

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS.

**Caracterización fisicoquímica del plegamiento del dominio variable de la cadena
ligera lambda VI**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

PRESENTA.

LUIS MIGUEL BLANCAS MEJÍA

El Presente trabajo se realizo bajo la asesoría de Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, en el Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, del departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Comité tutorial:

Dr. Baltazar Becerril Luján

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco

Dr. Armando Gómez-Puyou

Jurado:

PRESIDENTE Dr. Andrés Hernández Arana

VOCAL Dr. Baltazar Becerril Luján

SECRETARIO Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez

SUPLENTE Dr. Enrique García Hernández

SUPLENTE Dr. Hugo Nájera Peña

La realización de este proyecto fue parcialmente apoyada por CONACyT (43592 y 41328), PAPIIT (IN-218707, IN-220707 e IN-81832), Beca para estudios doctorales del Consejo Nacional De Ciencia y Tecnología, CONACyT (18487), Complemento de beca doctoral de la Dirección General de Estudios de Posgrado, DGEP, UNAM y

Agradecimientos.

A toda mi familia, en especial a mi mamá Catalina Mejía Sebastian y a mi papá Luis Gustavo Blancas Reyes por todo su apoyo durante toda mi vida. A mis hermanas Gela, Marce y Paty por soportarme tanto y a mis abuelos, sin ellos no habría sido posible.

A mis jefes, Alejandro Fernández Velasco, por soportarme durante casi 6 años, por su gran apoyo y amistad y a Hugo Nájera Peña por su amistad y por enseñarme casi todo lo que se de equipos, técnicas y fisicoquímica. Al Dr. José Manuel Sánchez-Ruiz, por su apoyo y contribuciones en este proyecto.

Al Doctor Sosa, jefe del mercado negro del laboratorio, y que por culpa de un volado no fue mi asesor. Sin el muchos experimentos habrían tomado mas tiempo y esfuerzo.

A cuatro grandes amigos, sin los cuales no hubiera podido hacer nada de este trabajo: Martin González Andrade, un gran amigo que por más de 10 años me ha ayudado bastante. Luis Tellez, el cual es responsable de la mitad de esa tesis y durante todo el doctorado compartimos penas y glorias. Daniel Silva, que además de darme apoyo computacional, es un gran amigo y anfitrión. Juan Tapia, que donde quiera que este, le agradezco por el apoyo técnico en muchos experimentos.

A los Domínguez: Israel, Oswaldo y Juan Carlos, amigos y compañeros del equipo Boca Jrs. de fútbol de salón, por hacerme mas competitivo. A todos los integrantes de los escorpiones rojos de ingeniería de la UNAM, en especial al Coach Omar, al Capi David, a Ranferi, a Taylor, al conejo y al bufalito, sin ellos hubiera sido muy aburrida mi vida en el doctorado.

A varios amigos que no se donde están en este momento, pero son parte de mi vida: Anita, Carlos Piña, Los Condores Prepa, Dion, Ulises, Cecy, Tania (la chica del messenger), Lucia. A Roci, Inma, David, Luis, Carles y Bertrand, del laboratorio de granada, por su ayuda y amistad, que aunque los conocí poco, los estimo mucho.

A Mercedes González García, Mónica Alcántara Moreno y Lorena De Anda, que cada una en su momento han sido La flor de mis heridas.

A los integrantes del comité tutorial: Dr. Baltazar Becerril Luján, Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco, Dr. Armando Gómez-Puyou. Así como a los integrantes del Jurado: Dr. Andrés Hernández Arana, Dr. Baltazar Becerril Luján, Dra. Georgina Garza-Ramos Martínez, Dr. Enrique García Hernández, Dr. Hugo Nájera Peña por la revisión, comentarios y sugerencias a este trabajo. Ah y se me olvidaba, a Lety Garcia, por su paciencia y apoyo.

A todos ellos y a los que falten...

Gracias.

Tabla de contenido.

Resumen.....	3
Abstract.....	4
Introducción.	5
Plegamiento y estabilidad de proteínas.....	5
Enfermedades asociadas al plegamiento anómalo de proteínas.....	8
Amiloidosis AL.....	10
Estructura de los anticuerpos.	13
Cadenas ligeras.....	15
Objetivos.	18
General.....	18
Particulares.....	19
Materiales y métodos.	19
Purificación y sobreexpresión de 6aJL2.	19
Desnaturalización caotrópica.....	20
Experimentos al equilibrio.	20
Fluorescencia intrínseca.	21
Dicroísmo circular.	21
Propiedades hidrodinámicas.....	22
Experimentos cinéticos.	23
Cinéticas a escala temporal corta.	23
Cinéticas a escala temporal larga.	25
Desnaturalización térmica.....	25
Fluorescencia intrínseca.	25
Calorimetría de barrido diferencial (DSC).	26
Ensayo de fibrilogenesis in vitro.....	27
Resultados.....	29
Desnaturalización caotrópica: Experimentos en escala temporal corta.....	29
Experimentos al equilibrio.....	29

Fluorescencia intrínseca.	29
Dicroísmo circular.	30
Experimentos cinéticos.	32
Desnaturalización caotrópica: Experimentos en escala temporal larga (24 horas)..	35
Experimentos al equilibrio.	35
Fluorescencia intrínseca.	35
Dicroísmo circular.	36
Cinética de formación del intermediario.	39
Propiedades hidrodinámicas.	41
Desnaturalización Térmica.	45
Efecto de la concentración de proteína y reversibilidad.	47
Efecto de la velocidad de barrido.	48
Reversibilidad del intermediario.	52
Formación de fibrillas in vitro.	54
Discusión y conclusiones.	58
Desnaturalización a escala temporal corta: comportamiento de dos estados.	58
Tiempos largos de incubación: Un intermediario fuera de la vía de plegamiento y la formación de fibrillas.	63
Perspectivas.	67
Referencias	68

Resumen.

Las proteínas codificadas por el gen 6a, pertenecientes al dominio variable de las cadenas ligeras λ , están fuertemente asociadas con la acumulación amiloide. La cadena ligera 6aJL2 es una proteína modelo construida a partir de las secuencias de aminoácidos codificadas por las líneas germinales 6a y JL2. En este trabajo, caracterizamos la desnaturalización de 6aJL2 inducida por urea y temperatura. En una escala temporal corta, los experimentos espectroscópicos, hidrodinámicos y calorimétricos fueron consistentes con una transición de dos estados. Además, los valores de ΔG , m y C_m fueron similares a los obtenidos a partir de experimentos cinéticos. En contraste, al incubar las muestras por 24 horas a 37 °C, los datos espectroscópicos, hidrodinámicos y calorimétricos revelaron la presencia de un intermediario parcialmente desplegado fuera de la vía de plegamiento a concentraciones de urea cercanas a la C_m (1.5-3.0 M de urea). Las propiedades hidrodinámicas del intermediario, son consistentes con un intermediario monomérico soluble. Los datos de fibrillogénesis *in vitro* mostraron que en el intervalo de concentraciones de urea en el cual se acumula el intermediario, la extensión de las fibrillas es máxima y el tiempo de retardo de la cinética es mínimo. Estos resultados indican que la formación y/o acumulación del intermediario parcialmente desplegado es un paso crítico para la formación de fibrillas *in vitro*. Ya que a concentraciones de urea cercanas a la C_m el estado nativo y el desnaturalizado están igualmente poblados, proponemos que el intermediario puede formarse a partir de la asociación de estas dos conformaciones.

Abstract.

Proteins encoded by the gene segment 6a of the λ variable light-chain repertoire are strongly associated with amyloid deposition. 6aJL2 is a model protein constructed with the predicted sequences encoded by the 6a and JL2 germ line genes. In this work, we characterized the urea and temperature induced unfolding of 6aJL2. In the short time scale, spectroscopic, hydrodynamic and calorimetric experiments were compatible with a two-state transition. Furthermore, ΔG , m and the midpoint urea concentration obtained from equilibrium experiments were compatible with those obtained from kinetic experiments. In contrast, after incubation for 24 hours at 37 °C, spectroscopic, hydrodynamic and calorimetric experiments revealed the presence of a partially unfolded off-pathway intermediate around the midpoint urea concentration (1.5–3.0 M urea). The hydrodynamic properties of the intermediate were consistent with a soluble monomeric state. In vitro fibrillogenesis assays showed that the maximum growth rate for fibril formation and the minimum lag time were obtained at urea concentrations where the partially unfolded state was populated. This indicates that this partially unfolded state is critical for in vitro fibril formation. The intermediate is formed around the midpoint urea concentration, where the native and unfolded states are equally populated, therefore, we propose that the intermediate may result from the association of the native and unfolded conformers.

Introducción.

Plegamiento y estabilidad de proteínas.

El término “plegamiento de proteínas” se refiere, desde un punto de vista estructural, al proceso mediante el cual las proteínas adquieren una estructura tridimensional específica llamada estructura nativa, la cual está estrechamente relacionada con su función biológica. La formación de la estructura nativa es debida a la interacción entre los grupos funcionales de los aminoácidos de una cadena polipeptídica. Dichas interacciones, relativamente débiles, son los puentes de hidrogeno, interacciones electrostáticas y de van der Waals. En algunos casos también se presentan interacciones de tipo covalente tales como la formación de puentes disulfuro. Lo anteriormente descrito, se refiere a la estructuración de una sola cadena polipeptídica, sin embargo, en una forma más amplia también abarca la interacción entre varias cadenas polipeptídicas formando lo que se conoce como estructura cuaternaria. Este proceso es de hecho una extensión del plegamiento dependiendo del propósito y del modelo de estudio, en ocasiones se hacen distinciones operacionales tales como “oligomerización” para el caso de proteínas con varias subunidades o “ensamblado”, en la formación de capsides virales y complejos proteicos. Durante la segunda mitad del siglo pasado, mediante experimentos de plegamiento/desplegamiento in vitro, Anfinsen¹ demostró que toda la información necesaria para que una cadena polipeptídica adquiriera su conformación nativa se encuentra contenida en la secuencia de aminoácidos. Cabe señalar que lo anterior es una generalización, ya que si bien es cierto que en experimentos in vitro una gran cantidad de proteínas pasan de un estado desnaturalizado a un estado nativo de forma espontánea y

sin ningún tipo de asistencia; In vivo, el plegamiento de varias proteínas es asistido por otras proteínas².

Anfinsen postuló la “hipótesis termodinámica”, en la cual se asume que bajo las condiciones fisicoquímicas correctas, el plegamiento de una proteína al estado nativo de mínima energía es espontáneo y determinado solamente por su secuencia de aminoácidos^{1; 3; 4}. Aunado a esto, la capacidad de las cadenas polipeptídicas de elegir una conformación de manera rápida y espontánea de entre una gran cantidad de posibilidades indica que durante el plegamiento de una proteína, esta sigue de manera preferencial un “camino” de conformaciones hasta alcanzar el estado nativo. A la luz de esta información, surge una serie de preguntas básicas referentes al plegamiento, tales como: ¿Cómo se pliega una proteína? ¿Cuáles son los caminos implicados? ¿Si los hay, qué intermediarios están implicados? ¿Cuál es su cinética?, etc. Es también a partir de esta información que el problema del plegamiento puede ser abordado como un problema termodinámico, de forma similar a una reacción química

Desde un punto de vista termodinámico, el plegamiento de una proteína se puede describir como un equilibrio termodinámico entre diferentes estados con propiedades macroscópicas experimentalmente distinguibles entre sí³⁻⁸. El modelo más sencillo de equilibrio termodinámico es el de dos estados, el cual asume que el proceso de interés puede representarse como:



En el cual las especies "A" y "B" se interconvierten entre sí.

Para el caso de proteínas relativamente pequeñas, esta aproximación generalmente es bastante buena y permite calcular parámetros de estabilidad. Sin embargo, no hay que perder de vista que "estado" en un sentido termodinámico no es sinónimo de "estado" conformacional⁴⁻⁶, específicamente cuando intentemos asociar una estructura definida a un estado termodinámico particular buscando describir los cambios en las fuerzas inter e intramoleculares que expliquen las transiciones entre un estado termodinámico y otro⁴. Así el que un proceso pueda describirse de forma aparentemente adecuada como de dos estados, no necesariamente excluye la presencia de intermediarios, ya que estos pueden presentar propiedades macroscópicas experimentalmente similares⁶.

Por otro lado, es mayor el número de proteínas cuyo plegamiento es un proceso que involucra más de dos estados, tanto estructurales como termodinámicos, en los cuales es posible identificar especies intermedias entre los estados nativo y desnaturalizado. En algunos casos es posible separar y caracterizar dichos intermediarios así como su participación en la vía de plegamiento, sin embargo, en ocasiones dichos intermediarios están fuera de la vía de plegamiento o están involucrados en procesos irreversibles, como por ejemplo, la formación de agregados inespecíficos, conformaciones incorrectas que dificultan la caracterización tanto termodinámica como fenomenológica del proceso de plegamiento^{3; 4; 6; 9-13}, o agregados fibrilares, causantes de un gran número de patologías.

Enfermedades asociadas al plegamiento anómalo de proteínas.

In vivo, una proteína es capaz de plegarse inmediatamente tan pronto como el extremo amino de la cadena polipeptídica recién sintetizada emerge a través del canal del ribosoma, aún cuando puede adoptar su conformación nativa sin la asistencia de ningún otro factor, el medio ambiente en el interior de la célula está densamente poblado por otras moléculas lo cual favorece los procesos de agregación. Por lo tanto, la célula cuenta con diversos mecanismos que previenen las interacciones no productivas, tales como las chaperonas, prolil-cistrans isomerasas, entre otros^{2; 9; 14}.

Estos mecanismos de control, si bien son altamente eficientes en el reconocimiento de proteínas parcial o incorrectamente plegadas, generalmente se encuentran asociados al retículo endoplasmico,² algunas proteínas con conformaciones incorrectas escapan a este “control de calidad”, lo cual generalmente ocasiona un mal funcionamiento en los sistemas biológicos. Una gran cantidad de enfermedades humanas están relacionadas con alteraciones en el plegamiento de las proteínas^{9; 12; 13; 15}.

Algunas de estas enfermedades (p.ej. fibrosis quística¹⁶) se deben simplemente a que las proteínas incorrectamente plegadas son incapaces de realizar su función biológica. En otros casos, las proteínas en conformaciones anormales que escapan a los mecanismos de control de la célula, forman agregados insolubles dentro de las células o en el espacio extracelular.

Un elevado número de patologías, entre las cuales se encuentran el Alzheimer, el Parkinson, las encefalopatías espongiiformes, amiloidosis de cadenas ligeras y algunos

tipos de diabetes de inicio tardío, están directamente asociadas con la acumulación de dichos agregados en algunos tejidos. Una de las características más importantes de la mayoría de estas enfermedades es la formación de agregados fibrilares o placas llamados amiloides. Estos agregados se han encontrado en diferentes órganos como cerebro, corazón, hígado o tejido óseo, dependiendo de la proteína involucrada.

Otra característica que comparten estas distintas patologías y por la cual se agrupan bajo el término “amiloidosis”, es que todas forman agregados estructuralmente semejantes aunque, las características estructurales de las proteínas solubles involucradas van desde proteínas globulares solubles hasta péptidos carentes de estructura definida. Los depósitos amiloides presentan propiedades ópticas características (tales como la birrefringencia) al unir ciertos colorantes como el rojo congo. También comparten características morfológicas (largas estructuras “torcidas”, no ramificadas, con pocos milímetros de diámetro) y un patrón de difracción de rayos X característico de hojas- β cruzadas (figura 1, fibrilla amiloidea), lo cual revela que el núcleo de dichas estructuras está organizado en filamentos de hojas β que corren perpendiculares al eje de las fibrillas

16-21

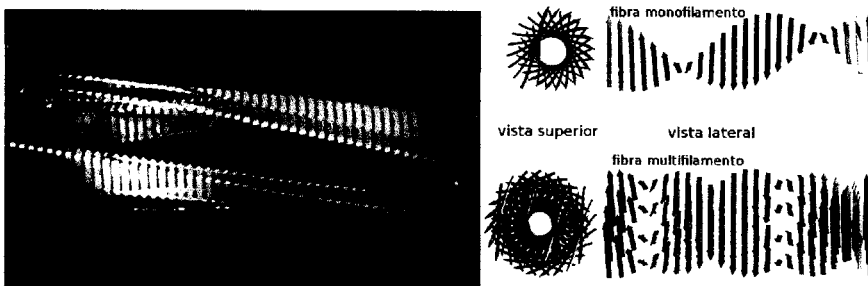


Figura 1. Modelos estructurales de una fibrilla amiloide. Estos modelos^{9 20} se han propuesto a partir de datos de difracción de rayos x de fibrillas amiloides (figras modificadas de las referencias 9 y 20) .

Un aspecto crucial para la formación de fibrillas amiloides es el mecanismo por el cual se ensamblan a partir de sus precursores. En la estructura plegada de las proteínas globulares, la mayor parte de la cadena polipeptídica se encuentra por lo general oculta, para la formación de fibrillas es necesaria la exposición de ciertas regiones. Esto se deduce a partir de experimentos *in vitro* en los cuales el proceso de agregación fibrilar se favorece bajo condiciones en las cuales *in vivo* se desestabiliza el estado nativo y la proteína se encuentra parcialmente desplegada, por ejemplo, bajas concentraciones de desnaturalizantes caotrópicos o extremos de pH^{9; 10; 14; 22-38}.

Amiloidosis de cadenas ligeras o amiloidosis AL.

La amiloidosis AL pertenece a un grupo de al menos 20 enfermedades relacionadas al plegamiento anómalo de las proteínas^{9; 13; 18}; esta enfermedad se caracteriza por la acumulación patológica de agregados proteicos en forma de fibrillas insolubles cuyo componente principal es el dominio variable de las cadenas ligeras (V_L) de las inmunoglobulinas o éste y una pequeña fracción del dominio constante^{39,15; 17; 40}. En la mayoría de los casos, los depósitos amiloides se localizan en dos o más órganos, entre los mas frecuentemente afectados se encuentran los riñones y el corazón, pero el hígado, sistema nervioso periférico y autónomo, tracto gastrointestinal y pulmones también son afectados⁴⁰⁻⁴⁵. No se conocen las bases moleculares que conllevan a esta acumulación en estos tejidos en particular. Aunque se sabe que algunas de las cadenas ligeras amiloidogénicas son capaces de unirse a ciertos componentes de tejidos de una forma tan específica que recuerda al reconocimiento antígeno-anticuerpo⁴⁶. Por lo anterior, la amiloidosis es una enfermedad degenerativa y generalmente fatal para la cual hasta el

momento no se ha desarrollado un tratamiento eficiente. Los pacientes diagnosticados con amiloidosis que no reciben alguna clase de tratamiento, tienen un tiempo de supervivencia de 10 a 14 meses a partir del diagnóstico, en tanto que para los pacientes bajo algún tratamiento es de 24 a 46 meses, dependiendo del tratamiento y los órganos afectados⁴⁵.

Por lo general, la amiloidosis AL está asociada a casos de cáncer en linfocitos B, caracterizados por una sobre expresión de cadenas ligeras monoclonales, las cuales se excretan en forma libre. Sin embargo, no todos los casos de cáncer en linfocitos B se encuentran agregados amiloides. La presencia de cadenas ligeras monoclonales libres en el suero y/o en la orina es relativamente común en individuos mayores de 50 años^{41; 47}, pero solo una fracción menor de ellos sufre de amiloidosis. Estos datos indican claramente que in vivo no todas las cadenas ligeras son amiloidogénicas.

Aunque hasta el momento no es claro el mecanismo molecular ni los factores que modulan la formación de fibrillas amiloides, existen evidencias que indican que una baja estabilidad termodinámica en las cadenas ligeras es uno de los factores principales que promueven el comportamiento amiloidogénico^{29;48-54}, como el hecho de que generalmente las proteínas involucradas en casos de amiloidosis AL son menos estables que sus contrapartes no amiloidogénicas pertenecientes al mismo subgrupo. Con base en datos termodinámicos obtenidos a partir de experimentos de desnaturalización al equilibrio, se ha propuesto una correlación entre una baja estabilidad de los VL amiloidogénicos y grado de fibrilogenidad^{48; 50; 52; 55}. En todos los casos, el plegamiento

del las cadenas ligeras, tanto amiloidogénicas como no amiloidogénicas se ha descrito como un proceso de dos estados y sin evidencia de intermediarios.

Adicionalmente, se ha observado que *in vitro*, bajo condiciones desestabilizantes como temperaturas elevadas, pH extremos y la presencia de concentraciones relativamente bajas de desnaturalizantes químicos como urea o cloruro de guanidina (GuHCl) se promueve la formación de fibrillas amiloides aun en proteínas no amiloidogénicas *in vivo*^{52; 55-57}. En este sentido, se ha estudiado el efecto de agentes desestabilizantes (GuHCl y pH bajos) en la cinética de formación de fibrillas *in vitro*^{30; 35; 57}.

Mediante el uso de diferentes métodos espectroscópicos e hidrodinámicos, se demostró que la fibrilogénesis *in vitro* de la cadena ligera amiloidogénica Sma es promovida por condiciones desestabilizantes, bajo las cuales la proteína adopta una conformación parcialmente desplegada, identificada como un intermediario del plegamiento. Este intermediario presenta una pérdida sustancial de estructura terciaria^{30; 35}. Un segundo intermediario, con un grado de estructuración muy cercano al estado nativo, fue detectado bajo condiciones menos extremas de pH y concentración de GuHCl. Este intermediario forma, de manera preferencial, agregados amorfos.

Esos datos sugieren que es necesario que ocurran rearrreglos estructurales en las cadenas ligeras, formando especies parcialmente plegadas, las cuales actúan como precursores en la fibrilogénesis; sin embargo, no ha sido posible hasta el momento caracterizar a nivel molecular el mecanismo por el cual ocurre la formación de fibrillas. Hasta el momento, solo se ha logrado caracterizar los cambios estructurales globales asociados con la agregación fibrilar^{23; 26; 32; 35-37; 55; 57-63}.

Estructura de los anticuerpos.

Los anticuerpos son glicoproteínas oligoméricas cuya función es la respuesta inmune humoral en vertebrados, son sintetizadas por los linfocitos B en respuesta a un estímulo antigénico. Su secuencia de aminoácidos se distingue por tener una gran variabilidad localizada en zonas específicas, conocidas como regiones determinantes de complementariedad (CDR) las cuales reconocen y unen específicamente a un gran número de antígenos⁶⁴.

Los anticuerpos están constituidos por cantidades equimolares de dos tipos de cadenas polipeptídicas: Las cadenas pesadas de entre 440 a 550 aminoácidos (50-70 kD), que poseen un dominio variable (V_H) y tres dominios constantes (C_{H1} , C_{H2} y C_{H3}) y las cadenas ligeras, de aproximadamente 220 aminoácidos, formadas por un dominio constante (C_L) y un dominio variable (V_L), estos dominios son estabilizados por interacciones covalentes (puentes disulfuro) y no covalentes (puentes de hidrogeno, interacciones de Van der Waals.)⁶⁴. Al interaccionar ambas cadenas, forman una estructura tridimensional similar a una “Y distorsionada” (Figura 2), en la que cada brazo (fragmentos Fab) posee un sitio de unión a antígeno formado por los dominios variables de las cadenas ligera y pesada (V_L y V_H)⁶⁴. Los brazos están unidos al “tallo de la Y” (fragmento Fc) por una región altamente flexible y expuesta, conocida como bisagra.



Figura 2. Estructura tridimensional de las inmunoglobulinas. En color claro se muestran las cadenas ligeras (L) y en color oscuro las cadenas pesadas (H).

Todos los dominios, tanto de las cadenas pesadas como de las ligeras, presentan un plegamiento característico denominado plegamiento β -sándwich, formado por dos hojas β de 3 y 5 hebras, unidas por un puente disulfuro (Fig. 3). Las hebras β que dan la arquitectura característica de los anticuerpos, presentan menor variabilidad y se denominan regiones marco (FR), por otro lado, las asas que conectan a las hebras β forman el sitio de unión al antígeno y son las que presentan la mayor variabilidad en su secuencia⁶⁴.

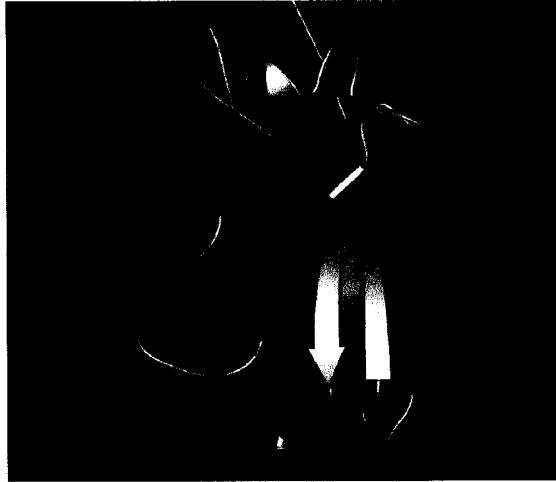


Figura 3. Plegamiento característico de los dominios de las inmunoglobulinas. Se pueden apreciar las dos hojas β unidas por un puente disulfuro.

Cadenas ligeras.

Las cadenas ligeras, están formadas por dos dominios de 107 aminoácidos cada uno. La porción N-terminal (dominio variable) es altamente variable con un total de 75-77 aminoácidos sustituibles (con un 70% de variabilidad) en tanto que la porción C-terminal (dominio constante) está conservada para cada grupo. Cuatro residuos de cisteína, dos en la zona variable y dos en la constante, originan puentes disulfuro que estabilizan cada dominio⁶⁴. El dominio variable (V_L) de las cadenas ligeras está relacionado al reconocimiento y unión de antígenos durante la respuesta inmune, su alta variabilidad amplía el rango de reconocimiento, en tanto que el dominio constante cumple funciones estructurales.

En general los V_L presentan un triptofano conservado en la posición 35, el cual está en contacto con el puente disulfuro que une a las dos hojas- β ; debido a esto, la señal de fluorescencia de este triptofano está apagada en el estado nativo, la modificación del

ambiente alrededor de este grupo, permite seguir los cambios conformacionales que ocurren durante el proceso de desnaturalización.

Las cadenas ligeras se pueden clasificar de acuerdo a la secuencia de aminoácidos del dominio constante en dos grupos: El grupo lambda (λ) dividido en 6 subgrupos que presentan una cisteína altamente conservada en el C-terminal y el subgrupo kappa (κ) formado por 4 subgrupos que tienen una serina en el C-terminal⁶⁴. Al comparar las secuencias consenso de los distintos subgrupos, éstas difieren considerablemente aunque las secuencias dentro de un mismo grupo están relativamente conservadas. Así, dos cadenas λ de un mismo subgrupo provenientes de distintos vertebrados presentan mayor homología que las cadenas κ y λ de un mismo vertebrado⁶⁵.

A diferencia de otras proteínas asociadas a amiloidosis, las cadenas ligeras de inmunoglobulinas son altamente heterogéneas en secuencia de aminoácidos^{17; 66}. Esta variabilidad resulta principalmente de la recombinación de segmentos de genes que codifican para las inmunoglobulinas y también de los mecanismos de hipermutación somática que ocurren en el sistema inmunológico para crear un repertorio de anticuerpos diverso⁶⁷.

