



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA

ASOCIACIÓN DE LA ESTABILIDAD Y PROPENSIÓN A LA AGREGACIÓN DE
DISTINTAS CADENAS LIGERAS RELACIONADAS CON LA AMILOIDOSIS
PRIMARIA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
SERGIO ANTONIO GARAY SÁNCHEZ

DIRECTOR DE TESIS
DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA
FACULTAD DE MEDICINA
COMITÉ TUTOR
DR. DANIEL ALEJANDRO FERNÁNDEZ VELASCO
FACULTAD DE MEDICINA
DR. ENRIQUE GARCÍA HERNÁNDEZ
INSTITUTO DE QUÍMICA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

FEBRERO DE 2019



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 en el Laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN), bajo la dirección del Dr. Jorge Meléndez Zajgla.

JURADO ASIGNADO:

DRA. SOFIA YOLANDA DÍAZ MIRANDA

DR. JORGE MELÉNDEZ ZAJGLA

DRA. LETICIA HAYDEE RAMÍREZ SILVA

DRA. ADELA RAMÍREZ ROMERO

DR. JULIO ISABEL PÉREZ CARREÓN

Le agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por haberme otorgado una beca con el número de registro 171599 durante la realización de mis estudios de Doctorado en Ciencias Biomédicas en la Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

A mi comité tutorial integrado por:

- Dr. Jorge Meléndez Zajgla, por permitirme desarrollar este proyecto de investigación.
- Dr. Luis del Pozo Yauner, por su guía y asesoramiento para la realización de este proyecto de investigación.
- Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco y
- Dr. Enrique García Hernández por su apoyo y consejos.

A los miembros del laboratorio de Genómica Funcional del Cáncer del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN)

- Dra. Luz María del Consuelo Mejía Cristóbal
- Dr. Gustavo Ulises Martínez Ruíz
- cDr. Francisco Javier Gaytán Cervantes

A todos ustedes muchas gracias...

INDICE

ABREVIATURAS.....	1
LISTA DE TABLAS FIGURAS.....	2
RESUMEN.....	3
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCION.....	5
• <i>Clasificación.....</i>	<i>6</i>
• <i>Estructura de las fibras amiloides</i>	<i>7</i>
• <i>Amiloidosis Primaria AL.....</i>	<i>9</i>
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVO.....	15

MATERIALES Y MÉTODOS.....	16
• <i>Proteínas experimentales.....</i>	16
• <i>Clonación de proteínas VHL de línea germinal.....</i>	17
• <i>Purificación y expresión bacterial.....</i>	18
• <i>Desplegamiento inducido por el equilibrio químico.....</i>	18
• <i>Ensayos de formación de fibras in vitro.....</i>	19
• <i>Ensayo de formación de semilla amiloide.....</i>	20
RESULTADOS.....	22
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	30
CONCLUSIONES.....	35
BIBLIOGRAFÍA.....	36
PUBLICACIÓN.....	41

ABREVIATURAS

cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
V _L	Cadenas Ligeras
GAG	Glicosaminoglicanos
AP	Componente amiloide P
SAP	Componente sérico P
ThT	Tioflavina T
GdnHCl	Hidrocloreuro de Guanidina
IPTG	Isopropil-B-D-tigalactopiranósido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
TEM	Microscopia Electrónica de Transmisión
mM	Milimolar
PBS	Buffer salino de fosfatos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

- Figura 1. Fibras amiloides vistas por microscopia electrónica
- Figura 2. Alineación de secuencias múltiples de las proteínas rV_L
- Figura 3. Curvas de equilibrio de desplegamiento de las proteínas rV_L
- Figura 4. Cinética de fibrillogénesis *in vitro* de las proteínas rV_L
- Figura 5. Comparación de la estabilidad termodinámica ΔG_{unf} VS C_m (M) de proteínas amiloides y proteínas no amiloides.
- Tabla 1. Tipos más frecuentes de amiloidosis
- Tabla 2. Porcentaje de identidad de secuencia entre las distintas proteínas estudiadas
- Tabla 3. Parámetros que describen la termodinámica del plegamiento nativo de las proteínas rV_L
- Tabla 4. Parámetros que describen la cinética de fibrillogénesis *in vitro* y siembra homóloga de proteínas rV_L

RESUMEN

Los segmentos de genes del dominio variable de inmunoglobulinas (VL) presentan distintas tendencias a asociarse en la Amiloidosis de Cadenas Ligeras (AL). Existe una notable diferencia en cuanto a la aparición de estos VL en los casos de AL, ya que un grupo pequeño de ellos son muy frecuentes y dan lugar a la mayoría de las cadenas ligeras amiloidogénicas compiladas en las bases de datos de secuencias, mientras que otras son raramente encontradas. Para analizar en qué medida estas tendencias dependen de la estabilidad de plegado y de la propensión a la agregación de la proteína VL de línea germinal, caracterizamos las proteínas VL que codifican para cuatro segmentos de genes de línea germinal asociados a AL y uno no asociado a AL. Encontramos que las proteínas de línea germinal rVL asociadas a AL, difieren ampliamente en la estabilidad conformacional y en la propensión a la agregación amiloide *in vitro*. Mientras que *in vitro* la cinética de formación amiloide de estas proteínas se correlaciona bien con sus estabilidades de plegado, la estabilidad de plegado no correlaciona claramente con las frecuencias de su línea germinal en AL. Nosotros concluimos que la asociación de los segmentos de genes VL de la amiloidosis no está determinada únicamente por la estabilidad de plegado y la propensión a la agregación de la proteína VL de línea germinal. Otros factores, como las frecuencias de mutaciones desestabilizadoras y la susceptibilidad a la proteólisis, deben desempeñar un papel determinante en la amiloidogenicidad de las cadenas ligeras.

ABSTRACT

Variable domain (VL) gene segments exhibit variable tendencies to be associated with light chain amyloidosis (AL). While few of them are very frequent in AL and give rise to most of the amyloidogenic light chains compiled at the sequence databases, other are rarely found among the AL cases. To analyze to which extent these tendencies depend on folding stability and aggregation propensity of the germline VL protein, we characterized VL proteins encoded by four AL-associated germline gene segments and one not associated to AL. We found that the AL-associated germline rVL proteins differ widely in conformational stability and propensity to in vitro amyloid aggregation. While in vitro the amyloid formation kinetics of these proteins correlate well with their folding stabilities, the folding stability does not clearly correlate with their germline's frequencies in AL. We conclude that the association of the VL genes segments to amyloidosis is not determined solely by the folding stability and aggregation propensity of the germline VL protein. Other factors, such as the frequencies of destabilizing mutations and susceptibility to proteolysis, must play a role in determining the light chain amyloidogenicity.

INTRODUCCIÓN

Las amiloidosis son un grupo de enfermedades que tienen en común la deposición extracelular patológica de fibras insolubles en varios tejidos y órganos. Las fibras tienen una conformación característica en su núcleo de hebra β -plegada que produce birrefringencia verde-manzana bajo luz polarizada cuando se tiñe con rojo Congo. La característica más sobresaliente que comparten todos los tipos de amiloidosis es un plegamiento anormal de una proteína que normalmente es soluble [1]. Los glicosaminoglicanos (GAG), predominantemente el heparan-sulfato y dermatan-sulfato, son el segundo componente mayor de los depósitos amiloides. Estos componentes se unen fuertemente, pero no covalentemente a las fibras amiloides. El componente amiloide P (AP) es una glicoproteína de estructura no fibrilar que se encuentra en menor cantidad con respecto a los glicosaminoglicanos, pero es parte importante de los depósitos amiloides.

El componente amiloide P (AP) es un derivado del componente amiloide sérico P (SAP) que pertenece al grupo de proteínas de fase aguda, el cual se une reversiblemente a todos los tipos de fibras amiloides [2].

La unión de estos componentes a la fibra amiloide promueve la formación y extensión de fibra confiriéndole una gran estabilidad a ésta en el tejido blanco, haciéndola resistente a la proteólisis [1, 3]. La disfunción de los órganos, principalmente riñón, corazón e hígado, resulta de la alteración de la

arquitectura del tejido por los depósitos amiloides. Sin embargo, existe evidencia que indica que las proteínas precursoras amiloidogénicas o los agregados precursores de la fibra tienen efectos citotóxicos directos sobre el órgano blanco que también contribuyen a la aparición de las manifestaciones de la enfermedad [4].

Clasificación

Existen varias proteínas que son capaces de formar fibras amiloides y los tipos de amiloidosis son clasificados en base a la proteína amiloidogénica así como por la distribución de los depósitos amiloides, ya sea sistémica o localizada [5], en la Tabla 1 se pueden observar los tipos más frecuentes de amiloidosis.

Los depósitos amiloides están compuestos por fibras de proteína y las subunidades peptídicas difieren en los distintos tipos de amiloidosis. La enfermedad de Alzheimer es la más común y típica representante de las formas localizadas de amiloidosis con depósitos de proteína- β encontrados en el cerebro, mientras que las formas sistémicas de amiloidosis pueden afectar a múltiples tejidos.

En las amiloidosis sistémicas, la proteína amiloidogénica es producida en un sitio distante al sitio donde ocurre la deposición amiloide. En contraste, las amiloidosis localizadas, la proteína amiloidogénica es producida en el sitio donde se lleva a cabo la deposición amiloide [6].

Tabla 1. Tipos más frecuentes de amiloidosis, modificada de [7].

