



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Regiones implicadas en la estabilidad termodinámica y formación de fibra de la cadena ligera  $\lambda 3r$  humana y su relación con la amiloidosis AL“

### TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

### PRESENTA:

M. en C. Miryam Ivette Villalba Velázquez

### TUTOR PRINCIPAL

Dr. Baltazar Becerril Luján  
Instituto de Biotecnología de la UNAM

### MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velasco,  
Facultad de Medicina UNAM

Dr. Lorenzo Segovia Forcella  
Instituto de Biotecnología de la UNAM

MÉXICO, D. F. junio, 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

Este trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Baltazar Becerril Luján.

En este proyecto nos apoyaron:

Dr. Daniel Alejandro Fernández Velazco del Laboratorio de Fisicoquímica e Ingeniería de Proteínas de la Facultad de Medicina, UNAM.

Dr. Enrique Rudiño Piñera del Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Dra. Rosana Sánchez López del Departamento de Biología Molecular de Plantas, del Instituto de Biotecnología, UNAM.

El jurado de tesis estuvo integrado por:

Dra. Leonor Pérez Martínez

Dra. Rosana Sánchez López

Dra. Nina Pastor Colón

Dra. Georgina Garza Ramos

Dr. Rubén Paul Gaytán Colín

Durante el desarrollo de este proyecto son muchas las manos que me han ayudado y también las que me han sujetado en momentos difíciles. Su apoyo hizo posible realizar y concluir este maravilloso proyecto.

Este trabajo está dedicado a mi familia y a todos ustedes.

De todo corazón ¡gracias!

# Índice general

|  |           |
|--|-----------|
| Lista de abreviaturas y símbolos.....  | i         |
| Resumen .....  | 1         |
| Abstract .....   | 2         |
| <b>1. Introducción .....</b>   | <b>3</b>  |
| 1.1 Enfermedades relacionadas con el plegamiento anómalo de proteínas .....  | 3         |
| 1.2 Características de la fibra amiloide.....  | 4         |
| 1.3 Aspectos clínicos de la Amiloidosis por cadenas ligeras de inmunoglobulinas (AL) .....                                       | 5         |
| 1.4 Mecanismos moleculares de la síntesis de los dominios variables de cadenas ligeras y su relación con la amiloidosis AL ..... | 6         |
| 1.5 Características estructurales de los dominios variables de cadenas ligeras asociadas a la amiloidosis.....                   | 7         |
| 1.5.1 Generalidades estructurales de los anticuerpos.....  | 7         |
| 1.5.2 Estructura $\beta$ -sandwich y elementos de protección del dominio variable de la cadena ligera .....                      | 7         |
| 1.6 Modelos propuestos de las cadenas ligeras para la formación de la fibra .....  | 9         |
| 1.7 Antecedentes .....   | 11        |
| 1.7.1 Familia $\lambda$ 3 .....  | 11        |
| <b>3. Hipótesis.....</b>   | <b>15</b> |
| <b>4. Objetivos.....</b>   | <b>15</b> |
| 4.1 Objetivo General .....   | 15        |
| 4.2 Objetivos Particulares.....  | 15        |
| <b>5. Materiales y Métodos.....</b>  | <b>16</b> |
| 5.1 Reactivos. ....  | 16        |
| 5.2 Metodología .....  | 17        |
| 5.2.1 Clonación, expresión y purificación de los dominios recombinantes $\lambda$ 3. ....  | 17        |
| 5.3 Cálculo de peso molecular de las cadenas ligeras .....   | 18        |
| 5.4 Experimentos de desnaturalización.....   | 18        |
| 5.4.1 Desnaturalización química .....  | 19        |
| 5.4.2 Desnaturalización térmica.....   | 20        |
| 5.5 Formación de fibras <i>in vitro</i> .....  | 20        |
| 5.6 Microscopía electrónica.....   | 21        |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.7 Cristalografía.....   | 21        |
| 5.7.1 Colecta de datos de la difracción de rayos X .....  | 22        |
| 5.7.2 Procesamiento de datos y refinamiento del modelo .....  | 22        |
| 5.8 Análisis estructural. ....  | 22        |
| 5.9 Dicroísmo circular (CD). ....   | 23        |
| <b>6. Resultados.....</b>   | <b>24</b> |
| 6.1 3mJL2 y 3rJL2/YA (C34Y/W91A), dominios variables $\lambda$ 3 amiloidogénicos y no amiloidogénicos .....   | 24        |
| 6.2 Diferencias estructurales entre la línea germinal 3mJL2 y las mutantes de 3rJL2 .....   | 30        |
| 6.3 Evaluación de la hebra de protección “sheet switch” y una región con características fibrilogénicas en las mutantes derivadas de 3rJL2/YA. .... | 40        |
| 6.4 3rJL2/YA/P7D y 6aJL2 mostraron una cinética similar durante la fibrilogénesis <i>in vitro</i> .....   | 44        |
| <b>7. Discusión y Conclusiones .....</b>  | <b>47</b> |
| <b>8. Bibliografía.....</b>   | <b>53</b> |

## **Lista de Tablas**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1</b> Clasificación de las amiloidosis.....   | 4  |
| <b>Tabla 2</b> Cadenas ligeras tipo $\lambda$ .....  | 12 |
| <b>Tabla 3</b> Cepas .....   | 16 |
| <b>Tabla 4</b> Plásmidos .....   | 16 |
| <b>Tabla 5</b> Parámetros termodinámicos de cadenas ligeras $\lambda$ 3.....   | 28 |
| <b>Tabla 6</b> Datos cristalográficos y estadísticas del afinamiento de las estructuras $\lambda$ 3....  | 30 |
| <b>Tabla 7</b> Comparación de interacciones entre residuos específicos de proteínas $\lambda$ 3 y 6aJL2.....                                     | 34 |
| <b>Tabla 8</b> Áreas de interfaz de diferentes formatos de anticuerpo .....  | 36 |
| <b>Tabla 9</b> Estabilidad de las cadenas ligeras $\lambda$ en diferentes concentraciones de proteína .....                                      | 38 |
| <b>Tabla 10</b> Parámetros termodinámicos y de fibrilogénesis <i>in vitro</i> de las cadenas ligeras $\lambda$ 3 y sus respectivas mutantes..... | 42 |

## **Lista de figuras**

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> Etapas de la formación de fibra (fibrilogénesis) y estructura. ....  | 5  |
| <b>Figura 2</b> Estructura de una inmunoglobulina. ....  | 9  |
| <b>Figura 3</b> Modelos propuestos para la conversión de los dímeros de $V_L$ en fibras amiloides. ....  | 10 |
| <b>Figura 4</b> Frecuencia de expresión de los segmentos de genes $V_L\lambda$ en las células plasmáticas aisladas de pacientes con amiloidosis AL y de células de médula ósea de personas sanas. .... | 12 |
| <b>Figura 5</b> Alineamiento de secuencias de cadenas ligeras de la familia $\lambda 3$ . ....   | 14 |
| <b>Figura 6</b> Curvas de desnaturalización de cadenas ligeras $\lambda 3$ . ....  | 26 |
| <b>Figura 7</b> Espectros de dicroísmo circular (CD) de las cadenas ligeras $\lambda$ a diferentes temperaturas. ....  | 29 |
| <b>Figura 8</b> Gráficas de RMSD de las estructuras $\lambda 3$ . ....   | 32 |
| <b>Figura 9</b> Diferencias estructurales entre la línea germinal 3mJL2 y las mutantes de 3rJL2. ....  | 33 |
| <b>Figura 10</b> Diferencias estructurales entre la línea germinal 3mJL2 y las mutantes de 3rJL2. ....   | 35 |
| <b>Figura 11</b> Análisis del estado oligomérico de los dominios variables de las cadenas ligeras $\lambda$ . ....   | 37 |
| <b>Figura 12</b> Efecto de la concentración en la estabilidad de las cadenas ligeras $\lambda$ . ....  | 39 |
| <b>Figura 13</b> Predicción de los perfiles de agregación de 3rJL2 y 3mJL2 a partir de las secuencias de aminoácidos. ....   | 43 |
| <b>Figura 14</b> Fibrilogénesis <i>in vitro</i> . ....   | 45 |

## **Lista de abreviaturas y símbolos**

|   |  |
|---|--|
| AL  | Amiloidosis de cadenas ligeras   |
| Ig  | Inmunoglobulina  |
| V <sub>L</sub>                                      | Variable de cadena ligera  |
| V <sub>H</sub>                                      | Variable de cadena pesada  |
| C <sub>L</sub>                                      | Constante de cadena ligera   |
| CH <sub>1</sub> , CH <sub>2</sub> y CH <sub>3</sub> | Constante de cadena pesada (1, 2 y 3)                                    |
| JL  | Segmento joining de cadena ligera  |
| Fab   | Fragmento de unión al antígeno   |
| CDR   | Región determinante de la complementariedad                              |
| FR1   | Framework 1  |
| N-ter   | Amino terminal   |
| β   | Beta   |
| μ   | Mu   |
| α   | Alfa   |
| γ   | Gamma  |
| δ   | Delta  |
| ε   | Épsilon  |
| κ   | Kappa  |
| Λ   | Lambda   |
| ThT   | Tioflavina T   |
| Gnd-HCl   | Cloruro de guanidina   |
| IPTG  | Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido                                     |
| CD  | Dicroísmo Circular   |
| SEC   | Cromatografía de exclusión por tamaño                                    |
| r.p.m.  | Revoluciones por minuto  |
| H   | Horas  |
| w/v   | Peso/volumen (Weight/Volume)   |
| ΔG°   | Energía libre de Gibbs   |
| ΔG <sub>H<sub>2</sub>O</sub> °                      | Energía libre de Gibbs en ausencia de Gnd-HCl                            |
| ΔH  | Entalpía   |
| ΔH <sub>VH</sub>                                    | Valor de entalpía calculado a partir de la ecuación de van't Hoff        |
| °C  | Grados centígrados   |
| K   | Kelvin   |
| T   | Temperatura  |
| N   | Estado nativo  |
| U   | Estado desnaturalizado   |
| M   | Gradiente lineal de la transición  |
| C <sub>m</sub>                                      | Concentración media de desnaturalizante                                  |
| T <sub>m</sub>                                      | Temperatura media de desnaturalización                                   |
| R   | Constante universal de los gases ideales                                 |
| Å   | Ångström   |
| Cm  | Centímetros  |
| RMSD  | Raíz de la desviación cuadrática promedio ("Root Mean Square Deviation") |



## **Resumen**

La Amiloidosis de cadenas ligeras (AL) es una enfermedad que afecta a los órganos vitales, siendo la causa de la agregación fibrilar de las cadenas ligeras monoclonales. La línea germinal  $\lambda 3r$  está implicada significativamente en esta enfermedad. En este trabajo, contrastamos la estabilidad termodinámica y la propensión a la agregación de las líneas germinales  $\lambda 3$  como son 3mJL2 (no amiloidogénica) y 3rJL2 (amiloidogénica). La línea germinal de 3rJL2 presentó una baja expresión impidiendo su caracterización. Al realizar un análisis de secuencia de aminoácidos se observó que la posición 34 se encuentra ocupada por una cisteína, la cual podría ser la causa de la baja expresión. Debido a lo anterior se generó una mutante en la posición 34, el cambio de Cys se hizo por Tyr. A partir de esta mutación se observó un mejor rendimiento de expresión. Una segunda sustitución (W91A), se introdujo en la línea germinal de 3r con el fin de obtener una mejor plantilla molecular para incorporar mutaciones adicionales. La mutante en la posición C34Y no fue fibrillogénica mientras que la segunda mutación localizada en el CDR3 (Región determinante de la complementariedad 3) (W91A) indujo fibrillogénesis. Proponemos por primera vez que la posición 91 (CDR3) de la cadena ligera  $\lambda 3r$  afecta a la estabilidad y promueve la formación de fibras en humanos. Usando la doble mutante (3rJL2/YA) como plantilla se construyeron otras variantes, con el fin de evaluar la importancia de dichas sustituciones en la estabilidad y la propensión a la formación de fibras. Un cambio en la posición 7 (P7D), promovió que 3rJL2/YA adquiriera aún más propiedades fibrillogénicas. Al modificar la posición 48 (I48M) se revirtió parcialmente la formación de fibras de 3rJL2/YA. Finalmente, los cambios en las posiciones 8 (P8S) o 40 (P40S) revirtieron completamente la formación de fibras. Estos resultados confirman que la región N-terminal (posiciones 7 y 8) y el asa 40-60 (posiciones 40 y 48) participan en la amiloidosis AL. Al analizar las estructuras cristalográficas por rayos X, se observó que la topología entre las mutantes sencilla y doble de  $\lambda 3r$ , y no se alteró significativamente. Este enfoque mutagénico, ayudó a identificar regiones clave, implicadas en la amiloidosis AL causada por cadenas ligeras  $\lambda 3$ .

## **Abstract**

Light chain amyloidosis (AL) is a disease which affects vital organs by the fibrillar aggregation of monoclonal light chains.  $\lambda$ 3r germ line is significantly implicated in this disease. In this work, we contrasted the thermodynamic stability and aggregation propensity of 3mJL2 (non amyloidogenic) and 3rJL2 (amyloidogenic)  $\lambda$ 3 germ lines. Due to an inherent limitation (extremely low expression), Cys at position 34 of the 3r germ-line, was replaced by Tyr reaching a good expression yield. A second substitution (W91A), was introduced in 3r in order to obtain a better template to incorporate additional mutations. Although the single mutant (C34Y) was not fibrillogenic, the second mutation located at CDR3 (Complementarity determining region 3) (W91A), induced fibrillogenesis. We propose, for the first time, that CDR3 (position 91) affects the stability and fiber formation of human  $\lambda$ 3r light chains. Using the double mutant (3rJL2/YA) as template, other variants were constructed in order to evaluate the importance of those substitutions into the stability and aggregation propensity of  $\lambda$ 3 light chains. A change in position 7 (P7D), boosted 3rJL2/YA fibrillogenic properties. Modification of position 48 (I48M) partially reverted 3rJL2/YA fibril aggregation. Finally, changes at positions 8 (P8S) or 40 (P40S) completely reverted fibril formation. These results confirm the influential roles of N-terminal region (positions 7 and 8) and the loop 40-60 (positions 40 and 48) on (AL) amyloidosis. X-ray crystallography revealed that the three-dimensional topology of the single and double  $\lambda$ 3r mutants was not significantly altered. This mutagenic approach, helped to identify key regions implicated in  $\lambda$ 3 (AL) amyloidosis.

# **1. Introducción**

## **1.1 Enfermedades relacionadas con el plegamiento anómalo de proteínas**

La función biológica de una proteína depende de la secuencia de aminoácidos y de su estructura tridimensional, la cual se adquiere a través del proceso de plegamiento. Alteraciones en la secuencia de una proteína pueden llevar a la pérdida parcial o total de su plegamiento nativo. Una proteína mal plegada puede no ser secretada en la cantidad adecuada, o bien, no llevar a cabo su función correctamente [1, 2].

Enfermedades relacionadas con el plegamiento anómalo de proteínas se identifican bajo el término de amiloidosis. Las proteínas amiloides se caracterizan por la formación de depósitos extra celulares del tipo fibrilar [3, 4, 5]. En las proteínas amiloides no se pueden generalizar características que determinen porqué uno u otro grupo de proteínas tiende a formar fibras, ya que cada una de ellas proviene de un precursor diferente con propiedades bioquímicas distintas [6]. En los humanos se han identificado más de 20 proteínas y péptidos diferentes como “precursores amiloides” que no comparten homología estructural ni de secuencia [7]. Las proteínas amiloides son relativamente pequeñas, 4-25 kDa, y suelen estar truncadas en diferentes puntos de sus extremos amino y carboxilo por lo que se dice que son heterogéneos [2,8].

Las amiloidosis han sido clasificadas como localizadas o sistémicas (Tabla 1); las primeras causan daño en un solo tipo de tejido u órgano. Dentro de este grupo se encuentran las amiloidosis neurodegenerativas, como las enfermedades de Alzheimer y Parkinson. En las amiloidosis sistémicas dos o más órganos son afectados; como ejemplo se pueden citar a la amiloidosis por cadena pesada de inmunoglobulina, y la amiloidosis por cistatina, entre otras [9].

Muchas de las amiloidosis son hereditarias; en estos casos las proteínas amiloides presentan cambios de aminoácidos causados por mutaciones puntuales en los genes respectivos. El reemplazo de un único aminoácido puede ser suficiente para favorecer el plegamiento anómalo de la proteína hacia una conformación que determina la formación de fibras [9,10].

**Tabla 1. Clasificación de las amiloidosis**

| Amiloidosis | Clasificación   | Enfermedad                 | Precursor                         |
|-------------|-----------------|----------------------------|-----------------------------------|
| Localizadas | Neuropáticas    | Alzheimer                  | Péptido $\beta$ amiloide          |
|             |                 | Encefalopatía espongiforme | Proteínas prión (PrP)             |
|             |                 | Parkinson                  | $\alpha$ -sinucleína              |
|             |                 | Huntington                 | Huntingtina                       |
|             | No neuropáticas | Diabetes tipo II           | Amilina (IAPP)                    |
| Sistémicas  | Primaria        | Amiloidosis cutánea        | No caracterizado                  |
|             |                 | AL amiloidosis             | Cadena ligera de inmunoglobulinas |
|             | Secundaria      | AA amiloidosis             | Apoproteína AA sérica             |
|             | Familiar        | Familiar tipo Andrade      | Transtirretina (TTR)              |

Información tomada de Chiti *et al* y Westermark P. [4, 7]

## 1.2 Características de la fibra amiloide

Se ha sugerido que la formación de fibras amiloides es una propiedad intrínseca de algunas proteínas siempre y cuando existan las condiciones microambientales que propicien la amiloidogénesis. Sin embargo, *in vivo* la formación de las fibras amiloides se restringe a unas cuantas proteínas o péptidos. [7].

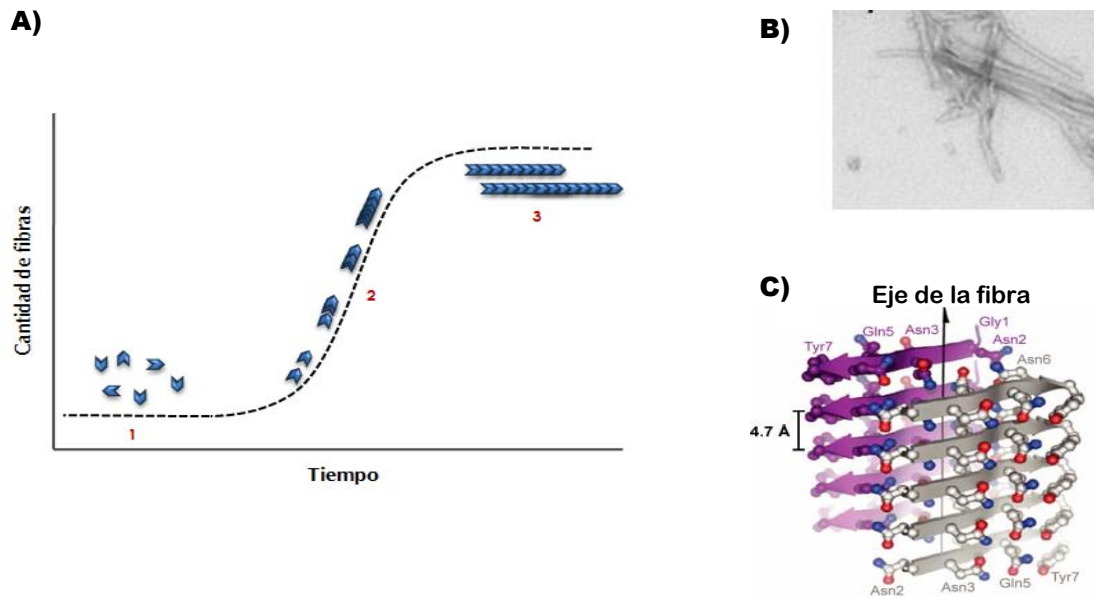
El proceso de formación de las fibras amiloides o proceso de amiloidogénesis consta de una fase inicial lenta de nucleación (fase lag) (Fig. 1). En esta fase, la proteína nativa ha adquirido un cambio conformacional promoviendo la formación de los primeros núcleos o semillas de polimerización. La segunda fase se identifica como exponencial o de crecimiento; esta etapa se caracteriza por ser rápida y por la incorporación de monómeros alterados conformacionalmente al núcleo (Fig. 1). Las estructuras que se forman son primero de origen prefibrilar que posteriormente darán origen a estructuras fibrilares. La última fase se puede identificar como un periodo en el que la fibra deja de crecer (fase estacionaria), es decir, la fibra ya se ha formado (Fig. 1). [11].

Hasta el momento no se ha descrito una secuencia de aminoácidos o una firma estructural que esté asociada con los contactos entre cada monómero [2]. Esto llama la atención, ya que las fibras que se forman son similares en cuanto a apariencia morfológica; otras propiedades que comparten es la afinidad por el rojo Congo y el ThT [7]. Estudios *in vitro*, usando microscopía electrónica y microscopía de transmisión de fuerza atómica han identificado y caracterizado varios intermediarios durante la formación de la fibra madura. Sin embargo, no se sabe cuál de las estructuras que se forman resultan ser los productos tóxicos [12].

Las fibras amiloides poseen un núcleo estructural rico en hojas  $\beta$  presentando un patrón denominado " $\beta$  cruzado", en donde se observa que las hojas  $\beta$  están

orientadas paralelamente al eje longitudinal de la fibra, mientras que las hebras que las componen se disponen en ángulo recto a éste [4, 13, 14].

Esta característica es compartida por todas las fibras amiloides independientemente de su naturaleza bioquímica. La microscopía electrónica muestra que las fibras son rectas, no ramificadas, con 70-120 Å de diámetro y una longitud variable [15].



**Figura 1. Etapas de la formación de fibra (fibrilogénesis) y estructura. A)** Cinética de fibrilogénesis, 1 corresponde a la fase de nucleación, 2 etapa de elongación o crecimiento de la fibra y 3 fase estacionaria. **B)** Microscopía electrónica del péptido  $\beta$  amiloide (Ab42). **C)** Representación tridimensional de la fibra amiloide [4].

### 1.3 Aspectos clínicos de la Amiloidosis por cadenas ligeras de inmunoglobulinas (AL)

La amiloidosis de cadenas ligeras (AL) es una enfermedad sistémica y progresiva causada por la deposición de grandes cantidades de cadenas ligeras mal plegadas. Las cadenas ligeras asociadas al fenómeno de agregación de la amiloidosis son de origen monoclonal, es decir, provienen de un clon de células plasmáticas que presenta alteraciones en su proceso de regulación. Si bien estas células han sufrido alteraciones genéticas, no poseen todos los atributos de las células malignas. Hasta el momento, no se conoce el mecanismo que permite a las células B, dar origen a las cadenas ligeras amiloidogénicas, y escapar a los controles normales de su lapso de vida y proliferación. Estas células B alteradas se dividen una y otra vez sin regulación y no requieren de ninguna activación por antígeno que los induzca a proliferar [16, 17, 18].

Aproximadamente el 70% de los pacientes en una etapa avanzada de la enfermedad presenta daño en más de un órgano [10, 19]. Los síntomas de la amiloidosis dependen de los órganos afectados. La enfermedad puede afectar la lengua, los intestinos, los músculos esqueléticos y lisos, los nervios, la piel, ligamentos, el corazón, el hígado, el bazo y los riñones [10, 19]. Los síntomas abarcan: ritmo cardíaco anormal, hinchazón de la lengua, fatiga, entumecimiento de manos y pies, dificultad respiratoria, cambios en la piel, problemas para deglutir, hinchazón de brazos y piernas, pérdida de peso. [19]. El diagnóstico de la amiloidosis AL se hace por medio de biopsias. El tejido obtenido se tiñe con Rojo Congo para posteriormente ser analizado al microscopio de luz polarizada, identificando de esta manera la presencia del amiloide. La edad promedio en la cual puede ser diagnosticada es cercana a los 60 años. Estos pacientes presentan un tiempo de supervivencia de 2-3 años, dependiendo del tipo de tratamiento y del número de órganos afectados [17, 19].

#### **1.4 Mecanismos moleculares de la síntesis de los dominios variables de cadenas ligeras y su relación con la amiloidosis AL**

El ensamble genético del dominio variable se lleva a cabo durante el proceso de recombinación. Cuando este proceso no ocurre de la forma adecuada genera una síntesis aberrante de la cadena ligera. Una consecuencia es que la cadena ligera defectuosa no se asocia a la cadena pesada ( $V_H$ ) y por lo tanto sea secretada de manera individual [20, 21].

La pérdida de la estructura de la inmunoglobulina puede ser un factor que contribuye a la amiloidogenicidad de la  $V_L$ . Muchos pacientes con amiloidosis AL presentan fibras formadas por un solo tipo de dominio variable [10].

Los diferentes estudios realizados proponen que el dominio variable defectuoso debe poseer ciertas características estructurales y de estabilidad termodinámica para que la formación de los depósitos ocurra [1]. A partir de estos estudios se observó que existe una correlación directa entre el efecto desestabilizante del plegamiento que ejerce una mutación y su capacidad de favorecer la agregación amiloide de una cadena ligera. Es decir, entre menos estable es el dominio variable más susceptible es a la formación de la fibra amiloide [22, 23]. Comparaciones entre secuencias de cadenas ligeras amiloidogénicas y no amiloidogénicas ha llevado a la identificación de aminoácidos en posiciones claves de la estructura que disminuyen la estabilidad [24, 25, 26, 27]. La introducción de algunas mutaciones desestabilizantes en cadenas ligeras no amiloidogénicas incrementan su tendencia a la agregación y forman fibras amiloides *in vitro* [23].

## **1.5 Características estructurales de los dominios variables de cadenas ligeras asociadas a la amiloidosis**

### **1.5.1 Generalidades estructurales de los anticuerpos**

La estructura de las inmunoglobulinas se encuentra muy conservada. En una inmunoglobulina completa de IgG se identifican cuatro cadenas polipeptídicas. Dos corresponden a cadenas pesadas y dos ligeras. Cada cadena contiene un dominio variable y de una ( $C_L$ ; cadena ligera), a 3-4 regiones constantes ( $CH_1$ ,  $CH_2$ ,  $CH_3$ ,  $CH_4$ ; cadena pesada). Cada una de las regiones variables contiene un segmento J ("joining"). La región variable de la cadena pesada además tiene un segmento D (Fig. 2). Las cadenas ligeras y pesadas se encuentran unidas entre sí por un puente disulfuro y por interacciones no covalentes. La cadena ligera interactúa con la cadena pesada y con el dominio  $CH_1$  de la cadena pesada mediante un puente disulfuro e interacciones no covalentes [18].

Para las cadenas pesadas se identificaron cinco clases  $\mu$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , y  $\epsilon$ , las cuales dependen del tipo de cadena pesada que contienen. Las secuencias de aminoácidos de las cadenas ligeras permiten distinguir dos clases:  $\kappa$  y  $\lambda$ . La clasificación de estos dos grupos se hizo en relación a la secuencia de aminoácidos del primer "framework" (FR1) que comprende los primeros 23 residuos del extremo amino terminal del dominio variable [28].

### **1.5.2 Estructura $\beta$ -sandwich y elementos de protección del dominio variable de la cadena ligera**

En cuanto a longitud los dominios variables pueden ser de distintos tamaños debido a la presencia de deleciones e inserciones de residuos. Sin embargo, todos los dominios variables presentan una estructura secundaria y terciaria similar. Las  $V_L$  adoptan el plegamiento típico de inmunoglobulina o de  $\beta$  sándwich el cual está formado por nueve hebras  $\beta$  identificadas como A, B, C, C', C'', D, E, F y G (Fig. 2C) [9,29, 30]. Cada una de ellas se encuentra conectada entre sí mediante asas ("loops"). A este tipo de arreglo se le conoce como de llave griega o greca debido a su parecido con los decorados de las vasijas griegas (Fig. 2D) [30, 31]. Las nueve hebras a su vez se encuentran organizadas en dos hojas  $\beta$  antiparalelas unidas por un puente disulfuro.

Dentro de los inconvenientes que presentan las proteínas ricas en estructura  $\beta$  es la susceptibilidad a la agregación. Si los bordes de las hebras  $\beta$  quedaran expuestos se convertirían en un peligro para la proteína debido a que ya se

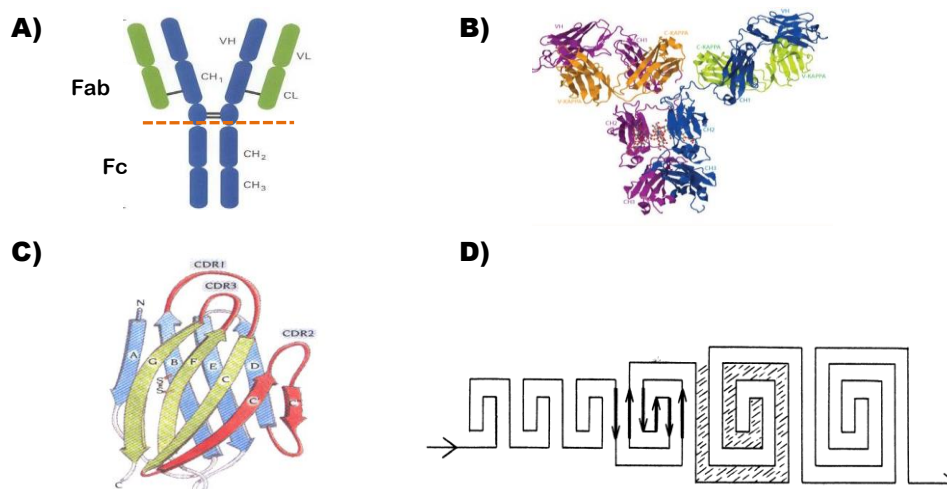
encuentran en la conformación adecuada para interactuar con cualquier otra hebra  $\beta$  que se encuentren [30]. De forma natural este tipo de proteínas han diseñado estrategias que les permiten compensar este problema.

En el caso de las  $V_L$  las estrategias de protección utilizados son variadas y la combinación de todas ellas genera un sofisticado sistema de seguridad que impide la agregación [31]. Dentro de la estructura de una  $V_L$  se puede observar un “ $\beta$ -bulge” en la hebra G (C-terminal), un asa en los residuos 40-60 que protege el borde de la hebra C y D, el N-terminal (residuos 1-14) presenta la conformación “sheet switch” el cual se ha propuesto que protege a las hebras B y G. Otros elementos de protección que se pueden encontrar es la presencia de prolina y aminoácidos cargados ubicados en lugares estratégicos de la estructura [31].

Otro tipo de estrategia que permite dar protección a las cadenas ligeras, es la formación de dímeros. En el caso de los anticuerpos completos se forma la interacción  $V_H$ - $V_L$  la cual es considerada como un hetero-dímero canónico. Sin embargo, no es el único dímero que se puede formar. En las proteínas de Bence Jones (cadenas ligeras de inmunoglobulinas aisladas de pacientes con mieloma múltiple), se ha observado que en condiciones fisiológicas pueden formar homo-dímeros de  $V_L$  ( $V_L$ - $V_L$ ) conocidos también como dímeros de Bence Jones (BJ) [32]. El dímero formado por las proteínas de Bence Jones se caracteriza por ser un dímero no canónico y por formar una interfaz similar a la de una interacción  $V_H$ - $V_L$  la cual se considera como una interfaz heterodimérica, mientras que la interfaz  $V_L$ - $V_L$  es considerada como homodimérica. En ambos casos las interacciones de la interfaz consisten en residuos apolares y residuos hidrofóbicos [32, 33]. Esto refleja la fuerte homología estructural de la interfaz de la cadena pesada y de la cadena ligera.

Se ha propuesto que una de las funciones del dímero consiste en otorgar estabilidad a la  $V_L$ , de tal manera que compensa la ausencia de la  $V_H$ . Al interactuar dos monómeros se protegen las hebras bordes o regiones que pudieran quedar susceptibles a ser expuestas y favorecer la formación de fibra [26, 33, 34]. Podemos considerar que la formación del dímero de  $V_L$  es un sistema de seguridad adicional que impide la circulación en exceso de monómeros de  $V_L$  [34].





**Figura 2. Estructura de una inmunoglobulina.** **A)** Representación esquemática de una inmunoglobulina; en azul se representan las cadenas pesadas ( $V_H$ ), en verde las cadenas ligeras ( $V_L$ ) y líneas en negro, los puentes disulfuro. La línea punteada marca los fragmentos que se generan cuando el anticuerpo es digerido con papaína, porción Fab y Fc. **B)** Modelo tridimensional de una inmunoglobulina. En el fragmento Fab se muestran en azul y anaranjado se las cadenas pesadas, en verde y morado las cadenas ligeras (PDB: 1hzh). **C)** Arreglo de hebras beta en una cadena ligera. **D)** Greca.

### 1.6 Modelos propuestos de las cadenas ligeras para la formación de la fibra

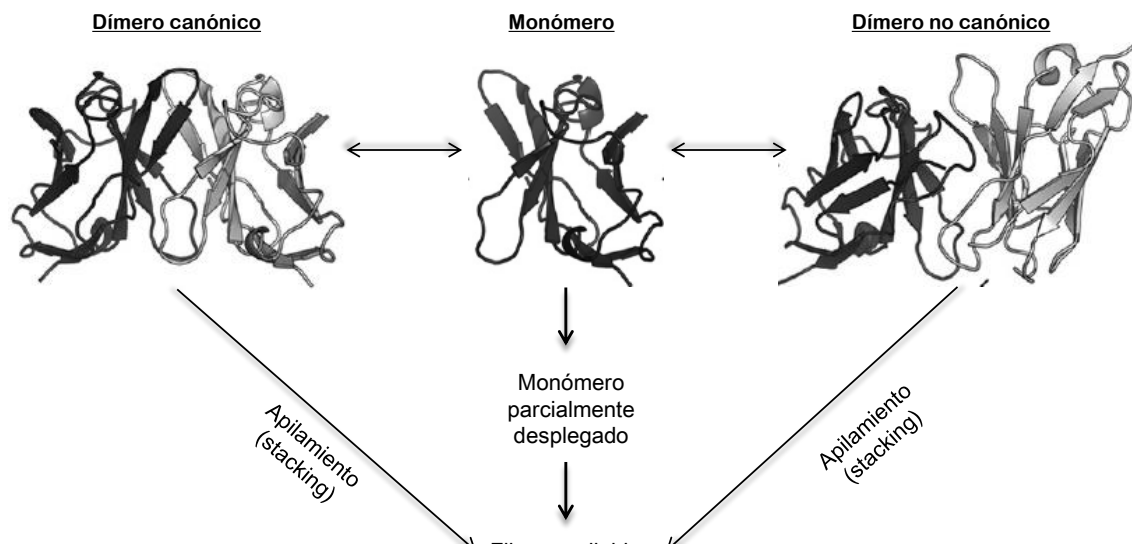
La vía por la que los dominios variables forman fibras amiloides continua siendo incierta. Sin embargo, se han planteado varias hipótesis. Recientemente se propusieron modelos de cómo podría llevarse a cabo el ensamblaje de la fibra amiloide.

El primer modelo (Fig. 3) involucra a dímeros canónicos; en este modelo la  $V_L$  conserva su estado nativo y la interfaz formada por el dímero es de carácter hidrofóbico. La estructura que mantiene la  $V_L$  es de tipo globular, similar al rearrreglo observado en los cristales de  $V_L$  y supone que la formación del amiloide es reversible [26, 27, 33].

Tanto las cadenas ligeras  $\lambda$  y  $\kappa$  cristalizan como dímeros canónicos, sin embargo se ha observado que algunas  $V_L$  presentan una rotación alterada hasta de  $180^\circ$  en la interface del dímero [26, 27]. En el interior de la interface se conserva el ambiente hidrofóbico. Estas alteraciones en la rotación sugieren la posibilidad de una ruta alterna para formar la fibra amiloide. A este tipo de rearrreglo se le identifica como dímero no canónico y es el segundo modelo propuesto [26, 27, 33] (Fig. 3). En este modelo se propone que los dímeros formados son poco estables. La fibra que lograra formarse estaría formada de proteínas globulares o de proteínas que se encuentren en un estado parcialmente desplegado.

El tercer modelo (Fig. 3) considera a la  $V_L$  como un dímero que puede disociarse en monómeros. En los trabajos en donde se realizan experimentos de desnaturalización con diferentes agentes caotrópicos se ha observado que la estabilidad juega un papel importante. Si la cadena ligera presenta una baja estabilidad la propensión a formar fibras será mayor. En esta condición la cadena ligera se encontrará parcialmente desplegada dejando expuestas las regiones que favorecen que los monómeros se vayan acoplando y den origen a la fibra amiloide [33, 34].

En los tres modelos la introducción de mutaciones juegan un papel importante ya que pueden inducir la disociación del dímero o generar monómeros desplegados [26, 27, 33].



**Figura 3. Modelos propuestos para la conversión de los dímeros de  $V_L$  en fibras amiloides.** La vía de la izquierda representa al modelo del dímero canónico, que posteriormente se va apilando para dar origen a la fibra. En el extremo derecho se muestra el dímero no canónico. En estos dímeros, la estructura cuaternaria de los dos dominios variables de cadena ligera difiere del dímero canónico (se encuentra rotado 180°), pero cada dominio conserva su conformación terciaria, al igual que en el modelo anterior el dímero se apila dando origen a la fibra amiloide. En la parte central se representa la disociación del dímero dando origen a monómeros que se encuentran en un estado parcialmente desplegado y formar una fibra amiloide. Adaptado de Brumshtein, B. *et al* [33].