En todas las células del organismo excepto en los linfocitos B, los segmentos génicos que codifican las regiones variables de las inmunoglobulinas se encuentran muy separados en el genoma. La aproximación de estos genes se produce en la médula ósea durante el proceso de maduración de los linfocitos B y tiene lugar por un proceso de recombinación entre los diferentes segmentos génicos denominado recombinación somática. Los genes o líneas germinales que codifican para los distintos tipos de cadenas ligeras están

codificados por los segmentos génicos V-J yuxtapuestos, que codifican para el dominio variable y el de unión respectivamente. El dominio constante está codificado por el segmento C.

En el humano existen 40 genes κ y 31 genes λ que codifican para los dominios variables, los cuales se clasifican en seis subgrupos κ y diez λ (de acuerdo con la base de datos de inmunoglobulinas, <http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk>). Dos genes VL, el 6a y el 3r, fueron identificados como precursores de más del 50% de las cadenas ligeras reportadas en casos de amiloidosis AL^{40; 68; 69}. Estos datos contrastan fuertemente con su baja frecuencia en el repertorio de anticuerpos en individuos sanos⁶⁹ (2% y 8% respectivamente). De manera similar, el par de segmentos génicos de tipo k 8 y 18 están sobre representados en amiloidosis AL^{40; 69; 70}. Hasta el momento se desconoce el origen de la asociación entre estos genes y la amiloidosis, pero todo indica que la secuencia codificada por estos genes tiene una predisposición intrínseca para la formación de amiloides. El gene 6a es el único miembro del subgrupo lambda 6⁷¹ relacionado con amiloidosis. Sorprendentemente sólo se conoce una cadena ligera lambda 6 relacionada a un caso de mieloma múltiple que no forma agregados amiloides in vivo⁶⁸.

Todos los datos anteriormente descritos sugieren que, en el caso particular de la amiloidosis AL relacionada con el subgrupo $\lambda 6$, la alta predisposición de dicho subgrupo a formar fibrillas amiloides es una característica intrínseca de la línea germinal y que dicha predisposición es debida principalmente a una baja estabilidad termodinámica del estado nativo, facilitando la formación de especies parcialmente plegadas bajo

condiciones poco desestabilizantes, las cuales actúan como precursores en la formación de fibrillas amiloides in vivo.

En un trabajo previo, se estudió la estabilidad de la cadena ligera 6aJL2 usando cloruro de guanidina como agente caotrópico. En este trabajo, se encontró que 6aJL2 es más estable que las proteínas del subgrupo lambda 6 obtenidas de pacientes con mieloma múltiple, tanto amiloidogénicas (Wil, $\Delta\Delta G = 9.2 \text{ kJ mol}^{-1}$) como no amiloidogénicas (Jto, $\Delta\Delta G = 3.7 \text{ kJ mol}^{-1}$)⁵³. Estos datos sugieren que, la alta predisposición de las cadenas ligeras del subgrupo $\lambda 6$ a formar agregados amiloides in vivo, no se puede atribuir solamente a una baja estabilidad termodinámica de la línea germinal, sino que otros factores además de la estabilidad gobiernan el proceso de agregación amiloide.

Con la finalidad de obtener una descripción completa del patrón de plegamiento de la línea germinal y su relación con la formación de fibras amiloides in vivo, en este trabajo se caracterizó el proceso de plegamiento/desplegamiento desde un punto de vista termodinámico y cinético usando urea y/o temperatura como agentes perturbantes, así como la existencia y participación de especies o intermediarios parcialmente plegados en el proceso de fibrilogénesis in vitro.

Objetivos.

General.

Caracterizar termodinámica y cinéticamente el patrón de plegamiento del dominio variable de la cadena ligera λVI (rV_L6aJL2) y estudiar la relación entre el plegamiento y la fibrilogénesis.

Particulares.

* Cuantificación de la estabilidad conformacional (ΔG) de rV_L6aJL2 a partir de experimentos de desnaturalización cinéticos y al equilibrio con urea y temperatura.

* Detección y caracterización de posibles intermediarios en la vía de plegamiento

* Relacionar la presencia de intermediarios en el plegamiento con la formación de fibrillas.

Materiales y métodos.

El extracto de levadura y la triptona se obtuvieron de Difco. Los demás reactivos se obtuvieron de Sigma-Aldrich. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico y el agua desionizada fue grado Mili Q.

Purificación y sobreexpresión de 6aJL2.

La producción, expresión y purificación de la proteína recombinante 6aJL2 se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Pozo et al⁵³. El amortiguador de trabajo empleado durante la purificación fue fosfato de sodio 50 mM, NaCl 100mM pH 8.0. De forma resumida, la proteína recombinante 6aJL2 se purificó de células de *E.coli* BL21 transformadas con el plásmido *pSynI-6aJL2*. La proteína sobre expresada se extrajo del periplasma usando una solución de sacarosa al 20 % peso/volumen, 0.1 M Tris, 0.1 M EDTA (pH 8.0), seguida de un choque osmótico usando agua destilada fría.

El sobrenadante se concentró por ultrafiltración usando una membrana de corte de 10 kDa y cargado en una columna de exclusión molecular Superdex-75 preparativa

(Amersham Pharmacia). La pureza de la proteína se determinó por electroforesis desnaturizante (PAGE-SDS).

La concentración de proteína se determinó por espectroscopía de absorción de UV usando un coeficiente de extinción $\epsilon_{280\text{nm}} = 1.2327 \text{ mg}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ mL}$, calculado a partir de la secuencia de aminoácidos usando el programa ProtParam, disponible en la página de internet Expasy (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>). La proteína se almacenó a 4 °C.

Desnaturalización caotrópica.

Experimentos al equilibrio.

Para obtener parámetros termodinámicos a partir de experimentos de desnaturalización, se deben cumplir con varios requerimientos, entre los que destacan:

- A) Reversibilidad: Las curvas de plegamiento y desplegado deben ser coincidentes entre sí, esto es, que no se presenten fenómenos de histéresis.
- B) Equilibrio: Las señales observadas deben alcanzar un equilibrio dinámico, es decir, no mostrar cambio detectable en la señal observada con el tiempo.

Debido a esto, se realizaron experimentos preliminares para determinar el tiempo mínimo de incubación para alcanzar el equilibrio, estos experimentos (datos no mostrados), indicaron que el desplegado de 6aJL2 alcanza un equilibrio dinámico en pocos minutos (3 minutos aproximadamente), correspondiente a un tiempo de incubación corto. En contraste, la formación de fibrillas es un proceso muy lento, teniendo lugar en una

escala de tiempo mucho mayor. Con la finalidad de correlacionar los datos de estabilidad con la formación de fibrillas, se realizaron experimentos empleando tiempos de incubación de 3 minutos (que llamaremos experimentos en escala temporal corta) y 24 horas (que llamaremos experimentos en escala temporal larga).

Fluorescencia intrínseca.

Las mediciones de fluorescencia intrínseca se realizaron usando un espectrofluorómetro ISS PC1. La temperatura de las muestras se reguló mediante un sistema Peltier con una incertidumbre de ± 0.02 °C. Todas las muestras ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) se incubaron en amortiguador de fosfatos 50 mM, NaCl 100 mM pH 8.0 conteniendo concentraciones variables de urea a diferentes temperaturas en el rango de 25 a 37 °C. Las muestras se excitaron a 295 nm (0.5 nm de ancho de banda), y el espectro de emisión de fluorescencia se colectó en el rango de 310-410 nm (1.0 nm de ancho de banda). Los datos de fluorescencia a 352 nm se graficaron contra la concentración de urea y a partir de dichos valores se calculó la fracción desnaturalizada.

Dicroísmo circular.

Las mediciones de dicroísmo circular se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-715 usando celdas de cuarzo de 4 mm de paso de luz para los experimentos en el UV cercano o celdas de 1.0 mm de paso de luz para la región del UV lejano. Todas las muestras ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) se incubaron en amortiguador de fosfatos 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8.0, conteniendo concentraciones variables de urea. Los espectros de elipticidad se colectaron en el rango de 250-320 nm para las mediciones en el UV cercano y de 210-

250 nm para el UV lejano. Los valores de elipticidad a 272 y 296 nm se graficaron en función de la concentración de urea y a partir de dichos valores se calculó la fracción desnaturalizada. Estos experimentos se realizaron solamente a 25 y 37 °C.

A partir de los datos espectroscópicos, se calculó el valor de ΔG en ausencia de desnaturalizante mediante un ajuste de regresión no lineal usando un modelo de dos estados entre los estados nativo (**N**) y desnaturalizado (**U**):

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

Donde y_{obs} es la señal observada, y_N y y_U son las señales para los estados nativo y desnaturalizado, respectivamente, $\Delta G^0_{H_2O}$ es la energía libre de desplegamiento en ausencia de desnaturalizante D es la concentración de urea y m es $\delta\Delta G / \delta[D]$. Las líneas base de pre y post transición son descritas por las pendientes del ajuste lineal m_N y m_U respectivamente.

Propiedades hidrodinámicas.

Con la finalidad de determinar el cambio en las propiedades hidrodinámicas durante la desnaturalización caotrópica, se realizaron experimentos de cromatografía de exclusión molecular.

Los experimentos de cromatografía de exclusión molecular se realizaron usando una columna Superdex 75 HR 10/30 analítica (Amersham Pharmacia) acoplada a un sistema FPLC (Amersham Pharmacia) equipado con un detector de absorbancia de UV (280 nm)

y un detector de fluorescencia Waters 747 usando una longitud de onda de 295 nm para la excitación y de 352 nm para la emisión. La temperatura de trabajo (25 o 37 °C) se controló con un baño circulante de agua acoplado mediante una modificación a la chaqueta externa de la columna. La columna se pre-equilibró a la concentración de urea correspondiente antes de cada corrida cromatográfica. Las corridas cromatográficas se realizaron a un flujo de 0.5 mL min⁻¹ inyectando 100 µL de muestra (a 100 mg mL⁻¹ de proteína) en cada ensayo.

Los radios hidrodinámicos (radios de Stokes, R_s) se calcularon mediante la interpolación de los volúmenes de elución de los picos cromatográficos, a una curva de calibración construida usando ocho proteínas con radios hidrodinámicos conocidos tanto en condiciones nativas como desnaturalizantes⁷². Dichas curvas de calibración se realizaron tanto a 25 como a 37 °C en amortiguador y 6.0 M de urea. Los valores de R_s se calcularon con las siguientes ecuaciones:

$$1000/V_e = (47.7 \pm 2.9) + (1.3 \pm 0.1)R_s \quad \text{a } 25 \text{ °C}$$

$$1000/V_e = (48.9 \pm 2.5) + (1.3 \pm .01)R_s \quad \text{a } 37 \text{ °C.}$$

Donde V_e es el volumen de elución a cada concentración de proteína y R_s es el radio de Stokes correspondiente.

Experimentos cinéticos.

Cinéticas a escala temporal corta.

Los experimentos cinéticos se realizaron tanto a 25 como a 37 °C usando un fluorómetro con lector de placas de ELISA de 96 pozos FLUOstar Optima (BMG Labtech) con filtros de 295 nm en la excitación y de 350 nm en la emisión. La concentración final de proteína fue de 100 µg mL⁻¹. Los experimentos de desnaturalización se realizaron a concentraciones de urea mayores que la concentración media de urea (C_m) (3.5 M de urea para 25 °C y 2.5M de urea para 37 °C). Para los experimentos de replegamiento, una solución concentrada de proteína (1.0 mg mL⁻¹) se desnaturalizó en 6.0 M de urea durante 2 horas y se renaturalizó por dilución a concentraciones de urea menores que la concentración media de urea (C_m). Las soluciones de urea y proteína se incubaron previamente a la temperatura correspondiente. La reacción se inicio mediante la adición de la proteína y se siguió el cambio en la señal de fluorescencia durante tres minutos, con mediciones a intervalos de 0.1 segundos. Los trazos cinéticos obtenidos se ajustaron usando un modelo de decaimiento exponencial sencillo¹¹:

$$(2) \quad FI_{obs} = FI_0 + Ae^{-t/\tau}$$

Donde FI_0 es la intensidad de fluorescencia final, A es la amplitud, t es el tiempo y τ es el tiempo de relajación (inverso de la constante de velocidad). A partir de estos datos se obtuvieron gráficos de Chevron y las constantes cinéticas para el desplegamiento en ausencia de desnaturalizante se calcularon usando la siguiente ecuación:

$$(3) \quad \ln k_{obs} = \ln \left(k_f^{H_2O} e^{-mk_f[urea]} + k_u^{H_2O} e^{-mk_u[urea]} \right)$$

Donde, $k_f^{H_2O}$ y $k_u^{H_2O}$ son las constantes cinéticas de plegamiento y desplegamiento en ausencia de desnaturalizante, respectivamente.

Cinéticas a escala temporal larga.

Las cinéticas de desplegamiento en 2.4 M de urea siguiendo el cambio en la señal de fluorescencia intrínseca durante tiempos largos de incubación, se monitorearon usando un espectrofluorómetro ISS PC1. La concentración de proteína para estos experimentos se varió entre 0.5 y 1.0 mg mL⁻¹, por lo tanto el paso de luz de la celda (0.5 ó 1.0 cm) y las rejillas de la excitación (0.5 a 1.0 mm) y emisión (1.0 a 2.0 mm) se modificaron de acuerdo a la concentración de proteína. La iluminación de la muestra se minimizó para evitar el fotoblanqueo.

Desnaturalización térmica.

Fluorescencia intrínseca.

Los experimentos de desnaturalización térmica se realizaron en un espectrofluorómetro ISS PC1 usando una celda de cuarzo de 500 µL. Los cambios en la señal de fluorescencia intrínseca fueron medidos a una longitud de onda de 352 nm (2 mm de ancho de banda), usando una longitud de onda de excitación de 295 nm (4 mm de ancho de banda). La temperatura se elevó de 25 a 60 °C a una velocidad de 1 °C min⁻¹, seguida por un enfriamiento a 25 °C usando la misma velocidad de barrido. A partir de los datos de fluorescencia se calculó la fracción desnaturalizada tomando en cuenta las líneas base de pre y post transición. Los datos normalizados se analizaron usando el equivalente térmico de la ecuación 1:

$$(4) \quad y_{obs} = \frac{(y_N + m_N T) + (y_U + m_U T) e^{(-\Delta H_m / RT + \Delta H_m / RT_m)}}{1 + e^{(-\Delta H_m / RT + \Delta H_m / RT_m)}}$$

Donde y_{obs} es la señal observada, y_N y y_U son las señales para los estados nativo y desnaturalizado, respectivamente, T es temperatura, T_m es la temperatura media de desnaturalización y ΔH_m es el cambio en la entalpía a la T_m . Las líneas base de pre y post transición son descritas por las pendientes del ajuste lineal m_N y m_U respectivamente.

Calorimetría de barrido diferencial (DSC).

Los experimentos de DSC se realizaron usando un calorímetro de barrido diferencial (VP-Capillary DSC. MicroCal Northampton, MA) a diferentes velocidades de barrido. La concentración de proteína fue de 1.0 mg mL^{-1} en amortiguador de fosfatos 50 mM , NaCl 100 mM pH 8.0 y cantidades variables de urea. Las endotermas se ajustaron usando un modelo de dos estados mediante una regresión no lineal usando la siguiente ecuación⁷³:

(5)

$$Cp_{exc} = [A + B(T - T^0)] + [(C + D(T - T^0)) - (A + B(T - T^0))] \frac{e^{-\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right)}}{1 + e^{-\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right)}} + \frac{\Delta H^2}{RT^2} \cdot \frac{e^{-\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right)}}{\left(1 + e^{-\frac{\Delta H}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m} \right)} \right)^2}$$

Donde T es la temperatura, T^0 es una temperatura de referencia (330 K), T_m es la temperatura media de desnaturalización (definida como la temperatura a la cual la constante de equilibrio para el desplegamiento es igual a uno) y ΔH_m que es el cambio de entalpía de van't Hoff en la T_m . A y C son los valores de capacidad calorífica (Cp) a T^0 , B y D representan las pendientes de las líneas base del estado nativo y desnaturalizado, respectivamente. Esta ecuación desprecia la dependencia de la capacidad calorífica con la temperatura. Por otra parte, el ΔH calorimétrico (ΔH_{cal}) se estimó mediante la integración del área bajo la curva de las endotermas.

Por otra parte, se realizaron experimentos a diferentes concentraciones de proteína (0.3-1.1 mg mL⁻¹) para obtener el valor de ΔC_p de la transición.

Los valores de ΔC_p , ΔH_{cal} y T_m obtenidos de los experimentos de DSC se usaron para estimar la dependencia del ΔG en función de la temperatura usando la siguiente ecuación:

$$(6) \quad \Delta G(T) = \Delta H_m \left(1 - T/T_m\right) - \Delta C_p \left[(T_m - T) + T \ln(T/T_m) \right]$$

Ensayo de fibrilogenesis in vitro.

Los ensayos de fibrilogenesis in vitro se llevaron a cabo siguiendo el aumento en la intensidad de fluorescencia del colorante Tioflavin T (ThT) al unirse a las fibrillas amiloides. Las muestras (200 mg mL⁻¹) se prepararon en amortiguador de fosfatos 50 mM, 100 mM de NaCl, pH 8.0, conteniendo concentraciones variables de urea. Cada medición se realizó por triplicado. Se emplearon dos protocolos: 1) Ensayo de agitación orbital: 250 μ L de solución de proteína conteniendo 10 μ M de tioflavin T preparados en una placa negra de 96 pozos (Corning), sellada con una película plástica de Mylar (Dynex) y cargadas en un fluorómetro de placas (FLUOstar Optima, BMG Labtech) a 37 °C. Las muestras fueron agitadas continuamente de forma orbital, con un diámetro de 1 mm. Los datos de fluorescencia se colectaron a intervalos de 3 minutos usando filtros de 450 nm en la excitación y de 490 nm en la emisión. 2) Ensayo de agitación con barra magnética: se incubaron 6.0 mL de solución en viales de polipropileno de fondo plano y tapa. Las muestras se agitaron continuamente a 250 rpm usando micro barras magnéticas recubiertas con teflón (2 mm x 10 mm) en una parrilla de agitación magnética multipuntos (Variomag) colocada dentro de un incubador a 37 °C. Alícuotas de 100 μ L

se transfirieron a diferentes tiempos a cubetas de poliestireno conteniendo 2.6 mL de ThT 10 μM . La intensidad de fluorescencia se midió en un espectrofluorometro ISS PC1 usando una longitud de onda de excitación de 450 nm (rejillas de 1 mm) y una longitud de onda de emisión de 490 nm (1 mm de slits).

Las constantes de velocidad de crecimiento de las fibrillas se obtuvieron a partir de la pendiente de la región lineal de la fase de crecimiento. El tiempo de retardo en el aumento de la señal de fluorescencia se obtuvo mediante la extrapolación de dicha región lineal a la abscisa.

Los datos, tanto del tiempo de retraso como de la extensión de las fibrillas (y) al variar la concentración de urea (D) se ajustaron usando la siguiente ecuación que describe la fracción mol del intermediario:

$$(7) \quad y = \frac{y_0 \cdot e^{m'[D]/RT}}{1 + e^{m([D]-Cm)/RT}}$$

Donde y_0 es el valor la señal medida, (el tiempo de retardo o el inverso de la velocidad de extensión de las fibrillas) en ausencia de desnaturizante, m y m' son $\delta\Delta G / \delta D$ para la transición del estado nativo al desnaturizado y para la transición del estado nativo al intermediario, respectivamente. La concentración media de desnaturizante (Cm) es el valor de la Cm correspondiente a la transición del estado nativo al desnaturizado. Este modelo asume un equilibrio de tres estados, donde el intermediario no llega a estar nunca significativamente poblado.

Resultados.

Desnaturalización caotrópica: Experimentos en escala temporal corta.

Experimentos al equilibrio.

Fluorescencia intrínseca.

El dominio variable 6aJL2 de la línea germinal presenta un triptofano en la posición 35, el cual está en contacto con un puente disulfuro que une a las dos hojas β , debido a esto la señal de fluorescencia en el estado nativo es mínima (figura 3). Como se mencionó anteriormente, esta característica es compartida por todos los VL. Debido a la ubicación de este residuo, es posible usar el cambio en la señal de fluorescencia como medida de los cambios conformacionales durante la desnaturalización de 6aJL2.

Durante la desnaturalización de 6aJL2 con urea, se observó un incremento en la intensidad de fluorescencia además de un corrimiento hacia el rojo de aproximadamente 24 nm en el máximo del espectro de emisión (figura 4a). Estos cambios reflejan respectivamente el distanciamiento entre el triptofano 35 y el puente disulfuro, así como la exposición de este residuo al solvente. A partir de los datos de intensidad de fluorescencia a 352 nm, se calculó la fracción desnaturalizada de 6aJL2 en función de la concentración de urea y se obtuvieron las curvas de desnaturalización a 25 °C y 37 °C. Bajo las condiciones experimentales ensayadas, el proceso de desplegamiento fue reversible y todas las muestras alcanzan el equilibrio, como puede deducirse de la coincidencia de las curvas de desnaturalización/renaturalización obtenidas después de 3 minutos de incubación.

Las curvas de desnaturalización/renaturalización obtenidas tanto a 25 como a 37 °C, presentaron una sola transición cooperativa. Las curvas se ajustaron correctamente usando un modelo de dos estados (figura 4d).

Dicroísmo circular.

Para confirmar los valores de estabilidad obtenidos por fluorescencia intrínseca, se realizaron experimentos siguiendo el cambio en la señal de dicroísmo circular durante la desnaturalización caotrópica.

El espectro de dicroísmo circular en el UV-cercano (250-320 nm) de la proteína nativa presento dos bandas bien definidas a $\lambda = 272$ nm y $\lambda = 296$ nm, las cuales corresponden a residuos aromáticos (figura 4b, línea continua).

En la región del UV-lejano (210-250 nm), se observó un mínimo a 217 nm. Dicho espectro es consistente con lo esperado para una estructura de hoja β -antiparalela. Se observó además un pequeño hombro a 230 nm (ver recuadro en la figura 3b, símbolos cerrados), el cual es producto de interacciones aromáticas.

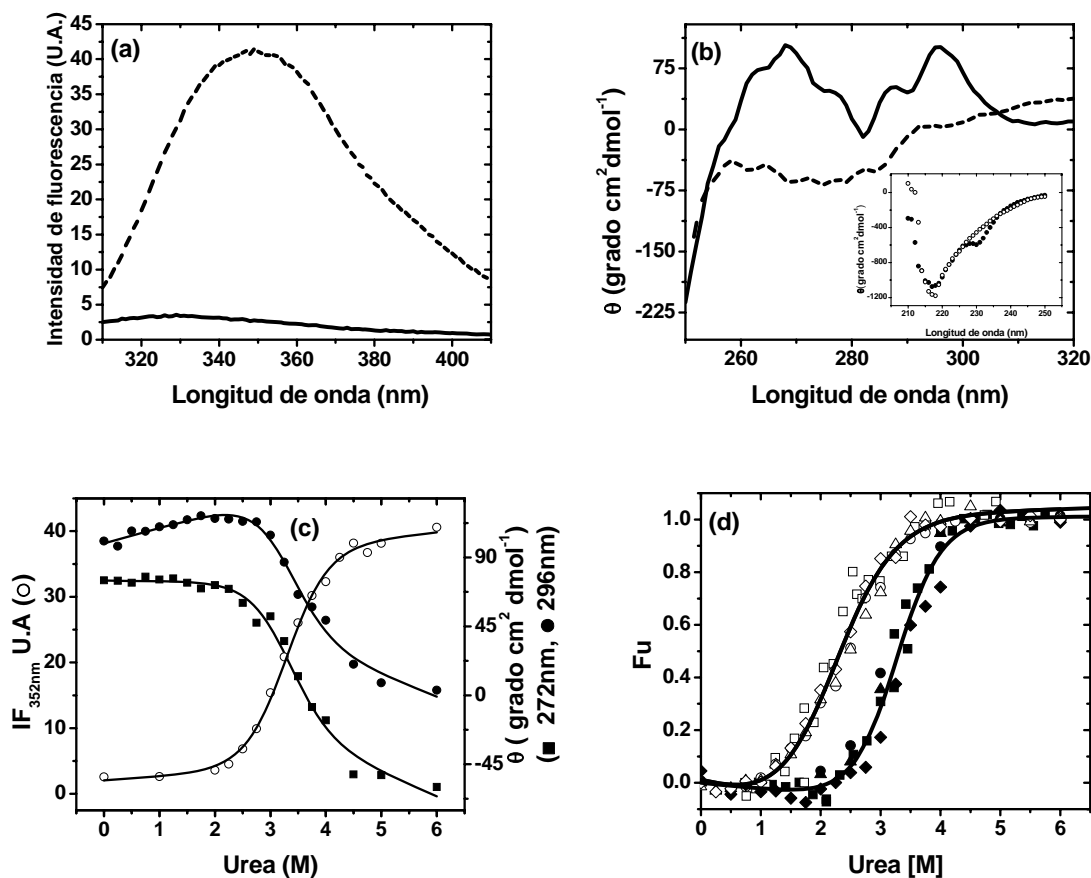


Figura 4. Propiedades espectroscópicas y Desnaturalización/renaturalización de 6aJL2 en urea.

Espectros de fluorescencia intrínseca (a) y dicroísmo circular en el UV-cercano (b) de 6aJL2 en amortiguador de fosfatos pH 8.0 (líneas continua) y en amortiguador de fosfatos con urea 6.0 M pH 8.0 (líneas discontinuas). La concentración de proteína fue de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ y $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ para los paneles a y b respectivamente. El recuadro en el panel b se muestran los espectros en el UV-lejano para la proteína en 0 M (círculos llenos) y 6.0 M de urea (círculos vacíos). El panel c muestra los datos del cambio en la señal de dicroísmo circular a 272 nm (cuadros), 296 nm (círculos llenos) y fluorescencia intrínseca a 352 nm (círculos vacíos) para 25 °C. (d) Curvas de desnaturalización de 6aJL2 seguidas por intensidad de fluorescencia. Los símbolos llenos representan los datos a 25 °C y los símbolos cerrados los obtenidos a 37 °C, tanto para el desplegamiento (círculos) como para el replegamiento (triángulos). Las líneas continuas representan el ajuste global de los datos de fluorescencia y dicroísmo circular usando un modelo de dos estados (ecuación 1, ver tabla 1).

Durante la desnaturalización, se observó la disminución de las bandas observadas en el UV-cercano (Figura 4b, líneas discontinuas), sin embargo, en la región del UV-lejano, solo se observó la desaparición del hombro a 230 nm, sin embargo dicho cambio fue muy pequeño como para seguir la desnaturalización (figura 4b recuadro, símbolos vacíos).

Las curvas de desnaturalización tanto a 25 como a 37 °C, obtenidas de los datos a 272 y 296 nm, presentaron un comportamiento monofásico y fueron coincidentes con las curvas de fluorescencia intrínseca (figura 4b, diamantes), lo cual indica que ambas señales censan cambios conformacionales equivalentes.

Los valores del cambio en la energía libre para el desplegamiento en ausencia de desnaturalizante ($\Delta G_{H_2O}^0$), calculados mediante un ajuste global de los datos de dicroísmo y fluorescencia intrínseca fueron: $\Delta G_{H_2O}^0 = 21.7 \pm 2.0 \text{ kJ mol}^{-1}$, $m = 6.6 \pm 0.6$, $Cm = 3.5 \text{ M}$ a 25 °C y $\Delta G_{H_2O}^0 = 11.2 \pm 1.3 \text{ kJ mol}^{-1}$, $m = 5.1 \pm 0.4$, $Cm = 2.5$ a 37 °C. Cabe señalar que el ΔG obtenido a 25 °C con urea fue similar al reportado usando cloruro de guanidina⁵³ ($\Delta G_{H_2O}^0 = 21.47 \pm 0.67 \text{ kJ mol}^{-1}$), lo que indica que la desnaturalización con ambos agentes caotrópicos es termodinámicamente equivalente.