Proteína Amiloide	Precursor	Localizada (L) o Sistémica (S)	Síndrome u órganos involucrados
A β	Precursor de la proteína A β	L	Enfermedad de Alzheimer Angiopatia cerebral amiloide (Variante Holandesa)
APrP	Proteína prión	L	Encefalopatías espongiiformes
ABri	Proteína ABri	L	Demencia Familiar (Variante Británica)
ACys	Cistatina C	L (S)	Angiopatia cerebral amiloide (Variante Islandesa)
A β_2 M	β_2 -Macroglobulina	S	Asociada a diálisis
AL	Cadenas ligeras de inmunoglobulinas	S	Amiloidosis Primaria (Asociada a Mieloma)
AA	Precursor sérico del amiloide A	S (L)	Amiloidosis Secundaria (Reactiva)
ATTR	Transtirretina	S	Polineuropatía amiloide familiar
AApoAI	Apolipoproteína AI	S L	Familiar (riñón, hígado, corazón) Aorta
AApoAII	Apolipoproteína AII	S	Familiar (riñón, corazón)
AGel	Gelsolina	S	Familiar (Variante Finlandesa)
ALys	Lisozima	S	Familiar (riñón, hígado, bazo)
AIAPP	Polipéptido amiloide insular Cadena α del fibrinógeno	L	Islotes de Langerhans (diabetes mellitas, insulinomas)

Estructura de las fibras amiloides

El núcleo de los depósitos amiloides es de origen proteico, pero además incluye especies asociadas llamadas moléculas accesorias, entre las que se encuentran iones metálicos (Zn²⁺ y Cu²⁺), glicosaminoglicanos, glicoproteínas como el compuesto sérico P amiloide y la apolipoproteína E, así como

componentes de matriz extracelular como colágena, heparan sulfato y el proteoglicano perlecan [8]. Estudios *in vitro* han demostrado que dichas moléculas pueden promover la fibrillogénesis de algunos precursores amiloides, estabilizar las fibrillas o aumentar la toxicidad amiloide. Sin embargo, su papel *in vivo* no se conoce bien [9]. A pesar de la diversidad de estructura de los precursores amiloidogénicos, los agregados fibrilares comparten características morfológicas, tintoriales y espectroscópicas.

Bajo microscopía electrónica, las fibrillas aparecen como manojos de fibrillas rígidas, no ramificadas con una longitud variable entre 100 y 1600 nm y un diámetro entre 7.5 y 10 nm dependiendo de su origen químico. Constan de un número variable de protofilamentos (generalmente dos a seis), de 2 a 5 nm de diámetro que se asocian de manera helicoidal, para formar fibrillas trenzadas (Figura 1.1a). Las fibrillas tienen la capacidad de unir ciertos colorantes específicos, como la Tioflavina T (ThT), lo que resulta en una emisión de fluorescencia, o el rojo Congo o Sirius, que se caracteriza por una birrefringencia color verde manzana bajo luz polarizada; aunque la especificidad de la birrefringencia resultante ha sido cuestionada recientemente [10-14].

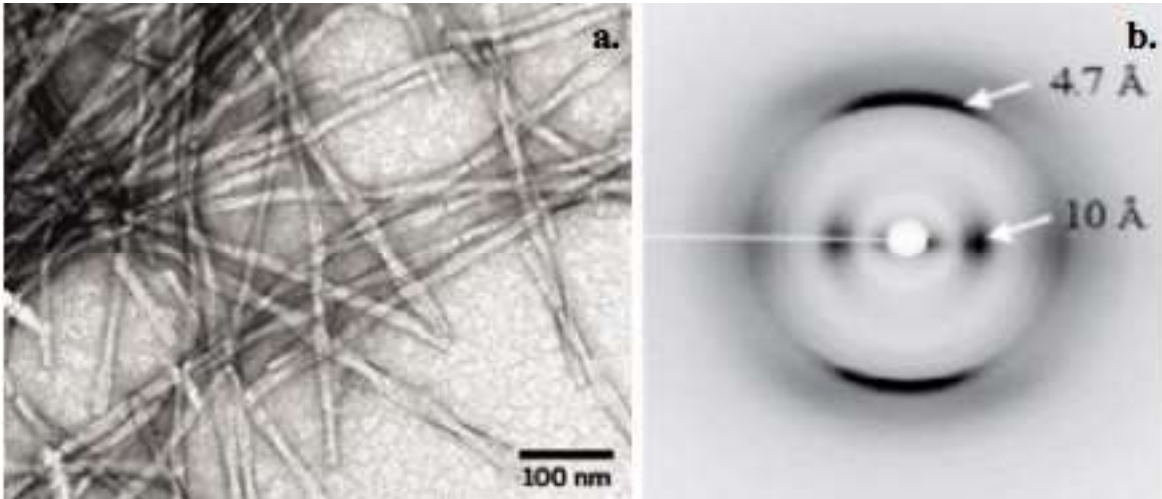


Figura 1. Fibras amiloides vistas bajo microscopía electrónica; en particular, la ausencia de ramificaciones (tomada de Arnold, 2008) (a). Patrón de refracción de rayos X, característico de las fibras amiloides correspondiente al patrón β cruzado. (b) La reflexión meridional a 4.7Å corresponde a las repeticiones entre hebras, mientras que la reflexión ecuatorial a 10 Å resulta del apilamiento entre hojas (ver figura 1.2) modificado de [Fowler et al., 2007].

Asimismo, presentan un patrón de difracción de rayos X característico (Figura 1.1b), correspondiente a un patrón β cruzado, en el cuál las hojas β extendidas que forman las fibrillas se orientan paralelamente al eje longitudinal de la fibrilla, mientras que las hebras β que forman las hojas se orientan perpendicularmente al eje de la fibra [15] (Figura 1.2a). Esta organización sugiere la presencia de interacciones hidrofóbicas o polares a lo largo del eje fibrilar (Figura 1.2b) [9].

Amiloidosis Primaria AL

La amiloidosis de cadenas ligeras de inmunoglobulinas o mejor conocida como amiloidosis AL es el tipo más común de amiloidosis sistémica y se encuentra asociada con una discrasia de células plasmáticas [6] Aunque la amiloidosis AL

es vista como una rara enfermedad, su incidencia es similar a la del linfoma de Hodgkin's o la leucemia mielogenosa crónica [16]. Se estima que afecta de 5 a 12 personas por millón cada año, aunque los estudios de autopsia sugieren que la incidencia podría llegar a ser más alta [6, 17].

La proteína amiloidogénica en la amiloidosis AL es una cadena ligera de inmunoglobulina o un fragmento de ésta, que es producida por una población clonal de células plasmáticas en la médula ósea y que no pueden ser catabolizadas o que sufren un plegamiento anormal, por lo que las enzimas catabólicas son incapaces de fragmentar la proteína a los aminoácidos que la constituyen [18]. El porcentaje de células plasmáticas involucradas en este desorden es bajo, del 5 al 10% [19], aunque de 10 a 15% de los pacientes, la amiloidosis AL se encuentra asociada con mieloma múltiple [20].

Las cadenas ligeras tienen dos dominios: un dominio variable y otro constante. Dentro del dominio variable, las hebras- β componen regiones estructurales conocidas como FRs, mientras que algunas de las asas forman parte de regiones que determinan la complementariedad conocidas como CDRs, las cuales son responsables de la unión con el antígeno. En condiciones normales dos cadenas ligeras de inmunoglobulinas forman un complejo con dos cadenas pesadas para así formar un heterotetrámero, que es secretado en la circulación sanguínea como una molécula de inmunoglobulina perfectamente ensamblada. Sin embargo, las cadenas ligeras pueden ser secretadas de forma libre como homodímeros, también conocidos como proteínas de Bence Jones [21]. En la Amiloidosis AL, ha sido reportado que la gran mayoría de los

pacientes con fibras amiloides depositadas en uno o varios órganos, están formadas por el dominio variable de inmunoglobulinas [22]. Por esta razón, varios reportes de cadenas ligeras amiloidogénicas incluyen el dominio variable y no el dominio constante. En la amiloidosis AL, las clonas de células plasmáticas expresan el isotipo λ de cadenas ligeras con una mayor frecuencia que el isotipo κ , con un radio de 3:1, que contrasta con lo que sucede en la médula ósea normal, donde las células plasmáticas expresan en mayor proporción el isotipo κ que el λ [23].