## 1.7 Antecedentes

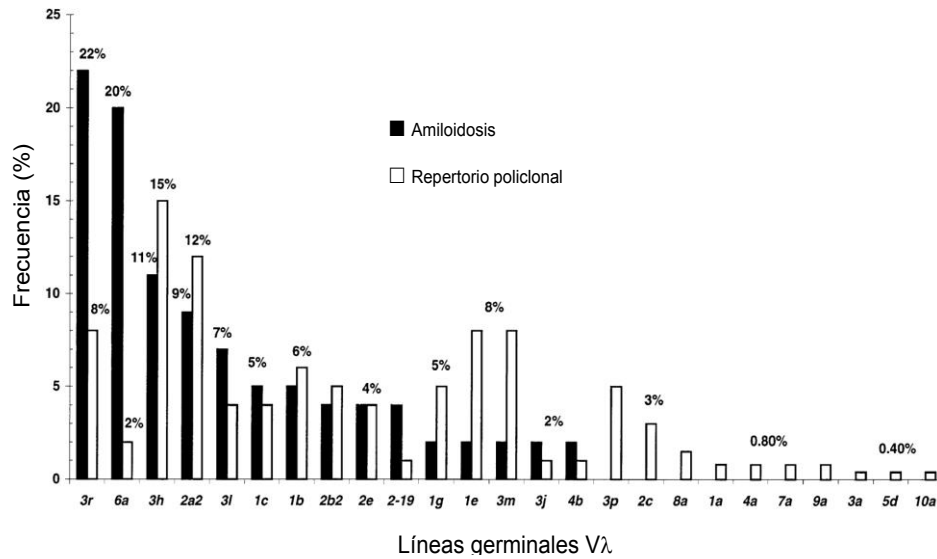
### 1.7.1 Familia $\lambda 3$

Como se mencionó anteriormente los dominios variables de cadenas ligeras se clasifican de acuerdo a su secuencia de aminoácidos y pueden ser de dos tipos  $\kappa$  o  $\lambda$ . Las cadenas ligeras  $\kappa$  se expresan en el 60% de las células plasmáticas del repertorio de la médula ósea, mientras que las  $\lambda$  sólo en el 40% [35]. Diversos estudios señalan a las cadenas ligeras  $\lambda$  como responsables del mayor número de casos relacionados con la amiloidosis AL, con una proporción que varía de dos a tres veces con respecto a las  $\kappa$  [36]. Estos resultados indican que las cadenas ligeras  $\lambda$  presentan características particulares que las hacen más susceptibles a agregarse como amiloide que las cadenas  $\kappa$ .

El grupo de cadenas ligeras tipo  $\lambda$  está integrada por 10 familias (Tabla 2). En el repertorio policlonal así como también en la amiloidosis AL cada una de las familias presenta una frecuencia de expresión característica (Fig. 4).

Las familias  $\lambda 3$  y  $\lambda 6$  están significativamente relacionadas con la amiloidosis AL, siendo los genes que presentan una mayor prevalencia  $3r$  y  $6a$  [37]. Estos genes son los causantes de al menos un 42% de los casos de amiloidosis AL. La prevalencia de  $3r$  en pacientes con amiloidosis AL es del 22%, mientras que el de  $6a$  es al menos de un 20% [37]. Si se evalúa la expresión de dichos genes en el repertorio policlonal de células plasmáticas de médula ósea se observa que ambos se expresan en un porcentaje bajo,  $3r$  en un 8.3% y  $6a$  2.3% (Fig. 4) [37]. Las fibras derivadas de cadenas ligeras de  $3r$  y  $6a$  presentan tropismo hacia algunos órganos. Las fibras provenientes de  $6a$  se dirigen principalmente al riñón, mientras que  $3r$  causa daño en diferentes órganos como el corazón, el riñón, el aparato gastrointestinal y otros tejidos.

El principal objetivo de este proyecto se centra en estudiar a la familia de cadenas ligeras  $\lambda 3$ , en especial el caso de  $3r$ . La familia  $\lambda 3$  está formada por 21 genes de los cuales 9 se expresan en el repertorio policlonal, 10 presentan características de pseudogenes, 2 de ellos son genes no funcionales y 6 de ellos están asociados con amiloidosis Tabla 2 [39].



**Figura.4.** Frecuencia de expresión de los segmentos de genes  $V_{\lambda}$  en las células plasmáticas aisladas de pacientes con amiloidosis AL y de células de médula ósea de personas sanas. Se observa un uso preferencial de genes en ambas condiciones, siendo evidente en la amiloidosis AL, que los genes 3r y 6a están significativamente sobrerrepresentados, lo cual los relaciona con la amiloidosis AL. Este trabajo fue realizado en Italia [37].

**Tabla 2.** Cadenas ligeras tipo  $\lambda$

| Familia        | Genes  |
|----------------|--|
| V $\lambda$ 1  | 1a, *1b, *1c, 1d, *1e, 1f, *1g   |
| V $\lambda$ 2  | <b>2a1</b> , *2a2, <b>2b1</b> , *2b2, 2c, 2d, *2e, 2f  |
| V $\lambda$ 3  | 3a, <b>3a2</b> , <b>3b</b> , <b>3c</b> , <b>3d</b> , 3e, <b>3f</b> , <b>3g</b> , *3h, 3i, 3i1, *3j, <b>3k</b> , *3l, *3m, <b>3n</b> , <b>3o</b> , 3p, <b>3q</b> , *3r, *2-19 |
| V $\lambda$ 4  | 4a, *4b, 4c  |
| V $\lambda$ 5  | 5a, 5b, 5c, 5d, 5e   |
| V $\lambda$ 6  | *6a  |
| V $\lambda$ 7  | 7a, 7b, <b>7c</b>  |
| V $\lambda$ 8  | 8 <sup>a</sup>   |
| V $\lambda$ 9  | 9 <sup>a</sup>   |
| V $\lambda$ 10 | 10a, <b>10b</b>  |

En negritas se marcan los pseudogenes

En itálicas se marcan los genes no funcionales

Sin marcar se encuentran los genes funcionales

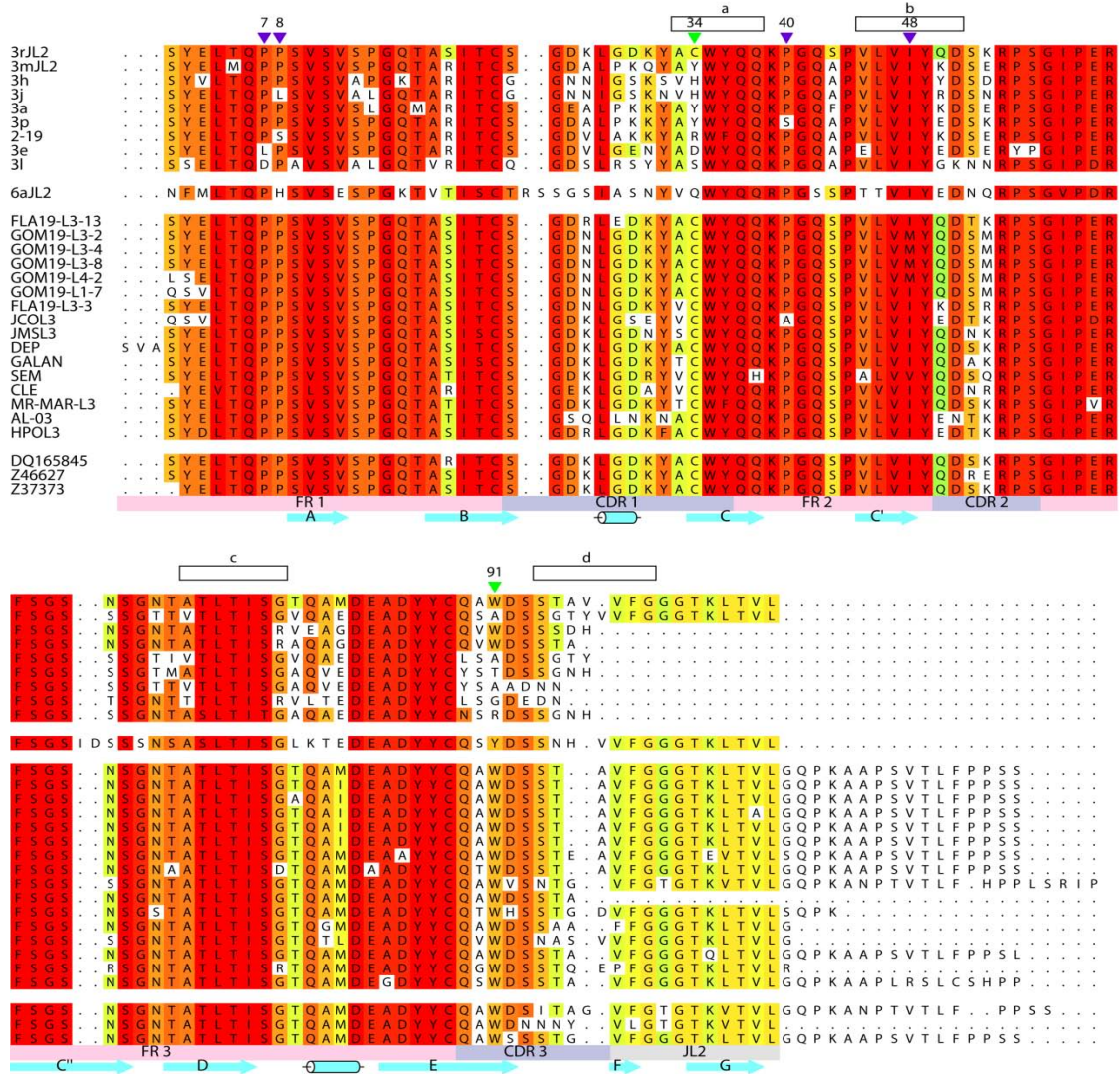
♦ Genes asociados con las amiloidosis

La familia  $\lambda 3$  es la más numerosa del repertorio de genes de anticuerpos y la mitad de sus integrantes son pseudogenes. Al hacer un alineamiento con las secuencias de aminoácidos de cada uno de los miembros de la familia  $\lambda 3$  (Fig. 5) se puede observar que los genes más parecidos son aquellos que se expresan generalmente en el repertorio policlonal (3a, 3h, 3m, 3p, 3e, 3j y 3r), mientras que los pseudogenes son más parecidos entre ellos (3c, 3d, 3o, 3a2, 3i1, 3k, 3q, 3b y 3g). En particular, 3l que es una  $V_L$  asociada a la amiloidosis AL, es más parecida a los pseudogenes. De forma general se puede observar que en las zonas de los CDRs es donde hay más diferencias y esto se debe a que en esta región se lleva a cabo el proceso de hipermutación somática.

La tendencia de estas cadenas ligeras de ser amiloidogénicas sugiere que la estructura de estas proteínas pudiera ser intrínsecamente amiloidogénica. En el laboratorio se comprobó esta hipótesis mediante el estudio de una proteína modelo, nombrada 6aJL2, la cual es el dominio variable de la línea germinal 6a. Los resultados obtenidos señalan que esta proteína no es significativamente inestable, como se había supuesto. Por esta razón, se puede considerar que la línea germinal 6a no es la causa directa de la alta tendencia de las cadenas ligeras  $\lambda 6$  a la agregación amiloide [40].

Actualmente no se ha descrito ningún estudio termodinámico y/o estructural de las líneas germinales de las cadenas ligeras  $\lambda 3$ . Para la familia  $\lambda 3$  no se conoce cuál es el origen de su relación con la amiloidosis AL. Este es el primer trabajo en donde se estudia a la línea germinal.

En este trabajo nos enfocamos a 3r por su alta relación con la amiloidosis AL y a 3m como miembro de la familia que no está asociado con la enfermedad. Nuestros objetivos se centraron en evaluar cómo influye la secuencia de la línea germinal 3r en la amiloidosis AL y como difiere su comportamiento de la línea germinal  $\lambda 6$ . Evaluamos la importancia de algunos de los dominios de anti-agregación previamente descritos: el “sheet switch” y el asa 40-60 [24, 30]. Mediante el uso de servidores bioinformáticos especializados en la predicción de secuencias profibrillogénicas, identificamos secuencias de agregación que podrían estar implicadas en la formación de la fibra. El primer punto lo abordamos mediante mutaciones sencillas, dobles y triples de la línea germinal 3r en donde observamos que la estabilidad y la capacidad de formar fibras de cada mutante se afecta de forma diferencial.



**Figura 5. Alineamiento de secuencias de cadenas ligeras de la familia  $\lambda$ 3.** Los aminoácidos fueron coloreados de acuerdo a los parámetros del programa ALINE [38]. Los puntos indican huecos introducidos para maximizar el alineamiento. En el grupo superior se encuentran las secuencias de las subfamilias de las líneas germinales  $\lambda$ 3. Las secuencias de 3m y 3r comparten 81.7% de identidad. El triángulo de color púrpura sobre el alineamiento indica los sitios que fueron sustituidos en 3rJL2. En los grupos de en medio y debajo se encuentran las secuencias  $\lambda$ 3 derivadas de pacientes con amiloidosis AL y los individuos sanos. Las líneas negras encima del alineamiento señalan las regiones de agregación predichas por los servidores TANGO, PASTA y Aggrescan. Marcados con colores rosa, índigo y gris se encuentran los “frameworks” (FR), regiones determinantes de complementariedad (CDR) y el segmento de unión JL2. La estructura secundaria de 3mJL2 está marcada por debajo del alineamiento. Las secuencias de la línea germinal se obtuvieron de la base de datos VBASE (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) y las secuencias derivadas de pacientes e individuos sanos se obtuvieron del servidor del NCBI.

### **3. Hipótesis**

La secuencia de la línea germinal de 3r es intrínsecamente amiloidogénica y favorece la tendencia a formar fibras amiloides.

### **4. Objetivos**

#### **4.1 Objetivo General**

Estudiar la estabilidad termodinámica y las propiedades de fibrillogénesis *in vitro* de cadenas ligeras  $\lambda 3$  con el propósito de definir cuáles son las bases estructurales y biofísicas de su tendencia a la agregación amiloide.

#### **4.2 Objetivos Particulares**

- Sintetizar y expresar genes que codifican para segmentos variables de cadenas ligeras que contengan la secuencia de la línea germinal de miembros de la familia  $\lambda 3$  que presenten características amiloidogénicas (3r) y no amiloidogénicas (3m)
- Determinar las propiedades biofísicas y de fibrillogénesis *in vitro* de cada una de las cadenas ligeras expresadas
- Introducir cambios de aminoácidos en las cadenas ligeras seleccionadas y definir su papel en la estabilidad termodinámica y su relación con la fibrillogénesis
- Determinación de la estructura cristalográfica de cadenas ligeras  $\lambda 3$  amiloidogénicas y no amiloidogénicas
- A partir de las estructuras cristalográficas identificar regiones o residuos de aminoácidos que pudieran ayudar a explicar la diferencia entre cadenas ligeras  $\lambda 3$  amiloidogénicas y no amiloidogénicas

## 5. Materiales y Métodos

### 5.1 Reactivos.

El extracto de levadura fue de la marca Difco. El cloruro de guanidina (Gnd-HCl) y la Tioflavina T (ThT) fueron de la marca de Research Organics. Las enzimas de restricción y la Vent polimerasa fueron de la compañía New England Biolabs. Todos los reactivos se utilizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Los oligonucleótidos usados en este trabajo fueron sintetizados en la unidad de síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

**Tabla 3. Cepas**

| Cepa         | Genotipo  | Referencia          |
|--------------|---|---------------------|
| DH5 $\alpha$ | F <sup>-</sup> endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG $\Phi$ 80d/lacZ $\Delta$ M15 $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), $\lambda$ - | New England Biolabs |
| BL21(DE3)    | F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdSB(rB- mB-) $\lambda$ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])   | New England Biolabs |

**Tabla 4. Plásmidos**

| Plásmido      | Características  | Referencia   |
|---------------|--|--------------|
| pET22b        | Vector de expresión que adiciona al N-terminal de la proteína de interés el péptido señal <i>pe/B</i> . La proteína de fusión generada se envía al periplasma. Además de forma opcional se puede agregar al C-terminal una cola de 6 histidinas. | NOVAGEN      |
| 3mJL2         | Contiene el gen <i>3mj2</i> clonado en pET22b en los sitios MscI-HindIII.  | Este trabajo |
| 3rJL2         | Contiene el gen <i>3rj2</i> clonado en pET22b en los sitios MscI-HindIII.  | Este trabajo |
| 3rJL2/Y       | Derivado de 3rJL2. Presenta la mutación en el residuo C34Y.  | Este trabajo |
| 3rJL2/YA      | Derivado de 3rJL2/Y. Presenta mutaciones en los residuos C34Y/W91A   | Este trabajo |
| 3rJL2/YA/P7D  | Derivado de 3rJL2/YA. Presenta mutaciones en los residuos P7D/C34Y/W91A  | Este trabajo |
| 3rJL2/YA/P8S  | Derivado de 3rJL2/YA. Presenta mutaciones en los residuos P8S/C34Y/W91A  | Este trabajo |
| 3rJL2/YA/P40S | Derivado de 3rJL2/YA. Presenta mutaciones en los residuos C34Y/ P40S/W91A  | Este trabajo |
| 3rJL2/YA/I48M | Derivado de 3rJL2/YA. Presenta mutaciones en los residuos C34Y/ I48M/W91A  | Este trabajo |



## 5.2 Metodología

### 5.2.1 Clonación, expresión y purificación de los dominios recombinantes $\lambda$ 3.

Las secuencias de las líneas germinales fueron obtenidas de la base de datos VBASE (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>). 3rJL2 y 3mJL2 contienen las secuencias de las líneas germinales que corresponden a los dominios variables  $\lambda$  humanos 3r y 3m. El segmento JL2 se seleccionó por ser el segmento de unión (“joining”), más utilizado por las células plasmáticas [37]. La síntesis de 3r y 3m se realizó con la metodología de PCR recursivo descrita por Prodromou *et al*, [41]. El DNA sintetizado fue clonado en el vector pET22b (NOVAGEN). Las mutaciones sitio específicas se generaron con la metodología de megaprimer mutagénico [42]. Todas las construcciones fueron verificadas por secuencia.

Los vectores que contienen los dominios variables recombinantes fueron transformados en *E.coli* BL21(DE3) y se cultivaron a 37°C toda la noche en una placa de agar de YT2X. Se tomó una colonia aislada para inocular 50mL de medio YT2X que contiene 100µg/mL de ampicilina; posteriormente se dejó incubando por 8 horas a 37°C en un agitador orbital a 150 r.p.m. Cuando el cultivo llegó a una D.O.<sub>600</sub> 1-1.4 se hizo la inducción con IPTG a una concentración final de 0.2mM. La inducción se dejó por 5h a 22°C y agitándose a 115 r.p.m.

El cultivo se centrifugó 10 minutos a 6000 r.p.m. y el sedimento (“pellet”) formado, fue procesado de la siguiente manera: la proteína de interés fue purificada del espacio periplásmico mediante la extracción por choque (“shock”) osmótico con una solución fría que contiene 20% (w/v) de sacarosa, 0.1M Tris y 0.1M EDTA. Se dejó reposar 10 minutos a 4°C, posteriormente se centrifugó como en el paso anterior. El “pellet” formado se sometió a un segundo proceso de extracción con agua fría. El “pellet” resuspendido se dejó incubando a 4°C por 10 minutos. Transcurrido ese tiempo, se centrifugó como en el paso anterior.

Los sobrenadantes obtenidos de los procesos de extracción fueron precipitados con diferentes concentraciones de sulfato de amonio. La primera precipitación se hizo en 0-30%, se dejó incubando a 4°C toda la noche y posteriormente se centrifugó 10 minutos a 6000 r.p.m. El pellet formado se eliminó. El segundo paso de precipitación se hizo de 30-90% y se dejó incubando toda la noche a 4°C.

La proteína de interés se recuperó de la precipitación al 90% de la siguiente manera: los extractos precipitados se centrifugaron 30 minutos a 6000 r.p.m., se eliminó

el sobrenadante, se resuspendió el pellet formado y se dializó en un amortiguador ("buffer") que contenía 40mM Tris pH 8, 50mM NaCl ("Buffer" A).

Se requirieron dos pasos de purificación para obtener la proteína de interés. El primer paso consistió en una purificación por filtración en gel, para lo cual se utilizó una columna de Sephacryl S-100 HR. La columna se equilibró con Buffer A a un flujo de 1.5mL/min. Las fracciones que contenían la proteína de interés se precipitaron con 70% de sulfato de amonio. La proteína solubilizada fue dializada gradualmente en buffer que contiene 40mM de Tris pH 8, disminuyendo las concentraciones de NaCl cada 4 horas. La diálisis final se realizó en 40mM Tris pH 8 por 1 hora.

El segundo paso de purificación consistió en una cromatografía de intercambio aniónico (BIORAD column). La columna fue equilibrada con Tris 40mM pH 8 (Buffer B). La muestra en la columna fue lavada con Buffer B durante 40 minutos. El gradiente salino utilizado fue Tris 40mM con 0.5M de NaCl (Buffer C). Se utilizó un gradiente de 0-30%B durante 60 minutos a un flujo de 1mL/min. La pureza de la proteína se determinó por SDS-PAGE. La concentración se determinó por absorción de UV (280 nm). A partir de la secuencia de aminoácidos se determinó el coeficiente de extinción usando el servidor ProtParam disponible en el sitio web Expasy. La proteína purificada se almacenó a 4°C.

### **5.3 Cálculo de peso molecular de las cadenas ligeras**

El cálculo de peso molecular de los dominios variables se hizo mediante una columna pre-empacada Superdex 75 (10/30) (Amersham Pharmacia). La columna fue previamente equilibrada con Buffer A. Los pesos moleculares se calcularon usando una interpolación lineal a partir de una curva de calibración que incluyó albúmina de suero bovino (66,3 kDa), ovoalbúmina (43,5 kDa), anhidrasa carbónica (28.8 kDa), mioglobina (17 kDa) y citocromo c (11,7 kDa) como marcadores moleculares de peso.

### **5.4 Experimentos de desnaturalización**

La desnaturalización química de los dominios variables se siguió mediante el registro de la fluorescencia intrínseca del triptófano (Trp) 35 en un espectrofluorímetro LS50B (Perkin Elmer). Los cambios en la intensidad de fluorescencia del Trp35 fueron detectados a 355 nm excitando a 295 nm. La intensidad de la fluorescencia se graficó contra la concentración de cloruro de guanidina (Gdn-HCl). Los cambios en la intensidad de fluorescencia del Trp35 fueron comparados mediante un proceso de normalización.

Para cada curva se calculó la fracción desnaturalizada aparente ( $F_{app}$ ) mediante la siguiente ecuación:

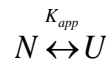
$$F_{app} = \frac{(Y_{obs} - Y_f)}{(Y_u - Y_f)}$$

En donde  $Y_{obs}$  es la intensidad de fluorescencia a una temperatura dada o a una concentración de Gnd-HCl.  $Y_f$  y  $Y_u$  son los valores observados para el estado nativo y el estado desnaturalizado a la misma concentración de desnaturalizante. A partir de los valores de fluorescencia graficados se trazaron líneas base en la pre-transición (estado nativo) y en la post-transición (estado desnaturalizado). Las líneas base permitieron obtener una estimación de  $Y_f$  y  $Y_u$  en la región de transición.

#### 5.4.1 Desnaturalización química

Para llevar a cabo los experimentos de desnaturalización química se utilizó una celda de cuarzo con un paso de luz de 1cm, manteniendo la temperatura a 25°C. Se prepararon muestras de 600µl con una concentración de proteína de 50 µg/mL en buffer de fosfatos 20mM pH 7.5. Las muestras se incubaron 12 horas (condiciones de equilibrio). Se utilizaron diferentes diluciones de cloruro de guanidina de un stock 8M.

Los parámetros termodinámicos fueron calculados asumiendo un proceso de desnaturalización de dos estados: monómeros en estado nativo (N) en equilibrio con monómeros en estado desnaturalizado (U):



En donde  $K_{app} = F_{app}/(1 - F_{app})$ . Se asumió una dependencia del  $\Delta G^\circ$  sobre la concentración de Gnd-HCl [43]:

$$\Delta G^\circ = \Delta G_{H_2O} - m[GndHCl]$$

En donde  $\Delta G^\circ$  representa la energía libre de Gibbs a una concentración determinada de Gnd-HCl.  $\Delta G_{H_2O}^\circ$  representa la energía libre de Gibbs en ausencia de Gnd-HCl,  $m$  es el gradiente lineal de la transición y refleja el proceso de cooperatividad.  $C_m$  es la concentración de desnaturalizante, en donde  $\Delta G = 0$ , fue calculado a partir de  $C_m = -\Delta G_{H_2O}^\circ / m$ .

#### 5.4.2 Desnaturalización térmica

Los experimentos de desnaturalización térmica fueron realizados en una celda de cuarzo sin restricción de paso de luz. Se prepararon muestras de 3mL de una solución que contiene la proteína de interés a una concentración final de 50µg/mL en PBS 1X. La intensidad de la fluorescencia del Trp35 se midió como se describió en los experimentos de desnaturalización química. La solución de proteína fue calentada usando un baño de agua con recirculación conectado a la cubeta del espectro-fluorímetro. La temperatura de la solución fue medida de forma directa usando un termómetro termistor.

Los datos de la desnaturalización térmica fueron analizados de acuerdo a Pace *et al.*, [43] considerando un proceso de dos estados y considerando la ecuación de van't Hoff:

$$\frac{d(\ln K_{app})}{d(1/T)} = -\frac{\Delta H_{app}}{R}$$

En donde T es la temperatura, ΔH es la entalpía y R es la constante de los gases.

El valor de ΔG a temperatura ambiente fue determinado usando la siguiente ecuación:

$$\Delta G(T) = \Delta H_m \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) - \Delta C_p \left[ (T_m - T) + T \ln \left( \frac{T}{T_m} \right) \right]$$

En donde T es 298K y Cp es el cambio en la capacidad calorífica asociada al desplegamiento, calculado de forma teórica de acuerdo al método de Millardi *et al.*, [44].

#### 5.5 Formación de fibras *in vitro*

Se prepararon 3mL de una solución de proteína con una concentración de 100µg/mL en PBS 1X. La solución de proteína se filtró por una membrana Millex GV 0.22mm (Millipore). La solución de proteína se colocó en una celda de poliestireno y se dejó agitando con una microbarra magnética a 37°C. La formación de fibras fue monitoreada mediante la incorporación de Tioflavina T (ThT) [45]. La emisión de fluorescencia se registró a 482 nm usando una longitud de onda de excitación de 450 nm. La cinética de formación de fibra se analizó mediante los cambios en la intensidad de fluorescencia del ThT a través del tiempo. El análisis se realizó con la siguiente ecuación [22]:

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

En donde  $F_{\text{ThT}}$  es la intensidad de la fluorescencia del ThT,  $A$  es la intensidad de la fluorescencia del ThT en la postransición,  $t_i$  es el tiempo medio de la región de transición,  $B$  es el crecimiento de la fibra y  $t$  es el tiempo. El tiempo lag de nucleación fue calculado por extrapolación lineal de la fase hiperbólica con origen en el eje de las abscisas [46].

### **5.6 Microscopía electrónica**

Se colocaron 20  $\mu\text{l}$  de muestra durante 2 minutos sobre una rejilla G200 (formvar/carbono), cubierta de cobre (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA), secando exceso de líquido con papel filtro. Posteriormente se realizó una tinción negativa con 40  $\mu\text{l}$  de acetato de uranilo 4% (w/v) durante 2 minutos, secando el exceso de líquido con papel filtro. Las muestras fueron analizadas a 80 kV en un microscopio de transmisión electrónica Zeiss EM900. Las imágenes se tomaron con una cámara CCD DualVision 300W (Gatan, Pleasanton, CA) a una resolución de 1030 X 1300 pixeles. Las imágenes fueron editadas con el programa Adobe Photoshop, version 7.0.

### **5.7 Cristalografía**

La generación de los cristales, difracción, colecta de datos y la generación de los modelos estructurales fue realizada en el grupo del Dr. Enrique Rudiño, del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Mediante la técnica de “microbatch”, se buscaron las condiciones óptimas de cristalización, utilizando los “Kits” 1 y 2 de cristalización de Hampton Research (Laguna Niguel, CA). Las proteínas fueron concentradas de la siguiente manera: 3mJL2 a 3.5mg/mL, 3rJL2/Y a 4.5 mg/mL y 3rJL2/YA a 3.5 mg/mL. Se colocaron muestras conteniendo 1  $\mu\text{L}$  de proteína y 1  $\mu\text{L}$  de solución de cristalización, mezcladas con aceite de parafina. Los microcristales fueron obtenidos en diferentes condiciones. En la condición 5 (Citrato de sodio 0.2 M, Hepes 0.1 M pH 7.5 y 30% MPD) se obtuvieron los cristales de 3mJL2. Los cristales de 3rJL2/Y y 3rJL2/YA se obtuvieron en la condición 32 (Sulfato de amonio 2 M) del Kit 1. Para las tres proteínas las condiciones en las que se obtuvieron cristales fueron optimizadas. Utilizando la metodología de gota colgante se obtuvieron cristales 0.30x0.30x0.30 mm a 291K después de 15 días. Las condiciones fueron las siguientes: 3mJL2, Citrato de sodio 0.2 M, HEPES 0.1 M pH 7.5 y 40% MPD. Para 3rJL2/Y, Sulfato de amonio 2.3 M y 40% de trealosa. 3rJL2/YA, Sulfato de amonio 1.6 M y 40% de trealosa. Todas estas condiciones fueron adecuadas para los experimentos de difracción de rayos X. Los cristales seleccionados para los análisis de

difracción de rayos X se congelaron directamente en N<sub>2</sub> líquido, inmediatamente después de haberlos cosechado y preservado con la solución protectora correspondiente.

#### **5.7.1 Colecta de datos de la difracción de rayos X**

La colecta de datos se realizó en el NSLS beamline X6A a dos longitudes de onda de rayos X: 0.9720 Å (para las dos mutantes) y 0.9330 para 3mJL2. Se utilizó el criosistema Oxford de la serie Cryostream 700 y un detector ADSC Q270 (ADSC; Poway, CA, USA).

#### **5.7.2 Procesamiento de datos y refinamiento del modelo**

La indexación y la integración se realizaron con el programa MOSFLM para 3rJL2/Y y XDS para 3mJL2 y 3rJL2/YA (45, 46). La integración de las reflexiones fueron ordenadas, escaladas y truncados con SORTMTZ, SCALA y TRUNCATE [49] de la suite CCP4 respectivamente.

Para el reemplazo molecular se utilizaron las coordenadas atómicas del PDB 1LIL, correspondiente a la inmunoglobulina  $\lambda$ 3 Cle. El reemplazo molecular se llevó a cabo con el programa PHASER [50, 51]. El modelo resultante para cada proteína fue sometido a un refinamiento de cuerpo rígido, seguido de un refinamiento en REFMAC5 [52]. Una vez que se alcanzó la convergencia se continuó el refinamiento en PHENIX 1.5 [53]. El refinamiento se alternó con la construcción manual mediante el programa COOT [54].

Se realizaron varios ciclos de refinamiento, cuando los valores R<sub>work</sub> y R<sub>free</sub> fueron inferiores a 0.18 y 0.22 se terminó el proceso de refinamiento. La validación de los modelos se realizó mediante el programa PROCHECK [55].

Las coordenadas y los factores de estructura de los modelos finales fueron depositados en el “Protein Data Bank” (PDB) [56], con los siguientes códigos 4AIZ (3mJL2), 4AIX (3rJL2/Y) y 4AJ0 (3rJL2/YA). Los datos cristalográficos y las estadísticas de refinamiento para las tres estructuras se muestran en la Tabla 6 (página 30).

### **5.8 Análisis estructural.**

Para realizar el análisis estructural se utilizó el servidor 3dss que permite realizar la superposición de las estructuras [57]. Con el servidor “Protein Interaction Calculator Server” se calcularon las interacciones de puentes de hidrógeno e hidrofóbicas, las distancias interatómicas consideradas fueron  $\leq 3.5$  and  $4.0$  Å [58]. Con el servidor “Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies (PISA)” se analizaron las interacciones que se crean en los cristales de 3mJL2, 3rJL2/Y and 3rJL2/YA [59]. Las figuras se realizaron

con el programa PyMOL (The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.2, Schrödinger, LLC).

### **5.9 Dicroísmo circular (CD).**

Los espectros de CD y los experimentos de desnaturalización térmica se realizaron en un espectropolarímetro JASCO J-715 (JASCO Inc. Easton MD) equipado con un Peltier refrigerado por agua. Los espectros en el UV-lejano (Far-UV CD) se midieron usando una celda de cuarzo cerrada con 0.2 cm de paso de luz. La concentración de proteína que se utilizó fue de 200µg/mL en 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,5.

Los datos registrados se convirtieron en elipticidad molar mediante la fórmula [60]:

$[\theta] = \text{miligrados} / (\text{paso de luz de la celda en milímetros} \times \text{concentración molar de la proteína} \times \text{número de residuos})$

## **6. Resultados**

### **6.1 3mJL2 y 3rJL2/YA (C34Y/W91A), dominios variables $\lambda$ 3 amiloidogénicos y no amiloidogénicos**

Las líneas germinales de 3r y 3m se ensamblaron integrándoles el segmento JL2, dando como resultado las construcciones 3rJL2 y 3mJL2. Las construcciones de cada línea germinal se verificaron mediante secuenciación nucleotídica. Las proteínas recombinantes se expresaron en un sistema bacteriano, utilizando la cepa de *E.coli* BL21 (DE3). 3mJL2 se expresó de forma soluble y con un alto rendimiento. La identidad de 3mJL2 se verificó mediante espectrometría de masas y secuenciación de los primeros cinco aminoácidos. 3rJL2 no se expresó en cantidad suficiente aun cuando se modificaron las condiciones de expresión (datos no mostrados). La poca cantidad de proteína que se obtuvo de 3rJL2 nos impidió llevar a cabo su caracterización. Debido a que la expresión de 3rJL2 resultó poco exitosa se decidió analizar mediante un predictor de puentes disulfuro si la presencia de Cys34 podría alterar la formación del puente disulfuro característico de las cadenas ligeras. Para este propósito se utilizó el servidor DiANNA 1.1[61] el cual predice la formación de puentes disulfuro a partir de la secuencia de aminoácidos; en este servidor se introdujo la secuencia de 3rJL2. El servidor detecta el puente disulfuro característico que presentan las cadenas ligeras entre los residuos Cys23 y Cys88. Sin embargo, detecta también una segunda opción con alta probabilidad de formar un puente disulfuro entre los residuos Cys23 y Cys34 (dato no mostrado). En contraste, el servidor no detecta la probabilidad de formar un puente disulfuro entre Cys34 y Cys88. Actualmente se tiene bien documentado que dentro de las limitantes que presenta la expresión heteróloga en bacterias es llevar a cabo plegamientos complejos de proteínas que incluyan varios puentes disulfuro [62]. La presencia de la Cys34 podría ser la causa por la que la expresión heteróloga de 3rJL2 resultara poco exitosa. Probablemente durante el plegamiento de 3rJL2 en *E.coli* (DE3) resulta complejo el poder distinguir la combinación correcta de residuos de cisteína que se deben utilizar, es decir, usar la combinación Cys23 y Cys88 para formar el puente disulfuro característico y descartar la selección de Cys22 y Cys34.