Experimentos cinéticos.

Una forma de determinar si un modelo de dos estados describe de manera adecuada el desplegamiento de una proteína es comparar los parámetros termodinámicos (ΔG , K_{eq} , y Cm) obtenidos de experimentos al equilibrio con los obtenidos de datos cinéticos. Para una reacción de dos estados, dichos valores deben ser coincidentes.

Las cinéticas de desnaturalización y renaturalización se siguieron por espectroscopia de fluorescencia (ver materiales y métodos). Todos los trazos cinéticos, tanto de desnaturalización como de renaturalización, presentaron una sola fase exponencial a 25 y 37 °C (figura 5a, cinéticas representativas). Las constantes de velocidad de desplegamiento (k_U) y replegamiento (k_f) para cada concentración de urea se obtuvieron del ajuste con la ecuación 2.

Al graficar el $\ln(k)$ en función de la concentración de urea, se obtuvieron gráficos con forma de “V” o de chevron. En los chevrones, la rama de la derecha corresponde a los datos de desnaturalización a altas concentraciones de urea, en tanto que la rama izquierda corresponde a la renaturalización a bajas concentraciones de urea. En dichos gráficos, el mínimo corresponde al punto en el cual la constante de equilibrio (K), definida como el cociente entre las constantes de velocidad de plegamiento y desplegamiento, es igual a 1. Por lo tanto, la concentración de urea en la cual se observa este mínimo, corresponde a la C_m , concentración a la cual $\Delta G = 0$. De la extrapolación de dichas ramas a ausencia de desnaturalizante se obtuvieron los valores de las constantes de desplegamiento y replegamiento en ausencia de desnaturalizante (ecuación 3).

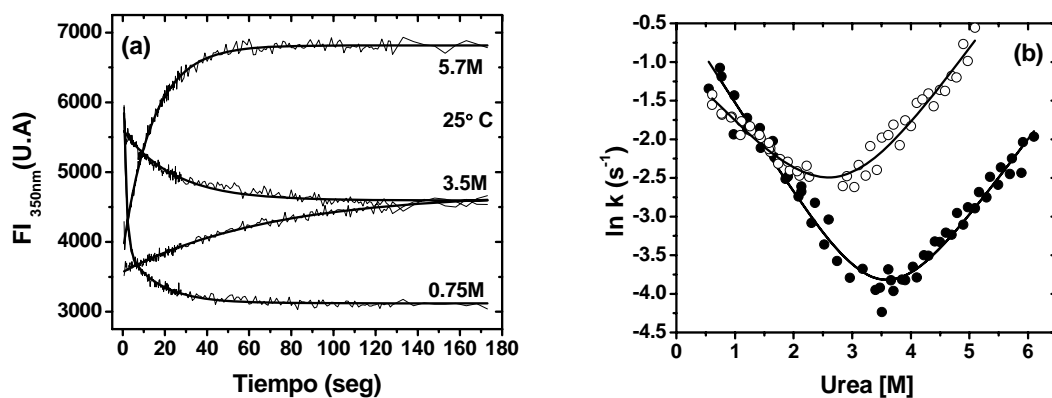


Figura 5. Cinéticas de desnaturalización/renaturalización de 6aJL2 en urea. (a) Trazos cinéticos representativos para la desnaturalización/renaturalización de 6aJL2 a 25 °C. En la grafica se indica la concentración final de urea correspondiente a cada cinética. Las líneas continuas representan las curvas de ajuste usando la ecuación 2. (b) Gráficos de chevron a 25 °C (símbolos llenos) y 37 °C (símbolos vacíos). Las líneas continuas representan las curvas de ajuste usando la ecuación 3.

Tanto a 25 °C como 37 °C los chevrones no presentaron desviaciones de la linealidad o curvaturas, en ninguna de sus ramas (figura 5b). Además, los mínimos observados en los chevrones coinciden con los valores de C_m obtenidos de los experimentos al equilibrio (3.5 M para 25 °C y 2.4 M para 37 °C). Por otra parte, los valores de ΔG calculados a partir del cociente de las constantes cinéticas de desplegamiento y desplegamiento, son similares dentro del error experimental a los calculados a partir de los experimentos al equilibrio (tabla 1).

Los resultados descritos anteriormente confirman que a intervalos de tiempo cortos (correspondientes a 3 minutos de incubación), la desnaturalización de 6aJL2 puede describirse en términos de un modelo clásico de dos estados.

Desnaturalización caotrópica: Experimentos en escala temporal larga (24 horas).

Experimentos al equilibrio.

Los datos presentados en el apartado anterior mostraron que el desplegamiento de 6aJL2 es un proceso reversible, el cual alcanza el equilibrio en una escala temporal del orden de 3 minutos y se ajusta bien a un modelo de dos estados. Sin embargo, como ya se mencionó anteriormente, la formación de agregados fibrilares es un proceso extremadamente lento, del orden de días.

Por lo anterior, con la finalidad de correlacionar de manera más directa los datos de estabilidad con la formación de agregados fibrilares, se realizaron mediciones espectroscópicas usando tiempos de incubación de 24 horas.

Fluorescencia intrínseca.

Las curvas de desnaturalización a 25 °C incubando las muestras durante 24 horas fueron idénticas a las obtenidas con tiempos de incubación de 3 minutos (figura 4d) así como los valores de ΔG y C_m (ver figura 6a, símbolos llenos).

Sin embargo, los experimentos realizados a 37 °C, presentaron un comportamiento significativamente distinto a lo observado a 25 °C. Las curvas de desnaturalización a tiempos de incubación cortos (3 minutos) fueron monofásicas y se ajustaron bien usando un modelo de 2 estados, mientras que las curvas de desnaturalización obtenidas con muestras incubadas durante 24 horas, presentaron dos transiciones cooperativas bien definidas (figura 6b, símbolos llenos), separadas por una meseta en el rango de 1.75-2.73

M de urea. Estos resultados indican la presencia de por lo menos un intermediario parcialmente plegado en la desnaturalización a 37 °C, el cual se forma y/o acumula lentamente.

Además de los experimentos anteriormente descritos, se realizaron experimentos similares a 0, 3, 10, 12, 28, 31 y 34 °C para determinar el efecto de la temperatura en el ΔG . Las curvas de desnaturalización comprendidas entre 0 y 31 °C presentaron un comportamiento similar descrito para a 25 °C, con transiciones monofásicas sin evidencia de intermediarios. Las curvas de desnaturalización se ajustaron correctamente a un modelo de dos estados. Por otra parte la curva de desnaturalización a 34 °C presentó un comportamiento más parecido al observado a 37 °C (figura 6c). Aunque esta transición no presenta un comportamiento bifásico tan marcado como el observado a a 37 °C, el ajuste con un modelo de dos estados no es adecuado. Con los datos de ΔG correspondientes a las temperaturas en las cuales la desnaturalización sigue un comportamiento de dos estados se construyó la curva de estabilidad de 6aJL2 (figura 11d). Como valor de ΔG correspondiente a 37 °C se usó el estimado a partir de los experimentos a tiempos cortos de incubación.

Dicroísmo circular.

Las curvas de desnaturalización, realizadas a tiempos largos de incubación, mostraron un comportamiento similar al observado por fluorescencia intrínseca en ambas temperaturas. Las curvas de desnaturalización a 25 °C fueron monofásicas y coincidentes tanto con los datos a tiempos cortos de incubación como con las curvas de fluorescencia (figura 6a, símbolos abiertos). En tanto que, al comparar entre tiempos cortos y largos de incubación

a 37 °C, se observó un corrimiento hacia concentraciones de desnaturalizante menores, además de que dichas curvas no fueron coincidentes con las obtenidas por fluorescencia bajo las mismas condiciones (círculos abiertos, figura 6b). Este comportamiento sugiere que el ambiente local del triptofano en el intermediario es más parecido al del estado desnaturalizado que al del estado nativo.

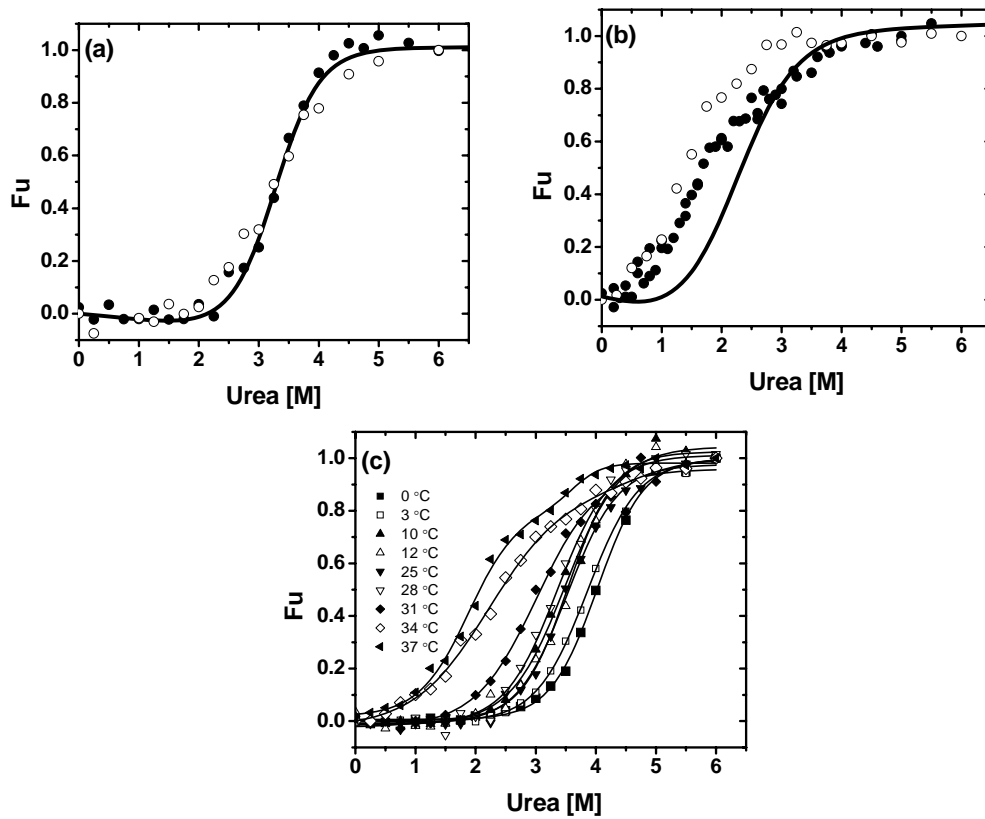


Figura 6. Curvas de desnaturalización de 6aJL2 a tiempos largos de incubación. Los datos de fluorescencia intrínseca (círculos llenos) y dicroísmo circular a 396 nm (símbolos vacíos) se obtuvieron después de 24 horas de incubación a 25 °C (a) y 37 °C (b). Por motivos de comparación se muestran las curvas de ajuste (líneas continuas) de los experimentos a tiempos cortos (ver figura 3d). (c) Experimentos isotérmicos de desnaturalización con urea. De 0 a 25 °C, las transiciones fueron monofásicas y a partir de 34 °C el comportamiento fue bifásico. Las líneas continuas representan las curvas de ajuste, excepto para 34 y 37 °C, que solo se muestran como ayuda visual.

El hecho de que las transiciones observadas con dos técnicas diferentes no fueran coincidentes es una evidencia a favor de la formación de un intermediario durante el desplegamiento de 6aJL2, el cual se forma y/o acumula en una escala temporal relativamente larga.

El corrimiento de las curvas de dicroísmo circular sugiere que el ambiente local de los residuos aromáticos es similar al del estado desnaturalizado. Por otra parte, la F_u calculada en la meseta, usando los datos de fluorescencia intrínseca es distinta a la calculada usando los datos de dicroísmo circular ($F_u\text{-IF} = 0.7$, $F_u\text{-DC} = 0.8$), lo cual sugiere que si bien el ambiente que rodea al triptofano en el intermediario es comparable al del estado desnaturalizado, la distancia entre el puente disulfuro y el triptofano en el intermediario es menor que en el desnaturalizado, por lo que presenta características espectroscópicas consistentes con una especie parcialmente plegada.

Tabla 1. Parametros termodinamicos y cineticos del desplegamiento de 6aJL2.

Temperatura (K)	298.15	310.15
RTm_f (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	2.9 ± 0.1	2.1 ± 0.2
RTm_u (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	2.5 ± 0.2	2.7 ± 0.2
k_f (sec ⁻¹)	7.1x10 ⁻¹ ± 7.0x10 ⁻²	3.4x10 ⁻¹ ± 3.2x10 ⁻⁴
k_u (sec ⁻¹)	3.2x10 ⁻⁴ ± 1.1x10 ⁻⁴	2.4x10 ⁻³ ± 7.3x10 ⁻⁴
ΔG_U (kJ mol ⁻¹) ^a	19.0 ± 0.5	12.8 ± 0.3
m_{cin} (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹) ^a	5.39	4.71
ΔG_U (kJ mol ⁻¹) ^b	21.7 ± 2.0	11.2 ± 1.3
m_{eq} (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹) ^b	6.6 ± 0.6	5.1 ± 0.4

a. cinetico, b. equilibrio

Cinética de formación del intermediario.

Las propiedades espectroscópicas del intermediario, así como la formación y/o acumulación observada a tiempos largos de incubación y su dependencia con la concentración de proteína, se estudiaron mediante experimentos cinéticos siguiendo el cambio en la señal de fluorescencia intrínseca. Las muestras incubadas a 37 °C en 2.4 M de urea mostraron por lo menos dos procesos cinéticos con escalas temporales claramente diferentes: Un proceso rápido (300 seg.) caracterizado por un incremento mono-exponencial de la señal de fluorescencia (figura 7a, recuadro), el cual fue independiente de la concentración de proteína y un proceso lento, el cual varía con la concentración de proteína (figura 7a). Para descartar que el incremento en la señal de fluorescencia fuera ocasionado por fenómenos de dispersión de luz, se tomó espectros de fluorescencia al inicio, así como a los 3 minutos y 24 horas de medición, los espectros normalizados (figura 7b y 7c) no muestran señales de dispersión.

La fase rápida de la reacción corresponde a la desnaturalización de dos estados observada en los experimentos espectroscópicos a tiempos cortos (ver figura 4d). La fase lenta corresponde a la formación y acumulación del intermediario. La dependencia de esta fase con la concentración de proteína sugiere que el paso lento de la reacción podría involucrar fenómenos de asociación

La fase lenta de las cinéticas mostró un comportamiento ligeramente sigmoideo, lo cual dificultó la estimación del orden de reacción. Como una primera aproximación, el incremento en la señal de fluorescencia observado en esta escala temporal se ajustó a una línea recta y se efectuó un análisis de velocidades iniciales. El orden de reacción esperado

para un proceso bímolecular (asociación) es de 2. Sin embargo, el orden de reacción obtenido del gráfico \ln velocidad vs \ln [proteína] (figura 7b) fue de 0.29, lo cual sugiere que el paso limitante en la reacción es un evento unimolecular.

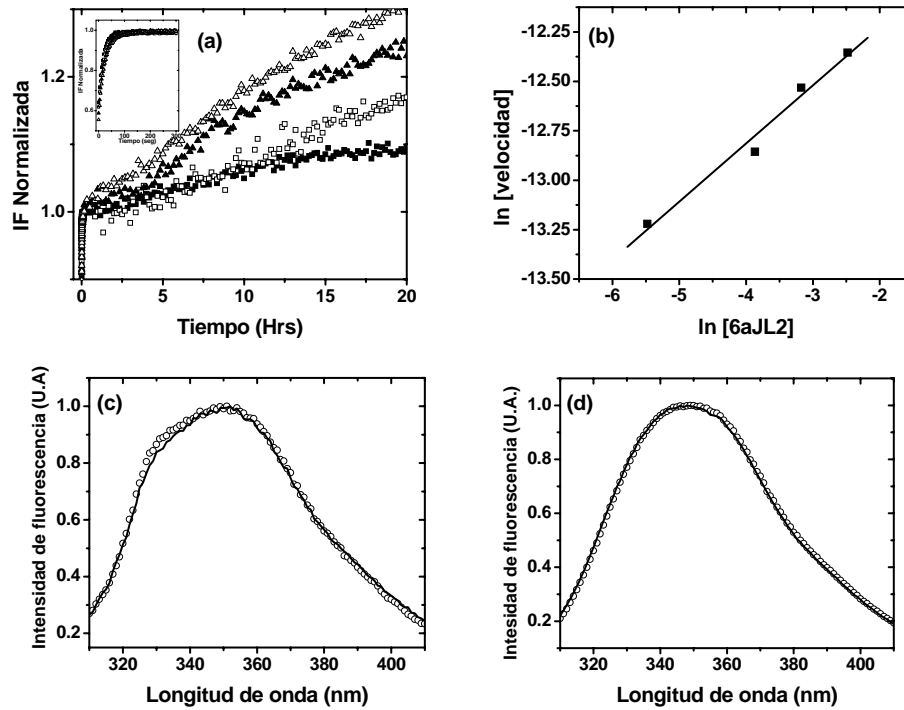


Figura 7. Cinética de formación/acumulación del intermediario. (a) Cambio en la intensidad de fluorescencia intrínseca de 6aJL2 incubadas en 2,4M de urea a 37 °C. Las concentraciones de proteína usadas fueron: 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (cuadrados llenos), 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (cuadrados vacíos), 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (triángulos llenos) y 1 mg mL^{-1} (triángulos vacíos). En el recuadro se muestran los primeros 300 segundos. Los valores de tiempo de relajación calculados usando la ecuación de decaimiento exponencial fueron $\tau = 17.4 \pm 0.3$ s para 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $\tau = 19.8 \pm 0.3$ s para 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $\tau = 23.3 \pm 0.3$ s para 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y $\tau = 24.5 \pm 0.3$ s para 1.0 mg mL^{-1} . Los datos correspondientes a la fase lenta (>300 segundos) de la reacción se ajustaron a una recta y el \ln de las pendientes se graficó vs. \ln de la concentración de proteína (Panel b). Los espectros de emisión de fluorescencia a los 3 minutos (círculos abiertos) y 24 horas (línea continua) correspondiente a 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (c) y 1.0 mg mL^{-1} (d) se normalizaron con propósitos comparativos. No se observaron efectos de dispersión de luz asociados a la formación de agregados insolubles.

Propiedades hidrodinámicas.

Para determinar los cambios en las propiedades hidrodinámicas de 6aJL2 asociadas a la desnaturalización, se realizaron cromatografías de exclusión molecular en presencia de diferentes concentraciones de urea. Como primer experimento, muestras pre-incubadas durante 3 minutos ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína) a diferentes concentraciones de urea, se inyectaron a una columna Superdex-75 equilibrada a la misma concentración de desnaturalizante. El perfil de elución de las muestras se siguió tanto por absorción de UV como por fluorescencia intrínseca a 352 nm (ver materiales y métodos).

Para todas las concentraciones de urea ensayadas, tanto a 25 como a 37 °C, se observó solo un pico cromatográfico (figura 8a y b) independientemente de la señal medida. Los picos cromatográficos seguidos por fluorescencia mostraron un aumento en la intensidad de fluorescencia, así como un corrimiento hacia volúmenes de elución menores al incrementar la concentración de urea. Un corrimiento similar se observó mediante absorción de UV a 280 nm, sin embargo la intensidad de la señal fue constante. Este comportamiento es consistente con un equilibrio clásico de dos estados donde la interconversión entre el estado nativo y el desnaturalizado es más rápido que la corrida cromatográfica⁷². El cambio en el radio hidrodinámico en función de la concentración de urea se muestra en las figura 9a y b (símbolos llenos). Los R_s calculados para los estados nativo (11.89 Å para 25 °C y 10.92 Å para 37 °C) y desnaturalizado (27.12 Å para 25 °C y 26.14 Å para 37 °C) fueron similares en ambas temperaturas, observándose un incremento de 20Å al pasar de 0 M a 6.0 M de urea.

En un segundo experimento, las muestras se incubaron durante 24 horas antes de su inyección a la columna. Bajo estas condiciones, tal como se esperaba, las diferencias entre los experimentos a tiempos cortos y largos de incubaciones fueron más evidentes a 37 °C que a 25 °C.

A 25 °C los cromatogramas correspondientes al intervalo de 2.75-3.25 M de urea presentaron dos picos cromatográficos (figura 8c), indicando la presencia de un intermediario. Los radios hidrodinámicos calculados indican que las especies en equilibrio tienen un grado de compactación mayor que el del estado desnaturalizado, sin embargo, están lo suficientemente expandidos como para ser conformaciones nativas. Mediante la deconvolución de los picos cromatográficos se calculó el volumen de elusión de cada especie y usando estos valores se calcularon los R_s correspondientes. El cambio en el radio hidrodinámico en función de la concentración de urea se muestra en la figura 9a (símbolos vacíos).

Al comparar estos datos con los obtenidos a tiempos cortos de incubación, se observó que el componente principal de los cromatogramas presentó un comportamiento similar en ambos casos, la única diferencia radica en la presencia de una especie extra.

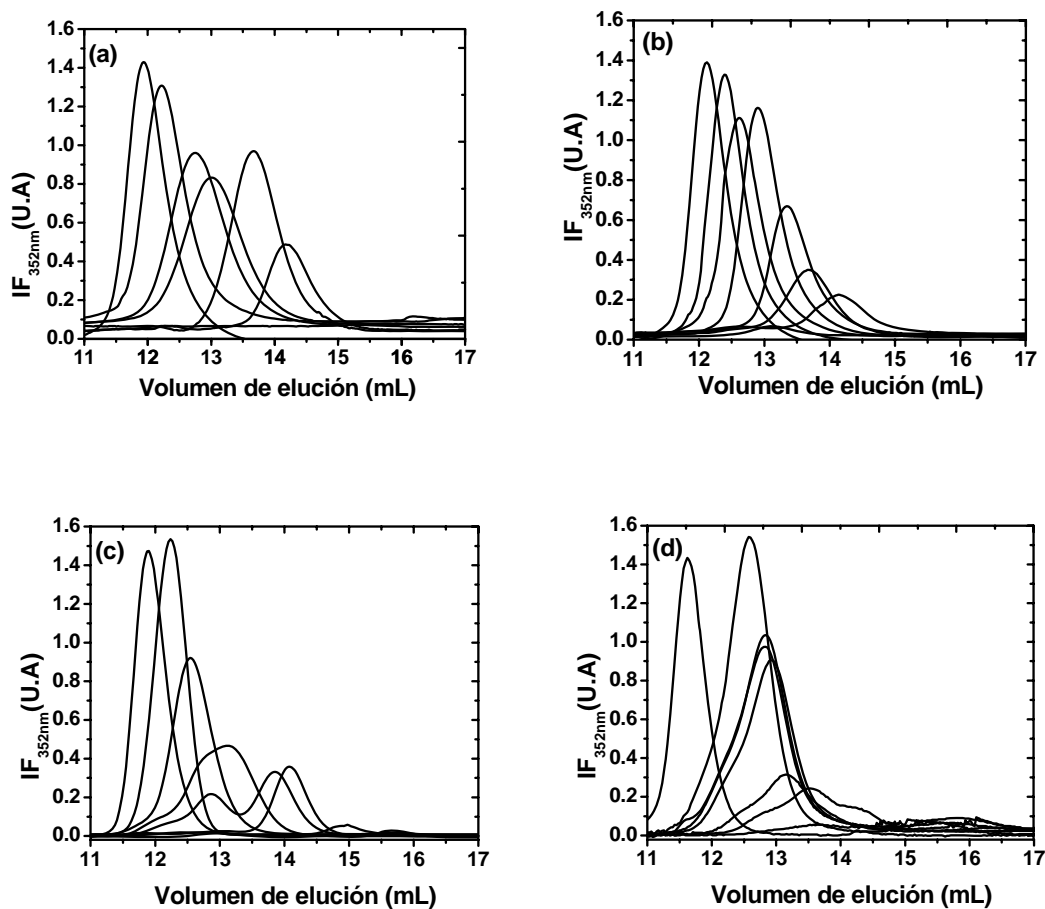


Figura 8. Experimentos cromatográficos en presencia de urea. En todos los casos la columna fue equilibrada en las condiciones indicadas para cada panel. Para el panel (a) 25 °C y 3 minutos de incubación. Las concentraciones de urea fueron (de derecha a izquierda) 0.0M, 1.0M, 2.4M, 3.0M, 3.5M, 3.75M, 4.5M y 5.5M. Para el panel (b) fueron 37 °C y 3 minutos de incubación. Las concentraciones usadas fueron 0.0M, 1.0M, 2.13M, 2.4M, 3.0M, 3.75M, 4.5M y 5.5M. Para el panel (c) fueron 25 °C y 24 horas de incubación. Las concentraciones usadas fueron 0.0M, 1.0M, 2.13M, 2.4M, 3.0M, 3.75M, 4.5M y 6.0M. Para el panel (d) 37 °C y 24 horas, Las concentraciones usadas fueron 0.0M, 1.0M, 1.75M, 2.0M, 2.25M, 2.75M, 3.25 M y 6.0M. Los cromatogramas correspondientes a 0.0M de urea no son visibles en esta escala.

Por otra parte, a 37 °C, las diferencias en los R_s obtenidos de las muestras incubadas durante tiempos cortos y largos fueron significativamente diferentes. En el intervalo de

0.5 a 3.0 M de urea, los valores de R_s calculados fueron mayores que los obtenidos a 25 °C, lo que indica un mayor grado de desplegamiento al aumentar el tiempo de incubación. La gran asimetría de los picos cromatograficos en el intervalo de 1.0 a 2.0 M de urea se debe a la contribución de más de una especie a la señal observada.