Se ha observado que la presencia de ciertas líneas germinales y la hipermutación somática, que es un proceso requerido para la maduración de las inmunoglobulinas son dos eventos que juegan un papel importante para la aparición de esta enfermedad [24, 25]. De las más de setenta líneas germinales de cadenas ligeras de inmunoglobulinas, son cinco las que se han visto relacionadas con una mayor frecuencia en la Amiloidosis AL: λ 1-C, λ 2-2a2, λ 3-r, λ 6 y κ 1-018. En los pacientes con la línea germinal λ 6 la gran mayoría de los depósitos amiloides se localizan en riñón. Asimismo, estos pacientes presentan amiloidosis cardíaca asintomática, poco daño a sistema nervioso y no presentan daño hepático, que les genera un mayor porcentaje de sobrevivencia después del trasplante de médula ósea, en contraste con los pacientes que presentan otras líneas germinales tales como λ 1-C, λ 2-2a2 y λ 3-r, ya que estas últimas llegan a dañar otros órganos vitales como corazón e hígado [24, 26]. Las mutaciones en las proteínas AL tienen un efecto perjudicial sobre la estabilidad de la proteína, favoreciendo un plegamiento anormal. En

varios estudios *in vitro* se ha observado una relación entre la estabilidad de la proteína y el incremento de la formación de fibra [27, 28]

Las mutaciones somáticas son el factor dependiente de la proteína que ha sido estudiado más y, por lo tanto, aquel cuya función se entiende mejor en la formación de agregados amiloides [2-8]. Por otra parte, varios estudios han proporcionado evidencias que sugieren una importante contribución del segmento de gen de dominio variable (V_L) en el comportamiento amiloidogénico de las cadenas ligeras [17]. No todos los segmentos de genes de inmunoglobulinas están presentes en la Amiloidosis AL con la misma frecuencia, se ha observado un predominio inexplicable de proteínas derivadas de ciertos segmentos de genes V_L IGLV6-57 (6a), IGLV1-44 (1c), IGLV2-14 (2a2), IGLV3-1 (3r) y IGKV1-33 (018) entre las proteínas AL reportadas en varios estudios [18-21]. Estos segmentos de genes, representan solamente alrededor del 7% del repertorio funcional de genes V_L κ y λ [14], pero representan casi el 70% de las cadenas ligeras AL reportadas en la AL-Base [23]. Se ha sugerido que las cadenas ligeras derivadas de los segmentos de genes AL-asociados comparten ciertos factores estructurales que los hacen altamente propensos a la agregación amiloide [19]. Sin embargo, no está claro si estos factores son determinados por la secuencia de la línea germinal del segmento del gen V_L , el efecto de las mutaciones somáticas deletéreas, o por una combinación de ambas. Por lo tanto, una estrategia utilizada para entender el impacto del segmento del gen V_L en el comportamiento de agregación de una familia de cadena ligera en particular, es la caracterización de las

propiedades biofísicas y estructurales de la proteína V_L una línea germinal en específico [24-26]

Actualmente, solo un pequeño número de proteínas de línea germinal V_L se ha caracterizado [24-26]. Dos de ellos son 6aJL2 y 018/08, que se codifican, respectivamente, por los segmentos de genes V_L IGL V6-57 y IGKV1-33 [24, 25]. IGL V6-57, el único miembro del subgrupo λ6 V_L, codifica alrededor del 25% de las proteínas ALλ compilados en el AL-Base [27], lo que contrasta con su baja frecuencia (2%) de expresión en el repertorio normal en la médula ósea de células plasmáticas que expresan una cadena ligera λ [21]. Cabe resaltar que prácticamente todas las cadenas ligeras monoclonales λ6 identificadas hasta el momento se han encontrado en alguna forma de depósito amiloide [7, 30, 29]. Esta observación ha llevado a asumir que las cadenas ligeras λ6 son inherentemente amiloidogénicas [21, 28, 30]. Por otro lado, el segmento de gen V_L IGKV 1-33 pertenece al subgrupo κ1 V_L, éste codifica cerca de 40% de las proteínas AL κ compilados en el AL-Base [23]. En comparación con la proteína 018/08, 6aJL2 termodinámicamente es menos estable y, según los informes, parece ser más fibrilogénico [25, 31]. Sin embargo, se determinó que el comportamiento de agregación de estas proteínas se generó en condiciones experimentales no equivalentes, en estudios separados [25,31]. Para ampliar nuestra comprensión acerca de la relación entre el segmento del gen V_L de línea germinal y la propensión de las cadenas ligeras para formar agregados amiloides, hemos caracterizado el plegamiento termodinámico y la fibrilogénesis *in vitro* de un conjunto de proteínas V_L recombinantes (r) que

codifican para los segmentos de genes de las líneas germinales IGL V6-57 ($\lambda 6$), IGL 1-44 ($\lambda 1$), IGL 1-40 ($\lambda 1$), IGL 2-14 ($\lambda 2$) y IGKV1-33 ($\kappa 1$).

HIPÓTESIS

- Las proteínas de las líneas germinales IGL V6-57 ($\lambda 6$), IGL 1-44 ($\lambda 1$), IGL 1-40 ($\lambda 1$), IGL 2-14 ($\lambda 2$) y IGKV1-33 ($\kappa 1$) contienen diferente potencial fibrilogénico.

OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la contribución de la estabilidad termodinámica de las proteínas V_L al mecanismo de la agregación amiloide.

MATERIALES Y MÉTODOS

El hidrocloreuro de guanidina (GdnHCl) UltraPure™ y la urea se compraron de Invitrogen (Life Technologies Corporation., Carlsbad, CA). Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) libre de dioxano, se adquirió de Promega. (Madison, WI). La tioflavina T (ThT), ampicilina sódica, sulfato de kanamicina, sulfato de amonio de grado biología molecular y medio microbiano 2xYT se obtuvieron todos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Otros productos químicos utilizados para la preparación de soluciones y tampones fueron adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO).

Proteínas experimentales

Se estudiaron seis diferentes proteínas V_L, nombradas 1cJL2, 1eJL2, 2a2JL2, 6aJL2-R25, 6aJL2-G25 y 018JK2. Las proteínas 1cJL2, 1eJL2, 2a2JL2, y 018JK2 contienen la secuencia de su línea germinal respectiva, los segmentos de los genes V_L IGLV1-44 (1c), IGLV1-40 (1e), IGLV2-14 (2a2), y IGKV1-33 (018) se encuentran unidos en dirección 3' → 5' a la secuencia del segmento del gen de unión (J_L) correspondiente. El segmento del gen J_L es IGLJ2 para todas las proteínas de tipo λ y IGKJ2 para la proteína 018JK2. Las proteínas 6aJL2-R25 y 6aJL2-G25 fueron codificadas, respectivamente, por los dos alelos conocidos como IGLV6-57 (6a) locus, llamado IGLV6-57* 01 y * 02 IGLV6-57* 02, que difieren en una Arg en la posición 25 para el primero, mientras que en el segundo difiere en una Gly en la misma posición [32]. Las

secuencias de las líneas germinales de los segmentos de genes V_L mencionados anteriormente fueron tomadas de la base de datos de región variable del gen VBASE2 (<http://www.vbase2.org/>) [33].

Clonación de proteínas VHL derivadas de la línea germinal

El fragmento de ADN 018JK2 flanqueado por sitios de restricción para SfiI y NotI, se sintetizó mediante PCR recursiva, como se describió anteriormente para la proteína 6aJL2, utilizando un conjunto de oligonucleótidos sintéticos de 45-60 bases de largo [34]. Las construcciones de ADN que codifican para las proteínas 1cJL2, 1eJL2 y 2a2JL2 fueron generadas por una estrategia multi-pasos. Las secuencias del repertorio V_L policlonal de un individuo sano fueron amplificadas por PCR convencional a partir de una biblioteca de cDNA obtenido a partir de células mononucleares de sangre periférica usando un conjunto de oligonucleótidos sintéticos V_L de subgrupos específicos. Los productos de PCR fueron clonados en el plásmido pSyn1 y el fragmento de ADN recombinante secuenciado por electroforesis capilar en el Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN). Las construcciones de ADN que contenían el inserto que mejor coincidió con las secuencias de V_Ls 1cJL2, 1eJL2, y 2a2JL2 se utilizaron como blancos en reacciones de mutagénesis sitio-dirigidas individuales basados en PCR para restaurar los residuos de la línea germinal en cada posición identificados como mutados. Los productos de la reacción de PCR fueron clonados en el plásmido pSyn1 y secuenciados, como se mencionó anteriormente. Las proteínas 6aJL2-R25 y 6aJL2-G25 se clonaron como se describe previamente [9]. Todos los oligonucleótidos utilizados en este

trabajo fueron adquiridos de IDT (Integrated DNA Technologies, Inc., Coralville, IA, EE.UU.) y sus secuencias están disponibles bajo petición.

Purificación y expresión bacterial

Las proteínas recombinantes se expresaron en células E. coli BL21 (DE3) cultivadas en medio 2xYT, que contenía 150 mg / ml de ampicilina sódica, como se describe previamente [9]. La etapa de purificación se realizó en una columna de filtración en gel Sephacryl HR S-100 HiPrep 26/60 (GE Healthcare Bio-Sciences AB), como se describió [9]. La identidad de las proteínas recombinantes fue corroborada por un análisis de espectrometría de masas (MALDI-TOF), mientras que su pureza se determinó por electroforesis en SDS-PAGE, como se describió [9].

Desplegamiento inducido por el equilibrio químico

La termodinámica del plegamiento nativo de las proteínas experimentales fue determinado por el desplegamiento reversible en equilibrio reversible en presencia de dos diferentes sales caotrópicas, hidrocloreuro de guanidina (GdnHCl) y urea. En ambos experimentos, las muestras que contenían 50 µg / ml (4,1 µM) de proteína diluida en 20 mM de fosfato de sodio pH 7,5, se incubaron durante toda la noche a 25°C en concentraciones crecientes del desnaturizante [9]. Los espectros de emisión de fluorescencia se registraron a 25°C de 310 nm a 410 nm, excitando la muestra a 290 nm. Los parámetros termodinámicos fueron calculados por mínimos cuadrados no lineales de ajuste de los datos brutos de la intensidad de fluorescencia a la ecuación 1, suponiendo un modelo de dos estados entre el nativo (N) y desplegada (U):

$$y_{\text{obs}} = \frac{(y_N + m_N[D]) + (y_U + m_U[D])e^{-(\Delta G_{H_2O}^0 + m)/RT}}{1 + e^{-(\Delta G_{H_2O}^0 + m)/RT}}$$

donde y_{obs} es la intensidad de fluorescencia medida, y_N es la intensidad de fluorescencia de la proteína nativa, y y_U es la intensidad de fluorescencia de la proteína desplegada. $\Delta G_{H_2O}^0$ es la energía libre de desplegamiento en ausencia de desnaturizante. D es la concentración desnaturizante, m es el cambio de energía libre por mol de desnaturizante. R y T son la constante de gas ideal y la temperatura absoluta, respectivamente. Las líneas de base de transición antes y después son descritas por las pendientes m_N y m_U respectivamente. La C_m , es la concentración de desnaturizante cuando $\Delta G = 0$, se calcula por la ecuación 2.

$$C_m = \frac{-\Delta G_{H_2O}}{m}$$

Ensayos de formación de fibras *in vitro*

Los experimentos *in vitro* de fibrillogénesis consistieron en 1 ml de una dilución de proteína en PBS, pH 7.4 de 500 $\mu\text{g/ml}$ (41,5 M) con 0.05% de azida de sodio. Los experimentos se realizaron por triplicado, las muestras se colocaron en un tubo de 2 ml de microcentrífuga de polipropileno y se incubaron a 37°C con agitación constante a 1.000 r.p.m. en un agitador orbital Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Hamburgo, Alemania).

