrilar (Fig. 21 y Tabla IV).



Fig. 21. Apagamiento de fluorescencia intrínseca por acrilamida de las mutantes de 6aJL2 Phe2Trp (círculos), Gly100Trp (cuadrados), Lys103Trp (triángulos) y Thr105Trp (diamantes). Se representa la media de dos conjuntos de datos, ± una desviación estándar de la variación de la fluorescencia (F_o/F) en función de la concentración de acrilamida. Las líneas sólidas representan el ajuste de los datos acorde a la ecuación 1 (Materiales y Métodos). Los símbolos llenos corresponden a las formas fibrilares y los vacíos a las formas solubles de las proteínas. En el inserto se muestra una representación esquemática de la ubicación de los residuos mutados.

Proteína	K _{sv}	K _{ST}	χ²	R ²
F2W soluble	5.3 ± 0.0	0.77 ± 0.02	0.0001	0.999
F2W fibrilar	4.5 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.002	0.995
G100W soluble	28.3 ± 0.7	0.21 ± 0.03	0.019	0.998
G100W fibrilar	3.5 ± 0.2	0.13 ± 0.10	0.002	0.988
K103W soluble	10.1 ± 0.2	0.59 ± 0.03	0.004	0.998
K103W fibrilar	2.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1	0.004	0.998
T105W soluble	18.8 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.085	0.994
T105W fibrilar	4.3 ± 0.1	0.24 ± 0.05	0.001	0.997

Tabla IV. Parámetros calculados de los ajustes mostrados en la Fig. 21, acorde a la ecuación 1. K_{sv} y K_{st} representan las constantes de Stern-Volmer y de apagamiento estático, respectivamente. Los valores de χ^2 y R^2 corresponden a los ajustes mostrados en la Fig. 21.

La mutante Phe2Trp mostró un comportamiento radicalmente diferente, pues, tanto en el estado soluble como en el fibrilar, el valor de K_{SV} fue pequeño, similar al calculado para los estados fibrilares de las mutantes de las posiciones 100, 103 y 105. Esto indica que en la mutante Phe2Trp el Trp2 es poco accesible al solvente, tanto en la forma soluble como agregada de la proteína. Una posible interpretación de estos resultados es que el Trp2 esté ocupando la cavidad apolar que normalmente ocupa la Phe2 en la silvestre. Debe tenerse en cuenta que el extremo amino terminal no posee mucha libertad conformacional, pues algunos de los residuos de este segmento, como la Leu4, están comprometidos en contactos con componentes del núcleo apolar del dominio.

La sustitución de la Phe2 modificó la cinética de fibrilogénesis *in vitro* del dominio 6aJL2 y como podía esperarse, el efecto fue una función del costo termodinámico de la mutación. La mutante Phe2Ser mostró el *t*_{lag} más breve, el cual es un orden de magnitud menor que el de 6aJL2 y similar al de la proteína amiloidogénica Wil. El comportamiento de Phe2Ala y Phe2Pro es comparable al de Phe2Ser, en oposición, Phe2Leu muestra una cinética de agregación más lenta, comparable a la de Jto (Fig. 22 y Tabla I). Como se observa en el recuadro de la Fig. 22, el análisis al ME de los agregados colectados en éste y otros experimentos de fibrilogénesis *in vitro* de varias de las mutantes de Phe2 confirmó que estos poseen la morfología característica de los agregados fibrilares similares al amiloide.



Fig. 22. Fibrilogénesis *in vitro* del rV_L λ 6 6aJL2 y sus mutantes F2S, F2A, F2L y F2P a 100 µg/mL (8.3µM) en PBS más ThT 20µM, en el sistema A (Ver Materiales y Métodos). Las flechas indican la duración del período de latencia (t_{lag}), calculado acorde al procedimiento propuesto en la referencia 61. En el recuadro se presenta el código de colores y el t_{lag} calculado para cada proteína. En el inserto del extremo derecho se muestra una micrografía electrónica de los agregados fibrilares de la mutante F2S.

Las propiedades termodinámicas y de fibrilogénesis *in vitro* de las mutantes de la posición 2 son coherentes con los datos aportados por la mutante 6aJL2-R25G y aportan sustento adicional a nuestro postulado sobre la importancia de la interacción Phe2-Arg25 en la red de interacciones que estabilizan el dominio variable λ 6. Además, sugieren que el debilitamiento de las interacciones que estabilizan la conformación del segmento N-terminal promueve los reajustes estructurales que llevan a la agregación fibrilar de la proteína.

6. 7 Influencia de las mutaciones en las posiciones 7 y 8 sobre la estructura del segmento amino-terminal del V_L .

En las cadenas ligeras de inmunoglobulinas, el segmento amino terminal (en el V_L λ 6 corresponde a los residuos 1 a 13) se sitúa entre las hebras β B y G, las cuales son hebras bordes del sándwich β del V_L. Esta conformación espacial es estabilizada por una red amplia de puentes de H entre los grupos del esqueleto peptídico del segmento amino-terminal y de ambas hebras β (Fig. 23).



Fig. 23. Red de interacciones y motivos estructurales que estabilizan la conformación del segmento aminoterminal del rV_L 6aJL2. Los residuos involucrados se representan en forma de bastones y se identifican con el código de una letra. Las líneas punteadas representan interacciones por puente de H entre grupos de la cadena peptídica del segmento amino-terminal y grupos complementarios ubicados en las hebras β B y G.

Entre la hebra β B y el segmento amino-terminal se forma un par de puentes de H que involucra a los grupos carbonilo y amida de la cadena principal de Thr5 y Thr24.

Adicionalmente, se establece una interacción de tipo catión- π entre Phe2 y Arg25, cuya relevancia estructural ya fue demostrada en este trabajo. A nivel de la Pro7 el segmento amino-terminal gira en dirección a la hebra β G, a lo cual probablemente contribuye una red de interacciones por puente de H entre Gln6, Pro7 y Thr102. A partir del par His8-Arg103 y hasta el par Glu13-Leu107, se establecen interacciones por puentes de H entre los grupos de la cadena principal de los residuos enfrentados de ambos segmentos del dominio (Fig. 23). Este motivo estructural se denomina "cambio de hoja β ",¹⁴⁶ y determina que la mayoría de los grupos donadores y aceptores de puentes de H en ambas hebras β borde, B y G, estén comprometidos en interacciones con el segmento amino-terminal y no disponibles para interacciones promiscuas con grupos complementarios de otras moléculas. En otras palabras, el segmento amino-terminal protege al V_L de la agregación al desfavorecer las potenciales interacciones intermoleculares de las hebras β borde B y G.^{146,147}

El papel estructural del segmento amino terminal es también definido por las interacciones que establece con el núcleo apolar del dominio a través de los residuos Leu4, Gln6 y Val 11. Estas consideraciones permiten anticipar que la función protectora del segmento amino terminal depende críticamente de la conservación de la red de interacciones que estabilizan su conformación, de las cuales depende también, en alguna medida, la integridad estructural del dominio.¹⁴⁸ El análisis de las estructuras sugiere que Pro7 y probablemente His8, son piezas claves de esta red de contactos. Para determinar la contribución de ambos residuos a las propiedades biofísicas y estructurales del dominio variable λ 6, se construyeron mutantes, sencillas y dobles, por sustitución de ambos en la proteína 6aJL2. Las mutantes sencillas estudiadas fueron Pro7Ser, His8Ser e His8Pro. Las mutantes dobles fueron Phe2Ser-His8Pro, Phe2Leu-His8Pro y Pro7Ser-His8Ser. La estabilidad termodinámica de estas mutantes fue determinada mediante desnaturalización térmica y con GdnHCI. En la Fig. 24 se muestran las curvas de desnaturalización térmica y con GdnHCI de algunas de estas mutantes y en la tabla I se muestran sus parámetros termodinámicos.

Los experimentos de desnaturalización al equilibrio demostraron que Pro7 desempeña un papel clave en la estabilidad del V_L λ 6. La sustitución de este residuo por Ser disminuye la estabilidad del dominio en 1.8 kcal mol⁻¹. En contraste, la influencia de los cambios en la posición 8 es significativamente menor. El carácter dominante de las posiciones 2 y 7 sobre la 8 se pone de manifiesto en las propiedades termodinámicas de las mutantes dobles. Por

sus propiedades termodinámicas, estas mutantes se asemejan más a las mutantes sencillas correspondientes de las posiciones 2 y 7 (Tabla I). Llama la atención el valor relativamente alto de ΔG_{H2O} de la mutante Phe2Leu-His8Pro, el cual es significativamente mayor que el de la mutante Phe2Leu. Sin embargo, la C_m de ambas proteínas, así como los parámetros calculados a partir de la desnaturalización térmica, son muy similares. La diferencia en ΔG_{H2O} se explica por el valor de *m* (-5.0 kcal/mol) de la mutante Phe2Leu-His8Pro, significativamente diferente al de las restantes proteínas $\lambda 6$ estudiadas (Tabla I). Este parámetro refleja la dependencia del cambio de energía libre (ΔG) de la concentración del desnaturalizante (GldHCI).⁹⁹ Estudios previos reportaron diferencias sustanciales en el valor de *m* entre proteínas que difieren en un solo aminoácido.⁵⁹ Se ha planteado que estas diferencias reflejan cambios importantes en la interacción de la forma desnaturalizada con el solvente y/o el desnaturalizante, más que desviaciones del mecanismo de dos estados (Ver ref. 24 del Anexo 2).⁵⁹



Fig. 24. Curvas de desnaturalización con GdnHCI (A) y temperatura (B) de las proteínas V λ 6. (A) 6aJL2 (\Box), 6aJL2-R25G (\bigcirc), P7S (\triangle), H8P (\diamondsuit) y H8S (\bigtriangledown). Las líneas representan el ajuste no lineal de los datos de intesidad de fluorescencia intrínseca a 350 nm con la ecuación (1) y (2) del Anexo 2. (B) Las curvas representan la variación de la intensidad de fluorescencia intrínseca a 350 nm en función de la temperatura. Los parámetros termodinámicos calculados a partir de las curvas se presentan en la Tabla I.

El efecto de las mutaciones en las posiciones 7 y 8 sobre la cinética de las fibrilogénesis *in vitro* del rV_L 6aJL2 en general guardó correspondencia con su efecto sobre la estabilidad termodinámica del dominio. La fibrilogénesis de Pro7Ser se caracterizó por un t_{lag} de 50 min, similar al de Wil y la mutante 6aJL2-Phe2Ser. Sin embargo, la fase de extensión de la primera fue de progresión relativamente más lenta y breve. La mutante His8Pro muestró

muy poca tendencia a agregarse; su fibrilogénesis se caracterizó por un t_{lag} de más de 830 min y la fase de extensión fue muy lenta y breve, comparable a la mutante His8Ser y la proteína silvestre (Fig. 25).



Fig. 25. Fibrilogénesis *in vitro* del rV_L 6aJL2 y sus mutantes P7S, H8S, H8P, P7S-H8S, F2S-H8P y F2L-H8P a 100 μ g/mL (8.3 μ M) en PBS más ThT 20 μ M, en el sistema A (Ver Materiales y Métodos). Las flechas indican la duración del período de latencia (t_{ag}), calculado acorde al procedimiento propuesto en la referencia 61. En el recuadro se presenta el código de colores y el t_{ag} calculado para cada proteína. En el inserto del extremo derecho se muestra una micrografía electrónica de los agregados fibrilares de la mutante H8P.

El análisis de la estructura cristalográfica de la mutante Pro7Ser demuestra que esta mutación induce cambios a nivel del giro, característico del segmento amino terminal, y de la conformación de la His8 (Fig. 26). Estos cambios, aunque limitados a los residuos 7 y 9, están asociados a una disminución significativa de la estabilidad termodinámica del dominio, lo cual pone de manifiesto el carácter cooperativo de las interacciones que involucran al segmento amino terminal.¹⁴⁸

La duración del t_{lag} de la fibrilogénesis *in vitro* de las mutantes de las posiciones 2, 7, 8 y 25 correlaciona con los parámetros que describen la estabilidad termodinámica de estas proteínas (Fig. 27). Esta relación puede interpretarse como expresión del aporte de las moléculas con plegamiento no-nativo al mecanismo de formación de los núcleos de las fibras. En ninguno de los casos la correlación guarda linealidad a lo largo de todo el eje de coordenadas, observándose un cierto valor de estabilidad, por debajo del cual no disminuye apreciablemente el t_{lag} . En el caso de la T_m, es interesante que la linealidad se pierde alrededor de los 44 °C, varios grados por encima de la temperatura experimental (37 °C), lo cual sugiriría que la nucleación no está limitada a la aparición de formas totalmente desnaturalizadas. Es posible que la formación de los nucleos ocurra a través de varias

etapas, en las que varios factores, además de la conformación 3D del monómero soluble, determinen la velocidad del proceso. En condiciones en las que la estructura del monómero sea cercana a la óptima, otros factores pueden limitar la velocidad a la que la nucleación ocurre.

Al margen de las observaciones que aún no pueden explicarse, opinamos que estos resultados aportan sustento adicional a los postulados sobre el papel clave de las formas de plegamiento no-nativo en el mecanismo de la fibrilogénesis *in vitro* de las cadenas ligeras.^{57-61,70-77}.



Fig. 26. Ajuste estructural de los segmentos N1-W35 y D92-L107 del rV_L 6aJL2 (gris) y su mutante P7S (Cadena A PDB 3B5G, en rojo). El ajuste fue realizado con el programa SwissPDBviewer v 3.7 y la figura fue creada con el programa PyMOL. En el inserto se representa en mayor detalle el ajuste del segmento entre los residuos L4-S12 de ambas proteínas. Nótese la diferente conformación de H8.



Fig. 27. Correlación entre el tiempo de latencia (t_{ag}) de la fibrilogénesis *in vitro* en el sistema A y los parámetros (A) C_m, (B) ΔG_{H2O} , (C) T_m y (D) ΔG_{25oC} , que describen la estabilidad termodinámica de las proteínas $\lambda 6$. Los datos termodinámicos y la *k* fueron tomados de la tabla I.

6. 8 Las mutaciones somáticas en las cadenas ligeras λ 6. Su contribución potencial a la amiloidogenicidad.

En este trabajo hemos demostrado que la proteína modelo 6aJL2 en significativamente más estable que las cadenas ligeras amiloidogénicas λ 6 Wil y AR. Este hallazgo sugiere que las mutaciones somáticas contribuyen importantemente a la alta proclividad de las cadenas ligeras λ 6 a la deposición amiloide. Para definir las posibles bases estructurales de tal contribución, se estudió la naturaleza y el patrón de distribución de las mutaciones somáticas en 123 secuencias de cadena ligeras λ 6; de las cuales 49 corresponden a proteínas amiloidogénicas (AL) –obtenidas de igual número de pacientes con el diagnóstico de amiloidosis AL- y las restantes 74 fueron obtenidas del repertorio policional de linfocitos B (Fig. 5 y tabla II). Dado los objetivos de este estudio, el mismo se basó únicamente en la secuencia de aminoácidos del V_L-posiciones 1-104-, lo cual excluyó del mismo a las mutaciones somáticas silenciosas, sólo reconocibles a nivel del gen. El alineamiento de las 123 secuencias compiladas, así como su número de acceso, se muestran en la Fig. 5.

Como se mencionó antes, alrededor de un cuarto de las secuencias $\lambda 6$ (32 de 123 secuencias) posee Gly en la posición 25. Gly25 se presenta en el 30% (15 de 49 secuencias) y el 23% (17 de 74 secuencias), respectivamente, de las secuencias de origen amiloide (AL) y policional (Fig. 5 y tabla II). La mayor frecuencia de la variante Gly25 en las proteínas AL podría estar relacionado con su efecto sobre la estabilidad del dominio, como se demostró antes (Fig. 4). Se necesita estudiar más ampliamente esta posible relación.

6. 8. 1 Frecuencia y diversidad de las mutaciones en las secuencias λ 6.

La mayoría de las secuencias λ6 posee mutaciones con respecto a la línea germinal (proteína 6aJL2); sin embargo, se encontraron 4 secuencias de origen policional (No. de acceso Z85269, AB064195, AB064194, AF386105) que no presentan cambios atribuibles a este origen (ver Fig. 5). El promedio de mutaciones en el universo de secuencias fue 8.1; en las secuencias de origen amiloides 9.5 y en las policionales 7.2. (Tabla V). El mayor número de mutaciones observado en una secuencia policional fue 26 (No. Acceso Z84949); el menor número de mutaciones en una secuencia AL fue 3 y el mayor 21 (Tabla V).

-	Secuencias AL			Secuencias policionales			Total
Parámetro	Todas	R25	G25	Todas	R25 ¹	G25 ¹	123 sec.
Promedio	9.3	9.5	8.9	7.2	6.7	7.0	8.0
Desv. Estándar.	4.0	3.7	4.9	6.0	5.1	4.1	5.4
Máximo	21	21	21	26	26	17	26
Mínimo	3	5	3	0	0	1	0

Tabla V. Estadística de las mutaciones somáticas en las 123 secuencias $\lambda 6$ analizadas en este trabajo y diferenciadas por su origen (AL o policional) y por el residuo presente en la posición 25. R25 y G25 significan secuencias $\lambda 6$ con Arg25 y Gly25, respectivamente.

¹No se incluyen las tres secuencias con residuos diferentes de Arg/Gly en la posición 25.

Por el número de mutaciones somáticas, las secuencias AL se distribuyen en dos poblaciones relativamente bien definidas. Una la forman secuencias con 3-8 mutaciones, que representa aproximadamente el 47 % del total, y la otra se compone de secuencias con más de 8 mutaciones. Las secuencias de origen policional, en contraste, se distribuyen en un intervalo más amplio y en grupos menos definidos (Fig. 28). Estas diferencias probablemente reflejan el origen diverso de las secuencias analizadas. La amiloidosis AL es una discrasia de células plasmáticas, lo cual significa que las cadenas ligeras

amiloidogénicas son producidas por células B en el estadio final de diferenciación,⁴¹ en una fracción de las cuales se ha encontrado evidencias claras de selección antigénica.¹⁴⁹ Por el contrario, las secuencias policionales provienen de células B de origen muy diverso, como la sangre periférica, las amígdalas, la médula ósea, el cordón umbilical, entre otros, lo cual puede determinar que el grado de diferenciación de los linfocitos B fuente sea desigual, así como su exposición al antígeno.¹⁵⁰



Fig. 28. Distribución de las secuencias λ 6 AL y policionales en relación al número de mutaciones somáticas. En las abcisas se representa el número de mutaciones somáticas por secuencia y en las ordenadas la fracción de secuencias, en %, que poseen igual número de mutaciones.

Notablemente, también se observaron diferencias entre las secuencias con Gly25 y Arg25 en relación al número de mutaciones. Cerca de la mitad de las secuencias con Gly25 (43 %) posee 5 ó 6 cambios; el otro grupo importante de estas secuencias son las que poseen más de 8 mutaciones. En contraste, las secuencias Arg25 se distribuyen de forma más homogénea, en un rango más amplio (Fig. 29). Similar diferencia se observó entre las secuencias policionales con Gly25 y Arg25 (Fig. 30). Como dato ilustrativo, las secuencias policionales Gly25 con 5 y 6 mutaciones representan el 47 % del total, mientras que las que poseen igual número de mutaciones en el grupo con Arg25 representan sólo el 7.4%.



Fig. 29. Distribución de las secuencias $\lambda 6$ con Arg25 y Gly25 en relación al número de mutaciones somáticas. En las abcisas se representa el número de mutaciones somáticas por secuencia y en las ordenadas la fracción de secuencias, en %, que poseen igual número de mutaciones.



Fig. 30. Distribución de las secuencias λ6 de origen policional con Arg25 y Gly25 en relación al número de mutaciones somáticas. En las abcisas se representa el número de mutaciones somáticas por secuencia y en las ordenadas la fracción de secuencias, en %, que poseen igual número de mutaciones.

Las secuencias AL se distribuyen en un modo un poco diferente (Fig. 31). Si bien las secuencias con 5 y 6 mutaciones son también mayoría entre las Gly25, su proporción es menor que en sus homólogas del grupo policional. Además, las diferencias entre las Gly25 y Arg25 de origen AL no son tan notables como las observadas entre las secuencias

policionales homólogas. Al presente, no hay antecedentes que permitan interpretar las diferencias observadas en el número de mutaciones entre las secuencias con Gly25 y Arg25, particularmente evidentes en el grupo de las policionales. Sin embargo, la relevancia estructural de la posición 25 para el CDR-1 del V_L λ 6 estimula a pensar en posibles diferencias en la biología y/o las propiedades de reconocimiento de los anticuerpos λ 6, condicionadas por el residuo en 25, lo cual podría expresarse en los mecanismos de selección cional (Ver Anexo 1).



Fig. 31. Distribución de las secuencias λ6 de origen AL con Arg25 y Gly25 en relación al número de mutaciones somáticas. En las abcisas se representa el número de mutaciones somáticas por secuencia y en las ordenadas la fracción de secuencias, en %, que poseen igual número de mutaciones.

6. 8. 2 Residuos conservados en las secuencias λ 6.

Varios residuos fueron encontrados conservados en las 123 secuencias λ 6 (Fig. 32). Estos residuos son: Leu4, Gln6, Pro7, Cys23, Trp35, Arg39, Pro44, Arg61, Asp82, Cys88, Gly99 y Thr102. Seis de estos residuos (Gln6, Pro7, Cys23, Trp35, Cys88, Thr102) son parte de un grupo de residuos que están muy conservados en los segmentos de genes de V_L de línea germinal de cadenas ligeras humanas, tanto λ como κ , así como en los genes homólogos de otras especies.⁵² Este grupo también está conservado en virtualmente todas las cadenas ligeras expresadas.⁵² Su función estructural es bien reconocida; las Cys23 y Cys88 forman el único enlace disulfuro intra-dominio, cuyo aporte a la estabilidad del V_L se estima en el orden de 4.5 kcal mol^{-1.46,47,150} En la estructura nativa, este enlace está en estrecho contacto

con el Trp35, formando parte fundamental del núcleo apolar del dominio.^{46,47} Los residuos Gln6, Pro7 (su homólogo en κ es Pro8) y Thr102 conectan, a través de una red de interacciones por puentes de H, los extremos amino y carboxilo del V_L y contribuyen a estabilizar el giro de la cadena polipeptídica a nivel de Pro7. Como se demostró en este trabajo, este motivo estructural es relevante para la estabilidad del V_L y contribuye a disminuir su propensión a la agregación.¹⁴⁶ La función estructural de los otros residuos encontrados invariantes en las secuencias $\lambda 6$ es sugerida por los contactos que establecen en el estado nativo. Leu4 conecta al segmento N-terminal con el núcleo apolar del dominio, Arg39 y Arg61 participan en interacciones salinas, esta última con Asp82. Pro44, conjuntamente con los residuos 40 y 60, el cual es parte de la interface V_H-V_L y, como se discutirá más adelante, probablemente funciona como motivo inhibidor de la agregación. Gly99 es parte del "bulbo β " situado en la hebra borde G.¹⁵² A este motivo también se le atribuye función protectora de la agregación.¹⁴⁶



Fig. 32. Residuos de aminoácidos conservados en las 123 secuencias λ 6. Los residuos son identificados con el código de una letra y son representados en el formato de bastones en color azul, con excepción de las C23 y C28, que forman el enlace disulfuro intradominio, las cuales se representan en color verde. Las figuras, que representan dos vistas rotadas 180° de la molécula de 6aJL2, fueron creadas con el programa PyMOL.

Se han aislado secuencias a partir bibliotecas de ADN complementario que poseen mutaciones que afectan residuos estructuralmente claves, como Cys23, Cys88 y Trp35. Sin

embargo, estas mutaciones no trascienden al repertorio de proteínas expresadas, debido a que son sometidas a una fuerte selección negativa, que las elimina del repertorio de células plasmáticas.⁵² Es probable que este tipo de mutaciones comprometa la viabilidad del linfocito B debido a que eliminan la capacidad del V_L para plegarse estable y eficientemente.^{52,153}

La conservación de los residuos estructuralmente claves en las secuencias $\lambda 6$, es específico en las de origen AL, sugiere que esta familia de proteínas está sometida a fuerzas de selección, basadas en requerimientos estructurales, que son similares a las que operan en las otras familias de inmunoglobulinas. Es decir, la amiloidogenicidad de las cadenas ligeras $\lambda 6$ no parece ser causada por fallos de los mecanismos de contra-selección de las mutaciones somáticas de efecto catastrófico para la estructura del V_L.⁵²

6. 8. 3 Sitios hipervariables en las secuencias λ 6.

En la Fig. 33 se muestra la relación entre la frecuencia de mutaciones y la variabilidad por posición, calculadas en el universo de secuencias –ver Materiales y Métodos. Si bien las mutaciones son más frecuentes en los CDRs, particularmente en el CDR-3 –lo cual es característico de las inmunoglobulinas-^{62,67,86} también se distribuyen en los FRs, donde son relativamente frecuentes en algunas posiciones. Por ejemplo, las posiciones 1 (FR-1), 45, 46 (FR-2), 68, 79 (FR-3) y 103 (FR-4) muestran una frecuencia de mutación relativamente alta – mayor del 15%-, siendo además muy diversas por el número de residuos diferentes encontrados en ellas. Otros sitios en los FRs, como las posiciones 3, 8, 17, 20 (FR-1), 42 (FR-2), 60, 69, 70 y 80 (FR-3) muestran una frecuencia de mutación menor del 15%, pero la diversidad de los cambios es significativamente alta.

La Fig. 34 muestra la frecuencia de mutaciones por residuo, calculada tanto para las secuencias AL como para las policionales. Aunque en general el patrón es similar en ambos grupos, se observan diferencias en varias posiciones. Las posiciones 1, 8 (FR-1), 29, 30b, 31 (CDR-1), 45, 46, 47 y 49 (FR-2) muestran una frecuencia de mutación más alta en las secuencias AL que en las de origen policional; en contraste, las posiciones 69 y 70 mutan con más frecuencia en las policionales que en las AL.



Fig. 33. Relación entre la frecuencia de mutación y la variabilidad (ver Materiales y Métodos) por residuo del V_L en las 123 secuencias λ 6. En la parte superior de la figura se señala la extensión de las regiones determinantes de complementariedad con el antígeno (CDRs) y las regiones marco (FRs), acorde al sistema de numeración de Kabat.⁶²



Fig. 34. Frecuencia de mutación (ver Materiales y Métodos) de los residuo del V_L λ 6 observada en las secuencias de origen AL y policional. En la parte superior de la figura se señala la extensión de las regiones determinantes de complementariedad con el antígeno (CDRs) y las regiones marco (FRs), acorde al sistema de numeración de Kabat.⁶²

También se observan diferencias en cuanto a la diversidad de los cambios; en general, ésta fue mayor en las secuencias policionales, lo cual podría esperarse si las secuencias AL

provinieran de una población celular sometida a una mayor selección dependiente del antígeno y/o por otro factores.^{149,150} Sin embargo, algunas posiciones en las secuencias AL, como la 8 y la 77, fueron particularmente diversas (Fig. 35).



Fig. 35. Variabilidad por posición observada en las secuencias $\lambda 6$ de origen AL y policional (ver Materiales y Métodos). En la parte superior de la figura se señala la extensión de las regiones determinantes de complementariedad con el antígeno (CDRs) y las regiones marco (FRs), acorde al sistema de numeración de Kabat.⁶²

Las posiciones que mutan con una frecuencia igual o mayor del 10% -mucho mayor que lo esperado si los cambios fueran introducidos al azar- se han denominado "sitios hipervariables". ^{52,67,154,155} En general, la distribución de estos sitios es similar en ambos grupos de secuencias, AL y policional, si bien se observan algunas diferencias relevantes (Fig. 36 y 37). Por ejemplo, las posiciones 1, 8 y 19, localizadas en el FR-1, son sitios hipervariables en las secuencias AL, pero no en las policionales. En estas últimas, son las posiciones 3 y 17 las que mutan con alta frecuencia en el FR-1. Los residuos Thr45, Thr46 y Val47 constituyen sitios hipervariables de las secuencias AL, pero no en las policionales. Estos residuos se localizan en el asa 40-60 y contribuyen a formar parte de la interface V_H-V_L. La diferente tasa de mutación de estos residuos en ambos grupos de secuencias pudiera tener alguna relación con el reconocimiento antigénico, pues las mutaciones en la interface V_H-V_L pueden modificar la afinidad de interacción del anticuerpo con el antígeno, al modificar

la naturaleza de la interacción y/o la orientación relativa de los dominios variables de las cadenas ligeras y pesadas.¹⁵⁶ No puede descartarse, por tanto, que la alta variabilidad observada en estas posiciones sea reflejo de la selección antigénica.¹⁴⁹



Fig. 36. Sitios hipervariables del V_L λ 6, cuya frecuencia de mutación en las secuencias λ 6 de origen policional (A) y amiloide (B) es igual o mayor del 10%. En la parte superior de la figura se señala la extensión de las regiones determinantes de complementariedad con el antígeno (CDRs) y las regiones marco (FRs), acorde al sistema de numeración de Kabat.⁶²



Fig. 37. Distribución de los sitios hipervariables (frecuencia de mutación \geq del 10%) en la estructura del rV_L λ 6. (A) Secuencias policionales. (B) Secuencias AL. Las figuras, que representan dos vistas rotadas 180° de la molécula de 6aJL2, fueron creadas con el programa PyMOL. Los residuos que ocupan las posiciones hipervariables se representan en el formato de bastones, en color rojo. Las asas de interacción con el antígeno CDR1 y CDR3 son señaladas.