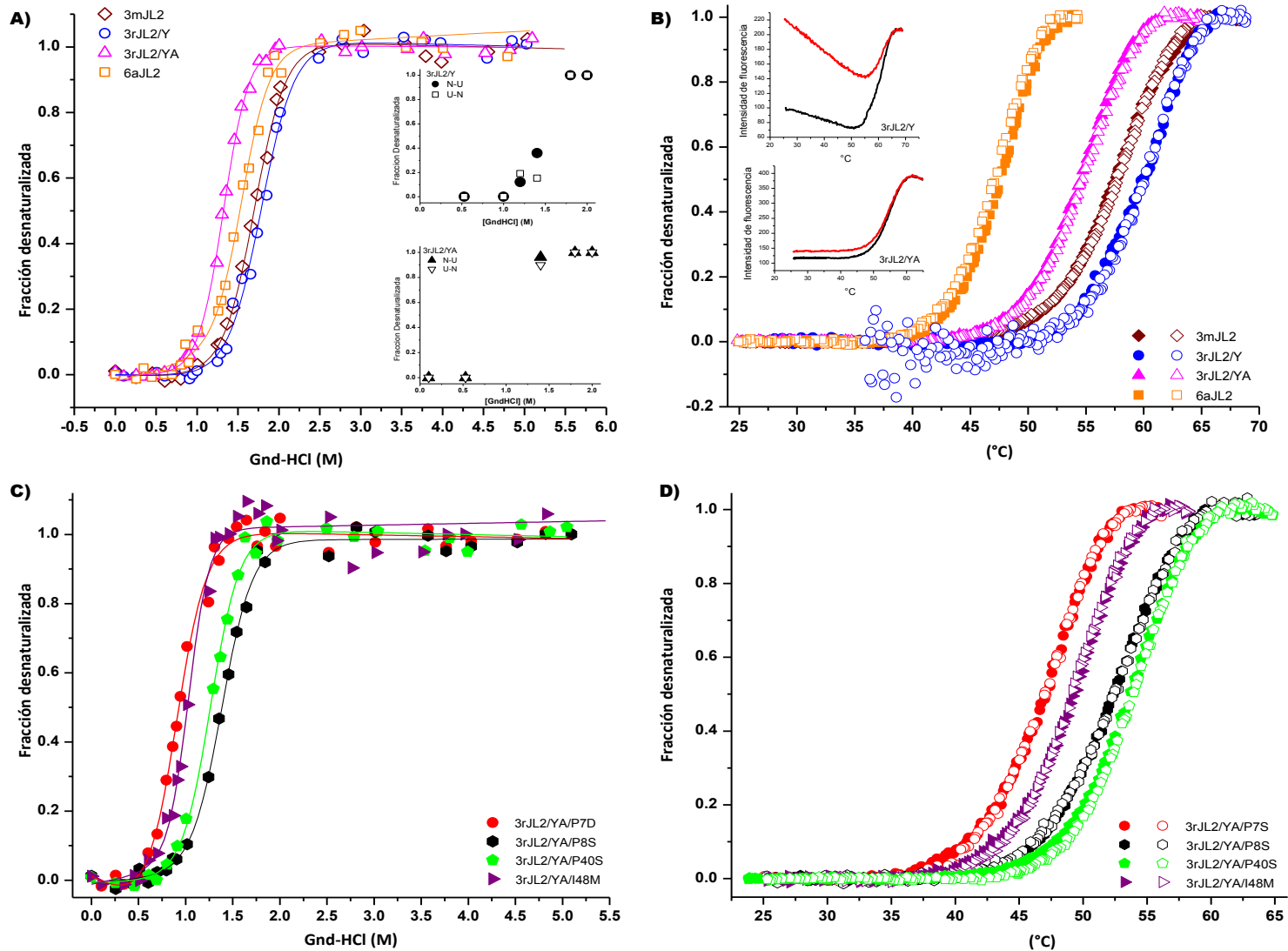
Con el objetivo de caracterizar estas dos líneas germinales decidimos construir varias mutantes derivadas de 3rJL2. Las secuencias de las líneas germinales  $\lambda$ 3 fueron alineadas (Fig. 5), observándose que 3r es la única línea germinal que presenta una cisteína en la posición 34 (CDR1) (numeración de Kabat). Algunas líneas germinales  $\lambda$ 3



presentan tirosina en esta posición. En otras secuencias se observan residuos cargados y polares (Fig. 5), mientras que las secuencias amiloidogénicas y no amiloidogénicas aisladas de pacientes con amiloidosis AL presentan Cys34 (Fig. 5).

De acuerdo con estas observaciones construimos 3rJL2/Y, un mutante en la que Cys34 se mutó a tirosina (3rJL2/C34Y), el residuo equivalente que se encuentra en la línea germinal 3m (Fig. 5). La expresión, purificación y el rendimiento de 3rJL2/Y fueron comparables a los de 3mJL2. Probablemente la presencia del residuo de cisteína expuesta al solvente pudo haber afectado la expresión de 3rJL2. La estabilidad termodinámica de 3mJL2 y 3rJL2/Y se evaluó por medio de experimentos de desnaturalización química (12 horas de incubación a 25°C) y térmica al equilibrio. La desnaturalización química se hizo a diferentes concentraciones de cloruro de guanidina (Gnd-HCl). En ambos experimentos (desnaturalización química y térmica) los valores de fluorescencia del triptófano revelaron transiciones monofásicas (Fig.6A y 6B). Los datos obtenidos fueron analizados suponiendo un comportamiento de dos estados (Fig.6A).

La desnaturalización térmica de 3rJL2/Y mostró transiciones que no fueron superponibles en la curva de desnaturalización (Fig. 6B). Estos resultados pueden reflejar un proceso de plegamiento irreversible o daño foto-físico del Trp35. Para corroborar lo anterior se midieron espectros de fluorescencia de muestras que estuvieran en oscuridad o iluminadas por la luz de la lámpara de fluorescencia durante el proceso de desnaturalización térmica. Los espectros registrados de las muestras en oscuridad o iluminadas fueron muy similares, lo que indica que la foto-oxidación no es responsable de las diferencias en la desnaturalización térmica de 3rJL2/Y. Con el objetivo de saber si algún tipo de agregación pudiera ser la causa de la irreversibilidad, se realizaron análisis por cromatografía de exclusión por tamaño ("Size Exclusion Chromatography", SEC) y microscopía electrónica de la muestra desnaturalizada. Los resultados de ambas estrategias no mostraron agregados (datos no mostrados). Para determinar cambios en la estructura secundaria de las proteínas se utilizó dicroísmo circular (CD). Se registraron espectros de UV lejano de 3rJL2/Y antes (condición nativa, 20°C) y después de la desnaturalización térmica (condición desnaturalizante, 75°C), encontrando que los espectros obtenidos no son iguales (Fig. 7). Este resultado sugiere que algún tipo de irreversibilidad no vinculada a la agregación está presente en esta proteína.



**Figura 6. Curvas de desnaturalización de cadenas ligeras  $\lambda 3$ .** **A)** y **C)** Fracción desnaturalizada de las proteínas en presencia de cloruro de guanidina (Gnd-HCl). Las líneas sólidas representan un modelo de dos estados. Los insertos en **A)** corresponden a una curva de desnaturalización y renaturalización de 3rJL2/Y y 3rJL2/YA. Los símbolos rellenos corresponden a la desnaturalización de la forma nativa (N-U), mientras que los símbolos vacíos corresponden a la renaturalización del estado desnaturalizado (U-N). **B)** y **D)** Desnaturalización térmica; los símbolos rellenos indican desnaturalización y los vacíos renaturalización. Los insertos en **B)** muestra la intensidad de fluorescencia de 3rJL2/Y y 3rJL2/YA. 6aJL2 se muestra en las gráficas con propósitos de comparación. Los cálculos termodinámicos se muestran en la Tabla 5.

Todas las proteínas de cadenas ligeras  $\lambda$  recombinantes previamente estudiadas por desnaturalización térmica han mostrado reversibilidad sin daño. Además del Trp35 en el núcleo hidrofóbico característico de las cadenas ligeras, la secuencia de 3rJL2 contiene un segundo residuo de triptófano en la posición 91, que también está presente en la mayoría de las secuencias de cadena ligera amiloidogénicas y no amiloidogénicas  $\lambda$ 3 (Fig. 5). La presencia de varios residuos de triptófano en una proteína dificulta la interpretación de la señal de fluorescencia generada de forma individual. Cuando dos residuos de triptófano se encuentran en la misma proteína, ocurre un apagamiento de la fluorescencia. En el inserto de la Figura 6B se puede observar que la intensidad de la fluorescencia entre el proceso de desnaturalización y el de renaturalización difiere. Lo anterior sugiere que durante el proceso de desnaturalización ocurre un apagamiento de la señal de fluorescencia generada por los triptófanos 35 y 91. Este apagamiento en la mutante 3rJL/Y nos impidió generar un análisis confiable para obtener la fracción desnaturalizada de la curva de reversibilidad (Fig. 6B).

Con la finalidad de facilitar la interpretación y el análisis de datos de la curva de reversibilidad de desnaturalización térmica seguida por fluorescencia, se cambió el W91 por alanina (el equivalente de residuos presentes en la secuencia de 3m, Fig. 5). Esta doble mutante llamada 3rJL2/YA (3rJL2/C34Y/W91A) mostró curvas de desnaturalización y renaturalización superponibles (Fig.6B). Los resultados de CD en el UV lejano indicaron que la doble mutante recuperó su estructura nativa más significativamente en comparación con la mutante sencilla (Fig.7). Este resultado nos alentó a utilizar la doble mutante como molde para generar nuevas mutantes y evaluar la propensión a la formación de fibras.

En la Figuras 6A y 6B se muestran las gráficas obtenidas de los experimentos de desnaturalización química y térmica. Los valores termodinámicos calculados a partir de estas curvas muestran que 3mJL2 y 3rJL2/Y presentan valores similares de  $C_m$ ,  $m$ ,  $T_m$ ,  $\Delta H$ , y  $\Delta G$  (Tabla 5). Los valores termodinámicos obtenidos para 3mJL2 y para 3rJL2/Y caen dentro de los valores termodinámicos para cadenas ligeras consideradas estables reportados por otros grupos [23, 63] y resultados obtenidos en el laboratorio [40] (ver detalles más adelante).

El cambio Trp91Ala en 3rJL2/YA causó una desestabilización significativa. Al comparar los valores termodinámicos de 3rJL2/Y con los de 3rJL2/YA se observa que los parámetros de  $C_m$ ,  $T_m$  y  $\Delta G$  disminuyeron 0.4 M, 7°C y 6KJ/mol, respectivamente (Tabla

5). Para las mutantes se evaluó si la desnaturalización química de estas proteínas es un proceso reversible. El inserto de la Figura 6A en la cual se muestran algunos puntos de la curva de desnaturalización-reatauralización en diferentes concentraciones de cloruro de guanidina, se puede apreciar que ambas curvas son superponibles, sugiriendo que el proceso de renaturalización de 3rJL2/Y y 3rJL2/YA es reversible.

La línea germinal de 6a fue la primera línea germinal  $\lambda$  estudiada, usando como modelo a la proteína 6aJL2. Los valores termodinámicos de 6aJL2 permiten considerarla como una cadena ligera estable [40]. En este trabajo, tomamos como referencia los valores termodinámicos de 6aJL2 como un criterio para considerar cuando una cadena ligera es relativamente estable o inestable. Este valor termodinámico de 6aJL2 permitió comparar la estabilidad termodinámica entre las familias  $\lambda 3$  y  $\lambda 6$ . Los resultados termodinámicos obtenidos para 6aJL2 fueron similares a los reportados anteriormente [40]. Los resultados de CD en el UV lejano mostraron que la línea germinal de 6aJL2 es completamente reversible (Fig. 7).

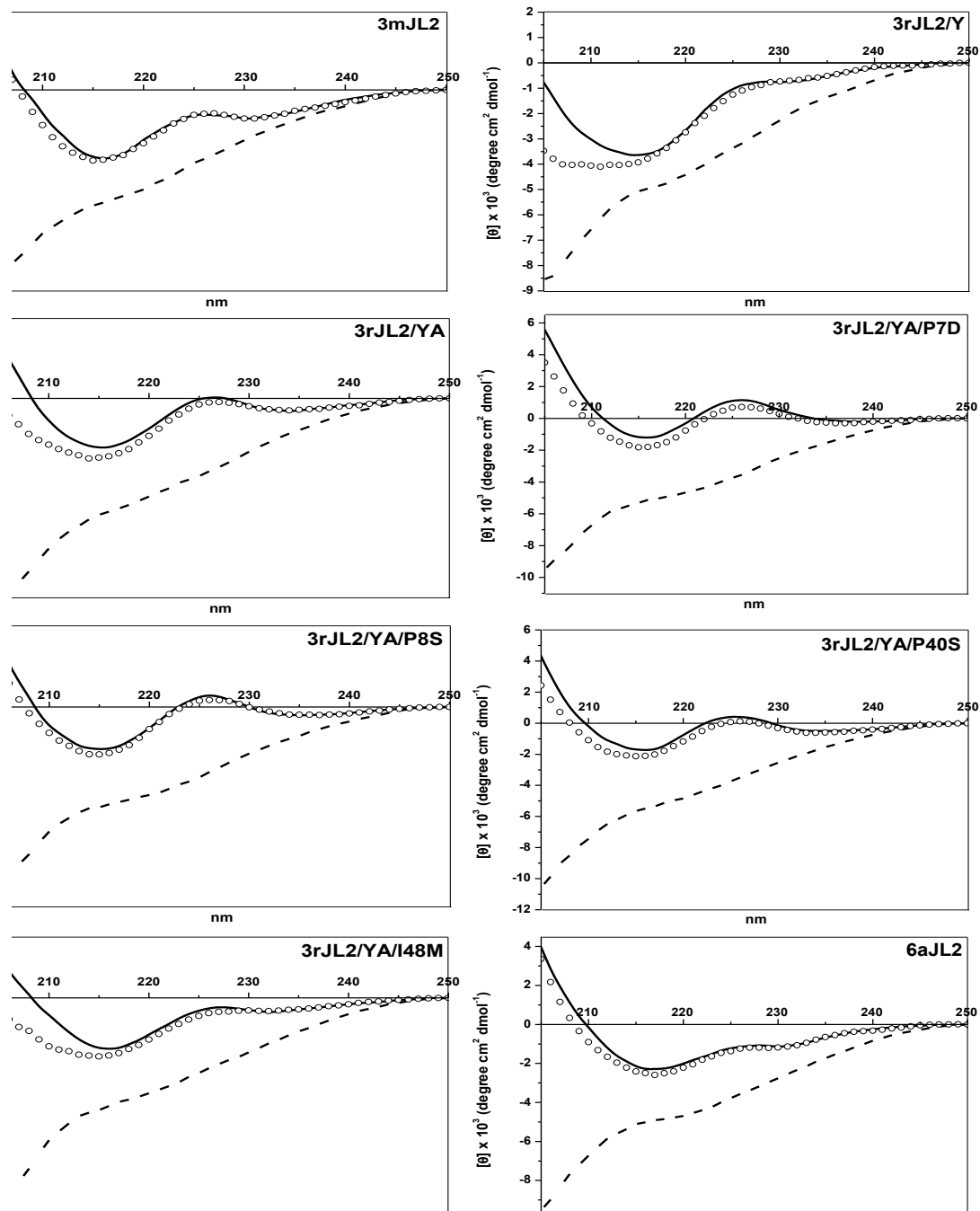
Cuando se comparan los valores termodinámicos de 3mJL2 y 3rJL2/Y (Tabla 5) se pueden apreciar diferencias como lo son una  $T_m$  y un  $\Delta G$  superiores al de 6aJL2 (Tabla 5). Tomados en conjunto estos datos indican que 3mJL2 y 3rJL2/Y son al menos tan estables como la línea germinal 6aJL2 y que la línea germinal  $\kappa$ IO18/08, las únicas líneas germinales amiloides previamente estudiadas [40, 63, 64].

**Tabla 5.** Parámetros termodinámicos de cadenas ligeras  $\lambda 3$ .

| Parámetro  | 3mJL2     | 3rJL2/Y<br>(CDR1) | 3rJL2/YA<br>(CDR1/CDR3) | 6aJL2        |
|--|-----------|-------------------|-------------------------|--------------|
| <b>C<sub>m</sub> (M)</b>                         | 1.6 ± 0.1 | 1.8 ± 0           | 1.4 ± 0.1               | 1.6 ± 0      |
| <b>m (KJ/mol)</b>                                | -12 ± 1.2 | -13 ± 1.3         | -16 ± 1.0               | -14 ± 1.2    |
| <b>T<sub>m</sub>(°C)</b>                         | 60 ± 0.8  | 63 ± 0.1          | 56 ± 0.5                | 49 ± 0.5     |
| <b><math>\Delta G_{25^\circ C}</math> KJ/mol</b> | 33 ± 0.7  | 37 ± 2.9          | 31.3 ± 0.2              | 27 ± 1.3     |
| <b><math>\Delta H_{VH}</math> (KJ/mol)</b>       | 317 ± 2   | 331.3 ± 26        | 332 ± 5                 | 359.5 ± 19.4 |

La desviación estándar corresponde a tres experimentos independientes

n. a.= no aplica, no se observó formación de fibras después de 70 h



**Figura 7. Espectros de dicroísmo circular (CD) de las cadenas ligeras  $\lambda$  en sus formas desnaturada y renaturada.** Los espectros de desnaturación (75°C) y renaturalización (20°C), se muestran como líneas de puntos y círculos. Los espectros se registraron durante el calentamiento y enfriamiento de la misma muestra. La línea continua representa el espectro de la proteína nativa. La renaturalización de 3rJL2/Y, 3rJL2/YA, 3rJL2/YA/P7D, 3rJL2/YA/P40S y 3rJL2/YA/I48M muestran algunos cambios en la estructura secundaria (trazo de círculos). Lo anterior se puede observar por el desplazamiento del trazo (215 nm) en el espectro de renaturalización alrededor de la máxima a 225 nm. Los experimentos se llevaron a cabo utilizando una celda con un paso de luz de 0.2 cm (200 $\mu$ g/ml de proteína en 20 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7.5).

## 6.2 Diferencias estructurales entre la línea germinal 3mJL2 y las mutantes de 3rJL2

Los dominios variables 3mJL2, 3rJL2/Y y 3rJL2/YA se cristalizaron mediante el método de difusión de vapor de gota colgante. Las estructuras cristalográficas se determinaron por reemplazo molecular utilizando como modelo de búsqueda la proteína de mieloma múltiple  $\lambda$ 3 Cle [51]. 3mJL2 formó cristales en el grupo espacial C121, mientras 3rJL2/Y y 3rJL2/YA formaron cristales en el grupo espacial P3<sub>1</sub>. La unidad asimétrica de cada cristal contiene cuatro monómeros. Cada monómero del dominio variable de cadena ligera presenta el plegamiento canónico del respectivo segmento de una inmunoglobulina. Se pudieron observar los residuos 2-107. El mapa final de densidad de electrones 2fo/fo de cada estructura presentó buena calidad y un arreglo congruente con los modelos. Los datos cristalográficos y estadísticos de refinamiento se presentan en la Tabla 6.

**Tabla 6.** Datos cristalográficos y estadísticas del afinamiento de las estructuras  $\lambda$ 3

| Datos  | 3mJL2                               | 3rJL2/Y                        | 3rJL2/YA                        |
|--|-------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Grupo espacial   | C 1 2 1                             | P3 <sub>1</sub>                | P3 <sub>1</sub>                 |
| Dimensiones de la celda unitaria (a, b, c /Å; $\alpha, \beta, \gamma$ /°)                        | 89.4, 40.9, 106.7; 90, 90.15, 90    | 41.9, 41.9, 170.8; 90, 90, 120 | 41.8, 41.8, 171.10; 90, 90, 120 |
| Residuos por monómero/ Monómeros por AU  | 106 / 4                             | 106 / 4                        | 106 / 4                         |
| Coefficiente de Matthews (Å <sup>3</sup> Da <sup>-1</sup> )/ Concentración de solvente (%)       | 2.1 / 41.3                          | 1.9 / 33.9                     | 1.8 / 33.6                      |
| Fuente de rayos X  | NSLS, X6A                           |                                |                                 |
| Detector   | ADSC Q270 CCD                       |                                |                                 |
| Longitud de onda   | 0.9330                              | 0.9720                         | 0.9720                          |
| Intervalo de resolución (Å)  | 34.20-1.75 (1.84-1.75) <sup>a</sup> | 24.86-1.80 (1.90-1.80)         | 27.63-1.70 (1.79-1.70)          |
| Número de reflexiones únicas   | 31323                               | 31131                          | 36831                           |
| Multiplicidad  | 6.8 (7.2)                           | 5.7 (5.7)                      | 5.7 (5.6)                       |
| Integridad de los datos (%)  | 79.4 (74.3)                         | 100 (100)                      | 99.9(99.7)                      |
| I/ $\sigma$ (I)  | 7.4 (2.1)                           | 10.4 (2.3)                     | 10.2 (1.8)                      |
| R <sub>merge</sub> (%)   | 7 (37)                              | 6 (32)                         | 6 (43)                          |
| Valor B obtenido de la gráfica de Wilson (Å <sup>2</sup> ) / Valor B promedio de las coordenadas | 17.22 / 22.50                       | 16.27 / 20.87                  | 18.46 / 23.55                   |
| R <sub>work</sub> / R <sub>free</sub> (%)  | 16.6 / 21.8                         | 16.8 / 21.1                    | 17.4 / 21.1                     |
| PDB  | 4AIZ                                | 4AIX                           | 4AJ0                            |

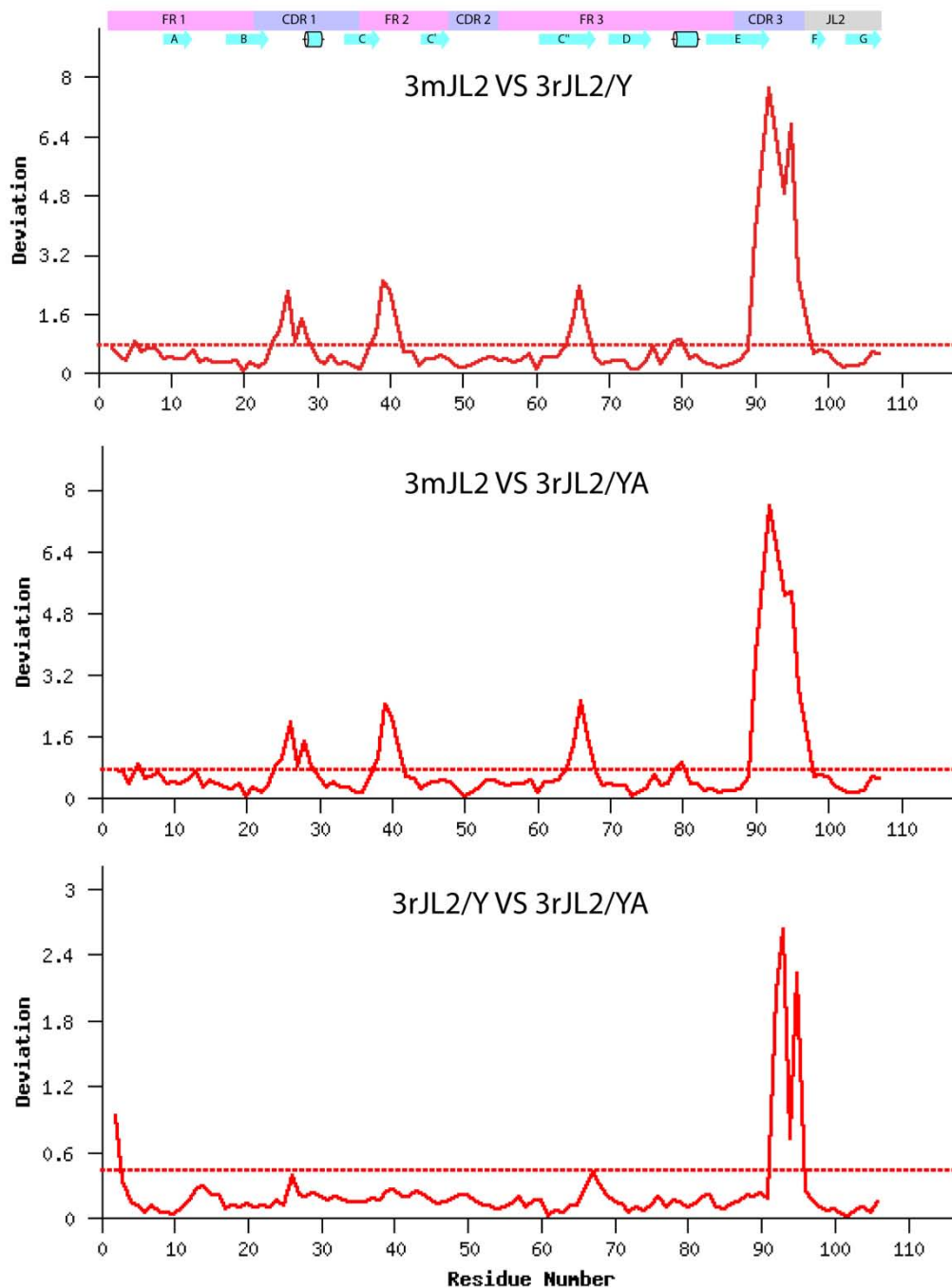
La superposición de los monómeros de cada una de las estructuras permitió obtener un valor de desviación estándar (RMSD) entre 0.4 y 0.9 Å, indicando que los tres modelos son similares (Fig. 8). Sin embargo, hay ligeras desviaciones de la cadena principal entre 3mJL2 y las mutantes 3rJL2/Y y 3rJL2/YA en el CDR1. Otras desviaciones se observan en la región cercana al residuo P40. El asa que conecta las hebras C' y D junto con el CDR3 presentan también ligeras desviaciones (Fig. 9A).

La conformación de la región N-terminal en las estructuras 3mJL2, 3rJL2/Y y 3rJL2/YA es similar a la de 6aJL2 [24], incluyendo la prolina del "β-bulge". Sin embargo la hebra A en las estructuras λ3 es corta y solo comprende el segmento después del "β-bulge" (Fig. 9B). En las estructuras λ3 y en la estructura de 6aJL2 se observó que se comparten los mismos puentes de hidrógeno que se forman entre los grupos carbonilos de P7 y P8 de la hebra A con los grupos carbonilos de T103 y K104 de la hebra G (Fig. 9B). En comparación con otras líneas germinales de la familia λ3, 3mJL2 presenta una inserción en la CDR3 (Y95b) (Fig. 5). En 3mJL2, el hidroxilo del residuo Y95b forma un único puente de hidrógeno con el OE2 de E3 que contribuye a mantener el extremo N-terminal en el interior del dominio variable (Fig. 9B; Tabla 7).

La conformación de la cadena principal de 3rJL2/Y y 3rJL2/YA es similar. El cambio de cisteína a tirosina en la posición 34 incrementó el parche de hidrofobicidad en las mutantes de 3r. En 3rJL2/Y, el residuo Tyr34 (hebra β C) forma parte de un grupo hidrofóbico con los residuos Y32, Y49, L46 y W91 (Fig. 9D). El último residuo forma una interacción hidrofóbica adicional con V96 (Fig. 9D). 3rJL2/YA mantiene las mismas interacciones hidrofóbicas, con la excepción de la posición 91. Esto nos sugirió que el cambio W91A (hebra β G) propició la pérdida de contactos con las hebras β C, F y G. Quizás ésta podría ser una de las explicaciones de por qué 3rJL2/Y es ligeramente más estable (Tabla 5) y por qué 3rJL2/YA presenta la capacidad de formar fibras (ver más adelante).

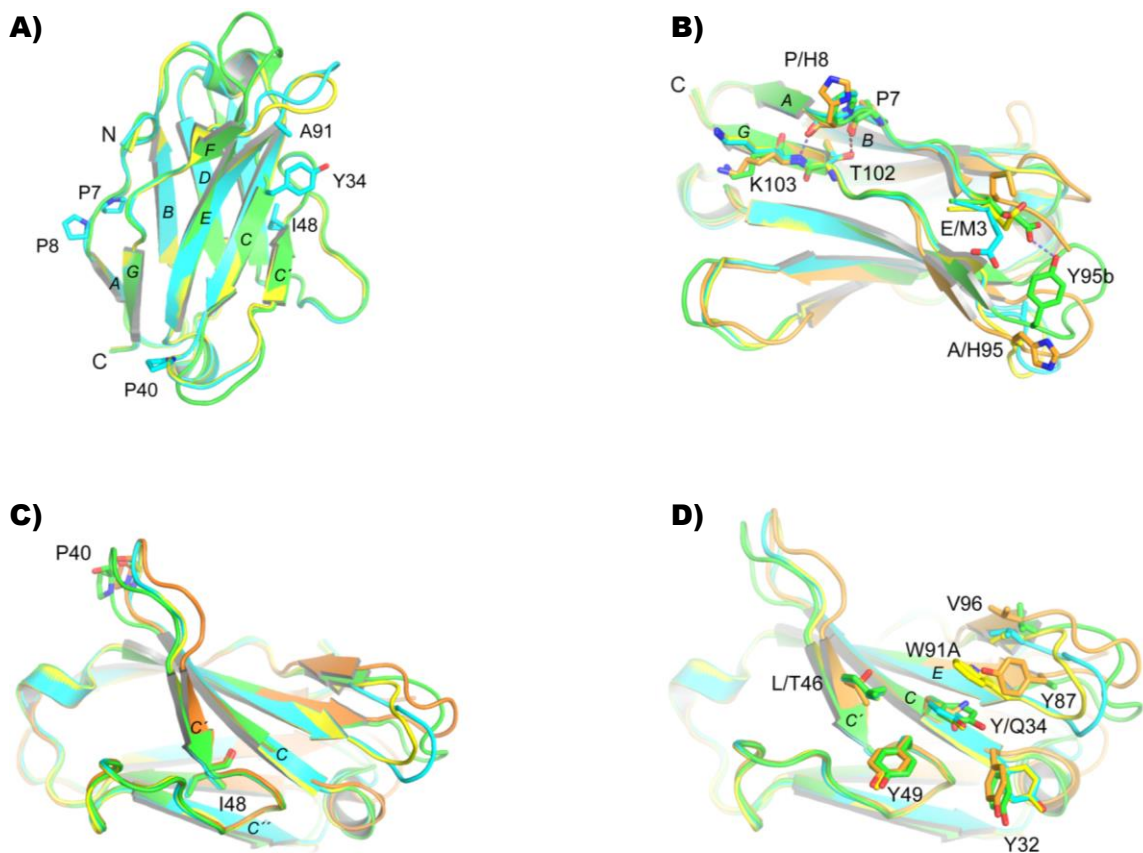
Al comparar las estructuras λ3 con 6aJL2, se observa una desviación de ~2 Å en el Cα del asa que conecta las hebras β C y C' (K39 a Q42) (Fig. 9C). Esta diferencia ha sido reportada en proteínas asociadas a la amiloidosis AL y podría reflejar la alta movilidad de esta región [27].

El análisis estructural sugiere que cada línea germinal presenta un grupo particular de contactos que estabiliza su estructura. En las estructuras de las cadenas ligeras λ3 se observó que presentan un mayor número de interacciones hidrofóbicas que la cadena ligera 6aJL2 (Tabla 7).



**Figura 8. Gráficas de RMSD de las estructuras  $\lambda 3$ .** Las gráficas de RMSD fueron calculadas entre un monómero de la unidad asimétrica de 3mJL2 vs 3rJL2/C34Y (RMSD 0.9 Å), 3mJL2 vs 3rJL2/YA (RMSD 0.8 Å) y 3rJL2/Y vs 3rJL2/YA (RMSD global 0.4 Å). Entre 3mJL2 y las estructuras de 3rJL2 hay cuatro regiones que presentan desviaciones significativas en la cadena principal: CDR1 (residuos 25-31a), alrededor de la región P40 (residuos 39-42), FR3 (residuos 66-68) y en todo el CDR3 (residuos 91 -95B). 3rJL2/Y y 3rJL2/YA sólo muestran ligeras diferencias de RMSD en los residuos 93 y 94. La superposición de los monómeros se hizo usando el programa de 3dss [57].





**Figura 9. Diferencias estructurales entre la línea germinal 3mJL2 y las mutantes de 3rJL2. A)** Superposición de 3mJL2 (verde), 3rJL2/Y (amarillo) y 3rJL2/YA (cian). Los monómeros muestran la ubicación de los residuos P7, P8, P40, I48 y A91 en 3rJL2/YA. Las hebras  $\beta$  forman el plegamiento típico de inmunoglobulina. **B)** La conformación del N-terminal “sheet switch” es similar en 3mJL2 y 3rJL2, incluyendo el “ $\beta$ -bulge” en las hebras A. Se forman dos puentes de hidrógeno entre P7 y P8 de la hebra  $\beta$  A con T103 y K104 de la hebra  $\beta$  G, esto se representa por líneas de puntos. En 3mJL2, la inserción en Y95b forma un puente de hidrógeno con el E3 dirigiendo el extremo N-terminal hacia el núcleo hidrofóbico del dominio variable. El monómero de 6aJL2 se muestra en color naranja para propósitos de comparación. **C)** Superposición de la región que comprende los residuos de P40 e I48 de 3mJL2, 3rJL2/Y, 3rJL2/YA y 6aJL2. **D)** Representación de las interacciones hidrofóbicas únicas formadas entre W91 y Y34 en 3rJL2/Y. Se observa el apilamiento adicional (parche hidrofóbico) de V96 con los residuos Y32, Y49 y L46.

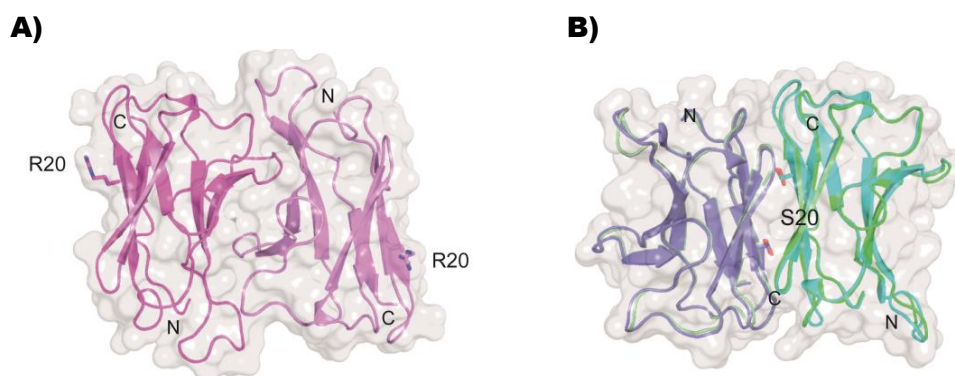
**Tabla 7.** Comparación de interacciones entre residuos específicos de proteínas  $\lambda 3$  y 6aJL2.

| 3mJL2                             |            | 3rJL2/Y   |            | 3rJL2/YA |            | 6aJL2      |            |
|-----------------------------------|------------|-----------|------------|----------|------------|------------|------------|
| <b>Puentes de hidrógeno</b>       |            |           |            |          |            |            |            |
| E3 (OE2)                          | Y95b (OH)  | -         | -          | -        | -          | -          | -          |
| P7 (O)                            | T102 (OG1) | P (O)     | T102 (OG1) | P7 (O)   | T102 (OG1) | P7 (O)     | T102 (OG1) |
| P8 (O)                            | K103 (N)   | P8 (O)    | K103 (N)   | P8 (O)   | K103 (N)   | H8 (O)     | K103 (N)   |
| -                                 | -          | -         | -          | -        | -          | N31b (OD1) | R25 (NH1)  |
| -                                 | -          | -         | -          | -        | -          | N31b (ND2) | Y91 (O)    |
| Y34 (N)                           | Q89 (O)    | Y34 (N)   | Q89 (O)    | Y34 (N)  | Q89 (O)    | Q34 (N)    | Q89 (O)    |
| Y34 (O)                           | Q89 (N)    | -         | -          | -        | -          | Q34 (O)    | Q89 (N)    |
| -                                 | -          | -         | -          | -        | -          | Q34 (NE2)  | Y32 (O)    |
| -                                 | -          | -         | -          | -        | -          | Q34 (OE1)  | E50 (N)    |
| -                                 | -          | -         | -          | -        | -          | Q34 (NE2)  | Q89 (OE1)  |
| I48 (O)                           | W35 (N)    | I48 (O)   | W35 (N)    | I48 (O)  | W35 (N)    | I48 (O)    | W35 (N)    |
| I48 (N)                           | W35 (O)    | I48 (N)   | W35 (O)    | I48 (N)  | W35 (O)    | I48 (N)    | W35 (O)    |
| -                                 | -          | W91 (O)   | Y32 (N)    | A91 (O)  | Y32 (N)    | Y91 (O)    | N31b (ND2) |
| -                                 | -          | W91 (N)   | Y32 (O)    | A91 (N)  | Y32 (O)    | Y91 (N)    | S90 (OG)   |
| -                                 | -          | W91 (NE1) | Q89 (OE1)  | -        | -          | -          | -          |
| <b>Interacciones hidrofóbicas</b> |            |           |            |          |            |            |            |
| P7                                | P8         | P7        | P8         | P7       | P8         | -          | -          |
| Y34                               | Y32        | Y34       | Y32        | -        | -          | -          | -          |
| -                                 | -          | Y34       | L46        | Y34      | L46        | -          | -          |
| Y34                               | Y49        | Y34       | Y49        | Y34      | Y49        | -          | -          |
| -                                 | -          | Y34       | W91        | -        | -          | -          | -          |
| I48                               | W35        | I48       | W35        | I48      | W35        | I48        | W35        |
| I48                               | L73        | I48       | L73        | I48      | L73        | I48        | L73        |
| -                                 | -          | W91       | V96        | A91      | V96        | -          | -          |

Los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas formadas por los residuos de 3mJL2, 3rJL2/Y, 3rJL2/YA y 6aJL2 fueron calculadas usando el servidor PIC ("Protein Interaction Calculator") con un criterio de distancias inter-atómicas  $\leq 3.5 \text{ \AA}$  and  $4.0 \text{ \AA}$  [58]. La numeración de los residuos está de acuerdo a la numeración de Kabat.