La formación de fibra fue detectada por ensayos de tioflavina T (ThT) [35]. En tiempos predeterminados una alícuota (15 μl) fue retirada de cada muestra y se mezcló con 550 μl de una solución de ThT 20 mM en Tris-HCl 25 mM, pH 8.0.

La emisión de fluorescencia se registró de 460 nm a 510 nm, excitando la muestra a una longitud de onda de 450 nm. Los parámetros que describen la cinética de la formación de fibras se determinaron mediante el ajuste del cambio en función del tiempo en la fluorescencia de ThT con la ecuación 3.

$$F_{ThT} = \frac{A}{\{1 + e^{[-B(t-t_i)]}\}}$$

donde F_{ThT} es la intensidad de fluorescencia de ThT, A es la intensidad de fluorescencia de ThT en la meseta posterior a la transición, t_i es el punto medio de la región de transición, B es la tasa constante de crecimiento fibrilar y t es el tiempo. El tiempo de retraso (t_{lag}) se calculó mediante la extrapolación de la región lineal de la fase hiperbólica al origen de la abscisa [36]. En paralelo al análisis de la fluorescencia de ThT, la fluorescencia intrínseca y la fluorescencia de ANS de las muestras ensayadas en el sistema B se determinaron, como se describe previamente [37]. Los análisis espectrofluorométricos se realizaron en un Espectrofluorómetro ISS PC1 de recuento de fotones (ISS, Inc., Champaign, IL) o en un Espectrofluorómetro Fluorolog 3 (HORIBA, Ltd., Kyoto, Japón).

Ensayo de formación de semilla amiloide

Semillas amiloides homólogas (fibras fragmentadas) se produjeron como se describe en [38]. En el caso de la proteína 018JK2, las semillas amiloides se producen a partir de fibras que se generaron en condiciones no nativas. Una solución 1 mg / ml de esta proteína, se diluyó en PBS a pH 7.4 y después se incubó a 60°C durante 30 min en presencia de 10 mM de ditioneitol (DTT). En tales condiciones, el enlace disulfuro altamente conservado en Cys23-Cys88 se

reduce y desestabiliza a la proteína. Posteriormente, la solución se agitó para promover la formación de fibras amiloide, como se demostró mediante el ensayo ThT. Se utilizó este enfoque porque la proteína 018JK2 no se agrega como fibras amiloides en condiciones nativas, al menos después de 50 horas de incubación. Los experimentos de formación de semilla amiloide se realizaron por duplicado y se prepararon mezclando 1,0 ml de una dilución proteína con 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (41,5 μM) en PBS pH 7.4 más 0.05% w: w azida de sodio, que contenía 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de semillas amiloides homólogas (4,1 M de monómeros). Las muestras se colocaron en tubos de microcentrifuga de polipropileno de 2.0 mL y se incubaron a 37 ° C sin agitación. En un momento predeterminado, una alícuota (20 μl) de cada muestra fue retirada y se mezcló con 550 μl de una solución 20 M ThT en 25 mM Tris-HCl, pH 8.0. La emisión de fluorescencia se registró como se describe anteriormente. Al mismo tiempo, una segunda alícuota fue retirada de cada muestra, se centrifugó a 14.000 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente en una centrifuga de sobremesa y la absorbancia a 280 nm (A_{280}) del sobrenadante se determinó en un NanoDrop (Thermo Fisher Científico). Entonces, la fracción de agregados (A. F.) de monómeros en cada momento específico se calculó mediante la ecuación 4.

$$\text{A.F.} = 1 - (t_{280} / t_{280}^0)$$

Donde t_{280} y t_{280}^0 son, respectivamente, la A_{280} del sobrenadante medido en un momento experimental específico y $t = 0$.

RESULTADOS

Comparación de las secuencias de las proteínas rV_L de línea germinal

La alineación de la secuencia de las seis proteínas se muestra en la Fig. 2. Las proteínas 6aJL2-R25 ($\lambda 6$), 6aJL2-G25 ($\lambda 6$), 1eJL2 ($\lambda 1$) y 2a2JL2 ($\lambda 2$) tienen 111 residuos de longitud, mientras que 1cJL2 ($\lambda 1$) es un residuo menos. La proteína 018JK2 ($\kappa 1$), tiene 107 residuos, es la más corta de todas. Hay varias diferencias estructurales entre estas proteínas, incluyendo la longitud de las regiones FRs y CDRs, así como la posición de los residuos insertados (Fig. 2). El porcentaje de identidad de secuencia entre las proteína se presentan en la Tabla 2. La identidad de secuencia más alto (> 69%) es compartida por las proteínas que pertenecen a los subgrupos de VL $\lambda 1$ y $\lambda 2$, por otra parte, son 64-66% idénticas a las proteínas $\lambda 6$. Como se puede esperar, la proteína $\kappa 1$ 018JK2 tiene la secuencia de identidad más bajo (<52%) con respecto a las otras.

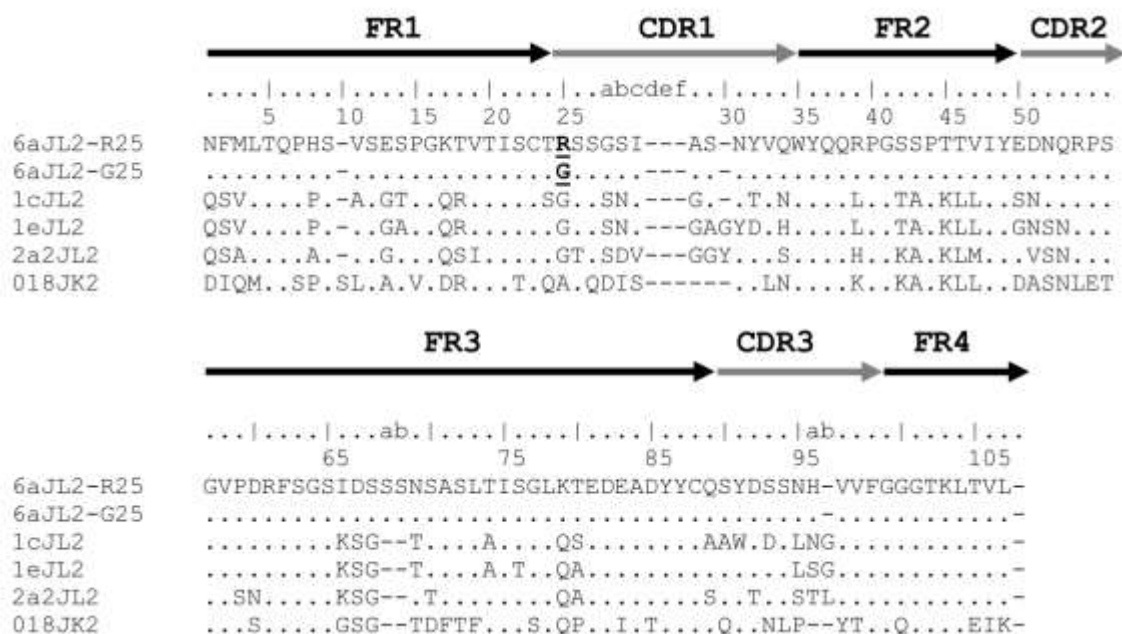


Figura 2. Alineación de secuencias múltiples de las proteínas r_VL 6aJL2-R25, 6aJL2-G25, 1cJL2, 1eJL2, 2a2JL2, y 018JK2, como se deduce de la secuencia del segmento de ADN recombinante que codifica la proteína en el constructo respectivo. El sistema de numeración, así como los marcos (FR) y regiones determinantes de la complementariedad (CDR) están de acuerdo con Kabat et al [40]. La diferencia en la posición 25 de las proteínas derivadas de los alelos del gen IGLV6-57 segmento se pone en relieve.