En general, se observó buena correlación entre la accesibilidad al solvente y la frecuencia con que cada residuo muta (Fig. 38), lo cual podría esperarse para proteínas sometidas a selección en base a su capacidad para plegarse con eficiencia, dado que las mutaciones que afectan posiciones no accesibles al solvente, - ocupadas mayoritariamente por residuos apolares- suelen causar un efecto deletéreo sobre la estructura y/o la estabilidad del dominio.^{153,157} Esta observación refuerza el planteamiento sobre la funcionalidad de los mecanismos de selección de las cadenas ligeras $\lambda 6$.

Para algunos aminoácidos se observó una relación entre el codón usado en la línea germinal y su frecuencia de mutación (Fig. 39).^{67,154} Un ejemplo claro son los residuos de serina. Las serinas codificadas por *agc* y *agt*, localizadas fundamentalmente en las asas CDR-1, CDR-3 y en la posición 68 (FR-3) mutaron con una frecuencia varias veces mayor que las codificadas por *tcc* y *tct*. Estas últimas se localizan fundamentalmente en las hebras β del sándwich y a pesar de que están orientadas hacia el solvente, su papel estructural parece ser importante, debido a que contribuyen a establecer el patrón alternativo "*residuo polarresiduo apolar*" que se ha postulado como promotor de plegamiento β^{158} (Fig. 40). La relación entre el codón usado, la posición en la estructura del V_L y la frecuencia de mutaciones sugiere cómo la evolución ha operado para asegurar la funcionalidad de la secuencia 6a, en términos de su capacidad para sustentar la hipermutación somática – origen de diversidad estructural y de reconocimiento- sin que se vea comprometida la habilidad de las proteínas λ 6 para plegarse en forma eficiente y estable. ^{66,67,153,155}

Si bien el patrón de distribución de las mutaciones somáticas de las secuencias $\lambda 6$ sugiere que éstas están sometidas a procesos de selección que eliminan las mutaciones de efecto catastrófico para la estructura del dominio, sí se identificaron mutaciones, algunas de ellas relativamente frecuentes, que por su naturaleza y distribución en el V_L pudieran explicar, al menos en parte, el comportamiento anormalmente proclive de las proteínas lambda 6 a la deposición amiloide. Para su análisis, las hemos dividido en dos grupos: 1) Las que potencialmente modifican las propiedades biofísicas generales de la proteína y 2) Las que potencialmente pueden alterar la estructura del dominio y/o disminuir su estabilidad termodinámica.



Fig. 38. Relación entre la frecuencia de mutación y la accesibilidad relativa del residuo al solvente (ver Materiales y Métodos) determinada en las secuencias $\lambda 6$ (A) policionales y (B) AL. En la parte superior de la figura se señala la extensión de las regiones determinantes de complementariedad con el antígeno (CDRs) y las regiones marco (FRs), acorde al sistema de numeración de Kabat.⁶²



Fig. 39. Relación entre la frecuencia de mutación, en %, y el codón usado en el $V_L \lambda 6$ para cada residuo. El valor representado corresponde al promedio de la frecuencia de mutación observada para los residuos codificados por el mismo codón. En las abcisas se representa la combinación residuo (R) - codón (C). Por ejemplo, A-gcc significa Alanina codificada por *gcc*.



Fig. 40. Distribución de los residuos de serina en la estructura del rV_L 6aJL2, representados en el formato de bastones. Se usa un código de colores que indica el codón usado y la frecuencia de mutación observada en cada posición en las 123 secuencias λ 6. Las serinas en rojo son codificadas por *agc* y *agt* y su frecuencia de mutación es \geq 10 %. Las serinas en azul son codificadas por *tcc, tct* y *tcg* y su frecuencia de mutación es menor del 3 %. Las serinas en verde ocupan las posiciones 70, 76 y 90, son codificados por *tct* y su frecuencia de mutación es de entre el 3 y el 10%.

6. 8. 4 Mutaciones que potencialmente modifican las propiedades biofísicas generales del V_L λ 6.

6. 8. 4. 1 Solubilidad.

Varios residuos de Tyr, que se localizan en la superficie del dominio (32, 49, 87 y 91) se encontraron mutados por Phe en hasta el 15% de las secuencias (Tabla VI). Ninguno de los residuos de Tyr mencionados está involucrado en interacciones por puente de H a través del OH fenólico. Se ha comprobado que la sustitución de la Tyr49 por Phe en las proteínas κ no modifica significativamente la estabilidad de la molécula.⁵⁷ Sin embargo, la pérdida del OH fenólico, el cual hace más favorable la interacción de Tyr con el solvente, podría disminuir la solubilidad de la proteína y favorecer su agregación.^{52,159} Además, se ha demostrado que los residuos de Phe contribuyen importantemente a las interacciones que promueven la agregación fibrilar de algunos péptidos y proteínas globulares.^{160,161} Se postula que esto se debe a su habilidad para establecer interacciones por apilamiento del radical aromático de su cadena lateral.^{160,161}

6. 8. 4. 2 Punto isoeléctrico (p.l.).

Las mutaciones Asn1Asp (Frec. Mut. 11.2%), Ser30bAsp (Frec. Mut. 5%), Asn52Asp (Frec. Mut. 17%) introducen un residuo ácido, lo cual modifica las propiedades ácido-básicas de la molécula (Tabla VI). Varios estudios han encontrado evidencias de una posible relación entre el punto isoeléctrico (pl) de las cadenas ligeras y su propensión a agregarse en forma de amiloide, o como agregados de morfología diferente. Acorde a estos estudios, las cadenas ligeras amiloidogénicas se caracterizan por tener pl menor de 5.0, mientras que las cadenas ligeras implicadas en otras formas de deposición tienen típicamente pl neutro o básico.^{69,162,163} El pl ácido de las cadenas ligeras amiloidogénicas les confiere carga negativa a pH fisiológico. Se sospecha que esto puede favorecer su interacción con componentes de carga opuesta de la sustancia intercelular, lo que potencialmente aportaría sitios de anclaje que promoverían la agregación.^{69,162,163} Notablemente, 9 de las 10 mutaciones Asn1Asp y 11 de las 21 mutaciones Asn52Asp, fueron encontradas en secuencias de origen AL. La mutación Asn52Asp se observó en el 13.5% de las secuencias policionales, pero su frecuencia en las AL fue del 22.4 %.

Mutación	%	Observaciones en secuencias útiles ^a	Región
Tyr32Phe	8.9	(11 de 123)	CDR1
Tyr49Phe	10.5	(13 de 123)	FR2
Tyr87Phe	7.5	(9 de 120)	FR3
Tyr91Phe	15.1	(18 de 119)	CDR3
Asn1Asp	11.2	(10 de 89)	FR1
Ser30bAsp	5.0	(6 de 123)	CDR1
Asn52Asp	17.0	(21 de 123)	CDR2

Tabla VI. Algunas mutaciones frecuentes en las secuencias $\lambda 6$ que pueden modificar la solubilidad o las propiedades acido-básica del V_L (Ver texto).

^aSe refiere a las secuencias $\lambda 6$ en las que el residuo de la posición analizada fue reportado.

6. 8. 5 Mutaciones con potencial efecto sobre la estabilidad termodinámica del dominio.

6. 8. 5. 1 Mutaciones que suprimen interacciones salinas.

Las cadenas ligeras $\lambda 6$ son únicas entre las proteínas λ por poseer cinco interacciones salinas que estabilizan el V_L, en las que están involucrados residuos codificados en la línea germinal 6a – a excepción de Lys103 (Fig. 41). Notablemente, las interacciones salinas en el V_L de proteínas λ de los otros subgrupos, que involucran residuos de la línea germinal, varían de 1 a 3.

Las interacciones salinas del V_L λ 6 de línea germinal son las siguientes:

Glu13-Lys17: Está interacción está presente sólo en las cadenas ligeras λ 6. Su posición en el V_L sugiere que contribuye a estabilizar el asa que conecta las hebras β A (segmento amino-terminal) y B.

R39-E81-Lys79. Estos residuos forman una red de interacciones salinas que probablemente estabiliza la estructura en hélice que adopta el segmento 79-83. Este segmento es parte de una asa que conecta hebras de las dos hojas del sándwich β , es decir, es un brazo β .^{46,47} La interacción salina entre los residuos señalados conecta el final de la hebra β C con el brazo β mencionado, contribuyendo a estabilizar la región del dominio situada en el polo opuesto a los CDRs. Dado que los residuos Arg39 y Glu81 están poco conservados en los restantes segmentos de genes de V_L λ ,⁸⁶ en particular la Lys79, que es codificada únicamente en 6a, esta red de interacciones salinas puede asumirse como característica de las proteínas λ 6.

Arg61-Asp82: Esta interacción conecta las hebras β bordes D y F y está conservada en el 100% de las secuencias λ 6 compiladas, y también en todos los segmentos de genes de V_L λ .⁵² La relación espacial de los residuos Arg39, Arg61, Lys79, Glu81 y Asp82 sugiere que éstos forman, en conjunto, una red de interacciones salinas, conectando las hebras β borde D y F y el brazo β formado por el segmento 79-83 (Fig. 41C).

Arg54-Asp60: Esta interacción probablemente estabiliza la conformación del asa 40-60, conectando el inicio de la hebra β borde D con el segmento medio del asa. Estos residuos están conservados en alrededor del 75 % de los segmentos de genes de V_L λ .⁸⁶

Asp85-Lys103: La interacción entre estos residuos conecta las hebras β F y G y podría ayudar a estabilizar el "bulbo β " a nivel de la Gly100. El residuo ácido de la posición 85 está conservado en el 100% de los segmentos de genes de V_L λ . Teniendo en cuenta que sólo el segmento de gen J_L7 no codifica la Lys103, puede asumirse que esta interacción está conservada en la mayoría de las proteínas λ .^{52,86}

Significativamente, se encontró que en 41 (33%) de las 123 secuencias $\lambda 6$ uno de los residuos que participa en las interacciones salinas antes descritas ha sido sustituido por otro que no puede soportar este tipo de interacción (Tabla VI).

En 13 secuencias, 3 de ellas AL, la interacción E13-K17 está suprimida por mutación; siendo la más frecuente Glu13Gly (8 de 13 mutaciones). En 10 secuencias, la mitad de origen AL, se identificó una mutación que elimina la interacción salina Arg54-Asp60. En 9 de estas secuencias el residuo sustituido es el Asp60. La interacción K79-E81, en la que también parece estar involucrado el residuo R39, es blanco de mutaciones en 19 secuencias, nueve de ellas de origen AL. La K79 está mutada en 18 secuencias, en 3 de ellas por Glu, lo cual pudiera introducir un efecto desestabilizador adicional, por la repulsión entre este residuo y el Glu81. En 13 secuencias, 5 de ellas AL, uno o ambos de los residuos Asp85-Lys103 está sustituido.

En tres secuencias AL, dos de las cinco interacciones salinas están en, teoría, eliminadas por mutaciones. En una secuencia (No. Acceso L6HU48) las interacciones afectadas son tres.





Fig. 41. Interacciones salinas características del V_L λ 6. Las figuras son diferentes vistas de la estructura del rV_L 6aJL2. Los residuos involucrados en las interacciones son representados en el formato de bastones, en color rojo los de Arg y Lys y en azúl los de Glu y Asp. Las figuras fueron creadas en PyMOL.

No. acceso	Interacción					Origen
	E13-K17 ^a	R54-D60	R39-K79-E81	R61-D82	D85-K103	
AF490967	-	R54- Y60	-	-	D85- Q103	AL
AF124187	-	-	R39- E79 -E81	-	-	AL
AF124188	-	-	R39- M79 -E81	-	-	AL
AF320837	-	-	R39- E79 -E81	-	-	AL
AF320842	-	-	-	-	H85- K103	AL
AF320840	-	-	-	-	H85- K103	AL
AF115360	-	-	R39- E79 -E81	-	-	AL
AF462689	-	R54- A60	R39- Q79 -E81	-	-	AL
AF462676	-	-	-	-	D85- Q103	AL
P06317	-	-	R39- Q79 -E81	-	-	AL
L6HU48	-	R54- N60	R39- T79 -D81	-	M85 -K103	AL
AF054654	-	-	R39- M79 -E81	-	-	AL
P06318	G13 ^b -K17	-	-	-	-	AL
AF054655	-	R54- N60	-	-	-	AL
AF490968	G13 -K17	-	-	-	-	AL
AF124189	-	R54- N60	-	-	-	AL
AF462669	G13 -K17	-	R39- M79 -E81	-	-	AL
Total AL	3	5	9	0	5	17
Z84949	A13-G17	R54- Y60	R39- Q79 -D81	-	-	Policlonal
L40591	-	-	R39- D79 -E <i>81</i>	-	G85 -K103	Policlonal
L40589	E13 -Q17	-	-	-	-	Policlonal
L40553	-	-	R39- N79 -E81	-	-	Policlonal
AY190823	-	-		-	-	Policlonal
AF063733	G13-T17	-	-	-	-	Policlonal
AF063714	E13 -E17	-	-	-	D85 -T103	Policlonal
AF103717	E13 -G17	R54- A60	-	-	-	Policlonal
AJ578357	-	R54- V60	-	-	-	Policlonal
AJ426366	-	-	-	-	D85 -Q103	Policlonal
AJ426364	-	-	-	-	D85 -Q103	Policlonal
AJ426307	-	-	-	-	D85-V103	Policlonal
AB064191	-	-	R39- Q79 -E81	-	-	Policlonal
AJ241410	E13 -E17	-	-	-	-	Policlonal
AJ578301	G13-Q17	-	-	-	D85 -Q103	Policlonal
Z84905	-	-	R39- M79 -E81	-	-	Policlonal
Z85003	-	-	-	-	N85- K103	Policlonal
AB064190	-	G54 -D60	-	-	-	Policlonal
AF047253	-	-	R39- E79 -E81	-	-	Policlonal
AB064192	-	-	R39-K79- Q81	-	-	Policlonal
AJ233716	-	R54- G60	R39- E79 -E81	-	-	Policlonal
AF103680	G13-Q17				D85- H103	Policlonal
AF047263	G13 -K17	-	R39- S79- E81	-	-	Policlonal
AF047264	G13 -K17	-	R39- S79- E81		-	Policlonal
Total Polic.	10	5	10	0	8	24
Gran total	13	10	19	0	13	41

Tabla VII. Secuencias $\lambda 6$ con mutaciones somáticas que eliminan enlaces salinos del V_L.

^aSe refiere a los residuos involucrados en la interacción. Se indican con el código de una letra.

^bSe refiere al residuo introducido por mutación. Se indica con el código de una letra.

El aporte de las interacciones salinas a la estabilidad de las proteínas puede variar considerablemente, dependiendo de la distancia entre las agrupaciones iónicas, el grado de solvatación de ambos componentes y la interacción con otros grupos y/o redes de interacciones que potencialmente pueden incrementar o disminuir la fuerza de la interacción.¹⁶⁴ Esto determina que, en algunos casos, su aporte a la estabilidad sea alto, de 2 kcal mol⁻¹ o mayor, mientras en otros puedan inclusive ejercer efecto de desestabilización. En general se estima que los enlaces salinos aportan estabilidad en el orden de los 1.5-3.5 kcal mol⁻¹. El valor energético del enlace salino formado entre los residuos mutantes Asp30a-Arg68 en la proteína λ 6 Jto fue estimado en 1.6 kcal mol⁻¹.^{89,90} Como se mencionó previamente, es el incremento en la estabilidad, dependiente de este enlace, la causa postulada del comportamiento no amiloidogénico de esta proteína.

El número de las potenciales interacciones salinas reconocidas en el V_L λ 6 parecería sugerir que este dominio depende significativamente de este tipo de interacciones para conservar su plegamiento nativo. De ser así, las mutaciones que eliminan interacciones salinas, por su relativa alta frecuencia, podría contribuir importantemente al comportamiento fibrilogénico de las cadenas ligeras λ 6. Dado que la frecuencia de estas mutaciones en las secuencias AL es comparable a la observada en las policionales, no puede descartarse que participen del mecanismo normal de diversificación funcional de las proteínas λ 6. Puede especularse que la eliminación de ciertos enlaces salinos confiere al V_L λ 6 propiedades de reconocimiento mejoradas, como parte del proceso de maduración de la afinidad de los anticuerpos λ 6.¹⁶⁷

Sin embargo, solo el estudio de mutantes puntuales de los residuos involucrados en estas interacciones permitirá determinar con mayor exactitud su contribución a la estabilidad del V_L λ 6 y en consecuencia, estimar la potencial contribución de las mutaciones identificadas a la propensión de las proteínas λ 6 de la deposición amiloide.

6. 8. 6 Mutaciones que sustituyen residuos componentes del núcleo apolar del V_L.

El sándwich β del V_L λ 6 se estabiliza sobre un núcleo formado por residuos mayoritariamente apolares, cuyo elemento central lo forman el Trp35 y el enlace disulfuro Cys23-Cys88.^{46,47,52} Los residuos del núcleo apolar pueden dividirse en cuatro agrupaciones, de acuerdo a la cercanía entre ellos y su posición relativa con respecto al Trp35 y el enlace disulfuro Cys23-Cys88.¹⁶⁸ Los cuatro grupos de residuos son los siguientes (Fig. 42):

Grupo superior del segmento N-terminal: Lo forman los residuos Phe2, Leu4, y Val97.

Grupo inferior del segmento N-terminal: Lo forman los residuos Val11, Val19, Ile21, Leu73, Ile75, Leu78, y Leu104: Esta agrupación contacta con el Trp35 a través de Ile21 y Leu73.

Grupo asociado al asa CDR-1: Lo forman los residuos Ile30, Val33, Ile66 y Ala71. Estos residuos contribuyen a la estabilidad del plegamiento del asa CDR-1 a través de los contactos entre Ile30 y los otros tres residuos, los cuales forman una cavidad apolar donde se acomoda la cadena lateral del primero (ver Anexo 1).

Grupo asociado al asa 40-60: Lo forman los residuos Val47, Ile48, Val58 y Phe62. Esta agrupación se conecta con el grupo inferior del segmento N-terminal mediante contactos con la Leu73.

Algunos de estos residuos mutan con una frecuencia relativamente alta, teniendo en cuenta la baja frecuencia de mutación que generalmente caracteriza a los residuos apolares poco accesibles al solvente (Fig. 38).^{153,157} En la tabla VIII se muestran algunas de las mutaciones identificadas, incluyendo el número y la identidad del residuo sustituto. El potencial de estas mutaciones para disminuir la estabilidad del dominio se debe a que el residuo sustituto tiene diferente volumen y/o estructura de la cadena lateral que el codificado en la línea germinal.⁵² Por ejemplo, las mutaciones Val19lle y Val19Ala introducen residuos con mayor y menor volumen, respectivamente. Las 9 mutaciones identificadas de Val47 introducen un residuo de mayor volumen, lo cual puede ser potencialmente deletéreo, teniendo en cuenta que la accesibilidad al solvente de Val47 es prácticamente cero (Fig. 38). El efecto de las mutaciones Phe2Ser y Phe2Leu sobre la estabilidad del dominio fue estudiado en este trabajo y se demostró que la disminuyen, en particular el cambio por Ser.

Dos de los residuos que mutan con alta frecuencia en las cadenas ligeras $\lambda 6$ son Val96 y Val97 (Fig. 34), probablemente debido a que están situados cerca del sitio de recombinación V_L-J_L.⁸⁶ Ambos son codificados por los segmento J_{λ}2/3, los más frecuentemente usados en las cadenas ligeras λ , incluyendo a las λ amiloidogénicas.^{84,86} Sin embargo, en el contexto de las cadenas ligeras $\lambda 6$ ambos residuos están involucrados en contactos que son estructuralmente distintivos de estas proteínas.⁸⁸ Como se describió previamente, Val97 contribuye a formar la cavidad apolar donde se acomoda la cadena lateral de Phe2. Las mutaciones que sustituyen a Val97 por residuos cuya polaridad y/o estructura de la cadena lateral de la cadena lateral de debilitar los

contactos entre la Phe2 y los residuos que forman la cavidad mencionada. Como se demostró en este trabajo, el posicionamiento de Phe2 en esta cavidad contribuye considerablemente a conservar la estabilidad del V_L λ 6. Un efecto similar pudieran provocar las mutaciones de la Val96, debido a su cercanía espacial con Val97. Notablemente, la mutación más frecuente en la posición 96 es por Trp, lo cual pudiera ser relevante teniendo en cuenta que Val96 está poco expuesta al solvente (Figs 38 y 43). En resumen, la participación de Val97 en un motivo estructural exclusivo del dominio V λ 6 –la interacción catión- π entre Phe2 y Arg25- le confiere a las mutaciones que afectan a esta posición, así como a la 96, un efecto potencialmente desestabilizador.



Fig. 42. Residuos apolares que contribuyen a la formación del núcleo estructural de rV_L λ 6. Los residuos se representan en el formato de bastones y están agrupados acorde a como se describe en el texto. Grupo superior del segmento N-terminal en rojo, grupo inferior del segmento N-terminal en rosado, grupo asociado al asa CDR-1 en naranja, grupo asociado al asa 40-60 en azul. EL residuo de referencia Trp35 se representa en magenta y el enlace disulfuro intradominio Cys23-Cys88 en verde. Las figuras son representaciones rotadas aproximadamente 90° del rV_L 6aJL2 y fueron creadas con el programa PyMOL.

Residuo	ASA relativa (%) ^a	Residuo mutante ^b	Total mutaciones
Leu104 ^c	0	5V, 1A	6
lle30	0	2V, 1F	3
lle48	0	2M, 2V, 1T, 1L	6
lle66	27	8V, 2F, 1T	11
Val19	6	5I, 3A, 1N, 1G	10
Val33	0	1L, 1E	2
Val47	1	4I, 3L, 2M	9
Val96 ^c	27	34W, 5L, 4A, 7Q	66
Val97 ^c	3	14I, 5L, 2A, 2G, 2M, 1T	26
Phe2	7	2S y 1L	3
Phe98 ^c	55	3I, 1L,1S, 1C, 1R, 1M	8

Tabla VIII. Mutaciones somáticas observadas en 123 secuencias $\lambda 6$, que sustituyen residuos apolares.

^a Área relativa accesible al solvente. Fue calculada con el programa de computación ASAView (ver Materiales y Métodos).

^b Residuo sustituto, en código de una letra.

^c Residuos codificados por el segmento de gen *jl*2.



Fig. 43. Residuos involucrados en la cavidad apolar que ocupa Phe2 en la estructura de 6aJL2. Los residuos se muestran en formato de esferas llenas e identificados con el código de una letra, los. Nótese la relación espacial de Val96 y Val97 con el motivo estructural mencionado. La figura fue creada con el programa PyMOL.
6. 8. 7 Mutaciones que sustituyen residuos Pro y Gly con función estructural.

El motivo estructural de los dominios de inmunoglobulinas se compone de numerosas hebras β conectadas por asas.^{46,47} Estas últimas son frecuentemente estabilizadas por residuos de Pro situados en posiciones relevantes del asa. Las Pro imponen restricciones a la conformación de la cadena polipeptídica, favoreciendo la adopción de giros.¹⁶⁹ Por otra parte, los residuos de Gly también pueden tener un papel estructural en las asas. Debido a su pequeña cadena lateral, permitien que la cadena polipeptídica adopte conformaciones en sitios específicos, no admisibles para residuos más voluminosos.¹⁶⁹ Un ejemplo es el asa que comunica las hebras β A y B del V_L λ 6, cuyo giro es favorecido por los residuos Pro15 y Gly16.⁵² La naturaleza cooperativa de las interacciones que estabilizan a las proteínas permite anticipar que las mutaciones que afectan residuos de Pro y/o Gly involucrados en las asas de un dominio pueden disminuir la estabilidad de todo el dominio.¹⁶⁹ En la tabla IX se muestran mutaciones que afectan residuos de Pro y Gly con función estructural en el V_L λ 6.

Residuo	Residuo mutante ^ª	Total ^⁵
Pro15	2L	2
Pro40	2S	2
Pro55	2S, 1Y, 1A, 1L	5
Pro59	2A, 1L	3
Gly16 ^c	2E, 1R	3
Gly28 ^c	1D	1
Gly57 ^c	1R, 1A, 1E	3
Gly101 ^c	1A, 1H, 1K	3

Tabla IX. Mutaciones somáticas que sustituyen residuos de Pro y Gly con función estructural en el V_L λ6.

^a Residuo sustituto, en código de una letra.

^b Veces en las 123 secuencias $\lambda 6$.

^c Adoptan conformación con ángulos diedros en la representación de Ramachandra no permitida para otros residuos.

La función de los residuos Pro15 y Gly16 ya fue descrita. De los residuos Pro40, Pro55 y Pro59 también se mencionó su participación en el plegamiento del segmento en asa entre los residuos 40 y 60, que es parte de la interface con el V_H (Figura 44). En este segmento también se sitúan los residuos Pro44 - conservado en las 123 secuencias λ 6-, Gly41 y Gly57. La estrecha relación espacial del segmento 40-60 con las hebras β borde C y D le confiere al primero la capacidad de proteger a estas últimas de interacciones intermoleculares que potencialmente pueden llevar a la agregación.¹⁴⁶ El segmento 40-60 además, contribuye a la formación del núcleo apolar a través de residuos como Phe62 y Val58.



Fig. 44. Residuos de Pro y Gly situados en el segmento plegado en asa entre las posiciones 40 y 60 del rV_L 6aJL2. El segmento 40-60 se representa en azul, los residuos Pro40, Pro55 y Pro59 se representan en el formato de bastones en color verde. El residuo Pro44, conservado en las 123 secuencias λ 6, se representa en rojo. Los residuos Gly41 y Gly57 se representan en rosa intenso. La figura fue creada con el programa PyMOL.

6. 9 Identificación de regiones de V_L λ 6 con secuencia proamiloidogénica.

6. 9. 1 Fibrilogénesis in vitro en presencia de tripsina.

La hipótesis más recurrida sobre el mecanismo de la agregación fibrilar de las proteínas globulares es la que señala como responsable de este fenómeno a los cambios conformacionales provocados por las mutaciones y/o las variaciones del entorno microambiental.¹⁵⁻¹⁸ Abundante evidencia experimental indica que, sumado a estos cambios, otros factores, como la secuencia de regiones discretas del péptido o la proteína amiloidogénica, contribuyen esencialmente a la termodinámica del estado fibrilar.⁹⁸ Basado en estos datos, ha sido propuesta la "*hipótesis de los segmentos pro-amiloidogénicos*", o, como se conoce en la literatura de habla inglesa: "*the amyloid stretch hypothesis*", la cual postula que la amiloidegenicidad de una proteína se localiza en segmentos cortos de su secuencia.¹⁷⁰ En el caso de las cadenas ligeras, poco o nada fue publicado acerca de la existencia y/o localización de estos supuestos segmentos pro-amiloidogénicos, previo a este trabajo.

Partiendo de la hipótesis de que la alta propensión a la deposición amiloide de las cadenas ligeras λ 6 puede ser contribuida por varios factores, incluyendo a elementos de secuencia codificados en el segmento *6a*; se investigó el potencial fibrilogénico *in vitro* de los péptidos producidos por proteólisis parcial con tripsina de las proteínas λ 6. Como una aproximación inicial, se realizó un ensayo de fibrilogénesis *in vitro* de las proteínas 6aJL2-R25G, Wil, AR y Jto en presencia de tripsina (Ver Materiales y Métodos). En el experimento se incluyeron muestras de las proteínas sin la proteasa, como controles. Con la única excepción de Jto, se observó incremento de la fluorescencia de ThT en todas las muestras con tripsina en función del tiempo de incubación, lo cual es indicativo de la formación de agregados fibrilares con propiedades similares al amiloide (Fig. 45).

La cinética de la fibrilogénesis *in vitro* de la proteína 6aJL2-R25G se aceleró significativamente por el tratamiento con la proteasa. El t_{lag} de la fibrilogénesis de la muestra con tripsina de esta proteína incubada fue de aproximadamente 120 min. En cambio, la muestra sin tripsina no mostró variación significativa de la fluorescencia de ThT durante las 7 horas que duró el experimento (Fig. 45).

Si bien la agregación amiloide de las proteínas AR y Wil fue compatible con la proteólisis parcial con tripsina, el efecto de este tratamiento sobre la cinética de la fibrilogénesis fue opuesto al observado en 6aJL2-R25G. En AR y Wil se observó un aumento modesto del t_{ag}

(Fig. 45). En el caso de la proteína Jto, se realizaron varios experimentos con tiempo de incubación de más de 24 horas y se demostró que, cuando es proteolizada con tripsina, no forma fibras.