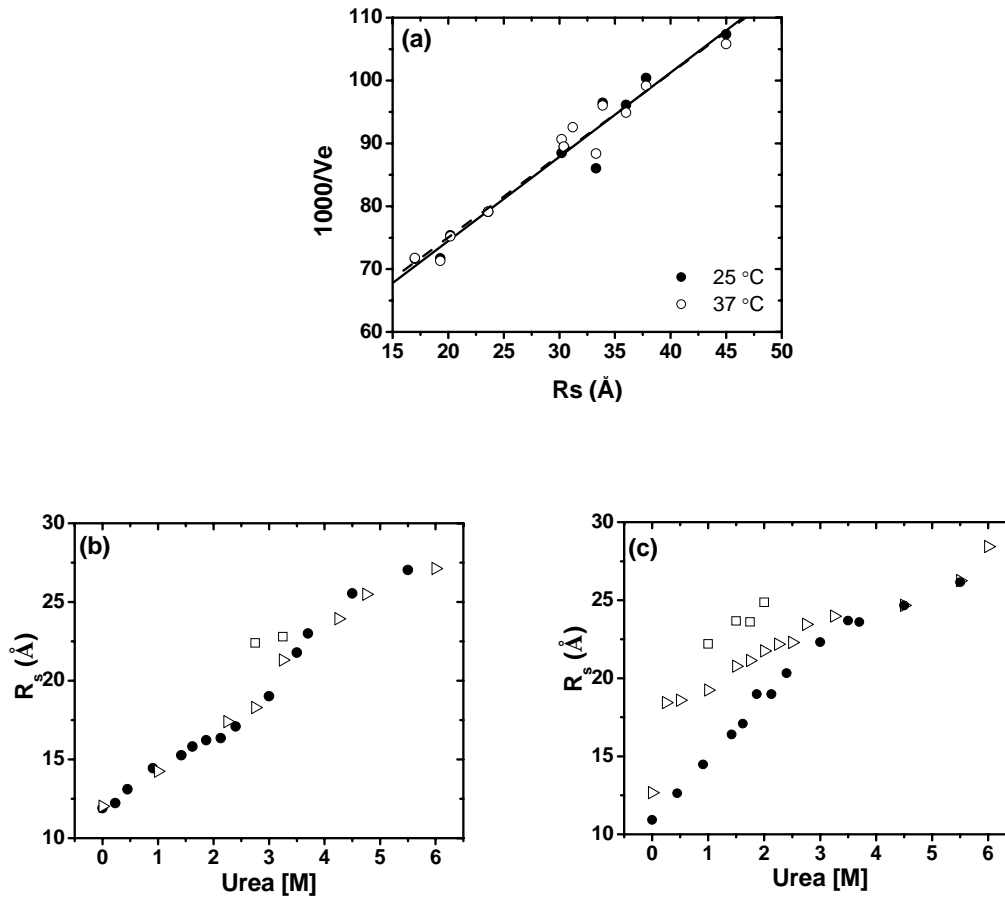


Figura 9. Cambio en el radio hidrodinámico de 6aJL2 en función de la concentración de urea. (a) Curva de calibración de la columna Superdex-75 (ver materiales y métodos). Los paneles (b) y (c) muestran el radio hidrodinámico (R_s) en función de la concentración de urea para muestras incubadas a 25 y 37 °C respectivamente. Los símbolos llenos representan el R_s de las muestras incubadas por 3 minutos y los símbolos abiertos representan los valores de las muestras incubadas 24 horas. Los triángulos representan los valores de los picos de mayor área relativa y los cuadros representan los picos de menor área relativa.

Estos cromatogramas recibieron un tratamiento similar al anteriormente descrito, el cambio en el R_s durante la desnaturalización se muestra en la figura 9b.

El análisis de los cromatogramas muestra que el intermediario observado por fluorescencia a tiempos prolongados de incubación (figura 6b) tiene un R_s aparente entre 22 y 23 Å (figuras 9a y b, cuadros), intermedio entre los correspondientes a los estado nativo y desnaturalizado.

Las muestras no presentaron agregación visible y los perfiles hidrodinámicos descartan la presencia de agregados insolubles de alto peso molecular, por otra parte el radio hidrodinámico calculado a 6.0 M de urea concuerda con el esperado para un monómero expandido⁷⁴.

Desnaturalización Térmica.

Con la finalidad de obtener una caracterización termodinámica completa del proceso de desplegamiento de 6aJL2, se realizaron experimentos de desnaturalización térmica. Como primera aproximación, se realizaron experimentos de desnaturalización térmica siguiendo el cambio en la señal de fluorescencia intrínseca.

Los datos de intensidad de fluorescencia, tanto en el sentido de la desnaturalización como de la renaturalización, mostraron una transición monofásica y reversible (figura 10a). No se observó histéresis ni agregación visible, lo cual confirma que a la velocidad de calentamiento empleada (1 K min^{-1}), las muestras alcanzan el equilibrio térmico. A partir de un ajuste global de los datos de desnaturalización y renaturalización usando el equivalente térmico de la ecuación de dos estados o ecuación de van't Hoff (ver

materiales y métodos, ecuación 4), se obtuvieron los siguientes valores para el ΔH van't Hoff (ΔH_{VH}) y para la T_m : $\Delta H_{VH} = 376.1 \pm 6.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ y $T_m = 323.2 \pm 1.0 \text{ K}$.

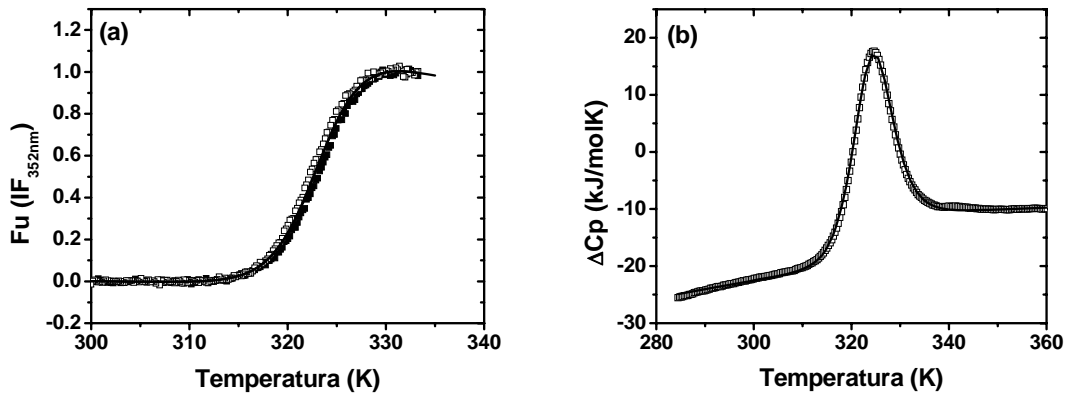


Figura 10. Desnaturalización térmica de 6aJL2. (a) Los datos de intensidad de fluorescencia para la desnaturalización y renaturalización de 6aJL2 (símbolos llenos y vacíos, respectivamente) se obtuvieron usando una velocidad de calentamiento de 1 K min^{-1} . Las líneas continuas representan la curva de ajuste global usando la ecuación 4. Los valores calculados fueron: $\Delta H_{VH} = 376.1 \pm 6.9 \text{ kJ/mol}$ y $T_m = 323.2 \pm 1.0 \text{ K}$. (b) Experimento representativo de DSC a 1.0 mg mL^{-1} de proteína usando una velocidad de barrido de 2.5 K min^{-1} . La línea continua representa el ajuste usando la ecuación 5. Los valores calculados fueron: $\Delta H_{cal} = 336.2 \pm 41.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ y $T_m = 324.2 \text{ K}$.

Aún cuando es posible estimar parámetros termodinámicos tales como el ΔH_{VH} mediante métodos indirectos, como el cambio en las propiedades espectroscópicas durante la desnaturalización de proteínas a altas temperaturas, es importante recordar que para realizar un análisis de van't Hoff es necesario asumir un modelo de dos estados. Las técnicas calorimétricas proporcionan información termodinámica fidedigna acerca del proceso de desnaturalización ya que miden de manera directa los cambios de energía asociados al proceso de desnaturalización sin asumir ningún modelo.

Otra de las bondades de los experimentos de DSC radica en que tanto la forma como el área bajo la curva de las endotermas contienen información acerca del proceso de desnaturalización. Así, al integrar el área bajo la curva de la endoterma y dividirla entre la concentración de proteína se obtiene el ΔH calorimétrico para la transición. Por otro lado, una segunda estimación del cambio en la entalpía durante el proceso de desplegamiento, puede realizarse mediante un análisis de van't Hoff a partir de la forma de la endoterma asumiendo un modelo de dos estado. Para un caso ideal de dos estados, la entalpía de van't Hoff debe ser igual a la entalpía calorimétrica ($\Delta H_{VH} = \Delta H_{cal}$). Este análisis se conoce como criterio calorimétrico^{4;5}.

Debido a lo anterior y con la finalidad de obtener parámetros termodinámicos de manera directa, en particular el valor de ΔH para una caracterización termodinámica más completa, se realizaron experimentos de calorimetría de barrido diferencial.

Efecto de la concentración de proteína y reversibilidad.

Para determinar el grado de reversibilidad así como el efecto de la concentración de proteína, se realizaron experimentos de DSC a cinco diferentes concentraciones de proteína y haciendo dos barridos de temperatura consecutivos con la misma muestra. El intervalo de concentración de proteína empleado en estos experimentos fue de 0.3 a 1.1 mg/mL de proteína, a una velocidad de calentamiento de 2.5 K min^{-1} . Para todas las concentraciones de proteína, las endotermas mostraron una sola transición altamente reversible (figura 11a), con un porcentaje de recuperación mayor al 86 % del área bajo la curva después de un segundo barrido de temperatura. No se observaron diferencias

significativas en la T_m o el ΔH_{cal} al incrementar la concentración de proteína (ΔH_{cal} promedio = $280.91 \pm 4.27 \text{ kJmol}^{-1}$, T_m promedio = $324.16 \pm 0.098 \text{ K}$).

Efecto de la velocidad de barrido.

Para confirmar que los experimentos estuvieran al equilibrio, se realizaron barridos de temperatura usando tres diferentes velocidades de calentamiento (0.5 a 2.5 K min^{-1}) manteniendo fija la concentración de proteína (1 mg mL^{-1}). Tanto el valor de la T_m como el ΔH_{cal} no presentaron diferencias significativas entre la velocidad más alta y la más baja de calentamiento ($\Delta H_{\text{cal}} = 285.41 \pm 1.53 \text{ kJmol}^{-1}$, $T_m = 323.81 \pm 0.55 \text{ K}$), lo cual indica que bajo estas condiciones de calentamiento se alcanza el equilibrio (Figura 11b).

La entalpía de desnaturalización se calculó utilizando todos los datos calorimétricos obtenidos de los experimentos anteriormente descritos mediante dos estrategias independientes: integrando el área bajo la curva de las endotermas y mediante el ajuste de las endotermas asumiendo un modelo de dos estados clásico. En todos los casos el modelo de dos estados (ecuación 5, ver materiales y métodos) describe aparentemente bien el desplegamiento térmico de la proteína (ver figura 11, líneas continuas).

El valor de ΔC_p se calculó a partir de los datos obtenidos variando la concentración de proteína de acuerdo a la metodología descrita por Ibarra-Molero et al⁷³ siendo de $6.8 \pm 0.2 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Este valor es similar al estimado usando la parametrización reportada por Robertson y Murphy⁷⁵ basada en el número de residuos ($\Delta C_p = 6.4 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$).

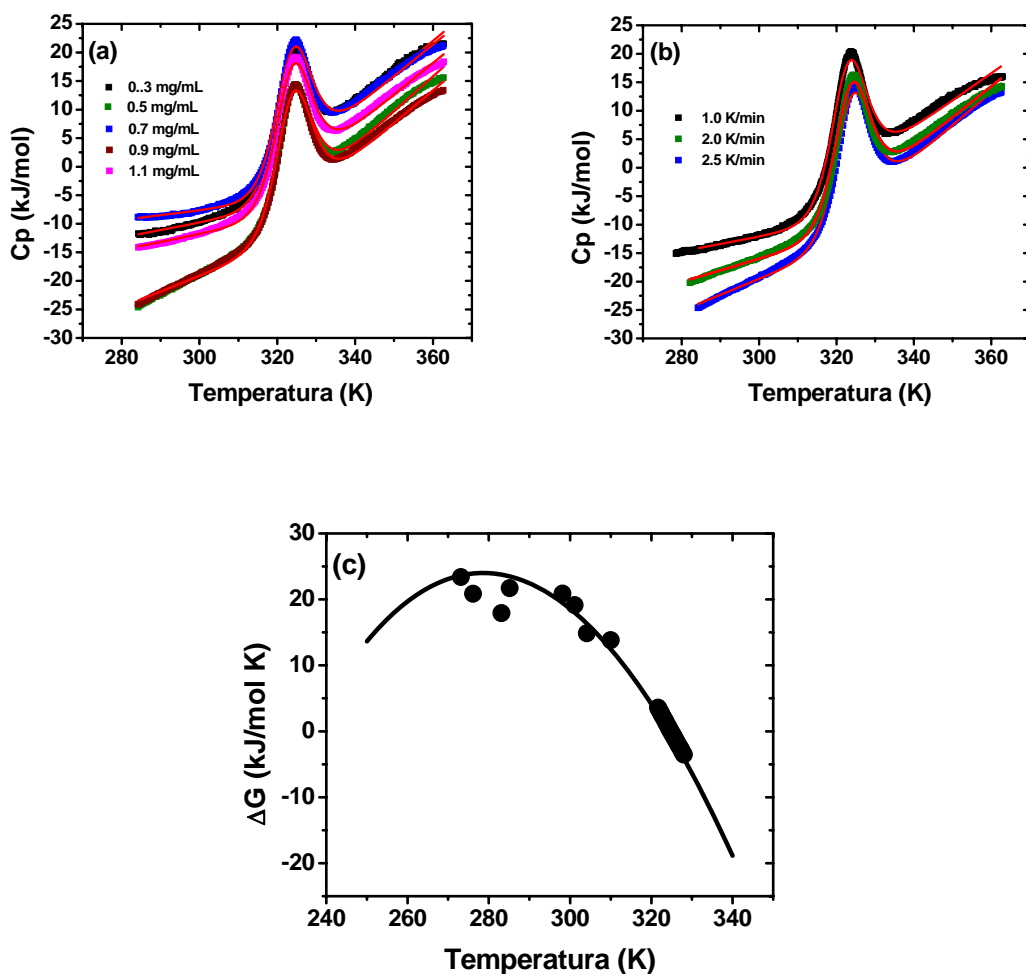


Figura 11. Experimentos calorimétricos. (a) Experimentos de DSC a diferentes concentraciones de proteína. La velocidad de calentamiento fue de 2.5 K min^{-1} . (b) Experimentos de DSC (1.0 mg mL^{-1}) variando la velocidad de barrido. (c) Curva de estabilidad de 6aJL2 obtenida a sustituyendo los valores calorimétricos $\Delta H_{cal} = 336.2 \text{ kJ/mol}$, $T_m = 323.7 \text{ K}$, $\Delta C_p = 6.8 \text{ kJ/mol K}$ en la ecuación 6 (línea continua) y datos espectroscópicos (círculos). Los datos a bajas temperaturas se obtuvieron de experimentos isotérmicos de desnaturalización con urea (ver figura 6c). Los datos a temperaturas elevadas se obtuvieron de los experimentos de desnaturalización térmica seguidos por fluorescencia.

Como es de esperarse, los valores obtenidos mediante mediciones espectroscópicas ($\Delta H_{\text{VH}} = 376.1 \pm 6.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ y $T_m = 323.2 \pm 1.0 \text{ K}$) son similares a los calorimétricos ($\Delta H_{\text{cal}} = 336.2 \pm 41.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ y $T_m = 324.2 \text{ K}$.) dentro del error experimental.

A partir de la información termodinámica obtenida de estos experimentos, la recabada con los experimentos isotérmicos de desnaturalización con urea en el rango de 273-310 K descritos previamente (figura 6c) y los datos de desnaturalización térmica obtenidos por fluorescencia, se construyó la curva de estabilidad de 6aJL2 (ecuación 6, figura 11 c).

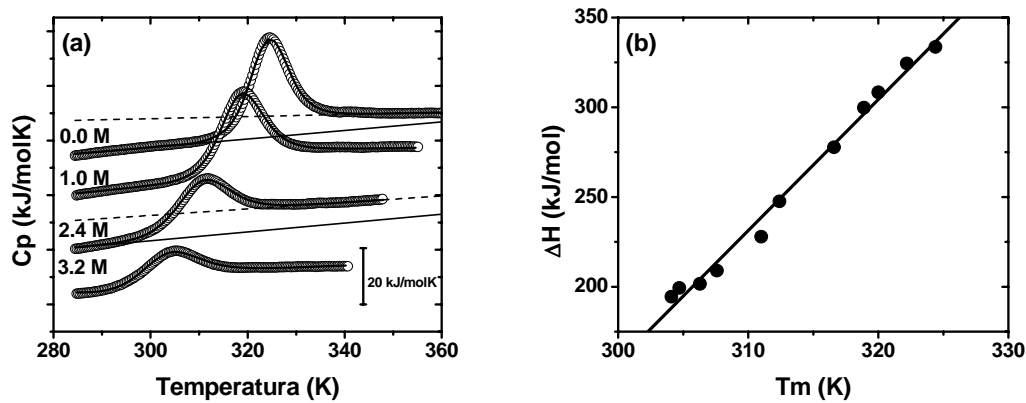


Figura 12. (a) Experimentos de DSC en presencia de urea. (a) Endotermas obtenidas en presencia de diferentes concentraciones de urea. La concentración de proteína y la velocidad de barrido fueron de 1.0 mg mL^{-1} y 1 K min^{-1} en todos los casos. Todas las muestras se pre-incubaron durante 3 minutos a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Las líneas continuas representan las curvas de ajuste usando un modelo de dos estados. Las endotermas se desplazaron en el eje y con propósitos de comparación. (b) Cambio del ΔH con respecto a la T_m a diferentes concentraciones de urea. A partir de la pendiente del ajuste lineal se calculo el valor de $\Delta C_p = 7.3 \pm 0.2 \text{ kJ/K mol}$.

Por otra parte, se realizaron experimentos de DSC en presencia de diferentes concentraciones de urea. En todos los casos, las transiciones fueron reversibles y se ajustaron correctamente a un modelo de dos estados (figura 12a). Al graficar el ΔH vs la temperatura, se encontró una dependencia lineal con la T_m . Este valor de ΔC_p (7.3 ± 0.2 kJ mol⁻¹ K⁻¹) fue muy cercano al determinado a partir de los experimentos variando la concentración de proteína ($\Delta C_p = 6.4$ kJmol⁻¹ K⁻¹, Figura 12b).

En un intento por caracterizar la desnaturalización térmica del intermediario, se realizaron experimentos de DSC a una muestra de 6aJL2 (1.0 mg mL⁻¹) preparada en 2.4 M de urea a 37 °C, tomando alícuotas a diferentes tiempos de incubación previo al barrido de temperatura. Independientemente del tiempo de incubación, las endotermas presentaron una sola transición con $T_m = 310.3 \pm 0.5$ K (figura 13a). Sin embargo, se observó una disminución considerable en el valor de ΔH al aumentar el tiempo de incubación (figura 13b).

Estos datos sugieren que una fracción de las moléculas adopta una conformación que no se despliega en el rango de temperatura ensayado o que su desplegamiento no contribuye significativamente al cambio en la capacidad calorífica. Otra posible explicación es la formación irreversible de fibrillas, sin embargo, aunque bajo estas condiciones se observa la formación de un intermediario, los datos hidrodinámicos descartan la posibilidad de que dicha especie sea un agregado de alto peso molecular (agregados amorfos o fibrillas). Por lo tanto, es muy probable que la disminución en la entalpía esté relacionada con la formación irreversible de un intermediario oligomérico soluble, el cual es estable bajo estas condiciones.

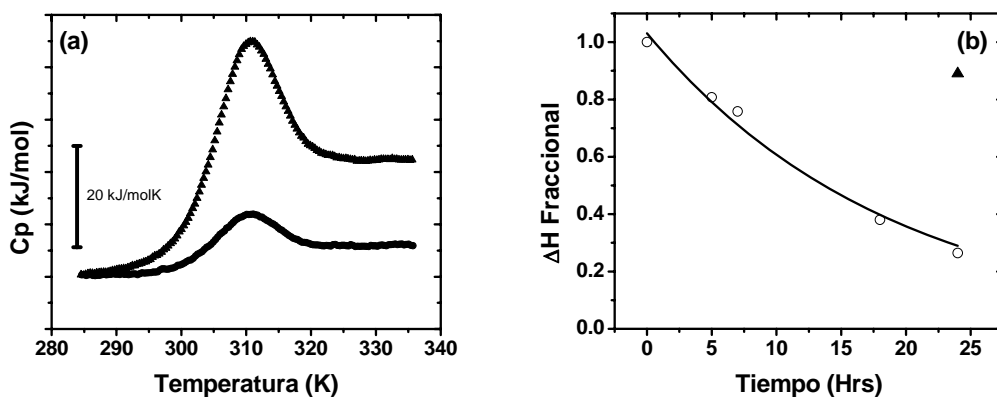


Figura 13. Efecto del tiempo de incubación en el ΔH de desplegamiento de 6aJL2 en 2.4 M de urea a 37 °C. (a) En triángulos cerrados se muestra la endoterma de la muestra preincubada por un lapso de 3 minutos. Los cuadrados cerrados representan el trazo calorimétrico correspondiente a la muestra preincubada durante 24 horas. Las curvas se desplazaron en el eje y con propósitos de comparación. (b) cambio del ΔH fraccional en función del tiempo de incubación (el ΔH correspondiente a 3 minutos de incubación se usó como referencia, $\Delta H = 1$). La línea continua muestra el ajuste a un modelo de decaimiento exponencial con un tiempo de relajación de 18.9 horas. El triángulo cerrado representa el valor de ΔH obtenido para una muestra incubada durante 24 horas en 2.4 M de urea a 25 °C.

Reversibilidad del intermediario.

Para probar si la formación del intermediario a 37 °C es un proceso irreversible, muestras previamente incubadas durante 24 horas en 2.4 M de urea se transfirieron a 0.48 M o 6,0 M de urea y se incubaron por otras 24 horas con la finalidad de promover el desplegamiento o el replegamiento. Las muestras renaturalizadas de 2.4 M a 0.48 M de urea presentaron una intensidad de fluorescencia, radio hidrodinámico y un espectro de dicroísmo circular en el UV-lejano similares a los obtenidos de muestras incubadas

directamente en 0.48 M de urea durante 24 horas (figura 14a y b). Sin embargo, la proteína no recobró totalmente sus propiedades., se observó una diferencia de 17 nm en el máximo del espectro de emisión de fluorescencia (λ_{max}).

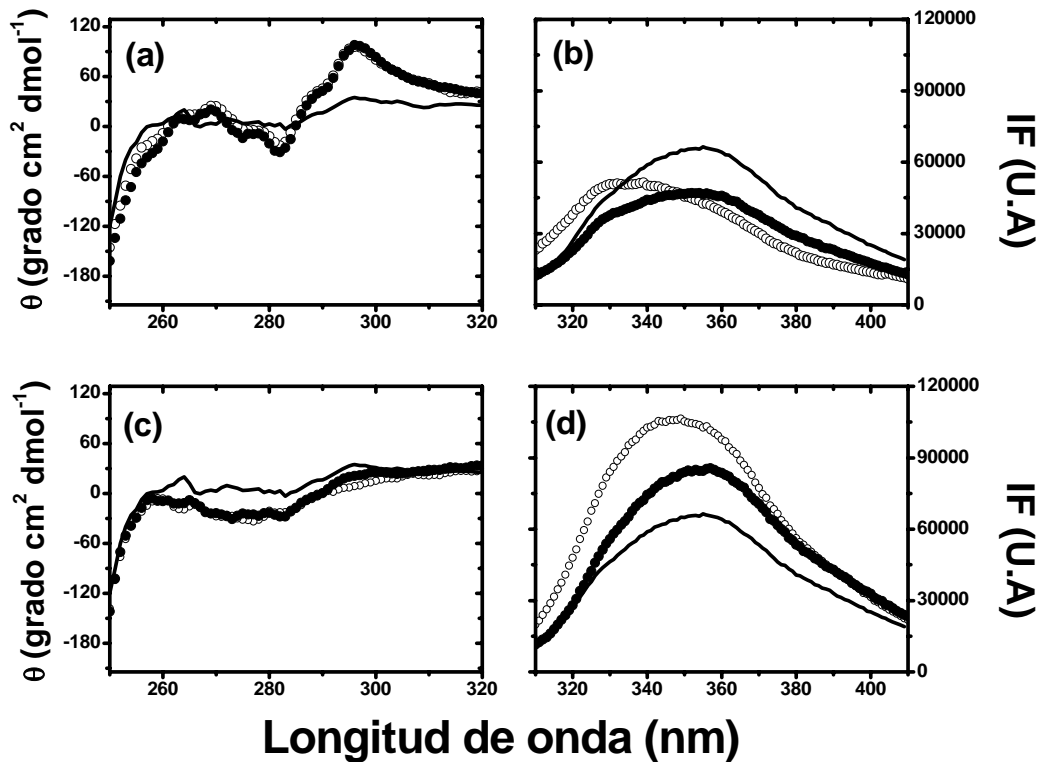


Figura 14. Desnaturalización y renaturalización del intermediario a 37 °C. Muestras incubadas durante 24 horas en 2.4 M de urea (líneas continuas) y posteriormente transferidas a 0.48M de urea (paneles a y b) o 6.0 M de urea (paneles c y d) e incubados por 24 horas (círculos llenos). En los paneles a y c se muestran los espectros de dicroísmo en el UV-cercano y fluorescencia intrínseca respectivamente. En círculos vacíos se muestran los espectros de muestras incubadas directamente en 0.48 M (paneles a y b) o en 6.0 M de urea (paneles c y d). En todos los casos la concentración final de proteína fue 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Por otro lado, la muestra que se transfirió a 6.0 M de urea, presentó un radio hidrodinámico y un espectro de dicroísmo circular en el UV-lejano similares a los observados en las muestras incubadas directamente en 6.0 M de urea. Por otra parte, el aun cuando la λ_{\max} del espectro de emisión de fluorescencia fue similar a la de las muestras en 6.0 M de urea, la intensidad de fluorescencia fue del 73 % (figura 14c y d). Estos datos indican que en la escala de tiempo probada el paso del intermediario al estado nativo o desnaturalizado es parcialmente reversible.

Formación de fibrillas in vitro.

Para determinar el papel del intermediario en la formación de fibrillas amiloides, se realizaron experimentos de fibrilogénesis en presencia de urea. Las cinéticas de fibrilogénesis in vitro se monitorearon midiendo el incremento de la intensidad de fluorescencia del colorante tioflavinT (ThT) al unirse a las fibrillas. Ya que la agitación tiene un efecto muy importante en las cinéticas de fibrilogénesis, se emplearon dos sistemas de fibrilogénesis distintos (ver materiales y métodos para mas detalles): El ensayo en microplacas de 96 pozos con agitación orbital (figura 15a) y el ensayo en viales empleando agitación con micro barras magnéticas (figura 15b). En ambos casos las cinéticas de unión de ThT mostraron una fase de retardo o “fase lag (t_{lag})”, seguida de una fase caracterizada por un rápido aumento en la intensidad de fluorescencia. Este comportamiento complejo es característico de la formación de fibrillas amiloides in vitro y se ha descrito para 6aJL2, para otras cadenas ligeras y para otro tipo de proteínas.

La fase de retardo se ha descrito como la fase en la cual ocurre la acumulación de precursores solubles de los agregados fibrilares. La segunda fase se ha relacionado con el

crecimiento o extensión de las fibrillas mediante la incorporación de especies solubles. Debido a que no existe hasta el momento un modelo claro del mecanismo de fibrillogénesis, los parámetros empíricos usados para caracterizar las distintas fases observadas en la cinéticas se obtuvieron de la siguiente manera: 1) las constantes de velocidad de la fase de extensión se estimaron a partir de la pendiente de la parte lineal de la fase de crecimiento. 2) El tiempo de retardo se calculo mediante la extrapolación de la parte lineal de crecimiento a la abscisa.

Para el ensayo de agitación orbital, se observó un aumento significativo en la intensidad de fluorescencia del ThT en el rango de 1.75 a 3.0 M de urea (figura 15a, símbolos cerrados en la figura 15c y d), mientras que para el ensayo de agitación con barras magnéticas (símbolos abiertos en las figuras 15c y d) el aumento en la fluorescencia del ThT se observó en todas las concentraciones de urea empleadas (0.0 a 3.5 M). Tanto el inverso del tiempo de retardo (figura 15c) como la velocidad de extensión de fibrillas (figura 15d) mostraron un máximo en el rango de 2.0-2,75 M de urea.