Table 2. Porcentaje de identidad de secuencia entre las distintas proteínas estudiadas

% de identidad de secuencia						
6aJL2-R25	100%					
6aJL2-G25	99.12%	100%				
1cJL2	66.66%	67.54%	100%			
1eJL2	65.78%	66.66%	84.21%	100%		
2a2JL2	64.91%	65.78%	69.29%	74.56%	100%	
018JK2	46.49%	46.49%	50.87%	51.75%	49.12%	100%
	6aJL2-R25	6aJL2-G25	1cJL2	1eJL2	2a2JL2	018JK2

Estabilidad termodinámica del plegamiento nativo

La Figura 3 muestra los gráficos de la fracción de proteína desplegada (F_U) como una consecuencia de la concentración de los agentes desnaturizantes, como urea y GdnHCl. En todos los casos, los datos se ajustaron a curvas con forma sigmoideal con una transición única que se explica bien con un modelo de dos estados. Esto es consistente con un desplegamiento cooperativo, en el que sólo los estados nativo y desplegado fueron formados de manera significativa. Los parámetros termodinámicos calculados ajustando los datos de fluorescencia intrínseca con la Ecuación 1 se muestran en la tabla 3. De acuerdo con la C_m de desplegamiento del GdnHCl, la proteína menos estable es 6aJL2-G25, seguido en orden ascendente por 6aJL2-R25, 2a2JL2, 1eJL2, 1cJL2 y 018JK2. Se obtuvieron resultados similares de los valores de C_m con urea, siendo 6aJL2-G25 la proteína menos estable y 018JK2 y 1cJL2 las más estables (Tabla 3). Aunque la C_m de GdnHCl de 1cJL2 (2,1 M) es 50% mayor que la de 6aJL2-R25 (1,4 M), sus ΔG_{unf} son muy similares ($4,7 \pm 0,4$ kcal / mol Vs $4,8 \pm 0,1$ kcal / mol). Un contraste análogo se observa cuando se comparan los parámetros termodinámicos de ambas proteínas calculado por el desplegamiento con urea. Esto se explica por el valor- m de desnaturizante bajo de las curvas de desplegamiento de la proteína 1cJL2 con ambos desnaturizantes, GdnHCl ($-2,2 \pm 0,2$ kcal / mol M⁻¹) y urea ($-1,0 \pm 0,1$ kcal / mol M⁻¹) (Tabla I), que son los más bajos, y significativamente distintos?? en comparación a los valores- m de las otras proteínas (Tabla 3). La divergencia en el valor- m de desnaturizante se ha atribuido a diferencias en el área de la

superficie hidrófoba expuesta al disolvente una vez que las proteínas se despliegan o la presencia de productos intermedios en las vías de plegado / desplegado [41]. Por lo tanto, el valor- m de desnaturalizante bajo de 1cJL2, comparado con las otras proteínas, podría reflejar una estructura más compacta de su estado desplegado. Sin embargo, no se puede excluir que su ruta de desplegamiento presenta uno o más productos intermedios, en cuyo caso el ΔG_{unf} calculado por ajuste de los datos experimentales en un modelo de dos estados es inexacto. Por otro lado, 1cJL2 es la única proteína que tiene un residuo de Trp adicional colocado en la posición 91 (Fig. 2). Se ha demostrado que las mutaciones hidrofóbicas a hidrofílicas en la superficie de las proteínas puede modificar el valor- m desnaturalizante en una magnitud que dependerá de la región en la que se coloque la mutación [42].

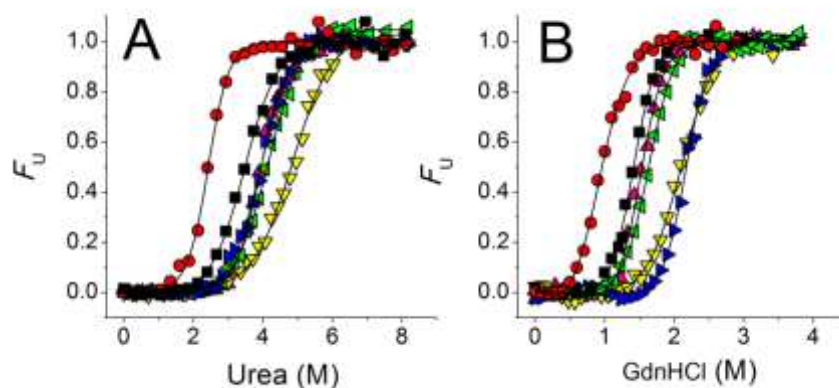


Figura 3. Curvas de equilibrio de desplegamiento de las proteínas μ VL 6aJL2-R25 (cuadrado negro), 6aJL2-G25 (círculo rojo), 1cJL2 (amarillo triángulo hacia abajo), 1eJL2 (verde triángulo hacia la izquierda), 2a2JL2 (rosa triángulo hacia arriba), y 018JK2 (triángulo azul hacia la derecha) inducida por A) urea y B) hidrocloreuro de guanidina (GdnHCl). La fracción desplegada (F_U) de cada proteína fue calculada a partir de los datos de fluorescencia intrínseca en función de la concentración de desnaturalizante. La línea continua representa el ajuste no lineal de los datos de la ecuación. 1.

Tabla 3. Parámetros que describen la termodinámica del plegamiento nativo de las proteínas rVLs determinados por equilibrio de despliegue con GdnHCl y urea.

Proteína	GdnHCl				Urea			
	ΔG_{H2O} (kcal/mol)	$-m$ (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	C_m (M)	$\Delta\Delta G_{unf}$ (kcal/mol)	ΔG_{H2O} (kcal/mol)	$-m$ (kcal mol ⁻¹ M ⁻¹)	C_m (M)	$\Delta\Delta G_{unf}$ (kcal/mol)
6aJL2-G25	4.1 ± 0.1	3.9 ± 0.1	1.0	-	4.3 ± 0.2	1.8 ± 0.1	2.4	-
6aJL2-R25	4.8 ± 0.1	3.4 ± 0.1	1.4	1.6	4.8 ± 0.1	1.3 ± 0.0	3.5	2.0
1cJL2	4.7 ± 0.4	2.2 ± 0.2	2.1	4.3	5.0 ± 0.2	1.0 ± 0.1	5.0	4.7
1eJK2	5.3 ± 0.3	3.2 ± 0.2	1.6	2.3	5.3 ± 0.2	1.3 ± 0.1	4.1	3.1
2a2JL2	5.3 ± 0.4	3.5 ± 0.2	1.5	2.0	5.8 ± 0.4	1.5 ± 0.1	3.9	2.7
018JK2	7.7 ± 0.6	3.6 ± 0.3	2.2	4.7	5.8 ± 0.1	1.5 ± 0.1	4.0	2.9

$\Delta\Delta G_{unf}$ es el cambio relativo de energía libre acumulada para 6aJL2-G25: $\Delta\Delta G_{unf} = (m^{6aL2-G25} \times C_m^{Prot}) - (m^{6aL2-G25} \times C_m^{6aL2-G25})$

Fibrilogénesis *in vitro*

La incubación de las seis proteínas a 37°C con agitación orbital vigorosa de 1000 r.p.m. condujo a la formación de agregados de cinco de ellas con capacidad de unión a ThT, aunque con claras diferencias en la cinética de agregación (Fig. 4A y la Tabla 4). La t_{lag} de ambas proteínas $\lambda 6$, 6aJL2-G25 ($t_{lag} = 3,3$ h) y 6aJL2-R25 ($t_{lag} = 3.4$ h), fueron las menores, seguidas en orden ascendente por 2a2JL2 (5,5 h), 1eJL2 (16 h) y 1cJL2 (18,6 h). Según el ensayo de fluorescencia de ThT, la proteína 018JK2 no formó agregados amiloides después de cerca de 55 horas de incubación (Fig. 4A). También hubo diferencias entre las proteínas con respecto a la constante de velocidad (k) de

la reacción de polimerización, siendo la más alta y la más baja de ellas 6aJL2-G25 ($0,025 \pm 0,003 \text{ min}^{-1}$) y 1cJL2 ($0,0015 \pm 0,0001 \text{ min}^{-1}$), lo que representa una diferencia de más de un orden de magnitud (Tabla 4).