Fig. 45. Fibrilogénesis *in vitro* de los $rV_L \lambda 6$ (A) 6aJL2-R25G, (B) AR, (C) Wil y (D) Jto, en presencia (símbolos vacíos) y ausencia (símbolos llenos) de tripsina. Diluciones con 3.0 mg/mL (249 μ M) de las proteína $\lambda 6$ en amortiguador bicarbonato de amonio 60 mM, pH 8.0 más 0.05% de azida de Na., fueron incubadas a 37 °C con agitación constante, en presencia (o ausencia) de tripsina a la relación peso:peso de 1:200 entre la enzima y la proteína $\lambda 6$. A tiempos pre-establecidos se determinó la intensidad de fluorescencia de ThT a alícuotas tomadas de cada muestra.

El carácter fibrilar de los agregados formados en estos experimentos fue determinado al ME (Fig. 46). En general, los agregados están compuesto de fibras largas y de aproximadamente 5-7 nm de grosor. En las micrografías se observa que algunas fibras de AR están compuestas de 2-3 fibrillas, de alrededor de 2 nm, que se trenzan con un período de alrededor de 70 nm (Flechas blancas en Fig. 45B). Otras, por el contrarioi, tienen un aspecto liso, es decir, en estas fibras no se percibe su estructura interna (Flecha negra en Fig. 45B).



Fig. 46. Micrografías electrónicas de los agregados fibrilares producidos durante la incubación de los rV_L λ 6 (A) 6aJL2-R25G, (B) AR y (C) Wil con tripsina (ver Materiales y Métodos). Al concluir la incubación, se tomaron alícuotas que se secaron sobre una rejilla de Cu recubierta de Formvar. Las muestras fueron contrastadas con acetato de uranilo 3-4% y observadas en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM900 a 80 kV.

6. 9. 2 Identificación de los péptidos fibrilogénicos.

La tripsina escinde preferencialmente la cadena polipeptídica en las Lys y Arg cuando éstas están en posición P1, mostrando mayor actividad con Arg. La presencia de Pro en la posición P1´ bloquea la acción de la tripsina, excepto cuando Lys está en P1 y Trp en P2 al mismo (http://ca.expasy.org/tools/peptidecutter/peptidecutter enzymes.html#Tryps). Acorde tiempo а esta especificidad, la tripsina debe cortar a las proteínas AR y 6aJL2-R25G en 4 sitios (K17, R61, K79 y K103) y a las proteínas 6aJL2, Wil y Jto en 5 (a los antes mencionados se suma R25). El análisis de los agregados fibrilares por proteólisis de 6aJL2-R25G demostró que éstos están compuestos por dos péptidos de 46 y 25 residuos, respectivamente, ambos unidos por el puente disulfuro C23-C88 (Figs. 47 y 49 y tabla XI). El péptido de 46 residuos se inicia en Thr18 y se extiende hasta Arg61, lo cual incluye una parte de la hebra β borde B (FR-1), el CDR-1 y el asa 40-60 (FR-2 y CDR-2). El péptido de 25 residuos se inicia en Thr80 y se extiende hasta Lys103 e incluye parte del FR-3, el CDR-3 y parte del FR-4.46,47,62. Una composición equivalente se encontró en las fibras de AR, si bien, en lugar del péptido 17-61 se identificaron dos péptidos más cortos, ambos iniciando en Thr17, pero extendiéndose hasta Arg39 y Tyr49, respectivamente. Este hallazgo sugiere que hubo actividad inespecífica de la proteasa, probablemente inducida por las condiciones experimentales usadas y/o por particularidades de la secuencia y/o la estructura de AR (Fig. 48A y Tabla XI). Es importante hacer notar que ambos péptidos de AR incluyen la totalidad del CDR-1.

En contraste con las proteínas AR y 6aJL2-R25G, que poseen Gly25, la composición de las fibras de las proteínas 6aJL2 y Wil fue más sencilla. Se encontró que el componente más abundante de las fibras de 6aJL2 fue un péptido que inicia en Ser26 y se extiende hasta Arg39. Lo más relevante en este caso es que la escisión de la proteína a nivel de la Arg25 liberó al segmento peptídico que incluye al CDR-1 de la unión con el péptido que inicia en Thr80, pues ésta ocurre a través de la Cys23. Nuevamente se observó el corte en la Arg39, como en AR, lo cual es llamativo, debido a que este residuo es seguida por una Pro. El péptido Ser26-Arg39 incluye la mayor parte del CDR-1. Por secuenciación directa, se identificó un componente en la fibra de Wil que inicia también en Ser26. El análisis de masas identificó un componente adicional en la misma fracción, que incluye el segmento entre Phe62 y Lys79.

6. 9. 3 Análisis de la resistencia de los agregados fibrilares a la proteólisis con pepsina.

Con la intención de definir la región de los péptidos fibrilogénicos involucrada en la formación del núcleo estructural de los agregados fibrilares, se sometió a estos últimos a proteólisis extensa con pepsina. Esta estrategia ha sido usada previamente por otros autores y se basa en las evidencias que indican que el núcleo de las fibras es una estructura compacta, lo cual le confiere resistencia a la acción de las proteasas, a diferencia de las regiones periféricas, de estructura más laxa.¹⁷⁰ Se observó marcada diferencia entre los agregados en cuanto a su resistencia a la acción de la pepsina. Los agregados fibrilares de las proteínas AR y 6aJL2-R25G fueron evidentemente más resistentes a la pepsina que los de las proteínas 6aJL2 y Wil (Fig. 47 y 48). Luego de 54 horas de incubación con pepsina, se recuperaron péptidos de los agregados de 6aJL2-R25G que inician en Thr18, pero son más cortos en el extremo carboxilo-terminal que el péptido correspondiente de los agregados no tratados. Notablemente, la región eliminada por la pepsina corresponde al asa 40-60, lo cual indica que ésta no es parte de la estructura compacta de la fibra, resistente a la pepsina.¹⁷⁰ Este resultado podría predecirse, teniendo en cuenta la presencia de cuatro residuos de Pro (Fig. 44) en esta asa que desfavorecerían su incorporación en una estructura β. El péptido Thr80-Lys103 fue recuperado de los agregados sin ser modificado por el tratamiento con pepsina, lo cual sugiere que forma parte del núcleo de la fibra. En la muestra de AR se identificó un único péptido con la secuencia Thr18-Arg39 (Figs. 48 y 49 y Tabla XI).

En contraste, los agregados de 6aJL2 y Wil demostraron ser sensibles a la pepsina, pues fueron prácticamente degradados en su totalidad (Figs. 48 y 49 y Tabla XI).

Estos resultados claramente sugieren que la región del CDR-1 de las cadenas ligeras $\lambda 6$ posee características de secuencia que le confieren alto potencial fibrilogénico. La incorporación del péptido Thr80-Lys103 en los agregados fibrilares de AR y 6aJL2-R25G parece estar más determinada por su unión covalente al péptido del CDR-1, que por su potencial fibrilogénico intrínseco. Esto es sugerido por los experimentos con las proteínas Wil y 6aJL2. En el caso de los agregados fibrilares de 6aJL2, sólo se recuperó una pequeña cantidad del péptido Thr80-Lys103, lo cual podría esperarse, debido a que, por probabilidad, la escisión en la posición 25 puede no ocurrir en una pequeña fracción de los productos de la proteólisis antes de que se incorporen a las fibras (Figs. 48 y 49 y tabla XI). En otras palabras, los resultados obtenidos demuestran que el péptido que incluye el CDR-1 puede formar agregados fibrilares de modo independiente, al contrario del péptido Thr80-Lys103. Sin embargo, la estructura fibrilar formada por el péptido que contiene el CDR-1 aislado es menos resistente a la acción de la pepsina que los agregados fibrilares formados por los dos péptidos unidos covalentemente, lo cual sugiere una estructura más compleja y compacta en el último caso. Es probable que los contactos primordiales, que dan inicio a la vía cinética de agregación fibrilar, sean mediados por la región del CDR-1, mientras que la región correspondiente al péptido Thr80-Lys103 contribuya, en una etapa posterior, con interacciones que cooperativamente estabilizan el núcleo de la fibra. Esta hipótesis es coherente con los resultados de los experimentos de apagamiento de la fluorescencia intrínseca con acrilamida, los cuales indican que las posiciones 100, 103 y 105, situadas en el extremo carboxilo del péptido Thr80-Lys103, no son significativamente accesibles al solvente en el estado fibrilar de la proteína 6aJL2 (Fig. 21 y Tabla IV).

Acorde a estos resultados, puede postularse que la secuencia con mayor potencial fibrilogénico del V_L λ 6 está incluida en el segmento entre Ser26 y Arg39 (Tabla XI y Fig. 49).



Fig. 47. Identificación de los péptidos componentes de los agregados fibrilares formados durante la incubación del rV_L 6aJL2-R25G con tripsina (ver Materiales y Métodos). (A) Componentes de los agregados fibrilares separados mediante cromatografía de fase reversa en columna C18 analítica. Las fracciones analizadas mediante secuenciación directa por el método clásico de Edman se identifican con su tiempo de retención en minutos (Ej. P 24.83). La secuencia obtenida se presenta en código de una letra encima del tiempo de retención (Ej. TEDEA). (B) Secuencia de los dos segmentos peptídicos del rV_L 6aJL2-R25G componentes de los agregados fibrilares, acorde a los datos de secuenciación directa y el análisis de espectrometría de masa (MS-MS). El residuo Trp35 y el enlace disulfuro Cys23-Cys88 se representan en el formato de bastones y en rojo y verde, respectivamente. (C) Componentes eluidos mediante cromatografía de fase reversa en columna C18 analítica, a partir de una muestra de agregados fibrilares de 6aJL2-R25G incubados 54 horas con pepsina.



Fig. 48. Componentes separados mediante cromatografía de fase reversa en columna C18 analítica, a partir de muestras de agregados fibrilares obtenidos mediante proteólisis con tripsina de los rV_L AR (A, B), Wil (C, D) y 6aJL2 (E, F). Los cromatogramas A, C y E corresponden a agregados fibrilares no tratados con pepsina. Los cromatogramas B, D y F corresponden a muestras de agregados fibrilares incubados con pepsina por 54 horas. El tiempo de retención (min) de cada fracción es indicado.

6. 9. 4 Identificación de secuencias pro-fibrilogénicas en los V_L λ 6.

Estudios basados en péptidos modelos han demostrado que ciertos patrones de secuencia están asociados a una mayor propensión a la agregación fibrilar.^{98,170-172} Trabajos posteriores sugirieron que este concepto puede ser aplicado a las proteínas globulares.¹⁷³⁻¹⁷⁵ A partir de estos estudios, han sido desarrollados algoritmos que permiten predecir el potencial fibrilogénico de regiones discretas de una proteína, a partir de su secuencia.¹⁷⁶⁻¹⁷⁹ En este trabajo se usó el patrón de secuencia para un hexapéptido fibrilogénico, propuesto por López de la Paz y Serrano⁹⁸ (Ver Materiales y Métodos). Se identificaron cinco segmentos en los V_L λ 6 que satisfacen dicho patrón (Figs. 49, 50 y 51). Dos de ellos (*IASNYV* y *NYVQWY*) se sobreponen parcialmente y se extienden por parte del asa CDR-1 y la hebra β C. Los tres segmentos restantes corresponden a las hebras β B, C´y D (Fig. 51). Notablemente, cuatro de estos segmentos se distribuyen en el péptido Thr18-Arg61, lo cual es coherente con el potencial fibrilogénico que mostró en los experimentos de fibrilogénesis *in vitro*.

A la luz de estos resultados, es posible proponer una explicación a la incapacidad de los productos de la proteólisis parcial con tripsina de Jto para formar fibras (Fig. 45). Es probable que la mutación Ala30aAsp, al introducir un grupo iónico en lugar de uno apolar, alteraró la auto-complementariedad estérica y/o de cargas del péptido relacionado al CDR-1, impidiendo su agregación fibrilar. Se ha demostrado que la introducción de un residuo iónico, como Lys, en la región apolar de un péptido involucrado en la formación de la estructura β -cruzada, desfavorece la formación de las fibras debido al costo termodinámico que implica mantener una carga no compensada en un medio apolar, excluida del solvente.¹⁸⁰ De hecho, similar estrategia ha sido usada por la evolución para inhibir la agregación de las proteínas ricas en estructura β .¹⁴⁶

Es sugerente que el número y la distribución de los segmentos pro-fibrilogénicos en la secuencia codificada en *6a* sea diferente con respecto a los otros segmentos de genes de V_L λ (Fig. 50). Además de *6a*, solo algunos miembros del subgrupo λ 2 poseen segmentos pro-fibrilogénicos tanto en la hebra β borde B como en el asa CDR-1. Ambas regiones están muy expuestas al solvente, por lo que son susceptibles de interactuar con regiones complementarias de otras moléculas, sin la necesidad de que el dominio se despliegue totalmente.

A la luz de los datos experimentales obtenidos en este estudio, es razonable postular que la alta tendencia de las cadenas ligeras $\lambda 6$ a la agregación amiloide debe ser contribuida importantemente por la alta capacidad fibrilogénica de los segmentos peptídicos asociada al CDR-1 y a la hebra β borde B.

Muestra ^a	T.R. ^b (min)	Secuencia directa (Método de Edman)	Secuencia determinada por MS MS
R25G-T0h	24.83	TEDEA	TEDEADYYCQSYDSSNHVVFGGGTK
R25G-T0h	29.31	(dipéptido) TEDEA y TVTIS	TEDEADYYCQSYDSSNHVVFGGGTK
R25G-T0h	29.52	TVTISCT	TVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRPSGVPDR
R25G-T54h	24.80	-	TEDEADYYCQSYDSSNHVVFGGGTK
"	26.94	-	TISGLKTEDEADYYCQSYDSSNHVVFGGGTK
"	28.52	-	TVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTT
"	28.78	TVTI	TVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQR
"	29.31	(dipéptido) TVTIS y TEDEA	TVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTV
AR-T0h	24.61	-	HVVFG
"	31.39	-	SFVQWYQQ
"	33.55	-	TVTFSCTGSGGSIADSFVQWYQQR
"	35.01	-	TVTFSCTGSGGSIADSFVQWYQQRPGSAPTTVIY
AR-T54h	24.14	-	Espectro complejo
	33.61	-	TVTFSCTGSGGSIADSFVQWYQQR
Wil-T0h	25.43	SSGSIA	FSGSVDTSSNSASLTISGLK
6aJL2-T0h	24.91	-	TEDEADYYCQSYDSSNHVVFGGGTK
"	26.41	-	SSGSIASNYVQWYQQR
"	28.19	-	SSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYEDNQRPSGVPDR
"	29.20	-	SSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIYE
"	29.76	-	SSGSIASNYVQWYQQRPGSSPTTVIY
"	30.62	-	Espectro complejo
"	30.83	-	Espectro complejo

Tabla X. Secuencia de los péptidos componentes de los agregados fibrilares producidos por proteólisis con tripsina, antes y después del tratamiento con pepsina.

^a Indica la proteína de origen del agregado fibrilar y el tiempo de tratamiento con pepsina (Ej. R25G-T0h significa "agregados fibrilares de 6aJL2-R25G producidos por proteólisis con tripsina, no incubados ulteriormente con pepsina".

^b Tiempo de retención.

6ajl2-R25G R25G-T0h (24.83) " (29.31) " (29.52)	NFMLTQPHSVSESPG <mark>KTVTIS</mark> CTGSSGS <mark>IASNYVQWY</mark> QQRPGSSP <mark>TTVIYE</mark> DNQRPSGV TVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSSP <mark>TTVIYE</mark> DNQRPSGV TVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSSP <mark>TTVIYE</mark> DNQRPSGV	PD <u>R</u> FSGSIDSSSNS <mark>ASLTIS</mark> GL <u>K</u> TEDEADYYCQSYDSSNHVVFGGGT <u>K</u> LTVL TEDEADYYCQSYDSSNHVVFGGGTK PDR TEDEADYYCQSYDSSNHVVFGGGTK PDR
R25G-T54h (24.80 " (24.94) " (28.52) " (28.78) " (29.31)) TVTISCTGSSGS <mark>IASNYVQWY</mark> QQRPGSSP <mark>TT</mark> TVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQR TVTISCTGSSGSIASNYVQWYQQRPGSSP <mark>TTV</mark>	TEDEADYYCQSYDSSNHVVFGGGTK <mark>TISG</mark> LKTEDEADYYCQSYDSSNHVVFGGGTK
AR DF AR-T0h (24.61) " (31.39) " (33.55) " (35.01)	MLTQPHSVSESPG <mark>KTVTFS</mark> CTGSGGSIADS <mark>FVQWYQ</mark> QRPGSAP <mark>TTVIYD</mark> DNQRPSGVPL S <mark>FVQWYQ</mark> Q TVTFSCTGSGGSIADSFVQWYQQR TVTFSCTGSGGSIADSFVQWYQQRPGSAPTTVIY	I <u>R</u> FSGSIDDSANS <mark>ASLTIS</mark> GL <u>K</u> TEDEADYYCQSYNSNHHVVFGGGT <u>K</u> VTVL HVVFG
AR-T54h (33.61)	TVTFSCTGSGGSIADSFVQWYQQR	
6ajl2 6a-T0 (24.91) " (26.41) " (28.19) " (29.20) " (26.76)	NFMLTQPHSVSESPG <mark>KTVTIS</mark> CT <u>R</u> SSGS <mark>IASNYVQWY</mark> QQRPGSSP <mark>TTVIYE</mark> DNQRPSGVF SSGS <mark>IASNYVQWY</mark> QQR SSGSIASNYVQWYQQRPGSSP <mark>TTVIYE</mark> DNQRPSGVF SSGSIASNYVQWYQQRPGSSP <mark>TTVIYE</mark> SSGS <mark>IASNYVQWY</mark> QQRPGSSP <mark>TTVIY</mark>	PD <u>R</u> FSGSIDSSSNS <mark>ASLTIS</mark> GL <u>K</u> TEDEADYYCQSYDSSNHVVFGGGT <u>K</u> LTVL TEDEADYYCQSYDSSNHVVFGGGTK PD <u>R</u>
Wil NF Wil-T0 (25.43)	LLTQPHSVSESPG <mark>KTVTIS</mark> CT <u>R</u> SSGS <mark>IANNYV</mark> HWYQQRPGSSP <mark>TTVIFE</mark> DDHRPSGVPD <u>R</u> SSGS <mark>IA</mark>	FSGSVDTSSNS <mark>ASLTIS</mark> GL <u>K</u> TEDEADYYCQSYDHNN-QVFGGGT <u>K</u> LTVL FSGSVDTSSNS <mark>ASLTIS</mark> GLK

Fig. 49. Posición relativa en la secuencia de las proteínas λ6, de los péptidos componentes de los agregados fibrilares producidos por proteólisis con tripsina, antes y después del tratamiento con pepsina. La identificación de las muestras es la usada en la tabla XI. El tiempo de retención de la fracción cromatográfica en la que fue eluído cada péptido es indicada entre paréntesis. Las regiones sombreadas en amarillo corresponden a los segmentos con secuencia pro-fibrilogénica, acorde al patrón propuesto por López de la Paz y Serrano.⁹⁸

λ6	6a.	NFMLTQPHSVSESPG <mark>KTVTIS</mark> CTRSSGS <mark>IASNYVQWY</mark> QQRPGSSP <mark>TTVIYE</mark> DNQRPSGVPDRFSGSIDSSSNS <mark>ASLTIS</mark> GLKTEDEADYYCQSYDSSN
λ1	la. le. lc. lg. lb.	QSVLTQPPSVSEAPRQRVTISCSG <mark>SSSNIG</mark> NN <mark>AVNWYQ</mark> QLPGKAP <mark>KLLIYY</mark> DDLLPSGVSDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNG QSVLTQPPSVSGAPGQRVTISCTG <mark>SSSNIG</mark> AGYDVHWYQQLPGTAP <mark>KLLIYG</mark> NSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEDEADYYCQSYDSSLSG QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSG <mark>SSSNIG</mark> SN <mark>TVNWYQ</mark> QLPGTAP <mark>KLLIYS</mark> NNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNG QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSG <mark>SSSNIGSNYV</mark> YWYQQLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSG QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSG <mark>SSSNIGNNYVSWYQ</mark> QLPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSG QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSG <mark>SSSNIGNNYVSWYQ</mark> QLPGTAPKLLIYRNNQRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDSSLSA
λ2	2c. 2e. 2a2. 2d. 2b2.	QSALTQPPSASGSPG <mark>QSVTIS</mark> CTGTSSDVGGYN <mark>YVSWYQ</mark> QHPGKAPKLMIYEVSKRPSGVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAEDEADYYCSSYAGSNNF QSALTQPRSVSGSPG <mark>QSVTIS</mark> CTGTSSDVGGYN <mark>YVSWYQ</mark> QHPGKAPKLMIYDVSKRPSGVPDRFSGSKSGNT <mark>ASLTIS</mark> GLQAEDEADYYCCSYAGSYTF QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYN <mark>YVSWYQ</mark> QHPGKAPKLMIYEVSNRPSGVSNRFSGSKSGNT <mark>ASLTIS</mark> GLQAEDEADYYCSSYTSSSTL QSALTQPPSVSGSPG <mark>QSVTIS</mark> CTGTSSDVGSYN <mark>KVSWYQ</mark> QPPGTAPKLMIYEVSNRPSGVPDRFSGSKSGNT <mark>ASLTIS</mark> GLQAEDEADYYCSSYTSSSTF QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGSYN <mark>KVSWYQ</mark> QPPGTAPKLMIYEVSNRPSGVPDRFSGSKSGNT <mark>ASLTIS</mark> GLQAEDEADYYCSSYTSSSTF
λ3	3r. 3j. 3p. 3a. 31. 3h. 3e. 3m. 2-19.	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGDKYACWYQQKPGQSP <u>VLVIYQ</u> DSKRPSGIPERFSGSNSGNT <u>ATLTIS</u> GTQAMDEADYYCQAWDSSTA SYELTQPLSVSVALGQTARITCGGNNIGSKNVHWYQQKPGQAPVLVIYRDSNRPSGIPERFSGSNSGNT <u>ATLTIS</u> RAQAGDEADYYCQVWDSSTA SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKKYAYWYQQKSGQAP <u>VLVIYE</u> DSKRPSGIPERFSGSSSGTM <u>ATLTIS</u> GAQVEDEADYYCYSTDSSGNH SYELTQPPSVSVSLGQMARITCSGEALPKKYAYWYQKPGQFPVLVIYKDSERPSGIPERFSGSSSGTI <u>VTLTIS</u> GVQAEDEADYYCLSADSSGTY SSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSY <u>YASWYQ</u> QKPGQAP <u>VLVIYG</u> KNNRPSGIPDRFSGSSSGNT <u>ATLTIS</u> RVEAGDEADYYCNSRDSSGNH SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAP <u>VLVIYY</u> DSDRPSGIPERFSGSNSGNT <u>ATLTIS</u> RVEAGDEADYYCQVWDSSDH SYELTQLPSVSVSPGQTARITCSGDVLGENYADWYQQKPGQAP <u>ELVIYE</u> DSERYPGIPERFSGSTSGNT <u>TLTIS</u> RVLTEDEADYYCLSGDEDN SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGDALPKQYAYWYQQKPGQAPVLVIYKDSERPSGIPERFSGSSSGTT <u>VTLTIS</u> GVQAEDEADYYCLSGDEDN SYELMQPPSVSVSPGQTARITCSGDVLAKKYARWFQQKPGQAPVLVIYKDSERPSGIPERFSGSSSGTT <u>VTLTIS</u> GQQEDEADYYCQSADSSGTY
λ4	4c. 4a. 4b.	LPVLTQPPSASALLGASIKLTCTLSSEHSTYTIEWYQQRPGRSPQYIMKVKSDGSHSKGDGIPDRFMGSSSGAD <mark>RYLTFS</mark> NLQSDDEAEYHCGESHTIDGQVG QPVLTQSSSASASLGSSVKLTCTLSSG <mark>HSSYII</mark> AWHQQQPGKAPRYLMKLEGSGSYNKGSGVPDRFSGSSSGAD <mark>RYLTIS</mark> NLQLEDEADYYCETWDSNT QLVLTQSPSASASLGASVKLTCTLSSGHSSYAIAWHQQQPEKGPRYLMKLNSDGSHSKGDGIPDRFSGSSSGAE <mark>RYLTIS</mark> SLQSEDEADYYCQTWGTGI
λ5	5e. 5c. 5b.	QPVLTQPPSSSASPGESARLTCTLPSDINVG <mark>SYNIYW</mark> YQQKPGSPP <mark>RYLLYYY</mark> SDSDKGQGSGVPSRFSGSKDASANT <mark>GILLIS</mark> GLQSEDEADYYCMIWPSNAS QAVLTQPASLSASPGASASLTCTLRSGINVGTYRIYWYQQKPGSPPQYLLRYKSDSDKQQGSGVPSRFSGSKDASANA <mark>GILLIS</mark> GLQSEDEADYYCMIWHSSAS QPVLTQPSSHSASSGASVRLTCMLSSGFSVGDFWIRWYQQKPGNPP <mark>RYLLYY</mark> HSDSNKGQGSGVPSRFSGSNDASANAGILRISGLQPEDEADYYCGTWHSNSKT
λ7	7a. 7b.	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCASSTGAVTSGYYPNWFQQKPGQAP <mark>RALIYS</mark> TSNKHSWTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEY <mark>YCLLYYG</mark> GAQ QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGHYPYWFQQKPGQAP <mark>RTLIYD</mark> TSNKHSWTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCLLSYSGAR
λ8	8a.	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSYYPSWYQQTPGQAP <mark>RTLIYS</mark> TNTRSSGVPDRFSGSILGNK <mark>AALTIT</mark> GAQADDESDY <mark>YCVLYM</mark> GSGI
λ9	9a.	QPVLTQPPSASASLGASVTLTCTLSSGYSNYKVDWYQQRPGKGPRFVMRVGTGGIVGSKGDGIPDRFSVLGSGLNRYLTIKNIQEEDESDYHCGADHG <mark>SGSNFV</mark>
λ10	10a.	QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSNNVGNQGAAWLQQHQGHPPKLLSYRNNNRPSGISERLSASRSGNT <mark>ASLTIT</mark> GLQPEDEADYYCSAWDSSLSA

Fig. 50. Localización en los 31 segmentos de genes de línea germinal de $V_L \lambda^{86}$ de las secuencias pro-fibrilogénicas (sombreadas en amarillo), acorde al patrón propuesto por López de la Paz y Serrano.⁹⁸ Se muestra la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la secuencia de nucleótidos de cada segmento de gen.



Fig. 51. Localización en la estructura del rV_L 6aJL2 de los segmentos con secuencias profibrilogénica (sombreadas en rojo), identificados acorde al patrón propuesto por López de la Paz y Serrano.⁹⁸ Las figuras son representaciones rotadas aproximadamente 180° del rV_L 6aJL2 y fueron creadas con el programa PyMOL, usando las coordenadas de la estructura cristalográfica de 6aJL2 (E. Horjales y col., estructura en proceso de remisión al PDB).

7. CONCLUSIONES.

La deposición amiloide in vivo es un evento complejo y aún no bien comprendido. Este fenómeno anormal ocurre mientras la proteína precursora está sometida a múltiples interacciones con componentes de la sangre y otros fluidos corporales, así como de los tejidos. Como se ha demostrado en ensavos en animales de laboratorio, la acción del sistema inmunológico puede promover la eliminación de los depósitos y en consecuencia retrasar e incluso revertir los eventos patológicos asociados a la deposición.¹⁸¹ Además, trabajos recientes sugieren que el aporte del factor celular puede ser crítico en algunas amiloidosis.¹⁸² En consecuencia, la amiloidogenicidad de una proteína, entendida en términos de su capacidad para provocar una enfermedad específica, es determinada no sólo por sus propiedades fisicoquímicas y estructurales, que pueden ser estudiadas in vitro, sino por muchos otros factores del complejo contexto biológico donde este fenómeno ocurre. Por ello, debe hacerse una clara distinción entre la amiloidogénesis y el comportamiento fibrilogénico in vitro. Los datos que aportan los experimentos descritos en este trabajo reflejan la relación entre las propiedades fisicoquímicas y estructurales de la proteína y su capacidad para formar in vitro agregados comparables, en términos de estructura y morfología, a los que se han identificado como componentes principales del amiloide. En consecuencia, aportan una estimación de la tendencia o la probabilidad de una molécula a agregarse como amiloide, o de una forma distinta, in vivo. En el caso particular de las cadenas ligeras, emitir conclusiones se hace más complicado que para otras proteínas precursoras, debido a su diversidad estructural intrínseca.

Sin embargo, en este trabajo se han obtenido evidencias experimentales que claramente sugieren que la contribución de varios factores determina el comportamiento proclive de las cadenas ligeras $\lambda 6$ a la agregación amiloide. Estos resultados pueden resumirse en los siguientes puntos:

 La alta tendencia de las cadenas ligeras λ6 a la agregación amiloide no puede ser explicada únicamente en base a la estabilidad termodinámica de la estructura codificada en el segmento de gen 6a. Sin embargo, la estabilidad relativa del V_L de línea germinal 6aJL2 sí podría representar una condición de riesgo.