Muchos dominios variables y cadenas ligeras completas forman dímeros en condiciones fisiológicas [32]. Los dímeros no parecen estar implicados en la formación de fibra y esta condición estructural podría inhibir el efecto patológico causado por los monómeros de cadena ligera [34]. La dimerización de los dominios variables podría considerarse una característica de seguridad que impide la formación de fibras. Por esta razón, se analizaron las interacciones  $V_L$ - $V_L$  en las estructuras de las cadenas ligeras  $\lambda 3$ . En la unidad asimétrica de 3mJL2 cada monómero interactúa con otro monómero

formando un dímero equivalente a un dímero de Bence-Jones (BJ) (Fig. 10A), mientras que los monómeros de 3rJL2/Y y 3rJL2/YA forman un dímero en el que el segundo monómero está rotado 180° con respecto al monómero correspondiente de 3mJL2 (Fig. 10B). Los monómeros de las mutantes derivadas de 3r sólo forman el equivalente de un dímero BJ con sus patrones de simetría. En el centro de la hebra B de 3mJL2 la cadena lateral de R20 se encuentra dirigida hacia el solvente y evita la formación de una interfaz alterna que se encuentra en 3rJL2/Y y 3rJL2/YA, donde S20 está sumergida en la interfaz del dímero (Fig. 10B).



**Figura 10. Interfaces de dímeros cristalográficos en sus unidades asimétricas de las cadenas ligeras 3mJL2, 3rJL2/Y y 3rJL2/YA.** **A)** 3mJL2 presentó el dímero nativo formado por la mayor parte de las estructuras cristalográficas  $V_L$ - $V_L$  reportadas (magenta y rosa). **B)** Los dímeros de las estructuras de 3rJL2, 3rJL2/Y (verde y verde claro) y 3rJL2/YA (cian y azul), presentan una disposición diferente en sus unidades asimétricas. Tanto 3rJL2/Y y 3rJL2/YA sólo forman la interfaz del dímero nativo con sus compañeros de simetría correspondientes. El residuo R20 ubicado en la hebra borde de 3mJL2 podría evitar la formación de la estructuración observada en B).

Con el servidor PISA (“Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies”) [58] se realizó un análisis de la interfaz de las cadenas ligeras  $\lambda$ 3 y de 6aJL2. El análisis indicó que la interfaz del dímero de 3mJL2 contiene 1,820 Å<sup>2</sup> del área de interfaz accesible sumergida (BSA). Este valor es mucho mayor que las interfaces de los dímeros cristalográficos canónicos formados por 3rJL2/Y, 3rJL2/YA y 6aJL2 (1546 Å<sup>2</sup>, 1361 Å<sup>2</sup> y 1227 Å<sup>2</sup> respectivamente). Con el objetivo de comparar el tamaño de las interfaces obtenidas a partir de las estructuras  $\lambda$ 3 se analizaron también las interfaces de dímeros de fragmentos correspondientes a anticuerpos ( $V_H$ - $V_L$ ) y cadenas ligeras ( $V_L$ - $V_L$ ) reportadas (Tabla 8). A partir de esta comparación se observó que el área de la interfaz del dímero

de 3mJL2 es grande lo cual podría dificultar que esta proteína pudiera adquirir una conformación que le permita agregarse.

**Tabla 8.** Áreas de interfaz de diferentes formatos de anticuerpo

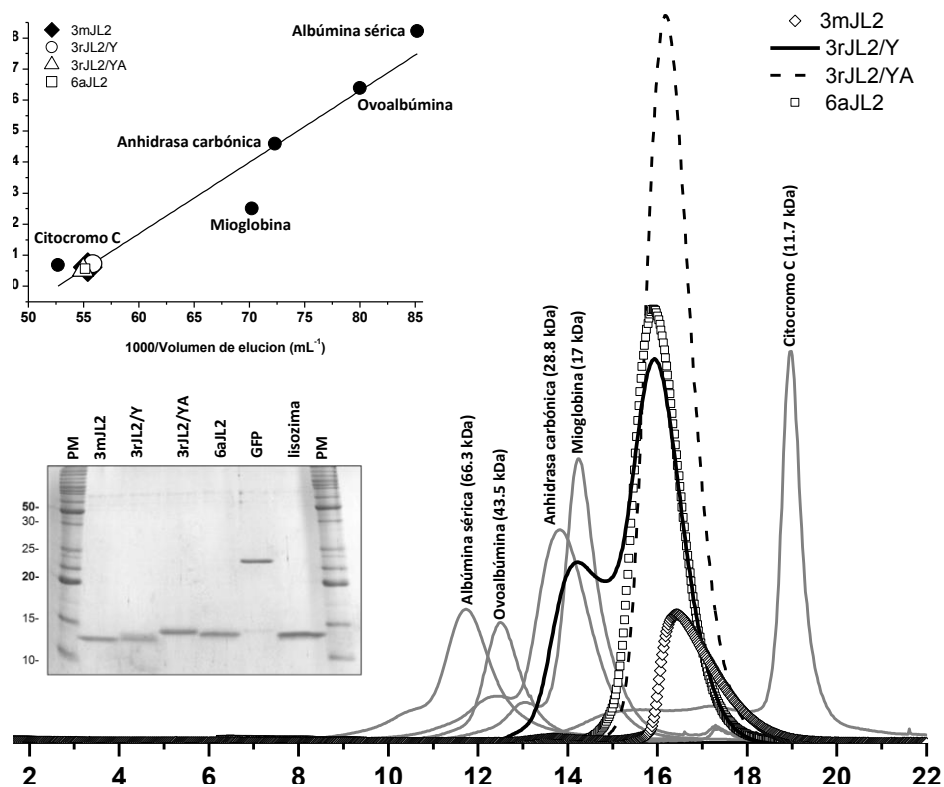
| Proteína               | Interacción                    | Formato  | Área Å <sup>2</sup> | PDB  |
|------------------------|--------------------------------|--|---------------------|------|
| IgG H1l, mieloma       | V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> | Fab  | 1,551               | 8FAB |
| IgM Factor reumatoide  | V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> | Fab  | 1,726               | 1ADQ |
| Complejo 9004G con Cn2 | V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> | ScFv   | 1,176               | 2YC1 |
| CLE                    | V <sub>L</sub> -V <sub>L</sub> | Dímero de cadena ligera (λ3)                     | 1,422               | 1LIL |
| LEN                    | V <sub>L</sub> -V <sub>L</sub> | Dímero de cadena ligera (κIV)                    | 1,080               | 2LVE |
| AL-09                  | V <sub>L</sub> -V <sub>L</sub> | Proteína Bence Jones (κI)                        | 1,348               | 2Q1E |
| κIO18/08               | V <sub>L</sub> -V <sub>L</sub> | Homo-dímero de cadena ligera (línea germinal κI) | 1,237               | 2Q20 |
| 3mJL2                  | V <sub>L</sub> -V <sub>L</sub> | Cadena ligera (línea germinal λ3)                | 1,820               | 4AIZ |
| 3rJL2/Y                | V <sub>L</sub> -V <sub>L</sub> | Cadena ligera (línea germinal λ3)                | 1,546               | 4AIX |
| 3rJL2/YA               | V <sub>L</sub> -V <sub>L</sub> | Cadena ligera (línea germinal λ3)                | 1,361               | 4AJ0 |

Para calcular el área de interfaz del dímero de las cadenas ligeras, sólo se tomó en cuenta el dominio variable. En las estructuras Fab los dominios constantes no se incluyeron en los cálculos de la superficie. Las zonas de interfaz se calcularon utilizando el servidor PISA ("Protein Interfaces, Surfaces and Assemblies") [59].

Basándonos en el análisis estructural, se evaluó el estado de oligomerización de 3mJL2, 3rJL2/Y, 3rJL2/YA y 6aJL2 mediante dos estrategias experimentales. En la primera de ellas, se evaluó la dimerización por medio de un perfil de elución utilizando una columna analítica SEC y en la segunda estrategia se realizaron experimentos de desnaturalización química y térmica. En ambas estrategias, se utilizaron diferentes concentraciones de proteína (20µg/mL, 50µg/mL y 200µg/mL).

En la Figura 11 se muestra el perfil de elución de la columna analítica SEC. Los dominios variables 3mJL2, 3rJL2/YA y 6aJL2 purificados eluyen como un solo pico en un volumen de elución correspondiente al peso molecular de un monómero. No se observaron especies oligoméricas en el perfil de elución (Fig. 11). Sin embargo, en el perfil de elución de 3rJL2/Y se pueden apreciar dos picos; el primero ubicado a los 14 mL y el segundo que es el mayoritario a los 16 mL. De ambos picos se tomó una fracción la cual fue analizada en gel SDS-PAGE al 15%. En el gel se observó que ambos picos

contienen a 3rJL2/Y (dato no mostrado). El peso molecular estimado del pico ubicado a los 14mL no corresponde al de un dímero o monómero, mientras que el peso molecular del pico ubicado en 16 mL corresponde al de un monómero. Pensamos que el pico de 14 mL puede corresponder a una migración anómala de 3rJL2/Y en la columna debida a la interacción de la proteína con la matriz.



**Figura 11. Análisis del estado oligomérico de los dominios variables de las cadenas ligeras  $\lambda$ .** La grafica principal muestra el perfil de elución de los dominios variables. En el gel se muestra el análisis de pureza de las muestras mediante SDS-PAGE 15%. En cada carril se cargaron cincuenta microgramos de proteína. La grafica insertada muestra la curva de calibración de las cadenas ligeras  $\lambda$  y proteínas estándar en una columna Superdex-75. La curva de calibración se utilizó para estimar el peso molecular de los dominios variables en función de la posición de elución. Todos los dominios variables purificados eluyeron con un peso molecular correspondiente a un monómero.

Nuestra segunda estrategia para evaluar la presencia de dímeros fue mediante experimentos de desnaturalización química y térmica a diferentes concentraciones de proteína. De acuerdo con la literatura, en bajas concentraciones de proteína se debe favorecer el estado monomérico de las cadenas ligeras, mientras que en concentraciones altas se favorece el estado dimérico [34, 64]. La forma de visualizar la situación anterior

es que las curvas de desnaturalización química y térmica correspondiente al dímero presenten un corrimiento, es decir, la curva del dímero se debe situar después de la curva que corresponde al monómero. Los valores termodinámicos correspondientes a la  $C_m$ ,  $T_m$  y  $\Delta G$  deberían ser mayores para el dímero, ya que se requiere de más calor o cloruro de guanidina para disociarlo.

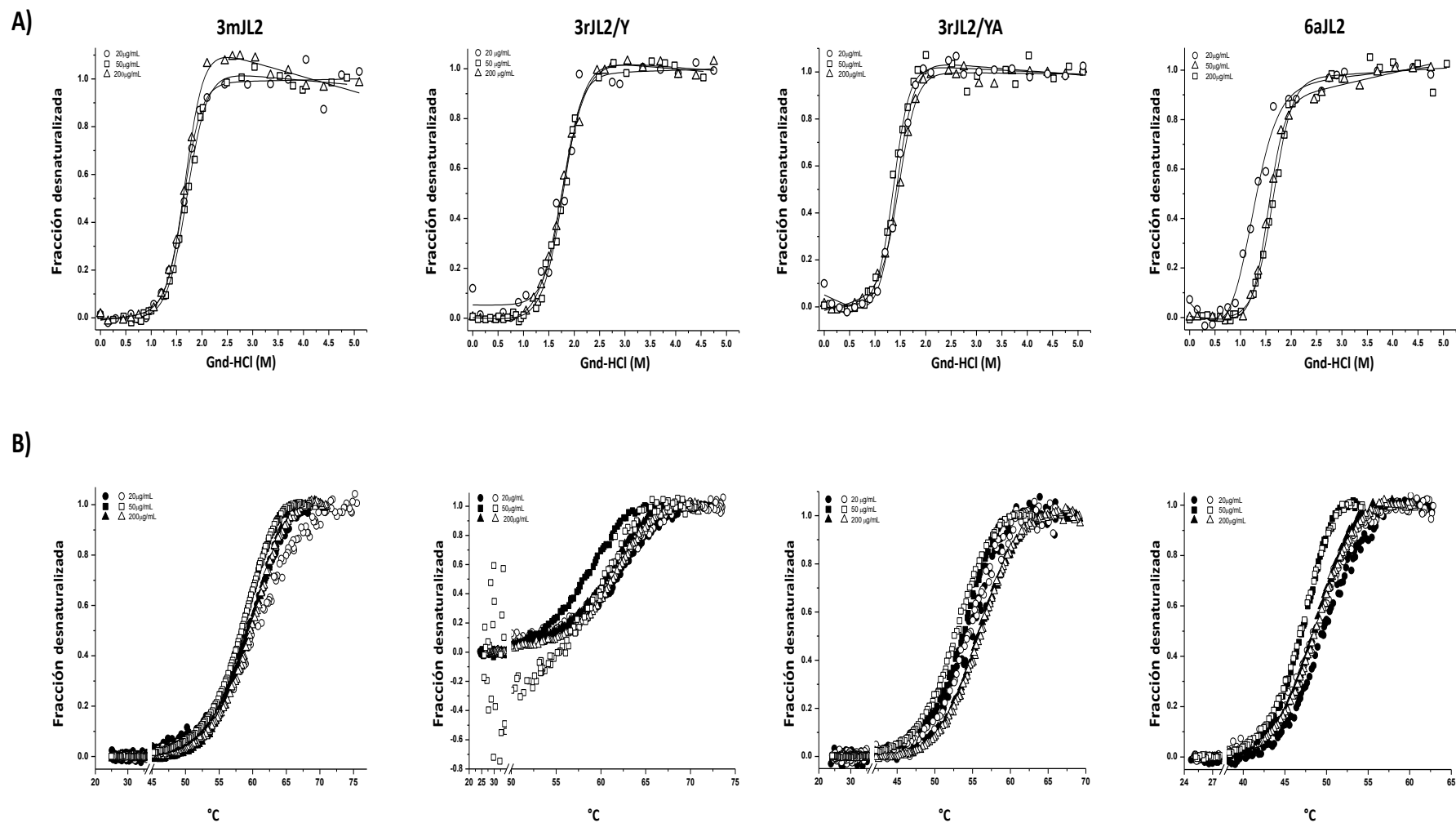
Las gráficas correspondientes a estos experimentos se pueden apreciar en la Figura 12. En ninguna de las concentraciones de las proteínas ensayadas observamos algún corrimiento de las curvas. Los valores de  $C_m$ ,  $T_m$  y  $\Delta G$  fueron similares en todas las concentraciones evaluadas (Tabla 9). Estos datos en conjunto sugirieron que en las concentraciones evaluadas los dominios variables se encuentran preferencialmente como especies monoméricas. A pesar de que el área de interfaz calculada en las estructuras cristalográficas de 3mJL2, 3rJL2/Y, 3rJL2/YA y 6aJL2 es similar a una interacción  $V_L-V_L$  (Tabla 8), esta interacción no parece ser lo suficientemente fuerte para formar un dímero estable.

**Tabla 9.** Estabilidad de las cadenas ligeras  $\lambda$  en diferentes concentraciones de proteína

| Concentración | Parámetro                      | 3mJL2          | 3rJL2/Y          | 3rJL2/YA         | 6aJL2            |
|---------------|--------------------------------|----------------|------------------|------------------|------------------|
| 20 $\mu$ g    | $C_m$ (M)                      | $1.7 \pm 0.1$  | $1.8 \pm 0.1$    | $1.4 \pm 0.0$    | $1.3 \pm 0.2$    |
|               | $\Delta G_{H_2O}^\circ$ KJ/mol | $24 \pm 0.8$   | $21 \pm 3.6$     | $21 \pm 2.2$     | $11 \pm 0.4$     |
|               | $m$ KJ/mol                     | $-14 \pm 0.0$  | $-11 \pm 2.6$    | $-15 \pm 1.6$    | $-9 \pm 1.6$     |
|               | $T_m$ ( $^\circ$ C)            | $61.3 \pm 2.3$ | $63.5 \pm 0.6$   | $56.9 \pm 0.2$   | $49.5 \pm 0.5$   |
|               | $\Delta G_{25^\circ C}$ KJ/mol | $29.5 \pm 4$   | $36 \pm 0.6$     | $30.5 \pm 4.2$   | $25.5 \pm 1.4$   |
|               | $\Delta H_{VH}$ KJ/mol         | $273 \pm 52.4$ | $316.2 \pm 10$   | $316.2 \pm 45.3$ | $342 \pm 31.6$   |
| 50 $\mu$ g    | $C_m$ (M)                      | $1.6 \pm 0.1$  | $1.8 \pm 0$      | $1.4 \pm 0.1$    | $1.6 \pm 0$      |
|               | $\Delta G_{H_2O}^\circ$ KJ/mol | $21 \pm 0.9$   | $24 \pm 2.1$     | $23 \pm 2.3$     | $21.4 \pm 0.9$   |
|               | $m$ KJ/mol                     | $-12 \pm 1.2$  | $-13 \pm 1.3$    | $-16 \pm 1.0$    | $-14 \pm 1.2$    |
|               | $T_m$ ( $^\circ$ C)            | $60 \pm 0.8$   | $63 \pm 0.1$     | $56 \pm 0.5$     | $49 \pm 0.5$     |
|               | $\Delta G_{25^\circ C}$ KJ/mol | $33 \pm 0.7$   | $37 \pm 2.9$     | $31 \pm 0.2$     | $27 \pm 1.3$     |
|               | $\Delta H_{VH}$ KJ/mol         | $317 \pm 1.8$  | $331.3 \pm 26$   | $332 \pm 4.9$    | $359.5 \pm 19.4$ |
|               | Growth rate ( $h^{-1}$ )       | n.a.           | n.a.             | $0.08 \pm 0.01$  | $1.20 \pm 0.24$  |
| $t_i$ (h)     | n.a.                           | n.a.           | $11.25 \pm 5.22$ | $5.17 \pm 0.84$  |                  |
| 200 $\mu$ g   | $C_m$ (M)                      | $1.7 \pm 0.0$  | $1.8 \pm 0$      | $1.5 \pm 0.1$    | $1.5 \pm 0.1$    |
|               | $\Delta G_{H_2O}^\circ$ KJ/mol | $24.4 \pm 0.2$ | $18 \pm 0.3$     | $21 \pm 0.6$     | $20 \pm 3.1$     |
|               | $m$ KJ/mol                     | $-15 \pm 0.1$  | $-10 \pm 0.3$    | $-14 \pm 1.1$    | $-14 \pm 1.2$    |
|               | $T_m$ ( $^\circ$ C)            | $61.6 \pm 1$   | $63 \pm 0.6$     | $56.5 \pm 0.0$   | $49 \pm 0$       |
|               | $\Delta G_{25^\circ C}$ KJ/mol | $31.6 \pm 0.5$ | $37 \pm 1.2$     | $30 \pm 1$       | $25.5 \pm 0.8$   |
|               | $\Delta H_{VH}$ KJ/mol         | $289 \pm 2.7$  | $328 \pm 6.4$    | $321 \pm 9.8$    | $339 \pm 11.3$   |

Las desviaciones estándar corresponden a tres experimentos independientes.

En la desnaturalización térmica sólo se muestran los valores obtenidos a partir de la curva de desnaturalización.



**Figura 12. Efecto de la concentración en la estabilidad de las cadenas ligeras $\lambda$ .** A) Curvas de desnaturación en presencia de Gnd-HCl. B) Curvas de desnaturación térmicas. Para ambos experimentos se utilizaron concentraciones 20 $\mu$ g, 50 $\mu$ g y 200 $\mu$ g. Los símbolos llenos indican desnaturación y los vacíos renaturalización. No se observó una relación dependiente de la concentración con el valor de  $\Delta G$ . Los parámetros termodinámicos calculados se muestran en la Tabla 9.

### **6.3 Evaluación de la hebra de protección “sheet switch” y una región con características fibrilogénicas en las mutantes derivadas de 3rJL2/YA.**

Las proteínas ricas en estructura  $\beta$  presentan diferentes estrategias que han desarrollado para evitar la agregación, ya sea causada por el ambiente o por la consecuencia de una mutación. Las cadenas ligeras presentan dos motivos que ayudan a prevenir la asociación intramolecular entre hebras vecinas que pueden promover la agregación y la formación de fibra [31, 65]. La región N-terminal de los dominios de cadena ligera  $\lambda 3$  (residuos 1-14) muestran un motivo estructural conocido como “sheet switch” que se ha propuesto como un borde de protección (dominio de antiagregación) de las hebras  $\beta$  B y G. Las prolinas de las posiciones 7 y 8 se encuentran altamente conservadas (Fig. 5, página 14) y se ha propuesto que estos residuos estabilizan al “sheet switch” [24] (Fig.9A). La importancia de estos residuos se evaluó mediante mutaciones sitio dirigidas generadas en la mutante 3rJL2/YA. P7 se cambió a ácido aspártico, este residuo está presente en la línea germinal de 3l; la mutante resultante se identificó como 3rJL2/YA/P7D (3rJL2/C34Y/W91A/P7D). P8 se cambió a serina porque este residuo se encuentra presente en la línea germinal 2-19; nombrando entonces a esta mutante como 3rJL2/YA/P8S (3rJL2/C34Y/W91A/P8S). Los datos termodinámicos de estas mutantes se muestran en la Tabla 10. Al comparar la estabilidad termodinámica entre 3rJL2/YA y 3rJL2/YA/P7D se observó que el cambio P7D la afectó significativamente, mientras que en la mutante 3rJL2/YA/P8S, el cambio P8S no la afectó (Tabla 10 y Fig.6C y 6D, página 26). Los datos de CD en el UV lejano mostraron que la mutación en la posición 7 ejerció una influencia sobre la reversibilidad, permitiendo al final un regreso al plegamiento de la estructura nativa. En el caso de la posición 8, el efecto sobre la reversibilidad de desplegamiento térmico fue mínima (Fig. 7).

El segundo motivo de protección contra la agregación de las cadenas ligeras se encuentra formado por los residuos 40-60, ya que este segmento estaría protegiendo a las hebras C y C' (Fig. 9, página 33). El residuo Pro40 es de particular interés debido a su alta conservación en las cadenas ligeras  $\kappa$  y  $\lambda$ . Su importancia en cuanto a la estabilidad, ha sido descrita en la cadena ligera de mieloma múltiple LEN [66]. La importancia de esta posición fue evaluada por medio de la mutante 3rJL2/YA/P40S (3rJL2C34Y/W91A/P40S). El cambio de Pro40Ser se hizo en base a la secuencia de 3p, la única línea germinal  $\lambda 3$  que no contiene un residuo de prolina en esta posición (Fig. 5, página 14). Los parámetros termodinámicos de 3rJL2/YA/P40S indican que este cambio no afecta la estabilidad de la proteína mutante (Tabla 10 y Fig. 6C y 6D, página 26). Los datos de CD



en el UV lejano señalan que las mutantes en la posición 8 (3rJL2/YA/P8S) y 40 (3rJL2/YA/P40S) presentan una influencia mínima en la reversibilidad (Fig. 7, página 29).

La agregación de proteínas es un factor relacionado con la formación de fibra amiloide. Los servidores TANGO, PASTA y Aggrescan estiman en forma predictiva, la propensión de agregación de los residuos presentes en una hoja- $\beta$  ya sea que se encuentren frente a frente o en hebras vecinas [67, 68, 69]. Con la ayuda de estos servidores, se identificaron en secuencias  $\lambda 3$  cuatro regiones (a-d), cada una de ellas con diferente propensión de agregación (Fig.13). La región b (residuos 44-50) presentó los puntajes más altos. Posteriormente en la secuencia de 3rJL2/YA la región b fue sometida a un segundo análisis con los tres servidores, con la finalidad de identificar residuos que al ser cambiados pudieran modificar el perfil de agregación. Cuando Ile48 se cambió por metionina o prolina, los servidores predijeron una disminución del perfil de agregación (Fig.13). Aun cuando en el alineamiento de la Figura 5 (página 14) se pudo observar que varias secuencias presentan un residuo de metionina en esta posición. Lo anterior nos llevó a generar las mutantes en metionina y prolina, no obstante, sólo la mutante 3rJL2/YA/I48M (3rJL2/C34Y/W91A/I48M) se expresó de forma exitosa. En las estructuras cristalográficas se observó que Ile48 es un residuo que se encuentra en el núcleo hidrofóbico (Fig. 9C, página 33), probablemente el cambio a prolina por sus características naturales ocasionó una desestabilización impidiendo su expresión. Los resultados termodinámicos obtenidos de 3rJL2/YA/I48M indican que esta mutante presenta una disminución en la estabilidad (Tabla 10, Fig. 6C y 6D, página 22). Los datos del CD en el UV lejano mostraron que la mutación en la posición 48 influye de forma moderada en la reversibilidad (Fig.7, página 29).

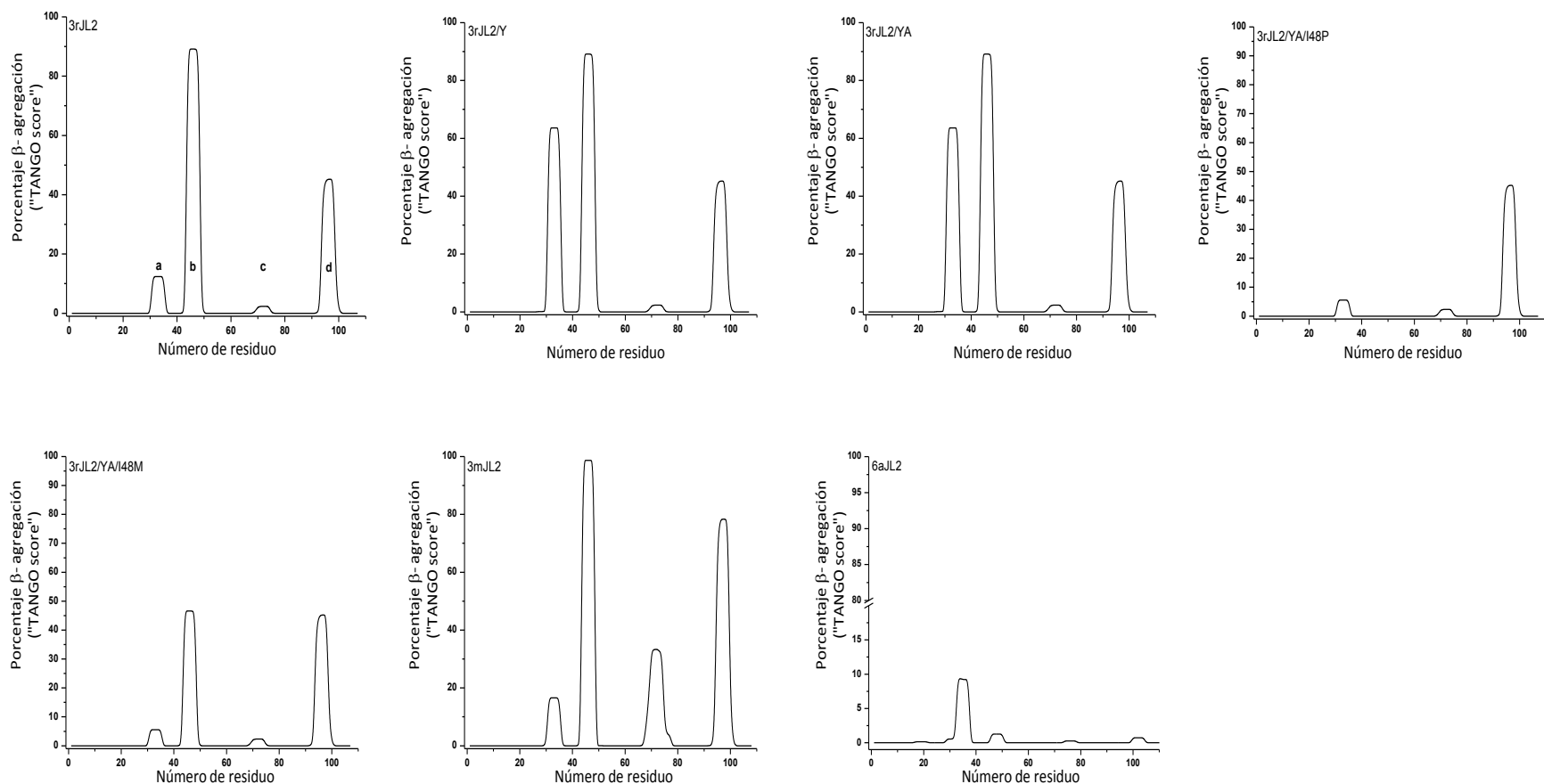
De acuerdo con los valores de  $\Delta G_{298K}^{\circ}$  las mutantes 3rJL2/YA/P8S, 3rJL2/YA/P40S son tan estables como 3mJL2, 3rJL2/Y o 3rJL2/YA. En contraste, la estabilidad termodinámica de la proteína 3rJL2/YA/P7D y 3rJL2/YA/I48M se vio afectada significativamente. De hecho, los valores de  $C_m$  y  $T_m$  de 3rJL2/YA/P7D y 3rJL2/YA/I48M son característicos de proteínas relativamente inestables [40, 70]. Los parámetros de estabilidad que nos permiten hacer una comparación más precisa entre todas las cadenas ligeras analizadas son los valores de  $C_m$  y  $T_m$ . La estabilidad de las mutantes derivadas de 3r se puede ordenar como sigue: 3rJL2/Y > 3rJL2/YA > 3rJL2/YA/P40S = 3rJL2/YA/P8S > 3rJL2/YA/I48M > 3rJL2/YA/P7D.

**Tabla 10.** Parámetros termodinámicos y de fibrilogénesis *in vitro* de las cadenas ligeras  $\lambda 3$  y sus respectivas mutantes.

| Parámetro  | 3mJL2     | 3rJL2/Y<br>(CDR1) | 3rJL2/YA<br>(CDR1/CDR3) | 3rJL2/YA/P7D<br>(FR1) | 3rJL2/YA/P8S<br>(FR1) | 3rJL2/YA/P40S<br>(FR2) | 3rJL2/YA/I48M<br>(FR2) | 6aJL2        |
|--|-----------|-------------------|-------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|--------------|
| <b>C<sub>m</sub> (M)</b>                             | 1.6 ± 0.1 | 1.8 ± 0           | 1.4 ± 0.1               | 0.9 ± 0               | 1.3 ± 0               | 1.3 ± 0                | 1 ± 0.1                | 1.6 ± 0      |
| <b>m (KJ/mol)</b>                                    | -12 ± 1.2 | -13 ± 1.3         | -16 ± 1.0               | -17 ± 1.8             | -14 ± 1.2             | -17 ± 1.5              | -21 ± 1.2              | -14 ± 1.2    |
| <b>T<sub>m</sub>(°C)</b>                             | 60 ± 0.8  | 63 ± 0.1          | 56 ± 0.5                | 50 ± 0.2              | 54 ± 1.4              | 55 ± 0.6               | 51 ± 0.7               | 49 ± 0.5     |
| <b><math>\Delta G_{25^\circ C}</math><br/>KJ/mol</b> | 33 ± 0.7  | 37 ± 2.9          | 31.3 ± 0.2              | 22.1 ± 0.2            | 28 ± 2.4              | 28.4 ± 1.5             | 25.5 ± 1.1             | 27 ± 1.3     |
| <b><math>\Delta H_{VH}</math><br/>(KJ/mol)</b>       | 317 ± 2   | 331.3 ± 26        | 332 ± 5                 | 291 ± 5.3             | 313.3 ± 29.4          | 312.7 ± 12             | 316.3 ± 15.6           | 359.5 ± 19.4 |
| <b>Índice de crecimiento<br/>(h<sup>-1</sup>)</b>    | n.a.      | n.a.              | 0.08 ± 0.01             | 0.84 ± 0.28           | n.a.                  | n.a.                   | 0.07 ± 0.01            | 1.20 ± 0.24  |
| <b>t<sub>lag</sub> (h)</b>                           | n.a.      | n.a.              | 11.25 ± 5.22            | 9.24 ± 0.41           | n.a.                  | n.a.                   | 11.74 ± 0.87           | 5.17 ± 0.84  |

La desviación estándar corresponde a tres experimentos independientes

n. a.= no aplica, no se observó formación de fibras después de 70 h



**Figura 13. Predicción de los perfiles de agregación de 3rJL2 y 3mJL2 a partir de las secuencias de aminoácidos.** Cuatro regiones con propensión a la agregación intrínseca fueron identificadas en las secuencias  $\lambda 3$  con los servidores TANGO, PASTA y Aggrescan. Por razones de brevedad, se muestran los perfiles de predicción con el servidor TANGO. Las regiones identificadas se señalan con letras en negritas en el perfil de agregación de 3rJL2, a (residuos 32-37), b (residuos 44-50), c (residuos 70-76), y d (residuos 93-100). La región b (que incluye la hebra  $\beta$  C') presenta el mayor puntaje para la agregación en todos los servidores. La sustitución de I48 por Pro o Met disminuyó el puntaje de agregación. En la mutante 3rJL2/YA/I48M fue más lento el proceso de formación de fibras que el de la mutante 3rJL2/YA, confirmando la importancia de la posición 48 en la propensión a la agregación de la proteína. Sorprendentemente en la secuencia de 6aJL2 no se predijeron regiones de agregación.

Las mutantes mostraron diferencias principalmente en la pendiente de la transición, ya sea en las curvas de desnaturalización química o térmica (valores de  $m$  y  $\Delta H$ ) (Tabla 10, Fig. 6C y 6D, página 26). En otras palabras, la estabilidad global no fue significativamente alterada, mientras que el proceso de cooperatividad se modificó en cada mutante evaluada. Los parámetros termodinámicos indican que las mutantes más inestables fueron 3rJL2/YA/P7D y 3rJL2/YA/I48M.

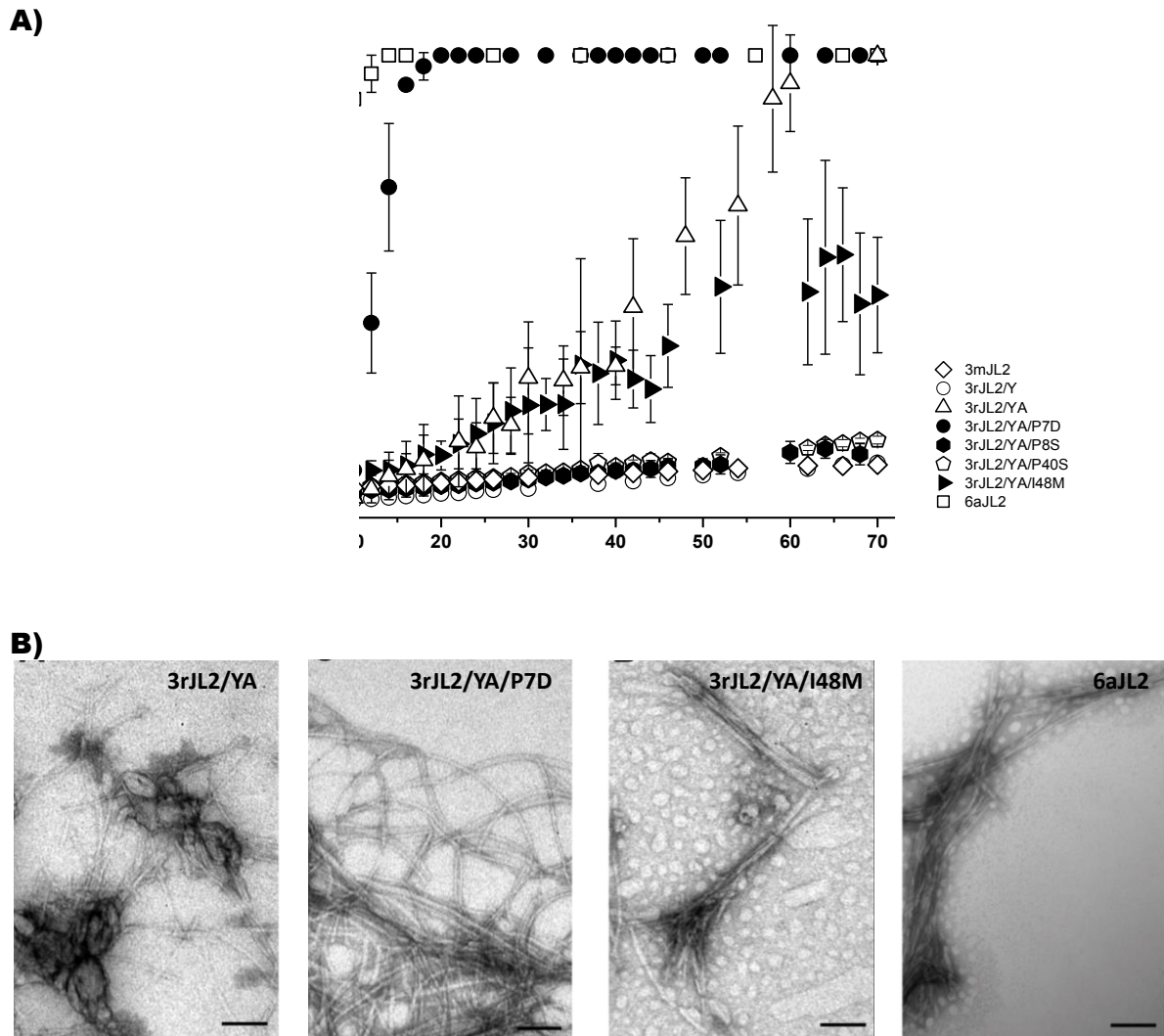
#### **6.4 3rJL2/YA/P7D y 6aJL2 mostraron una cinética similar durante la fibrilogénesis *in vitro***

Una de las características de las proteínas amiloidogénicas es su capacidad de formar fibras *in vitro* [22, 71]. Mediante experimentos de fibrilogénesis *in vitro* evaluamos la capacidad de formar fibras de la línea germinal 3mJL2 y las respectivas mutantes derivadas de la línea germinal 3r. Las proteínas fueron agitadas continuamente con una micro barra magnética para inducir la formación de fibras. El curso de la formación de fibras se determinó por la fluorescencia de tioflavín T (ThT). La cinética de formación de fibras se muestra en la Figura 14A. Las muestras de 3mJL2 y 3rJL2/Y no muestran un incremento en la fluorescencia de ThT después de 70 horas (Fig. 14A). En la cinética de fibrilogénesis no se distinguen las etapas de nucleación y extensión. Conforme transcurrió el tiempo se observó a simple vista que en la celda de 3mJL2 y 3rJL2/Y la solución se va tornando turbia. Vistas al microscopio las muestras de 3rJL2/Y y 3mJL2 presentan el aspecto de depósitos amorfos, no obstante, no se observó la presencia de fibras (dato no mostrado). Los resultados observados en la fibrilogénesis *in vitro* van de acuerdo con los datos termodinámicos, es decir, 3mJL2 y 3rJL2/Y son termodinámicamente estables por lo que no deberían formar fibras. A pesar de que 3rJL2/YA y 3rJL2/YA/I48M son relativamente estables, ambas proteínas formaron fibras ya que en la cinética de fibrilogénesis se observó un aumento significativo de la fluorescencia de ThT después de 10h (Fig. 14A).