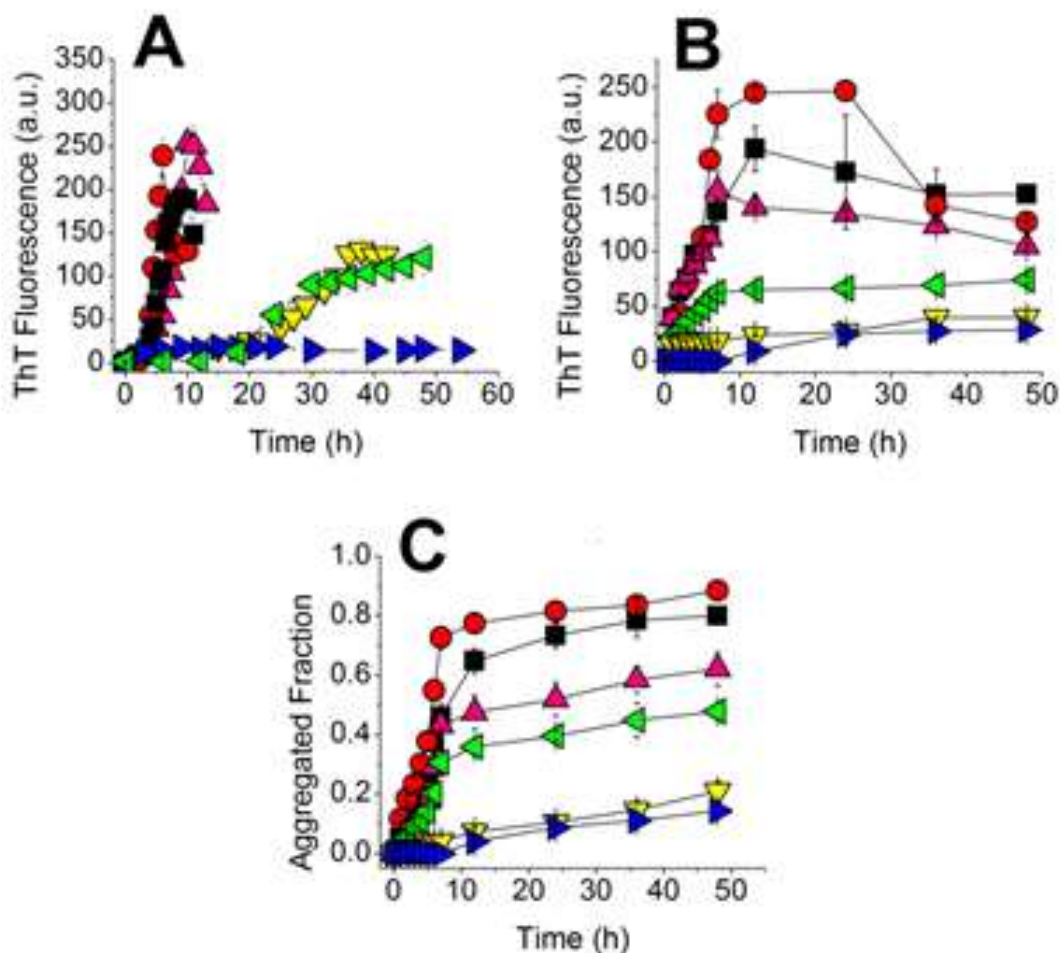


Figura 4. Cinética de fibrillogénesis *in vitro* de las proteínas rV_L 6aJL2-R25 (cuadrado negro), 6aJL2-G25 (círculo rojo), 1cJL2 (triángulo amarillo hacia abajo), 1eJL2 (triángulo verde hacia la izquierda), 2a2JL2 (triángulo rosa hacia arriba), y 018JK2 (triángulo azul hacia la derecha). Todas las proteínas se ensayaron a 500 µg / ml (41,5 µM) diluidas en PBS pH 7.4 y la incubación se realizó a 37°C. En A), las muestras se incubaron con agitación constante de 1.000 r.p.m. en un agitador orbital. En B) se observa la cinética de la fibrillogénesis de las mismas proteínas representadas en A) desarrollado con semillas amiloides homólogas. C) Tiempo de la variación de la fracción agregada de las muestras del experimento representado en B). La fracción de agregados se realizó como se describe en Material y Método.

Tabla 4. Parámetros que describen la cinética de fibrillogénesis *in vitro* y siembra amiloide homóloga de las proteínas rV_L de línea germinal.

Proteína	Fibrillogénesis		Semillas Homólogas	
	t _{lag} (h)	K (min ⁻¹)	Fracción Agregada	k (min ⁻¹)
6aJL2-G25	3.3	0.025 ± 0.003	0.88	0.0024 ± 0.0003
6aJL2-R25	3.4	0.016 ± 0.001	0.79	0.0016 ± 0.0001
1cJL2	18.6	0.0015 ± 0.0001	0.20	0.0002 ± 0.0001
1eJK2	16.0	0.0028 ± 0.0001	0.48	0.0016 ± 0.0002
2a2JL2	5.5	0.0086 ± 0.0009	0.62	0.0016 ± 0.0002
018JK2	-	-	0.14	-

Ensayo de siembra amiloide

El tiempo de agregación a partir de la fluorescencia de ThT y la fracción agregada, generada en los experimentos de siembra amiloide homóloga se muestran en la Fig. 4C. El valor de la fracción agregada determinada al final del experimento de siembra, así como la constante de velocidad (k) de la reacción de elongación, se muestran en la tabla 4. La co-incubación de las proteínas solubles con la respectiva semilla amiloide homóloga resultó en un perfil de la fibrillogénesis sin una t_{lag} reconocible en cinco de ellos. La excepción fue la proteína 018JK2, cuyos perfiles de fluorescencia de ThT y la fracción agregada mostraron una t_{lag} evidente de aproximadamente 7 horas (Fig. 4C).

La ausencia de t_{lag} es coherente con la supresión de la fase de nucleación de la fibrillogénesis, debido a la adición de las fibras fragmentadas. De acuerdo con ambos parámetros, la fluorescencia de ThT y la fracción agregada, la proteína 6aJL2-G25 formó la mayor cantidad de agregados amiloides, seguido en orden decreciente por 6aJL2-R25, 2a2JL2, 1eJL2, 1cJL2 y 018JK2. 6aJL2-G25 sostuvo la reacción más rápida de elongación de fibrillas ($k = 0,0024 \text{ min}^{-1} \pm 0,0003$), mientras que la más lenta fue la proteína 1cJL2 ($k = 0,0002 \text{ min}^{-1} \pm 0,0002$). No hubo diferencias en este parámetro entre las proteínas 6aJL2-R25G, 1eJL2 y 2a2JL2.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Las cadenas ligeras de inmunoglobulinas son únicas entre los precursores amiloides existentes, debido a su alta heterogeneidad estructural [43]. Tal característica está relacionada con su función de reconocimiento, y los resultados de los mecanismos moleculares de evolución seleccionados para asegurar la generación de un repertorio amplio y diverso de anticuerpos [44]. Dos de estos mecanismos son la recombinación de segmentos de genes de inmunoglobulinas [45] y la hipermutación somática [46]. El papel de la hipermutación somática en la amiloidogénesis de las cadenas ligeras se ha investigado sistemáticamente por diferentes laboratorios, utilizando diferentes modelos [27-28, 37-38, 47-48, 49-54]. Una conclusión general postulada por estos estudios es que las mutaciones somáticas desestabilizadoras juegan un papel clave en la agregación amiloide de las cadenas ligeras, debido a su capacidad para promover un plegamiento incorrecto. Por otro lado, la evidencia indica que el segmento del gen que codifica para V_L contribuye de forma importante para determinar la propensión de las cadenas ligeras a agregarse de forma amiloide [9, 24, 26, 55-57].

Cabe destacar que alrededor del 70% de las proteínas AL compiladas en la ALBase involucran a sólo cinco segmentos de genes V_L de líneas germinales, lo que demuestra su fuerte asociación con la amiloidosis [58]. Con base en la correlación inversa bien documentada entre la estabilidad de plegamiento y la

propensión a formar agregados amiloides, se especuló que los segmentos de genes VL de las líneas germinales asociadas a amiloides son inherentemente inestables y propensos a formar un plegamiento incorrecto y en consecuencia el agregado en fibras amiloides [9]. Los datos de este estudio no apoyan esta hipótesis, ya que muestran que las proteínas rVL de línea germinal derivadas de los segmentos de genes asociados a amiloidosis-AL difieren entre sí en su termodinámica de plegamiento y la propensión a la agregación amiloide *in vitro*. La proteína 6aJL2-G25, codificada por el alelo IGLV6-57 * 02, es la menos estable termodinámica y más fibrilogénica de todas ellas, siendo similar en estabilidad a la proteína Rec (κ 4) [47] (Fig. 5). En claro contraste se encuentra la proteína 018JK2, la más estable termodinámica y menos fibrilogénica. Esta proteína, derivada del segmento de gen κ 1 IGKV1-33, es tan estable como la proteína κ 4 VL Len, que se considera una típica proteína no-AL [47] (Fig. 5). En comparación con 6aJL2-G25, la proteína 018JK2 es ~ 70% ($\Delta\Delta G_{unf} = 2,9$ kcal / mol) más estable por desplegamiento con urea, pero aún más estable ($\Delta\Delta G_{unf} = 4,7$ kcal / mol) por su desplegamiento con GdnHCl (Tabla I). Tal diferencia en la estabilidad correlaciona con su propensión a la agregación, ya que 018JK2 no forma fibras amiloides, tras más de 50 horas de incubación a 37 ° C con agitación vigorosa. Incluso, la siembra de semillas fragmentadas en solución de 018JK2 apenas promovió la agregación, siendo incapaces de suprimir la fase t_{lag} (Fig. 4C).

En comparación, la proteína 6aJL2-G25 extiende rápida y eficientemente sus fibras en el ensayo de la siembra y fácilmente formó fibras con una t_{lag} no

superior a 3 horas cuando se incubó sin semillas. De las otras tres proteínas asociadas-AL derivadas de la línea germinal, 1cJL2 es la más estable, siendo apenas fibrillogénica; mientras que 2a2JL2 se puede definir como una proteína moderadamente estable, con una propensión media a agregarse *in vitro* en fibras amiloides. Por otro lado, la proteína 6aJL2-R25, la menos estable termodinámicamente de las tres, mostró una mayor propensión a formar fibras amiloides. En general, la propensión de las proteínas derivadas de la línea germinal para formar fibras amiloides *in vitro* correlaciona inversamente con la estabilidad de plegado, que está documentado en informes previos [47, 59, 60]

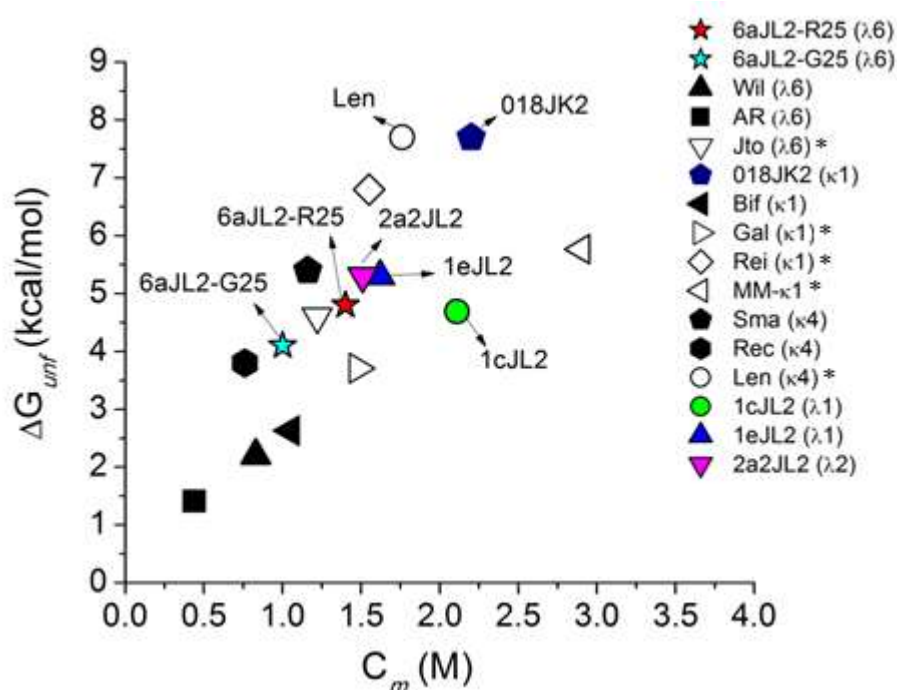


Figura 5. Comparación de la estabilidad termodinámica ΔG_{unf} VS C_m (M) de proteínas amiloides y proteínas no amiloides (*).