- 2. Las cadenas ligeras $\lambda 6$ poseen mutaciones somáticas que, por su naturaleza, pueden desestabilizar el plegamiento del V_L. Debido a que algunas de estas mutaciones son relativamente frecuentes, como las que afectan a los enlaces salinos, su contribución a la amiloidogenicidad asociada al subgrupo $\lambda 6$ parece ser importante.
- 3. La secuencia codificada en el segmento de gen 6a posee regiones con alto potencial fibrilogénico. En particular, el segmento que incluye el CDR-1 mostró la capacidad de formar agregados fibrilares similares al amiloide en condiciones *in vitro* comparables a las fisiológicas. Estas regiones pueden ser el blanco de estrategias terapéuticas que promuevan la inhibición de la agregación.
- 4. En resumen, la amiloidogenicidad exacerbada de las proteínas λ6 es, probablemente, consecuencia de las contribuciones de varios factores, entre los que resaltan la estabilidad termodinámica relativa del V_L de la línea germinal, la acumulación de mutaciones somáticas deletéreas y el alto potencial fibrilogénico de segmentos discretos del Vλ6.

8. PERSPECTIVAS.

- 1. Estudiar la relevancia de las mutaciones somáticas más frecuentes en las cadenas ligeras $\lambda 6$ para la estructura y la estabilidad termodinámica del V_L.
- Determinar la contribución de los segmentos pro-fibrilogénicos en la cinética de la fibrilogénesis in vitro del rV_L 6aJL2 y en la estructura de sus agregados fbrilares.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1. Buxbaum J. N. & Tagoe C. E. (2000) The genetic of the amyloidoses. Annu. Rev. Med. 51, 543-569.
- 2. Buxbaum J. N. (2006) The genetics of the amyloidoses: interactions with immunity and inflammation. Genes and Immunity 7, 439-449.
- 3. Hirschfield, G. M. (2004) Amyloidosis: a clinical patho-physiological synopsis. Seminars in Cell & Developmental Biology 15, 39-44
- Sunde M., Blake C. C. F. (1998) From globular to fibrous state: protein structure and structural conversion in amyloid formation. Quarterly Reviews of Biophysics 31(I), 1-39.
- Alexandrescu, A. T. (2005) Amyloid accomplices and enforcers. Protein Sci. 14, 1-12
- Sipe, J. D. & Cohen, A. S. (2000) Review: history of the amyloid fibril. J. Struct. Biol. 130, 88-98
- Missmahl, H. P. & Hartwig, M. (1953). Polarisationsoptische Untersuchungen an der Amyloidsubstanz. Virchows Arch. Path. Anat. 324, 489-508.
- Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M., & Takeda (1989) Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye Thioflavin T. Analytical Biochemistry 177, 244-249
- Cohen, A. S. & Calkins, E. (1959). Electron microscopic observation on a fibrous component in amyloid of diverse origin. Nature 183, 1202-1203.
- Eanes, E. D. & Glenner, G. G. (1968). X Ray diffraction studies on amyloid filaments. J. Histochem. Cytochem. 16, 673-677.
- 11. Serpell, L. C., Sunde, M., Blake C. C. F. (1997) The molecular basis of amiloidosis. CMLS, Cell mol. lif. sci 53, 871-887.
- Sunde, M., Serpell, L. C., Bartlam, M., Fraser, P. E., Pepys, M. B., Blake C. C. F. (1997) Common core structure of amyloid fibrils by synchrotrom Xray diffraction. J. Mol. Biol. 273, 729-739.
- Makin, O. S., Atkins, E., Sikorsky, P., Johansson, J., Serpell, L. C. (2005) The molecular basis for amyloid fibril formation and stability. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 315-320.

- Nelson, R., Sawaya, M. R., Balbirnie, M., Madsen, A., Riekel, C., Grothe, R., Eisenberg, D. (2005) Structure of the cross-β spine of amyloid-like fibrils. Nature 435, 773-778.
- Dobson, C. M. (1999) Protein misfolding, evolution and disease. Trends in biochemical sciences 24, 329-332
- Stefani, M., Dobson, C. M. (2003) Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. J Mol Med, 81, 678-699.
- Dodson, C. M. (2004) Principles of protein folding, misfolding and aggregation. Sem Cell & Develop Biol, 15, 3-16.
- Kelly, J. W. (2002) Toward an understanding of amyloidogenesis. Nature Struct Biol 9, 323-325.
- Heegaard, N. H. H., Roepstorff, P., Melberg, S. G., Nissen, M. H. (2002) Cleaved β₂-microglobulin partially attains a conformation that has amyloidogenic features. J. Biol. Chem. 277, 11184-11189.
- Page, L. J., Suk, J. Y., Huff, M. E., Lim, H-J., Venable, J., Yates III J., Kelly, J. W., Balch, W. E. (2005) Metalloendoprotease cleavage triggers gelsolin amyloidogenesis. EMBO J. 24, 4124-4132.
- Stix, B., Kähne, T., Sletten, K., Raynes, J., Roessner, A., Röcken, C. (2001) Proteolysis of AA amyloid fibril proteins by matrix metalloproteinases-1, -2, and -3. Am. J. Pathol. 159, 561-670.
- 22. Soto, C. (2001) Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. FEBS Letters 498, 204-207.
- 23. Selkoe, D. J. (2003) Folding proteins in fatal ways. Nature 426, 900-904.
- 24. Ross, C. A., Poirier, M. A. (2004) Protein aggregation and neurodegenerative disease. Nat. Med. 10, S10-S17.
- Villegas, V., Zurdo, J., Filimonov, V. V., Avilés, F. X., Dobson, C. M., Serrano, L. (2000) Protein engineering as a strategy to avoid formation of amyloid fibrils. Prot. Sci. 9, 1700-1708.
- Bemporad, F., Calloni, G., Campioni, S., Plakoutsi, G., Taddei, N., Chiti, F. (2006) Sequence and structural determinants of amyloid fibril formation. Acc. Chem. Res. 39, 620-627.
- McPharland, V. J., Kad, N. M., Kalverda, A. P., Brown, A., Kirwin-Jones,
 P., Hunter, M. G, Sunde, M., Radford, S. R. (2000) Partially unfolded states

of β_2 -microglobulin and amyloid formation *in vitro*. Biochemistry 39, 8735-8746.

- McPharland, V. J., Kalverda, A. P., Homans S. W., Radford, S. E. (2002) Structural properties of an amyloid precursor of β₂-microglobulin. Nature Struct. Biol. 9, 326-331.
- Kameda, A., Hoshino, M., Higurashi, T., Takahashi, S., Naiki, H., Goto, Y. (2005) Nuclear magnetic resonance characterization of the refolding intermediate of β₂-microglobulin trapped by non-native prolyl peptide bond. J. Mol. Biol. 348, 383-397.
- Niraula, T. N., Haraoka, K., Ando, Y., Li, H., Yamada, H., Akasaka, K. (2002) Decreased thermodynamic stability as a crucial factor for familial amyloidotic polyneuropathy. J Mol. Biol. 320, 333-342.
- Wiseman, R. L., Powers, E. T., Kelly, J. W. (2005) Partitioning conformational intermediates between competing refolding and aggregation pathways: insights into transthyretin amyloid disease. Biochemistry 44, 16612-16623.
- Uversky, V. N., Fink, A. L. (2004) Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded. Biochem Biophys Acta 1698, 131-153.
- 33. Dodson, M. C. (2003) Protein folding and misfolding. Nature 426, 884-890.
- Lee, C., Yu, M-H. (2005) Protein folding and diseases. J. Biochem & Mol. Biol. 38, 275-280.
- Falk, R. H., Comenzo, R. L., Skinner, M. (1997) The systemic amyloidosis.
 N. Engl. J. Med. 337, 898-909.
- Sirohi, B., Powles, R. (2006) Epidemiology and outcomes research for MGUS, myeloma and AL amyloidosis. EJC 42, 1671-1683.
- 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.
- 38. Obici, L., Perfetti, V., Palladini, G., Morati, R., Merlini, G. (2005) Clinical aspects of systemic amyloid diseases. Biochim Biophys Acta 1753, 11-22.

- Solomon, A. (1986) Clinical implications of monoclonal light chains. Sem. in Oncol. 13, 341-349.
- Buxbaum, J. N. (1992) Mechanisms of disease: monoclonal immunoglobulin deposition, amyloidosis, light chain deposition disease, and light and heavy chain deposition disease. Hemat/Oncol. Clin. North. Am. 6 ,323-324.
- 41. Skinner, M. AL amyloidosis: the last 30 years. (2000) Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest. 7, 13-14.
- 42. Cohen A S. (1993) Primary (AL) Amyloidosis. Renal Failure 15, 429-433.
- Palladini, G., Kyle, R. A., Larson, D. R., Therneau, T. M., Merlini, G., Gertz, M. A. (2005) Multicentre versus single centre approach to rare diseases: the model of systemic light chain amyloidosis. Amyloid 12, 120-126.
- 44. Solomon, A. (1985) Light chains of immunoglobulins: Structural-genetic correlates. Blood 68, 603-610.
- 45. Pilström, L. (2002) The mysterious immunoglobulin light chain. Dev. Comp. Immunol. 26, 207-215.
- 46. Amzel, L. M., Poljak, R. J. (1979) Three-dimensional structure of immunoglobulins. Ann Rev Biochem 48, 961-997.
- Davies, D. R., Chacko, S. (1993) Antibody structure. Acc. Chem. Res. 26, 421-427.
- Solomon, A., Weiss, D. T. (1995) Structural and functional properties of human λ-light-chain variable-region subgroup. Clin. Diag. Lab. Immunol. 2, 387-394.
- Williams, S. C., Frippiat , J., Tomlinson, I. M., Ignatovich, O., Lefranc, M., Winter, G. (1996) Sequence and evolution of the human germline Vλ repertoire. J. Mol. Biol., 264:220-232.
- Aguzzi, F., Bergami, M. R., Gasparro, C., Belloti, V., Merlini, G. (1992) Occurrence of monoclonal components in general practice: Clinical implication. Eur. J. Haematol. 48, 192-195.
- Kyle, R. A. (1982) Monoclonal gammopathy of indetermined significance (MGUS): A review. Clinics in Haematology 11, 123-150.
- 52. Stevens, F. J. & Argon Y. (1999) Pathogenic light chains and the B-cell repertoire. Immunol. Today 20, 451-457.

- 53. Kyle, R. A., Gertz, M. A. (1995) Primary systemic amyloidosis: Clinical and laboratory features in 474 cases. Sem Hemathol 32, 45-59.
- 54. Sanchorawala, V. (2006) Light-Chain (AL) Amyloidosis: diagnosis and treatment. Clin. J. Am. Soc. Nephrol. 1, 1331–1341.
- 55. Solomon, A., Weiss, D., T., Kattine, A. A. (1991) Nephrotoxic potential of Bence Jones protein. New. Engl. J. Med. 324, 1845-1851.
- Solomon, A., Weiss, D., T., Williams, T., K. (1992) Experimental model of human light-chain-associated disease. Current Topics in Microb. & Immunol. 182, 261-267.
- 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.
- 58. Wetzel, R. (1997) Domain stability in immunoglobulin light chain deposition disorders. Adv. Prot. Chem. 50, 182-242.
- Raffen, R. M., Dieckman, L. J., Szpunar, M., Wunschl, C., Pokkuluri, P. R., Daves, P., Stevens, P. W., Cai, X., Schiffer, M., Stevens, F. J. (1999) Physicochemical consequences of amino acid variations that contribute to fibril formation by immunoglobulin light chain. Prot. Sci. 6, 509-517.
- 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.
- Walls, J., Schell, M., Murphy, C., Hrncic, R., Stevens, F. J., Solomon, A. (1999) Thermodynamic instability of human λ6 light chain: correlation with fibrillogenicity. Biochemistry 38, 14101-14108.
- Wu, T. T., Kabat, E A. (1970) An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. J. Exp. Med. 132, 211-250.
- Sletten, K., Westermark, P., Husby, G. (1986) Structural studies of the variable region of immunoglobulin light chain-type amyloid fibril protein., in Glenner, G. G., Osserman, E. F., Bendit, E. P., Calkins, E., Cohen, A. S., Zucker Franklin, D. (Eds), Amyloidosis, pp. 463-475, Plenum, New York
- Bellotti, V., Mangione, P., Merlini, G. (2000) Review: Immunoglobulin light chain amyloidosis-The archetype of structural and pathogenic variability. J. Struct. Biol. 130, 280-289.

- Tomlinson, I. M., Walter, G., Jones, P. T., Dear, P. H., Sonnhammer, E. L.
 L., Winter, G. (1996) The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. J. Mol. Biol. 256, 813-817.
- 66. Díaz, M., Klinman, N. R. (2002) Relative roles of somatic and Darwinian evolution in shaping the antibody response. Immunol. Res. 21, 89-102.
- Shapiro,G. S., Aviszus,K., Murphy, J., Wysocki, L. J. (2002) Evolution of Ig DNA sequence to target specific base positions within codons for somatic hypermutation. J. Immunol. 168, 2302-2306.
- Lantto, J., Ohlin, M. (2002) Functional consequences of insertions and deletions in the complementarity-determining regions of human antibodies. J. Biol. Chem. 277, 45108-45114.
- Rostagno, A., Vidal, R., Kaplan, B., Chuba, J., Kumar, A., Elliott, J. I., Frangione, B., Gallo, G., Jorge, G. (1999) pH-dependent fibrillogenesis of a VkIII Bence Jones protein. British J. Haematol. 107, 835-843.
- Kim, Y-S., Cape, S. P., Chi, E., Raffen, R., Wilkins-Stevens, P., Stevens, F. J., Manning, M. C., Randolph, T. W., Solomon, A., Carpenter, J. F. (2001) Counteracting effects of renal solutes on amyloid fibril formation by immunoglobulin light chains. J. Biol. Chem. 276, 1626–1633.
- Kim, Y-S., Randolph, T. W., Stevens, F. J., Solomon, Carpenter, J. F. (2002) Kinetics and energetic of assembly, nucleation, and growth of aggregates and fibrils for an amyloidogenic protein. J. Biol. Chem. 277, 27240–27246.
- Davis, D. P., Gallo, G., Vogen, S. M., Dul, J. L., Sciarretta, K. L., Kumar, A., Raffen, R., Stevens, F. J., Argon, Y. (2001) Both the environment and somatic mutations govern the aggregation pathway of pathogenic immunoglobulin light chain. J. Mol. Biol. 313, 1021-1034.
- Khurana R., Gillespie J.R., Talapatra A., Minert L.J., Ionescu-Zanetti C., Millet I., Fink A. (2001) Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates. Biochemistry 40, 3525-3535
- Souillac, P. O., Uversky, V. N., Millert, I S., Khurana, R., Doniach, S., Fink, A. L. (2002) Effect of association state and conformation stability on the kinetics of immunoglobulin light chain amyloid fibril formation at physiological pH. J. Biol. Chem. 277, 12657–12665.

- 75. Souillac, P. O., Uversky, V. N., Fink, A. L. (2003) Structural transformations of oligomeric intermediates in the fibrillation of the immunoglobulin light chain Len. Biochemistry 42, 8094-8104.
- Khurana, R., Souillac, P. O., Coats, A. C., Minert, L., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S. Solomon, A., Fink, A. L. (2003) A model for amyloid formation in immunoglobiulin light chains based on comparison of amyloidogenic and benign proteins and specific antibody binding. Amyloid: J. Protein Folding Disord. 10, 97-109.
- Qin, Z., Hu, D., Zhu, M., Fink, A. L. (2007) Structural characterization of the partially folded intermediates of an immunoglobulin light chain leading to amyloid fibrillation and amorphous aggregation. Biochemistry 46, 3521-3531.
- Helms, L. R., Wetzel, R. (1996) Specificity of Abnormal Assembly in Immunoglobulin Light Chain Deposition Disease and Amyloidosis. J. Mol. Biol. 257, 77-86.
- 79. Solomon A., Weiss, D. T. (1993) Ominous consequences of immunoglobulin deposition. N. Engl. J. Med. 329, 1422-1423.
- Solomon, A., Frangione, B., Franklin, E. C. (1982) Preferential association of the VλVI subgroup of human light chains. UIT Amyloidosis AL. J. Clin. Invest. 70, 453-460.
- Ozaki, S., Abe, M., Wolfenbarger, D., Weiss, D. T., Solomon, A. (1994) Preferential expression of human-lambda light chain variable-region subgroups in multiple myeloma, AL amyloidosis, and Waldenstrom's macroglobulinemia. Clin. Immunol. Immunopathol. 71, 183-189.
- Comenzo, R. L., Wally, J., Kica, G., Murray, J., Ericsson, T. (1999) Clonal immunoglobulin light chain variable region germline gene use in al amyloidosis: association with dominant amyloid-related organ involvement and survival after stem cell transplantation. British J. Haematol. 106, 744-751.
- Comenzo R. L., Zhang, Y., Martinez, C., Osma, K., Herrera, G. (2001) The tropism of organ involvement in primary systemic amyloidosis: contributions of Ig V_L germ line gene use and clonal plasma cell burden. Blood 98, 714-720.

- 84. Perfetti, V., Casarini, S., Palladini, G., Vignarelli, M. C., Klersy, C., Diegoli, M., Ascari, E., Merlini, G. (2002) Analysis of Vλ-Jλ expression in plasma cells from primary (AL) amyloidosis and normal bone marrow identifies 3r (λIII) as a new amyloid-associated germline gene segment. Blood 100, 948-953.
- 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 chainassociated amyloidosis (AL). Blood 101, 3801-3808
- Ignatovich, O., Tomlinson, I. M., Jones, P. T., Winter, G. (1997) The creation of diversity in the human immunoglobulin Vλ repertoire. J. Mol. Biol. 268, 69-77.
- Ch'ang, L-Y., Yen, C-P., Besl, L., Schell, M., Solomon, A. (1994) Identification and characterization of a functional human Ig VλVI germline gene. Mol. Immunol. 31, 531-536.
- Pokkuluri P. R., Solomon, A., Weiss, D. T., Stevens, F. J. Schiffer, M. (1999) Tertiary Structure Of Human λ6 Light Chains. Amyloid: Int. J. Exp. Clin. Invest. 6, 165-171.
- 89. Dealwis, C., Wall, J. (2004) Towards understanding the structure-function relationship of human amyloid disease. Curr Drug Targets 5, 159-171.
- 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 Vlambda6 proteins. J. Mol. Recognit. 17, 323-331.
- 91. Solomon, A., Weiss, D., Schell. M., Ringelberg, C., Ch'ang, L-Y., Klebig,
 M. L. (1997) Identification and characterization of a human Vλ5 (T1) germline gene that encodes structurally unique λ light chains. Mol. Immunol. 34, 463-470.
- 92. Sletten, K., Natvig, J. B., Husbyt, T. G., Juul, J. (1981) The complete amino acid sequence of a prototype immunoglobulin-λ light-chain-type amyloid-fibril protein AR. Biochem. J. 195, 561-572.

- Prodromou, C. & Pearl, L. H. (1992). Recursive PCR: A novel technique for total gene synthesis. Protein Eng. 5:827-829.
- Stevens, P. W., Raffen, R., Hanson, D. K., Deng, Y-L., Berrios-Hammond, M., Westholm, F., Murphy, C., Eulitz, M., Wetzel, 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.
- Schier, R., Marks, J. D., Wolf, E. J., Apell, G., Wong, C., McCartney, J. E., Bookman, M. A., Huston, J. S., Houston, L. L., Weiner, L. M. (1995) *In vitro* and *in vivo* characterization of a human anti-c-erbB-2 single-chain Fv isolated from a filamentous phage antibody library. Immunotechnol. 1, 73– 81.
- Abe, M., Goto, T., Kennel, S. J., Wolfenbarger, D., Macy, S. D., Weiss, D. T., Solomon, A. (1993) Production and immunodiagnostic applications of anti-human light chain monoclonal antibodies. Am. J. Clin. Pathol.100, 67-74.
- 97. Wall, J., Murphy, C. L., Solomon, A. (1999) *In vitro* immunoglobulin light chain fibrilogenesis. Methods Enzymol. 309, 204-216.
- 98. López de la Paz, M., Serrano, Luis. (2003) Sequence determinants of amyloid fibril formation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 87-92.
- Pace, C. N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. Methods Enzymol. 131, 266–280.

100. Lee, S., Tsai F. T. F. (2005) Molecular chaperones in protein quality control. J. Biochem. Mol. Biol. 38, 259-265.

101. Barral, J. M., Broadley, S. A., Schaffar, G., Hartl, F. U. (2004) Role of molecular chaperones in protein misfolding diseases. Sem. Cell. & Develop. Biol. 15,17-29.

102. Gregersen, N., Bross, P., Vang, S., Christensen, J. H. (2006) Protein misfolding and human disease. Annu. Rev. Genom. Human Genet. 7, 103-124.

103. Knittler, M. R., Haas, I. G. (1992) Interaction of BiP with newly synthesized immunoglobulin light chain molecules: cycles of sequential binding and release. EMBO J. 11, 1573-1581.

104. Hellman, R., Vanhove, M., Lejeune, A., Stevens, F. J., Hendershot, L. M. (1999) The *in vivo* association of BiP with newly synthesized proteins is

dependent on the rate and stability of folding and not simply on the presence of sequences that can bind to BiP. J. Cell. Biol. 144, 21-30.

105. Dul, J. L., Davis, D. P., Williamson, E. K., Stevens, F. J., Argon, Y. (2001) Hsp70 and antifibrillogenic peptides promote degradation and inhibit intracellular aggregation of amyloidogenic light chains. J. Cell. Biol. 152, 705-715.

106. Abraham, R. S., Ballman, K. V., Dispenzieri, A., Grill, D. E., Manske, M. K., Price-Troska, T. L., Paz, N. G., Gertz, M. A., Fonseca, R. (2005) Functional gene expression analysis of clonal plasma cells identifies a unique molecular profile for light chain amiloidosis. Blood 105, 794-803.

107. Milardi, D., la Rosa, C., Fasone, S., Grasso, D. (1997) An alternative approach in the structure-based predictions of the thermodynamic of protein unfolding. Biophys. Chem. 69, 43-51.

108. Jarrett, J. T., Lansbury, P. T. (1992) Amyloid fibril formation requires a chemically discriminating nucleation event: Studies of an amyloidogenic sequence from the bacterial protein OsmBt. Biochemistry 31, 12345-12352.

109. Nilsson, M. R. (2004) Techniques to study amyloid fibril formation *in vitro*. Methods 34, 151–160.

110. Fändrich, M. (2007) Absolute correlation between lag time and growth rate in the spontaneous formation of several amyloid-like aggregates and fibrils.J. Mol. Biol. 365, 1266-1270.

111. Krebs, M. R. H., Bromley, E. H. C. Donald, A. M. (2005) The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localization and implications. J. Struct. Biol 149, 30–37.

112. Groenning, M., Olsen, L., van de Weert, M., Flink, J. M., Frokjaer, S., Jørgensen, F. S. (2007) Study on the binding of Thioflavin T to β -sheet-rich and non- β -sheet cavities. J. Struct. Biol 158, 358–369.

113. Groenning, M., Norrman, M., Flink, J. M., van de Weert, M., Bukrinsky, J. T., Schluckebier, G., Frokjaer, S. (2007) Binding mode of Thioflavin T in insulin amyloid fibrils. J. Struct. Biol 159, 483-497.

114. Voropai, E. S., Samtsov, M. P., Kaplevskii, K. N., Maskevich, A. A., Stepuro, V. I., Povarova, O. I., Kuznetsova, I. M., Toroverov, K. K., Fink, A. L., Uverskii, V. N. (2003) Spectral properties of thioflavin T and its complexes with amyloid fibrils. J. Appl. Spectrosc. 70, 868–874. 115. Ionescu-Zanetti, C., Khurana, R., Gillespi, J. R., Petrick, J. S., Trabachino, L. C., Minert, L. J., Carter, S. A., Fink, A. L. (1999) Monitoring the assembly of Ig light-chain amyloid fibrils by atomic force microscopy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 13175-13179.

116. Khurana,K., Ionescu-Zanetti, C., Pope, M., Li, J., Nielson, L., Ramírez-Alvarado, M., Regan, L., Fink, A. L., Carter, S. A. (2003) A general model for amyloid fibril assembly based on morphological studies using atomic force microscopy. Biophys J. 85, 1135–1144.

117. Klunk, W. E., Jacob, R. F., Mason R. P. (1999) Quantifying amyloid by Congo red spectral shift assay. Methods Enzymol. 309, 285-305.

118. Johnson, W. C. (1990) Protein secondary structure and circular dichroism: A practical guide, Proteins: Struct. Funct. Genet. 7, 205–214.

119. McLaughlin, R. W., De Stigter J. K., Sikkink, L. A., Baden, E. M., Ramirez-Alvarado, M. (2006) The effects of sodium sulfate, glycosaminoglycans, and Congo red on the structure, stability, and amyloid formation of an immunoglobulin light-chain protein. Protein Sci 15, 1710-1722.

120. Narimoto, T., Sakurai, K., Okamoto, A., Chatani, E., Hoshino, M., Hasegawa, K., Naiki, H., Goto, Y. (2004) Conformational stability of amyloid fibrils of β 2-microglobulin probed by guanidine-hydrochloride-induced unfolding. FEBS 576, 313-319.

121. Morozova-Roche, L. A., Zurdo, J., Spencer, A., Noppe, W., Receveur, V., Archer, D. B., Joniau, M., Dobson, C. M. (2000) Amyloid fibril formation and seeding by wild-type human lysozyme and its disease-related mutational variants. J. Struct. Biol. 130, 339–351.

122. Goldsbury, C., Frey, P., Olivieri, V., Aebi, U., Müller, S. A. (2005) Multiple assembly pathways underlie amyloid-b fibril polymorphisms. J. Mol. Biol. 352, 282-298.

123. Kad, N. M., Thomson, N. H., Smith, D. P., Smith, A. S., Radford, S. E. (2001) β_2 -Microglobulin and its deamidated variant, N17D form amyloid fibrils with a range of morphologies *in vitro*. J. Mol. Biol. 313, 559-571

124. Kad, N. M., Myers, S. L., Smith, D. P., Smith, D. A., Radford, S. A., Thomson, N. H. (2003) Hierarchical assembly of β_2 -microglobulin amyloid *in vitro* revealed by atomic force microscopy. J. Mol. Biol. 330, 785-797. 125. Kodali R, Wetzel R, (2007) Polymorphism in the intermediates and products of amyloid assembly. Curr Opin Struct Biol, doi:10.1016/j.sbi.2007.01.007.

126. Kanno, T., Yamaguchi, K., Naiki, H., Goto, Y., Kawai, T. (2005) Association of thin filaments into thick filaments revealing the structural hierarchy of amyloid fibrils. J. Struct. Biol. 149, 213–218.

127. Zhu, M., Han, S., Zhou, F., Carter, S. A., Fink, A. L. (2004) Annular oligomeric amyloid intermediates observed by *in situ* atomic force microscopy. J. Biol. Chem. 279, 24452–24459.

128. Lindgren, M., Karin, Sörgjerd., Hammarström, P. (2005) Detection and characterization of aggregates, prefibrillar amyloidogenic oligomers, and protofibrils using fluorescence spectroscopy. Biophys. J. 88, 4200–4212.

129. Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni,F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C. M., Stefani, M. (2002) Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. Nature 416, 507-511.

130. Kourie, J. I., Henry, C. L. (2001) Protein aggregation and deposition: implications for ion channel formation and membrane damage. Croat. Med. J. 42, 358-373.

131. Kayed, R., Sokolov, Y., Edmonds, B., McIntire, T. M., Milton, S. C., Hall, J. E., Glabe, C. E. (2004) Permeabilization of lipid bilayers is a common conformation-dependent activity of soluble amyloid oligomers in protein misfolding diseases. J. Biol. Chem. 279, 46363–46366.

132. Pastor, M. T., Kümmerer, N., Schubert, V., Esteras-Chopo, A., Dotti, C.G., López de la Paz, M., Serrano, L. (2008) Amyloid toxicity is independent of polypeptide sequence, length and chirality. J. Mol. Biol. 375, 695–707.

133. Naiki, H., Gejyo, F. (1999) Kinetic analysis of amyloid fibril formation. Methods Enzymol. 309, 305–318.

134. Takahashi, N., Hasegawa, K., Yamaguchi, I., Okada, H., Ueda, T Gejyo, F., Naiki, H. (2002) Establishment of a first-order kinetic model of light chainassociated amyloid fibril extension *in vitro*. Biochim Biophys Acta 1601, 110– 120.

135. Harper, J. D., Lansbury, P. T. (1997) Models of amyloid seeding in Alzheimer's disease and scrapie: Mechanistic truths and physiological

consequences of the time-dependent solubility of amyloid proteins. Annu. Rev. Biochem. 66, 385–407.

136. O'Nuallain, B., Shivaprasad, S., Kheterpal, I., Wetzel, R. (2005). Thermodynamics of abeta(1 40) amyloid fibril elongation. Biochemistry 44, 12709–12718.