Sin embargo, 3rJL2/YA y 3rJL2/YA/I48M presentaron diferencias en los tiempos de nucleación ( $t_{lag}$ ) y en el índice de crecimiento de la fibra. 3rJL2/YA presentó un  $t_{lag}$  de 11.25h y requiere 40h para la extensión de la fibra. 3rJL2/YA/I48M mostró un  $t_{lag}$  de 11.74h y requiere un tiempo más largo para extender las fibras (56h). El incremento en el tiempo de extensión de fibra de la mutante 3rJL2/YA/I48M está de acuerdo con la predicción de los servidores. El cambio I48M disminuyó la propensión de agregación de

3rJL2/YA (Fig. 14A). 3rJL2/YA y 3rJL2/YA/I48M mostraron un índice de crecimiento de las fibras muy similar (Tabla 10).

Las muestras de 3rJL2/YA vistas al microscopio electrónico confirmaron la presencia de fibras de aspecto delgado y no ramificado, observándose también la presencia de material amorfo (Fig. 14B).



**Figura 14. Fibrilogénesis *in vitro*.** **A)** Cinética de fibrilogénesis *in vitro* de las cadenas ligeras  $\lambda$ 3. Las mutantes 3rJL2/YA, 3rJL2/YA/I48M y 3rJL2/YA/P7D presentan diferencias en la fase lag y en el tiempo de extensión de la fibra. En contraste, las mutantes 3rJL2/Y, 3rJL2/YA/P8S, 3rJL2/YA/P40S y 3mJL2 no formaron fibras. 6aJL2 formó fibras en un tiempo similar al de la mutante 3rJL2/YA/P7D. Las muestras contienen 100  $\mu$ g/mL de proteína en “buffer” PBS a una temperatura de 37 °C con agitación constante. La formación de fibras fue monitoreada por los cambios en la fluorescencia del Tioflavina T (ThT). La desviación estándar corresponde a tres experimentos independientes. **B)** Microscopía electrónica de fibras. La microscopía de 3rJL2/YA, 3rJL2/YA/P7D, 3rJL2/YA/I48M y 6aJL2 mostró una morfología típica. Las muestras para este análisis fueron tomadas de los experimentos de fibrilogénesis *in vitro* (ver sección de materiales y métodos). La barra negra indica 100nm.

En el caso de 3rJL2/YA/I48M las fibras fueron menos abundantes que los depósitos amorfos, el aspecto que presentaban fue de bultos en forma de varilla (“rod-like bundles”) los cuales contienen varias fibras rectas (Fig. 14B). Es importante destacar que las mutantes 3rJL2/YA/P8S y 3rJL2/YA/P40S no presentaron las mismas propiedades fibrilogénicas de 3rJL2/YA. A pesar de que son ligeramente menos estables que 3rJL2/YA, no forman fibras durante el periodo de tiempo evaluado (Fig. 14A). La mutante 3rJL2/YA/P7D fue la proteína menos estable, formó fibras en aproximadamente 10h (Tabla 10). Las fibras de 3rJL2/YA/P7D se encontraron en grupos que contienen de 2-4 fibrillas bien definidas. Son fibras largas y ligeramente curvas, lo cual es una característica morfológica inusual. (Fig. 14B). 6aJL2 también formó fibras en las condiciones ensayadas para las proteínas  $\lambda 3$  (Fig. 14B). De acuerdo con la cinética de la fibrilogénesis *in vitro*, 3rJL2/YA/P7D y 6aJL2 presentaron tiempos de extensión similares (10h y 8h, respectivamente) (Tabla 10). Las diferencias se observaron en los tiempos de nucleación, en donde se observó que 6aJL2 es más rápido que 3rJL2/YA/P7D (5.17h y 9.24h respectivamente) (Tabla 10).

## **7. Discusión y Conclusiones**

Las características moleculares que promueven la conversión de las cadenas ligeras solubles en fibras amiloides siguen sin estar claros. Nuestra hipótesis inicial se refirió a que la alta asociación de la familia 3r con la amiloidosis AL se debe a la inestabilidad termodinámica intrínseca de la secuencia de la línea germinal. Sin embargo, observamos que 3rJL2/Y y 3rJL2/YA fueron tan estables como la línea germinal no amiloidogénica 3mJL2 (Tabla 10). Nosotros esperábamos que 3rJL2/Y fuera capaz de formar fibras *in vitro* porque 3r se encuentra entre las líneas germinales  $\lambda 3$  frecuentemente asociadas con la amiloidosis AL [37], sin embargo no se encontraron fibras. La alta estabilidad de 3rJL2/Y puede atribuirse a las interacciones formadas por Y34 (Tabla 7, Fig. 9D), lo anterior parece haber tenido un efecto benéfico sobre la expresión de la proteína. Estrictamente, los resultados termodinámicos obtenidos no nos permiten responder si la línea germinal 3r es intrínsecamente amiloidogénica o no.

Aunque 3mJL2, 3rJL2/Y y 3rJL2/YA comparten propiedades termodinámicas similares, 3rJL2/YA fue la única cadena ligera que formó fibras *in vitro*. Las comparaciones estructurales indicaron que el cambio W91A en 3rJL2/YA disminuye las interacciones hidrofóbicas con respecto a las otras estructuras  $\lambda 3$  (Tabla 7). Aparentemente las mutaciones en la posición 34 y 91 causaron efectos opuestos en las mutantes derivadas de 3rJL2. La mutación en la posición 34 pudo haber fortalecido las interacciones entre las hebras  $\beta$  C, F y G y de esta manera, haber contribuido a la estabilización de 3rJL2/Y. La mutación en la posición 91 contribuyó en la disminución de diversas interacciones, ocasionando que la cadena ligera 3rJL2/YA fuera menos estable y más propensa a la formación de fibras.

Los resultados obtenidos señalan que el papel de los residuos P7 (3rJL2/YA/P7D) e I48 (3rYA/I48M) es crítico para la estabilidad y la formación de fibra en las cadenas ligeras derivadas de 3r. Nuestros resultados sugieren que otros elementos a considerar en la cinética de formación de fibras son los valores de  $m$  y  $\Delta H$ , ya que se observó una relación entre la cooperatividad y la formación de las mismas (Tabla 10).

Reportes previos han sugerido que la función del N-ter de las cadenas ligeras consiste en proteger los bordes de las hebras adyacentes, evitando de esta manera la exposición de regiones que podrían favorecer la agregación [31]. Los resultados obtenidos indicaron que 3rJL2/YA/P7D fue termodinámicamente menos estable que 3rJL2/YA. La disminución observada en la estabilidad de la mutante 3rJL2/YA/P7D

respecto a su proteína parental es comparable con lo sucedido para la mutante 6aJL2/P7S [24]. La mutación P8S ejerció un efecto menor sobre la estabilidad de 3rJL2/YA/P8S pero afectó la capacidad de formar fibras (Tabla 10). Estos resultados sugieren que P8 es importante para la formación de fibras. Nuestros resultados confirman que P7 juega un papel importante en la función de protección realizada por el N-Ter, además de sugerir que el “ $\beta$ -bulge” de la hebra  $\beta$  A está involucrado en la formación de fibras. Estos comportamientos pueden encontrarse conservados en las familias de cadenas ligeras  $\lambda$ .

En algunas cadenas ligeras  $\kappa$  se ha reportado que la sustitución del residuo P40 (asa que conecta las hebras  $\beta$  C y C') se encuentra asociado a la amiloidosis tal como se describió para las cadenas ligeras BRE, ARN, WR, y MCG. En este grupo de proteínas se reportó que la mutación de este residuo aumentó la capacidad de formación de fibras [72]. En el contexto de línea germinal, los datos termodinámicos de la mutante 3rJL2/YA/P40S nos indican que no se encuentra afectada significativamente en la estabilidad (Tabla 10). Lo anterior se debe a que P40 solamente establece interacciones a través del esqueleto peptídico. En el caso de esta mutante no contamos con una explicación que ayude a definir porque no forma fibras, como si fue posible tener una explicación para las propiedades de la mutante 3rJL2/YA/P8S.

Como se mencionó anteriormente I48 es un residuo conservado en las familias  $\lambda$ 3 y  $\lambda$ 6. En la mutante 3rJL2/YA/I48M se observó una disminución en la estabilidad termodinámica indicando que la cadena ligera se vuelve inestable. Lo anterior podría deberse a que la mutación ocasiona que sea complicado acomodar de manera adecuada lo voluminoso de la cadena lateral de la metionina; afectando también el proceso de formación de fibra de tal manera que lo retrasa pero no lo inhibe por completo. Tal vez, el residuo de metionina generó un reordenamiento estructural entre las hebras de C y C', evitando la auto complementariedad entre las hojas  $\beta$ . De esta manera se restringe el correcto acoplamiento de los monómeros durante la etapa de extensión de la fibra. Estos resultados sugirieron que la posición 48 es importante para mantener la estabilidad de la cadena ligera y cuando fue mutado favoreció la formación de fibras.

Los resultados obtenidos para las mutantes 3rJL2/YA/P40S y 3rJL2/YA/I48M indican que el asa 40-60 que conecta las dos hojas  $\beta$  parece estar involucrado en el proceso de formación de fibras cuando la proteína es lo suficientemente inestable. La protección del asa 40-60 a través de la interacción canónica de  $V_H$ - $V_L$  limita su exposición.



Es importante destacar que las líneas germinales 3m y 3r presentaron una puntuación alta en su perfil de  $\beta$ -agregación en la región del asa 40-60. Esta misma región mostró una baja puntuación en el perfil de  $\beta$ -agregación en la línea germinal 6a (Fig.13). En esta región 6a difiere de las líneas germinales 3m y 3r en tres residuos (Fig. 5). De acuerdo con estas observaciones, cambios mínimos en el asa 40-60 podrían modificar su perfil de agregación y alterar las propiedades del dominio variable de la cadena ligera.

Por lo que sabemos, la dimerización de las cadenas ligeras se ha reportado sólo en proteínas aisladas de pacientes, como es el caso de las proteínas de Bence Jones. Baden *et al* [27], reportó que la forma monomérica de la línea germinal  $\kappa$ IO18/O8 es más estable que su estado dimérico. En contraste con su contraparte amiloidogénica AL-09 la forma dimerica es más estable que el monómero [64]. Las zonas de interfaz calculadas para dímeros nativos en las estructuras cristalográficas de cadenas ligeras  $\lambda$ 3 son muy similares a otras interfaces de  $V_H$ - $V_L$  y  $V_L$ - $V_L$  de varios anticuerpos (Tabla 8). Cabe señalar que el arreglo estructural observado en el cristal puede no reflejar lo que realmente sucede en solución, es decir, cuando las cadenas ligeras se encuentran circulando en estado libre. Lo anterior nos llevó a evaluar la presencia de dímeros en las proteínas 3mJL2, 3rJL2/Y, 3rJL2/YA y 6aJL2 por medio de diferentes metodologías. Los resultados sugirieron que a las concentraciones de proteínas ensayadas, los dominios variables se encuentran principalmente en un estado monomérico.

A simple vista en el cristal se puede apreciar que 3mJL2, 3rJL2/Y, 3rJL2/YA podrían formar dímeros. A pesar de que el análisis detallado de cada estructura muestra que se pudiera formar algún tipo de dímero, los resultados arriba mencionados indican que por lo menos a las concentraciones ensayadas, eso no ocurre. La línea germinal de 3r presenta Ser en esta posición, esta es una diferencia importante entre las líneas germinales de 3m y 3r. Probablemente la presencia de Arg20 en la línea germinal de 3m podría actuar como un seguro que contribuye a evitar la agregación. Cabe recordar que algunos aminoácidos con carga en el centro de las hebras borde es una estrategia de protección utilizada en proteínas que presentan una estructura  $\beta$ -sándwich [31]. En la mayoría de las secuencias de las líneas germinales  $\lambda$ 3 y  $\lambda$ 3 aisladas de pacientes, se observa Arg en la posición 20 (Fig. 5). Estas observaciones sugieren que de origen las líneas germinales cuentan con elementos de seguridad que las protegen de la agregación. Es hasta el proceso de la hipermutación somática en donde suceden los cambios que van a ser los responsables de violar o reforzar los elementos de seguridad. Si los cambios ocurridos alteran la interfaz en donde ocurre la interacción  $V_H$ - $V_L$  o  $V_L$ - $V_L$  se

dará origen a un estado dimérico poco estable, por lo tanto la  $V_L$  tenderá a mantenerse en un estado monomérico. Si a esto se le suma que el monómero puede carecer de estabilidad entonces el monómero se encontrará vinculado con la formación de la fibra.

Es posible que las líneas germinales  $\lambda 3$  tiendan a permanecer como monómeros tal como se reportó para  $\kappa IO18/O8$  [64]. Esto contrasta con lo observado en los dominios variables aislados de pacientes en donde se observó un equilibrio entre monómeros y dímeros [64]. Estos dominios variables presentan varias mutaciones en diferentes regiones de la interfaz que podrían favorecer la interacción  $V_L-V_L$ . Otros elementos estructurales que podrían estar involucrados en favorecer este tipo de interacción podría ser que el dominio variable presentara un fragmento de la región constante o una parte de éste.

En conjunto nuestros resultados indican que 3m es una línea germinal relativamente estable y no es capaz de formar fibras *in vitro*. Lo anterior puede estar relacionado con el bajo porcentaje de expresión que presentan proteínas derivadas de 3m en los casos de amiloidosis AL de tan solo un 2% (Fig. 4) [37].

Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la secuencia de la línea germinal de 3r *per se* no es amiloidogénica. Antes de que una cadena ligera adquiera características fibrillogénicas requiere acumular mutaciones desestabilizantes que pueden generar nuevas interacciones moleculares que podrían favorecer la agregación bajo ciertas condiciones microambientales tales como pH, temperatura o concentraciones locales altas de urea. En las mutantes derivadas de la línea germinal 3r se identificaron residuos que afectan la estabilidad, que influyen en la formación de fibra y que alteran las estrategias de protección como se ha reportado en diferentes cadenas ligeras mutantes [24, 64, 70]. Las mutantes derivadas de 3rJL2 permitieron identificar residuos de importancia como fue el caso de Y34, la cual está asociada con la estabilidad; mientras P8 y W91 fueron implicados en la formación de la fibra. También se identificaron los residuos P7 e I48, que están asociados con la estabilidad y la formación de la fibra.

Las líneas germinales 6a y 3r presentan una expresión baja en el repertorio policlonal de linfocitos B (2% y 8% respectivamente). El porcentaje de pacientes con AL en el que 6a es el donante de la línea germinal del gen precursor puede alcanzar hasta 40% [10]. En el caso de 3r, se reportó una expresión cuatro veces superior, el porcentaje de pacientes se acerca al 20% [3]. Las diferencias observadas en la estabilidad, tiempos de nucleación y la ganancia o pérdida de interacciones particulares entre cadenas ligeras  $\lambda 6$  y  $\lambda 3$  en conjunto con los niveles de expresión policlonales, pueden explicar los

diferentes grados de "agresividad" de estas dos familias de cadenas ligeras  $\lambda$ , siendo 6a el más patológico.

La amplia variedad de secuencias de cadenas ligeras ligadas a la amiloidosis AL hace que sea una enfermedad compleja. La caracterización de diferentes líneas germinales y cadenas ligeras aisladas de pacientes con amiloidosis AL permitirá tener una comprensión más completa de cómo cambios puntuales en la secuencia original de una cadena ligera alteran los mecanismos de protección que evitan la agregación. Debido a esto resulta importante dilucidar cómo ciertas líneas germinales dan lugar a variantes amiloidogénicas.

En la actualidad para la amiloidosis AL se están diseñando fármacos que permitan disolver los depósitos amiloides o que permitan interrumpir su producción, evitando de esta manera dejar proteína mal plegada disponible para la formación de fibras [70]. La información generada por diversos grupos de investigación acerca de residuos o regiones involucradas con la estabilidad, formación, retraso o inhibición de fibra contribuye con el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas o en mejorar las ya existentes.

Para conocer con más detalle el comportamiento de las líneas germinales de las cadenas ligeras se han planteado las siguientes perspectivas:

- Con el objetivo de obtener la línea germinal 3rJL2 se deberían explorar otros sistemas de expresión heteróloga, como puede ser el sistema de expresión de la levadura *Pichia pastoris* en el cual se ha conseguido expresar otros formatos de anticuerpos. De conseguir que la línea germinal se exprese se podría evaluar si la secuencia de la línea germinal es amiloidogénica o no.

- Caracterizar otras líneas germinales que se encuentren asociadas a la amiloidosis AL. Lo anterior permitirá tener un mayor conocimiento de si existe un defecto de origen en las líneas germinales. Además de que los resultados que se obtengan ayudarán a realizar una comparación con las cadenas ligeras aisladas de pacientes con amiloidosis AL.

- Generar nuevas mutantes en otras regiones de la estructura con el objetivo de identificar otras regiones de la estructura que pudieran estar vinculadas con la estabilidad, formación de fibra o formar parte de un sistema de protección.

- Para conocer con mayor detalle la respuesta del organismo ante la presencia de la fibra se pueden emplear algunos modelos *in vivo* como son las líneas celulares o el modelo murino. Con este tipo de modelos se puede conocer el desarrollo de la enfermedad y como responde el organismo ante la presencia de las fibras. En nuestro caso, podríamos evaluar si las diferencias de tiempo observadas en la cinética de fibrilogénesis pueden ser consideradas como un indicativo del grado de “agresividad” de la enfermedad entre las cadenas ligeras  $\lambda 6a$  y  $\lambda 3$ .

## **8. Bibliografía**

1. Cháñez-Cárdenas, M. E., D. A. Cisneros Armas, L. del Pozo Yauner, B. Becerril y D. A. Fernández-Velasco. 2002. Enfermedades relacionadas al plegamiento anómalo de las proteínas. Mensaje Bioquímico, Vol. XXVI. UNAM. Pp.73-97
2. Soto, C. (2001) Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. *FEBS letters* **498**, 204-207
3. Sacchettini, J. C., and Kelly, J. W. (2002) Therapeutic strategies for human amyloid diseases. *Nature reviews. Drug discovery* **1**, 267-275
4. Chiti, F., and Dobson, C. M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual review of biochemistry* **75**, 333-366
5. Obici, L., Perfetti, V., Palladini, G., Moratti, R., and Merlini, G. (2005) Clinical aspects of systemic amyloid diseases. *Biochimica et biophysica acta* **1753**, 11-22
6. Hammarström, P., Jiang, X., Hurshman, AR., Powers ,ET., and Kelly JW. (2002) Sequence-dependent denaturation energetics: A major determinant in amyloid disease diversity .*Proc Natl Acad Sci U S A* **4**, 16427-32.
7. Westermark P. (2005) Aspects on human amyloid forms and their fibril polypeptides. *FEBS J* **272**, 5942-9.
8. Sacchettini, J. C., and Kelly, J. W. (2002) Therapeutic strategies for human amyloid diseases. *Nature reviews. Drug discovery* **1**, 267-275
9. Blancas-Mejía, LM., and Ramirez-Alvarado, M. (2013) Systemic amyloidoses. *Annu Rev Biochem* **82**, 745-74.
10. Comenzo, R. L., Zhang, Y., Martinez, C., Osman, K., and 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**, 714-720.
11. Goldsbury, CS., Wirtz, S., Müller, SA., Sunderji, S., Wicki, P., Aebi, U., and Frey P. (2000) Studies on the in vitro assembly of a beta 1-40: implications for the search for a beta fibril formation inhibitors. *J Struct Biol.* **130**,217-31.
12. Jahn, TR., and Radford, SE. (2005) The Yin and Yang of protein folding. *FEBS J.* **272**,5962-70.
13. Eanes, ED., and Glenner, GG. (1968) X-ray diffraction studies on amyloid filaments. *J Histochem Cytochem.* **16**,673-7.
14. Makin, OS., and Serpell, LC. (2005) Structures for amyloid fibrils. *FEBS J.* **272**, 5950-61.
15. Cohen A.S., T. Shirahama, and M. Skinner. (1982) Electron microscopy of amyloid. In *Electron Microscopy of Protein* (Harris I, ed.), pp. 165–205. Academic Press, London, UK.
16. Bellotti, V., Mangione, P., and Merlini, G. (2000) Review: immunoglobulin light chain amyloidosis--the archetype of structural and pathogenic variability. *Journal of structural biology* **130**, 280-289

17. Abraham, RS., Geyer, SM., Price-Troska, TL., Allmer, C., Kyle, RA., Gertz, MA., and 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.
18. Janis Kuby; Thomas J. Kindt; Richard A. Goldsby; Barbara A. Osborne. 2007. Capítulo 4: Antígenos y anticuerpos, en *Inmunología de Kuby*. 6a edición. México: McGraw-Hill interamericana. pp. 76-110.
19. Merlini, G., and Stone, M. J. (2006) Dangerous small B-cell clones. *Blood* **108**, 2520-2530
20. Buxbaum J. (1992) Mechanisms of disease: monoclonal immunoglobulin deposition. Amyloidosis, light chain deposition disease, and light and heavy chain deposition disease. *Hematol Oncol Clin North Am.* **6**,323-46.
21. Muller, A. M., Geibel, A., Neumann, H. P., Kuhnemund, A., Schmitt-Graff, A., Bohm, J., and Engelhardt, M. (2006) Primary (AL) amyloidosis in plasma cell disorders. *The oncologist* **11**, 824-830
22. Wall, J., Schell, M., Murphy, C., Hrcic, R., Stevens, F. J., and Solomon, A. (1999) Thermodynamic instability of human lambda 6 light chains: correlation with fibrillogenicity. *Biochemistry* **38**, 14101-14108
23. Hurle, M. R., Helms, L. R., Li, L., Chan, W., and Wetzel, R. (1994) A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 5446-5450
24. Hernandez-Santoyo, A., del Pozo Yauner, L., Fuentes-Silva, D., Ortiz, E., Rudino-Pinera, E., Sanchez-Lopez, R., Horjales, E., Becerril, B., and Rodriguez-Romero, A. (2010) A single mutation at the sheet switch region results in conformational changes favoring lambda6 light-chain fibrillogenesis. *Journal of molecular biology* **396**, 280-292.
25. Poshusta, T. L., Sikkink, L. A., Leung, N., Clark, R. J., Dispenzieri, A., and Ramirez-Alvarado, M. (2009) Mutations in specific structural regions of immunoglobulin light chains are associated with free light chain levels in patients with AL amyloidosis. *PLoS one* **4**, e5169
26. Randles, E. G., Thompson, J. R., Martin, D. J., and Ramirez-Alvarado, M. (2009) Structural alterations within native amyloidogenic immunoglobulin light chains. *Journal of molecular biology* **389**, 199-210
27. Baden, E. M., Randles, E. G., Aboagye, A. K., Thompson, J. R., and Ramirez-Alvarado, M. (2008) Structural insights into the role of mutations in amyloidogenesis. *The Journal of biological chemistry* **283**, 30950-30956
28. Solomon, A., Frangione, B., and Franklin EC. (1982) Bence Jones proteins and light chains of immunoglobulins. Preferential association of the V lambda VI subgroup of human light chains with amyloidosis AL (lambda). *J Clin Invest.* **70**,453-60.
29. Schiffer M. (1996) Molecular anatomy and the pathological expression of antibody light chains. *Am J Pathol.* **148**,1339-44.
30. Richardson, JS., Richardson, DC., Tweedy, NB., Gernert, KM., Quinn, TP., Hecht, MH., Erickson, BW., Yan, Y., McClain, RD., Donlan ME, and Surlles, MC. (1992) Looking at proteins: representations, folding, packing, and design. Biophysical Society National Lecture, 1992. *Biophys J.* **63**,1185-209.

31. Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2002) Natural beta-sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 2754-2759
32. Stevens, F. J., and Schiffer, M. (1995) Structure and properties of human immunoglobulin light-chain dimers. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **51**, 51-81
33. Brumshtein, B., Esswein, SR., Landau, M., Ryan, CM., Whitelegge, JP., Phillips, ML., Cascio, D., Sawaya, MR., Eisenberg, DS. (2014) Formation of amyloid fibers by monomeric light chain variable domains. *J Biol Chem.* **289**, 27513-25.
34. Qin, Z., Hu, D., Zhu, M., and 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
35. Farner, N. L., Dorner, T., and Lipsky, P. E. (1999) Molecular mechanisms and selection influence the generation of the human V lambda J lambda repertoire. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **162**, 2137-2145
36. Abe, M., Goto, T., Kosaka, M., Wolfenbarger, D., Weiss, D. T., and Solomon, A. (1998) Differences in kappa to lambda (kappa:lambda) ratios of serum and urinary free light chains. *Clinical and experimental immunology* **111**, 457-462
37. Perfetti, V., Casarini, S., Palladini, G., Vignarelli, M. C., Klersy, C., Diegoli, M., Ascari, E., and 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 germ line gene segment. *Blood* **100**, 948-953
38. Bond, C. S., and Schuttelkopf, A. W. (2009) ALINE: a WYSIWYG protein-sequence alignment editor for publication-quality alignments. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **65**, 510-512
39. Williams, S. C., Fripiat, J. P., Tomlinson, I. M., Ignatovich, O., Lefranc, M. P., and Winter, G. (1996) Sequence and evolution of the human germ line V lambda repertoire. *Journal of molecular biology* **264**, 220-232
40. 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., and Becerril, B. (2008) Influence of the germ line sequence on the thermodynamic stability and fibrillogenicity of human lambda 6 light chains. *Proteins* **72**, 684-692
41. Prodromou, C., and Pearl, L. H. (1992) Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis. *Protein engineering* **5**, 827-829
42. Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D., and Winter, G. (1991) By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *Journal of molecular biology* **222**, 581-597
43. JA., P. C. S. B. T. (1989) Measuring the conformational stability of a protein. in *Protein structure: a practical approach*. (TE, C. ed.), IRL Press, Oxford, England. pp 311-330
44. Milardi, D., la Rosa, C., Fasone, S., and Grasso, D. (1997) An alternative approach in the structure-based predictions of the thermodynamics of protein unfolding. *Biophysical chemistry* **69**, 43-51

45. Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M., and Takeda, T. (1989) Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Analytical biochemistry* **177**, 244-249
46. Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**, 125-132
47. Leslie, A. G. (2006) The integration of macromolecular diffraction data. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **62**, 48-57
48. Wall, J., Murphy, C. L., and Solomon, A. (1999) In vitro immunoglobulin light chain fibrillogenesis. *Methods in enzymology* **309**, 204-217
49. Evans, P. (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **62**, 72-82
50. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. *Journal of applied crystallography* **40**, 658-674
51. Huang, D. B., Ainsworth, C., Solomon, A., and Schiffer, M. (1996) Pitfalls of molecular replacement: the structure determination of an immunoglobulin light-chain dimer. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **52**, 1058-1066
52. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **53**, 240-255
53. Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkoczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., and Zwart, P. H. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **66**, 213-221
54. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography* **60**, 2126-2132
55. R. A. Laskowski, M. W. M., D. S. Moss and J. M. Thornton. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Cryst.* **26**, 283-291
56. Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J., Meyer, E. F., Jr., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T., and Tasumi, M. (1977) The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *Journal of molecular biology* **112**, 535-542.
57. Sumathi, K., Ananthalakshmi, P., Roshan, MN., and Sekar K. (2006) 3dSS: 3D structural superposition.
58. Tina, K. G., Bhadra, R., and Srinivasan, N. (2007) PIC: Protein Interactions Calculator. *Nucleic acids research* **35**, W473-476
59. Krissinel, E., and Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *Journal of molecular biology* **372**, 774-797
60. Greenfield, N.J. (2006) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Protoc.* **1**, 2876-90



61. Ferrè F., and Clote P. (2006) DiANNA 1.1: an extension of the DiANNA web server for ternary cysteine classification. *Nucleic Acids Res.* **1**, 34
62. de Marco, A. (2009) Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in *Escherichia coli*. *Microb Cell Fact* **14**, 8-26.
63. Blancas-Mejia, L. M., Tellez, L. A., del Pozo-Yauner, L., Becerril, B., Sanchez-Ruiz, J. M., and Fernandez-Velasco, D. A. (2009) Thermodynamic and kinetic characterization of a germ line human lambda6 light-chain protein: the relation between unfolding and fibrillogenesis. *Journal of molecular biology* **386**, 1153-1166
64. Baden, E. M., Owen, B. A., Peterson, F. C., Volkman, B. F., Ramirez-Alvarado, M., and Thompson, J. R. (2008) Altered dimer interface decreases stability in an amyloidogenic protein. *The Journal of biological chemistry* **283**, 15853-15860
65. Nowak, M. (2004) Immunoglobulin kappa light chain and its amyloidogenic mutants: a molecular dynamics study. *Proteins* **55**, 11-21.
66. Stevens, P. W., Raffin, R., Hanson, D. K., Deng, Y. L., Berrios-Hammond, M., Westholm, F. A., Murphy, C., Eulitz, M., Wetzel, R., Solomon, A., and et al. (1995) Recombinant immunoglobulin variable domains generated from synthetic genes provide a system for in vitro characterization of light-chain amyloid proteins. *Protein science : a publication of the Protein Society* **4**, 421-432
67. Fernandez-Escamilla, A. M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., and Serrano, L. (2004) Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nature Biotechnology* **22**, 1302-1306
68. Trovato, A., Chiti, F., Maritan, A., and Seno, F. (2006) Insight into the structure of amyloid fibrils from the analysis of globular proteins. *PLoS computational biology* **2**, e170.
69. Conchillo-Sole, O., de Groot, N. S., Aviles, F. X., Vendrell, J., Daura, X., and Ventura, S. (2007) AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of "hot spots" of aggregation in polypeptides. *BMC bioinformatics* **8**, 65.
70. Wall, J. S., Gupta, V., Wilkerson, M., Schell, M., Loris, R., Adams, P., Solomon, A., Stevens, F., and Dealwis, C. (2004) Structural basis of light chain amyloidogenicity: comparison of the thermodynamic properties, fibrillogenic potential and tertiary structural features of four Vlambda6 proteins. *Journal of molecular recognition : JMR* **17**, 323-331
71. Jarrett, J. T., Berger, E. P., and Lansbury, P. T., Jr. (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **32**, 4693-4697
72. Dealwis, C., and Wall, J. (2004) Towards understanding the structure-function relationship of human amyloid disease. *Current drug targets* **5**, 159-171
73. Concientización sobre la amiloidosis (2013). Fairman Studios, LLC [FOLLETO]

# Site-directed Mutagenesis Reveals Regions Implicated in the Stability and Fiber Formation of Human $\lambda$ 3r Light Chains\*

Received for publication, December 3, 2014. Published, JBC Papers in Press, December 11, 2014, DOI 10.1074/jbc.M114.629550

Miryam I. Villalba<sup>‡1</sup>, Juan C. Canul-Tec<sup>‡</sup>, Oscar D. Luna-Martínez<sup>‡2</sup>, Rosalba Sánchez-Alcalá<sup>‡</sup>,  
Timoteo Olamendi-Portugal<sup>‡</sup>, Enrique Rudiño-Piñera<sup>‡3</sup>, Sonia Rojas<sup>‡</sup>, Rosana Sánchez-López<sup>§</sup>,  
Daniel A. Fernández-Velasco<sup>¶4</sup>, and Baltazar Becerril<sup>‡5</sup>

From the Departments of <sup>‡</sup>Molecular Medicine and Bioprocesses and <sup>§</sup>Molecular Biology of Plants, Instituto de Biotecnología and the <sup>¶</sup>Laboratory of Physical Chemistry and Protein Engineering, Faculty of Medicine, National Autonomous University of Mexico, Mexico City, 04510, Mexico

**Background:**  $\lambda$ 6a and  $\lambda$ 3r are the most implicated germ lines in light chain amyloidosis.

**Results:** Mutagenesis at N-terminal, loop 40–60, and CDR3 regions affected  $\lambda$ 3r fibrillogenesis.

**Conclusion:** Changes at residues 7, 48, and 91 increased fibril formation while changes at residues 8 and 40 reverted fibrillogenesis.

**Significance:** Characterization of light chain germ lines helps to identify key regions implicated in amyloidosis.

Light chain amyloidosis (AL) is a disease that affects vital organs by the fibrillar aggregation of monoclonal light chains.  $\lambda$ 3r germ line is significantly implicated in this disease. In this work, we contrasted the thermodynamic stability and aggregation propensity of 3mJL2 (nonamyloidogenic) and 3rJL2 (amyloidogenic)  $\lambda$ 3 germ lines. Because of an inherent limitation (extremely low expression), Cys at position 34 of the 3r germ line was replaced by Tyr reaching a good expression yield. A second substitution (W91A) was introduced in 3r to obtain a better template to incorporate additional mutations. Although the single mutant (C34Y) was not fibrillogenic, the second mutation located at CDR3 (W91A) induced fibrillogenesis. We propose, for the first time, that CDR3 (position 91) affects the stability and fiber formation of human  $\lambda$ 3r light chains. Using the double mutant (3rJL2/YA) as template, other variants were constructed to evaluate the importance of those substitutions into the stability and aggregation propensity of  $\lambda$ 3 light chains. A change in position 7 (P7D) boosted 3rJL2/YA fibrillogenic properties. Modification of position 48 (I48M) partially reverted 3rJL2/YA fibril aggregation. Finally, changes at positions 8 (P8S) or 40 (P40S) completely reverted fibril formation. These results confirm the influential roles of N-terminal region (positions 7 and 8) and the loop 40–60 (positions 40 and 48) on AL. X-ray crys-

tallography revealed that the three-dimensional topology of the single and double  $\lambda$ 3r mutants was not significantly altered. This mutagenic approach helped to identify key regions implicated in  $\lambda$ 3 AL.

Amyloidosis refers to a group of diseases caused by the extracellular deposition of misfolded proteins as insoluble fibrillar aggregates, which show a periodic and ordered cross- $\beta$ -spine structure (1–4). Light chain amyloidosis (AL)<sup>6</sup> is a systemic and progressive disease caused by the deposition of large amounts of misfolded light chains. Approximately 70% of patients in an advanced phase of AL suffer from damage to tissues or organ function, mainly the kidney, heart, liver, lungs, and peripheral nervous system (5, 6). Light chains involved in amyloid fibril formation are of monoclonal origin, derived from a clone of plasma B cells that possess alterations in their regulation of Ig expression, resulting in an overproduction of its cognate light chain (3, 7). Each light chain consists of a variable ( $V_L$ ) and a constant domain ( $C_L$ ). Each of these domains is characterized by the topological organization of nine  $\beta$ -strands (A, B, C, C', C'', D, E, F, and G) as a Greek key motif. Similar to other proteins rich in  $\beta$ -structures,  $V_L$  domains contain several anti-aggregation motifs (8). When these protective motifs are modified by mutations or environmental conditions, the  $\beta$ -edge strands of the light chain domains could potentially interact with  $\beta$ -edge strands from another monomer.

Because of the intrinsic diversity of the involved precursor proteins, it is difficult to understand the cause and mechanism of AL. Although a few germ line gene families have been implicated in the disease, hundreds of different sequences have been isolated from AL patients, each of which originates from a combinatorial arrangement of germ line gene segments that undergo a particular pattern of somatic mutations. The changes introduced into the  $V_L$  by somatic mutations can affect its stability and prevent normal association with its correspond-

\* This work was supported, in whole or in part, by National Institutes of Health Grant GM-0080 (to X6A Beamline). This work was also supported in part by U.S. Department of Energy Contract DE-AC02-98CH10886 to the National Synchrotron Light Source at Brookhaven National Laboratory.

<sup>1</sup> Recipient of Scholarship 185179 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

<sup>2</sup> Recipient of Scholarship 177224 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

<sup>3</sup> Supported by CONACyT Project 102370 and Programa de Apoyos a Proyectos de Investigación y de Innovación Tecnológica IN204611.

<sup>4</sup> To whom correspondence may be addressed: Avenida Universidad No. 3000 Colonia UNAM, CU, Del. Coyoacán, México, DF, Código Postal 04510, México. Tel.: 52-55-56232259; Fax: 52-55-56162419; E-mail: fdaniel@unam.mx.