Este estudio arroja información sobre el origen de la alta propensión de las cadenas ligeras derivadas del segmento de gen IGLV6-57 para formar amiloide [61- 62]. En comparación con las proteínas codificadas por las demás líneas germinales, 6aJL2-R25 y 6aJL2-G25 mostraron ser las menos estables termodinámicamente y más fibrilogénicas. Omitiendo la fundamental contribución de las mutaciones somáticas, nosotros postulamos que la estabilidad de plegamiento baja de las proteínas VL de línea germinal $\lambda 6$ contribuye de manera importante a la propensión anormalmente alta de formar agregados amiloides de las cadenas ligeras $\lambda 6$. Por el contrario, la participación frecuente en la deposición de amiloide de las cadenas ligeras derivadas de los segmentos de genes de línea germinal IGKV1-33 (018) y IGLV1-44 (1c) parecen ser más dependientes del efecto estructural de las mutaciones somáticas desestabilizadoras. Por lo tanto, la probabilidad de que una cadena ligera madura evite un mal plegamiento y agregación amiloide aumenta hasta el punto de que su proteína VL de línea germinal sea termodinámicamente más estable. Ciertamente, la estabilidad de plegamiento de una proteína VL de línea germinal no es el único factor, y quizás el más importante, con relación a la propensión amiloide de las cadenas ligeras, incluso para aquellas que pertenecen a la subgrupo $\lambda 6$. La evidencia indica que la amiloidogénesis *in vivo* de las cadenas ligeras resulta de la interacción de varios factores dependientes e independientes de la proteína [63]. Las mutaciones somáticas desestabilizadoras y la capacidad para formar intermediarios parcialmente plegados, muy propensos a agregarse [49, 64], se proponen como factores

claves dependientes de la proteína. Algunos estudios recientes han proporcionado evidencia sobre el efecto modulador desempeñado por el dominio constante de la cinética y termodinámica del plegado de V_L, influyendo de esta manera a la propensión la cadena ligera para formar agregados amiloides [66, 67]. Por lo tanto, las diferencias en la contribución relativa de los diversos factores dependientes de la proteína, combinados con particularidades del contexto biológico donde se secreta la cadena ligera, determinan las amplias diferencias en la propensión para formar agregados amiloides.

CONCLUSIONES

- Concluimos que las proteínas V_L de línea germinal estudiadas difieren unas de otras, en términos de su estabilidad termodinámica y la propensión a formar fibras de tipo amiloide *in vitro*. Este estudio sugiere que la estabilidad de plegamiento de las proteínas V_L de línea germinal contribuye de diferente manera a la amiloidogenicidad de las diferentes familias de cadenas ligeras.
- Este factor parece ser un importante contribuyente a la alta propensión amiloide de las cadenas ligeras pertenecientes al subgrupo $\lambda 6$, pero parece ser irrelevante para explicar la alta prevalencia de las cadenas ligeras derivadas del segmento $\lambda 1$ del gen IGKV1-33 (018) en amiloidosis AL.

BIBLIOGRAFIA

1. Merlini, G., Bellotti, V. (2003). Molecular mechanisms of amyloidosis. *N Engl J Med*; **349**:583-596.
2. Hawkins, P.N. (2002). Serum amyloid P component scintigraphy for diagnosis and monitoring amyloidosis. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. **11**:649-655.
3. Aprile, C., Marinone, G., Saponaro, R., Bonino, C., Merlini, G. (1995). Cardiac and pleuropulmonary AL amyloid imaging with technetium-99m labelled aprotinin. *Eur J Nucl Med*. **22**:1393–1401.
4. Brenner, D.A., Jain, M., Pimentel, D.R., Wang, B., Connors, L.H., Skinner, M., et al. (2004). Human amyloidogenic light chains directly impair cardiomyocyte function through an increase in cellular oxidant stress. *Circ Res*. **94**: 1008–1010.
5. Westermark, P., Benson, M.D., Buxbaum, J.N., Cohen, A.S., Frangione, B., Ikeda, S. et al. (2002). Amyloid fibril protein nomenclature. *Amyloid*; **9**: 197–200.
6. Comenzo, R.L. (2007). Managing systemic light-chain amyloidosis. *J Natl Compr Canc Netw*.**5**:179-187.
7. Westermark, P., et al. (2005): Amyloid: toward terminology clarification. Report from the Nomenclatura Committee of International Society of Amyloidosis. *Amyloid*; **12**: 1–4.
8. Stevens, F.J., Kisilevsky R. (2000). Immunoglobulin light chains, glycosaminoglycans, and amyloid, *Cell. Mol. Life Sci*. **57**(3): 441-449
9. del Pozo-Yauner, L., Ortiz, E., Sánchez, R., Sánchez-López,R., Güereca, L., Murphy, C.L., et al. (2008). Influence of the germline sequence on the thermodynamic stability and fibrillogenicity of human lambda 6 light chains, *Proteins*, **72**:684-692.
10. Chiti, F., C.M. Dobson, (2006). Protein misfolding, functional amyloid and human disease, *Ann. Rev. Biochem.*, **75**:333-366.
11. Khurana, R., Uversky, V.N, Nielsen, L., Fink, A.L. (2001). Is Congo red an amyloid-specific dye?, *The Journal of Chemical Biology*, **276**(25):22715-22721.
12. Wall, J., Murphy, C.L., A. Solomon. (1999). In vitro light-chain fibrillogenesis, *Methods Enzimol*, **309**:204-217.
13. Westermark, G.T, Johnson, K.H, Westermark P. (1999). Staining methods for identification of amyloid in tissue, *Methods Enzimol*, **309**:3-25.
14. Krebs M.R.H, Bromley E.H.C, Donald A.M. (2004). The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localization and implications, *J Struct Bio.*, **149** (1):30-37
15. Fowler, D.M., Koulov, A.V., Balch, W.E., Nelly, J.W. (2007). Functional amyloids –from bacteria to humans, *TIBS*, **32** (5):217-224.
16. Gertz, M.A, Dispenzieri, A. (1999). Amyloidosis *Hematol Oncol Clin North Am*. **13**:1211–1220.

17. Skinner, M., Sanchorawala, V., Seldin, D.C., Dember, L.M., Falk, R.H., Berk, J.L., et al. (2004). High-dose melphalan and autologous stem-cell transplantation in patients with AL amyloidosis: An 8-year study. *Ann Intern Med.* **140**:85–93.
18. Obici, L., Perfetti, V., Palladini, G. (2005). Clinical aspects of systemic amyloid diseases. *Biochim Biophys Acta.* **1753**:11-22.
19. Sanchorawala, V., Wright, D.G., Seldin, D.C., Dember, L.M., Finnk, Falk, R.H., Berk, J., et al. (2001). An overview of the use of high-dose melphalan with autologous stem cell transplantation for the treatment of AL amyloidosis. *Bone Marrow Transplant.* **28**:637–642.
20. Kyle, R.A. (1995). Primary systemic amyloidosis: Clinical and laboratory features in 474 cases. *Semin Hematol.* **32**:45–49.
21. Ramirez-Alvarado, M., De Stigter, J.K., Baden, E.M, Sikkink, L.A., McLaughlin, R.W., Taboas, A.L. (2007). Immunoglobulin Light Chain and Systemic Light-Chain Amyloidosis. *Protein Misfolding, Aggregation, and Conformational Diseases, Part B: Molecular Mechanisms of Conformational Diseases.* Springer Science+Business Media, LLC; New York; 183-197.
22. Solomon, A., Weiss, D.T. (1995). Protein and host factors implicated in the pathogenesis of light chain amyloidosis (AL amyloidosis). *Amyloid: Int J Exp Clin Invest.* **2**:269–279.
23. Abraham, R.S., Ballman, K.V., Dispenzieri, A., Grill, D.E., Manske, M.K., Price-Troska, T.L., et al. (2005). Functional gene expression analysis of clonal plasma cells identifies a unique molecular profile for light chain amyloidosis. *Blood;* **105**:794–803.
24. Comenzo, R.L., Wally, J., Kica, G., Murray, J., Ericsson, T., Skinner, M., Zhang, Y. (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. *Br J Haematol.* **106**:744–751.
25. Abraham, R.S., Geyer, S.M, Price-Troska, T.L., Allmer, C., Kyle, R.A., Gertz, M.A., Fonseca, R. (2003). Immunoglobulin light chain variable (V) region genes influence clinical presentation and outcome in light chain associated amyloidosis (AL). *Blood.* **101**:3801–3808.
26. Perfetti, V., Casarini, S., Palladini, G., Merlini, G. (2002). Analysis of V λ -J λ expression in plasma cells from primary (AL) amyloidosis and normal bone marrow identifies 3r (λ III) as a new amyloid-associated germline gene segment. *Blood.* **100**:948-954.
27. Wall, J., Schell, M., Murphy, C., Hrnčić, R., Stevens, F.J., Solomon, A. (1999). Thermodynamic instability of human lambda 6 light chains: correlation with fibrillogenicity. *Biochemistry.* **38**:14101–14108.
28. Baden, E.M., Randles, E.G., Aboagye, A.K., Thompson, J.R., Ramirez-Alvarado, M. (2008). Structural insights into the role of mutations in amyloidogenesis. *J Biol Chem;* **283**:30950–30956.
29. Obici, L., Perfetti, V., Palladini, G., Moratti, R., Amerlini, G. (2005). Clinical aspects of systemic amyloid diseases. *Biochim Biophys Acta.* **1753**:11–22.