Una característica importante en estos experimentos fue la gran influencia del tipo de agitación sobre el tiempo de nucleación (comparar los distintos valores de los ejes y en la figura 15c); por ejemplo, en 2.5 M de urea, el tiempo lag fue de 26.3 horas usando el protocolo de agitación orbital (■ figura 15a) y de 0.5 horas agitando con barras magnéticas (■ figura 15b).

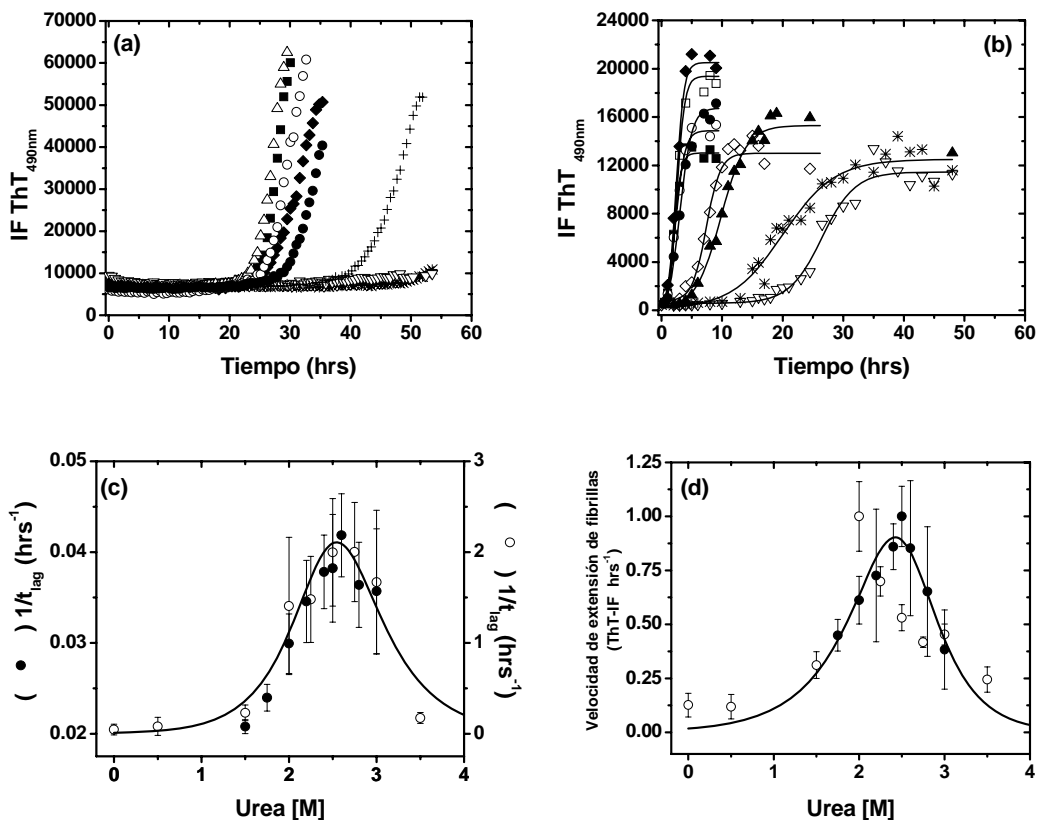


Figura 15. Experimentos de fibrilogénesis *in vitro* de 6aJL2 en presencia de urea. Cinéticas representativas de la formación de fibrillas con agitación orbital (a) o con agitación usando micro-barras magnética (b) a a 37 °C y 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de proteína. Las concentraciones de urea empleadas en estos experimentos fueron: 0.0 (∇), 0.5 ($*$), 1.75 (+), 2.0 (\blacklozenge), 2.5 (\blacksquare), 2.6 (\triangle), 2.8 (\circ) y 3.0 M urea (\bullet) para el ensayo de agitación orbital (a) y 0.0 (∇), 0.5 ($*$), 1.5 (\diamond), 2.0 (\blacklozenge), 2.25 (\square), 2.5 (\blacksquare), 2.75 (\circ), 3.0 (\bullet) y 3.5 M urea (\blacktriangle) para el ensayo de agitación con micro-barras magnéticas (b). Las líneas continuas se trazaron con propósitos de ayuda visual. La fluorescencia del colorante ThT se midió como se describe en los materiales y métodos. El inverso del tiempo de retardo o “tiempo lag” (panel c) y la velocidad de crecimiento o extensión de fibrillas (panel d) presentan una distribución de tipo gaussiana, similar en ambos tipos de experimento. Los símbolos abiertos representan los datos correspondientes al ensayo de agitación orbital y los símbolos cerrados representan a los datos obtenidos mediante agitación con micro-barras magnéticas. Las líneas continuas representan el ajuste con la ecuación 7.

De forma similar, en ausencia de desnaturizante no se observó una formación de fibrillas significativa en el ensayo de agitación orbital, con un $t_{lag} > 55$ horas, a diferencia del ensayo con agitación usando barras magnéticas cuyo t_{lag} calculado fue de 19.4 ± 2.8 horas. Este último valor, obtenido a pH 8.0 es ligeramente más alto que el reportado previamente para a un pH 7.5 (14.2 ± 0.5 horas)⁵³. Se ha documentado que diferencias tanto en el pH de trabajo como en el tipo de agitación tienen efectos importantes en las cinéticas de fibrilógenesis⁷⁶. Es notable que tanto la velocidad máxima en la extensión de las fibrillas, así como el menor tiempo de retardo se obtuvieron a la misma concentración de urea en la cual el intermediario se detectó (figuras 14b y 13f), lo cual sugiere que dicho intermediario está directamente relacionado con la formación de fibrillas. De hecho, al hacer un ajuste con la ecuación 7, en la cual se contempla la formación de un intermediario poco poblado, se observó que el máximo en la población del intermediario corresponde al menor tiempo de retardo y a la mayor velocidad de extensión de las fibrillas (líneas continuas, figuras 15 c y d).

Discusión y conclusiones.

Desnaturalización a escala temporal corta: comportamiento de dos estados.

En el presente trabajo se describió y caracterizo el proceso de desnaturalización/renaturalización de la cadena ligera de inmunoglobulinas 6aJL2 desde un punto de vista cinético y termodinámico, además de una caracterización de las propiedades macroscópicas de cada una de las especies involucradas en dicho proceso y su participación en la formación de fibrillas.

Con la finalidad de relacionar, de manera más directa, los estudios termodinámicos y el proceso de formación de fibrillas *in vitro*, dicha caracterización se realizó a dos escalas temporales, ya que las condiciones experimentales empleadas difieren significativamente entre ambos experimentos. Dentro de las principales diferencias se encuentra la temperatura del sistema, 25 °C es la temperatura estándar en los estudios de estabilidad reportados para otras cadenas ligeras y en general para cualquier proteína, en tanto que los experimentos de fibrilogénesis *in vitro* se realizan de manera rutinaria a 37 °C. Otra diferencia importante recae en la escala temporal en la que se desarrollan dichos procesos. Para el caso de los experimentos de estabilidad, generalmente se emplean tiempos de incubación relativamente cortos, los cuales oscilan entre los 5 minutos y las 12 horas, en comparación a los tiempos de retardo reportados para la formación de fibrillas que varían de horas a días⁵³.

De manera global, los datos experimentales del desplegamiento de 6aJL2 usando tiempos cortos de incubación (3 minutos) indican claramente que dicho proceso puede describirse

como de dos estados “clásico”, lo cual permite hacer un análisis termodinámico usando esta aproximación. Una prueba clásica para confirmar que dicha aproximación es correcta consiste en realizar experimentos de desnaturalización al equilibrio siguiendo el cambio conformacional de la proteína, mediante la medición de distintas propiedades fisicoquímicas de ésta en función del incremento del estímulo perturbante. Si la magnitud del cambio en las señales normalizadas es similar para todos los perturbantes y las transiciones observadas presentan un comportamiento sigmoide, se puede asumir que la suposición de dos estados es adecuada⁴⁻⁶. Otra prueba mas concluyente para determinar la validez de dicha aproximación es la comparación del valor de estabilidad, básicamente el cambio en la energía libre de Gibbs (ΔG), calculado de experimentos al equilibrio, con el valor calculado de experimentos cinéticos. Si ambos valores son iguales, dicha aproximación es valida⁴⁻⁶.

Durante la desnaturalización de 6aJL2 usando tiempos cortos de incubación, se emplearon dos técnicas espectroscópicas para monitorear el desplegamiento de 6aJL2, además se realizaron experimentos cinéticos. Las transiciones observadas con ambas técnicas fueron coincidentes tanto a 25 °C como a 37 °C (figura 3d). Adicionalmente, las mediciones hidrodinámicas realizadas bajo condiciones experimentales similares mostraron picos cromatográficos simétricos en todo el intervalo de concentraciones de urea ensayadas, lo cual es consistente con un equilibrio entre el estado nativo y el desnaturalizado, cuya interconversión es más rápida que la corrida cromatográfica⁷².

Por otra parte, en los experimentos cinéticos, tanto a 25 °C como a 37 °C, la evolución temporal del cambio en la señal de fluorescencia se ajustó con una ecuación mono

exponencial, a todas las concentraciones de desnaturalizante ensayadas. En dichos trazos no se observó evidencia de intermediarios cinéticos de plegamiento ni efecto apreciable de la concentración de proteína. A su vez, los gráficos de chevron no presentaron desviaciones de la linealidad en ninguna de sus ramas y el valor de concentración de urea en la cual se observa el mínimo del chevron coinciden con el valor de la C_m de los experimentos al equilibrio (comparar figura 3d y 4b).

La estabilidad de 6aJL2 determinada a partir de experimentos de desnaturalización, reportada en este trabajo ($\Delta G_{H_2O}^{25^\circ C} = 21.7 \pm 2.0 \text{ kJmol}^{-1}$) es similar al reportado usando GuHCl como desnaturalizante ($\Delta G_{H_2O}^{25^\circ C} = 21.7 \pm 0.8 \text{ kJ mol}^{-1}$)⁷⁷, Estos resultados indican claramente que las transiciones de desplegamiento observadas con ambos desnaturalizantes son termodinámicamente equivalentes.

Un comportamiento de dos estados se ha observado para la desnaturalización caotrópica a 25 °C de la mayoría de las cadenas ligeras estudiadas. Los valores de estabilidad reportados varían entre 9.2 y 32.2 kJmol⁻¹ ^{29; 50; 52; 54; 63; 78}. La estabilidad de 6aJL2 cae dentro de este intervalo y está muy cercano a la media. Hasta el momento no se han reportado valores de ΔG a 37 °C, sin embargo, el valor obtenido a esta temperatura es consistente con el esperado de acuerdo con la curva de estabilidad generada con los parámetros termodinámicos obtenidos de experimentos calorimétricos (ver figura 11c).

De manera similar, la desnaturalización térmica de 6aJL2 sigue un comportamiento de dos estados, ya que los valores de ΔH_{VH} y el ΔH_{Cal} de despegamiento, calculados de datos de fluorescencia intrínseca y DSC ($\Delta H_{VH} = 376.1 \pm 6.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ y $\Delta H_{cal} = 336.2 \pm 41.9 \text{ kJ}$

mol⁻¹) respectivamente, fueron similares dentro del error experimental. Por tanto, el modelo de dos estados, usado en el análisis de van't Hoff es correcto. Por otra parte, los valores de ΔH ($\Delta H_{cal} = 336.2 \pm 41.9$ kJ mol⁻¹) y ΔC_p (6.8 ± 0.2 kJmol⁻¹ K⁻¹) calculados concuerdan con los valores esperados para la desnaturalización una proteína de estas dimensiones ($\Delta H=324.12$ kJmol⁻¹ y $\Delta C_p=6.4$ kJmol⁻¹ K⁻¹) usando la correlación entre el numero de residuos y el cambio en dichos parámetros termodinámicos reportada por Robertson y Murphy⁷⁵.

En conjunto, estos datos indican que cuando se emplean tiempos cortos de incubación, la desnaturalización puede ser adecuadamente descrita con un modelo de dos estados.

El estado nativo tanto a 25 como a 37 °C, presentó las mismas propiedades fisicoquímicas. El espectro de fluorescencia intrínseca fue idéntico a ambas temperaturas, con un máximo de emisión a 328 nm y el mismo grado de apagamiento por transferencia de energía al puente disulfuro (ver introducción). El espectro de dicroísmo circular en el UV lejano fue similar al observado para otras inmunoglobulinas, con un alto contenido de estructura β -antiparalela^{35; 62; 79; 80}. El radio hidrodinámico aparente, calculado a partir de los datos cromatograficos ($R_s= 11.89$ Å para 25 °C y 10.92 Å para 37 °C) es consistente con el esperado para una proteína monomérica de dimensiones similares⁷⁴. Durante la desnaturalización, el cambio en el máximo de emisión a 352 nm y el aumento significativo en la intensidad de fluorescencia indican un alejamiento significativo del triptofano 35 con respecto al disulfuro, además de un aumento en el grado de exposición del triptofano. Los valores del radio hidrodinámico para el estado desnaturalizado (27.12 Å para 25 °C y 26.14 Å para 37 °C) confirman lo observado por fluorescencia. La

diferencia de 20 Å entre el estado nativo y el desnaturalizado (figura 10a y b) es consistente con el despegamiento total de una proteína de dimensiones similares⁷⁴.

Hasta el momento no se han reportado velocidades del plegamiento y desplegamiento de cadenas ligeras, sin embargo, existen datos de varias proteínas con plegamientos similares. Para 6aJL2, los valores de dichas constantes (0.707 s^{-1} y $3.2 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ para el plegamiento y despegamiento en agua, respectivamente) se equiparan a los valores mas lentos reportados para proteínas de dos estados¹¹ Sin embargo, estos valores se encuentran en el intervalo de los reportados para otras proteínas con plegamiento de tipo β sándwich⁸⁰ (ver tabla 2). A partir de las constantes cinéticas es posible hacer un análisis usando la teoría del estado de transición, calcular la magnitud de la barrera energética que separa a los dos estados termodinámicos y obtener información de las características conformacionales del estado de transición^{5; 81}, tales como el grado de exposición de residuos hidrofobitos, así como la proporción de interacciones nativas presentes en el estado de transición.

Tabla 2. Tiempos de relajación y constantes de velocidad.

Proteína	$\tau_{\text{plegamiento}}$ (seg)	$\tau_{\text{desplegamiento}}$ (seg)	$k_{\text{plegamiento}}$ (seg^{-1})	$k_{\text{desplegamiento}}$ (seg^{-1})
Fyn SH3	0.0075	77.7	133.33	0.01287
Espectrina SH3	0.35	125.2	2.86	0.00799
mAcP	4.85	81.03	0.21	0.01234
6aJL2	1.41	3115	0.71	0.00032
FKBP*	120.2	3294.5	0.01	0.00030

Datos tomados de Maxwell et al.^{11,*} Proteína con alto contenido de estructura α

Los valores de la β de Tanford obtenidos de las pendientes (m) calculadas de los datos cinéticos y al equilibrio⁸¹ ($\beta = RT \cdot (m_F / m_F - m_{eq}) = 0.44$ para 25 °C y 0.40 para 37 °C), indican que en ambas temperaturas el área hidrofóbica oculta en el estado de transición es por lo menos menor que la mitad del cambio en el área total expuesta. Estos valores de β de Tanford son ligeramente menores que los reportados para otras proteínas β sándwich,.

Tiempos largos de incubación: Un intermediario fuera de la vía de plegamiento y la formación de fibrillas.

La formación de fibrillas es un proceso complejo con múltiples pasos, para el cual se han propuesto diferentes mecanismos moleculares⁶¹, en los cuales el vínculo entre el (des)plegamiento y la formación de fibrillas depende en mayor medida de la proteína involucrada. Para las cadenas ligeras κ , Fink y colaboradores han propuesto un mecanismo general en el cual, intermediarios parcialmente plegados se asocian inicialmente en especies oligoméricas solubles para dar lugar posteriormente a núcleos de fibrilación, lo cual es un paso crítico para producir subsecuentemente especies fibrilares^{30; 35; 36; 55; 57}. Para otras cadenas ligeras, aunque los datos experimentales apuntan hacia un desplegamiento de dos estados, no es claro que especie es la precursora en la formación de las fibrillas; sin embargo, bajo condiciones desestabilizantes, la formación de fibrillas in vitro se ve favorecida, por lo que se ha propuesto que la desestabilización del estado nativo es un paso esencial en la formación de fibrillas^{37; 52}, lo cual concuerda con la relación estabilidad-fibrilogenicidad propuesta para las cadenas ligeras.

A diferencia de lo observado usando tiempos de incubación cortos, los datos experimentales obtenidos en una escala temporal mayor a 24 horas presentan evidencias de intermediarios parcialmente plegados.

Aún cuando a 25 °C, las técnicas espectroscópicas no fueron sensibles a la presencia de un intermediario y las transiciones observadas aparentemente son de dos estados, los datos hidrodinámicos mostraron claramente la presencia de un intermediario, el cual no se observa en el equilibrio a tiempos cortos. Este intermediario presenta un radio hidrodinámico intermedio entre el del estado nativo y el desnaturalizado (figura 8e). Cabe señalar que los radio hidrodinámicos aparentes del estado nativo y el desnaturalizado no presentaron diferencias significativas entre las distintas escalas temporales ensayadas ($R_s = 11.89 \text{ \AA}$ para 25 °C y 11.2 \AA para 37 °C) y el cambio en el radio hidrodinámico asociado al desplegamiento fue aproximadamente de la misma magnitud (20 \AA) (figura 9). Este intermediario se observó en un rango de concentraciones de urea alrededor del valor de la C_m (3.5 M) calculada a partir de los datos espectroscópicos, cuyo valor es idéntico en ambas escalas temporales.

La presencia del intermediario se observó de manera más marcada en los experimentos realizados a 37 °C. Bajo estas condiciones experimentales, las transiciones observadas siguiendo el cambio en la señal de fluorescencia y dicroísmo circular no fueron coincidentes entre sí y presentaron un corrimiento a concentraciones menores de desnaturalizante en comparación con las transiciones observadas a tiempos cortos de incubación (figura 5b). Adicionalmente los datos de fluorescencia mostraron una transición bifásica característica de un equilibrio de más de dos estados, con una meseta

en un intervalo de concentraciones (1.5-2.75) cercano al valor de la C_m (2.5 M) de los experimentos a tiempos cortos de incubación (figuras 3d y 5b). Las propiedades espectroscópicas e hidrodinámicas de este intermediario están entre las de los estados nativo y desnaturalizado y son consistentes con una especie monomérica expandida. El radio hidrodinámico aparente calculado para el intermediario fue de $R_s \approx 23 \text{ \AA}$ en ambas temperaturas.

Los cambios en la señal de fluorescencia asociados a la aparición del intermediario muestran que la formación y/o acumulación de esta especie se acelera a altas concentraciones de proteína, sin embargo, la cinética de formación del intermediario es un proceso lento que ocurre en una escala temporal de varias horas. Este comportamiento es el esperado para una reacción de asociación lenta, sin embargo, una estimación del orden de reacción mediante una aproximación de velocidades iniciales indica que este proceso está limitado por una reacción unimolecular lenta (Figura 7), por lo tanto es posible que los cambios en la señal de fluorescencia no correspondan a un solo evento.

Por otra parte, el intermediario se detectó en las mismas concentraciones de urea en las cuales se observó la máxima velocidad de crecimiento y el mínimo tiempo de retardo para la formación de fibrillas (figura 15c y d), por lo tanto, es muy probable que este intermediario sea el precursor crítico en la formación de fibrillas.

Ya que las propiedades hidrodinámicas del intermediario, así como el tiempo de retardo observado en los experimentos de fibrillogénesis *in vitro* descartan la posibilidad de que esta especie sea un agregado fibrilar, proponemos que el intermediario es una especie que nunca llega a estar significativamente poblada ya que es secuestrada del equilibrio,

probablemente por un proceso cinético de asociación, el cual es irreversible y que da lugar a la formación de las fibrillas²³. Los resultados anteriormente descritos concuerdan con lo que se ha observado para algunas cadenas ligeras κ ^{35; 36; 55; 57} y otras proteínas amiloidogénicas como la β -2 microglobulina^{27; 28}, donde la formación y acumulación de un intermediario parcialmente plegado es un paso crítico en la formación de fibrillas.

Con base en estos resultados, proponemos un modelo que nos permite describir el efecto de la concentración de urea tanto en el tiempo de retardo como en la velocidad de extensión de las fibrillas y relacionar estos resultados con los datos de desnaturalización a escalas temporales cortas. Este modelo supone un equilibrio de tres estados, en el cual se asume la presencia de un intermediario que no llega a estar significativamente poblado en el equilibrio ya que es secuestrado durante la formación de fibrillas. Este modelo predice que en las condiciones en las que el producto de la fracción nativa y desnaturalizada es máxima, es decir en la C_m , la población del intermediario es máxima y por lo tanto, la formación de fibrillas se ve favorecida.

Bajo este esquema es posible plantear una hipótesis alterna, en la cual la formación del intermediario implica la asociación entre el estado nativo y el desnaturalizado. Esta hipótesis no es tan inverosímil como puede parecer al principio, ya que se sabe que el estado desnaturalizado puede contener estructura residual y que en el estado nativo pueden presentarse fluctuaciones estructurales que pueden describirse como un desplegamiento parcial transitorio¹⁴. Por lo tanto, parece plausible que en las condiciones donde las fracciones nativa y desnaturalizada están igualmente pobladas, como ocurre en

la *C_m*, estas dos conformaciones presenten regiones complementarias que puedan promover una asociación específica.

Perspectivas.

Los resultados obtenidos en este trabajo dejan abiertas varias líneas de investigación sobre la amiloidosis AL. Dentro de los estudios propuestos para complementar este trabajo, los más relevantes son:

- Comprobar el mecanismo propuesto para la formación del intermediario, mediante experimentos de formación de fibrillas, empleando dos mutantes de 6aJL2 con estabilidades diferentes, bajo condiciones en las cuales una de las mutantes se encuentre en el estado nativo y la otra en el estado desnaturalizado. Si el modelo es correcto, la formación de fibrillas será favorecida en estas condiciones, así como la formación del intermediario.
- Caracterizar el grado de formación de las interacciones presentes en el estado de transición durante el desplegamiento de la cadena ligera 6aJL2, mediante el método de ingeniería de proteínas desarrollado por Fersht⁸².
- Determinar el efecto del pH en la estabilidad y fibrilogénesis de 6aJL2.
- Caracterizar el mecanismo de agregación fibrilar en 6aJL2.

Referencias.

1. Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* **181**, 223-30.
2. Christis, C., Lubsen, N. H. & Braakman, I. (2008). Protein folding includes oligomerization - examples from the endoplasmic reticulum and cytosol. *Febs J* **275**, 4700-27.
3. Dill, K. A., Ozkan, S. B., Shell, M. S. & Weikl, T. R. (2008). The protein folding problem. *Annu Rev Biophys* **37**, 289-316.
4. Cooper, A. (1999). Thermodynamics of protein folding and stability. In *Protein: A Comprehensive Treatise* (Allen, G., ed.), Vol. 2, pp. 217-270. 2 vols. JAI Press Inc., Stamford CT.
5. Haynie, D. T. (2001). *Biological thermodynamics*, Cambridge University Press, Cambridge ; New York.
6. Eftink, M. R. (1995). Use of multiple spectroscopic methods to monitor equilibrium unfolding of proteins. *Methods Enzymol* **259**, 487-512.
7. Bolen, D. W. & Santoro, M. M. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 2. Incorporation of delta G degrees N-U values in a thermodynamic cycle. *Biochemistry* **27**, 8069-74.
8. Santoro, M. M. & Bolen, D. W. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry* **27**, 8063-8.
9. Dobson, C. M. (2004). Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin Cell Dev Biol* **15**, 3-16.
10. Meersman, F., Dobson, C. M. & Heremans, K. (2006). Protein unfolding, amyloid fibril formation and configurational energy landscapes under high pressure conditions. *Chem Soc Rev* **35**, 908-17.
11. Maxwell, K. L., Wildes, D., Zarrine-Afsar, A., De Los Rios, M. A., Brown, A. G., Friel, C. T., Hedberg, L., Horng, J. C., Bona, D., Miller, E. J., Vallee-Belisle, A., Main, E. R., Bemporad, F., Qiu, L., Teilum, K., Vu, N. D., Edwards, A. M., Ruczinski, I., Poulsen, F. M., Kragelund, B. B., Michnick, S. W., Chiti, F., Bai, Y., Hagen, S. J., Serrano, L., Oliveberg, M., Raleigh, D. P., Wittung-Stafshede, P., Radford, S. E., Jackson, S. E., Sosnick, T. R., Marqusee, S., Davidson, A. R. & Plaxco, K. W. (2005). Protein folding: defining a "standard" set of experimental conditions and a preliminary kinetic data set of two-state proteins. *Protein Sci* **14**, 602-16.
12. Chiti, F. & Dobson, C. M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu Rev Biochem* **75**, 333-66.
13. Dobson, C. M. (2004). Experimental investigation of protein folding and misfolding. *Methods* **34**, 4-14.
14. Chiti, F. & Dobson, C. M. (2009). Amyloid formation by globular proteins under native conditions. *Nat Chem Biol* **5**, 15-22.
15. Falk, R. H., Comenzo, R. L. & Skinner, M. (1997). The systemic amyloidoses. *N Engl J Med* **337**, 898-909.

16. Thomas, P. J., Qu, B. H. & Pedersen, P. L. (1995). Defective protein folding as a basis of human disease. *Trends Biochem Sci* **20**, 456-9.
17. Bellotti, V., Mangione, P. & Merlini, G. (2000). Review: immunoglobulin light chain amyloidosis--the archetype of structural and pathogenic variability. *J Struct Biol* **130**, 280-9.
18. Dobson, C. M. (2001). The structural basis of protein folding and its links with human disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **356**, 133-45.
19. Koo, E. H., Lansbury, P. T., Jr. & Kelly, J. W. (1999). Amyloid diseases: abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9989-90.
20. Sunde, M. & Blake, C. (1997). The structure of amyloid fibrils by electron microscopy and X-ray diffraction. *Adv Protein Chem* **50**, 123-59.
21. Tan, S. Y. & Pepys, M. B. (1994). Amyloidosis. *Histopathology* **25**, 403-14.
22. Wilson, M. R., Yerbury, J. J. & Poon, S. (2008). Potential roles of abundant extracellular chaperones in the control of amyloid formation and toxicity. *Mol Biosyst* **4**, 42-52.
23. Andrews, J. M. & Roberts, C. J. (2007). A Lumry-Eyring nucleated polymerization model of protein aggregation kinetics: 1. Aggregation with pre-equilibrated unfolding. *J Phys Chem B* **111**, 7897-913.
24. Bellotti, V., Stoppini, M., Mangione, P., Sunde, M., Robinson, C., Asti, L., Brancaccio, D. & Ferri, G. (1998). Beta2-microglobulin can be refolded into a native state from ex vivo amyloid fibrils. *Eur J Biochem* **258**, 61-7.
25. Bliznyukov, O. P., Kozmin, L. D., Vysotskaya, L. L., Golenkov, A. K., Tishchenko, V. M., Samoylovich, M. P. & Klimovich, V. B. (2005). Human immunoglobulin light chains lambda form amyloid fibrils and granular aggregates in solution. *Biochemistry (Mosc)* **70**, 458-66.
26. Calamai, M., Chiti, F. & Dobson, C. M. (2005). Amyloid fibril formation can proceed from different conformations of a partially unfolded protein. *Biophys J* **89**, 4201-10.
27. Chiti, F., De Lorenzi, E., Grossi, S., Mangione, P., Giorgetti, S., Caccialanza, G., Dobson, C. M., Merlini, G., Ramponi, G. & Bellotti, V. (2001). A partially structured species of beta 2-microglobulin is significantly populated under physiological conditions and involved in fibrillogenesis. *J Biol Chem* **276**, 46714-21.
28. Chiti, F., Mangione, P., Andreola, A., Giorgetti, S., Stefani, M., Dobson, C. M., Bellotti, V. & Taddei, N. (2001). Detection of two partially structured species in the folding process of the amyloidogenic protein beta 2-microglobulin. *J Mol Biol* **307**, 379-91.
29. 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 U S A* **91**, 5446-50.
30. 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**, 3525-35.