137. Hasegawa,K., Ono, K., Yamada, M., Naiki, H. (2002) Kinetic modeling and determination of reaction constants of Alzheimer's β -amyloid fibril extension and dissociation using surface plasmon resonance. Biochemistry 41, 13489-13498.

138. Vernaglia, B. A., Huang, J., Clark, E. D. (2004) Guanidine hydrochloride can induce amyloid fibril formation from hen egg-white lysozyme. Biomacromolecules 5, 1362-1370.

139. Flocco, M. M., Mowbray, S. L. (1994) Planar stacking interactions of arginine and aromatic side-chains in proteins. J. Mol. Biol. 235, 709-717.

140. Gallivan, J. P., Dougherty, D. A. (1999) Cation- π interaction in structural biology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96, 9459-9464.

141. Prajapati, R. S., Sirajuddin, M., Durani, V., Sreeramulu, S., Varadarajan, R. (2006) Contribution of cation- π interactions to protein stability. Biochemistry 45, 15000-15010.

142. Chothia, C., Lesk, A. M. (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J. Mol. Biol. 196, 901–917.

143. Al-Lazikani, B., Lesk, A. M., Chothia, C. (1997) Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. J. Mol. Biol. 273, 927–948.

144. André, S., Guillet, F., Charlemagne, J., Fellah, J. S. (2000) Structure and diversity of Mexican axolotl lambda light chain. Immunogenetics 52, 137-154.

145. Amrani, Y. M., Voegtlé, D., Montagutelli, X., Cazenave, P-A., Six, A. (2002) The immunoglobulin light chain restricted B6. κ - λ^{SEG} mouse strain suggests that the IGL locus genomic organization is subject to constant evolution. Immunogenetics 54, 106-119.

146. Richardson, J. S. and Richardson D. C. (2002) Natural β -sheet proteins use negative design to avoid edge-to edge aggregation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(5)., 2754-2759.

147. Dobson, C. M. (2006) An accidental breach of a protein's natural defense. Nat. Struct. Mol. Biol. 13, 295-297.

148. Król, M., Roterman, I., Pikarska, B., Konieczny, L., Rybarska, J., Stopa, B. (2003) Local and long-range structural effects caused by the removal of the N-terminal polypeptide fragment from immunoglobulin L chain λ . Biopolymers. 69, 189-200.

149. Perfetti, V., Ubbiali, P., Vignarelli, M. C., Diegoli, M., Fasani, R., Stoppini, M., Lisa, A., Mangione, P., Obici, L., Arbustini, E., Merlini, G. (1998) Evidence that amyloidogenic light chain undergo antigen-driven selection. Blood 91, 2948-2954.

150. Sablitzky, F., G. Wildner, and K. Rajewsky. (1985) Somatic mutation and clonal expansion of B cells in an antigen-driven immune response. EMBO J. 4, 345–350.

151. Frisch, C., Kolmar, H., Schmidt, A., Kleemann, G., Reinhardt, A., Pohl, E., Usón, I., Schneider, T. R., Frizt, H-J. (1996) Contribution of the intramolecular disulfidebridge to the folding stability of REI_v , the variable domain of a immunoglobulin κ light chain.

152. Chan, C., Hutchinson, E. G., Harris, D., Thornton, J. M. (1993) Identification, classification, and analysis of beta-bulges in proteins. Prot. Sci. 2, 1574-1590.

153. Mirny, L. A., Shakhnovich, E. I. (1999) Universally conserved positions in protein folds: reading evolutionary signals about stability, folding kinetics and function. J. Mol. Biol. 291, 177-196.

154. Green, N. S., Lin, M. M., Scharff, M. D. (1998) Somatic hypermutation of antibody genes: a hot spot warms up. BioEssays 20, 227–234.

155. Tomlinson, I. M., Walter, G., Jones, P. T., Dear, P. H., Sonnhammer, E.L. L., Winter, G. (1996) The imprint of somatic hypermutation on the repertoire of human germline V genes. J. Mol. Biol. 256, 813–817.

156. Pokkuluri, P. R., Huang, D-B., Raffen, R., Cai, X., Johnson, G., Stevens,P. W, Stevens, F. J., Schiffer, M. (1998) A domain flip as a result of a single amino-acid substitution. Structure 6, 1067-1073.

157. Loladze, V. V., Ermolenko, D. N., Makhatadze, G. I. (2002) Thermodynamic consequences of burial of polar and non-polar amino acid residues in the protein interior. J. Mol. Biol. 320, 343–357.

158. Mandel-Gutfreund, Y., and Gregoret L. M. (2002) On the significance of alternating patterns of polar and non-polar residues in beta-strands. J. Mol. Biol. 323, 453–461.

159. Stevens, F. J. (2000) Four structural risk factors identify most fibrilforming kappa light chains. Amyloid 7, 200-211.

160. Marek, P., Abedini, A., Song, B., Kanungo, M., Johnson, M. E., Gupta, R., Zaman, W., Wong, S. S., Raleigh, D. P. (2007) Aromatic interactions are not required for amyloid fibril formation by islet amyloid polypeptide but do influence the rate of fibril formation and fibril morphology. Biochemistry 46, 3255-3261.

161. Tracz, S. M, Abedini, A., Driscoll, M., Raleigh, D. P. (2004) Role of aromatic interactions in amyloid formation by peptides derived from human Amylin. Biochemistry 43, 15901-15908.

162. Kaplan, B., Livneh, A., Gallo, G. (2007) Charge differences between *in vivo* deposits in immunoglobulin light chain amyloidosis and non-amyloid light chain deposition disease. Br J Haematol. 136, 723-728.

163. Bellotti, V., Merlini, G., Bucciarelli, E., Perfetti, V., Quaglini, S., Ascari, E. (1990) Relevance of class, molecular weight and isoelectric point in predicting human light chain amyloidogenicity. Br J Haematol. 74, 65-69.

164. Makhatadze, G. I., Loladze, V. V., Ermolenko, D. N., Chen, X-F., Thomas, S. T. (2003) Contribution of Surface Salt Bridges to Protein Stability: Guidelines for Protein Engineering. J. Mol. Biol. 327, 1135–1148.

165. Zhou, N. E., Kay, C. M., Hodges, R. S. (1994). The net energetic contribution of interhelical electrostatic attractions to coiled-coil stability. Protein Eng. 7, 1365–1372.

166. Strop, P. & Mayo, S. L. (2000). Contribution of surface salt bridges to protein stability. Biochemistry, 39, 1251–1255.

167. 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.

168. Ewert, S., Huber, T., Honegger, A., and Plückthun, A. (2003) Biophysical properties of human variable antibody domains, J. Mol. Biol. 325, 531-553.

169. Trevino, S. R., Schaefer, S., Scholtz, J. M. Pace, C. N. (2007) Increasing protein conformational stability by optimizing β -turn sequence. J Mol Biol. 373, 211–218.

170. Esteras-Chopo, A., Serrano, L., López de la Paz, M. (2005) The amyloid stretch hypothesis: Recruiting proteins toward the dark side. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 16672–16677.

171. Balbirnie, M., Grothe, B., Eisenberg, D. S. (2001) An amyloid-forming peptide from the yeast prion Sup35 reveals a dehydrated β -sheet structure for amyloid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 2375–2380.

172. Ventura, S., Zurdo, J., Narayanan, S., Parreño, M., Mangues, R., Reif, B., Chiti, F., Giannoni, E., Dobson, C. M., Aviles, F. X., Serrano, L. (2004) Short amino acid stretches can mediate amyloid formation in globular proteins: The Src homology 3 (SH3) case. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 7258-7263.

173. Ivanova, M. I., Thompson, M. J., Eisenberg, D. (2005) A systematic screen of $\lceil \beta_2$ -microglobulin and insulin for amyloid-like segments. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 4079–4082.

174. Frare, E., Polverino de Laureto, P., Zurdo, J., Dobson, C. M., Fontana, A. (2004) A highly amyloidogenic region of hen lysozyme. J. Mol. Biol. 340, 1153–1165.

175. Zibaee, Z., Jakes, R., Fraser, G., Serpell, L. C., Crowther, R. A., Goedert,
M. (2007) Sequence determinants for amyloid fibrillogenesis of human αSynuclein. J. Mol. Biol. 374, 454–464.

176. Sánchez de Groot, N., Pallarés, I., Avilés, F. X., Vendrell, J., Ventura, S.(2005) Prediction of "hot spots" of aggregation in disease-linked polypeptides.BMC Structural Biology 5, 18-32.

177. Pawar, A. P., DuBay, K. F., Zurdo, J., Chiti, F., Vendruscolo, M., Dobson, C. M. (2005) Prediction of "Aggregation-prone" and "Aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases. J. Mol. Biol. 350, 379–392.

178. Fernández-Escamilla, A., Rousseau, F., Schymkowitz, J., Serrano, L. (2004) Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptide and proteins. Nature 22, 1302-1306.

179. Thompson, M. J., Sievers, S. A., Karanicolas, J., Ivanova, M. I., Baker, D., Eisenberg, D. (2006) The 3D profile method for identifying fibril-forming segments of proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103, 4074–4078.

180. Wang, W., and Hecht, M. H. (2002) Rationally designed mutations convert de novo amyloid-like fibrils into monomeric-sheet proteins. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 2760–2765.

181. Hrncic, R., Wall, J., Wolfenbarger, D. A., Murphy, C. L., Schell, M., Weiss, D. T., Solomon, A. (2002) Antibody-Mediated Resolution of Light Chain-Associated Amyloid Deposits. Am. J. Pathol 157, 1239-1246.

182. Teng. J., Russell, W. J., Gu, X., Cardelli, J., Lamar-Jones, M., Herrera, G. (2004) Different types of glomerulopathic light chains interact with mesangial cells using a common receptor but exhibit different intracellular trafficking patterns. Lab Invest 84, 440-451.

183. Lührs, T., Ritter, C., Adrian, M., Riek-Loher, ., Bohrmann, B., Döbeli, H., Schubert, D., Riek, R. (2005) 3D structure of Alzheimer's amyloid-beta(1-42) fibrils. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102, 17342-17347.

184. Chung, C. M., Chiu, J. D., Connor, L. H., Gursky, O., Lim, A., Dykstra, A.
B., Liepnieks, J., Benson, M. D., Costello, C. E., Skinner, M., Walsh, M. T.
(2004) Thermodynamic stability of κI immunoglobulin light chain: Relevance for multiple myeloma. Biophys J. 88, 4232-4242.

The CDR1 of the Human λVI Light Chains Adopts a New Canonical Structure

L. del Pozo Yauner, E. Ortiz, and B. Becerril*

Department of Molecular Medicine and Bioprocesses, Institute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico, Cuernavaca, Mexico

ABSTRACT We performed a comparative analysis of the conformation of the CDR1 of the human λ VI variable domains JTO and WIL and the equivalent loop of the λ I light chains RHE and KOL, which are representative of the type I canonical structure for λ light chains. On the basis of the differences found in the main chain conformation, as well as the identity of the residues at key positions, we showed that the L1 of some λ VI light chains adopts a conformation that represents a new type of canonical structure. The conformation of the L1 of those λVI light chains, is primarily determined by the presence of an Arg residue at position 25. The analysis of the AVI light chain sequences so far reported, showed that near 25% of those proteins have Gly at position 25 instead of Arg, which represents an allotypic variant of the λ VI variable locus. The presence of Gly at position 25 in the L1 of λ VI light chains would imply a different conformation for this loop. Additionally, the position 68 in λ VI light chains, which is at the top of the FR3 loop, showed such spatial orientation and variability that suggested its participation in the conformation of the antigen recognition surface in this subgroup of λ chains. Proteins 2006;62:122-129. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

Key words: canonical structure; hypervariable loops; lambda light chain; λVI

INTRODUCTION

The dual function of immunoglobulins as membrane antigenic receptors in B lymphocytes and soluble effectors of the immune humoral response is based on their capacity to bind a variety of foreign and self molecules through the antigen binding site or paratope.¹ This site is formed by six hypervariable loops known as complementarity determining regions (CDRs), three from the light (L1, L2, and L3), and three from the heavy (H1, H2, and H3) chain variable domains.^{2,3} Despite the high sequence and length variability shown by CDRs, it has been found at the crystal structure level that, at least in five of them (L1, L2, L3, H1, and H2), the peptide backbone usually adopts a limited number of main chain conformations which have been called canonical structures.4-14 A particular canonical structure is defined by the length of the hypervariable loop and the residues present at key positions.⁵ The conformation adopted by these key residues and the interactions in which they are involved are factors determining the structure of the loops.^{5,10–12}

The knowledge emerged from the definition of canonical structures stimulated the development of algorithms to predict the structure of hypervariable regions of antibodies.^{15–18} It has also been a valuable tool for studying the structural bases of antibody-antigen recognition.¹⁹ However, this topic is not a concluded theme. Up to now, the canonical structures for the L1 of human λ light chains belonging to subgroups I, II, and III have been described.^{5,11,14,20} Taken together, these subgroups are expressed in approximately 96% of the B λ lymphocytes in peripheral blood.²¹ Nonetheless, the structural diversity of the L1 from less frequently expressed, although not necessarily less immunologically relevant families of human λ V_I gene segments, remains unknown.

The $\lambda VI~V_{\rm L}$ subgroup is represented by only one gene segment, 6a, which encodes the first 98 residues of all λ VI light chains.^{22,23} This gene segment is expressed in approximately 2% of peripheral blood Bλ lymphocytes of healthy individuals.²¹ It has been found that the λ VI subgroup is preferentially expressed in AL amyloidosis,²⁴ which has raised the interest in the characterization of the structural properties of the light chains belonging to this subgroup. The crystal structure of two recombinant V_L domains (rV_L) belonging to the human λ VI subgroup, the nonamyloidogenic JTO (PDB accession number 1CD0) and the amyloidogenic WIL (PDB accession number 2CD0), have been recently reported.²⁵ The authors described structural characteristics typical of these proteins as the enlargement of the FR3 loop due to a two residues insertion between positions 68 and 69 and an unusual planar interaction between Arg25 and Phe2 that influences the structure of the L1.²⁵ The conformations of the L2 and L3 of both λ VI

Received 12 May 2005; Accepted 17 August 2005

Published online 15 November 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/prot.20779

Abbreviations: CDR, complementarity determining region; FR, framework region; L1, hypervariable loop 1 of variable domain of light chain; V_L , light chain variable domain; r, recombinant; RMS, root mean square.

Grant sponsor: grants from DGAPA; Grant sponsor: UNAM; Grant number: IN220602-3; Grant sponsor: CONACyT; Grant number: D44122-Q (B.B.); Grant sponsor: DGEP, UNAM scholarship (L.del P.Y.)

^{*}Correspondence to: Baltazar Becerril, Department of Molecular Medicine and Bioprocesses, Institute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico, Avenida Universidad No. 2001 Colonia Chamilpa, Cuernavaca 62210, Mexico. E-mail: baltazar@ibt.unam.mx
$rV_{\rm L}$ domains corresponded to previously described canonical forms. 5,14 In this article we identify some other characteristic structural elements in both proteins that prompted us to propose a new type of canonical structure for the L1 of the λ light chains.

MATERIALS AND METHODS

The structure of the $\lambda VI \ rV_L$ JTO and WIL and the λI light chains RHE and KOL were accessed from the Protein Data Bank (PDB entries 1CD0, 2CD0, 2RHE, and 2FB4, respectively). Comparative analysis of each structure and the main chain φ and ψ angle calculations were performed with SwissPdbViewer.²⁶ The same program was used to compute H-bonds in the rV_L JTO and WIL structures. The H-bond detection threshold was set to 3.5 \pm 0.05 Å as maximal distance and 90.0° as minimal angle.

The human and nonhuman λ light chain sequences analyzed were compiled from the SwissProtein data bank and GeneBank. The alignment was performed with ClustalX,²⁷ with manual adjustment, based on the Chothia and Lesk structural alignment.⁵

TABLE I. Summary of High-resolution Structures of Human and Mouse Immunoglobulins Used to Describe the Canonical Structures for L1 of λ Light Chains[†]

Antibody	PDB file	Resolution (Å)	R factor (%)
RHE	2rhe	1.60	14.9
KOL	2fb4	1.90	18.9
NEWM	7fab	2.0	16.9
HIL	8fab	1.80	17.3
CHA255	1ind	2.20	18.8
HC19	1gig	2.30	19.5
SE155	1mfa	1.70	16.6
WIL	2cd0	1.80	28.9
JTO	1cd0	1.90	18.4

 † The λ VI rV_L JTO and WIL are included for comparative purpose.

RESULTS AND DISCUSSION λVI Light Chains Crystallographic Structures

JTO and WIL structures are refined to a resolution lower than 2.0 Å, but their *R*-factor differs, being 18.4 and 28.9%, respectively.²⁵ For comparative purposes, Table I shows the resolution and the *R*-factor of the antibody structures that have been used to describe the known canonical classes for the L1 of human and mouse λ light chains.^{5,11,14} Because of its better R-factor, the analysis reported in this article was centered on the structure of JTO. The structure of WIL was subsequently used to complete this analysis.

λVI Light Chain L1 Sequence Characteristics

The L1 of JTO and WIL is 10 residues long, as the L1 of the λ I light chains RHE and KOL, for which the type 1 canonical structure was previously described.⁵ Structural alignment places these residues at positions 25 to 30, 30a, 30b, 31, and 32, according to the Chothia and Lesk numbering system,⁵ henceforward used in this article. We will focus our discussion on the differences between the λ VI L1 and the type 1 canonical structure because the remaining ones differ in the loop's length,^{11,14} which, by definition, implies a different canonical form.⁵ As shown in Table II, the key residues at positions 30, 33, and 71 in JTO and WIL are conserved, compared with RHE and KOL. However, as shown in Figure 1(a), the conformation of the L1 in JTO clearly differs from that of RHE. The structural fitting of the main chain atoms of residues 25-32 of JTO and RHE shows a difference in the RMS value of 2.9 Å, the same value obtained when the L1 of JTO and KOL are fitted. This is in clear contrast with the RMS values obtained when the L1 of JTO and WIL as well as when the L1 of both monomers of the JTO crystallographic dimers are compared (see Table III).

The divergence of the L1 conformation of JTO with respect to the type 1 canonical structure is partially explained by the presence of an Arg residue instead of a

TABLE II. Sequence Patterns from the Invariant Cys23 to the Invariant Trp35 Residues of Human and Mouse λ Light Chains Used to Describe the Known L1 Canonical Structure Types[†]

Light chain	$\frac{2^{\mathrm{a}}}{2^{\mathrm{b}}}$	$\frac{4}{4}$	$\frac{23}{23}$	$\frac{24}{24}$	<u>25</u> 25	$\frac{26}{26}$	$\frac{27}{27}$	<u>27a</u> 28	<u>27b</u> 29	<u>27c</u> <u>30</u>	<u>28</u> 30a	<u>29</u> 30b	<u>30</u> 30c	$\frac{31}{31}$	<u>32</u> <u>32</u>	<u>33</u> 33	$\frac{34}{34}$	$\frac{35}{35}$	<u>66</u> 66	$\frac{71}{71}$	<u>90</u> 90	Length	Canonical structure type
KOL(H λI) ^c	S	L	С	S	G^d	Т	S	\mathbf{S}	Ν	Ι	G	S		S	Т	V	Ν	W	Κ	A	A	10	1^{5}
RHE(H λI)	\mathbf{S}	\mathbf{L}	С	Т	G	\mathbf{S}	Α	Т	D	Ī	\mathbf{S}	G		Ν	$\overline{\mathbf{S}}$	\boldsymbol{V}	Ι	W	Κ	A	A	10	1^5
NEWN(H λ I)	\mathbf{S}	\mathbf{L}	С	Т	\overline{G}	\mathbf{S}	\mathbf{S}	\mathbf{S}	Ν	Ī	G	Α	G	Η	Ñ	\boldsymbol{V}	Κ	W	Κ	A	\mathbf{S}	11	2^{5}
SE155-4(M)	Α	V	С	R	\overline{S}	\mathbf{S}	Т	G	Т	\bar{V}	Т	\mathbf{S}	G	Ν	$\overline{\mathrm{H}}$	A	Ν	W	L	A	L	11	$3B^{11,14}$
CHA255(M)	Α	V	С	R	\mathbf{S}	\mathbf{S}	Т	G	Α	\overline{V}	Т	Т	\mathbf{S}	Ν	Y	A	Ν	W	L	A	L	11	$3A^{11,14}$
HC19(M)	Α	V	С	R	\boldsymbol{S}	\mathbf{S}	Т	G	Α	\overline{V}	Т	Т	\mathbf{S}	Ν	Y	A	Ν	W	L	A	L	11	$3A^{11,14}$
HIL(H λIII)		L	С	\mathbf{S}	\overline{A}	Ν	Α			\overline{L}	Р	Ν		Q	$\overline{\mathbf{P}}$	A	Υ	W	T	\boldsymbol{V}	A	8	$4^{14,20}$
WIL(H λVI)	F	\mathbf{L}	С	Т	\overline{R}	\mathbf{S}	\mathbf{S}	G	\mathbf{S}	I	Α	Ν		Ň	Y	\boldsymbol{V}	Η	W	\boldsymbol{V}	A	\mathbf{S}	10	
$JTO(H \lambda VI)$	F	\mathbf{L}	С	Т	R	\mathbf{S}	\mathbf{S}	G	Ν	Ī	D	\mathbf{S}	_	Ν	Y	\boldsymbol{V}	Q	W	Ι	A	\mathbf{S}	10	

[†]The residues at positions 25 and 32, which limit the L1, and the residue at the position 30 (Chothia and Lesk numbering system) are underscored. Residues at other positions, not located at the L1 but having influence on its main chain conformation are also shown. ^aKabbat numbering system.

^bChothia and Lesk numbering system.

 c For each light chain the identification name, the species of origin ("H" means human and "M" means mouse) and the V_L subgroup (for human λ light chains) are indicated.

^dThe residues determining the L1 folding of each canonical structure are shown in bold italic.



Fig. 1. (a) Trace of the L1 loops of JTO (red) and RHE (green). The superposition was generated with SwissPdbViewer based on the alignment of residues at positions 23–35 only. (b) Trace of the L1 loops (residues 23–35) and the FR3 loops (residues 63–74) of JTO and RHE. The same color code is used. The superposition was generated with SwissPdbViewer, structurally aligning all the residues of whole domains. The residues occupying the positions 23 (Cys), 30 (IIe), and 35 (Trp) are shown in stick representation. Figure was generated with PyMOL.



Fig. 2. H-bond networks stabilizing the main chain conformation of the L1 loops of the monomer A of JTO (a) and RHE (b). The limits of the L1 loop (residues 25 and 32) and the spatial relationship between the conserved residues Cys23 and Trp35 are shown. In the case of JTO, the planar interaction between Phe2 and Arg25 is also shown. The H-bond network of the L1 of RHE was taken from Reference 14. Figure was generated with PyMOL.

			wei	
Region	RHE/JTO RMS (Å)	KOL/JTO RMS (Å)	WIL/JTO RMS (Å)	Monom JTO _A /JTO _B RMS (Å)
FR1(4-24)	0.36	0.45	0.57	0.33
CDR1(25-32)	2.89	2.89	0.41	0.18
FR2(33-49)	1.27	0.94	0.61	0.37
CDR2(50-52)	0.07	0.18	0.08	0.07
FR3(53-90)	0.95	0.94	0.66	0.44
CDR3(91-96)	1.30	1.19	1.23	1.37
FR4(97-108)	0.84	1.05	0.6	0.3

TABLE III. Structural Fitting of Human rV_L λ VI JTO with RHE, KOL, and WIL, Performed with SwissPdbViewer[†]

[†]For every region, only the amino acids indicated were included in the fitting process.



Fig. 3. Residues forming the JTO hydrophobic pocket (side chains shown in red) in which the side chain of residue 30 (blue) is located. A segment of the amino terminal end is represented (orange), together with the FR3 loop (green), in order to show the environment of the hydrophobic pocket. The residues Phe2, Cys23, and Trp35 are shown in stick representation. Figure was generated with PyMOL.

Gly at position 25 (see Table II). According to the structure of both λ VI light chains, this residue points toward the solvent and is located at the space delimited by loops L1 and L3 and the amino-terminal region.²⁵ The spatial orientation of Arg25 side chain seems to be determined by the previously mentioned planar interaction between its guanidyl group and the Phe2 phenyl group, being the last residue typical of λ VI proteins.²⁵ The structural relationship between Arg25 and Phe2 is depicted in Figures 2(a) and 3.

The role of Arg25 in JTO and WIL is significantly different from that of Gly25 in the conformation of the L1 in RHE and KOL.⁵ Its bulky side chain imposes restrictions to the L1 folding that determine a different trace for

the main chain between positions 25 and 30b. As it can be seen in Table IV, the torsion angles of these residues in JTO and WIL are notably different from the equivalent ones in RHE and KOL.¹⁴ One consequence of these differences is that, in JTO and WIL, main chain atoms from residues 26 and 29 become farther apart. The hydrogen bond between them, normally stabilizing the type I β-turn in this region of the RHE and KOL light chains,⁵ cannot therefore be formed. Instead, new H-bonds are formed which differ in number and distribution from those stabilizing the L1 folding in RHE and KOL [see Fig. 2(a,b)]. Arg25 participates in two of the three main chain H-bonds stabilizing the L1 in λ VI light chains. The guanidyl Ne and N1 atoms of Arg25 establish H-bonds with the carbonyl O of residue at position 27 and the carbonyl O of residue at position 29, respectively. The remaining conserved H-bond is formed between main chain O of residue 29 and the main chain N of residue 30b. Arg25 is involved in other interactions that probably contribute to stabilize the conformation of the L1. Its carbonyl O H-bonds with Asn69 imino Nô2 and its carbonyl O is also H-bonded with the Arg25 main chain N. Asn69 Ob1 is also connected by a hydrogen bond with the Ile30 amido N. In the A monomer of the crystallographic dimer of JTO, a network of H-bonds is formed centered on the Ser30b $O\gamma$, which interacts with the Asn31 Oy, the Asn29 main chain O and the Arg25 $\,$ amino N1. This network is neither formed in the monomer B, nor in WIL, suggesting that these particular interactions do not seem to be indispensable for the L1 structure, because the folding of this loop in both monomers of JTO and in WIL is very similar (see Table III).

The nonhelical folding of the L1 in λ VI light chains still satisfies the requirement of placing the Ile30 side chain deep inside the core-associated nonpolar pocket, a structural motif that has been suggested to constitute a major determinant for the L1 folding of the λ light chains.^{5,11} However, the relative position of Ile30 in JTO and WIL differs from that in KOL and RHE. In the λ VI rV_L's the Ile30 C α is displaced 2.9 Å toward the FR3 loop, compared with the same atom in RHE and KOL [see Fig. 1(b)]. This loop is bent toward the solvent, adopting a more open conformation than in KOL and RHE. The bending of the FR3 loop was previously described for the murine Se155-4 antibody, where it has been suggested to create enough space to accommodate the L1 in a nonhelical conformation.¹¹ In JTO and WIL, the nonpolar pocket occupied by Ile30 is limited by Val33, Ile66, and Ala71. The three

	Canonic 1 d	al type	λVI	Φ	Canonic 1 V	al type	λV	IΨ
Residue	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
25	-132	11	-86	9	-148	8	122	2
26	-134	10	-55	3	178	2	-51	18
27	-53	4	-141	15	-35	3	155	16
28	-82	1	84	10	-18	4	146	0.42
29	-113	1	-64	4	-90	7	127	4
30	-58	7	-64	8	-40	4	-19	22
30a	-60	7	-87	9	-26	9	-9	19
30b	-116	6	-75	11	-22	9	-7	5
31	-133	1	-147	1	163	7	147	5
32	-75	12	-64	8	147	14	146	6

TABLE IV. Torsion Angles of Residues Forming the L1 of Canonical Structure Type 1^{14} and λ VI light chains^{25}

[†]For each angle, the mean from the data of two structures (RHE/KOL for the type 1 structure and JTO/WIL for λ VI) and the standard deviation (SD) are given.

Arg25 side chain methylene groups also participate (Fig. 3). In type 1 and 2 canonical structures, the position 66 is polar (see Table II) and do not constitute part of the nonpolar pocket in which the residue 30 is anchored.⁵ As a consequence of the nonhelical folding of their L1, the relative position of Ile30 in JTO and WIL requires the presence of a nonpolar residue at position 66.

The canonical structure we are describing is the second one with nonhelical folding so far reported for the L1 of λ light chains. The first was the type 3, described for the λ light chains encoded by murine $V_{\rm L}$ gene segments $\lambda 1$ and $\lambda 2.^{11}$ Both structure types, even when they are clearly different from the one here described, have some common characteristics. In both cases, the presence of a non-Gly residue at position 25 imposes conformational restrictions to the L1, whose peptide main chain adopts a nonhelical folding that resemble an extended curl. Interestingly, position 28 in WIL and JTO is occupied by a Gly, as in the murine Se155-4 antibody (see Table II). It has been noticed that due to its short side chain, this residue, in both cases adopts a conformation nonfavored for larger residues, according to the Ramachandran plot.¹¹ This plasticity allows the adoption of such a fold of the L1 main chain that permits the accommodation of the hydrophobic side chain of residue at position 30 within the above mentioned nonpolar cavity.