<sup>5</sup> Supported by PAPIIT IN217510, UNAM. To whom correspondence may be addressed: Avenida Universidad No. 2001 Colonia Chamilpa, Cuernavaca 62210, México. Tel.: 52-777-3291669 or 52-777-3291847; Fax: 52-777-3172388; E-mail: baltazar@ibt.unam.mx.

<sup>6</sup> The abbreviations used are: AL, light chain amyloidosis; ThT, thioflavin T.

## Biophysical Characterization of $\lambda$ 3 Germ Lines

ing  $V_H$ , allowing its free secretion (9, 10). The loss of the Ig heterotetrameric structure may contribute to the amyloidogenicity of light chain variable domains because the fibrils of most AL patients predominantly comprise a single variable domain (11).

The comparison of amyloidogenic and nonamyloidogenic  $V_L$  sequences has allowed other researchers to identify certain amino acid changes that destabilize the  $V_L$  domain (12–16). The introduction of some of these mutations into nonamyloidogenic  $V_L$  domains decreases their stability and increases their tendency to aggregate and form amyloid fibers *in vivo* (17). Several studies have suggested that a less stable  $V_L$  domain is more likely to aggregate into amyloid fibers (17, 18).

The  $\lambda$  light chains are responsible for the majority of AL cases, with a 3:1 ratio over the  $\kappa$  isotype (19, 20). Several gene segments belonging to the  $\lambda$ 3 and  $\lambda$ 6 subgroups, particularly the *3r* and *6a* germ lines (6, 21), are significantly associated with AL. Despite the predominance of the  $\lambda$  isotype in the disease, only one  $\lambda$  germ line has been characterized for its propensity to form amyloids. Our group previously reported the characterization of the recombinant  $\lambda$  germ line 6aJL2, a protein encoded by the *6a* and the *jI2* gene segments (22). 6aJL2 is thermodynamically more stable than other  $\lambda$ 6 light chains derived from patients with multiple myeloma, although it is capable of forming fibers *in vitro* after long periods of incubation (22).

The  $\lambda$ 3 light chain family comprises 21 genes, nine of which are polyclonal; only six of these nine genes have been associated with AL (23). Although several  $\lambda$ 3 amyloidogenic light chains isolated from patients have been analyzed (6, 24–26), the role of germ line-encoded features (protein regions) in the amyloidogenic capability of the protein has not been determined.

Because the  $\lambda$ 3r subfamily might be intrinsically amyloidogenic, the aim of this work was to characterize the structural and biophysical properties of two germ lines of the  $\lambda$ 3 subgroup. We are interested in the *3r* subgroup because of its high prevalence in AL, whereas the *3m* germ line, which has not been associated with AL, was used as a control (6). Each *3m* and *3r* gene segment was joined to the *jI2* segment to obtain the whole variable domains 3mJL2 and 3rJL2. Because of an inherent limitation (extremely low expression), Cys at position 34 of the *3r* germ line was replaced by Tyr reaching a good expression yield. A second substitution at CDR3 (W91A) was introduced in *3r* to obtain a better template to incorporate additional mutations. Taking the double mutant (3rJL2/YA) as template, other variants were constructed to evaluate the importance of those substitutions on the stability and aggregation propensity of  $\lambda$ 3 light chains. Mutations were introduced into two regions thought to protect against light chain fibril formation: the sheet switch (positions 7 and 8) (13) and the loop 40–60 region (positions 40 and 48) (14). X-ray crystallography revealed that the three-dimensional topology of the single and double  $\lambda$ 3r mutants was not significantly different. The majority of  $\lambda$ 3 variants evaluated in this study showed higher stability compared with other germ lines associated with AL, such as  $\lambda$ 6a and  $\kappa$ IO18/O8 (22, 27, 28). This mutagenic approach helped to confirm or identify other key regions implicated in  $\lambda$ 3 AL.

## MATERIALS AND METHODS

**Cloning, Expression, Extraction, and Purification**—Germ line sequences were obtained from the VBASE database. 3rJL2 and 3mJL2 contained the sequences of the corresponding human  $V\lambda$  3r and 3m germ lines. Both proteins contained the *jI2* segment. The *jI2* segment was used because it is frequently present in clonal plasma cells (6) *3r* and *3m* were synthesized by recursive PCR as described by Prodromou and Pearl (29). The DNA was cloned into the pET22b vector (Novagen, Darmstadt, Germany). Site-specific mutations in 3rJL2 were generated using a mutagenic mega-primer (30). All constructs were verified by nucleotide sequencing.

Vectors containing the light chain recombinant proteins were transformed into the *Escherichia coli* strain BL21(DE3). The cells were grown in 2XYT medium containing 100  $\mu$ g/ml ampicillin at 37 °C and 150 rpm. When the culture reached an  $A_{600}$  of 1–1.4, protein expression was induced by the addition of isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside at a final concentration of 0.2 mM. The cultures were grown for 5 h under low agitation (115 rpm) at 22 °C.

The periplasmic proteins were extracted as described previously (22). The periplasmic extracts were precipitated twice with 30–90% saturated ammonium sulfate and stored at 4 °C. The precipitated proteins were removed by centrifugation (6000 rpm for 30 min), and the pellet was resuspended and dialyzed overnight in 50 mM NaCl and 40 mM Tris, pH 8.2 (buffer A). The proteins were separated by size exclusion chromatography using a Sephacryl S-100 HR column (Amersham Biosciences) connected to an Äkta FPLC system (GE Healthcare). The column was previously equilibrated with buffer A at a flow rate of 2 ml/min. The peak corresponding to the light chains was collected and precipitated with 70% saturated ammonium sulfate.

The precipitated protein was harvested by centrifugation (6,000 rpm for 30 min), and the pellet was resuspended in buffer A. The soluble protein was extensively dialyzed at 4 °C in buffer A while gradually decreasing the NaCl concentration. The final dialysis was performed in 40 mM Tris, pH 8.2. The dialyzed protein was applied onto an anion exchange chromatography column (Bioscale mini macro prep High Q; Bio-Rad) that was prewashed with 40 mM Tris, pH 8.2. The protein was eluted with a linear gradient of 0–30% 500 mM NaCl and 40 mM Tris, pH 8.2, over 60 min. The fractions containing the light chain proteins were pooled and stored at 4 °C until needed. The purity of the protein was verified by SDS-PAGE. The protein concentration was determined by UV absorption using the extinction coefficient value calculated with the ProtParam Tool in the ExPASy Web site.

**Analytical Size Exclusion Chromatography**—The oligomeric state of the  $\lambda$  light chain was determined using a Superdex 75 (10/30) prepacked column (Amersham Biosciences). The column was previously equilibrated with buffer A. The molecular masses were calculated using linear interpolation from a calibration curve that included serum albumin (66.3 kDa), ovalbumin (43.5 kDa), carbonic anhydrase (28.8 kDa), myoglobin (17 kDa), and cytochrome *c* (11.7 kDa) as molecular mass markers.

**Unfolding Experiments: Data Analysis**—The changes in tryptophan fluorescence were analyzed after normalization of the transition curves to the apparent fraction of unfolded molecules,  $F_{\text{app}}$ ,

$$F_{\text{app}} = \frac{(Y_{\text{obs}} - Y_f)}{(Y_u - Y_f)} \quad (\text{Eq. 1})$$

where  $Y_{\text{obs}}$  is the observed fluorescence intensity at a given temperature or guanidine HCl concentration, and  $Y_f$  and  $Y_u$  are the fluorescence signals for the native and unfolded forms, respectively. A linear dependence of  $Y_{\text{obs}}$  was observed in both the native and unfolded baseline regions; therefore, linear extrapolations from these baselines were made to obtain estimates of  $Y_f$  and  $Y_u$  in the transition region.

**Guanidine HCl Denaturation Experiments**—The intrinsic fluorescence emission measurements were recorded on an LS50B spectrofluorimeter (PerkinElmer Life Sciences) using a 1-cm-path length quartz cuvette. Protein samples were prepared at concentrations of 20, 50, and 200  $\mu\text{g/ml}$  in 20 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5. Different concentrations of guanidine HCl from an 8 M stock solution were used to unfold the protein; the samples were then incubated for 12 h at 25 °C (equilibrium conditions). Samples incubated for 6 or 12 h showed similar results. The fluorescence emission was collected at 355 nm using an excitation wavelength of 295 nm. Thermodynamic parameters were calculated assuming the unfolding reaction followed a two-state model in which the native monomers ( $N$ ) are in equilibrium with the unfolded monomers ( $U$ ),



where  $K_{\text{app}} = F_{\text{app}}/(1 - F_{\text{app}})$ . A linear dependence of  $\Delta G^\circ$  on the concentration of guanidine HCl (GndHCl) was assumed (30),

$$\Delta G^\circ = \Delta G_{\text{H}_2\text{O}} - m[\text{GndHCl}] \quad (\text{Eq. 3})$$

where  $\Delta G^\circ$  represents the Gibbs free energy at a given concentration of guanidine HCl,  $\Delta G_{\text{H}_2\text{O}}$  represents the Gibbs free energy in the absence of guanidine HCl,  $m$  is the gradient of the linear transition region and reflects the cooperativity of the process, and  $C_m$  is the denaturant concentration at which  $\Delta G = 0$  and was calculated as  $C_m = -/m$ .

**Thermal Unfolding**—The samples were solubilized at 50  $\mu\text{g/ml}$  in 3 ml of PBS solution and then placed into quartz cuvettes. A micro-stir bar was used at a low speed to maintain a uniform solution temperature. The fluorescence intensity was measured as described for the chemical denaturing experiments. The protein solution was heated using a water bath with a recirculation system connected to the cuvette holder of the spectrofluorimeter (LS50B; PerkinElmer Life Sciences). The temperature of the solution was measured using a thermistor thermometer. The thermal unfolding data were analyzed as described by Pace *et al.* (31) assuming a two-state process and the van't Hoff equation,

$$\frac{d(\ln K_{\text{app}})}{d(1/T)} = -\frac{\Delta H_{\text{app}}}{R} \quad (\text{Eq. 4})$$

where  $T$  is the temperature,  $\Delta H$  is the enthalpy, and  $R$  is the gas constant.

The value of  $\Delta G$  at room temperature was determined using the following equation,

$$\Delta G(T) = \Delta H_m \left(1 - \frac{T}{T_m}\right) - \Delta C_p \left[(T_m - T) + T \ln\left(\frac{T}{T_m}\right)\right] \quad (\text{Eq. 5})$$

where  $T$  is 298 K, and  $C_p$  is the change in heat capacity associated with unfolding, calculated theoretically according to the method described by Milardi *et al.* (32).

**In Vitro Fibril Formation**—Protein samples at a concentration of 100  $\mu\text{g/ml}$  were filtered through a 0.22- $\mu\text{m}$  pore-size Millex GV membrane filter (Millipore) and poured into a polystyrene cuvette in PBS. The cuvette was incubated at 37 °C under agitation with a magnetic stir bar. Fiber formation was monitored at different time points by following the incorporation of thioflavin T (ThT) (Sigma Aldrich) (33). The fluorescence emission was recorded at 482 nm using an excitation wavelength of 450 nm. The fibril formation kinetics was analyzed by fitting the time-dependent changes in the ThT fluorescence intensity to the following equation,

$$F_{\text{ThT}} = A/(1 + \exp[-B(t - t_i)]) \quad (\text{Eq. 6})$$

where  $F_{\text{ThT}}$  is the ThT fluorescence intensity,  $A$  is the ThT fluorescence intensity in the post-transition plateau,  $t_i$  is the midpoint of the transition region,  $B$  is the fibril growth rate constant, and  $t$  is time. An absolute value of the nucleation lag time,  $t_{\text{lag}}$ , was calculated by extrapolating the linear region of the hyperbolic phase back to the abscissa (34).

**Circular Dichroism Experiments**—CD spectra and thermal denaturation experiments were recorded on a JASCO J-715 spectropolarimeter (JASCO Inc., Easton, MD) equipped with a water-cooled peltier. Far-UV CD spectra were recorded using a 0.2-cm-path length closed quartz cell at a concentration of 200  $\mu\text{g/ml}$  protein in 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.5.

The raw data were converted to molar ellipticity using the formula,

$$[\theta] = 100 * \theta / (C * l) \quad (\text{Eq. 7})$$

where  $C$  is molar concentration, and  $l$  is the cell path length in cm.

**Transmission Electron Microscopy**—A Formvar/carbon-coated copper G200 grid (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) was floated onto a 20- $\mu\text{l}$  drop of protein sample for 2 min. The excess liquid was drained off with filter paper, and the specimen was negatively stained by floating onto a 40- $\mu\text{l}$  drop of 4% (w/v) uranyl acetate for 2 min and blotted dry. The specimens were analyzed at 80 kV on a Zeiss EM900 Transmission electron microscope. The images were recorded with a CCD DualVision 300W camera (Gatan, Pleasanton, CA) at a resolution of 1030  $\times$  1300 pixels. The image processing was performed using Adobe Photoshop version 7.0.



**TABLE 1**  
Data collection and refinement statistics

| Data set  | 3mJL2                            | 3rJL2/Y                        | 3rJL2/YA                        |
|---|----------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Space group   | C 1 2 1                          | P3 <sub>1</sub>                | P3 <sub>1</sub>                 |
| Unit cell parameters ( <i>a</i> , <i>b</i> , <i>c</i> (Å); $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ (°)) | 89.4, 40.9, 106.7; 90, 90.15, 90 | 41.9, 41.9, 170.8; 90, 90, 120 | 41.8, 41.8, 171.10; 90, 90, 120 |
| Residues per monomer/monomers per AU  | 106/4                            | 106/4                          | 106/4                           |
| Matthews coefficient (Å <sup>3</sup> Da <sup>-1</sup> )/solvent content (%)                   | 2.1/41.3                         | 1.9/33.9                       | 1.8/33.6                        |
| X-ray source  | NSLS, X6A                        | NSLS, X6A                      | NSLS, X6A                       |
| Detector  | ADSC Q270 CCD                    | ADSC Q270 CCD                  | ADSC Q270 CCD                   |
| Wavelength  | 0.9330                           | 0.9720                         | 0.9720                          |
| Resolution range (Å)  | 34.20–1.75<br>(1.84–1.75)        | 24.86–1.80<br>(1.90–1.80)      | 27.63–1.70<br>(1.79–1.70)       |
| Unique reflections  | 31,323                           | 31,131                         | 36,831                          |
| Multiplicity  | 6.8 (7.2)                        | 5.7 (5.7)                      | 5.7 (5.6)                       |
| Completeness (%)  | 79.4 (74.3)                      | 100 (100)                      | 99.9(99.7)                      |
| <i>I</i> / $\sigma$ ( <i>I</i> )  | 7.4 (2.1)                        | 10.4 (2.3)                     | 10.2 (1.8)                      |
| <i>R</i> <sub>merge</sub> (%)   | 7 (37)                           | 6 (32)                         | 6 (43)                          |
| Wilson plot B value (Å <sup>2</sup> )/mean B value from coordinates                           | 17.22/22.50                      | 16.27/20.87                    | 18.46/23.55                     |
| <i>R</i> <sub>work</sub> / <i>R</i> <sub>free</sub> (%)                                       | 16.6/21.8                        | 16.8/21.1                      | 17.4/21.1                       |
| Protein Data Bank code  | 4AIZ                             | 4AIX                           | 4AJ0                            |

**Crystallization**—Prior to the crystallization trials, the 3mJL2, 3rJL2/Y, and 3rJL2/YA proteins were maintained in 40 mM Tris, pH 8.2, containing 20 mM NaCl. Crystal screens 1 and 2 from Hampton Research (Laguna Niguel, CA) were chosen as the starting point in the search for crystallization conditions. The 3mJL2, 3rJL2/Y, and 3rJL2/YA proteins were concentrated to 3.5, 4.5, and 3.5 mg/ml, respectively. Drops containing 1  $\mu$ l of Hampton solution and 1  $\mu$ l of the respective protein were set up using the micro-batch method under paraffin oil. Micro-crystals were obtained under several conditions, as follows: 3mJL2 crystals with the best shape appeared using condition 5 from Crystal Screen 1 (Hampton Research, Aliso Viejo, CA) containing 0.2 M sodium citrate, 0.1 M HEPES, pH 7.5, and 30% MPD, and crystals of 3rJL2/Y and 3rJL2/YA appeared using condition 32 from Crystal Screen 1 (Hampton Research) containing 2 M ammonium sulfate. Upon optimization, 0.30  $\times$  0.30  $\times$  0.30-mm crystals were generated with the hanging drop method at 291 K after 15 days for each of the three proteins under the following conditions: 3mJL2, 0.2 M sodium citrate, 0.1 M HEPES, pH 7.5, and 40% MPD; 3rJL2/Y, 2.3 M ammonium sulfate and 40% trehalose; and 3rJL2/YA, 1.6 M ammonium sulfate and 40% trehalose. Because all of these conditions are suitable for cryocooling, the crystals were mounted in rayon cryoloops and flash-cooled in a 100 K nitrogen stream.

**X-ray Data Collection**—The data collection was performed at National Synchrotron Light Source Beamline X6A at two x-ray wavelengths: 0.9720 Å (for both 3r mutant crystals) and 0.9330 Å (for 3mJL2), using an Oxford Cryosystems 700 series Cryostream and an ADSC Q270 CCD detector (ADSC, Poway, CA).

**Data Processing and Model Refinement**—Indexing and integration were performed using MOSFLM for 3rJL2/Y (35) and XDS (36) for 3mJL2 and 3rJL2/YA. The integrated reflections were sorted, scaled, and truncated with SORTMTZ, SCALA, and TRUNCATE (37) from the CCP4 suite, respectively. Molecular replacement was carried out in PHASER (38) using the edited Protein Data Bank code 1LIL atomic coordinates, corresponding to the  $\lambda 3$  immunoglobulin Cle, as the starting model (24). The resulting model for each protein was subjected to rigid body refinement followed by restrained refinement in REFMAC5 (39). Once convergence was reached, the refinement was continued in PHENIX 1.5 (40). The refinement was alternated with manual building in COOT (41). The refinement

cycles ended when *R*<sub>work</sub> and *R*<sub>free</sub> values were lower than 0.18 and 0.22, respectively. Validation of the final models was performed using PROCHECK (42). The coordinates and structural factors of the final models were deposited in the Protein Data Bank (43) with the following codes: 4AIZ (3mJL2), 4AIX (3rJL2/Y), and 4AJ0 (3rJL2/YA). The crystallographic data and refinement statistics for the three structures are shown in Table 1.

## RESULTS

**3mJL2 and 3rJL2/YA as Nonamyloidogenic and Amyloidogenic  $\lambda 3$  Variable Domains**—3mJL2 was expressed and purified efficiently. In contrast, 3rJL2 was scarcely expressed.  $\lambda 3$  germ line sequences were analyzed to identify single substitutions that would allow improve protein expression (Fig. 1). We found that 3r is the only germ line with a cysteine residue at position 34 (according to Kabat numbering), a solvent-exposed position at the N terminus of strand C. Although both amyloidogenic and nonamyloidogenic 3r-derived sequences bear a Cys in this position, other  $\lambda$  germ lines (such as 3m) contain Tyr or another polar residue (Fig. 1). These data suggested that Cys-34 should not substantially modify the fibrillogenic properties of the proteins derived from the 3r sub-family. Because the presence of a solvent-exposed cysteine residue may affect 3rJL2 expression, we constructed 3rJL2/Y, a mutant in which Cys-34 was mutated to tyrosine (3rJL2/C34Y), the equivalent residue found in the 3m germ line (Fig. 1). The expression, purification, and yield of 3rJL2/Y were comparable with those of 3mJL2. We assessed the thermodynamic stability of 3mJL2 and 3rJL2/Y by thermal and chemical unfolding experiments. Based on the tryptophan fluorescence measurements, monophasic and reversible transitions were observed; therefore, as a first approximation, we analyzed the data assuming a two-state process (Fig. 2). The unfolding kinetics of 3rJL2/Y and 3mJL2 were very similar, as deduced from the comparison of the midpoints of chemical or thermal unfolding (*C*<sub>m</sub> and *T*<sub>m</sub>, respectively; Table 2) and the values for the cooperativity of the unfolding process (*m* and  $\Delta H_{VHP}$ , respectively; Table 2). The  $\Delta G$  values showed that 3rJL2/Y and 3mJL2 were more stable than 6aJL2 and  $\kappa$ IO18/08, the only amyloid germ lines previously evaluated (22, 27, 28). We found that 3rJL2/Y had refolding transitions that were not superimposable with the unfolding transitions (Fig. 2B). These results may reflect the presence of an irreversible refolding process

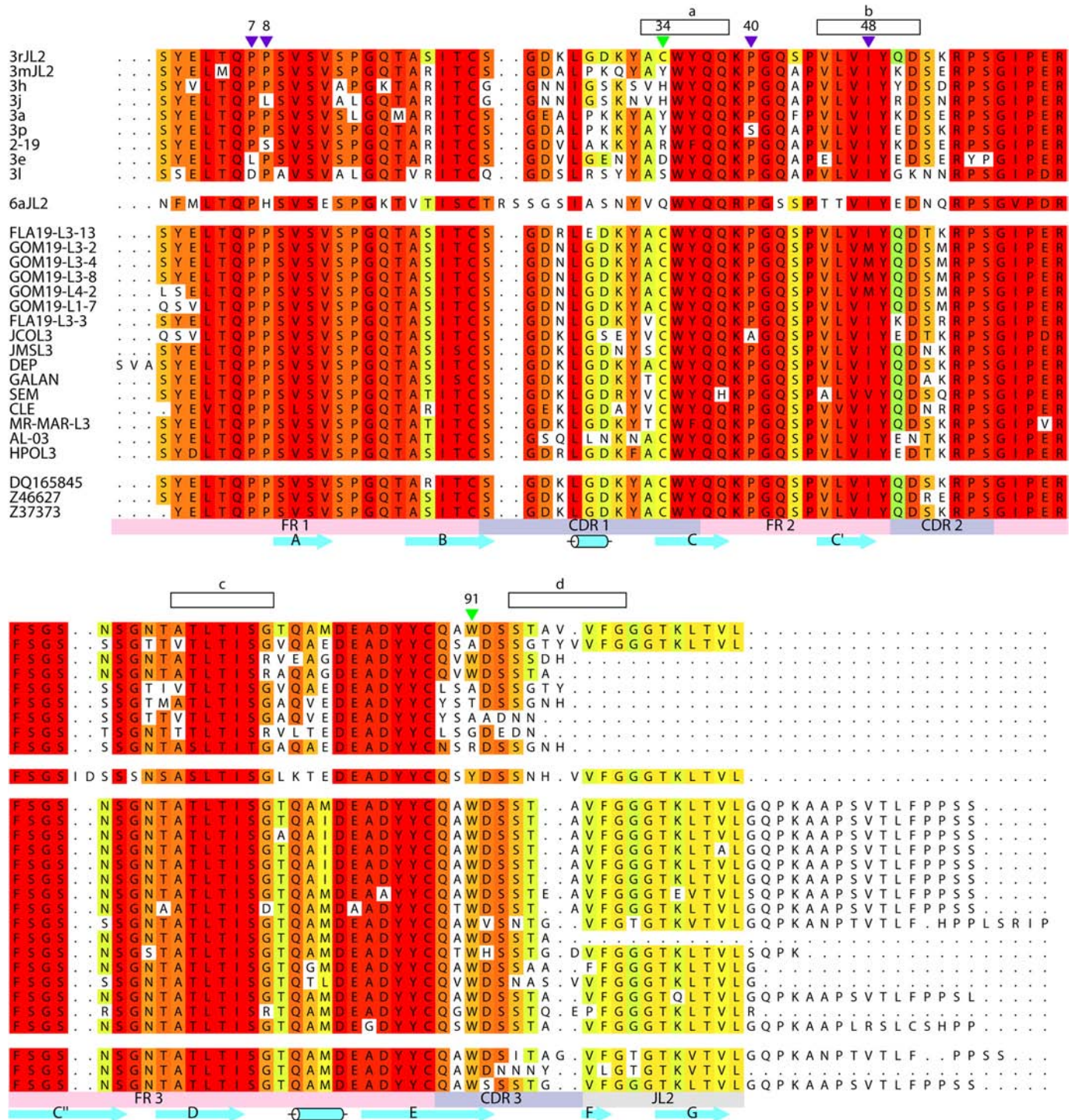


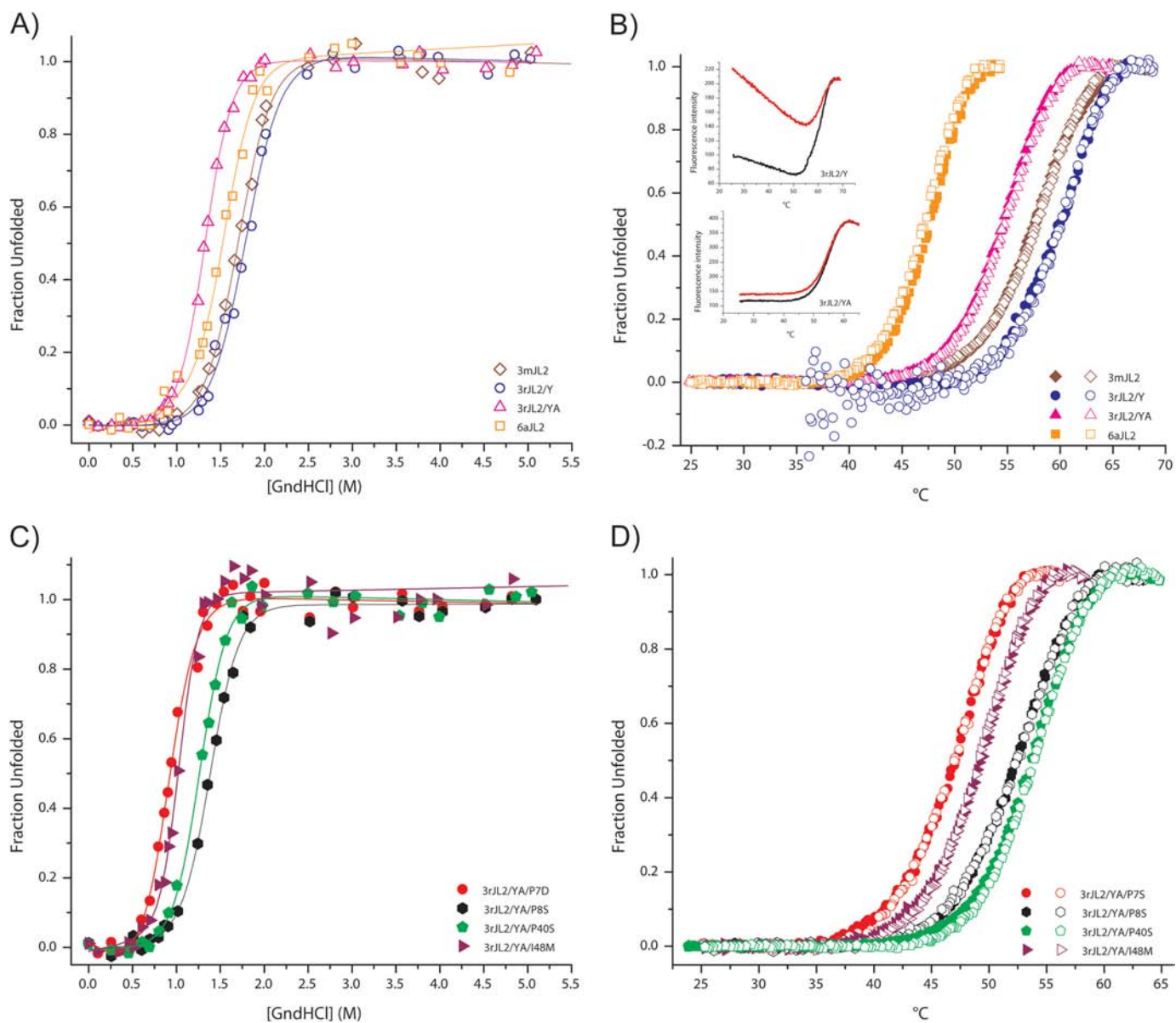
FIGURE 1. Sequence alignment of  $\lambda 3$  germ lines,  $\lambda 3$  proteins obtained from patients and healthy individuals, and 6aJL2 germ line. The amino acid residues are colored by relative conservation using the ALIGN program (54). The dots indicate gaps inserted to maximize the alignment. The top group shows the  $\lambda 3$  germ line sequences, including the 6aJL2 germ line sequence. Green, slate, and purple triangles above the alignment mark the sites that were mutated in 3rJL2, 3rJL2/Y, and 3rJL2/YA, respectively. Black rectangles above the alignment mark the potential aggregation regions predicted by TANGO, PASTA, and Aggrescan servers. Framework (FR), complementarity determining regions (CDR), and joining (JL2) segments are indicated below the alignment with pink, indigo, and gray stripes, respectively. The secondary structure elements of 3rJL2/Y are marked below the alignment. The middle and lower groups comprise the  $\lambda 3$  sequences derived from patients with AL amyloidosis and healthy individuals, respectively. The germ line sequences were obtained from the VBASE database, and the  $\lambda 3$  sequences derived from patients and healthy individuals were obtained from the National Center for Biotechnology Information server.

and/or photo-physical damage of a Trp residue. Fluorescence spectra of samples kept in the dark or illuminated during the thermal melt were very similar, indicating that photo-oxidation is not responsible for these differences. Size exclusion chroma-

tography and electron microscopy analyses were performed to know whether some type of aggregation would explain irreversibility. No detectable aggregates were found using both alternatives (data not shown). The far UV CD spectra of 3rJL2/Y before



## Biophysical Characterization of $\lambda$ 3 Germ Lines



**FIGURE 2. Denaturation curves of  $\lambda$ 3 proteins.** *A* and *C*, fraction of unfolded protein as a function of guanidine HCl concentration. The *solid lines* represent a two-state fit of the data from 0 to 5 M of the denaturant. *B* and *D*, temperature-induced unfolding. The *inset* in *B* shows the fluorescence spectra of 3rJL2/Y and 3rJL2/YA. The *filled symbols* indicate denaturation, and the *open symbols* indicate renaturation. The 6aJL2 protein is shown for comparison purposes. The calculated thermodynamic parameters are shown in Table 2.

**TABLE 2**  
Thermodynamic and fibrillogenesis parameters of  $\lambda$ 3 proteins

The error shown is the standard deviations from three independent experiments. NA, not applicable, *i.e.* fibril formation was not observed after 70 h.

| Parameter                                | 3mJL2         | 3rJL2/Y (CDR1) | 3rJL2/YA (CDR1/CDR3) | 3rJL2/YA/P7D (FR1) | 3rJL2/YA/P8S (FR1) | 3rJL2/YA/P40S (FR2) | 3rJL2/YA/I48M (FR2) | 6aJL2            |
|--|---------------|----------------|----------------------|--------------------|--------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| $C_m$ (M)                                | $1.6 \pm 0.1$ | $1.8 \pm 0$    | $1.4 \pm 0.1$        | $0.9 \pm 0$        | $1.3 \pm 0$        | $1.3 \pm 0$         | $1 \pm 0.1$         | $1.6 \pm 0$      |
| $m$                                      | $-12 \pm 1.2$ | $-13 \pm 1.3$  | $-16 \pm 1.0$        | $-17 \pm 1.8$      | $-14 \pm 1.2$      | $-17 \pm 1.5$       | $-21 \pm 1.2$       | $-14 \pm 1.2$    |
| $T_m$ ( $^{\circ}$ C)                    | $60 \pm 0.8$  | $63 \pm 0.1$   | $56 \pm 0.5$         | $50 \pm 0.2$       | $54 \pm 1.4$       | $55 \pm 0.6$        | $51 \pm 0.7$        | $49 \pm 0.5$     |
| $\Delta G_{25^{\circ}\text{C}}$ (KJ/mol) | $33 \pm 0.7$  | $37 \pm 2.9$   | $31.3 \pm 0.2$       | $22.1 \pm 0.2$     | $28 \pm 2.4$       | $28.4 \pm 1.5$      | $25.5 \pm 1.1$      | $27 \pm 1.3$     |
| $\Delta H_{\text{VH}}$ (KJ/mol)          | $317 \pm 2$   | $331.3 \pm 26$ | $332 \pm 5$          | $291 \pm 5.3$      | $313.3 \pm 29.4$   | $312.7 \pm 12$      | $316.3 \pm 15.6$    | $359.5 \pm 19.4$ |
| Growth rate ( $\text{h}^{-1}$ )          | NA            | NA             | $0.08 \pm 0.01$      | $0.84 \pm 0.28$    | NA                 | NA                  | $0.07 \pm 0.01$     | $1.20 \pm 0.24$  |
| $t_{\text{lag}}$ (h)                     | NA            | NA             | $11.25 \pm 5.22$     | $9.24 \pm 0.41$    | NA                 | NA                  | $11.74 \pm 0.87$    | $5.17 \pm 0.84$  |

and after the thermal melt are not the same (Fig. 3), suggesting that some sort of irreversibility not linked to aggregation is present in this protein.

All of the recombinant  $\lambda$  chain proteins previously analyzed have shown reversible temperature-induced transitions. In

addition to the buried Trp-35 in the hydrophobic core of all  $\lambda$  light chains, 3rJL2 contains a second tryptophan residue at position 91, which is also present in most  $\lambda$ 3 light chain sequences (Fig. 1). To simplify the interpretation of unfolding transition reversibility followed by fluorescence, Trp-91 was

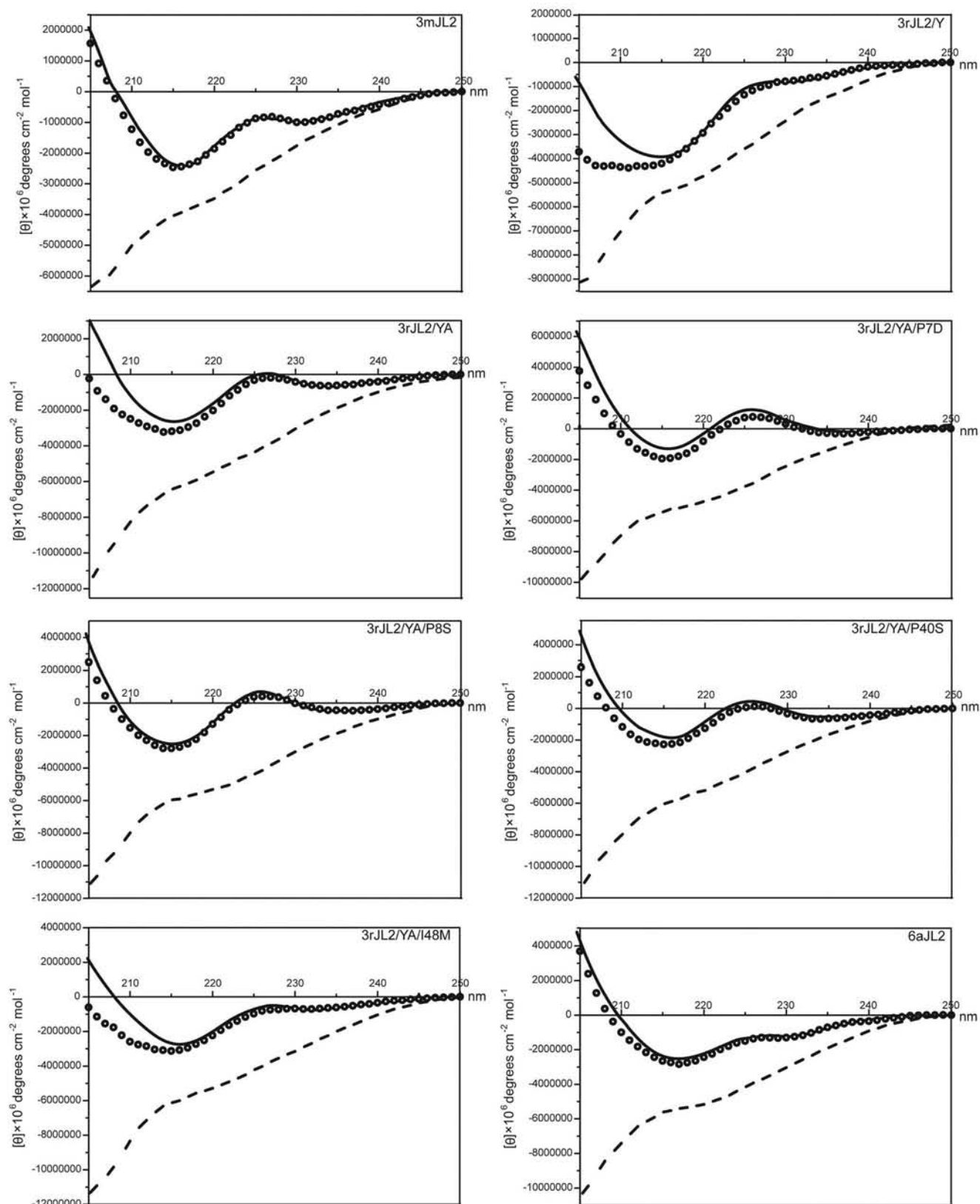


FIGURE 3. Far UV CD spectra at different temperatures of  $\lambda$  light chains. Unfolding and refolding traces correspond are shown as dashed lines and open circles, respectively. CD spectra were recorded during heating and cooling of the same sample. The continuous lines represent the native protein. The refolding of 3rJL2/Y, 3rJL2/YA, 3rJL2/YA/P7D, 3rJL2/YA/P40S, and 3rJL2/YA/I48M shows some changes in secondary structure as evidenced by the displacement of the refolding trace beyond the minimum (215 nm) or approximately at the maximum at 225 nm. The far UV CD recordings were carried out using a 0.2-cm-path length cuvette (200  $\mu$ g/ml protein in 20 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7.5).