31. Kim, Y. S., Randolph, T. W., Manning, M. C., Stevens, F. J. & Carpenter, J. F. (2003). Congo red populates partially unfolded states of an amyloidogenic protein to enhance aggregation and amyloid fibril formation. *J Biol Chem* **278**, 10842-50.
32. Kim, Y. S., Randolph, T. W., Stevens, F. J. & Carpenter, J. F. (2002). Kinetics and energetics of assembly, nucleation, and growth of aggregates and fibrils for an amyloidogenic protein. Insights into transition states from pressure, temperature, and co-solute studies. *J Biol Chem* **277**, 27240-6.
33. Martsev, S. P., Dubnovitsky, A. P., Vlasov, A. P., Hoshino, M., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. (2002). Amyloid fibril formation of the mouse V(L) domain at acidic pH. *Biochemistry* **41**, 3389-95.
34. Plakoutsi, G., Bemporad, F., Calamai, M., Taddei, N., Dobson, C. M. & Chiti, F. (2005). Evidence for a mechanism of amyloid formation involving molecular reorganisation within native-like precursor aggregates. *J Mol Biol* **351**, 910-22.
35. 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**, 3521-31.
36. 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**, 8094-104.
37. Wall, J., Murphy, C. L. & Solomon, A. (1999). In vitro immunoglobulin light chain fibrillogenesis. *Methods Enzymol* **309**, 204-17.
38. 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**, 24452-9.
39. Solomon, A. & Weiss, D. T. (1993). Ominous consequences of immunoglobulin deposition. *N Engl J Med* **329**, 1422-3.
40. Comenzo, R. L., Zhang, Y., Martinez, C., Osman, K. & Herrera, G. A. (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**, 714-20.
41. Obici, L., Perfetti, V., Palladini, G., Moratti, R. & Merlini, G. (2005). Clinical aspects of systemic amyloid diseases. *Biochim Biophys Acta* **1753**, 11-22.
42. 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**, 744-51.
43. Kyle, R. A. & Gertz, M. A. (1995). Primary systemic amyloidosis: clinical and laboratory features in 474 cases. *Semin Hematol* **32**, 45-59.
44. Liao, R., Jain, M., Teller, P., Connors, L. H., Ngoy, S., Skinner, M., Falk, R. H. & Apstein, C. S. (2001). Infusion of light chains from patients with cardiac amyloidosis causes diastolic dysfunction in isolated mouse hearts. *Circulation* **104**, 1594-7.
45. 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**, 120-6.

46. Harris, D. L., King, E., Ramsland, P. A. & Edmundson, A. B. (2000). Binding of nascent collagen by amyloidogenic light chains and amyloid fibrillogenesis in monolayers of human fibrocytes. *J Mol Recognit* **13**, 198-212.
47. Aguzzi, F., Bergami, M. R., Gasparro, C., Bellotti, V. & Merlini, G. (1992). Occurrence of monoclonal components in general practice: clinical implications. *Eur J Haematol* **48**, 192-5.
48. 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**, 14101-8.
49. 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**, 323-31.
50. 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**, 509-17.
51. Pokkuluri, P. R., Gu, M., Cai, X., Raffin, R., Stevens, F. J. & Schiffer, M. (2002). Factors contributing to decreased protein stability when aspartic acid residues are in beta-sheet regions. *Protein Sci* **11**, 1687-94.
52. 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**, 1570-4.
53. del Pozo Yauner, L., Ortiz, E., Sanchez, R., Sanchez-Lopez, R., Guereca, L., Murphy, C. L., Allen, A., Wall, J. S., Fernandez-Velasco, D. A., Solomon, A. & Becerril, B. (2008). Influence of the germline sequence on the thermodynamic stability and fibrillogenicity of human lambda 6 light chains. *Proteins* **72**, 684-92.
54. Chung, C. M., Chiu, J. D., Connors, L. H., Gursky, O., Lim, A., Dykstra, A. B., Liepnieks, J., Benson, M. D., Costello, C. E., Skinner, M. & Walsh, M. T. (2005). Thermodynamic stability of a kappaI immunoglobulin light chain: relevance to multiple myeloma. *Biophys J* **88**, 4232-42.
55. Souillac, P. O., Uversky, V. N., Millett, I. S., Khurana, R., Doniach, S. & Fink, A. L. (2002). Effect of association state and conformational stability on the kinetics of immunoglobulin light chain amyloid fibril formation at physiological pH. *J Biol Chem* **277**, 12657-65.
56. Kim, Y. S., Cape, S. P., Chi, E., Raffin, 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**, 1626-33.
57. Souillac, P. O., Uversky, V. N., Millett, I. S., Khurana, R., Doniach, S. & Fink, A. L. (2002). Elucidation of the molecular mechanism during the early events in immunoglobulin light chain amyloid fibrillation. Evidence for an off-pathway oligomer at acidic pH. *J Biol Chem* **277**, 12666-79.
58. Ionescu-Zanetti, C., Khurana, R., Gillespie, 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 U S A* **96**, 13175-9.
59. Kardos, J., Yamamoto, K., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. (2004). Direct measurement of the thermodynamic parameters of amyloid formation by isothermal titration calorimetry. *J Biol Chem* **279**, 55308-14.
 60. Khurana, R., Souillac, P. O., Coats, A. C., Minert, L., Ionescu-Zanetti, C., Carter, S. A., Solomon, A. & Fink, A. L. (2003). A model for amyloid fibril formation in immunoglobulin light chains based on comparison of amyloidogenic and benign proteins and specific antibody binding. *Amyloid* **10**, 97-109.
 61. O'Nuallain, B., Thakur, A. K., Williams, A. D., Bhattacharyya, A. M., Chen, S., Thiagarajan, G. & Wetzel, R. (2006). Kinetics and thermodynamics of amyloid assembly using a high-performance liquid chromatography-based sedimentation assay. *Methods Enzymol* **413**, 34-74.
 62. Schormann, N., Murrell, J. R., Liepnieks, J. J. & Benson, M. D. (1995). Tertiary structure of an amyloid immunoglobulin light chain protein: a proposed model for amyloid fibril formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9490-4.
 63. Stevens, F. J., Myatt, E. A., Chang, C. H., Westholm, F. A., Eulitz, M., Weiss, D. T., Murphy, C., Solomon, A. & Schiffer, M. (1995). A molecular model for self-assembly of amyloid fibrils: immunoglobulin light chains. *Biochemistry* **34**, 10697-702.
 64. Roitt, I. M. & Delves, P. J. (2001). *Roitt's essential immunology*. 10th edit, Blackwell Science, Oxford ; Malden, MA.
 65. Ockhuizen, T., Pandey, J. P., Galbraith, G. M., Fudenberg, H. H. & Hames, C. G. (1982). Autoantibodies and immunoglobulin allotypes in healthy North American Blacks of different age groups. *Mech Ageing Dev* **19**, 103-11.
 66. Stevens, F. J. & Argon, Y. (1999). Pathogenic light chains and the B-cell repertoire. *Immunol Today* **20**, 451-7.
 67. Janeway, C. A., Jr. (2001). How the immune system works to protect the host from infection: a personal view. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 7461-8.
 68. 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**, 183-9.
 69. 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**, 3801-8.
 70. Perfetti, V., Casarini, S., Palladini, G., Vignarelli, M. C., Klersy, C., Diegoli, M., Ascari, E. & Merlini, G. (2002). Analysis of V(lambda)-J(lambda) expression in plasma cells from primary (AL) amyloidosis and normal bone marrow identifies 3r (lambdaIII) as a new amyloid-associated germline gene segment. *Blood* **100**, 948-53.
 71. 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**, 531-6.

72. Uversky, V. N. (1993). Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule. *Biochemistry* **32**, 13288-98.
73. Ibarra-Molero, B., Makhatadze, G. I. & Sanchez-Ruiz, J. M. (1999). Cold denaturation of ubiquitin. *Biochim Biophys Acta* **1429**, 384-90.
74. Dutta, S. & Bhattacharyya, D. (2001). Size of Unfolded and Dissociated Subunits versus that of Native Multimeric Proteins. *J Biol Physic* **27**, 59-71.
75. Robertson, A. D. & Murphy, K. P. (1997). Protein Structure and the Energetics of Protein Stability. *Chem Rev* **97**, 1251-1268.
76. Xue, W. F., Homans, S. W. & Radford, S. E. (2008). Systematic analysis of nucleation-dependent polymerization reveals new insights into the mechanism of amyloid self-assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 8926-31.
77. Del Pozo Yauner, L., Ortiz, E., Sanchez, R., Sanchez-Lopez, R., Guereca, L., Murphy, C. L., Allen, A., Wall, J. S., Fernandez-Velasco, D. A., Solomon, A. & Becerril, B. (2008). Influence of the germline sequence on the thermodynamic stability and fibrillogenicity of human lambda 6 light chains. *Proteins*.
78. 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**, 453-60.
79. Berova, N., Nakanishi, K. o. & Woody, R. (2000). *Circular dichroism : principles and applications*. 2nd edit, Wiley-VCH, New York.
80. Clarke, J., Cota, E., Fowler, S. B. & Hamill, S. J. (1999). Folding studies of immunoglobulin-like beta-sandwich proteins suggest that they share a common folding pathway. *Structure* **7**, 1145-53.
81. Fersht, A. (1999). *Structure and mechanism in protein science : a guide to enzyme catalysis and protein folding*, W.H. Freeman, New York.
82. Fersht, A. R. (1995). Characterizing transition states in protein folding: an essential step in the puzzle. *Curr Opin Struct Biol* **5**, 79-84.

Thermodynamic and Kinetic Characterization of a Germ Line Human λ 6 Light-Chain Protein: The Relation between Unfolding and Fibrillogenesis

Luis M. Blancas-Mejia¹, Luis A. Tellez¹, Luis del Pozo-Yauner², Baltazar Becerril², Jose M. Sanchez-Ruiz³ and D. Alejandro Fernandez-Velasco^{1*}

¹Laboratorio de Físicoquímica e Ingeniería de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-159, D.F. 04510 México

²Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca 62210, Morelos, México

³Departamento de Química Física, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada 18071 Granada, Spain

Received 26 August 2008; received in revised form 21 November 2008; accepted 21 December 2008
Available online
6 January 2009

Proteins encoded by the gene segment 6a of the λ variable light-chain repertoire are strongly associated with amyloid deposition. 6aJL2 is a model protein constructed with the predicted sequences encoded by the 6a and JL2 germ line genes. In this work, we characterized the urea- and temperature-induced unfolding of 6aJL2. In the short time scale, spectroscopic, hydrodynamic and calorimetric experiments were compatible with a two-state transition. Furthermore, ΔG , m and the midpoint urea concentration obtained from equilibrium experiments were compatible with those obtained from kinetic experiments. Since fibril formation is a slow process, samples were also incubated for longer times. After incubation for several hours at 37 °C, spectroscopic, hydrodynamic and calorimetric experiments revealed the presence of a partially unfolded off-pathway intermediate around the midpoint urea concentration (1.5–3.0 M urea). *In vitro* fibrillogenesis assays show that the maximum growth rate for fibril formation and the minimum lag time were obtained at urea concentrations where the partially unfolded state was populated (2.5 M urea at 37 °C). This indicates that this partially unfolded state is critical for *in vitro* fibril formation. Concentration-dependent kinetics and hydrodynamic properties of the intermediate were consistent with a soluble oligomeric state. The intermediate is formed around the midpoint urea concentration, where the native and unfolded states are equally populated and their rate of interconversion is the slowest. This situation may promote the slow accumulation of an intermediate state that is prone to aggregate.

© 2009 Published by Elsevier Ltd.

Edited by S. Radford

Keywords: amyloidosis; off-pathway intermediate; light chains; transition state; differential scanning calorimetry

Introduction

Light-chain amyloidosis is a fatal disease characterized by the extracellular deposition of otherwise

monomeric and soluble antibody light chains into insoluble fibrillar aggregates, also called amyloids.¹ To understand the molecular basis of amyloidosis, the biophysical properties and *in vitro* fibrillogenesis of light-chain proteins have been extensively studied.^{1–25} A correlation between fibril formation and decreased thermodynamic stability has been documented.^{9,23} In spite of all the information available, the general mechanism of fibril formation in amyloidosis remains unclear. It is known that amyloid fibers are not formed under conditions that favor the native or unfolded states.^{2,5,7,9,10,17,26–29} This suggests that conformational changes, such as the formation of folding inter-

*Corresponding author. E-mail address: fdaniel@servidor.unam.mx.

Present address: L. del Pozo-Yauner, Instituto Nacional de Medicina Genómica, México City, 01900 Mexico.

Abbreviations used: GdnHCl, guanidine hydrochloride; DSC, differential scanning calorimetry; ThT, thioflavin T; PBS, phosphate-buffered saline.

mediates, are required for fibril formation. In fact, it has been documented that mild unfolding conditions favor fibril formation; however, as opposed to other conformational diseases where folding intermediates have been fully characterized,^{28–30} folding intermediates for light chains have been reported only for κ light chains in extreme pH conditions^{7,9,12,13,31} and, more recently, in the presence of guanidine hydrochloride (GdnHCl).¹⁶

One-third of the reported cases of light-chain amyloidosis are related to $\lambda 6$ proteins.^{1,3,32–35} $\lambda 6$ is a subgroup with a low level of expression, encoded by a single gene named *6a*.³⁶ Therefore, it has been proposed that the high level of amyloidogenicity of these proteins is inherent to the properties of the V_L6a gene segment.²³ In previous work, we determined the stability and *in vitro* fibrillogenesis of a recombinant V_L protein named 6aJL2, which contains the amino acid sequence encoded by the 6a and JL2 germ line genes.³⁷ 6aJL2 is a β -sandwich domain formed by 111 amino acid residues. The protein presents a conserved, single tryptophan residue at position 35, quenched in the native state by a conserved disulfide bridge (Fig. 1a). It was found that

6aJL2 is more stable than $\lambda 6$ proteins obtained from patients with multiple myeloma disease. Both the amyloidogenic protein Wil and the non-amyloidogenic protein Jto are less stable than 6aJL2 ($\Delta\Delta G = 9.2$ and 3.7 kJ mol^{-1} , respectively). The GdnHCl-induced unfolding pathway of all these proteins followed a two-state process.^{23,24,37} These data indicated that the propensity of $\lambda 6$ light chains to form amyloid cannot be attributed to thermodynamic instability of the germ-line-encoded 6aJL2 domain.³⁷ To obtain a more complete description of the folding pathway of 6aJL2 and its relation with fibrillogenesis, in the present work, we characterize the equilibrium and kinetic properties of the unfolding and refolding of 6aJL2 promoted by urea and/or temperature, as well as *in vitro* fibril formation in the presence of urea.

Results

Incubation of 6aJL2 in 6–8 M urea produced an increase in fluorescence intensity and a red shift of 24 nm in the maxima of the emission spectra (Fig.

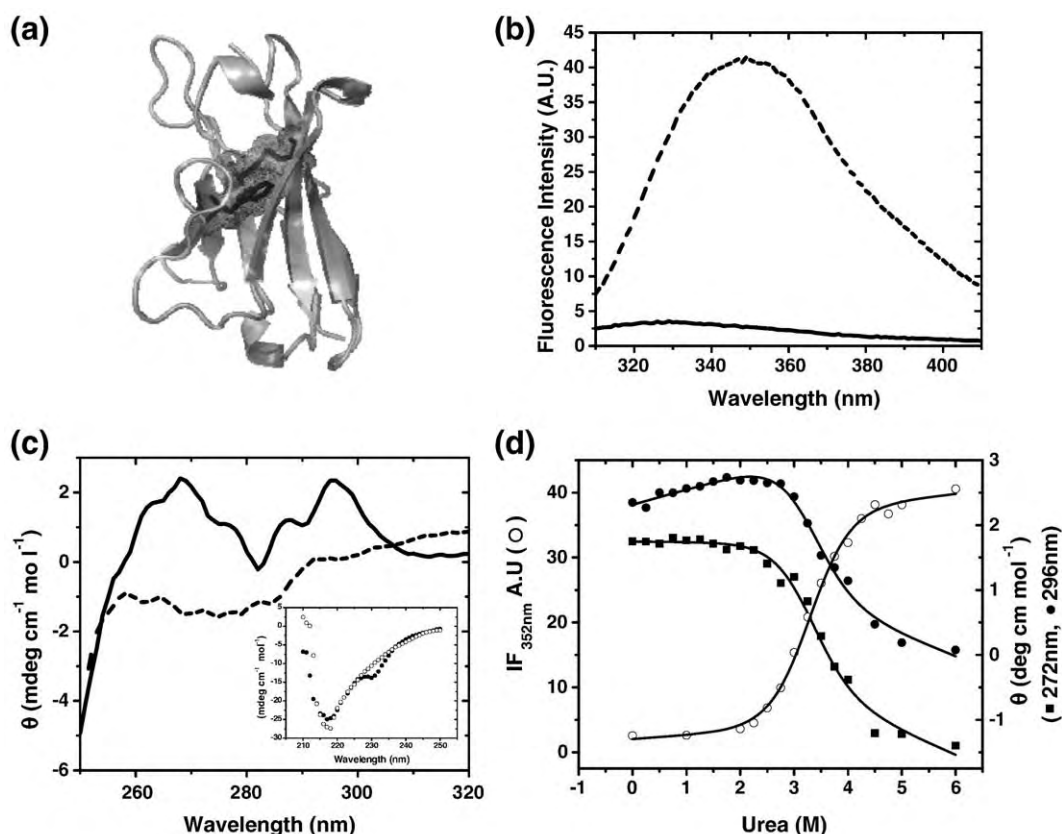


Fig. 1. Structure and spectroscopic properties of 6aJL2. (a) Structural model of 6aJL2, the disulfide bridge and W35 are shown in sticks and dots. Intrinsic fluorescence spectra (b) and near-UV CD spectra (c) of 6aJL2 in PBS buffer (pH 8.0) (solid line) and 6.0 M urea in PBS buffer (pH 8.0) (dashed line). Protein concentrations were 100 and $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ for (b) and (c), respectively. The inset in (c) shows the far-UV CD spectra for 6aJL2 ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$) in PBS buffer (pH 8.0) (filled circles) or 6.0 M urea in PBS buffer (pH 8.0) (open circles). (d) Raw data for changes in the near-UV CD spectra at 272 nm (filled circles), 296 nm (filled squares) or fluorescence intensity at 352 nm (open circles) from experiments carried out at 25 °C. Continuous lines show the fit to a two-state model [Eq. (1)], with $\Delta G = 21.7 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $m = 6.6 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ (Table 1).

1b). These changes reflect the increase in the distance between W35 and the disulfide bridge as well as the exposure of this aromatic ring to the solvent. In addition, unfolding abolished the well-defined aromatic bands observed in the near-UV CD spectra (Fig. 1c). The far-UV CD spectra showed a pronounced minimum at 217 nm and a small shoulder at 230 nm (Fig. 1c, inset); the latter is attributed to aromatic interactions. The disappearance in the shoulder at 230 nm is consistent with the changes observed in the near-UV CD. At 25 and 37 °C, fluorescence and CD showed monophasic and coincident unfolding patterns (Figs. 1d and 2a). Unfolding was reversible and at equilibrium, as deduced from the coincidence of unfolding and refolding data obtained after incubation for 3 min. Unfolding and refolding curves obtained by different techniques were adequately fitted to a two-state process (Figs. 1d and 2a and Table 1).

Stability parameters were also evaluated from kinetic data. Unfolding and refolding kinetics were followed by fluorescence spectroscopy. Single-exponential courses were observed at all urea concentrations tested (see Fig. 2b for representative traces). The chevron plots constructed from these data showed no evident curvature (Fig. 2c). In addition, the midpoints of the equilibrium experiments (3.5 M for 25 °C and 2.4 M for 37 °C) coincide with the bottom of the chevron plots (compare panels a and c in Fig. 2). Moreover, the ΔG values calculated from the ratio of unfolding and refolding kinetic constants and those calculated from equilibrium data are the same within experimental error (Table 1). All these pieces of evidence support the notion that in a time scale of minutes (corresponding to the short incubation times used), the urea-induced unfolding of 6aJL2 can be described in terms of classical two-state behavior from both the equilibrium and kinetic viewpoints.

The thermal unfolding/refolding of 6aJL2 was then studied. Fluorescence intensity data showed a single monophasic and reversible transition. No hysteresis or aggregation was observed. The global fit of unfolding and refolding data gives $\Delta H = 376.1 \pm 6.9 \text{ kJ mol}^{-1}$ and $T_m = 323.2 \pm 1.0 \text{ K}$ (Fig. 3a). The thermal unfolding of 6aJL2 was also studied by differential scanning calorimetry (DSC). All endotherms showed a single transition that was well fitted to a two-state model. The enthalpy recovery on the second scan was higher than 86% (data not shown), corroborating that thermal unfolding is essentially reversible. DSC endotherms were adequately fitted to a "true" two-state model (Fig. 3b), i.e., where the calorimetric and van't Hoff enthalpy changes are the same [Eq. (3)], confirming the two-state nature of the temperature-induced unfolding of 6aJL2. As expected, the ΔH values obtained from these data ($\Delta H = 336.2 \pm 41.9 \text{ kJ mol}^{-1}$; Fig. 3b) were similar to those obtained from fluorescence data analyzed according to the van't Hoff equation [Eq. (2) and Fig. 3a]. The ΔC_p calculated from DSC data obtained in the 0.3–1.1 mg mL⁻¹ range gives $6.8 \pm 0.2 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$. This value is similar to the one

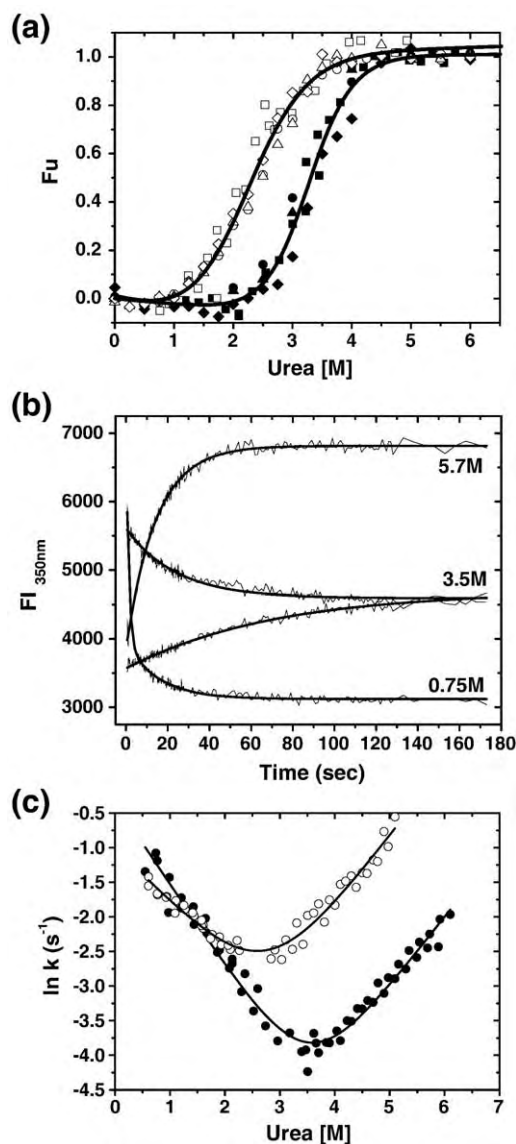


Fig. 2. Equilibrium and kinetics of 6aJL2 unfolding/refolding in urea. (a) Unfolding curves at 25 °C (filled symbols) and 37 °C (open symbols). Samples were incubated for 3 min. Experimental data are from unfolding experiments (circles, fluorescence data; diamonds, CD data), refolding experiments (triangles, fluorescence data), or from the final fluorescence intensity values of kinetic experiments (squares). Continuous lines represent the best fit to a two-state model [Eq. (1); see Table 1 for parameters]. (b) Representative refolding and unfolding kinetic traces obtained at 25 °C. Labels indicate the final urea concentration. Continuous curves are fits to Eq. (5). (c) Chevron plots for 25 °C (filled symbols) and 37 °C (open symbols). Continuous curves were obtained from fit to Eq. (6).

estimated by the parameterisation done by Robertson and Murphy³⁸ based on the number of residues ($\Delta C_p = 6.4 \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$). Isothermal experiments in the presence of urea carried out in the 273–310 K range (similar to those shown in Fig. 2a), as well as thermal unfolding data obtained from fluorescence and DSC, were used to construct the stability curve

Table 1. Thermodynamic and kinetic parameters for 6aJL2 unfolding in urea

Temperature (K)	RTm_f (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	RTm_u (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹)	k_f (s ⁻¹)	k_u (s ⁻¹)	ΔG_u (kJ mol ⁻¹) ^a	m^{kn} (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹) ^a	ΔG_u (kJ mol ⁻¹) ^b	m^{eq} (kJ mol ⁻¹ M ⁻¹) ^b
298.15	2.9±0.1	2.5±0.2	$7.1 \times 10^{-1} \pm 7.0 \times 10^{-1}$	$3.2 \times 10^{-4} \pm 1.1 \times 10^{-4}$	19.0±0.5	5.39	21.7±2.0	6.6±0.6
310.15	2.1±0.2	27±0.2	$3.4 \times 10^{-1} \pm 3.2 \times 10^{-4}$	$2.4 \times 10^{-3} \pm 7.3 \times 10^{-4}$	12.8±0.3	4.71	11.2±1.3	5.1±0.4

^a Kinetic data.^b Equilibrium data.

of 6aJL2 [Eq. (4) and Fig. 3d]. DSC experiments carried out in the presence of urea were reversible and well fitted to a two-state model [Eq. (3) and Fig. 3b]. ΔH showed a linear dependence with T_m , with a slope (7.3 ± 0.2 kJ mol⁻¹ K⁻¹) close to the ΔC_p value directly determined from the post- and pretransition baselines of the DSC transitions. This supports the theory that urea has a very small effect on unfolding enthalpy and suggests that the variation observed is actually a temperature effect linked to the urea dependence of the T_m value (Fig. 3c).