We propose that the key residues that determine the L1 conformation in JTO and WIL light chains are Arg25, Gly28, Ile30, Val33, Ile66, and Ala71. Phe2 could also play an important role because it is directly interacting with Arg25 via stacking. Because of the differences with the type 1 canonical, the structure here described represents a new type of canonical structure. We propose it to be the sixth type for the L1 of λ light chains.^{5,11,14,20}

λ Light Chain Sequences That Fulfill the Requirements for the Sixth Type of L1 Canonical Structure

The identification of the key residues that determine the folding of the L1 of the human λ VI light chains, allows to identify other light chains whose L1 might have structures identical or similar to the one here described.⁵

We have analyzed the thus far reported $V_L \lambda$ sequences and have selected those that fulfill the criteria of having 10 residues at the L1, a residue different from Gly at position 25, a Gly at position 28, and a hydrophobic residue at position 30.

Table V shows the sequences that fulfill the aforementioned criteria. From those sequences, the majority of the reported mouse $V_L \lambda 4$ gene segment sequences presents fully conserved residues at positions 2, 25, 28, 30, 33, 66, and 71 with respect to the human λVI sequence.²⁸

The V_L λ 4 gene from the axolotl (Mexican newt), codes for the same residues at positions 25, 28, 33, and 71, but at position 2 it codes for Tyr instead of Phe and at position 66 it codes for Thr instead of Ile.²⁹ The Tyr at position 2 could establish analog interactions as the ones described for Phe2 with Arg25 in human λ VI. Thr66 has been reported to conform the hydrophobic vessel in the type 4 canonical structure,²⁰ so it could play a role similar to that in the axolotl L1. Consequently, we postulate that the L1 of the V_L of the light chains encoded by the mouse and the axolotl V_L λ 4 gene segments could have the same structure as the one of the CDR1 of λ VI light chains.

One Locus, Two Allotypes with Different L1 Canonical Structure

As we show in this article, the Arg 25 performs a determinant role in the conformation of the L1 of the λ VI light chains. Interestingly, in approximately 25% of the reported λ VI light chains a Gly occupies the position 25, as in λI , λII , and λIII light chains. The change Arg25Gly has been assumed in a previous report to be the result of somatic hypermutation.³⁰ It has been found, however, that the presence of Gly25 represents the existence of an allotypic variant of the 6a gene segment (Dr. Alan Solomon, The University of Tennessee Medical Center, Postgraduate School of Medicine, Knoxville, TN, personal communication). Considering that the characteristics of the residues at key positions 4, 30, 33, and 71 are conserved in λ VI and λ I light chains, the presence of a Gly instead of an Arg at position 25 in λ VI L1 would determine a change from an extended curl-like structure to the helical type 1 canonical conformation. It can be expected

		Ites	iuue a	r positioi	1 20, a	Uly a	r positi		ulu a li	yuropho	bic resiu	ue ai p	05111011 00	,					
	2	23	24	<u>25</u>	26	27	27a	27b	<u>27c</u>	28	29	30	31	<u>32</u>	33	34	35	66	71
Light chain ^a	2	23	24	$\underline{25}$	26	27	28	29	<u>30</u>	30a	30b	30c	31	32	33	34	35	66	71
Human $V\lambda VI$ gene segment $6a^a$	F	С	Т	<u>R</u>	\mathbf{S}	\mathbf{S}	G	\mathbf{S}	I	А	\mathbf{S}	_	Ν	Y	V	Q	W	Ι	Α
<i>M. musculus</i> and <i>M. spretus</i> $V\lambda 4^{b}$	\mathbf{F}	С	K/E	<i>R/P/C</i>	\mathbf{S}	Т	G	N/K	I	G	N/S		N/Y/D	Y/F	V/M	H/S/N	W	Ι	Α
Carcharhinus plumbeus type II ^c	Р	С	Т	N/A	\mathbf{S}	G	G/D	S/T	Ī	G/S/D	N/S/D		Y	Y/W	T/A	\mathbf{S}	W	V	Μ
Raja erinacea type I ^d	Р	С	R	M	Q	Ν	G	Ν	V	А	\mathbf{S}		Y	H	V	Y	W	R	Y
Raja erinacea type II ^d		С	Т	\overline{L}	S	G	G	\mathbf{S}	I	G	\mathbf{S}		\mathbf{L}	Y	Т	\mathbf{S}	W	V	Μ
Heterodontus franciscii type I ^e	Р	С	Α	M	Q	Ν	G	K/N	M/V	G	\mathbf{S}		Y	Y/N	Μ	S/Y	W	R	Η
Heterodontus franciscii type II ^e	Р	С	Т	M	S	G	G	\mathbf{S}	Ι	G	\mathbf{S}		Y	Y	Т	\mathbf{S}	W	V	\mathbf{L}
Hydrolagus colliei type II ^f	V/P	С	Т	M	S/T	G	G	\mathbf{S}	Ī	G/C/S	\mathbf{S}		Y/E	Y	T/V	S/Y	W	T/V/R	Μ
Mexican axolotl $V\lambda 4^{g}$	Y	С	Т	R	\mathbf{S}	\mathbf{S}	G	\mathbf{S}	I	R	G		Η	\mathbf{S}	V	\mathbf{S}	W	Т	Α
Xenopus laevis type $\mathrm{III}^{\mathrm{h}}$	V	С	Т	\overline{L}	S/R	G	A/Y	\mathbf{S}	Ī	\mathbf{S}	D/G	_	R/Y	Y/H	V	N/H/Y	W	Κ	G/A

TABLE V. Sequence Alignment of the L1 (Positions 25 to 32) of Reported λ Light Chains of human and nonhuman origin with a length of 10 residues, a non-Gly residue at position 25, a Gly at position 28 and a hydrophobic residue at position 30^{\dagger}

[†]The residue occupying the positions 2, 66, and 71 are also shown (Chothia and Lesk numbering system). Underscores and bold italic as in Table II.

^aThe sequence of the germ line λ VI V_L gene segment 6a was taken from Reference 23.

^bThe sequence pattern was constructed from the sequences published in Reference²⁸ (accession numbers M94349, M94351, AF357982, AF357983, AF357984, AF357985, AF357986, AF357987, AF357981, AF357980, AF357979, AF357976, AF357975, AF357977).

^cThe sequence was taken from the Reference³² (accession number M81314).

^dRaja erinacea type I light chain is a consensus sequence taken from reference³³ and type II light chains were taken from Reference 34 (accession numbers L25565 and L25566).

^eHeterodontus franciscii type I light chains were taken from Reference³⁵ (accession numbers X15315 and X15316) and type II light chains were taken from reference³⁴ (accession numbers L25558 and L25560).

^fHydrolagus collie type II light chains were taken from Reference³⁶ (accession numbers L25556, L25551, L25552, L25549).

^gThe sequence was taken from the reference²⁹ (accession number AF317324).

^hXenopus laevis type III light chain sequences were taken from the Reference³⁵ (accession numbers L76574, L76584, L76575, L76582).

that this change in the conformation of the L1 of λVI light chains would modify the spatial orientation and solvent accessibility of some residues of this loop, affecting thereafter its interaction with the putative antigen. As far as we know, there is no other report of two allotypes for the same λ V_L locus coding for different canonical structures for the L1. The biological relevance of this observation remains to be established.

The detailed analysis of the reported λ VI light chain sequences used in this study, revealed that position 68 (germline encoded Ser) is mutated in 25% of the cases. Besides Ser, eight other amino acids can be found at 68, indicating that this position is not only variable, but diverse. The tri-nucleotide coding for Ser68 in the germline (AGC) represents a mutational hot spot,^{21,31} which is in clear contrast with the tri-nucleotides coding for adjacent positions Ser68a and Ser68b (TCC), which are not hypervariable. This is in accordance with the proposition that the insertions in the FR3 could make this loop part of the region interacting with the antigen, thus increasing the contact surface²⁵ and explaining the hypervariability of residue 68.

CONCLUDING REMARKS

Here we have made a comparative analysis of the conformation of the L1 of the human $rV_{\rm L}\,\lambda VI$ domains JTO and WIL and the equivalent loops of the λI light chains RHE and KOL, which are representative of the type I canonical form for λ light chains. On the basis of the differences found in the main chain conformation as well as in the identity of the residues at key positions, we have shown that the L1 of the λVI light chains adopts a conformation that represents a new type of canonical structure. The characteristic nonhelical conformation of the L1 of the λ VI light chains analyzed, which resembles an extended curl, is primarily determined by the presence of an Arg residue at the key position 25. The analysis of the λ VI light chain sequences so far reported, shows that near 25% of those proteins have Gly at 25 instead of Arg, which represents an allotypic variant of the $\lambda VI V_L$ locus. The presence of Gly at position 25 instead of Arg in the L1 of λ VI would imply a different conformation for this loop. Additionally, we have reported that the position 68 in λ VI light chains, which is at the top of the FR3 loop, has such spatial orientation and variability that suggests it could be part of the antigen recognition surface in this subgroup of λ chains.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Rosalba Sanchez, Leopoldo Güereca, and Timoteo Olamendi for technical assistance. We also thank Juan Manuel Hurtado and Arturo Ocadiz for computational assistance. This work was partially supported by grants from DGAPA, UNAM, IN220602-3 and CONACyT D44122-Q to B.B. L.del P.Y. is a recipient of a scholarship from DGEP, UNAM.

REFERENCES

1. Janeway CA. How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. Proc Natl Acad Sci USA 2001;98: 7461–7468.

- Wu TT, Kabat EA. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. J Exp Med 1970;132:211-250.
- Amzel LM, Poljak RJ. Three-dimensional structure of immunoglobulins. Annu Rev Biochem 1979;48:961–997
- Chothia C, Lesk AM, Levitt M, Amit AG, Mariuzza RA, Phillips SEV, Poljak RJ. The predicted structure of immunoglobulin D1.3 and its comparison with the crystal structure. Science 1986;233: 755–758.
- 5. Chothia C, Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J Mol Biol 1987;196:901–917.
- Chothia C, Lesk AM, Tramontano A, Levitt M, Smith-Hill SJ, Air G, Sheriff S, Padlan EA, Davies D, Tulip WR, Colman PM, Spinelli S, Alzari, PM, Poljak RJ. Conformation of immunoglobulin variable regions. Nature 1989;342:877–883.
- Tramontano A, Chothia C, Lesk AM. Framework residue 71 is a mayor determinant of the position and conformation of the second hypervariable region of the VH domain of immunoglobulins. J Mol Biol 1990;215:175–182.
- Brünger ÁT, Leahy DJ, Hynes TR, Fox RO. 2.9 Å resolution of an anti-dinitrophenyl spin label monoclonal antibody Fab fragment with bound hapten. J Mol Biol 1991;221:239–256.
- He XM, Ruker F, Casale E, Carter DC. Structure of the human monoclonal antibody Fab fragment against GP41 of HIV-1. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:7154–7158.
- Chothia C, Lesk AM, Gherardi E, Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB, Winter G. Structural repertoire of the human VH segments. J Mol Biol 1992;227:799-817.
- 11. Wu S, Cygler M. Conformation of complementarity determining region L1 loop in murine IgG λ light chain extended the repertoire of canonical forms. J Mol Biol 1993;229:597–601.
- Tomlinson IM, Cox JPL, Gherardi E, Lesk AM, Chothia C. The structural repertoire of the human V kappa domain. EMBO J 1995;14:4628-4638.
- Guarné A, Bravo J, Calvo J, Lozano F, Vives J, Fita I. Conformation of the hypervariable region L3 without the key proline residue. Protein Sci 1996;5:167–169.
- Al-Lazikani B, Lesk AM, Chothia C. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. J Mol Biol 1997;273: 927–948.
- Bruccoleri RE, Haber E, Novotny J. Structure of antibody hypervariable loops reproduced by a conformational search algorithm. Nature 1988;355:564–568.
- Martin AC, Cheetham JC, Rees AR. Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm. Proc Natl Acad Sci USA 1989;86:9268-9272.
- Martin ACR, Thorton JM. Structural families in loops of homologous proteins: automatic classification, modeling and application to antibodies. J Mol Biol 1996;263:800-815.
- Morea V, Lesk AM, Tramontano A. Antibody modeling: implications for engineering and design. Methods 2000;20:267–279.
- Vargas E, Lara F, Ramirez MC, Almagro JC. Canonical structure repertoire of the antigen-binding site of immunoglobulin suggest strong geometrical associated to the mechanism of immune recognition. J Mol Biol 1995;254:497–504.
- Vargas E, Paz E. Modifications to canonical structure sequence patterns: analysis of L1 and L3. Proteins 2002;47:250–254.
- Îgnatovich O, Tomlinson IM, Jones PT, Winter G. The creation of diversity in human immunoglobulin V_λ repertoire. J Mol Biol 1997;268:69–77.
- 22. Ch'ang L-Y, Yen C-P, Besl L, Schell M, Solomon A. Identification and characterization of a functional human Ig V λ VI germline gene. Mol Immunol 1994;31:531—536.
- 23. Williams SC, Frippiat J, Tomlinson IM, Ignatovich O, Lefranc M, Winter G. Sequence and evolution of the human germline V_λ repertoire. J Mol Biol 1996;264:220–232.
- 24. Solomon A, Frangione B, Franklin EC. Bence Jones proteins and light chains of immunoglobulins. Preferential association of the V λ VI subgroup of the human light chains with amiloidosis AL (λ). J Clin Invest 1982;70:453–460.
- Pokkuluri PR, Solomon A, Weiss DT, Stevens FJ, Schiffer M. Tertiary structure of human λ6 light chains. Amyloid 1999;6:165– 171.
- Guex N, Peitsch MC. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. Electrophoresis 1997;18:2714–2723.
- 27. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins

DG. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res 1997;24:4876–4882.

- 28. Amrani YM, Voegtlé D, Motagutelli X, Cazenave P-A, Six A. The Ig light chain restricted $B6.\kappa^-\lambda^{SEG}$ mouse strain suggests that the *IGL* locus genomic organization is subject to constant evolution. Immunogenetics 2002;54:106–119.
- André S, Guillet F, Charlemagne J, Fellah JS. Structure and diversity of Mexican axolotl lambda light chain. Immunogenetics 2000;52:137–144.
- 30. Comenzo RL, Zhang, Martínez C, Osman K, Herrera GA. The tropism of the organ involvement in primary systemic amyloid-osis: contributions of Ig V_L germ line gene use and clonal plasma cell burden. Blood 2001;98:714–720.
- Green NS, Lin MM, Scharff MD. Somatic hypermutation of antibody genes: a hot spot warms up. BioEssays 1998;20:227-234.
- 32. Hohman VS, Schluter SF, Marchalonis JJ. Complete sequence of a cDNA clone specifying sandbar shark immunoglobulin light chain:

gene organization and implications for the evolution of light chains. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:276-280.

- 33. Anderson MK, Shamblott MJ, Litman RT, Litman GW. Generation of immunoglobulin light chain gene diversity in *Raja erinacea* is not associated with somatic rearrangement, an exception to a central paradigm of B cell immunity. J Exp Med 1995;182:109– 119.
- Rast JP, Anderson MK, Ota T, Litman RT, Margittai M, Shamblott MJ, Litman GW. Immunoglobulin light chain class multiplicity and alternative organizational forms in early vertebrate phylogeny. Immunogenetics 1994;40:83–99.
- 35. Haire RN, Ota T, Rast JP, Litman RT, Chan FY, Zon LI, Litman GW. A third Ig light chain gene isotype in *Xenopus laevis* consists of six distinct VL families and is related to mammalian lambda genes. J Immunol 1996;157:1544-1550.
- 36. Shamblott MJ, Litman GW. Genomic organization and sequences of immunoglobulin light chain genes in a primitive vertebrate suggest coevolution of immunoglobulin gene organization. EMBO J 1989;8:3733–3739.

Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics

Copy of e-mail Notification

Your article (21934) from "Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics" is available for download

Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics Published by John Wiley & Sons, Inc.

Dear Sir or Madam,

PDF page proofs for your article are ready for review.

Please refer to this URL address

http://kwglobal.co.in/jw/retrieval.aspx

Login: your e-mail address Password: ----

The site contains 1 file. You will need to have Adobe Acrobat Reader software to read these files. This is free software and is available for user downloading at http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep.html.

This file contains:

Author Instructions Checklist Adobe Acrobat Users - NOTES tool sheet Reprint Order form A copy of your page proofs for your article

After printing the PDF file, please read the page proofs. Since this article has been reviewed and accepted based on its original content, now is not the time to make substanive changes to text, tables, or figures. Next:

1) indicate changes or corrections in the margin of the page proofs;

- 2) answer all queries on the last page of the PDF proof;
- 3) proofread any tables and equations carefully;

4) check that any Greek, especially "mu", has translated correctly.

Within 48 hours, please return the following to the address given below:

original PDF set of page proofs,
Reprint Order form

Return to:

Production Editor, PROT Cadmus Professional Communications 300 West Chestnut Street

Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics

Copy of e-mail Notification

Ephrata, PA 17522 U.S.A. E-mail: jrnlprodprot@cadmus.com Fax: 717-738-9478 or 717-738-9479

Your article will be published online via our EarlyView service soon after correction receipt. Your prompt attention to and return of page proofs is crucial to faster publication of your work. If you experience technical problems, please contact Birender/Sundeep (wileysupport@kwglobal.com, or +91(44) 4205-8888 (ext. 310).

If you have any questions regarding your article, please contact me. PLEASE ALWAYS INCLUDE YOUR ARTICLE NO. (21934) WITH ALL CORRESPONDENCE.

This e-proof is to be used only for the purpose of returning corrections to the publisher.

Sincerely,

Production Editor, PROT Cadmus Professional Communications 300 West Chestnut Street Ephrata, PA 17522 U.S.A.

Tel: 717-738-9334 Fax: 717-738-9478 or 717-738-9479 E-mail: jrnlprodprot@cadmus.com

Author Satisfaction Survey - Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics

Please follow the below link to an online survey concerning your experience in publishing in this journal. Your answers will assist Wiley in refining the publishing process to best suit your needs and those of your fellow authors. Thanks for your time and consideration.

http://interscience.wiley.com/survey/prot



111 RIVER STREET, HOBOKEN, NJ 07030

IMMEDIATE RESPONSE REQUIRED

Your article will be published online via Wiley's EarlyView® service (www.interscience.wiley.com) shortly after receipt of corrections. EarlyView® is Wiley's online publication of individual articles in full text HTML and/or pdf format before release of the compiled print issue of the journal. Articles posted online in EarlyView® are peer-reviewed, copyedited, author corrected, and fully citable via the article DOI (for further information, visit www.doi.org). EarlyView® means you benefit from the best of two worlds--fast online availability as well as traditional, issue-based archiving.

Please follow these instructions to avoid delay of publication.

READ PROOFS CAREFULLY

- This will be your <u>only</u> chance to review these proofs. <u>Please note that once your corrected article is posted</u> <u>online, it is considered legally published, and cannot be removed from the Web site for further corrections.</u>
- Also note that the volume and page numbers shown on the proofs are for position only.

ANSWER ALL QUERIES ON PROOFS (Queries for you to answer are attached as the last page of your proof.)

- Mark all corrections directly on the proofs. Note that excessive author alterations may ultimately result in delay of publication and extra costs may be charged to you.

CHECK FIGURES AND TABLES CAREFULLY

- Check size, numbering, and orientation of figures.
- All images in the PDF are downsampled (reduced to lower resolution and file size) to facilitate Internet delivery. -----These images will appear at higher resolution and sharpness in the printed article.
- Review figure legends to ensure that they are complete.
- Check all tables. Review layout, title, and footnotes.

COMPLETE REPRINT ORDER FORM

- Fill out the attached reprint order form. It is important to return the form <u>even if you are not ordering reprints</u>. You may, if you wish, pay for the reprints with a credit card. Reprints will be mailed only after your article appears in print. This is the most opportune time to order reprints. If you wait until after your article comes off press, the reprints will be considerably more expensive.

RETURN

__PROOFS __REPRINT ORDER FORM __CTA (If you have not already signed one)

RETURN WITHIN 48 HOURS OF RECEIPT VIA FAX TO DEBRA KEENER 717-738-9478 or 717-738-9479.

QUESTIONS ?

Production Editor, PROT Phone: 717-738-9334 fax: 717-738-9360 E-mail: jrnlprodprot@cadmus.com Please refer to journal acronym and article production number

Softproofing for advanced Adobe Acrobat Users - NOTES tool

NOTE: ACROBAT READER FROM THE INTERNET DOES NOT CONTAIN THE NOTES TOOL USED IN THIS PROCEDURE.

Acrobat annotation tools can be very useful for indicating changes to the PDF proof of your article. By using Acrobat annotation tools, a full digital pathway can be maintained for your page proofs.

The NOTES annotation tool can be used with either Adobe Acrobat 6.0 or Adobe Acrobat 7.0. Other annotation tools are also available in Acrobat 6.0, but this instruction sheet will concentrate on how to use the NOTES tool. Acrobat Reader, the free Internet download software from Adobe, DOES NOT contain the NOTES tool. In order to softproof using the NOTES tool you must have the full software suite Adobe Acrobat Exchange 6.0 or Adobe Acrobat 7.0 installed on your computer.

Steps for Softproofing using Adobe Acrobat NOTES tool:

1. Open the PDF page proof of your article using either Adobe Acrobat Exchange 6.0 or Adobe Acrobat 7.0. Proof your article on-screen or print a copy for markup of changes.

2. Go to Edit/Preferences/Commenting (in Acrobat 6.0) or Edit/Preferences/Commenting (in Acrobat 7.0) check "Always use login name for author name" option. Also, set the font size at 9 or 10 point.

3. When you have decided on the corrections to your article, select the NOTES tool from the Acrobat toolbox (Acrobat 6.0) and click to display note text to be changed, or Comments/Add Note (in Acrobat 7.0).

4. Enter your corrections into the NOTES text box window. Be sure to clearly indicate where the correction is to be placed and what text it will effect. If necessary to avoid confusion, you can use your TEXT SELECTION tool to copy the text to be corrected and paste it into the NOTES text box window. At this point, you can type the corrections directly into the NOTES text box window. **DO NOT correct the text by typing directly on the PDF page.**

5. Go through your entire article using the NOTES tool as described in Step 4.

6. When you have completed the corrections to your article, go to Document/Export Comments (in Acrobat 6.0) or Comments/Export Comments (in Acrobat 7.0). Save your NOTES file to a place on your harddrive where you can easily locate it. **Name your NOTES file with the article number assigned to your article in the original softproofing e-mail message.**

7. When closing your article PDF be sure NOT to save changes to original file.

8. To make changes to a NOTES file you have exported, simply re-open the original PDF proof file, go to Document/Import Comments and import the NOTES file you saved. Make changes and reexport NOTES file keeping the same file name.

9. When complete, attach your NOTES file to a reply e-mail message. Be sure to include your name, the date, and the title of the journal your article will be printed in.

John Wiley & Sons, Inc.

REPRINT BILLING DEPARTMENT • 111 RIVER STREET • HOBOKEN, NJ 07030 PHONE: (201) 748-8789; FAX: (201) 748-6326 E-MAIL: reprints @ wiley.com PREPUBLICATION REPRINT ORDER FORM

Please complete this form even if you are not ordering reprints. This form MUST be returned with your corrected proofs and original manuscript. Your reprints will be shipped approximately 4 weeks after publication. Reprints ordered after printing are substantially more expensive.

JOURNAL: **PROTEINS:** Structure, Function, and Bioinformatics VOLUME_____ ISSUE_____

TITLE OF MANUSCRIPT

MS. NO._____

NO. OF PAGES_____ AUTHOR(S)_____

			REPR	INTS 81/4X11		
	No. of Pages	100 Reprints	200 Reprints	300 Reprints	400 Reprints	500 Reprints
		\$	\$	\$	\$	\$
	1-4	336	501	694	890	1,052
	5-8	469	703	987	1,251	1,477
	9-12	594	923	1,234	1,565	1,850
	13-16	714	1,156	1,527	1,901	2,273
	17-20	794	1,340	1,775	2,212	2,648
	21-24	911	1,529	2,031	2,536	3,037
	25-28	1,004	1,707	2,267	2,828	3,388
	29-32	1,108	1,894	2,515	3,135	3,755
	33-36	1,219	2,092	2,773	3,456	4,143
	37-40	1,329	2,290	3,033	3,776	4,528
Please	>send me	reprints of the	above article at		\$	
Please ease ac ease ac OTAI	e send me dd appropriate State dd 5% Postage and AMOUNT OF O	reprints of the and Local Tax {Ta: Handling	above article at x Exempt No	}	\$ \$ \$	
Please lease ao lease ao OTAL **Inter	e send me dd appropriate State dd 5% Postage and AMOUNT OF O <i>rnational orders must</i>	reprints of the and Local Tax {Ta: Handling	above article at x Exempt No tcy and drawn on a U.	} 	\$ \$ \$	
Please ease ac o TAI **Inter ease c	e send me dd appropriate State dd 5% Postage and AMOUNT OF O <i>rnational orders must</i> :heck one: Charge	reprints of the and Local Tax {Ta: Handling RDER** be paid in U.S. current eck enclosed	above article at x Exempt No tcy and drawn on a U.	S. bank Bill me Visa	\$ \$ \$ Credit Car MasterCar	rd rd Discover
Please ease ac o TAI **Inter ease c credit editCa	e send me dd appropriate State .dd 5% Postage and AMOUNT OF O <i>rnational orders must</i> :heck one: Cho card order, charge ardNo.	reprints of the and Local Tax { Ta Handling RDER** be paid in U.S. current eck enclosed to: American E	above article at x Exempt No ucy and drawn on a U. Express Signature	} S. bank Bill me Visa	\$ \$ \$ Credit Car MasterCar Exp.E	rd rd Discover
Please ease ac OTAL **Inter ease c credit editCa ill To	e send me dd appropriate State .dd 5% Postage and L AMOUNT OF O <i>rnational orders must</i> check one: Che card order, charge ardNo):	reprints of the and Local Tax {Ta Handling RDER** <i>be paid in U.S. curren</i> eck enclosed to: American E	above article at x Exempt No ncy and drawn on a U. xpress Signature	S. bank Bill me Visa Ship To:	\$ \$ \$ Credit Car MasterCar Exp.E	rd rd d Discover Date
Please ac lease ac OTAI **Inter lease c credit reditCa ill To ame_	e send me dd appropriate State .dd 5% Postage and L AMOUNT OF O <i>rnational orders must</i> check one: Che card order, charge ardNo):	reprints of the and Local Tax {Ta Handling RDER** <i>be paid in U.S. curren</i> eck enclosed to: American E	above article at x Exempt No acy and drawn on a U. Express Signature	S. bank Bill me Visa Ship To: Name	\$ \$ \$ Credit Car MasterCar Exp.E	rd rd Discover Date
Please lease ac lease ac 'OTAL **Inter lease c 'credit 'reditCa ill To 'ame_ .ddres	e send me dd appropriate State dd 5% Postage and L AMOUNT OF O <i>rnational orders must</i> check one: Che card order, charge ardNo): s/Institution	reprints of the and Local Tax {Ta Handling RDER** <i>be paid in U.S. curren</i> eck enclosed to: American E	above article at x Exempt No ncy and drawn on a U. xpress Signature	S. bank Bill me Visa Ship To: Name Address/Instit	\$ \$ \$ Credit Car MasterCar Exp.E	rd rd rd Discover Date
Please ease ac OTAL **Inter ease c credit editCa ill To ame_ ddres	e send me dd appropriate State idd 5% Postage and L AMOUNT OF O <i>rnational orders must</i> check one: Ch card order, charge ardNo): ss/Institution	reprints of the and Local Tax { Ta Handling RDER** be paid in U.S. curren eck enclosed to: American E	above article at x Exempt No ncy and drawn on a U. Express Signature	} 	\$ \$ \$ Credit Car MasterCar Exp.D ution	rd rd Discover ate
Please ease ac OTAI **Inter lease c credit reditCa ill To ame_ ddres	e send me dd appropriate State udd 5% Postage and L AMOUNT OF O <i>rnational orders must</i> check one: Ch card order, charge ardNo): ss/Institution use Order No	reprints of the and Local Tax {Ta Handling	above article at x Exempt No ucy and drawn on a U. Express Signature	} S. bank Bill me Visa Ship To: Address/Instit Phone	\$ \$ \$ Credit Car MasterCar Exp.D ution	





Page:

Influence of the germline sequence on the thermodynamic stability and fibrillogenicity of human lambda 6 light chains

Luis del Pozo Yauner,¹ Ernesto Ortiz,¹ Rosalba Sánchez,¹ Rosana Sánchez-López,¹ Leopoldo Güereca,¹ Charles L. Murphy,² Amy Allen,² Jonathan S. Wall,² D. Alejandro Fernández-Velasco,³ Alan Solomon,² and Baltazar Becerril^{1*}

¹ Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca 62210, Morelos, México

² Human Immunology and Cancer Program, University of Tennessee Graduate School of Medicine, Knoxville, Tennessee

³ Laboratorio de Fisicoquímica de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca 62210, Morelos, México

ABSTRACT

Light chain-associated amyloidosis is a fatal disease characterized by the aggregation and pathologic deposition of monoclonal light chain-related fragments as amyloid fibrils in organs or tissues throughout the body. Notably, it has been observed that proteins encoded by the λ variable light chain (V_L) gene segment 6a are invariably associated with amyloid deposition; however, the contribution of the gene to this phenomenon has not been established. In this regard, we have determined the thermodynamic stability and kinetics of in vitro fibrillogenesis of a recombinant (r) V_L protein, designated 6aJL2, which contains the predicted sequences encoded by the 6a and JL2 germline genes. Additionally, we studied a 6a mutant (6aJL2-Arg25Gly), that is present in $\sim 25\%$ of all amyloid-associated $\lambda 6$ light chains. Remarkably, the wild-type 6aJL2 protein was more stable than were all known amyloidogenic κ and λ light chains for which stability parameters are available; more importantly, it was even more so (and less fibrillogenic) than the only clinically proven nonamyloidogenic $\lambda 6$ protein, Jto. Conversely, the mutated 6aJL2-R25G molecule was considerably less stable and more fibrillogenic than was the native 6aJL2. Our data indicate that the propensity of $\lambda 6$ light chains to form amyloid can not be attributed to thermodynamic instability of the germline-encoded V λ 6 domain, but rather, is dependent on sequence alterations that render such proteins amyloidogenic.