30. Kyle, R.A., Linos, A., Beard, M.C., Linke, R.P., Gertz, M.A, O'Fallon, M. (1992). Incidence and natural history of primary systemic amyloidosis (AL) in Olmsted County, Minnesota: 1950–1989. *Blood*. **79**:1817–1822.
31. Palladini G, Perfetti V, Merlini G. (2006). Therapy and management of systemic AL (primary) amyloidosis. *Swiss Med Wkly*. **136**:715–720.
32. Giudicelli, V., Chaume, D. & Lefranc, M. P. (2005). IMGT/GENE-DB: a comprehensive database for human and mouse immunoglobulin and T cell receptor genes, *Nucleic acids research*. **33**,D256-261.
33. Retter, I., Althaus, H. H., Munch, R. & Muller, W. (2005) VBASE2, an integrative V gene database, *Nucleic acids research*. **33**,D671-674.
34. Prodromou, C. & Pearl, L.H. (1992). Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis *Protein Eng*. **5**,827-829.
35. Rogers, D.R. (1965). Screening for Amyloid with the Thioflavin-T Fluorescent Method, *American journal of clinical pathology*. **44**,59-61.
36. Wall, J., Schell, M., Murphy, C., Hrcic, R., Stevens, F.J. & Solomon, A. (1999). Thermodynamic instability of human lambda 6 light chains: correlation with fibrillogenicity, *Biochemistry*. **38**, 14101-1418.
37. Gonzalez-Andrade, M., Becerril-Lujan, B., Sanchez-Lopez, R., Cecena-Alvarez, H., Perez-Carreón, J.I., Ortiz, E., Fernandez-Velasco, D.A. & del Pozo-Yauner, L. (2013) Mutational and genetic determinants of lambda6 light chain amyloidogenesis, *FEBS J*. **280**, 6173-6183.
38. Hernandez-Santoyo, A., del Pozo Yauner, L., Fuentes-Silva, D., Ortiz, E., Rudino-Pinera, E., Sanchez-Lopez, R., et al. (2010). A single mutation at the sheet switch region results in conformational changes favoring lambda6 light-chain fibrillogenesis, *J Mol Biol*. **396**,280-292.
39. Baden, E.M., Owen, B.A., Peterson, F.C., Volkman, B.F., Ramirez-Alvarado, M. & Thompson, J.R. (2008). Altered dimer interface decreases stability in an amyloidogenic protein, *J Biol Chem*. **283**,15853-15860.
40. Kabat, E.A. W., T.T.; Perry, H.M.; Gottesman, K.S.; and Foeller, C. (1991) Sequences of proteins of immunological interest in (Services, U. S. D. o. H. a. H., ed), *National Institutes of Health, Bethesda, MD*.
41. Myers, J.K., Pace, C.N. & Scholtz, J.M. (1995). Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding, *Protein science: a publication of the Protein Society*. **4**, 2138-2148.
42. Hammack, B., Attfield, K., Clayton, D., Dec, E., Dong, A., Sarisky, C. & Bowler, B.E. (1998). The magnitude of changes in guanidine-HCl unfolding m-values in the protein, iso-1-cytochrome c, depends upon the substructure containing the mutation, *Protein science: a publication of the Protein Society*. **7**, 1789-1795.
43. 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.
44. Marchalonis, J.J., Kaveri, S., Lacroix-Desmazes, S. & Kazatchkine, M.D. (2002). Natural recognition repertoire and the evolutionary emergence of the combinatorial immune system. *Faseb J*. **16**,842-848.
45. Market, E. & Papavasiliou, F.N. (2003). V(D)J recombination and the

- evolution of the adaptive immune system, *PLOS Biol.* **1**, E16.
46. French, D.L., Laskov, R. & Scharff, M.D. (1989). The role of somatic hypermutation in the generation of antibody diversity, *Science*. **244**, 1152-1157.
 47. Raffin, R., Dieckman, L.J., Szpunar, M., Wunschl, C., Pokkuluri, P.R., Dave, P., Wilkins Stevens, P., Cai, X., Schiffer, M. & Stevens, F. J. (1999) Physicochemical consequences of amino acid variations that contribute to fibril formation by immunoglobulin light chains, *Protein Sci.* **8**,509-517.
 48. Randles, E.G., Thompson, J.R., Martin, D.J. & Ramirez-Alvarado, M. (2009). Structural alterations within native amyloidogenic immunoglobulin light chains, *J Mol Biol.* **389**,199-210.
 49. Marin-Argany, M., Guell-Bosch, J., Blancas-Mejia, L.M., Villegas, S. & Ramirez-Alvarado, M. (2015). Mutations can cause light chains to be too stable or too unstable to form amyloid fibrils, *Protein Sci.***11**,1829-1840.
 50. Blancas-Mejia, L.M., Hammernik, J., Marin-Argany, M. & Ramirez-Alvarado, M. (2015). Differential effects on light chain amyloid formation depend on mutations and type of glycosaminoglycans, *J Biol Chem.* **290**, 4953-4965.
 51. Wall, J.S., Gupta, V., Wilkerson, M., Schell, M., Loris, R., Adams, P., et al. (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.
 52. Dealwis, C. & Wall, J. (2004). Towards understanding the structure-function relationship of human amyloid disease, *Curr Drug Targets.* **5**, 159-171.
 53. Davis, D.P., Gallo, G., Vogen, S.M., Dul, J.L., Sciarretta, K.L., Kumar, A., et al. (2001). Both the environment and somatic mutations govern the aggregation pathway of pathogenic immunoglobulin light chain, *J Mol Biol.* **313**,1021-1034.
 54. Stevens, F.J. (2000). Four structural risk factors identify most fibril-forming kappa light chains, *Amyloid: the international journal of experimental and clinical investigation: the official journal of the International Society of Amyloidosis.* **7**, 200-211.
 55. 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.
 56. Enqvist, S., Sletten, K., Stevens, F. J., Hellman, U. & Westermark, P. (2007). Germ line origin and somatic mutations determine the target tissues in systemic AL-amyloidosis, *PloS one.* **2**, e981.
 57. Abraham, R.S., Geyer, S. M., Ramirez-Alvarado, M., Price-Troska, T.L., Gertz, M. A. & Fonseca, R. (2004). Analysis of somatic hypermutation and antigenic selection in the clonal B cell in immunoglobulin light chain amyloidosis (AL), *Journal of clinical immunology.* **24**,340-353.
 58. Bodi, K., Prokaeva, T., Spencer, B., Eberhard, M., Connors, L. H. & Seldin, D.C. (2009). AL-Base: a visual platform analysis tool for the study of amyloidogenic immunoglobulin light chain sequences, *Amyloid: the international journal of experimental and clinical investigation: the official journal of the International Society of Amyloidosis.* **16**, 1-8.

59. Kim, Y., Wall, J.S., Meyer, J., Murphy, C., Randolph, T.W., Manning, M.C., et al. (2000). Thermodynamic modulation of light chain amyloid fibril formation, *J Biol Chem.* **275**,1570-4.
60. del Pozo-Yauner, L., Wall, J. S., Gonzalez Andrade, M., Sanchez-Lopez, R., Rodriguez-Ambriz, S.L., Perez Carreon, J.I., Ochoa-Leyva, A. & Fernandez-Velasco, D.A. (2014). The N-terminal strand modulates immunoglobulin light chain fibrillogenesis, *Biochem Biophys Res Commun.* **443**,495-499.
61. 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.
62. Solomon, A., Frangione, B. & Franklin, E. C. (1982). 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.* **70**,453-4560.
63. Ramirez-Alvarado, M. (2012) Amyloid formation in light chain amyloidosis, *Current topics in medicinal chemistry.* **12**,2523-2533.
64. Khurana, R., Gillespie, J.R., Talapatra, A., Minert, L.J., Ionescu-Zanetti, C., Millett, I. & Fink, A.L. (2001) Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates, *Biochemistry.* **40**,3525-3535.
65. Klimtchuk, E.S., Gursky, O., Patel, R.S., Laporte, K.L., Connors, L.H., Skinner, M. & Seldin, D.C. (2010). The critical role of the constant region in thermal stability and aggregation of amyloidogenic immunoglobulin light chain, *Biochemistry.* **49**, 9848-57.
66. Blancas-Mejia, L.M., Horn, T. J., Marin-Argany, M., Auton, M., Tischer, A. & Ramirez-Alvarado, M. (2015). Thermodynamic and fibril formation studies of full length immunoglobulin light chain AL-09 and its germline protein using scan rate dependent thermal unfolding, *Biophys Chem.* **207**, 13-20.