All the data presented above indicate that the unfolding of 6aJL2 is reversible and reaches a dynamic two-state equilibrium in the minutes time scale corresponding to short incubation times. In contrast, fibril formation of 6aJL2 is a very slow process, taking place in a much longer time scale.³⁷ To correlate stability data with fibril formation (*vide infra*), spectroscopic (CD and fluorescence intensity) measurements were determined after incubation for 24 h. The unfolding patterns obtained at 25 °C were very similar after incubation for 3 min or 24 h (Fig. 4a). On the other hand, samples incubated at 37 °C for 3 min were monophasic and coincident between techniques, whereas after incubation for 24 h, fluorescence intensity data showed two transitions and the CD curve was displaced to lower urea concentrations (Fig. 4b). The non-coincidence between different transitions indicates the presence of a partially unfolded intermediate that is populated in the long time scale. The monophasic shift in the near-UV CD profile to lower concentrations of urea (open circles, Fig. 4b) suggests that the local environment of the aromatic residues is unfolded—similar to that in the intermediate. The plateau in the F_U plot derived from fluorescence intensity data is close to 0.7 (filled circles, Fig. 4b), indicating that the quenching effect of the disulfide bridge on the fluorescence of W35 is lower in the intermediate than in the native state. The properties of the intermediate were then studied by following the kinetics of fluorescence changes at different protein concentrations. Samples incubated in 2.4 M urea at 37 °C showed at least two different kinetic processes with clearly different time scales (Fig. 4c). In a short time scale (300 s), a single-exponential increase in fluorescence was detected. This process was almost independent of protein concentration (Fig. 4c, inset) and corresponds to the two-state unfolding equilibrium previously described (Fig. 2a). In contrast, at longer times, a further increment in fluorescence was observed and intensity changes increased with protein concentration (Fig. 4c). These fluorescence changes are not due to light scattering, as deduced from the normalized fluorescence spectra obtained after incubation for 3 min and 24 h (Supplementary Fig. 4). This suggests that an association step is involved in the formation of the intermediate. Kinetic traces in the long time scale showed a sigmoidal-like shape. The non-exponential behavior of these time traces makes difficult the

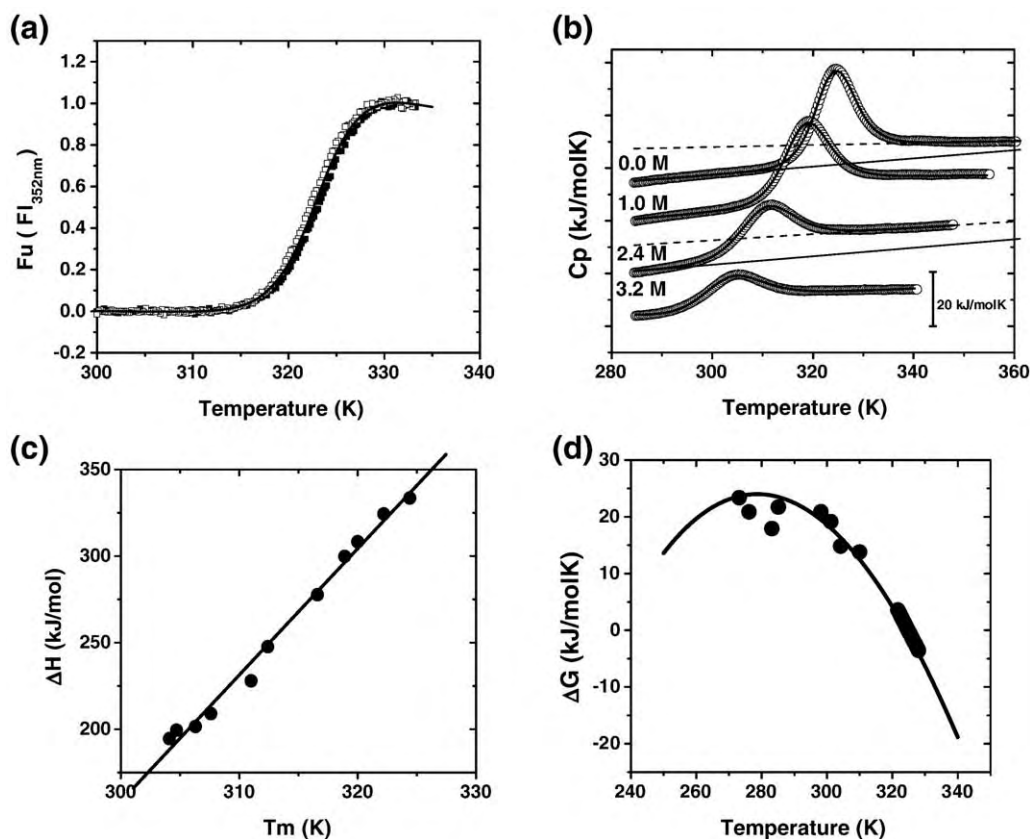


Fig. 3. Thermal unfolding of 6aJL2. (a) Fluorescence intensity unfolding and refolding data (filled and open symbols, respectively) were obtained with a heating/cooling rate of 1 K/min. Continuous lines represent the best fit of unfolding and refolding data with $\Delta H_m = 376.1 \pm 6.9$ kJ/mol and $T_m = 323.2 \pm 1.0$ K [Eq. (2)]. (b) DSC experiments in the presence of the indicated urea concentrations and a scan rate of 2.5 K/min. The continuous traces represent the fitting curves to a two-state model [Eq. (3)]. Continuous and dashed straight lines show the native and unfolding baselines. Endotherms have been displaced in the y -axis for display purposes. (c) ΔH versus T_m at different urea concentrations. The ΔC_p value calculated from the slope = 7.3 ± 0.2 kJ/K mol. (d) Stability curve for 6aJL2. Experimental data at low temperatures were obtained from isothermal urea unfolding curves similar to those shown in Fig. 2a. Data at high temperatures were from (a). The continuous curve was generated using the following parameters obtained from DSC data (b): $\Delta H = 336.2$ kJ/mol, $T_m = 323.7$ K, $\Delta C_p = 6.8$ kJ/mol K and Eq. (4). Quoted errors come from data fitting.

estimation of the rate order. As a first approximation, it was assumed that in the long time scale fluorescence changes increase linearly with time. Initial rate analysis (i.e., a \ln rate versus \ln [protein] plot) showed a slope of 0.29 (Fig. 4d), suggesting that before or after the association step a unimolecular event becomes rate limiting.

To determine the urea-induced changes in the hydrodynamic properties of 6aJL2, size-exclusion chromatography experiments were carried out. First, samples were incubated in different urea concentrations for 3 min before injection to a size-exclusion chromatography column preequilibrated in the same denaturant concentration. Unfolding abolishes the quenching of W35 by the nearby disulfide bridge; therefore, the elution profile of native 6aJL2 is barely detected by fluorescence (Supplementary Fig. 1). For all urea concentrations tested, at both 25 and 37 °C, single symmetric peaks were observed (Fig. 5a and b and Supplementary Fig. 2a and b). For the fluorescence-detected chromatograms, a single peak that increases in quantum

yield and moves towards lower elution volumes with increasing urea concentration was observed (Fig. 5a and b). For the UV-detected chromatograms, the shift in the peaks was observed but the intensity remained constant (Supplementary Fig. 2a and b). This behavior is consistent with a two-state equilibrium faster than that of the chromatographic run. The R_s (Stokes radii) of 6aJL2 increases by nearly 20 Å in going from the native to the unfolded state (filled circles in Figs. 5e and f). In the second experiment, samples were incubated in urea for 24 h before injection into the preequilibrated column. In agreement with spectroscopic experiments, changes between the short and long time scale experiments were more evident at 37 than at 25 °C (Fig. 5). At 37 °C, higher R_s values were observed in the 0.5–3.0 M urea range and two peaks were observed from 1.0 to 2.0 M urea (Fig. 5d and f). Analysis of these chromatograms shows that the intermediate state that appears in the long time scale has an apparent R_s between 19 and 25 Å, i.e., among those of the native and unfolded states (Fig.

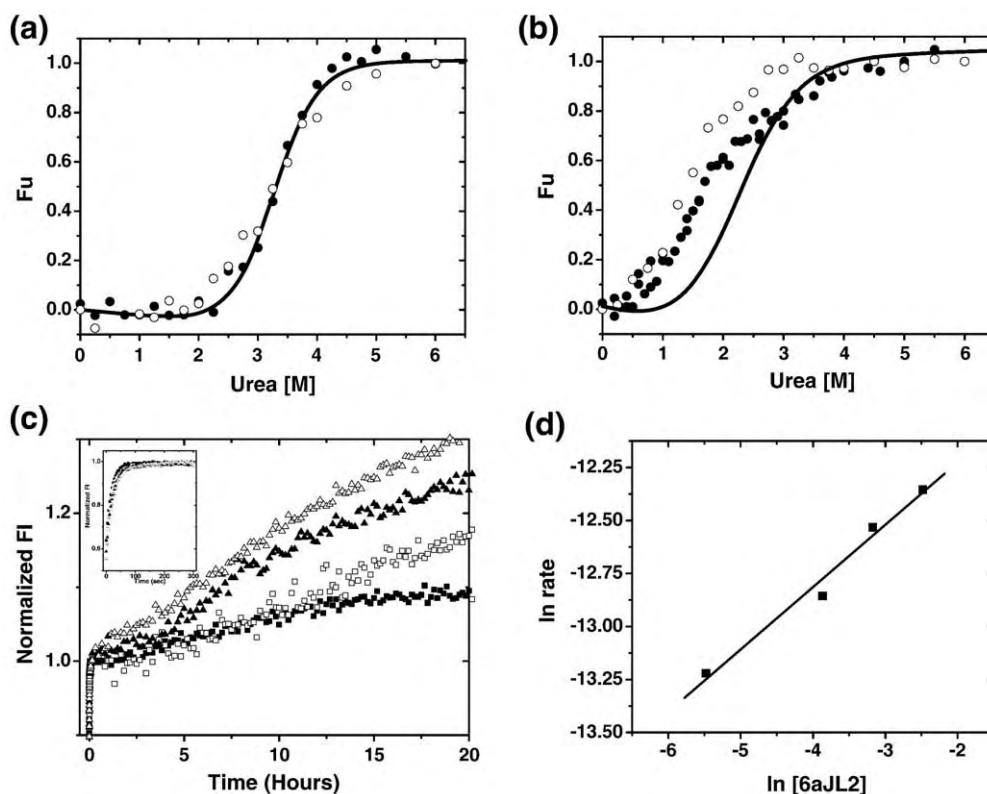


Fig. 4. Unfolding of 6aJL2 in urea after incubation for 24 h. Fluorescence and CD data (filled and open circles, respectively) were obtained after incubation for 24 h at 25 °C (a) and 37 °C (b). For comparison, the fitting curves obtained for short incubation times (see Fig. 2a) are shown as continuous lines. (c) Changes in fluorescence intensity ($\lambda_{\text{ex}}=295$ nm, $\lambda_{\text{em}}=352$ nm) of 6aJL2 samples incubated in 2.4 M urea at 37 °C. Protein concentration was 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (filled squares), 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (open squares), 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (filled triangles) and 1 mg mL^{-1} (open triangles). The inset shows an expansion of the first 300 s; these data fitted to Eq. (5) gave $\tau = 17.4 \pm 0.3$ for 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $\tau = 19.8 \pm 0.3$ for 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $\tau = 23.3 \pm 0.3$ for 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and $\tau = 24.5 \pm 0.3$ for 1.0 mg mL^{-1} . Quoted errors come from data fitting. (d) Data from (c) corresponding to the long time scale (>300 s) were fitted to a straight line; the natural logarithm of the slopes is plotted against ln [protein].

5e and f). The absence of visible protein aggregation and the hydrodynamic profiles obtained exclude the presence of insoluble or high molecular weight aggregates; rather, the apparent R_s values obtained are compatible with the intermediate being an expanded monomer or an oligomeric but soluble state.

The possibility of detecting the thermal unfolding of the intermediate was investigated by DSC. For this purpose, samples were prepared in 2.4 M urea at 37 °C and at different incubation times before the calorimetric scans. Regardless of the incubation time, single endotherms with a T_m of 310.3 ± 0.5 K were obtained (Fig. 6a). Interestingly, a severe decrease of ΔH with incubation time was observed. This is compatible with a fraction of the molecules being irreversibly transformed into aggregates or fibrils. However, in the absence of stirring, fibrils are not formed in these conditions (Fig. 7a and b), and high molecular weight aggregates are not compatible with hydrodynamic data; therefore, it is likely that the enthalpy decrease is related to the irreversible formation of a soluble oligomeric intermediate.

To test the irreversibility of the intermediate, samples incubated for 24 h in 2.4 M urea were transferred to either 0.48 or 6.0 M urea and incubated for 24 h to promote refolding or unfolding. It was found that the sample refolded from 2.4 to 0.48 M urea showed the same fluorescence intensity, hydrodynamic radii and near-UV CD spectra (Supplementary Fig. 3) as those observed for a sample incubated directly in 0.48 M urea. However, the protein did not fully recover its properties; a difference of 17 nm in the maximum emission wavelength of the fluorescence spectra (λ_{max}) was observed. On the other hand, the sample that was unfolded from 2.4 to 6.0 M urea showed the same hydrodynamic radii, near-UV CD spectra and λ_{max} as the sample prepared in 6.0 M urea. Nevertheless, only 73% of the expected increase in fluorescence intensity was observed (Supplementary Fig. 3). All these data indicate that the transitions from the intermediate to the native and unfolded states are only partially reversible at least in the time scale tested (24 h).

To determine the role of the partially unfolded intermediate in fibril formation, fibrillogenesis expe-

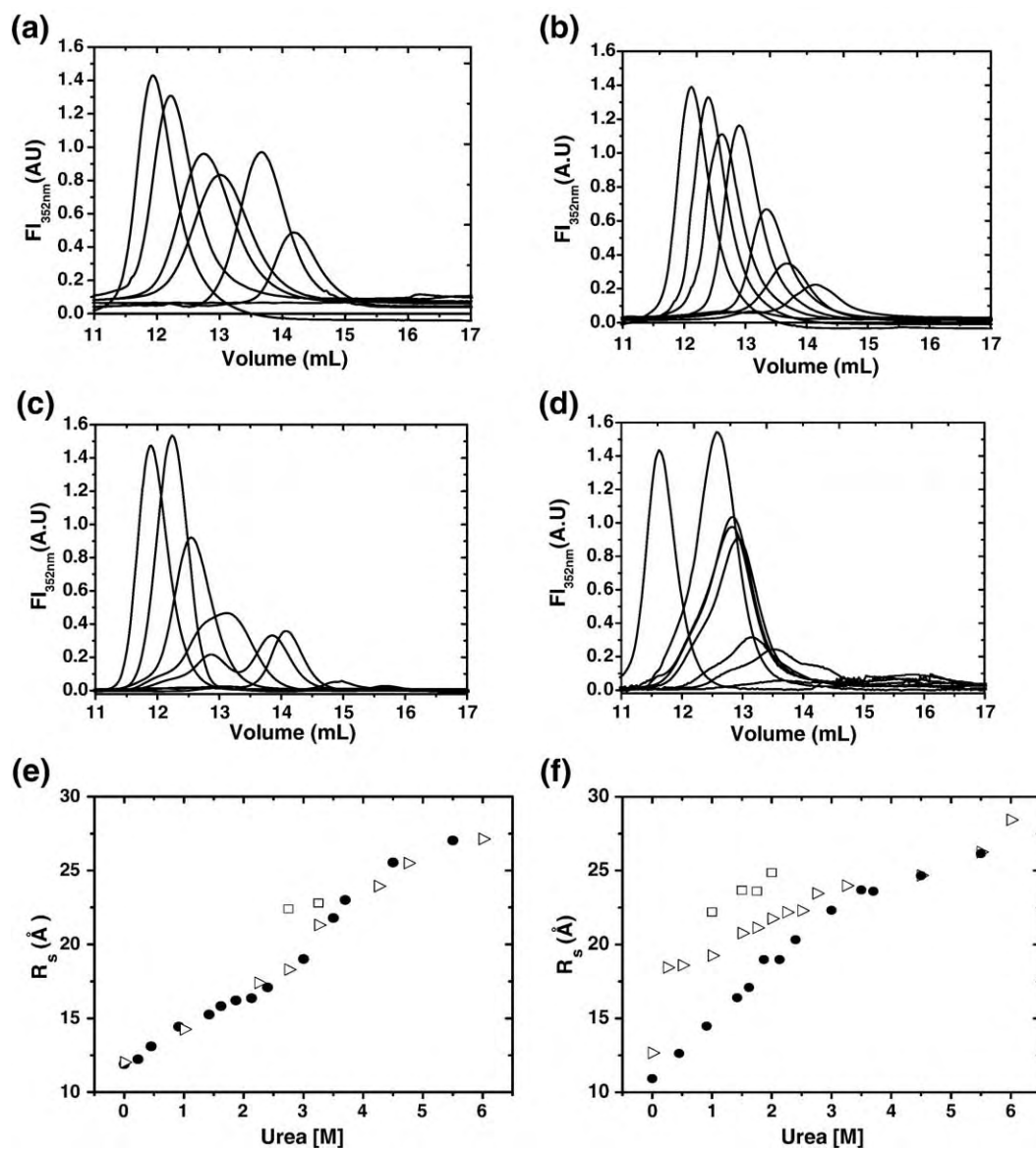


Fig. 5. Size-exclusion chromatography experiments in the presence of urea. 6aJL2 samples (100 $\mu\text{g/mL}$) were incubated for 3 min (a and b) or 24 h (c and d) before injection. The column was equilibrated at the indicated temperature and urea concentration. Representative chromatograms are shown: (a) 25 $^{\circ}\text{C}$, 3 min incubation; urea concentrations were (from left to right) 0.0, 1.0, 2.4, 3.0, 3.5, 3.75, 4.5 and 5.5 M; (b) 37 $^{\circ}\text{C}$, 3 min incubation; urea concentrations were (from left to right) 0.0, 1.0, 2.13, 2.4, 3.0, 3.75, 4.5 and 5.5 M; (c) 25 $^{\circ}\text{C}$, 24 h incubation; urea concentrations were 0.0, 1.0, 2.13, 2.4, 3.0, 3.75, 4.5 and 6.0 M; (d) 37 $^{\circ}\text{C}$, 24 h incubation; urea concentrations were (from left to right) 0.0, 1.0, 1.75, 2.0, 2.25, 2.75, 3.25 and 6.0 M. Elution peaks were detected by intrinsic fluorescence (excitation, $\lambda = 295$ nm; emission, $\lambda = 352$ nm). The 0 M urea traces are not visible in this scale due to fluorescence quenching in the native state (see [Supplementary Material](#)). (e) and (f) show Stokes radii (R_s) versus urea plots from data obtained at 25 and 37 $^{\circ}\text{C}$, respectively. Filled circles show the R_s values of samples incubated for 3 min. For the samples incubated for 24 h, open triangles represent the R_s for the highest peak and open squares show the R_s for the lowest peak.

periments were carried out in the presence of urea. The kinetics of 6aJL2 fibril formation was monitored at 37 $^{\circ}\text{C}$ in the presence of different urea concentrations and following the increase in fluorescence intensity of thioflavin T (ThT) upon binding to fibrils.³⁹ Since fibril formation depends on agitation, two protocols were followed (see [Materials and Methods](#) for details): an orbital shaking well plate assay ([Fig. 7a](#)) and a micro stir bar vial assay ([Fig. 7b](#)). ThT binding kinetics showed an

initial lag phase followed by a rapid enhancement in fluorescence intensity ([Fig. 7a](#) and [b](#)). This complex fibrillogenesis behavior has been observed *in vitro* for 6aJL2, for other immunoglobulin domains and for several unrelated proteins.^{40–44} The initial lag phase has been ascribed to the accumulation of a precursor of fibril formation. The second phase has been related to the kinetics of fibril growth. Empirical parameters for both phases were obtained as follows: (1) Fibril growth rate constants

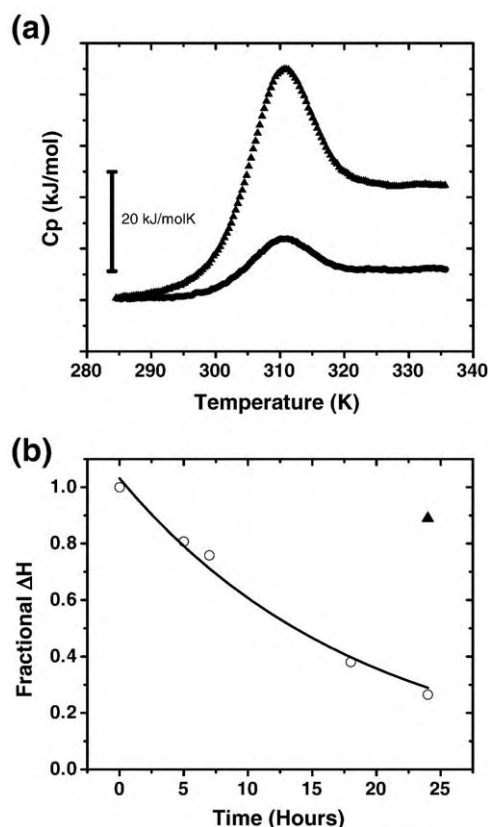


Fig. 6. Decrease in ΔH after incubation in 2.4 M urea and 37 °C. (a) Filled triangles show the endotherm of the sample introduced in the DSC instrument after incubation for 3 min. Filled squares show the endotherm of a sample incubated for 24 h. Lines show the respective rescan. The curves have been displaced in the y -axis for display purposes. (b) Fractional ΔH of samples incubated for different times in 2.4 M urea (ΔH of sample incubated for 3 min in urea = 1.0). The continuous line shows data fitted to a single-exponential decay with a relaxation time of 18.9 h. The filled triangle represents the decrease in ΔH of a sample incubated in 2.4 M urea at 25 °C for 24 h.

were estimated from the slope of the linear part of the growth phase. (2) The lag time was calculated from the extrapolation of this line back to the abscissa.^{23,37} For the orbital shaking assay, significant ThT binding was observed in the 1.75–3.0 M urea range (Fig. 7a and filled symbols in c and d), whereas for the micro stir bar assay (Fig. 7b and open symbols in c and d), ThT fluorescence was observed in all the ranges of urea concentrations used (0.0–3.5 M). Both the inverse of the lag time (Fig. 7c) and fibril growth rate (Fig. 7d) showed maxima in the 2.0–2.75 M urea range. The nucleation time was considerably influenced by the protocol used (compare the two y -axes in Fig. 7c); for example, in 2.5 M urea, t_{lag} was 26.3 h in the orbital shaking assay (Fig. 7a, filled squares) versus 0.5 h in the micro stir bar assay (Fig. 7b, filled squares). Similarly, in the absence of urea, no fibrillogenesis was observed in the orbital shaking experiment ($t_{lag} > 55$ h), whereas in the micro stir

bar experiment, the t_{lag} obtained was 19.4 ± 2.8 h. This value (obtained at pH 8.0) is slightly higher than the t_{lag} previously reported at pH 7.5 (14.2 ± 0.5 h).³⁷ It has been documented that pH and the type of shaking influence the kinetics of fibrillogenesis.^{45–47} It is noteworthy that the range of urea concentration where t_{lag} was shorter and extension rate was higher matched the range of denaturant concentrations where the intermediate was detected (Figs. 4b and 5f).

Discussion

Short time scale: two-state behavior

The stability of 6aJL2 obtained from the urea unfolding experiments reported in this work ($\Delta G_{H_2O}^{25^\circ C} = 21.7 \pm 2.0$ kJ mol⁻¹) is the same as that reported for experiments carried out in GdnHCl ($\Delta G_{H_2O}^{25^\circ C} = 21.7 \pm 0.8$ kJ mol⁻¹).³⁷ This indicates that the unfolding transitions observed in both denaturants are thermodynamically equivalent. Two-state behavior has been observed in most immunoglobulin light chains studied. Reported stability values are between 9.20 and 32.2 kJ mol⁻¹.^{5,9,17,23,48} The stability of 6aJL2 lies between these values.

To test the two-state character of the transition, two spectroscopic techniques were used in equilibrium experiments; in addition, kinetic experiments were carried out. Near-UV CD and fluorescence intensity showed coincident transitions (Fig. 2a). The free-energy changes obtained from equilibrium experiments (ΔG_{eq}) are similar to the values calculated from the ratio of kinetic constants (ΔG_{kin} see Table 1). Kinetic traces in both directions were well described by single-exponential changes (Fig. 2b), no curvature was observed in chevron plots (Fig. 2c), and the bottom of this plot corresponds to the midpoint of equilibrium experiments (compare a and c in Fig. 2). Furthermore, the sum of the kinetic m values are close to the equilibrium m value (Table 1). In addition, hydrodynamic measurements showed a single peak under all the ranges of urea concentrations tested (Fig. 5a and b), indicating a fast dynamic equilibrium between the native and unfolded states. Taken together, these data clearly indicate that when short incubation times (3 min) are used, the unfolding of 6aJL2 can be adequately described as a two-state process.

The folding and unfolding rates of immunoglobulin light chains have not been previously determined. For 6aJL2, the rate constants determined in water (0.707 and 3.2×10^{-4} s⁻¹ for folding and unfolding, respectively) are among the slowest values reported for two-state folding proteins.⁴⁹ However, these kinetic rates are in the range of those reported for other immunoglobulin-like β -sandwich domains.⁵⁰ The Tanford β values obtained from the ratio of unfolding and equilibrium m values⁵¹ ($\beta = RT(m_F/m_{eq}) = 0.44$ for 25 °C and 0.40 for 37 °C) indicate that at both temperatures, the area buried in

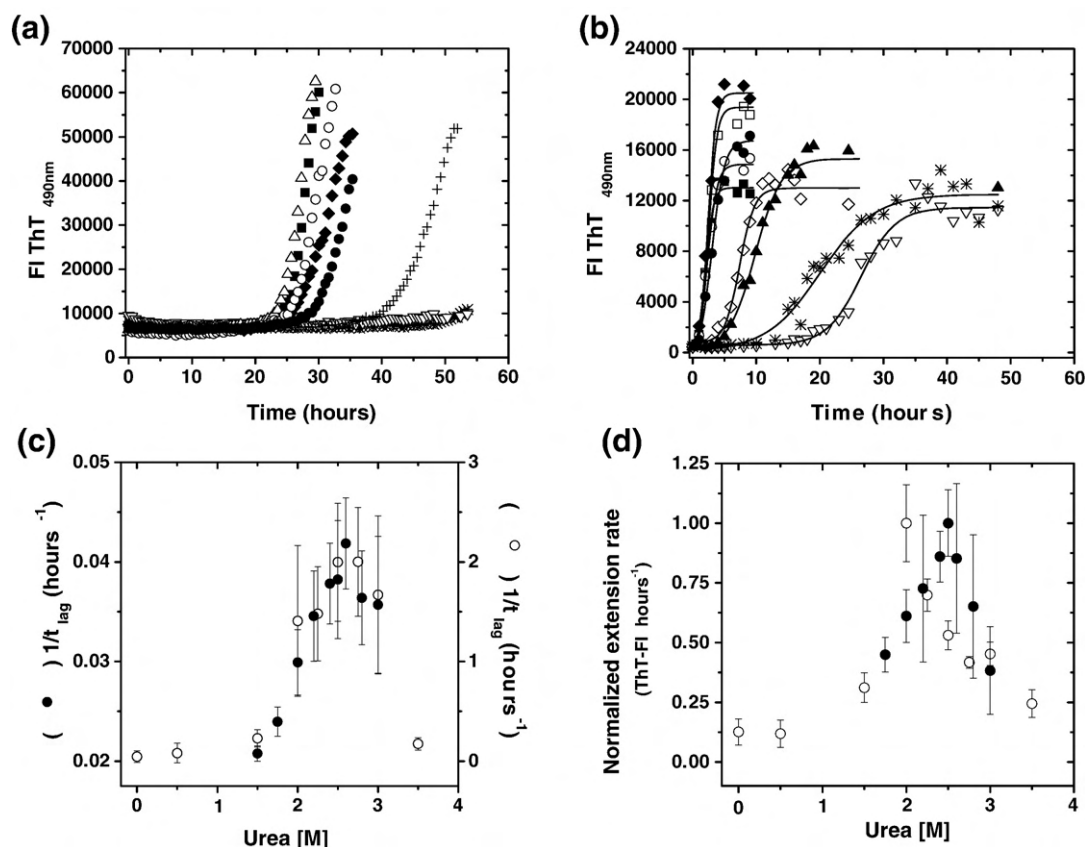


Fig. 7. *In vitro* fibril formation of 6aJL2. Representative kinetic traces of 6aJL2 fibril formation for the microorbital shaking assay (a) and the magnetic micro stir bar assay (b). Assays were carried out at 37°C and 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Urea concentrations in (a) were 0.0 (∇), 0.5 (*), 1.75 (+), 2.0 (◆), 2.5 (■), 2.6 (△), 2.8 (○) and 3.0 M (●). The urea concentrations tested in (b) were 0.0 (∇), 0.5 (*), 1.5 (◇), 2.0 (◆), 2.25 (□), 2.5 (■), 2.75 (○), 3.0 (●) and 3.5 M (▲). Continuous curves are drawn to guide the eye. ThT fluorescence was determined as described in [Materials and Methods](#). The inverse of lag time (c) and the normalized growth rate (d) obtained from both assays are shown. Open symbols represent data from the orbital shaking assay data; filled symbols represent data from the magnetic micro stir bar assay.

the transition state is slightly less than half of the total area change. These β values are somewhat lower than those reported for other β -sandwich proteins⁵⁰, suggesting an earlier transition state for 6aJL2.