Proteins 2007; 00:000–000. © 2007 Wiley-Liss, Inc.

Key words: amyloid; fibrillogenesis; light chain; cation-π.

INTRODUCTION

Light chain (AL) amyloidosis is a monoclonal plasma cell disorder characterized by the extracellular deposition of light chainrelated components as insoluble amyloid fibrils, leading to progressive organ failure and eventually death.^{1,2} Notably, proteins that are the products of certain light chain variable region (V_L) gene segments are preferentially associated with AL,^{3–7} in particular, V λ *6a*, the single gene that encodes λ 6 proteins.⁸ This gene segment is located in cluster C of the λ locus⁹ and is expressed by only ~2% of the peripheral blood and bone marrow B-cells of healthy individuals.^{6,10} In contrast, ~38%^{4–7} of patients with AL λ amyloidosis have serum or urinary monoclonal λ 6 light chains. In such cases, the kidneys are the predominant site of deposition, as opposed to the multiorgan involvement associated with light chains encoded by other V_L genes.^{5–7}

The crystallographic structures of two $\lambda 6$ recombinant (r) V_Ls, termed Wil and Jto, as well as their thermodynamic stabilities and *in vitro* fibrillogenicities, have been reported (notably, patient Wil had AL amyloidosis, whereas Jto had multiple myeloma with cast nephropathy and no evidence of amyloid deposition).^{11,12} Although these studies have led to an understanding of the molecular basis of light chain amyloid aggregation, it is still unknown which particular structural features render $\lambda 6$ light chains amyloidogenic or whether this abnormal propensity is inherent to the sequence encoded by the germline *6a* gene segment.^{5,6,11} On the

Abbreviations C_L, light chain constant domain; ESI-IT, electro-spray ionization ion trap; CDR, complementarity determining region; Ig, immunoglobulin; mAb, monoclonal antibody; VK4, kappa 4 variable domain; V λ 6, lambda 6 variable domain; V_L, light chain variable domain; λ_{maxo} wavelength of maximal fluorescence intensity.

The Supplementary Material referred to in this article can be found online at http://www.interscience.wiley.com/jpages/0887-3585/suppmat/.

*Correspondence to: Baltazar Becerril, Avenida Universidad No. 2001, Colonia Chamilpa, Cuernavaca 62210, Morelos, México. E-mail: baltazar@ibt.unam.mx.

Received 7 June 2007; Revised 19 October 2007; Accepted 26 November 2007 Published online 00 Month 2007 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/prot.21934

© 2007 WILEY-LISS, INC.

PROTEINS 1

basis of the well-documented inverse correlation between thermodynamic stability and the predilection of light chains to form amyloid,¹²⁻¹⁷ it would be expected that germline-encoded V_{λ6} proteins would be thermodynamically unstable and thus would form fibrils in vitro to a degree comparable to that of other amyloidogenic light chains. To test this hypothesis, we have determined the thermodynamic stability and kinetics of in vitro fibrillogenesis of a rV λ 6 protein (6aJL2) which contains the predicted sequence encoded by the 6a and JL2 germline gene segments.^{8,9} The data were compared to those derived from rV\lambda6 proteins Wil and Jto, as well as amyloidogenic κ light chains.^{12–15} Additionally, a mutant of 6aJL2, in which the Arg at position 25 was substituted by Gly (6aJL2-R25G), was studied. This alteration is present in \sim 25% of amyloid-associated λ 6 proteins and presumably represents an allotypic variant.^{8,18}

Our data indicate that the thermodynamic stability of the germline encoded V λ 6 protein cannot, by itself, account for the inherent propensity of λ 6 light chains to form amyloid.

MATERIALS AND METHODS

Materials

AO1

F1

Ultra pure guanidine hydrochloride (GdnHCl), Thioflavine T (ThT), and peptone and yeast extracts used in the media were obtained from Research Organics (Research Organics, Cleveland, OH) and DifcoTM (Becton Dickinson & Co, Spark, MD).

Design of the recombinant λ 6 genes

The 6aJL2 gene contained sequences of the human germline $V\lambda$ and $J\lambda$ gene segments 6a joined to JL2, respectively (Ig variable region gene database, VBASE http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk). The JL2 gene segment was selected, since it has been reported to be the most frequently used joining segment by AL λ clonal plasma cells, including those secreting $\lambda 6$ light chains.⁶ The 6aJL2-R25G gene was a variant of 6aJL2 having Gly substituted for Arg at position 25. Details regarding V $\lambda 6$ Wil and Jto have been previously reported.¹²

Cloning of the 6aJL2 gene

The DNA fragment encoding the sequence of *6aJL2*, flanked by suitable *Sfi*I and *Not*I restriction sites, was synthesized by recursive PCR¹⁹ using a set of 10 overlapping, synthetic 48–61 base-long oligonucleotides (all oligonucleotides used in this work were synthesized at our Institute's facilities and their sequences are available as Fig. 1 Supplementary material). PCR was performed in a GeneAmp PCR System 2400 thermocycler (Perkin-Elmer, Norwalk, CT) using Vent DNA polymerase with reagents and buffer provided by the enzyme's supplier (New Eng-

2 PROTEINS



2

Figure 1

Comparison of the deduced amino acid sequence of V λ 6 6aJL2 with those of Jto, Wil, and 6aJL2-R25G. The residues that differ from those encoded by the 6aJL2 germline gene segments are indicated. The numbering system, as well as the frameworks (FR) and complementarity determining regions (CDR) are according to Kabat et al.³⁰ The 2-residue insertion in FR3 characteristic of human 6 light chains is underlined. The regionsencoded by 6a (1–95) and jl2 (96–111) gene segments are indicated, respectively, by arrows. In 6aJL2 protein, the inserted residue His95a resulted from the junctional recombination of both genes.

land Biolabs, Beverly, MA). The PCR product was purified, digested with the *Sfi*I and *Not*I restriction enzymes (New England Biolabs, Beverly, MA), and ligated into the *Sfi*I/*Not*I-digested pSyn1 expression vector.²⁰ The product was electroporated into *E. coli* W3110 electrocompetent cells, independent clones selected, and the constructs verified by DNA sequencing.²¹ The final plasmid containing the correct sequence of *6aJL2* was designated *pSyn1-6aJL2*. Expression vectors containing V λ 6 Wil and Jto genes were constructed as described previously.¹²

Site directed mutagenesis

To generate the *6aJL2-R25G* gene from *6aJL2*, a mutagenic mega-primer was synthesized, using primers 6a-R25G and 6a-*Sfi*I (Fig. 1 Supplementary material), by standard PCR. The resultant product was used in conjunction with the 6a-*Not*I primer to assemble the entire gene by PCR. The template used in both PCR reactions was the plasmid *pSyn1-6aJL2*. The cloning of the *6aJL2*-*R25G* gene in the pSyn1 expression vector was performed as described for *6aJL2* and the final plasmid containing the correct sequence of the mutant gene was designated *pSyn1-6aJL2R25G*.

Protein expression and purification

W3110 cells transformed with plasmid pSyn1-6aJL2 or pSyn1-6aJL2R25G were grown at 37°C in 2× YT medium containing 200 µg/mL of ampicillin. When the culture reached an A_{600} of 1.2–1.4, expression was induced by the addition of IPTG (Promega, Madison, WI) to a final concentration of 1 mM. Cell growth was continued overnight at 20°C with an agitation rate of 100 rpm.

Wil and Jto proteins were expressed under the control of the T7 promoter in BL21(DE3) cells transformed with plasmids *pET-SW* and *pET-JTO*, respectively.¹² The same

Cells pelleted from 0.5 L culture volumes were resuspended in 50 mL of ice-cold 20% (w/v) sucrose, 1 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, and incubated on ice for 20-30 min with occasional shaking. The cells were centrifuged at 5000 rpm for 15 min at 4°C, resuspended in 50 mL of ice-cold bidistilled water, incubated as described above, and centrifuged at 7000 rpm for 20 min at 4°C. The supernatant, which constituted the periplasmic fraction, was saturated with 75% ammonium sulphate, stored overnight at 4°C, and centrifuged at 8000 rpm for 20 min at 4°C. The precipitated protein fraction was resuspended and extensively dialyzed against a 25 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4, plus 150 mM NaCl, and purified using a HiPrep 26/60 Sephacryl S-100 HR gel filtration column (Amersham-Biosciences AB, Uppsala, Sweden). Fractions containing VA6 proteins were identified by Western blotting using the anti- $\lambda 6$ specific mAb 55-5F5²² and the molecular masses determined by ESI-IT mass-spectrometry in a LCQ mass spectrometer equipped with a nanospray source (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). The concentration of the purified proteins was determined spectrophotometrically at 280 nm in 6.5M GdnHCl, 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5, using molar extinction coefficients of 13494 (6aJL2), 13489 (6aJL2-R25G), 12265 (Wil), and 13487 (Jto), as calculated from the amino acid sequence using the software ProtParam available at the ExPasy Web site (http://ca.expasy.org).

AQ1

GdnHCI and thermal-induced equilibrium unfolding

For chemical unfolding studies, 50 µg/mL (4.1 µM) protein samples were incubated at 25°C overnight at increasing concentrations (0–3M) of GdnHCl, buffered with 20 mM sodium phosphate, pH 7.5. Fluorescence emission spectra then were determined at 25°C from 310 nm to 410 nm with an excitation wavelength of 290 nm (excitation and emission slit widths were 2.5 nm and 5.0 nm, respectively). Fluorescence spectra were recorded on a LS50B spectrofluorimeter (Perkin Elmer, Norwalk, CT) equipped with a thermostated cell compartment. Thermal unfolding experiments were performed as described,¹² with samples containing 50 µg protein/mL in PBS.

GdnHCl and temperature-induced unfolding data were analyzed according to a two-state model. The equilibrium constant was obtained from $K = (y_n - y)/(y - y_d)$, where y is the measured fluorescence intensity, y_n is the fluorescence intensity of the native protein in the pretransition range, and y_d is fluorescence intensity of the protein unfolded at high concentrations of GdnHCl or

DOI 10.1002/prot

high temperature (in the latter case, a linear trend was used to fit the change in intensity of the unfolded protein). The conformational alterations induced by both perturbants were reversible, as inferred from the complete recovery of the fluorescence intensity after dilution of denaturant or return to ambient temperature.

The free energy change for unfolding (ΔG) was calculated from equation [Eq. (1)].

$$\Delta G = -RT \ln K \tag{1}$$

GdnHCl-induced unfolding was analyzed with the linear extrapolation method,²³ that is,

$$\Delta G = \Delta G_{\rm H_2O} + m[\rm{GdnHCl}], \qquad (2)$$

where $\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}$ is ΔG in the absence of denaturant and m is $\delta \Delta G / \delta [\text{GdnHCl}]$, the free energy change per mole of denaturant. C_m , the denaturant concentration where $\Delta G = 0$, was calculated from $C_m = -\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}/m$.

From temperature-induced unfolding experiments, the midpoint temperature (T_m) , as well as the enthalpy (ΔH_m) and entropy (ΔS_m) changes at the T_m , were determined from a plot of ΔG versus T, since at T_m , $\Delta G = 0$ and $\Delta H_m = (T_m)(\Delta S_m)$. The value of ΔG at room temperature (25°C) was calculated according to Pace *et al.*,²⁴

$$\Delta G(T) = \Delta H_m (1 - T/T_m) - \Delta C_p [(T_m - T) + T \ln(T/T_m)]$$
(3)

where *T* is 298 K and $\Delta C_{\rm p}$ is the change in heat capacity associated with unfolding, calculated theoretically according to the method of Milardi.²⁵

In vitro fibril formation

An appropriate volume of a 200 µg/mL (16.6 µM) protein solution in PBS, pH 7.4, containing 0.05% sodium azide was added to a 4.5 mL polystyrene cell and incubated at 37°C. A teflon-coated micro-stir bar (2 mm \times 7 mm) was set at 250 rpm to agitate the solution. Samples were analyzed at designated time points for detection of fibrils, using a ThT assay.²⁶ 100 µL of each sample were withdrawn and added to 2.6 mL of a 10 µM solution of ThT prepared in filtered PBS buffer. Fluorescence emission spectra were determined at 25°C from 460 nm to 510 nm with an excitation wavelength of 450 nm (excitation and emission slit widths were 2.5 and 5.0 nm, respectively). Fibril formation kinetics were analyzed by fitting time-dependent change in ThT fluorescence intensity of incubated samples to the following equation:

$$F_{\rm ThT} = A/(1 + \exp[-B(t - t_i)])$$
 (4)

where F_{ThT} is the ThT fluorescence intensity, *A* is the ThT fluorescence intensity in the posttransition plateau, $t_i(h)$ is the midpoint of the transition region, $B(h^{-1})$ is the

fibril growth rate constant, and t(h) is the time. An absolute value of the lag time for nucleation, t_{lag} , was calculated by extrapolating the linear region of the hyperbolic phase back to the abscissa.²⁷ End-point solutions were examined by Congo red and circular dichroism spectroscopy, as well as electron microscopy. Prior to *in vitro* fibrillogenesis experiments, the stock protein solutions were passed through a 0.22 µm pore-sized Millex GV membrane filter (Millipore Corporation, Bedford, MA) and quantified spectrophotometrically, as described above.

Congo red spectroscopy

Fifty-microliter aliquots of each fibril preparation were mixed with 900 μ L of a fresh 10 μ M solution of Congo red (CR) in PBS, pH 7.4 (protein concentration, 0.87 μ M [10.5 μ g/mL]). After 20 min of incubation at room temperature, visible absorption spectra were registered from 300 nm to 700 nm using a BioMate 5 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) and a 1-cm light path quartz cell. The molar concentration of CR bound to fibrils [CR-AL] was calculated using Eq. (5)²⁸:

$$[CR - AL] = {\binom{541}{A_t}} {47,800} - {\binom{403}{A_t}} {68,300} - {\binom{403}{A_{CR}}} {86,200}$$
(5)

where ${}^{541}A_{\rm t}$ means the absorbance of the CR plus the test sample at 541 nm, ${}^{403}A_{\rm t}$ means the absorbance of the CR plus the test sample at 403 nm, and ${}^{403}A_{\rm CR}$ is the absorbance of the CR-only sample at 403 nm.

Circular dichroism spectroscopy

Circular dichroism (CD) spectroscopy was performed in PBS (pH 7.4) at room temperature on a Jasco 710 Spectropolarimeter (Jasco Easton, MD) using a quartz cell with a light path of 1 mm. Far-UV spectra were registered from 16.6 μ M (200 μ g/mL) protein samples in the range of 200–260 nm with 0.1 nm intervals, at a scan rate of 50 nm/min, an integration time of 1 s and a band width of 1 nm. For each protein preparation, three consecutive spectra were obtained, averaged, and baseline-subtracted. Molar residue ellipticity values [Θ] were calculated using²⁹:

$$[\Theta](\deg \text{ cm}^2/\text{dmol}^1) = [\Theta(\text{MRW})/(101 \text{ c})], \quad (6)$$

where Θ is the measured ellipticity (millidegrees), MRW is the mean residue weight of the protein amino acids (g/mol), l is the path-length (cm) and *c* is the protein concentration (mg/mL).

Electron microscopy

After completion of the fibrillogenesis assays, $10 \ \mu L$ from each sample were applied to a piece of parafilm. A formvar coated copper grid (200 mesh), stabilized with evaporated carbon film (Electron Microscopy Sciences,

4 PROTEINS

Fort Washington, PA), was floated onto the sample drop for 1–3 min. The excess liquid was removed with a small filter paper strip and the grids negatively stained by floating them onto a drop of freshly prepared 4% uranyl acetate for 1–2 min. Electron microscopy was performed at 80 kV on a Zeiss EM900 Transmission Electron Microscope. Images were recorded by means of a CCD DualVision 300W camera at a resolution of 1030 \times 1300 pixels (Gatan, Pleasanton, CA).

RESULTS

Sequence comparison of V λ 6 products

6aJL2 consists of 111 residues and differs from the two Vλ6 proteins Wil and Jto at 11 and 10 positions, respectively (Fig. 1). Additionally, there is a His residue interposed at position 95a in 6aJL2 that results from the junctional recombination of the *6a* and *JL2* gene segments.⁹ Among 120 λ6 light chains that have been compiled by our group to date, 65 were found to have an insertion at this location which consisted of His in 23 cases, although Gln, Pro, Leu, and Tyr also were frequently found (Fig. 2 Supplementary material). Furthermore, Vλ6 Wil and Jto contain an additional Gly residue at position 108; however, it is not a product of the *JL2* gene segment and, consequently, was not incorporated into the sequence of 6aJL2.

Expression and purification of Vλ6 proteins

Bacterial expression of the $\lambda 6$ molecules yielded ~15– 20 mg of protein per liter of culture medium. After the purification process, the recombinant proteins were found to be >95% pure, as determined by SDS-PAGE and reverse phase-HPLC. The V $\lambda 6$ proteins were immunoblotted using the anti- $\lambda 6$ specific mAb 55-5F5 (Fig. 3 Supplementary material)²² and the chemical composition of the proteins was confirmed by mass spectrometric analysis (Fig. 4 Supplementary material).

Thermodynamic stability of λ 6 molecules

As shown in Figure 2, the denaturation curves obtained by GdnHCl and heat-induced equilibrium unfolding for 6aJL2 and 6aJL2-R25G manifested as a single cooperative transition and were adequately fitted to a two-state model. Both C_m and ΔG_{H_2O} were higher for 6aJL2 than for 6aJL2-R25G. The latter also had a 6°C lower T_m than 6aJL2 (Table I). The energetic cost of the substitution Arg25Gly in the molecular context of 6aJL2 was ~1.7 kcal/mol, as determined by GdnHCl equilibrium unfolding (Table I). For both proteins, there was a good correlation between the $\Delta G_{25^\circ C}$ and ΔG_{H_2O} values, suggesting that the ΔC_p of 1.4 kcal/mol/K, estimated by the theoretical method of Milardi *et al.*²⁵ for the thermal unfolding of both domains, was sufficiently precise.

DOI 10.1002/prot

F2

F3

F4

ID: srinivasanv Date: 19/12/07 Time: 21:02 Path: J:/Production/PROT/Vol00000/070651/3B2/C2PROT070651

 $\lambda 6$ Light Chain Stability and Fibrillogenicity



Figure 2

Chaotropic (A) and thermal (B) unfolding profiles of V λ 6 proteins. (A) 6aJL2 (\blacksquare) and 6aJL2-R25G (\square) were suspended in 20 mM sodium phosphate, pH 7.5, at 50 g/mL and equilibrated overnight in the presence of increasing concentrations of GdnHCl and the fluorescence intensity measured. The solid lines represent the nonlinear fits of the data, using the Eqs. (1) and (2) (see Materials and Methods). (B) The proteins were suspended in PBS, pH 7.5, at 50 µg/mL. Unfolding was induced by increasing the temperature at 2.4°C min⁻¹. The calculated thermodynamic parameters are given in Table I.

In vitro fibrillogenesis

All the $\lambda 6$ proteins aggregated as fibrils with a nucleation-dependent polymerization pattern (Fig. 3). The profiles of aggregation were characterized by a lag phase



Figure 3

In vitro fibrillogenesis of V λ 6 proteins. 6aJL2 (black squares), 6aJL2-R25G (open circles), Wil (open upward triangles), and Jto (black downward triangles) were incubated at a concentration of 200 µg/mL in PBS, pH 7.5, at 37°C with constant agitation, and fibril formation measured by ThT fluorescence. Data points are the normalized ThT fluorescence values (means \pm S.D.) of triplicate samples. Solid lines represent nonlinear, least-squares fits of the data using Eq. (4) (see Materials and Methods). Values of t_{lag} and fibril growth rate constant [B in Eq. (4)] are given in Table I.

 (t_{lag}) , followed by a rapid increase in ThT fluorescence (indicative of amyloid fibril formation) which ultimately reached a plateau.²⁶ As compared to Wil and Jto, the kinetics of in vitro fibrillogenesis were clearly different for 6aJL2 which showed a tlag of 14.2 h, a time period 3–4 times longer than that of the other two $\lambda 6$ molecules (Fig. 3 and Table I). 6aJL2 also had a fibril growth rate constant (B) of 0.53 h⁻¹, which was two and three times slower than those of Jto and Wil, respectively (Table I). In contrast, the kinetics of fibril formation of the 6aJL2-R25G mutant was similar to that observed for Wil. The former had a tlag that was one-seventh the wild-type molecule's (6aJL2), with a threefold faster growing rate (Fig. 3 and Table I). Interestingly, 6aJL2-R25G showed high values of ThT fluorescence in the posttransition plateau, which was more than 10-fold higher than seen with the other $\lambda 6$ proteins. Comparable differences in ThT fluorescence were observed for equally concentrated solutions of washed fibrils prepared from end-point solutions. This observation suggests that the fluorescence quantum yield of ThT upon binding to fibrillar aggregates formed by 6aJL2-R25G was higher than for the other proteins. Characteristically, the λ_{max} of ThT fluorescence emission of 6aJL2-R25G fibrils was shifted to 475 nm, in contrast to the λ_{max} (480 nm) displayed by the other samples (Fig. 5 Supplementary material).

Congo red spectroscopy

The Congo red spectra obtained after 48 h of incubation was characterized by an increase of absorbance at \sim 541 nm, an event which differed from the absorbance F5

L. del Pozo Yauner et al.



Figure 4

Ultrastructural analysis of fibrils formed by V λ 6 proteins. (**A**) 6aJL2, (**B**) Jto, (**C**) 6aJL2-R25G, and (**D**) Wil. After 48 h of incubation, the samples were dried on formvarcoated copper grids and negatively stained with 4% uranyl acetate (scale bar, 100 nm).

maximum at 490 nm that was observed in the spectra of the free dye or in the presence of the soluble, native protein (Fig. 6 Supplementary material). This spectral shift is characteristic of the association of Congo red with amyloid aggregates.²⁸ Quantification of Congo red binding was determined after completion of the fibrillogenesis assays and is shown in Table I. Because the binding capacity of the aggregates is assumed to be constant, this value reflects the amount of fibrils produced. Using this criteria, the mutant 6aJL2-R25G formed more Congo red positive aggregates than did the other proteins.

Circular dichroism spectroscopy

The far-UV CD spectra obtained from the native, soluble proteins were characterized by a minimum at 216 nm, which is observed in β -sheet rich proteins, for example, Ig domains.^{29,31–33} After incubation for 48 h,

6 PROTEINS

there was a marked change in the CD spectra, which indicated an increase of negative ellipticity with a minimum near 222 nm (Fig. 6 Supplementary material) A similar phenomenon has been documented for amyloidlike fibrils formed from Ig proteins and has been assumed to be related to β -structure enrichment.^{31–33} In contrast to the other proteins, the CD spectrum of Wil fibrils showed a minimum at 220 nm and an increase in negative ellipticity at wavelengths below 210 nm, presumably reflecting a larger contribution of random coiled regions to the CD spectra.³²

Morphological characteristics of $\lambda 6$ fibrils

As illustrated in Figure 4, all samples contained abundant fibrillar aggregates that displayed the characteristic features of amyloid fibrils, as evidenced by the presence of thin unbranching ultrastructure. However, there were distinct morphologic differences: 6aJL2 fibrils were mainly long and slender and formed by the lateral association of two or more rarely twisted protofibrils that joined to form bundles. In contrast, 6aJL2-R25G was composed of short and highly twisted fibrils. As described previously, Wil fibrils tended to be more twisted and shorter than were Jto's.¹²

DISCUSSION

6aJL2 thermodynamic stability and *in vitro* fibrillogenesis

The amyloidogenic potential of proteins encoded by the 6a gene segment is exhibited by their preferential association with AL amyloidosis.^{3–7} Notably, with the exception of Jto, all monoclonal $\lambda 6$ light chains obtained from patients with plasma cell dyscrasias have been implicated in amyloid deposition.^{11,12} We hypothesized that such pathological behavior would be related to the thermodynamic stability of the germline-encoded V λ 6 protein, that is, given the well-documented inverse correlation between light chain stability and amyloidogenic potential,^{12–17} we expected the germline-encoded 6aJL2 protein to be thermodynamically unstable to a degree comparable to that of AL-associated light chains. Surprisingly, thermal and GdnHCl unfolding experiments revealed that 6aJL2 was substantially more stable than were $\lambda 6$ Wil and even the nonamyloidogenic $\lambda 6$ Jto protein. Although 6aJL2 did form amyloid-like fibrils under physiological conditions of pH and ionic strength (as shown by the spectroscopic and ultrastructural analyses), its kinetics of in vitro fibrillogenesis were significantly slower than $\lambda 6$ proteins Wil and Jto. Moreover, 6aJL2 was more stable than virtually all the amyloidogenic light chains for which thermodynamic parameters are available (Fig. 5). Thus, we posit that mutations in the 6a germline gene result in products that are substantially destabilized and amyloidogenic. Further,

DOI 10.1002/prot

λ6 Light Chain Stability and Fibrillogenicity

Table I Properties of V\.6 Proteins				
Parameter	6aJL2	6aJL2-R25G	Wil ^a	Jto ^a
T ^b _m (°C)	49.9	44.2	38.3	45.2
ΔH_m^{b} (kcal/mol)	86.2	77.2	80.0	87.0
ΔC_p^c (kcal/mol)	1.4	1.4	1.4	1.5
$\Delta G_{25^{\circ}C}^{d}$ (kcal/mol)	5.2	3.8	3.0	4.3
C _m (M)	1.43	0.95	0.83	1.22
- <i>m</i> (kcal/mol)	3.6	3.8	2.3	3.5
$\Delta G_{H_{2}0}$ (kcal/mol)	5.2 ± 0.2	3.7 ± 0.1	2.2 ± 0.9	4.3 ± 1.0
$\Delta \Delta \tilde{G}_{unf}^{e}$ (kcal/mol)	_	1.7	2.1	0.7
t _{lag} ^f (h)	14.2 \pm 0.5	2.0 ± 0.3	3.4 ± 1.0	5.5 ± 0.3
Growth rate ^g (h^{-1})	0.53 ± 0.03	1.82 ± 0.17	1.67 ± 0.18	0.96 ± 0.12
Congo red ^h	2.7	3.9	2.9	2.5

^aThe thermodynamic parameters of Wil and Jto were taken from Ref. 12.

^bCalculated from the plot of ΔG versus T.

^cCalculated according to the method of Milardi *et al.*²⁵ ^dCalculated according to Pace *et al.*²⁴ and using Eq. (3) (see Materials and Methods).

^eCumulative free energy change relative to 6aJL2:

 $\Delta\Delta G_{unf} = (m^{6aJL2} \times C_m^{mut}) - (m^{6aJL2} \times C_{\omega}^{6aJL2}).$

^fCalculated by extrapolating the linear region of the hyperbolic phase back to the abscissa.

^gCalculated from non-linear, least-squares fits of the data using Eq. (4) (see Material and Methods).

^hCalculated by the methods of Klunk *et al.*²⁸ Data are expressed as mol of Congo red bound per mol of total monomer.

a bias in the pattern of somatic mutations in AL proteins has been documented.¹³

In addition to the importance of germline sequence in dictating a fold with a particular stability, it also could be directly involved in events relevant to the aggregation mechanism. Undoubtedly, discrete regions of $\lambda 6$ proteins must interact with each other to generate fibrils. Germline-encoded sequences of these regions, as compared to equivalent regions encoded by other V_L gene segments, could lead to promotion of these interactions. Moreover, data obtained from in vitro experiments suggest that the binding of light chains to a particular tissue component might result in fibril formation,³⁴ for example, cultured renal mesangial cells have been shown to promote amyloid formation of $\lambda 6$ light chains through a receptor-mediated mechanism.^{35,36} It is possible, therefore, that the 6a sequence may be unique among light chains for its propensity to bind components of caveoli in the mesangial cell surface.