## Biochemical Characterization of $\lambda 3$ Germ Lines

changed to alanine (the equivalent residue present in the sequence of 3m). This double mutant named 3rJL2/YA (3rJL2/C34Y/W91A) showed superimposable unfolding and refolding transitions. Far UV CD results indicate that the double mutant recovered its native structure more significantly as compared with the single mutant. The better recovering of native properties after thermal unfolding encouraged us to use this double mutant as a template for the evaluation of the fibril formation propensity of additional mutants generated by site-directed mutagenesis.

It should be noted, however, that the thermodynamic analysis of the double mutant showed that W91A change in 3rJL2/YA caused a significant destabilization, as demonstrated by the  $\Delta G$  decrement compared with that of 3rJL2/Y (Table 2). The  $C_m$  and  $T_m$  values decreased by 0.4 M and 7 °C, respectively (Table 2). The unfolding of 6aJL2 was evaluated to assess the thermodynamic stability difference between the  $\lambda 3$  and  $\lambda 6$  families. The results for 6aJL2 were similar to those previously reported (22). Far UV CD data showed that 6aJL2 germ line is completely reversible (Fig. 3). 3mJL2 and 3rJL2/Y had higher  $T_m$  values than 6aJL2, indicating that the  $\lambda 3$  variable domains are more stable (Table 2).

**Structural Characterization**—The asymmetric units of the 3mJL2, 3rJL2/Y, and 3rJL2/YA crystal structures each contain four monomers, and each monomer comprises residues 2–107 of the light chain variable domain. The crystallographic data and refinement statistics are presented in Table 1. The superposition of monomers from each of the structures showed a backbone root mean square deviation between 0.4 and 0.9 Å, indicating that the global topology of the three models is similar (Fig. 4). However, there are subtle backbone deviations between the 3mJL2, 3rJL2/Y, and 3rJL2/YA structures at CDR1, CDR3, the region around residue Pro-40, and the loop connecting strands C' and D (Fig. 4C).

The conformation of the N-terminal region in 3mJL2, 3rJL2/Y, and 3rJL2/YA was similar to that of 6aJL2 (13), including the proline  $\beta$ -bulge between the two segments of strand A. However, strand A in the  $\lambda 3$  structures was shorter and only comprised the segment after the  $\beta$ -bulge (Fig. 4B). The same hydrogen bonds are formed between the carbonyls of Pro-7 and Pro-8 in strand A and the carbonyls of Thr-103 and Lys-104 in strand G in the  $\lambda 3$  and 6aJL2 structures (Fig. 4B). 3mJL2 has an insertion (Y95b) at CDR3 compared with the other  $\lambda 3$  germ lines (Fig. 1). The OH of residue Y95b formed a hydrogen bond with the OE2 of residue E3, tightening the N terminus to the core of the domain (Fig. 4B and Table 3).

We compared the  $\lambda 3$  structures and 6aJL2 and found deviations of  $\sim 2$  Å in the C $\alpha$  position in the loop connecting  $\beta$ -strands C and C' (K39 to Q42) (Fig. 4A). This difference has been previously reported in AL proteins and may reflect the high mobility of this region (16).

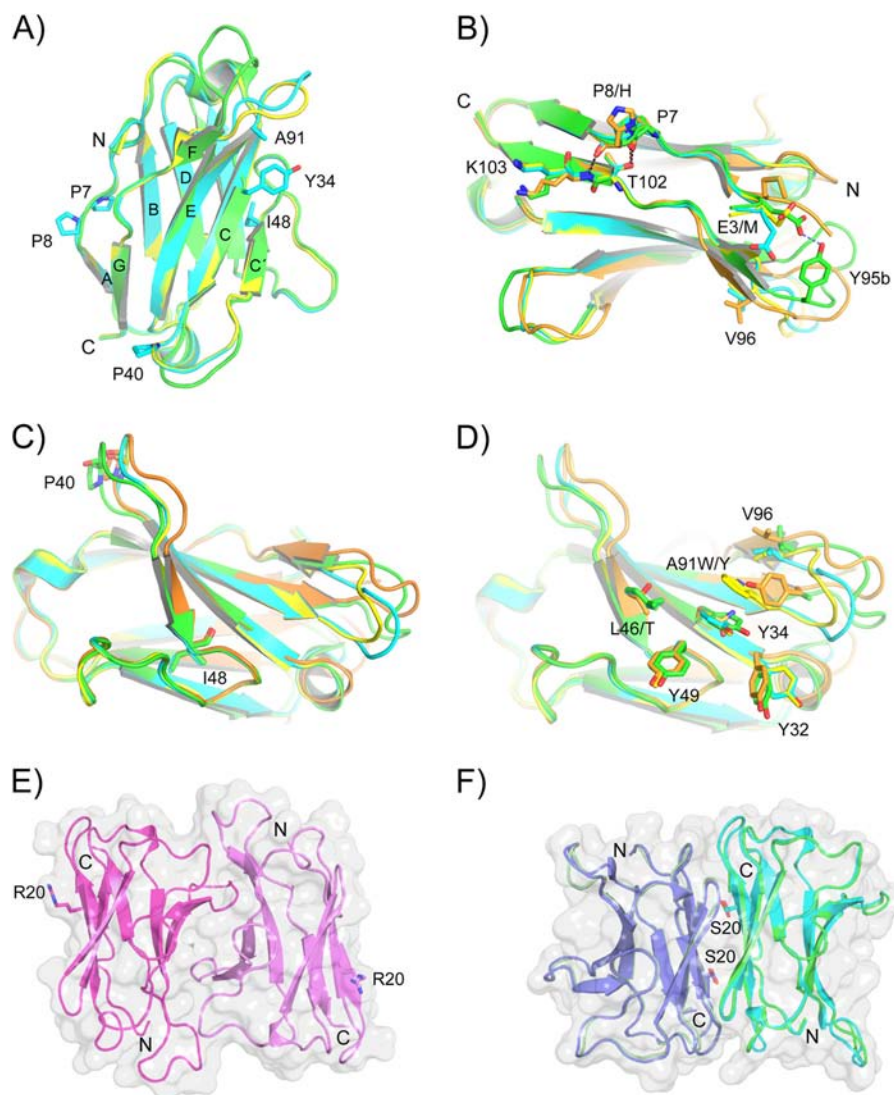
In the 3rJL2/Y mutant, Tyr-34 (at  $\beta$ -strand C) forms part of a hydrophobic cluster with residues Tyr-32, Tyr-49, Leu-46, and Trp-91 (Fig. 4D). Trp-91 forms an additional hydrophobic interaction with Val-96 (Fig. 4D). The 3rJL2/YA mutant maintains the same hydrophobic interactions, with the exception of position 91. The change from cysteine to tyrosine at position 34 increases this hydrophobic patch in 3r structures. Because the

backbone conformations of 3rJL2/Y and 3rJL2/YA are similar, we hypothesize that the W91A mutation ( $\beta$ -strand G) loosens the contacts at  $\beta$ -strands C, F, and G, explaining the slightly higher stability of 3rJL2/Y (Table 2) and the fibril formation capacity of 3rJL2/YA (see below and Table 3). Our structural analysis suggests that each germ line has a particular set of contacts that stabilizes its structure.

Many variable domains and complete light chains form dimers at physiological conditions (44, 45). Because the dimers do not seem to be involved in fiber elongation, they could modulate the aggregation of pathological light chain monomers (45). Therefore, variable domain dimerization could be a security lock to prevent fiber formation. We analyzed the  $V_L$ - $V_L$  interactions in the crystal lattices of the  $\lambda 3$  variants. In the asymmetric unit of 3mJL2, each monomer interacted with another monomer to form the equivalent of a Bence-Jones dimer (Fig. 4E), whereas the 3rJL2/Y and 3rJL2/YA monomers formed crystallographic dimers in which the second monomer was rotated 180° with respect to the corresponding 3mJL2 monomer (Fig. 4F). The 3r monomers would only form the equivalent of a Bence-Jones dimer with their symmetric partners. At the center of the 3mJL2 B strand, the Arg-20 side chain pointed toward the solvent, preventing the formation of the alternate interface found in the 3rJL2/Y and 3rJL2/YA mutants, whereas the Ser-20 side chain is buried in the crystal dimer interface (Fig. 4F). It was previously proposed that the presence of a charged amino acid at the center of an edge strand may protect against the aggregation of proteins that contain a  $\beta$ -sandwich structure (8). The majority of  $\lambda 3$  germ lines and  $\lambda 3$  variants isolated from patients presented an arginine residue at position 20 (Fig. 1). The germ line 3r contains a Ser at this position, and this is an important difference between 3m and 3r. Presumably, Arg-20 may be one of the security locks that prevent fibril formation in the 3m germ line.

PISA (Protein Interfaces, Surfaces, and Assemblies) (46) analysis indicated that the 3mJL2 dimer interface contains 1,820 Å<sup>2</sup> of buried accessible interface area. This value is significantly higher than the canonical crystallographic dimer interfaces formed by 3rJL2/Y, 3rJL2/YA, and 6aJL2 (1,546, 1,361, and 1,227 Å<sup>2</sup>, respectively) and other dimer interfaces in antibody fragments ( $V_H$ - $V_L$ ) and  $\lambda$  light chains ( $V_L$ - $V_L$ ) (Table 4). The size of the canonical interface of the 3mJL2 dimer would block conformations prone to aggregation.

To rule out those possibilities, we assessed the oligomerization state of the variable domains of 3mJL2, 3rJL2/Y, 3rJL2/YA, and 6aJL2, previously analyzed by SDS-PAGE (Fig. 5). Different protein concentrations (20, 50, and 200  $\mu$ g/ml) were examined through analytical size exclusion chromatography (Fig. 5). The purified variable domains eluted as a single peak with an elution volume corresponding to the molecular mass of a monomer (Fig. 5). We did not observe any oligomeric species in the elution profile. We next performed guanidine HCl and temperature-induced unfolding experiments using the same protein concentrations (20, 50, and 200  $\mu$ g/ml) (Fig. 6). These results, in addition to the hydrodynamic and thermodynamic data (Table 5), allowed the conclusion that the variable domains were mainly monomeric at the protein concentrations evaluated.



**FIGURE 4. Structural differences and dimer interfaces of germ line 3mJL2 and the 3rJL2 mutants.** *A*, superposition of 3mJL2 (green), 3rJL2/Y (yellow), and 3rJL2/YA (cyan) monomers showing the location of residues Pro-7, Pro-8, Pro-40, Ile-48, and Ala-91 in 3rJL2/YA. The  $\beta$ -strands that form the variable domain are marked with *capital letters*. *B*, the conformation of the N-terminal sheet switch region is similar in 3mJL2 and 3rJL2, including the  $\beta$ -bulge in strand A. The two hydrogen bonds that formed between Pro-7 and Pro-8 in  $\beta$ -strand A and Thr-103 and Lys-104 in  $\beta$ -strand G are represented by *dotted lines*. In 3mJL2, the additional residue at CDR3 (Y95b) forms a hydrogen bond with E3, tightening the N terminus to the core of the variable domain. The 6aJL2 monomer is shown in *orange* for comparison. *C*, superposition of the region between the Pro-40 and Ile-48 of 3mJL2, 3rJL2/Y, 3rJL2/YA, and 6aJL2. *D*, the unique hydrophobic interactions that formed between Trp-91 and Tyr-34 in 3rJL2/Y are marked. Notice the additional stacking with residue Val-96. Residues Tyr-32, Leu-46, and Tyr-49, which complement the hydrophobic patch, are shown. *E*, 3mJL2 (magenta and pink) presents the native dimer formed by most of the VL-VL crystal structures. *F*, the dimers of 3rJL2/Y (green and pale green) and 3rJL2/YA (cyan and slate) present a different arrangement at their asymmetric units. 3rJL2/Y and 3rJL2/YA only form the native dimer interface with their corresponding symmetry partners. Residue Arg-20, located on the strand edge of 3mJL2, prevents the formation of the arrangement observed in *B*.

*Site-directed Mutagenesis of the Protective Edges Identifies a Putative Fibrillogenic Region in 3r-derived Proteins*—Proteins rich in  $\beta$ -structures have structural features that prevent their aggregation under harsh conditions or as a consequence of mutations. Light chains have two such anti-aggregation motifs that have been proposed to prevent intermolecular associations of edge strands that could lead to aggregation and fibril formation (8, 47). The N-terminal region of  $\lambda 3$  (residues 1–14) contains a “sheet switch” motif, a structural feature in light chains that is proposed to act as an anti-aggregation domain for  $\beta$ -strands B and G. Prolines at positions 7 and 8 are highly conserved in light chains (Fig. 1); these residues have been proposed to stabilize the sheet switch (13) (Fig. 4B). The functions of these residues were assessed using the 3rJL2/YA mutant.

Pro-7 was mutated to aspartic acid, which is normally present in the  $3l$  germ line. We named the resulting protein (3rJL2/C34Y/W91A/P7D) 3rJL2/YA/P7D. We also mutated Pro-8 to serine, the residue present at the equivalent position in the 2-19 germ line. The resulting protein was named 3rJL2/YA/P8S (3rJL2/C34Y/W91A/P8S). The thermodynamic data for these mutants are shown in Table 2 and Fig. 2. The thermodynamic stability of 3rJL2/YA/P7D was significantly affected, whereas the stability of 3rJL2/YA/P8S was unaffected as compared with the double mutant (Table 2 and Fig. 2). Far UV CD data showed that mutation at position 7 exerted a subtle influence on the reversibility to the native structure. In the case of position 8, the effect on the reversibility of thermal unfolding was minimal (Fig. 3).

TABLE 3

Comparison of interactions among specific residues of  $\lambda$ 3 and 6aJL2 proteins

Hydrogen bonds and hydrophobic interactions formed between residues of 3mJL2, 3rJL2/Y, 3rJL2/YA, and 6aJL2 (according to Kabat numbering). The hydrogen bonds and hydrophobic interactions were determined with the Protein Interaction Server using criteria based on interatomic distances of  $\leq 3.5$  and  $4.0$  Å, respectively, and the Protein Interaction Calculator server (55). *Dashes*, hydrogen bonds or hydrophobic interactions are not present in corresponding proteins.

|                                 | 3mJL2         |              | 3rJL2/Y       |            | 3rJL2/YA      |               | 6aJL2         |
|---------------------------------|---------------|--------------|---------------|------------|---------------|---------------|---------------|
| <b>Hydrogen bonds</b>           |               |              |               |            |               |               |               |
| Glu-3 (OE2)                     | Tyr-95b (OH)  | —            | —             | —          | —             | —             | —             |
| Pro-7 (O)                       | Thr-102 (OG1) | Pro- (O)     | Thr-102 (OG1) | Pro-7 (O)  | Thr-102 (OG1) | Pro-7 (O)     | Thr-102 (OG1) |
| Pro-8 (O)                       | Lys-103 (N)   | Pro-8 (O)    | Lys-103 (N)   | Pro-8 (O)  | Lys-103 (N)   | His-8 (O)     | Lys-103 (N)   |
| —                               | —             | —            | —             | —          | —             | Asn-31b (OD1) | Arg-25 (NH1)  |
| —                               | —             | —            | —             | —          | —             | Asn-31b (ND2) | Tyr-91 (O)    |
| Tyr-34 (N)                      | Gln-89 (O)    | Tyr-34 (N)   | Gln-89 (O)    | Tyr-34 (N) | Gln-89 (O)    | Gln-34 (N)    | Gln-89 (O)    |
| Tyr-34 (O)                      | Q89 (N)       | —            | —             | —          | —             | Gln-34 (O)    | Gln-89 (N)    |
| —                               | —             | —            | —             | —          | —             | Gln-34 (NE2)  | Tyr-32 (O)    |
| —                               | —             | —            | —             | —          | —             | Gln-34 (OE1)  | Glu-50 (N)    |
| —                               | —             | —            | —             | —          | —             | Gln-34 (NE2)  | Gln-89 (OE1)  |
| Ile-48 (O)                      | Trp-35 (N)    | Ile-48 (O)   | Trp-35 (N)    | Ile-48 (O) | Trp-35 (N)    | Ile-48 (O)    | Trp-35 (N)    |
| Ile-48 (N)                      | Trp-35 (O)    | Ile-48 (N)   | Trp-35 (O)    | Ile-48 (N) | Trp-35 (O)    | Ile-48 (N)    | Trp-35 (O)    |
| —                               | —             | Trp-91 (O)   | Tyr-32 (N)    | Ala-91 (O) | Tyr-32 (N)    | Tyr-91 (O)    | Asn-31b (ND2) |
| —                               | —             | Trp-91 (N)   | Tyr-32 (O)    | Ala-91 (N) | Tyr-32 (O)    | Tyr-91 (N)    | Ser-90 (OG)   |
| —                               | —             | Trp-91 (NE1) | Gln-89 (OE1)  | —          | —             | —             | —             |
| <b>Hydrophobic interactions</b> |               |              |               |            |               |               |               |
| Pro-7                           | Pro-8         | Pro-7        | Pro-8         | Pro-7      | Pro-8         | —             | —             |
| Tyr-34                          | Tyr-32        | Tyr-34       | Tyr-32        | Tyr-34     | Leu-46        | —             | —             |
| —                               | —             | Tyr-34       | Leu-46        | Tyr-34     | Leu-46        | —             | —             |
| Tyr-34                          | Tyr-49        | Tyr-34       | Tyr-49        | Tyr-34     | Tyr-49        | —             | —             |
| —                               | —             | Tyr-34       | Trp-91        | —          | —             | —             | —             |
| Ile-48                          | Trp-35        | Ile-48       | Trp-35        | Ile-48     | Trp-35        | Ile-48        | Trp-35        |
| Ile-48                          | Leu-73        | Ile-48       | Leu-73        | Ile-48     | Leu-73        | Ile-48        | Leu-73        |
| —                               | —             | Trp-91       | Val-96        | Ala-91     | Val-96        | —             | —             |

TABLE 4

## Interface areas of different antibody formats

To calculate the interface area of the dimer, only the variable domain was taken into account. In the Fab structures, the constant domains were not included in the surface calculations. The interface areas were calculated using PISA analysis (46).

| Protein                   | Interaction                    | Format                                       | Area           | Protein Data Bank code |
|---------------------------|--------------------------------|--|----------------|------------------------|
|                           |                                |  | Å <sup>2</sup> |                        |
| Human myeloma IgG Hil     | V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> | Fab  | 1,551          | 8FAB                   |
| IgM rheumatoid factor     | V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> | Fab  | 1,726          | 1ADQ                   |
| 9004G in complex with Cn2 | V <sub>H</sub> -V <sub>L</sub> | ScFv   | 1,176          | 2YC1                   |
| CLE                       | V <sub>L</sub> -V <sub>L</sub> | Light chain dimer ( $\lambda$ 3)             | 1,422          | 1LIL                   |
| LEN                       | V <sub>L</sub> -V <sub>L</sub> | Light chain dimer ( $\kappa$ IV)             | 1,080          | 2LVE                   |
| AL-09                     | V <sub>L</sub> -V <sub>L</sub> | Bence-Jones proteins ( $\kappa$ I)           | 1,348          | 2Q1E                   |
| kIO18/08                  | V <sub>L</sub> -V <sub>L</sub> | Light chain homodimer (germ line $\kappa$ I) | 1,237          | 2Q20                   |
| 3mJL2                     | V <sub>L</sub> -V <sub>L</sub> | Light chain (germ line $\lambda$ 3)          | 1,820          | 4AIZ                   |
| 3rJL2/Y                   | V <sub>L</sub> -V <sub>L</sub> | Light chain (germ line $\lambda$ 3)          | 1,546          | 4AIX                   |
| 3rJL2/YA                  | V <sub>L</sub> -V <sub>L</sub> | Light chain (germ line $\lambda$ 3)          | 1,361          | 4AJ0                   |

Residues 40–60 formed the other protective edge of light chains and shield strands C and C' (Fig. 1). Residue Pro-40 was of particular interest because it is highly conserved in both  $\kappa$  and  $\lambda$  isotypes. Furthermore, residue Pro-40 of the multiple myeloma LEN protein has been shown to confer stability onto several amyloid-related light chains (14). We evaluated the role of Pro-40 using the 3rJL2/YA/P40S mutant (3rJL2/C34Y/W91A/P40S). We introduced this mutation based on the 3p sequence, the only  $\lambda$ 3 germ line that does not contain a proline residue at this position (Fig. 1). The thermodynamic parameters of 3rJL2/YA/P40S indicated that this change did not affect the stability of the mutant protein (Table 2 and Fig. 2). Far UV CD data showed that mutations at position 8 and 40 exerted a minimal influence on the reversibility to the native structure. (Fig. 3).

We examined protein aggregation because it promotes amyloid fibril formation. The TANGO, PASTA, and Aggrescan servers are useful bioinformatics tools to evaluate the propensity of residues within a  $\beta$ -sheet to be facing one another on neighboring strands (48–50). Following these criteria, we identified four regions in  $\lambda$ 3 sequences (designated a–d) with different aggregation propensities (Fig. 7). Region b (residues 44–50) obtained the highest scores. 3rJL2/YA was subjected to

*in silico* amino acid scanning around this region to find key residues that could modify its aggregation profile. When we mutated the conserved residue Ile-48 to methionine or proline, the servers predicted a decrease in the aggregation profile of this region in 3rJL2/YA (Fig. 7). Several light chain sequences contain a methionine residue at this position (Fig. 1). These results motivated us to generate the corresponding mutants; however, we were only successful on expressing the 3rJL2/YA/I48M (3rJL2/C34Y/W91A/I48M) mutant. Because Ile-48 is buried in the hydrophobic core of the protein (Fig. 4C), the mutation to proline presumably destabilized the mutant so severely that it was not expressed. The thermodynamic results of 3rJL2/YA/I48M indicated that this mutant showed a decrease in its thermodynamic stability (Table 2 and Fig. 2). Far UV CD data showed that mutation at position 48 exerted a moderate influence on the reversibility to the native structure (Fig. 3).

According to their thermodynamic parameters, the 3rJL2/YA/P8S and 3rJL2/YA/P40S mutants were considered stable. In contrast, 3rJL2/YA/I48M and 3rJL2/YA/P7D were the least stable. In fact, the  $C_m$  and  $T_m$  values of 3rJL2/YA/P7D and 3rJL2/YA/I48M are characteristic of relatively unstable proteins (22, 51). Based on the  $C_m$  and  $T_m$  values, the stability of the



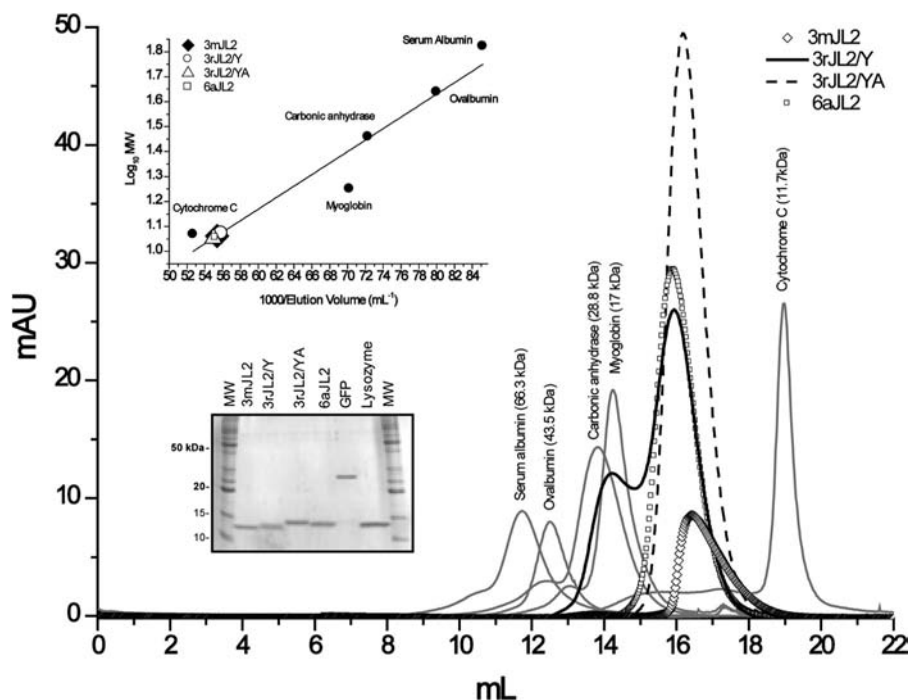


FIGURE 5. **Analysis of the  $\lambda$  light chain variable domain oligomeric state.** Purity of the samples was assessed by 15% SDS-PAGE. Fifty micrograms of protein was loaded into each well. The graph shows the elution profile, and the *inset* shows the calibration plot. A calibration curve for  $\lambda$  light chains and standard proteins was performed in a Superdex 75 column. The calibration curve was used to estimate the molecular mass of the variable domains based on the elution position during analytical size exclusion chromatography. All of the purified variable domains eluted with a molecular mass corresponding to a monomer.

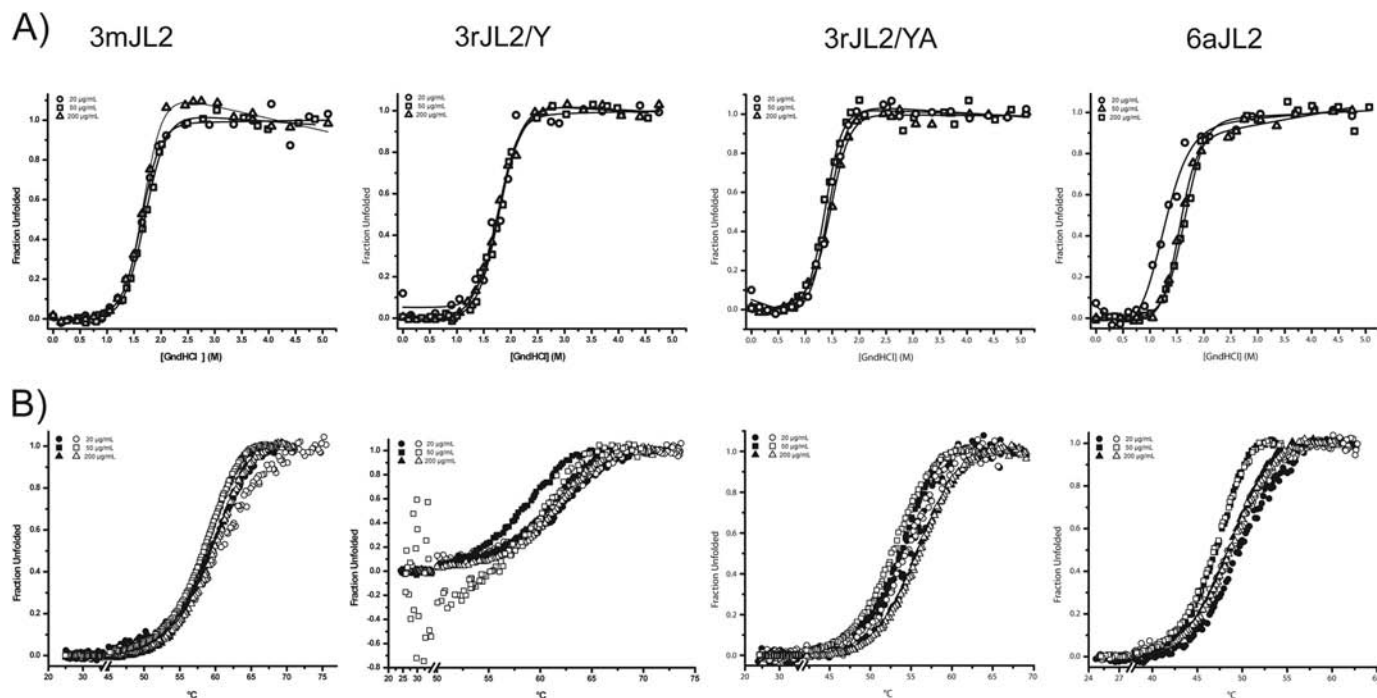


FIGURE 6. **Effect of protein concentration on  $\lambda$  light chain stability.** *A*, denaturation curves in the presence of guanidine HCl. *B*, thermal denaturation curves: 20, 50, and 200  $\mu\text{g}$ . The *filled symbols* and the *open symbols* indicate denaturation and renaturation, respectively. As can be seen, there is not a concentration dependence relationship with  $\Delta G$ . The calculated thermodynamic parameters are shown in Table 5.

3r mutants can be ordered as follows: 3rJL2/Y > 3rJL2/YA > 3rJL2/YA/P40S = 3rJL2/YA/P8S > 3rJL2/YA/148M > 3rJL2/YA/P7D. The mutants had different transition slopes ( $m$  and  $\Delta H$  values) and different chemical and thermal unfolding curves (Table 2 and Fig. 2, *C* and *D*). In other words, although the global stability was not significantly altered, the cooperativity of the

unfolding process was modified in each mutant. The thermodynamic parameters as a whole showed that the more unstable mutants were 3rJL2/YA/P7D and 3rJL2/YA/148M.

*3rJL2/YA/P7D and 6aJL2 Have Similar Kinetics during In Vitro Fibrillogenesis*—One of the characteristics of amyloidogenic proteins is their capacity to form fibers *in vitro* (18, 52).

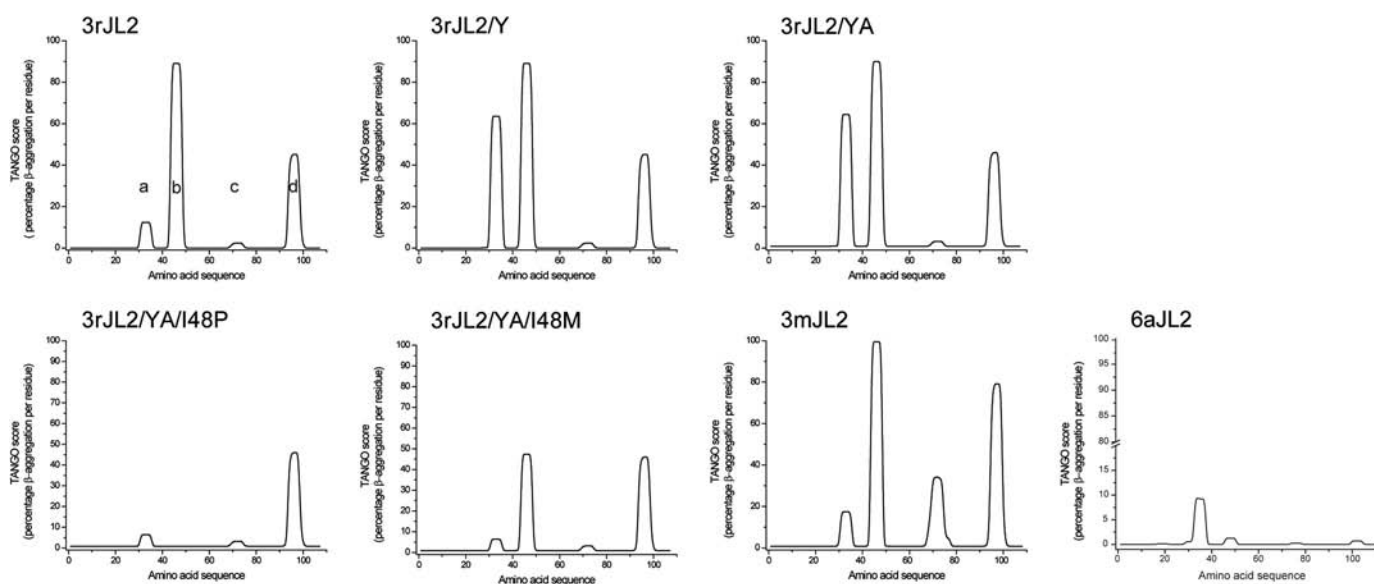
## Biophysical Characterization of $\lambda$ 3 Germ Lines

**TABLE 5**

**Stability of  $\lambda$  light chains at different protein concentrations**

The errors shown are the standard deviations from two or three independent experiments. For thermal denaturation, only the values obtained from the denaturation curve are shown. NA, not applicable.

| Concentration | Parameter                        | 3mJL2          | 3rJL2/Y        | 3rJL2/YA         | 6aJL2            |
|---------------|----------------------------------|----------------|----------------|------------------|------------------|
| 20 $\mu$ g    | $C_m$ (M)                        | 1.7 $\pm$ 0.1  | 1.8 $\pm$ 0.1  | 1.4 $\pm$ 0.0    | 1.3 $\pm$ 0.2    |
|               | $\Delta G_o^{H_2O}$ (KJ/mol)     | 24 $\pm$ 0.8   | 21 $\pm$ 3.6   | 21 $\pm$ 2.2     | 11 $\pm$ 0.4     |
|               | $m$ (KJ/mol)                     | -14 $\pm$ 0.0  | -11 $\pm$ 2.6  | -15 $\pm$ 1.6    | -9 $\pm$ 1.6     |
|               | $T_m$ ( $^{\circ}$ C)            | 61.3 $\pm$ 2.3 | 63.5 $\pm$ 0.6 | 56.9 $\pm$ 0.2   | 49.5 $\pm$ 0.5   |
|               | $\Delta G_{25}^{\circ}$ (KJ/mol) | 29.5 $\pm$ 4   | 36 $\pm$ 0.6   | 30.5 $\pm$ 4.2   | 25.5 $\pm$ 1.4   |
|               | $\Delta H_{VH}$ (KJ/mol)         | 273 $\pm$ 52.4 | 316.2 $\pm$ 10 | 316.2 $\pm$ 45.3 | 342 $\pm$ 31.6   |
| 50 $\mu$ g    | $C_m$ (M)                        | 1.6 $\pm$ 0.1  | 1.8 $\pm$ 0    | 1.4 $\pm$ 0.1    | 1.6 $\pm$ 0      |
|               | $\Delta G_o^{H_2O}$ (KJ/mol)     | 21 $\pm$ 0.9   | 24 $\pm$ 2.1   | 23 $\pm$ 2.3     | 21.4 $\pm$ 0.9   |
|               | $m$ (KJ/mol)                     | -12 $\pm$ 1.2  | -13 $\pm$ 1.3  | -16 $\pm$ 1.0    | -14 $\pm$ 1.2    |
|               | $T_m$ ( $^{\circ}$ C)            | 60 $\pm$ 0.8   | 63 $\pm$ 0.1   | 56 $\pm$ 0.5     | 49 $\pm$ 0.5     |
|               | $\Delta G_{25}^{\circ}$ (KJ/mol) | 33 $\pm$ 0.7   | 37 $\pm$ 2.9   | 31 $\pm$ 0.2     | 27 $\pm$ 1.3     |
|               | $\Delta H_{VH}$ (KJ/mol)         | 317 $\pm$ 1.8  | 331.3 $\pm$ 26 | 332 $\pm$ 4.9    | 359.5 $\pm$ 19.4 |
| 200 $\mu$ g   | Growth rate ( $h^{-1}$ )         | NA             | NA             | 0.08 $\pm$ 0.01  | 1.20 $\pm$ 0.24  |
|               | $t_i$ (h)                        | NA             | NA             | 11.25 $\pm$ 5.22 | 5.17 $\pm$ 0.84  |
|               | $C_m$ (M)                        | 1.7 $\pm$ 0.0  | 1.8 $\pm$ 0    | 1.5 $\pm$ 0.1    | 1.5 $\pm$ 0.1    |
|               | $\Delta G_o^{H_2O}$ (KJ/mol)     | 24.4 $\pm$ 0.2 | 18 $\pm$ 0.3   | 21 $\pm$ 0.6     | 20 $\pm$ 3.1     |
|               | $m$ (KJ/mol)                     | -15 $\pm$ 0.1  | -10 $\pm$ 0.3  | -14 $\pm$ 1.1    | -14 $\pm$ 1.2    |
|               | $T_m$ ( $^{\circ}$ C)            | 61.6 $\pm$ 1   | 63 $\pm$ 0.6   | 56.5 $\pm$ 0.0   | 49 $\pm$ 0       |
|               | $\Delta G_{25}^{\circ}$ (KJ/mol) | 31.6 $\pm$ 0.5 | 37 $\pm$ 1.2   | 30 $\pm$ 1       | 25.5 $\pm$ 0.8   |
|               | $\Delta H_{VH}$ (KJ/mol)         | 289 $\pm$ 2.7  | 328 $\pm$ 6.4  | 321 $\pm$ 9.8    | 339 $\pm$ 11.3   |



**FIGURE 7. Aggregation properties of 3rJL2 and 3mJL2 predicted from their amino acid sequences.** Four regions with intrinsic aggregation propensity were identified on the  $\lambda$ 3 sequences using the TANGO, PASTA, and Aggrescan servers. Only the representative TANGO prediction profiles are shown. The regions are identified with letters in the 3rJL2 profile as *a* (residues 32–37), *b* (residues 44–50), *c* (residues 70–76), and *d* (residues 93–100). Region *b*, which includes strand C', has the highest aggregation score. The replacement of Ile-48 by Pro or Met diminished or eliminated the aggregation score, respectively. The fibril extension rate of mutant 3rJL2/YA/I48M was slower than that of 3rJL2/YA, confirming the importance of position 48 in  $\beta$ -sheet aggregation. Surprisingly, there were no predicted aggregation regions in the 6aJL2 sequence.