Calorimetric and spectroscopic data also indicate that the thermal unfolding of 6aJL2 is a two-state process (Fig. 3a and b). In addition, there is agreement between isothermal urea unfolding experiments carried out at different temperatures and DSC unfolding data (Fig. 3d). All these data indicate that with or without urea the thermal unfolding of 6aJL2 is a two-state process.

Long time scale: an off-pathway intermediate and fibril formation

Fibril formation is a complex multistep process for which mechanisms have been proposed.⁵² The link between unfolding and fibril aggregation depends on the particular protein. For κ light chains, Fink and coworkers have proposed a general scheme where partially folded intermediates associate first into soluble oligomers and then into a critical fibrillation nucleus that subsequently produces fibrillar species.^{7,16,19–21} For other light chains, unfolding

transitions are two state, although in these cases the precursor for fibril formation is not detected, and a correlation between a decrease in thermodynamic stability and an increase in fibril formation has been documented.^{9,23}

At short time scales, the unfolding of 6aJL2 promoted by temperature and urea can be described as a two-state process; however, at long time scales (several hours) and at urea concentrations near the midpoint of the unfolding curve, spectroscopic, chromatographic and calorimetric data indicate the presence of a partially unfolded state that is not in equilibrium with the native and unfolded molecules. The long time required for intermediate formation and the inability of this state to reach the fully folded or fully unfolded states indicate that this partially unfolded state is an off-pathway folding intermediate. This intermediate is observed at the same urea concentrations where the maximal growth rate and minimal lag time for fibril formation were observed; therefore, it is very likely that this partially unfolded state is a critical precursor for fibril formation. Regarding the properties of the intermediate, their spectroscopic properties are between those of the native and unfolded states; hydrodynamic data

are compatible with those of an expanded monomer or a compact oligomer. Fluorescence changes indicate that formation of the intermediate became faster at higher protein concentration. This behavior is expected for an association reaction; however, an initial-rate estimation of the reaction order indicates that this process is partially governed by a unimolecular reaction, suggesting that fluorescence changes do not correspond to a single event. The intermediate is formed in the same conditions where fibril formation was favored, since this state is an off-pathway intermediate and is not in equilibrium with the native and unfolded states; it is likely that the intermediate is related to the nucleation step that commits the pre-nucleus to a net irreversible aggregate.⁵³

Regarding the assembly of the partially unfolded state, it may be formed from a barely populated folding intermediate, as observed for κ light chains^{16,19,21} and other amyloidogenic proteins such as beta 2-microglobulin.^{28,29} In this work, the highest population of the partially unfolded state was detected at 37 °C at urea concentrations around the midpoint of the short-time-scale unfolding curve. Under these conditions, native and unfolded states are equally populated; moreover, the rate of inter-conversion between these states is the slowest. This situation could promote the slow accumulation of an intermediate state that is prone to aggregate.

Materials and Methods

Chemicals

Water was Milli-Q grade. Yeast extract and tryptone were from Difco. Other reagents were from Sigma-Aldrich.

Expression and purification of recombinant 6aJL2

Purification was carried out as reported by del Pozo Yauner *et al.*³⁷ Briefly, the recombinant V_L domain 6aJL2 was purified from BL21 *Escherichia coli* cells transformed with plasmid *pSyn1-6aJL2*. The overexpressed protein was extracted by osmotic shock from the periplasm with 20% (w/v) cold sucrose, 0.1 M Tris, 0.1 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid, pH 8.0) buffer followed by distilled cold water. The periplasmic extract was concentrated by ultrafiltration with a molecular mass cutoff of 10 kDa and loaded into a Superdex-75 prep size-exclusion column (Amersham Pharmacia). Protein purity was determined by SDS-PAGE. Protein concentration was determined by UV absorption using an extinction coefficient $\epsilon = 1.2327 \text{ mg}^{-1} \text{ cm}^{-1} \text{ mL}$ calculated from the amino acid sequence using the software ProtParam, available at the Expasy Web site†. Protein was stored at 4 °C.

Intrinsic tryptophan fluorescence

Fluorescence measurements were made using an ISS PC1 spectrofluorometer. Temperature was regulated within

± 0.02 °C with a Peltier system. All samples ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) were incubated in phosphate-buffered saline (PBS) buffer (50 mM phosphate, 100 mM NaCl, pH 8.0) containing variable amounts of urea at different temperatures. Samples were excited at 295 nm (2-mm bandwidth); the emission spectra were collected in the 310- to 410-nm range (4-mm bandwidth). Fluorescence intensity data at 352 nm were plotted *versus* urea concentration.

Circular dichroism

CD measurements were made using a JASCO J-715 spectropolarimeter with a 4-mL quartz cuvette (near-UV CD) or 1.0-mm path-length cells (far-UV CD). Temperature was regulated within ± 0.02 °C with a Peltier system. All samples ($500 \mu\text{g mL}^{-1}$ for near-UV CD or $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ for far-UV CD) were incubated in PBS buffer (50 mM phosphate, 100 mM NaCl, pH 8.0) containing variable amounts of urea. The ellipticity spectra were collected in the 250- to 320-nm range for near-UV measurements or 210–250 nm for far-UV measurements (4-mm bandwidth).

Thermodynamic parameters from spectroscopic data were calculated by nonlinear least-squares fitting to the following scheme.

Two-state model between native (N) and unfolded (U) states $N \leftrightarrow U$:

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

where y_{obs} is the observed signal; y_N and y_U are the signals for native and unfolded states, respectively; $\Delta G_{H_2O}^\circ$ is the free energy of unfolding in the absence of denaturant; [D] is urea concentration; and m is $\delta\Delta G/\delta[D]$. The pre- and posttransition baselines are described by the linear slopes m_N and m_U , respectively.^{54,55}

Thermal unfolding followed by fluorescence

Samples ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) were placed into a 500- μL quartz cuvette. Changes in tryptophan fluorescence were measured at 352 nm (2-mm bandwidth) using an excitation wavelength of 295 nm (4-mm bandwidth). Temperature was ramped from 25 to 60 °C at a rate of 1 °C min^{-1} followed by cooling to 25 °C using the same rate. Thermal unfolding data were converted to F_U taking into account pre- and posttransition linear baselines. Data were analyzed using the thermal equivalent of Eq.(1):

$$F_U = \frac{e^{-(\Delta H_m/RT + \Delta H_m/RT_m)}}{1 + e^{-(\Delta H_m/RT + \Delta H_m/RT_m)}} \quad (2)$$

where T is temperature, T_m is the temperature of the midpoint and ΔH_m is the enthalpy at T_m .⁵⁶

Differential scanning calorimetry

DSC experiments were carried out with a VP-Capillary DSC System instrument (MicroCal, Northampton, MA) at several scan rates. Protein concentration was 1.0 mg mL^{-1} in 50 mM phosphate buffer (pH 8.0) containing 100 mM NaCl and variable amounts of urea. Thermal unfolding curves were analyzed with MicroCal Origin 7.0 software.

† <http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>

Thermodynamic parameters were calculated by nonlinear least-squares fitting to a two-state model.⁵⁷

$$C_{p,exc} = [A + B(T - T^0)] + [(C + D(T + T^0)) - (A + B(T - T^0))] \times \frac{e^{-\frac{\Delta H}{R}(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m})}}{1 + e} + \frac{\Delta H^2}{RT^2} \times \frac{e^{-\frac{\Delta H}{R}(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_m})}}{(1 + e)^2} \quad (3)$$

where T is temperature, T^0 is a reference temperature (330 K), T_m is the denaturation temperature (defined as the temperature at which the unfolding equilibrium constant is unity) and ΔH_m is the enthalpy change at T_m . A and C are the values of C_p at T^0 for the native and unfolded states, respectively, whereas B and D are the slopes of the native and unfolded baselines, respectively. This equation neglects the temperature dependence of the unfolding heat capacity within the comparatively narrow temperature range of the calorimetric transition. T_m did not change with scan rate in the 0.5–2.5 K min⁻¹ range, indicating that equilibrium was reached in the conditions used. ΔC_p was obtained from experiments carried out at different 6aJL2 concentrations (0.3–1.1 mg mL⁻¹).⁵⁸

ΔC_p , ΔH_m and T_m obtained from DSC experiments were used to estimate $\Delta G(T)$.

$$\Delta G(T) = \Delta H_m(1 - T/T_m) - \Delta C_p[(T_m - T) + T \ln(T/T_m)] \quad (4)$$

Kinetic experiments

Kinetic experiments were carried out at 25 and 37 °C using a FLUOstar Optima (BMG Labtech) multiplate reader fluorometer with an excitation wavelength filter of 295 nm and an emission wavelength filter of 350 nm. Final protein concentration was 100 μ g mL⁻¹. Unfolding experiments were carried out at urea concentrations higher than the midpoint urea concentration (3.5 M urea for 25 °C and 2.5 M for 37 °C). For refolding experiments, 1.0 mg mL⁻¹ protein stock was denatured in 6 M urea for 2 h and refolded by dilution at urea concentrations below the midpoint urea concentration. The temperatures of urea and protein solutions were measured before mixing. The reaction started by the addition of the protein and was followed for 3 min. Kinetics were fitted using a single-exponential decay:

$$FI_{obs} = FI_0 + Ae^{-t/\tau} \quad (5)$$

where FI_0 is the final fluorescence intensity value, A is the amplitude, t is time and τ is the inverse of the reaction rate. From these data, chevron plots were obtained and kinetic constants in the absence of denaturant were calculated with the following equation:^{49,51}

$$\ln k_{obs} = \ln(k_f^{H_2O} e^{-mk_f[urea]} + k_u^{H_2O} e^{-mk_u[urea]}) \quad (6)$$

where $k_f^{H_2O}$ and $k_u^{H_2O}$ are the folding and unfolding kinetic constants in the absence of denaturant, respectively. Unfolding kinetics in 2.4 M urea were also followed at longer incubation times using an ISS PC1 spectrofluorometer (see above). Protein concentration in these experiments varied between 50 and 1000 μ g mL⁻¹; consequently, cell path length (0.5 or 1.0 cm) as well as excitation (0.5 to 1.0 mm) and emission (1.0 to 2.0 mm) slits were modified according to protein concentration. Sample illumination was minimized to avoid photobleaching.

Size-exclusion chromatography

Chromatography experiments were carried out at 25 or 37 °C with a Superdex-75 HR 10/30 (Amersham Pharmacia) analytical size-exclusion column that was properly temperature-controlled with the use of a home-made circulating water bath connected to the column. Buffers were temperature controlled with a water bath. The column was coupled to a fast protein liquid chromatography system (Amersham Pharmacia) equipped with a Waters 747 fluorescence detector. Excitation was done at 295 nm and emission was followed at 352 nm. Samples were incubated under the same conditions used for spectroscopic measurements. The column was equilibrated at the corresponding urea concentration before sample loading. Chromatographic runs were carried out at 0.5 mL min⁻¹. Injections contained 100 μ L of 100 μ g mL⁻¹ protein solutions. Stokes radii (R_s) were calculated by interpolation to a calibration curve constructed using eight well-characterized proteins as standards under both native and unfolding conditions.⁵⁹ Calibration curves were carried out at 25 and 37 °C in the presence of urea. The filtration properties of the Superdex-75 matrix were not modified by the presence of urea or the increase in temperature. R_s values were calculated with the following equations:

$$1000/V_e = (47.7 \pm 2.9) + (1.3 \pm 0.1)R_s \quad \text{for } 25^\circ\text{C}$$

$$1000/V_e = (48.9 \pm 2.5) + (1.3 \pm 0.1)R_s \quad \text{for } 37^\circ\text{C}.$$

In vitro fibril formation assays

In vitro fibrillogenesis assays were carried out by monitoring the enhancement of fluorescence intensity of ThT when binding to amyloid fibrils.³⁹ Samples of 6aJL2 (200 μ g mL⁻¹) were prepared in PBS buffer (50 mM phosphate, 100 mM NaCl, pH 8.0) containing variable amounts of urea; each sample was run in triplicate. Two protocols were employed. (1) In the orbital shaking assay, 250- μ L protein solutions containing 10 μ M ThT were prepared in black 96-well plates (Corning), sealed with Mylar plate sealers (Dynex) and loaded into the fluorescence plate reader at 37 °C. Samples were continuously shaken with an orbital diameter of 1 mm. Fluorescence data were measured in a multiplate FLUOstar Optima fluorometer (BMG Labtech) at 3-min intervals with an excitation wavelength filter of 450 nm and an emission wavelength filter of 490 nm. (2) In the magnetic micro stir bar assay, 6 mL of protein solutions were incubated in flat-bottomed screw-capped polypropylene vials. Samples were continuously stirred at 250 rpm with Teflon-coated micro stir bars (2 mm \times 10 mm) in a multipoint Variomag magnetic stirrer placed inside a Brinkman incubator set at 37 °C. Aliquots (100 μ L) were transferred at different times to polystyrene cells containing 2.6 mL of 10 μ M ThT. Fluorescence intensity was measured in the ISS PC1 spectrofluorometer, using an excitation wavelength of 450 nm (1-mm slits) and an emission wavelength of 490 nm (1-mm slits). Fibril growth rate constants were obtained from the slope of the linear part of the growth phase. An estimated value of the lag time was obtained from the extrapolation of this line back to the abscissa.^{23,37}

Both fibril growth rate and (lag time)⁻¹ (y) obtained at different urea concentrations (D) were fitted to the following equation that describes the mol fraction of intermediate molecules:

$$y = \frac{y_0 e^{m'D/RT}}{1 + e^{m(D-C_m)/RT}} \quad (7)$$

where y_0 is the value of the fibril growth rate or the (lag time)⁻¹ in the absence of denaturant, m and m' are $\delta\Delta G/\delta D$ for the native to unfolded transition and for the native to intermediate transition, respectively. Midpoint urea concentration is the urea concentration at the midpoint of the native to unfolded transition. This model assumes the presence of an intermediate that is sequestered by the fibril formation and therefore is not significantly populated at equilibrium.

Acknowledgements

We thank E. Ortíz and I. Velazquez for help with protein purification.

This work was partially supported by CONACYT grants (43592 and 41328), PAPIIT grants (IN218707 and IN-220707) and Junta de Andalucía. Part of this work was performed by D.A.F.-V during a sabbatical stay at the Departamento de Ciencias Naturales and the Departamento de Química, Universidad Autónoma Metropolitana, México, and the Departamento de Química Física, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, España.

Supplementary Data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.jmb.2008.12.069](https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.12.069)

References

- 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**, 453–460.
- Bliznyukov, O. P., Kozmin, L. D., Vysotskaya, L. L., Golenkov, A. K., Tishchenko, V. M., Samoylovich, M. P. & Klimovich, V. B. (2005). Human immunoglobulin light chains lambda form amyloid fibrils and granular aggregates in solution. *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 458–466.
- 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.
- Deret, S., Chomilier, J., Huang, D. B., Preud'homme, J. L., Stevens, F. J. & Aucouturier, P. (1997). Molecular modeling of immunoglobulin light chains implicates hydrophobic residues in non-amyloid light chain deposition disease. *Protein Eng.* **10**, 1191–1197.
- Hurler, 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.
- Ionescu-Zanetti, C., Khurana, R., Gillespie, J. R., Petrick, J. S., Trabachino, L. C., Minert, L. J. *et al.* (1999). Monitoring the assembly of Ig light-chain amyloid fibrils by atomic force microscopy. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 13175–13179.
- 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.
- Khurana, R., Ionescu-Zanetti, C., Pope, M., Li, J., Nielson, L., Ramirez-Alvarado, M. *et al.* (2003). A general model for amyloid fibril assembly based on morphological studies using atomic force microscopy. *Biophys. J.* **85**, 1135–1144.
- 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**, 1570–1574.
- Kim, Y. S., Cape, S. P., Chi, E., Raffin, R., Wilkins-Stevens, P., Stevens, F. J. *et al.* (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. & Carpenter, J. F. (2002). Kinetics and energetics of assembly, nucleation, and growth of aggregates and fibrils for an amyloidogenic protein. Insights into transition states from pressure, temperature, and co-solute studies. *J. Biol. Chem.* **277**, 27240–27246.
- Martsev, S. P., Dubnovitsky, A. P., Vlasov, A. P., Hoshino, M., Hasegawa, K., Naiki, H. & Goto, Y. (2002). Amyloid fibril formation of the mouse V(L) domain at acidic pH. *Biochemistry*, **41**, 3389–3395.
- Nowak, M. (2004). Immunoglobulin kappa light chain and its amyloidogenic mutants: a molecular dynamics study. *Proteins*, **55**, 11–21.
- O'Nuallain, B., Allen, A., Kennel, S. J., Weiss, D. T., Solomon, A. & Wall, J. S. (2007). Localization of a conformational epitope common to non-native and fibrillar immunoglobulin light chains. *Biochemistry*, **46**, 1240–1247.
- Pokkuluri, P. R., Gu, M., Cai, X., Raffin, R., Stevens, F. J. & Schiffer, M. (2002). Factors contributing to decreased protein stability when aspartic acid residues are in beta-sheet regions. *Protein Sci.* **11**, 1687–1694.
- 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.
- Raffin, R., Dieckman, L. J., Szpunar, M., Wunschl, C., Pokkuluri, P. R., Dave, P., Wilkins *et al.* (1999). Physicochemical consequences of amino acid variations that contribute to fibril formation by immunoglobulin light chains. *Protein Sci.* **8**, 509–517.
- Schormann, N., Murrell, J. R., Liepnieks, J. J. & Benson, M. D. (1995). Tertiary structure of an amyloid immunoglobulin light chain protein: a proposed model for amyloid fibril formation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 9490–9494.
- 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.
- Souillac, P. O., Uversky, V. N., Millett, I. S., Khurana, R., Doniach, S. & Fink, A. L. (2002). Effect of association state and conformational stability on the kinetics of immunoglobulin light chain amyloid fibril formation at physiological pH. *J. Biol. Chem.* **277**, 12657–12665.
- Souillac, P. O., Uversky, V. N., Millett, I. S., Khurana, R., Doniach, S. & Fink, A. L. (2002). Elucidation of the

- molecular mechanism during the early events in immunoglobulin light chain amyloid fibrillation. Evidence for an off-pathway oligomer at acidic pH. *J. Biol. Chem.* **277**, 12666–12679.
22. Stevens, F. J., Myatt, E. A., Chang, C. H., Westholm, F. A., Eulitz, M., Weiss, D. T. *et al.* (1995). A molecular model for self-assembly of amyloid fibrils: immunoglobulin light chains. *Biochemistry*, **34**, 10697–10702.
 23. 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.
 24. 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.
 25. 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.
 26. Dobson, C. M. (2004). Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**, 3–16.
 27. Calamai, M., Chiti, F. & Dobson, C. M. (2005). Amyloid fibril formation can proceed from different conformations of a partially unfolded protein. *Biophys. J.* **89**, 4201–4210.
 28. Chiti, F., De Lorenzi, E., Grossi, S., Mangione, P., Giorgetti, S., Caccialanza, G. *et al.* (2001). A partially structured species of beta 2-microglobulin is significantly populated under physiological conditions and involved in fibrillogenesis. *J. Biol. Chem.* **276**, 46714–46721.
 29. Chiti, F., Mangione, P., Andreola, A., Giorgetti, S., Stefani, M., Dobson, C. M. *et al.* (2001). Detection of two partially structured species in the folding process of the amyloidogenic protein beta 2-microglobulin. *J. Mol. Biol.* **307**, 379–391.
 30. Williams, A. D., Portelius, E., Kheterpal, I., Guo, J. T., Cook, K. D., Xu, Y. & Wetzel, R. (2004). Mapping abeta amyloid fibril secondary structure using scanning proline mutagenesis. *J. Mol. Biol.* **335**, 833–842.
 31. Kim, Y. S., Randolph, T. W., Manning, M. C., Stevens, F. J. & Carpenter, J. F. (2003). Congo red populates partially unfolded states of an amyloidogenic protein to enhance aggregation and amyloid fibril formation. *J. Biol. Chem.* **278**, 10842–10850.
 32. Abe, M., Ozaki, S., Wolfenbarger, D., deBram-Hart, M., Weiss, D. T. & Solomon, A. (1994). Variable-region subgroup distribution among lambda-type immunoglobulins in normal human serum. *J. Clin. Lab. Anal.* **8**, 4–9.
 33. 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.
 34. Solomon, A., Weiss, D. T., Murphy, C., Fu, S. M. & Robbins, D. L. (1994). Chemical and serologic characterization of human lambda VIII light chains. *J. Immunol.* **153**, 1658–1664.
 35. Perfetti, V., Casarini, S., Palladini, G., Vignarelli, M. C., Klersy, C., Diegoli, M. *et al.* (2002). Analysis of V (lambda)-J(lambda) expression in plasma cells from primary (AL) amyloidosis and normal bone marrow identifies 3r (lambdaIII) as a new amyloid-associated germline gene segment. *Blood*, **100**, 948–953.
 36. Williams, S. C., Frippiat, J. P., Tomlinson, I. M., Ignatovich, O., Lefranc, M. P. & Winter, G. (1996). Sequence and evolution of the human germline V lambda repertoire. *J. Mol. Biol.* **264**, 220–232.
 37. Del Pozo Yauner, L., Ortiz, E., Sanchez, R., Sanchez-Lopez, R., Guereca, 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.
 38. Robertson, A. D. & Murphy, K. P. (1997). Protein structure and the energetics of protein stability. *Chem. Rev.* **97**, 1251–1268.
 39. Wall, J., Murphy, C. L. & Solomon, A. (1999). In vitro immunoglobulin light chain fibrillogenesis. *Methods Enzymol.* **309**, 204–217.
 40. Serio, T. R., Cashikar, A. G., Kowal, A. S., Sawicki, G. J., Moslehi, J. J., Serpell, L. *et al.* (2000). Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant. *Science*, **289**, 1317–1321.
 41. Uversky, V. N., Li, J., Souillac, P., Millett, I. S., Doniach, S., Jakes, R. *et al.* (2002). Biophysical properties of the synucleins and their propensities to fibrillate: inhibition of alpha-synuclein assembly by beta and gamma-synucleins. *J. Biol. Chem.* **277**, 11970–11978.
 42. Pedersen, J. S., Christensen, G. & Otzen, D. E. (2004). Modulation of S6 fibrillation by unfolding rates and gatekeeper residues. *J. Mol. Biol.* **341**, 575–588.
 43. Chiti, F. & Dobson, C. M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 333–366.
 44. Wilson, M. R., Yerbury, J. J. & Poon, S. (2008). Potential roles of abundant extracellular chaperones in the control of amyloid formation and toxicity. *Mol. Biosyst.* **4**, 42–52.
 45. Xue, W. F., Homans, S. W. & Radford, S. E. (2008). Systematic analysis of nucleation-dependent polymerization reveals new insights into the mechanism of amyloid self-assembly. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105**, 8926–8931.
 46. Nielsen, L., Khurana, R., Coats, A., Frokjaer, S., Brange, J., Vyas, S. *et al.* (2001). Effect of environmental factors on the kinetics of insulin fibril formation: elucidation of the molecular mechanism. *Biochemistry*, **40**, 6036–6046.
 47. Petkova, A. T., Yau, W. M. & Tycko, R. (2006). Experimental constraints on quaternary structure in Alzheimer's beta-amyloid fibrils. *Biochemistry*, **45**, 498–512.
 48. Chung, C. M., Chiu, J. D., Connors, L. H., Gursky, O., Lim, A., Dykstra, A. B. *et al.* (2005). Thermodynamic stability of a kappa1 immunoglobulin light chain: relevance to multiple myeloma. *Biophys. J.* **88**, 4232–4242.
 49. Maxwell, K. L., Wildes, D., Zarrine-Afsar, A., De Los Rios, M. A., Brown, A. G., Friel, C. T. *et al.* (2005). Protein folding: defining a “standard” set of experimental conditions and a preliminary kinetic data set of two-state proteins. *Protein Sci.* **14**, 602–616.
 50. Clarke, J., Cota, E., Fowler, S. B. & Hamill, S. J. (1999). Folding studies of immunoglobulin-like beta-sandwich proteins suggest that they share a common folding pathway. *Structure*, **7**, 1145–1153.
 51. Fersht, A. (1999). *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding* W. H. Freeman, New York.
 52. O’Nuallain, B., Thakur, A. K., Williams, A. D., Bhattacharyya, A. M., Chen, S., Thiagarajan, G. & Wetzel, R. (2006). Kinetics and thermodynamics of amyloid assembly using a high-performance liquid

- chromatography-based sedimentation assay. *Methods Enzymol.* **413**, 34–74.
53. Andrews, J. M. & Roberts, C. J. (2007). A Lumry–Eyring nucleated polymerization model of protein aggregation kinetics: 1. Aggregation with pre-equilibrated unfolding. *J. Phys. Chem. B*, **111**, 7897–7913.
 54. Bolen, D. W. & Santoro, M. M. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 2. Incorporation of ΔG degrees N–U values in a thermodynamic cycle. *Biochemistry*, **27**, 8069–8074.
 55. Santoro, M. M. & Bolen, D. W. (1988). Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alpha-chymotrypsin using different denaturants. *Biochemistry*, **27**, 8063–8068.
 56. Eftink, M. R. (1995). Use of multiple spectroscopic methods to monitor equilibrium unfolding of proteins. *Methods Enzymol.* **259**, 487–512.
 57. Ibarra-Molero, B., Makhatadze, G. I. & Sanchez-Ruiz, J. M. (1999). Cold denaturation of ubiquitin. *Biochim. Biophys. Acta*, **1429**, 384–390.
 58. Guzman-Casado, M., Parody-Morreale, A., Robic, S., Marqusee, S. & Sanchez-Ruiz, J. M. (2003). Energetic evidence for formation of a pH-dependent hydrophobic cluster in the denatured state of *Thermus thermophilus* ribonuclease H. *J. Mol. Biol.* **329**, 731–743.
 59. Uversky, V. N. (1993). Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule. *Biochemistry*, **32**, 13288–13298.