Effect of the Arg25Gly substitution

The 6a germline gene encodes an Arg at position 25.8,9 However, in $\sim 25\%$ of $\lambda 6$ light chains, this residue is substituted by Gly,18 which likely represents an allotypic variant.⁸ We thus analyzed the effect of the Arg25Gly substitution on V\lambda 6 stability and found decreased stability (by \sim 1.7 kcal/mol) and enhanced capacity for aggregation into amyloid-like fibrils. Remarkably, the stability parameters of 6aJL2-Arg25Gly are comparable to those previously reported for the amyloid-associated $\lambda 6$ protein Wil,¹² as well as amyloidogenic κ proteins (Fig. 5).^{13–15} We postulate that the decreased thermodynamic stability of

DOI 10.1002/prot

the mutant 6aJL2-Arg25Gly is determined, at least in part, by the elimination of the previously described planar stacking interaction between the guanidinium group of Arg25 and the phenyl ring of Phe2, which are in close proximity in the structures of native V λ 6 Wil and Jto.¹¹



Figure 5

Comparison of protein stability parameters, ΔG_{unf} and C_{m} , reported for λ and κ proteins. The values of 6aJL2 (open star) and 6aJL2-R25G (black star) were proteins. The values of 0.0122 (open sint) and 0.0122 (black sub-were taken from Table I. The data of amyloid-associated light chains [V 6 Wil12 (black upward triangle), Vk1 Bif¹⁵ (black downward triangle), Vk4 Rec¹⁴ (black diamond), Vk4 Sma¹⁴ (black hexagon)], and non-amyloidogenic light chains [k1 Gal¹⁵ (open square), Vk6 Jto¹² (open downward triangle), k2 Rei¹³ (open upward triangle), k4 Len¹⁴ (open diamond), MM-k144 (open circle)] have been previously reported.

L. del Pozo Yauner et al.

This cation- π interaction is a relatively common feature in proteins and has been postulated to contribute to stability;^{37–39} however, among light chain germline sequences, it is unique to $\lambda 6$ proteins.^{8,10,11} Interestingly, this interaction, that involves residues 2 and 25, is present in V $\lambda 6$ homologues from Mexican axolotl (Ambystoma mexicanum)⁴⁰ and wild mice (Mus spretus).⁴¹ This suggests that it has been evolutionarily conserved and is structurally and/or functionally relevant. Furthermore, Arg25 plays a key role in the network stabilizing the folding of complementarity determining region (CDR) 1.11,18 In accordance with the canonical structure model for antibody CDRs, we have postulated that the presence of Gly25 in $\lambda 6$ proteins must result in a helicoidal fold for the L1.¹⁸ This change might prevent the formation of the polar cavity that is occupied by the Phe2 side chain, as predicted from the crystallographic structure of Jto, thus allowing increased flexibility in the N-terminal region and, presumably, alteration of its conformation (Fig. 7 Supplementary material).

The significant influence of the substitution Arg25Gly on the fibrillogenic capability of 6aJL2 suggests that a weakening in the interactions stabilizing the N-terminal region has a remarkably negative effect on the stability of the whole domain⁴² and, as a consequence, promotes conformational adjustments that lead to fibril formation. Of note is that this portion of light chains adopts a different structure in native versus fibrillar states.⁴³ Experimental data obtained from the study of 6aJL2 mutants at positions 2 and 7 support this hypothesis (del Pozo Yauner, manuscript in preparation).

Notably, 6aJL2-R25G formed more Congo red-binding aggregates than did the other proteins, as calculated from Congo red spectroscopy. However, in general, there was no correlation between the degree of aggregate formed and the thermodynamic parameters, including the kinetics of fibrillogenesis for $\lambda 6$ proteins. However, the amount of Congo red-binding to these molecules does not necessarily reflect their individual capacity to elongate the fibrils. A differential contribution of heterogeneous nucleation¹² to the kinetics of fibrillogenesis, as well as the formation of amorphous aggregates that compete for the soluble monomers, could explain the lack of correlation.

CONCLUSION

Our studies have substantiated the relationship between $\lambda 6$ protein folding instability and increased fibrillogenic potential and supports the hypothesis that local destabilization of the N-terminal loop of light chains results in an increased propensity for fibrillogenesis. Furthermore, we have shown that the inherent capacity of $\lambda 6$ light chains to form amyloid fibrils can not be explained exclusively by thermodynamic instability of the germline-encoded V_L $\lambda 6$ domain; rather, other fac-

8 PROTEINS

tors (e.g., somatic mutation) contribute to the predilection of these molecules to be virtually exclusively associated with AL amyloidosis.

REFERENCES

- 1. Solomon A, Weiss DT. Protein and host factors implicated in the pathogenesis of light chain amyloidosis (AL amyloidosis). Amyloid 1995;2:269–279.
- Glenner GG, Harbaugh J, Ohms JI, Harada M, Cuatrecasas P. An amyloid protein: The amino-terminal variable fragment of an immunoglobulin light chain. Biochem Biophys Res Commun 1970;41:1287–1289.
- Solomon A, Frangione B, Franklin EC. Bence Jones proteins and light chains of immunoglobulins. Preferential association of the V lambda VI subgroup of human light chains with amyloidosis AL (lambda). J Clin Invest 1982;70:453–460.
- 4. Ozaki S, Abe M, Wolfenbarger D, Weiss DT, Solomon A. Preferential expression of human-lambda light chain variable-region subgroups in multiple myeloma, AL amyloidosis, and Waldenström's macro-globulinemia. Clin Immunol Immunopathol 1994;71:183–189.
- 5. Comenzo RL, Zhang Y, Martinez C, Osma K, Herrera G. The tropism of organ involvement in primary systemic amyloidosis: contributions of Ig V_L germ line gene use and clonal plasma cell burden. Blood 2001;98:714–720.
- Perfetti V, Casarini S, Palladini G, Vignarelli MC, Klersy C, Diegoli M, Ascari E, Merlini G. Analysis of Vλ-Jλ expression in plasma cells from primary (AL) amyloidosis and normal bone marrow identifies 3r (λIII) as a new amyloid-associated germline gene segment. Blood 2002;100:948–953.
- Abraham RS, Geyer SM, Price-Troska TL, Allmer C, Kyle RA, Gerzt MA, Fonseca R. Immunoglobulin light chain variable (V) region genes influence clinical presentation and outcome in light chainassociated amyloidosis (AL). Blood 2003;101:3801–3808.
- 8. Ch'ang L-Y, Yen C-P, Besl L, Schell M, Solomon A. Identification and characterization of a functional human Ig V λ_{VI} germline gene. Mol Immunol 1994;31:531–536.
- 9. Williams SC, Frippiat J, Ignatovich O, Lefranc M, Winter G. Sequence and evolution of the human germline V_{λ} repertoire. J Mol Biol 1996;264:220–232.
- 10. Ignatovich O, Tomlinson IM, Jones PT, Winter G. The creation of diversity in the human immunoglobulin V_{λ} repertoire. J Mol Biol 1997;268:69–77.
- 11. Pokkuluri PR, Solomon A, Weiss DT, Stevens FJ, Schiffer M. Tertiary structure of human $\lambda 6$ light chains. Amyloid 1999;6:165–171.
- 12. Wall J, Schell M, Murphy C, Hrncic R, Stevens FJ, Solomon A. Thermodynamic instability of human $\lambda 6$ light chain: correlation with fibrillogenicity. Biochemistry 1999;38:14101–14108.
- Hurle MR, Helms LR, Li L, Chan W, Wetzel R. A role for destabilizing amino acid replacements in light chain amyloidosis. Proc Natl Acad Sci USA 1994;91:5446–5450.
- Raffen RM, Dieckman LJ, Szpunar M, Wunschl C, Pokkuluri PR, Daves P, Stevens PW, Cai X, Schiffer M, Stevens FJ. Physicochemical consequences of amino acid variations that contribute to fibril formation by immunoglobulin light chain. Protein Sci 1999;6:509–517.
- Kim Y, Wall JS, Meyer J, Murphy C, Randolph TW, Manning MC, Solomon A, Carpenter JF. Thermodynamic modulation of light chain amyloid fibril formation. J Biol Chem 2000;275:1570–1574.
- Dealwis C, Wall JS. Toward understanding the structure-function relationship of human amyloid disease. Curr Drug Targets 2004;5: 159–171.
- Wall JS, Gupta V, Wilkerson M, Schell M, Loris R, Adams P, Solomon A, Stevens F, Dealwis C. Structural basis of light chain amyloidogenicity: comparison of the thermodynamic properties, fibrillogenic potential and tertiary structural features of four Vλ6 proteins. J Mol Recognit 2004;17:323–331.

DOI 10.1002/prot

$\lambda 6$ Light Chain Stability and Fibrillogenicity

- 18. del Pozo Yauner L, Ortiz E, Becerril B. The CDR1 of the human λ VI light chains adopts a new canonical structure. Proteins 2006; 62:122–129.
- 19. Prodromou C, Pearl LH. Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis. Protein Eng 1992;5:827–829.
- 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.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci USA 1977;74:5463–5467.
- Abe M, Goto T, Kennel SJ, Wolfenbarger D, Macy SD, Weiss DT, Solomon A. Production and immunodiagnostic applications of anti-human light chain monoclonal antibodies. Am J Clin Pathol 1993;100:67–74.
- Santoro MM, Bolen DW. Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. I. Unfolding of phenyl-methanesulfonyl α-chymotrypsin using different denaturants. Biochemistry 1988;27:8063–8074.
- 24. Pace CN, Shirley BA, Thomson JA. Measuring the conformational stability of a protein. In: Creighton TE, editor. Protein structure: a practical approach. Oxford: IRL Press; 1989. pp 311–330.
- Milardi D, la Rosa C, Fasone S, Grasso D. An alternative approach in the structure-based predictions of the thermodynamic of protein unfolding. Biophys Chem 1997;69:43–51.
- Naiki H, Higuchi K, Hosokawa M, Takeda T. Fluorometric determination of amyloid fibrils *in vitro* using the fluorescen dye, thioflavin T1. Anal Biochem 1989;177:244–249.
- 27. Wall J, Murphy CL, Solomon A. *In vitro* immunoglobulin light chain fibrilogenesis. Methods Enzymol 1999;309:204–216.
- Klunk WE, Jacob RF and Mason RP. Quantifying amyloid by Congo red spectral shift assay. Methods Enzymol 1999;309:285–305.
- 29. Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. Biochim Biophys Acta 2005;1751:119–139.
- Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, and Foeller C. Sequences of proteins of immunological interest, Vol. 5. Bethesda, MD: National Institute of Health; 1991.
- 31. McLaughlin RW, De Stigter JK, Sikkink LA, Baden EM, Ramirez-Alvarado M. The effects of sodium sulfate, glycosaminoglycans, and Congo red on the structure, stability, and amyloid formation of an immunoglobulin light-chain protein. Protein Sci 2006;15:1710–1722.

- 32. Souillac PO, Uversky VN, Fink AL. Structural transformations of oligomeric intermediates in the fibrillation of the immunoglobulin light chain LEN. Biochemistry 2003;42:8094–8104.
- 33. Narimoto T, Sakurai K, Okamoto A, Chatani E, Hoshino M, Hasegawa K, Naiki H, Goto Y. Conformational stability of amyloid fibrils of β_2 -microglobulin probed by guanidine-hydrochlorideinduced unfolding. FEBS Lett 2004;576:313–319.
- Harris DL, King E, Ramsland PA, Edmundson AB. Binding of nascent collagen by amyloidogenic light chains and amyloid fibrillogenesis in monolayers of human fibrocytes. J Mol Recognit 2000;13:198–212.
- 35. Issac J, Kerby JD, Russell WJ, Dempsey SC, Sanders PW, Herrera GA. *In vitro* modulation of AL-amyloid formation by human mesangial cells exposed to amyloidogenic light chains. Amyloid 1998;5: 238–246.
- 36. Teng J, Russell WJ, Gu X, Cardelli J, Lamar-Jones M, Herrera G. Different types of glomerulopathic light chains interact with mesangial cells using a common receptor but exhibit different intracellular trafficking patterns. Lab Invest 2004;84:440–451.
- Flocco MM, Mowbray SL. Planar stacking interactions of arginine and aromatic side-chains in proteins. J Mol Biol 1994;235:709–717.
- 38. Gallivan JP, Dougherty DA. Cation- π interaction in structural biology. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96:9459–9464.
- Prajapati RS, Sirajuddin M, Durani V, Sreeramulu S and Varadarajan R. Contribution of cation-π interactions to protein stability. Biochemistry 2006;45:15000–15010.
- André S, Guillet F, Charlemagne J, Fellah JS. Structure and diversity of Mexican axolotl lambda light chain. Immunogenetics 2000;52:137–154.
- 41. Amrani YM, Voegtlé D, Montagutelli X, Cazenave P-A, Six A. The immunoglobulin light chain restricted B6. $\kappa^{-\lambda}_{SEG}$ mouse strain suggests that the *IGL* locus genomic organization is subject to constant evolution. Immunogenetics 2002;54:106–119.
- 42. Król M, Roterman I, Piekarska B, Konieczny L, Rybarska J, Stopa B. Local and long-range structural effects caused by the removal of the N-terminal polypeptide fragment from immunoglobulin L chain λ . Biopolymers 2003;69:189–200.
- 43. O'nuallain B, Allen A, Kennel SJ, Weiss DT, Solomon A, Wall JS. Localization of a conformational epitope common to nonnative and fibrillar immunoglobulin light chains. Biochemistry 2007;46:1240–1247.
- 44. Chung CM, Chiu JD, Connor LH, Gursky O, Lim A, Dykstra AB, Liepnieks J, Benson MD, Costello CE, Skinner M, Walsh MT. Thermodynamic stability of κI immunoglobulin light chain: relevance for multiple myeloma. Biophys J 2004;88:4232–4242.

AQ4

DOI 10.1002/prot

PROTEINS 9

AQ3

AQ1: Please confirm that the URL is current and active.

AQ2: "2xYT" has been changed to " $2 \times$ YT." OK?

AQ3: Kindly note that the references have been renumbered to make their citations sequential.

AQ4: This reference (Ref. 44) was not cited anywhere in the text. Can this be deleted? If it needs to be inserted anywhere in the text, kindly renumber all citations and references accordingly.



ARTICLE

ANEXO 3

¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignment of 6aJL2(R25G), a highly fibrillogenic λ VI light chain variable domain

Luis H. Gutiérrez-González · Lucia Muresanu · Luis del Pozo-Yauner · Rosalba Sánchez · Leopoldo Guereca · Baltazar Becerril · Christian Lücke

Received: 19 June 2007/Accepted: 4 August 2007 © Springer Science+Business Media B.V. 2007

Abstract An allotypic variation at position 25 influences the fibrillogenicity of λ VI light chains, which are related to humoral immune response and have been associated with AL amyloidosis. The full resonance assignment and a preliminary structural characterization of 6aJL2(R25G) are reported.

Keywords Immunoglobulin · AL amyloidosis · Hypervariable loops

Biological context

Light chain-associated (AL) amyloidosis is a fatal disease characterized by the extracellular deposition of light chainrelated components as insoluble amyloid fibrils, leading to progressive organ failure and eventually death (Solomon and Weiss 1995). Although proteins encoded by the single V_{λ} 6*a* gene segment are invariably associated with amyloid

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s12104-007-9045-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

L. H. Gutiérrez-González

Laboratorio de Ingeniería Genética y Metabolitos Secundarios, Departamento de Biotecnología, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Mexico City 09340, Mexico

L. Muresanu · C. Lücke (🖂)

Max Planck Research Unit for Enzymology of Protein Folding, Weinbergweg 22, 06120 Halle (Saale), Germany e-mail: luecke@enzyme-halle.mpg.de

L. del Pozo-Yauner · R. Sánchez · L. Guereca · B. Becerril Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca 62210, Mexico formation (Solomon et al. 1982), the structural basis of λ VI amyloidogenicity remains unknown. The *6a* germline gene codes for Arg at position 25; however, nearly 25% of all λ VI proteins have Gly instead of Arg at this position, presumably representing an allotypic variant (Ch'ang et al. 1994). According to the postulates of the canonical structure model, the L1 loop of λ VI light chains featuring Gly25 must fold helicoidally—instead of the non-helicoidal (curly-type) fold characterizing the L1 loop of R25- λ VI light chains—which potentially influences the recognition properties of Ig λ VI-antibodies (del Pozo-Yauner et al. 2006).

Interestingly, it has been shown that the naturallyoccurring substitution R25G destabilizes the fold of 6aJL2, a recombinant variable domain derived from the sequences of 6a and *jl2* germline gene segments. Concomitant with its decreased thermodynamic stability, the R25G variant of 6aJL2 proved to be highly fibrillogenic, comparable to the amyloid-associated λ VI light chain Wil (del Pozo-Yauner et al., manuscript submitted). To expand our knowledge about the structural basis of both the λ VI light chain amyloidogenesis and the antigen recognition properties of Ig λ VI-antibodies, we performed an NMR study of the recombinant variable domain 6aJL2(R25G).

Methods and results

Protein preparation

A DNA fragment encoding the 111 amino acid residues of 6aJL2(R25G), flanked by suitable *MscI* and *EcoRI* restriction sites, was amplified from the plasmid *pSyn1-6aJL2*, using the mutagenic primer 6a-R25G to introduce the substitution R25G. First, a mutagenic mega-primer was

amplified using the primers 6a-R25G and 6a-MscI. Second, the mega-primer was used in conjunction with the 6a-EcoRI primer to amplify the entire gene. The PCR product was purified, digested with the *MscI* and *EcoRI* restriction enzymes, ligated into the *MscI/EcoRI*-digested pET27b expression vector, and cloned into *E. coli* BL21(DE3). The final plasmid containing the correct sequence of 6aJL2(R25G) was designated pET27b-6aJL2(R25G). Uniformly ¹⁵N- and ¹³C/¹⁵N-labeled 6aJL2(R25G) samples were produced by a modified method established in our lab (manuscript in preparation), based on a previously reported expression protocol (Cai et al. 1998).

NMR spectroscopy

The NMR samples with protein concentrations of 1.2-1.3 mM were prepared in 25 mM phosphate buffer (pH 5.2. 0.05% NaN₃. H₂O:D₂O = 95:5. v/v). All NMR experiments were recorded at 300 K with a Bruker DRX500 spectrometer operating at a ¹H resonance frequency of 500.13 MHz. All heteronuclear experiments made use of pulsed field gradients for coherence selection and artifact suppression, and utilized gradient sensitivity enhancement schemes wherever appropriate (Muhandiram and Kay 1994). Quadrature detection in the indirectlydetected dimensions was obtained by either the States-TPPI or the echo/antiecho method. Chemical shifts were referenced to external DSS (Wishart et al. 1995) to ensure consistency among all spectra. The spectral data were processed using the Bruker XWIN-NMR 3.5 software package; peak-picking and data analysis of the transformed spectra were performed using AURELIA 3.1.6 (Bruker, Rheinstetten, Germany) and FELIX 2000 (Accelrys Inc., San Diego, CA, U.S.A.).

In addition to homonuclear (TOCSY and NOESY) and ¹⁵N-edited (HSQC, HTQC, TOCSY-HSQC and NOESY-HSQC) NMR experiments, triple-resonance experiments were performed on the double-enriched sample using standard Bruker pulse sequences. To obtain the aliphatic ¹H and ¹³C resonances, the following experiments were employed: HNCA, HNCACB, H(CC)(CO)NH and CC(CO)NH (17.5 ms spinlock time each), ¹H- and ¹³C-edited HCCH-TOCSY (15.2 ms spinlock time each). The carbonyl resonances were determined from HNCO and HN(CA)CO spectra. In addition, ¹H/¹³C-HSQC and ¹³C-edited NOESY-HSQC (mixing time 120 ms) spectra were collected.

Assignments and data deposition

The sequence-specific resonance assignment is basically complete and has been deposited in the BioMagResBank

(http://www.bmrb.wisc.edu) database under accession number BMRB-15276. Interestingly, the ${}^{1}\text{H}/{}^{15}\text{N}$ -HSQC spectrum (see Figure S1 in the electronic supplementary material) features several amide resonances that show significant line-broadening (Fig. 1), which will complicate the structure determination based on NOEs. Still, a chemical shift index analysis (Wishart and Sykes 1994), presented in Fig. 2, and a NOE pattern examination both indicate that the R25G variant of human 6aJL2 surprisingly exhibits the same overall fold as the X-ray structure of the human λ VI light chain dimer JTO (PDB ID code 1CD0),



Fig. 1 Section from a ${}^{1}H/{}^{15}N$ -HSQC spectrum of 6aJL2(R25G) collected at 300 K. Certain amide resonances, like for example Cys23, Arg41, Tyr95 and Val101 (labeled in italics), feature significant line broadening due to differences either in exchange behavior or backbone dynamics



Fig. 2 The chemical shift index consensus based on H α , C α , C β and C' resonance values suggests a predominantly β -sheet structure for the 6aJL2(R25G) variant

i.e. with a non-helicoidal L1 loop. Only the triple-glycine sequence Gly104-Gly106 might feature a slightly altered conformational arrangement, as the NOEs from Cys91 HN to Gly104 and Gly106 display intensities that diverge from the expected distances. This structural divergence may eventually help to understand the role of residue 25 on the molecular mechanism of light chain fibrillogenesis, as this C-terminal β -strand is located adjacent to the N-terminal β -strand which in turn influences the fold of the L1 loop (del Pozo-Yauner et al. 2006).

Acknowledgments The authors would like to thank F. Zamudio and T. Olamendi (UNAM) for technical assistance. This work was partially supported by grants from UNAM, IN220602-3, and CONACyT D44122-Q to B.B.

References

Cai M, Huang Y, Sakaguchi K, Clore GM, Gronenborn AM, Craigie R (1998) An efficient and cost-effective isotope labeling protocol for protein expression in *Escherichia coli*. J Biomol NMR 11: 97–102

- 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
- del Pozo Yauner L, Ortiz E, Becerril B (2006) The CDR1 of the human λ VI light chains adopts a new canonical structure. Proteins 62:122–129
- Muhandiram DR, Kay LE (1994) Gradient-enhanced triple-resonance three-dimensional NMR experiments with improved sensitivity. J Magn Reson Ser B 103:203–216
- Solomon A, Weiss DT (1995) Protein and host factors implicated in the pathogenesis of light chain amyloidosis (AL amyloidosis). Amyloid 2:269–279
- Solomon A, Frangione B, Franklin EC (1982) Bence Jones proteins and light chains of immunoglobulins. Preferential association of the $V_{\lambda VI}$ subgroup of human light chains with amyloidosis AL(λ). J Clin Invest 70:453–460
- Wishart DS, Sykes BD (1994) The ¹³C chemical shift index: a simple method for the identification of protein secondary structure using ¹³C chemical shift data. J Biomol NMR 4:171–180
- Wishart DS, Bigam CG, Yao J, Abildgaard F, Dyson HJ, Oldfield E, Markley JL, Sykes BD (1995) ¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shift referencing in biomolecular NMR. J Biomol NMR 6:135–140

ANEXO 4.

Oligonucleótidos sintéticos usados en la síntesis del gen del rVL 26 AR

Sfil-ar 5' \rightarrow GTCCTCGCAACTGCGGCCCAGCCGGCCATGGCCGATTTTATGCTGACTCAGCCC

NotI-AR $5' \rightarrow$ GAGTCATTCTCGACTTGCGGCCGCTTAGCCTAGGACGGTCACCTTGGT

 $\texttt{AR-1} \qquad \textbf{5'} \rightarrow \texttt{GATTTTATGCTGACTCAGCCCCACTCTGTGTCGGAGTCTCCGGGGAAGACGGTAACCTTT}$

- AR-2 **5'** \rightarrow GCACAAAGCTATCGGCAATGCTGCCACCGCTGCCGGTGCAGGAAAAGGTTACCGTCTTCCCC
- $\texttt{AR-3} \qquad \textbf{5'} \rightarrow \texttt{CATTGCCGATAGCTTTGTGCAGTGGTACCAGCAGCGCCCGGGCAGTGCGCCCACCACTGTGA}$
- AR-4 **5**' \rightarrow GAGAACCGATCAGGGACCCCAGAGGGTCTTTGGTTATCATCATAGATCACAGTGGTGGGCGCA

- AR-7 **5'** \rightarrow CTGAGGACGAGGCTGACTACTGTCAGTCTTATAACAGCAACCATCATGTGGTATTC
- $\text{AR-8} \qquad 5' \rightarrow \text{GCCTAGGACGGTCACCTTGGTCCCTCCGCCGAATACCACATGATGGTTGCT}$



Available online at www.sciencedirect.com



Journal of Chromatography B, 803 (2004) 55-66

JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY B

www.elsevier.com/locate/chromb

Proteomics of the venom from the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei* and the role of prolines on mass spectrometry analysis of toxins

Cesar V.F. Batista^a, Luis del Pozo^a, Fernando Z. Zamudio^a, Sandra Contreras^b, Baltazar Becerril^a, Enzo Wanke^{a.c}, Lourival D. Possani^{a.*}

^a Department of Molecular Medicine and Bioprocesses, Institute of Biotechnology, National Autonomous University of Mexico,

Avenida Universidad 2001, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca 62210, Mexico

^b Centro de Investigación Sobre Fijación de Nitrogeno, UNAM, Avenida Universidad s/n, Colonia Chamilpa,

Apartado Postal 565-A, Cuernavaca 62210, Mexico

^e Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Università di Milano-Bicocca. Piazza della Scienza, 2 Milano 20126, Italy

Abstract

Scorpion venom are complex mixtures of peptides, known to cause impairment of ion-channel function in biological membranes. This eport describes the separation of approximately 60 different components by high performance liquid chromatography and the characterization by Edman degradation and mass spectrometry of 26 peptides from the soluble venom of the Amazonian scorpion *Tityus cambridgei*. One of hese peptides, named Tc48a, was fully characterized. It contains 65 amino acid residues, the C-terminal residue is amidated and it affects Na⁺-channels with a K_d of about 82 nM. Furthermore, this report shows the thermo-instability of scorpion toxins subjected to electron spray onization-mass spectrometry (ESI-MS). When a proline residue is located near the N-terminal region of the toxin, not stabilized by disulfide bridges, artificial components are generated by the mass spectrometer conditions, due to the cleavage of the peptide bond at the proline positions. This phenomenon was confirmed by using four model proteins (variable regions of immunoglobulins) studied by ESI-MS and natrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF)/MS.

Keywords: Proteomics; Tityus cambridgei; Toxins; Proline

1. Introduction

The venom of scorpions is a very complex mixture of peptides, most of them known to be toxic to various organisms, but also contain enzymes, nucleotides, lipids, piogenic amines, and other unidentified components. The oxic fractions usually affect ion-channels of excitable and non-excitable cells. They are classified according to strucural and physiological effects into several families and subàmilies of distinct peptides [1,2]. The classical biochemical upproach to study scorpion toxins is based on their purificaion to homogeneity by sequential steps of chromatographic echniques, followed by primary structure determination usng automatic Edman degradation [1]. The expression levels of the complex pool of toxins produced by the venomous glands of scorpion are dependent on many different fac-

ax: +52-777-3172388.

tors such as: genetic variations, geographic areas, elapsing predatory time, gender, and other environmental conditions [3]. Comparison of chromatographic profiles obtained from total venom of the same species of scorpion, sometimes reveals variations on the quality of the chromatogram. Some components might disappear or may be hidden in the complexity of the sample, making difficult to identify them, thus affecting the entire and precise proteomics of the venom.

In the 1980s, the introduction of the techniques of electron spray ionization-mass spectrometry (ESI-MS) and matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF), which made possible to produce ionized derivatives of macromolecules, changed completely the way in which biochemical analysis of toxins can now be conducted. Impure samples from liquid chromatography (on-line or off-line) can be isolated and analyzed using adequate alternate current voltage and radio-frequency in mass spectrometers. A significant number of powerful technologies coupled to mass spectrometry analysis have been developed recently. Multidimensional Protein Identification

^{*} Corresponding author. Tel.: +52-777-3171209;

E-mail address: possani@ibt.unam.mx (L.D. Possani).

Transworld Research Network 37/661 (2), Fort P.O., Trivandrum-695 023, Kerala, India



Advances in Protein Physical Chemistry, 2008: ISBN: 978-81-7895-324-3 Editors: Enrique García-Hernández and D. Alejandro Fernández-Velasco

Diseases related to protein	in
misfolding	

Luis del Pozo-Yauner, Ernesto Ortiz and Baltazar Becerril Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca 62210, México

Abstract

In this chapter, we focus on protein misfolding as an alleged cause of several human diseases. The fundamental concepts about protein folding and misfolding as well as the experimental data that link the misfolding state of some specific peptides or proteins to certain human diseases are reviewed. The pathological mechanisms and the genetic factors that have been proposed to influence the diseases phenotype are summarized. The models that explain the formation of the amyloid, the most common product of the misfolding process, as well as its structural characterization are discussed. An analysis of the similarities and differences of the amyloid folding with respect to the native folding of the precursor proteins is presented. Finally, the present and future strategies devoted to the treatment of an specific set of misfolding diseases are addressed.

Correspondence/Reprint request: Dr. Baltazar Beccriil Luján. Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca 62210, Mexico, E-mail: baltazar@ibt.unam inx