3mJL2 and the proteins derived from the 3r germ line were continually stirred to induce fibril formation. The fibril formation kinetics is illustrated in Fig. 8A. 3mJL2 and 3rJL2/Y samples did not show any change in ThT fluorescence after 70 h (Fig. 8A). These protein samples only became slightly turbid as the experiment progressed. The transmission electron micrographs showed the presence of amorphous deposits but no amyloid fibrils (data not shown). This is in agreement with the thermodynamic data, which indicate that both 3mJL2 and 3rJL2/Y are stable variable domains. Although the 3rJL2/YA and 3rJL2/YA/I48M mutants are borderline stable, they formed fibrils, as indicated by the significant increase in ThT fluorescence after 10 h of stirring (Fig. 8A). The 3rJL2/YA and 3rJL2/YA/I48M mutant fibril formation kinetics showed slightly

different nucleation times ( $t_{lag}$ ) and growth rates. 3rJL2/YA displayed a  $t_{lag}$  of 11.25 h and required 40 h for fiber extension. 3rJL2/YA/I48M showed a  $t_{lag}$  of 11.74 h and required a longer time for fiber extension (56 h). 3rJL2/YA and 3rJL2/YA/I48M showed similar growth rates, with a tendency of 3rJL2/YA/I48M to form fewer fibers with slower kinetics (Table 2).

3rJL2/YA/P8S and 3rJL2/YA/P40S did not form fibrils despite being marginally less stable than their parental protein (Fig. 8A). The transmission electron microscopy of 3rJL2/YA samples after fiber formation confirmed the presence of thin, unbranched, individual fibrils, and amorphous aggregates (Fig. 8B). 3rJL2/YA/P7D fibers appeared to be long and slightly curved, which is an unusual morphological feature. Smooth

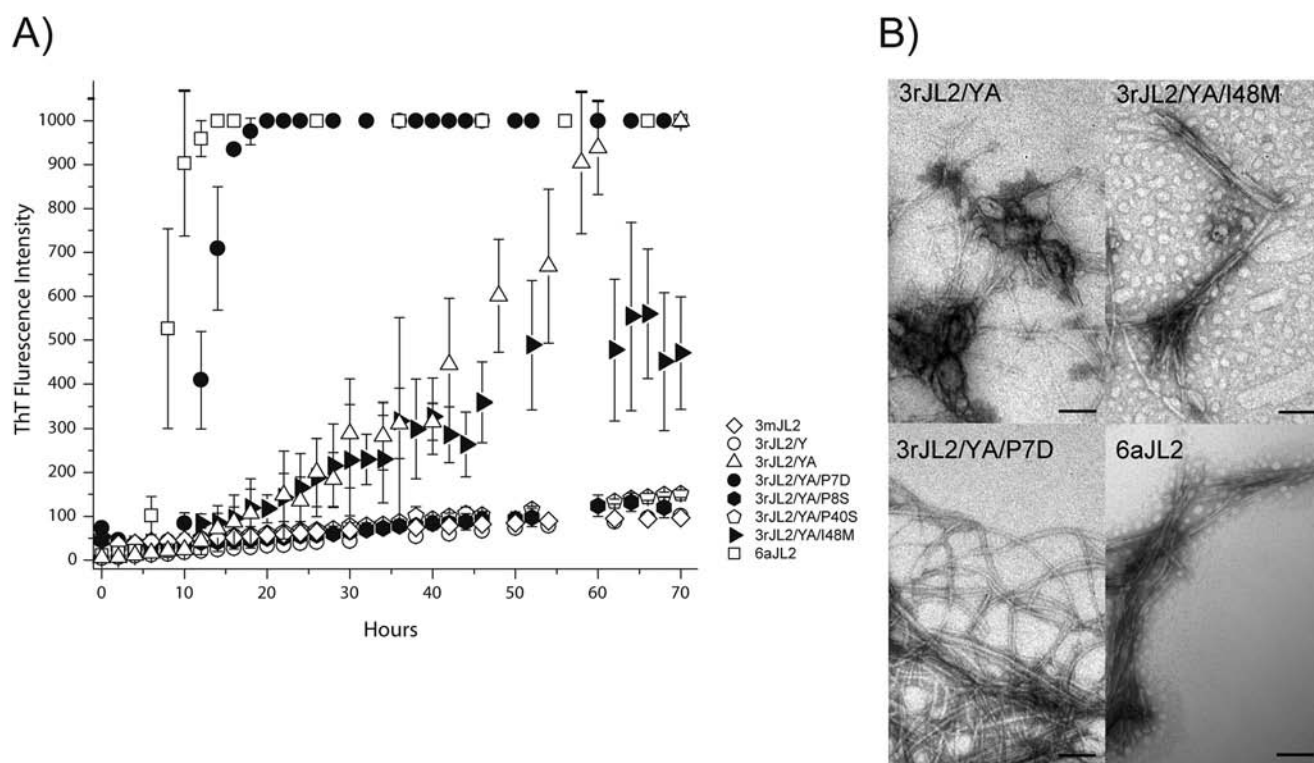


FIGURE 8. **Fibrillogenesis *in vitro*.** *A*, kinetics of the *in vitro* fibrillogenesis of  $\lambda 3$  proteins. The 3rJL2/YA, 3rJL2/YA/I48M, and 3rJL2/YA/P7D mutants present different lag phase ( $t_{lag}$ ) and fiber extension times. In contrast, 3rJL2/Y, 3rJL2/YA/P8S, 3rJL2/YA/P40S, and 3mJL2 did not form fibrils. The 6aJL2 protein formed fibrils under the conditions assayed at a similar rate as 3rJL2/YA/P7D. Samples containing 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  protein were incubated in PBS at 37  $^{\circ}\text{C}$  under continuous stirring. Fibril formation was monitored by changes in the thioflavin T fluorescence. The error bars represent the standard deviations from three independent experiments. *B*, transmission electron microscopy analysis of fibrils. TEM images of 3rJL2/YA, 3rJL2/YA/I48M, 3rJL2/YA/P7D, and 6aJL2 display the typical morphology. The samples were collected from *in vitro* fibrillogenesis experiments (see "Materials and Methods"). The black bars indicate 100 nm.

bundles containing two to four well defined fibrils were easily observed in this preparation (Fig. 8B). This mutant was the least stable with a  $t_{lag}$  of 9.2 h and a fibril formation plateau at  $\sim 20$  h (Table 2 and Fig. 8A). In the 3rJL2/YA/I48M mutant, there were fewer fibrils compared with the amorphous deposits, but the fibrils were organized as wide, rod-like bundles containing several linear fibrils (Fig. 8B). 6aJL2 also formed fibrils under the same conditions (Fig. 8B). According to the kinetics of fibrillogenesis, 3rJL2/YA/P7D and 6aJL2 have similar extension times of  $\sim 10$  and 8 h, respectively, but the nucleation time of 6aJL2 is faster than that of 3rJL2/YA/P7D (5.17 and 9.24 h, respectively) (Fig. 8A and Table 2). In addition, 6aJL2 had a faster growth rate (Table 2).

## DISCUSSION

To the best of our knowledge, this work provides the first biophysical characterization of a  $\lambda 3$  germ line and  $\lambda 3$  germ line-derived mutant proteins. Our initial hypothesis postulated that the high association of the  $\lambda 3r$  germ line with AL is due to the intrinsic thermodynamic instability of the corresponding light chain. Thermodynamically, 3rJL2/Y and 3rJL2/YA should be as stable as 3mJL2, a model protein that corresponds to a nonamyloid  $\lambda 3$  germ line (Table 2). We expected that 3rJL2/Y would form fibrils *in vitro* because 3r is among the germ lines most frequently associated with AL (6). However, we did not find any fibrils in the recombinant protein sample (data not shown). The relatively high stability of 3rJL2/Y may be attributed to the new interactions formed by residue Tyr-34 (Table 2

and Fig. 4D), which may have also increased the expression level of the protein. However, these results did not directly answer whether the 3r germ line is intrinsically amyloidogenic.

Although 3mJL2, 3rJL2/Y, and 3rJL2/YA share similar thermodynamic properties, 3rJL2/YA was the only mutant that formed fibrils *in vitro*. Structural comparisons indicate that the W91A mutation in 3rJL2/YA decreased its hydrophobic interactions compared with the other  $\lambda 3$  structures (Table 3). The results indicate that mutations at positions Cys-34 and Trp-91 had opposite effects in the 3rJL2 derivatives. The mutation in position 34 may have reinforced the interactions among the  $\beta$ -strands C, F, and G, resulting in a more stable domain. The second mutation, in position 91, may have diminished these interactions rendering a less stable variant and more prone to fibril aggregation (Fig. 4D).

The analysis of the triple mutants revealed the critical role of Pro-7 and Ile-48 on the stability and fibril formation of the 3r domain. Our results suggest a relationship between cooperativity and fiber formation, with  $m$  and  $\Delta H$  being key parameters that inhibit fibrillogenesis. A previous report stated that the sheet switch at the N terminus of the light chains may impede and edge strand-mediated aggregation (8). The 3rJL2/YA/P7D mutant was less thermodynamically stable than 3rJL2/YA. The decrease in the stability of mutant 3rJL2/YA/P7D is comparable with the decrease in that of mutant 6aJL2/P7S (13). The P8S mutation, despite causing a much lower effect on the stability of 3rJL2/YA/P8S, abolished fibril formation (Table 2). These



## Biophysical Characterization of $\lambda 3$ Germ Lines

results suggest that Pro-8 is important for fibril formation. The analysis of the 6aJL2-derived mutants P7S and H8P and the double mutant P7S/H8P revealed that only the mutation in position 7 decreased the stability of the protein (13). Our results confirm that position 7 contributes to the protective role of the N terminus of the germ lines 3r and 6a. The protective effect of the sheet switch against fiber formation may depend on the combinatorial amino acid sequence of residues 7 and 8. Furthermore, the similar features observed in the mutants studied in the context of the 6a and 3r scaffolds suggest that the protective role of the  $\beta$ -bulge of  $\beta$ -strand A (sheet switch) against fibril formation may be conserved in the  $\lambda$  family.

The substitution of residue Pro-40, located in the loop that connects  $\beta$ -strands C and C', has been associated with amyloidosis in several  $\kappa$  light chains, including BRE, ARN, WR, and MCG. In these proteins, the Pro-40 mutation enhanced their fibril formation capacity (53). The 3rJL2/YA/P40S mutant did not exhibit a significant change in stability compared with the double mutant. A plausible explanation can be that residue Pro-40 only establishes stabilizing interactions through the peptide backbone (Table 3). Unexpectedly, this mutant did not form fibrils like the 3rJL2/YA/P8S mutant.

As previously mentioned, the Ile-48 residue is conserved in  $\lambda$  families 3 and 6. The decreased thermodynamic stability of the 3rJL2/YA/I48M mutant is likely related to the presence of the bulky methionine side chain, which may decrease the rate of the fiber formation process without completely inhibiting it. It is likely that the methionine residue induced a structural rearrangement between strands C and C', decreasing the self-complementation between the  $\beta$ -sheets and restricting the correct coupling of the monomers during fiber extension. In summary, position 48 seems to be important for maintaining the stability of the light chain and, when disrupted, favors fiber formation.

Our analysis of the 3rJL2/YA/P40S and 3rJL2/YA/I48M mutants indicates that loop 40–60, which connects the two  $\beta$ -sheets, contributes to fibril formation when the protein is destabilized. The protection of loop 40–60 is associated with the canonical  $V_H$ - $V_L$  interaction, which limits its exposure (Fig. 4E).

Importantly, although region 40–60 in germ lines 3m and 3r presented a high  $\beta$ -aggregation profile score, the same region in germ line 6a had a low score (Fig. 7). 6a differs from germ lines 3r and 3m in only three residues at this region (Fig. 1). Consistent with these observations, minimal changes in the loop 40–60 are likely to modify its aggregation profile.

To the best of our knowledge, light chain dimerization has been reported only in proteins isolated from patients, such as the Bence-Jones proteins. Baden *et al.* (28) reported that the monomeric form of germ line  $\kappa$ IO18/O8 is more stable than its dimeric form, and the opposite occurs for its amyloidogenic counterpart AL-09, *i.e.* the dimer of this protein is more stable than the monomer (28). The calculated interface areas of the native dimers in the  $\lambda 3$  crystallographic structures are very similar to the  $V_H$ - $V_L$  and  $V_L$ - $V_L$  interfaces of several other antibodies (Table 4). These observations led us to assess the presence of dimers in the 3mJL2, 3rJL2/C34Y, 3rJL2/YA, and 6aJL2 proteins through various methods. Our results indicated that the variable domains are mainly monomeric at the protein concen-

trations tested. It is possible that the  $\lambda 3$  germ line proteins exist mainly as monomers, similarly to  $\kappa$ IO18/O8. This is in contrast to the variable domains isolated from patients with AL, in which both monomers and dimers are present (28). Those variable domains contain several mutations at different regions of the interface, favoring the  $V_L$ - $V_L$  interaction. Additionally, the complete light chain or the variable domain plus a fragment of the constant region may also promote  $V_L$ - $V_L$  interactions leading to dimerization.

In summary, our data indicate that the 3m germ line is relatively stable and did not form fibrils *in vitro*. This is in agreement with the very low percentage (2%) of 3m-derived proteins in reported AL cases (6). Before a light chain acquires its fibrillogenic potential, it has to accumulate destabilizing mutations to generate new molecular interactions favoring fibril aggregation under micro-environmental conditions, such as pH, temperature, and high local urea concentrations. In the mutants derived from 3r germ line, we identified residues that affect the stability of the protein, influence fiber formation, and alter their anti-aggregation properties, similarly to previously reported mutants (13, 28, 51).

The 6a and 3r germ lines show low polyclonal expression in B lymphocytes (2 and 8%, respectively). The percentage of AL cases in which 6a is the germ line donor gene precursor can reach up to 40%. Although 3r is expressed at a 4-fold higher level than 6a, the percentage of cases with 3r as the donor gene precursor hardly reaches 20% (6). The differences in polyclonal expression levels, stability, and fibril nucleation times and the differential gain or loss of particular interactions between  $\lambda 6$  and  $\lambda 3$  light chains mutants may explain the different “aggressiveness” of these two  $\lambda$  light chain families, of which 6a is the most pathogenic.

The characterization of other germ lines will lead to a more complete understanding of how changes in the original sequence of a light chain domain can modify its protective effect against aggregation. Determining how a germ line domain gives rise to amyloidogenic variants will allow us to understand why certain light chain subfamilies are highly implicated in AL and to develop new therapeutic strategies.

---

*Acknowledgments*—We are also grateful to the staff at National Synchrotron Light Source at Brookhaven National Laboratory Beamline X6A, particularly Dr. Vivian Stojanoff and Dr. Jean Jakoncic, for providing data collection facilities. We are grateful to Monica Patricia Mejia-Lopez, Leopoldo Güereca, Fernando Zamudio, and Edgar Reyna Rosas for the technical assistance provided and to Lorenzo Segovia for the critical comments and advice given. We thank Santiago Becerra, Eugenio Bustos, and Paul Gaytán from the Unidad de Síntesis y Secuenciación de Macromoléculas Instituto de Biotecnología. We are greatly indebted to Dr. Ricardo Canek Rodríguez de la Vega for the critical reading of the manuscript and substantial comments, which notably improved this manuscript.

---

## REFERENCES

1. Sacchettini, J. C., and Kelly, J. W. (2002) Therapeutic strategies for human amyloid diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* **1**, 267–275
2. Chiti, F., and Dobson, C. M. (2006) Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* **75**, 333–366

3. Obici, L., Perfetti, V., Palladini, G., Moratti, R., and Merlini, G. (2005) Clinical aspects of systemic amyloid diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1753**, 11–22
4. Soto, C. (2001) Protein misfolding and disease; protein refolding and therapy. *FEBS Lett.* **498**, 204–207
5. Comenzo, R. L., Zhang, Y., Martinez, C., Osman, K., and 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**, 714–720
6. Perfetti, V., Casarini, S., Palladini, G., Vignarelli, M. C., Klersy, C., Diegoli, M., Ascari, E., and Merlini, G. (2002) Analysis of  $\text{V}\lambda\text{-J}\lambda$  expression in plasma cells from primary (AL) amyloidosis and normal bone marrow identifies 3r (AIII) as a new amyloid-associated germ line gene segment. *Blood* **100**, 948–953
7. Merlini, G., and Stone, M. J. (2006) Dangerous small B-cell clones. *Blood* **108**, 2520–2530
8. Richardson, J. S., and Richardson, D. C. (2002) Natural  $\beta$ -sheet proteins use negative design to avoid edge-to-edge aggregation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 2754–2759
9. Bellotti, V., Mangione, P., and Merlini, G. (2000) Immunoglobulin light chain amyloidosis: the archetype of structural and pathogenic variability. *J. Struct. Biol.* **130**, 280–289
10. Müller, A. M., Geibel, A., Neumann, H. P., Kühnemund, A., Schmitt-Gräff, A., Böhm, J., and Engelhardt, M. (2006) Primary (AL) amyloidosis in plasma cell disorders. *The Oncologist* **11**, 824–830
11. Olsen, K. E., Sletten, K., and Westermark, P. (1998) Extended analysis of AL-amyloid protein from abdominal wall subcutaneous fat biopsy:  $\kappa\text{IV}$  immunoglobulin light chain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **245**, 713–716
12. Poshusta, T. L., Sikkink, L. A., Leung, N., Clark, R. J., Dispenzieri, A., and Ramirez-Alvarado, M. (2009) Mutations in specific structural regions of immunoglobulin light chains are associated with free light chain levels in patients with AL amyloidosis. *PLoS One* **4**, e5169
13. Hernández-Santoyo, A., del Pozo Yauner, L., Fuentes-Silva, D., Ortiz, E., Rudiño-Piñera, E., Sánchez-López, R., Horjales, E., Becerril, B., and Rodríguez-Romero, A. (2010) A single mutation at the sheet switch region results in conformational changes favoring  $\lambda 6$  light-chain fibrillogenesis. *J. Mol. Biol.* **396**, 280–292
14. Stevens, P. W., Raffin, R., Hanson, D. K., Deng, Y. L., Berrios-Hammond, M., Westholm, F. A., Murphy, C., Eulitz, M., Wetzel, R., and Solomon, A. (1995) Recombinant immunoglobulin variable domains generated from synthetic genes provide a system for in vitro characterization of light-chain amyloid proteins. *Protein Sci.* **4**, 421–432
15. Randles, E. G., Thompson, J. R., Martin, D. J., and Ramirez-Alvarado, M. (2009) Structural alterations within native amyloidogenic immunoglobulin light chains. *J. Mol. Biol.* **389**, 199–210
16. Baden, E. M., Randles, E. G., Aboagye, A. K., Thompson, J. R., and Ramirez-Alvarado, M. (2008) Structural insights into the role of mutations in amyloidogenesis. *J. Biol. Chem.* **283**, 30950–30956
17. Hurler, M. R., Helms, L. R., Li, L., Chan, W., and Wetzel, R. (1994) A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 5446–5450
18. Wall, J., Schell, M., Murphy, C., Hrcncic, R., Stevens, F. J., and Solomon, A. (1999) Thermodynamic instability of human  $\lambda 6$  light chains: correlation with fibrillogenicity. *Biochemistry* **38**, 14101–14108
19. Abe, M., Goto, T., Kosaka, M., Wolfenbarger, D., Weiss, D. T., and Solomon, A. (1998) Differences in kappa to lambda ( $\kappa\text{:}\lambda$ ) ratios of serum and urinary free light chains. *Clin. Exp. Immunol.* **111**, 457–462
20. Farner, N. L., Dörner, T., and Lipsky, P. E. (1999) Molecular mechanisms and selection influence the generation of the human V lambda J lambda repertoire. *J. Immunol.* **162**, 2137–2145
21. Abraham, R. S., Geyer, S. M., Price-Troska, T. L., Allmer, C., Kyle, R. A., Gertz, M. A., and 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
22. del Pozo Yauner, L., Ortiz, E., Sánchez, R., Sánchez-López, R., Güereca, L., Murphy, C. L., Allen, A., Wall, J. S., Fernández-Velasco, D. A., Solomon, A., and Becerril, B. (2008) Influence of the germ line sequence on the thermodynamic stability and fibrillogenicity of human  $\lambda 6$  light chains. *Proteins* **72**, 684–692
23. Williams, S. C., Fripiat, J. P., Tomlinson, I. M., Ignatovich, O., Lefranc, M. P., and Winter, G. (1996) Sequence and evolution of the human germ line V lambda repertoire. *J. Mol. Biol.* **264**, 220–232
24. Huang, D. B., Ainsworth, C., Solomon, A., and Schiffer, M. (1996) Pitfalls of molecular replacement: the structure determination of an immunoglobulin light-chain dimer. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **52**, 1058–1066
25. Lopez de Castro, J. A., Chiu, Y. Y., and Poljak, R. J. (1978) Amino acid sequence of the variable region of the light ( $\lambda$ ) chain from human myeloma cryoimmunoglobulin IgG Hil. *Biochemistry* **17**, 1718–1723
26. Sikkink, L. A., and Ramirez-Alvarado, M. (2008) Biochemical and aggregation analysis of Bence Jones proteins from different light chain diseases. *Amyloid* **15**, 29–39
27. Blancas-Mejia, L. M., Tellez, L. A., del Pozo-Yauner, L., Becerril, B., Sanchez-Ruiz, J. M., and Fernandez-Velasco, D. A. (2009) Thermodynamic and kinetic characterization of a germ line human  $\lambda 6$  light-chain protein: the relation between unfolding and fibrillogenesis. *J. Mol. Biol.* **386**, 1153–1166
28. Baden, E. M., Owen, B. A., Peterson, F. C., Volkman, B. F., Ramirez-Alvarado, M., and Thompson, J. R. (2008) Altered dimer interface decreases stability in an amyloidogenic protein. *J. Biol. Chem.* **283**, 15853–15860
29. Prodromou, C., and Pearl, L. H. (1992) Recursive PCR: a novel technique for total gene synthesis. *Protein Eng.* **5**, 827–829
30. Marks, J. D., Hoogenboom, H. R., Bonnert, T. P., McCafferty, J., Griffiths, A. D., and Winter, G. (1991) By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J. Mol. Biol.* **222**, 581–597
31. Pace, C. N., Shirley, B. A., and Thompson, J. A. (1989) Measuring the conformational stability of a protein. In *Protein Structure: A Practical Approach* (Creighton, T. E., ed) pp. 311–330, IRL Press, Oxford, UK
32. Milardi, D., la Rosa, C., Fasone, S., and Grasso, D. (1997) An alternative approach in the structure-based predictions of the thermodynamics of protein unfolding. *Biophys. Chem.* **69**, 43–51
33. Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M., and Takeda, T. (1989) Fluorometric determination of amyloid fibrils *in vitro* using the fluorescent dye, thioflavin T1. *Anal. Biochem.* **177**, 244–249
34. Wall, J., Murphy, C. L., and Solomon, A. (1999) *In vitro* immunoglobulin light chain fibrillogenesis. *Methods Enzymol.* **309**, 204–217
35. Leslie, A. G. (2006) The integration of macromolecular diffraction data. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62**, 48–57
36. Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 125–132
37. Evans, P. (2006) Scaling and assessment of data quality. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **62**, 72–82
38. McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., and Read, R. J. (2007) Phaser crystallographic software. *J. Appl. Crystallogr.* **40**, 658–674
39. Murshudov, G. N., Vagin, A. A., and Dodson, E. J. (1997) Refinement of macromolecular structures by the maximum-likelihood method. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **53**, 240–255
40. Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L. W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C., and Zwart, P. H. (2010) PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **66**, 213–221
41. Emsley, P., and Cowtan, K. (2004) Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **60**, 2126–2132
42. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W., Moss, D. S., and Thornton, J. M. (1993) PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr.* **26**, 283–291
43. Bernstein, F. C., Koetzle, T. F., Williams, G. J., Meyer, E. F., Jr., Brice, M. D., Rodgers, J. R., Kennard, O., Shimanouchi, T., and Tasumi, M. (1977) The Protein Data Bank: a computer-based archival file for macromolecular structures. *J. Mol. Biol.* **112**, 535–542
44. Stevens, F. J., and Schiffer, M. (1995) Structure and properties of human immunoglobulin light-chain dimers. *Methods Mol. Biol.* **51**, 51–81
45. Qin, Z., Hu, D., Zhu, M., and Fink, A. L. (2007) Structural characterization



## Biophysical Characterization of $\lambda$ 3 Germ Lines

- of the partially folded intermediates of an immunoglobulin light chain leading to amyloid fibrillation and amorphous aggregation. *Biochemistry* **46**, 3521–3531
46. Krissinel, E., and Henrick, K. (2007) Inference of macromolecular assemblies from crystalline state. *J. Mol. Biol.* **372**, 774–797
47. Nowak, M. (2004) Immunoglobulin kappa light chain and its amyloidogenic mutants: a molecular dynamics study. *Proteins* **55**, 11–21
48. Fernandez-Escamilla, A. M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., and Serrano, L. (2004) Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nat. Biotechnol.* **22**, 1302–1306
49. Trovato, A., Chiti, F., Maritan, A., and Seno, F. (2006) Insight into the structure of amyloid fibrils from the analysis of globular proteins. *PLoS Comput. Biol.* **2**, e170
50. Conchillo-Solé, O., de Groot, N. S., Avilés, F. X., Vendrell, J., Daura, X., and Ventura, S. (2007) AGGRESCAN: a server for the prediction and evaluation of “hot spots” of aggregation in polypeptides. *BMC Bioinformatics* **8**, 65
51. Wall, J. S., Gupta, V., Wilkerson, M., Schell, M., Loris, R., Adams, P., Solomon, A., Stevens, F., and Dealwis, C. (2004) Structural basis of light chain amyloidogenicity: comparison of the thermodynamic properties, fibrillogenic potential and tertiary structural features of four  $\lambda$ 6 proteins. *J. Mol. Recognit.* **17**, 323–331
52. Jarrett, J. T., Berger, E. P., and Lansbury, P. T., Jr. (1993) The carboxy terminus of the  $\beta$  amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **32**, 4693–4697
53. Dealwis, C., and Wall, J. (2004) Towards understanding the structure-function relationship of human amyloid disease. *Curr. Drug Targets* **5**, 159–171
54. Bond, C. S., and Schüttelkopf, A. W. (2009) ALINE: a WYSIWYG protein-sequence alignment editor for publication-quality alignments. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* **65**, 510–512
55. Tina, K. G., Bhadra, R., and Srinivasan, N. (2007) PIC: protein interactions calculator. *Nucleic Acids Research* **35**, W473–W476

VOLUME 290 (2015) PAGES 2577–2592

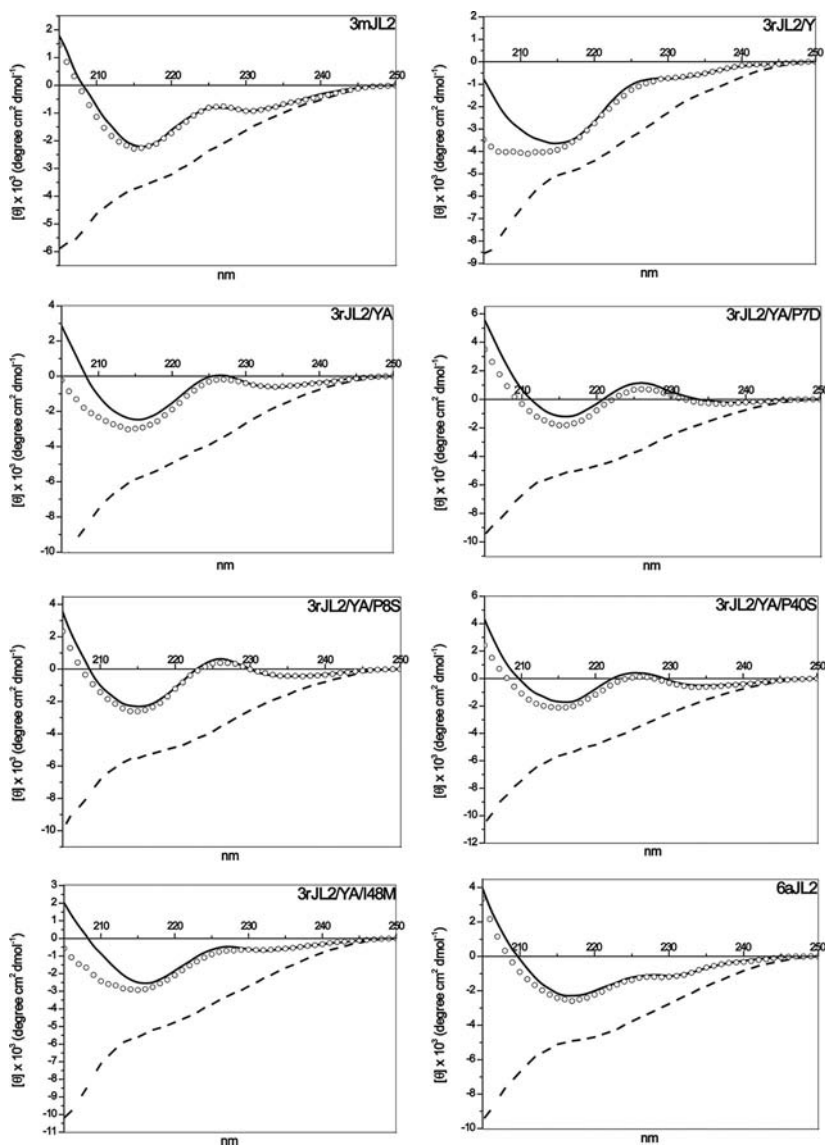
DOI 10.1074/jbc.A114.629550

## Site-directed mutagenesis reveals regions implicated in the stability and fiber formation of human $\lambda$ 3r light chains.

Miryam I. Villalba, Juan C. Canul-Tec, Oscar D. Luna-Martínez, Rosalba Sánchez-Alcalá, Timoteo Olamendi-Portugal, Enrique Rudiño-Piñera, Sonja Rojas, Rosana Sánchez-López, Daniel A. Fernández-Velasco, and Baltazar Becerril

PAGE 2583:

The method used to calculate the molar ellipticity of  $\lambda$  light chains at different temperatures from far UV CD spectra shown in Fig. 3 was incorrect. The calculations have now been performed correctly using the formula taken from Greenfield, N. J. (2006) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Protoc.* **1**, 2876–2890 with  $[\theta] = \text{millideg}/(\text{path length in millimeters} \times \text{the molar concentration of protein} \times \text{the number of residues})$ . This correction does not affect the interpretation of the results or the conclusions of this work.



Authors are urged to introduce these corrections into any reprints they distribute. Secondary (abstract) services are urged to carry notice of these corrections as prominently as they carried the original abstracts.

**Protein Structure and Folding:  
Site-directed Mutagenesis Reveals Regions  
Implicated in the Stability and Fiber  
Formation of Human  $\lambda$ 3r Light Chains**

Miryam I. Villalba, Juan C. Canul-Tec, Oscar  
D. Luna-Martínez, Rosalba Sánchez-Alcalá,  
Timoteo Olamendi-Portugal, Enrique  
Rudiño-Piñera, Sonia Rojas, Rosana  
Sánchez-López, Daniel A. Fernández-Velasco  
and Baltazar Becerril

*J. Biol. Chem.* 2015, 290:2577-2592.

doi: 10.1074/jbc.M114.629550 originally published online December 11, 2014

PROTEIN STRUCTURE  
AND FOLDING

MOLECULAR BASES  
OF DISEASE

Access the most updated version of this article at doi: [10.1074/jbc.M114.629550](https://doi.org/10.1074/jbc.M114.629550)

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](#).

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 54 references, 12 of which can be accessed free at  
<http://www.jbc.org/content/290/5/2577.full.html#ref-list-1>

VOLUME 290 (2015) PAGES 2577–2592

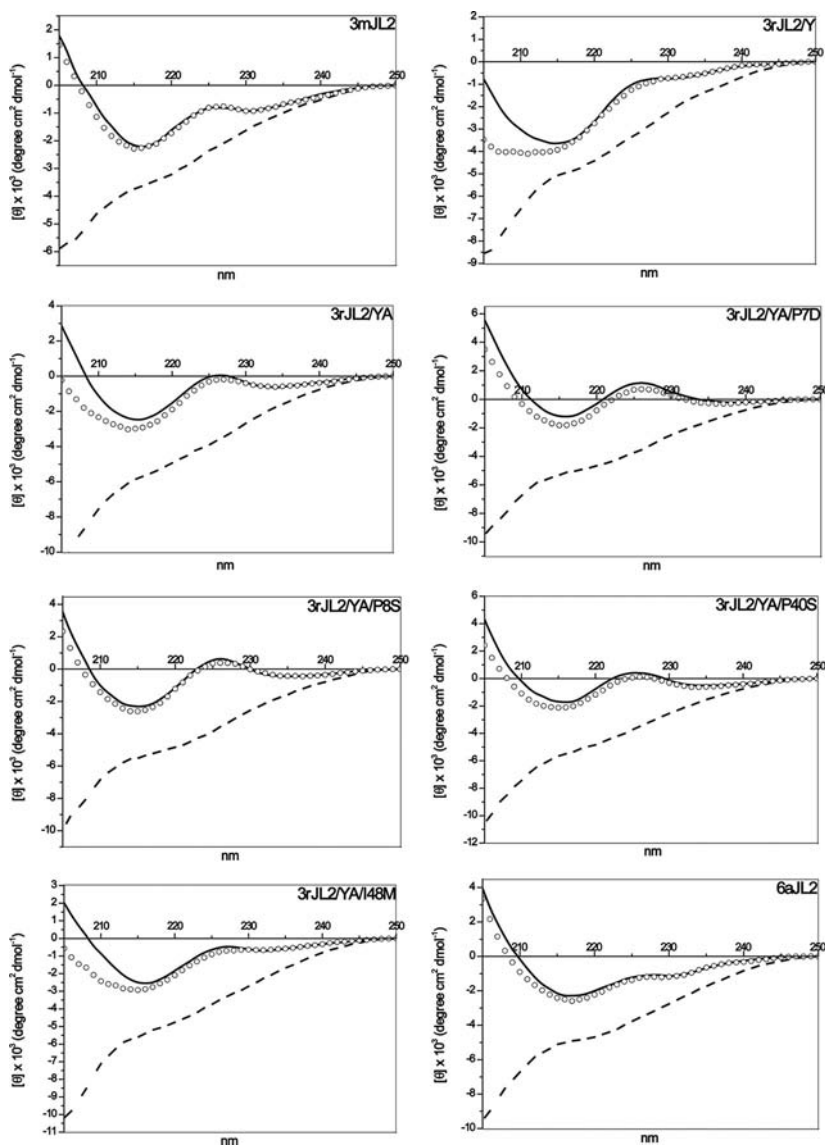
DOI 10.1074/jbc.A114.629550

## Site-directed mutagenesis reveals regions implicated in the stability and fiber formation of human $\lambda$ 3r light chains.

Miryam I. Villalba, Juan C. Canul-Tec, Oscar D. Luna-Martínez, Rosalba Sánchez-Alcalá, Timoteo Olamendi-Portugal, Enrique Rudiño-Piñera, Sonja Rojas, Rosana Sánchez-López, Daniel A. Fernández-Velasco, and Baltazar Becerril

PAGE 2583:

The method used to calculate the molar ellipticity of  $\lambda$  light chains at different temperatures from far UV CD spectra shown in Fig. 3 was incorrect. The calculations have now been performed correctly using the formula taken from Greenfield, N. J. (2006) Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat. Protoc.* **1**, 2876–2890 with  $[\theta] = \text{millideg}/(\text{path length in millimeters} \times \text{the molar concentration of protein} \times \text{the number of residues})$ . This correction does not affect the interpretation of the results or the conclusions of this work.



Authors are urged to introduce these corrections into any reprints they distribute. Secondary (abstract) services are urged to carry notice of these corrections as prominently as they carried the original abstracts.

**Additions and Corrections:**

**Site-directed mutagenesis reveals regions implicated in the stability and fiber formation of human  $\lambda 3r$  light chains.**

Miryam I. Villalba, Juan C. Canul-Tec, Oscar D. Luna-Martínez, Rosalba Sánchez-Alcalá, Timoteo Olamendi-Portugal, Enrique Rudiño-Piñera, Sonja Rojas, Rosana Sánchez-López, Daniel A. Fernández-Velasco and Baltazar Becerril  
*J. Biol. Chem.* 2015, 290:13039.  
doi: 10.1074/jbc.A114.629550

Access the most updated version of this article at <http://www.jbc.org/content/290/21/13039>

Find articles, minireviews, Reflections and Classics on similar topics on the [JBC Affinity Sites](#).

Alerts:

- [When this article is cited](#)
- [When a correction for this article is posted](#)

[Click here](#) to choose from all of JBC's e-mail alerts

This article cites 0 references, 0 of which can be accessed free at <http://www.jbc.org/content/290/21/13039.full.html#ref-list-1>