



**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Departamento de Bioquímica i Biología Molecular**

**Obtención de un fragmento de anticuerpo específico contra oligómeros de A $\beta$  como agente inmunoterapéutico de la enfermedad de Alzheimer: demostración de su eficacia en el modelo murino 3xTg-AD y mejora de su estabilidad termodinámica**

**Geovanny Rivera Hernández**

**Diciembre 2013**





**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Departamento de Bioquímica i Biología Molecular**

**Obtención de un fragmento de anticuerpo específico contra oligómeros de A $\beta$  como agente inmunoterapéutico de la enfermedad de Alzheimer: demostración de su eficacia en el modelo murino 3xTg-AD y mejora de su estabilidad termodinámica**

**Memoria presentada por Geovanny Rivera Hernández para optar al grado de Doctor en Bioquímica, Biología Molecular i Biomedicina**

**Trabajo realizado en la Unidad de Biociencias del Departamento de Bioquímica i Biología Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona, bajo la dirección de la Dra. Sandra Villegas Hernández**

**Geovanny Rivera Hernández**

**Dra. Sandra Villegas Hernández**

**Bellaterra, Diciembre del 2013**



## AGRADECIMIENTOS

Mi más sincero agradecimiento para la Dra. Sandra Villegas por brindarme la oportunidad de formar parte del naciente grupo *Protein Folding and Stability*, por la paciencia, por ficharme desde lejos sin conocerme, por mostrarte siempre sincera y amiga, por las celebraciones y los cabreos, por los “TE MATO”, por cambiar de alguna forma mi mundo con el llamado que hiciste desde aquel 11 de diciembre del 2007; porque apesar del tiempo y lo lejos que pueda resultar escribir en México, sé que si no tiré la toalla es porque de alguna forma estabas ahí esperando que terminara con tu paciencia infinita y el siempre apoyo en los momentos donde uno quiere tirarse de un piso! Sandra... Vencimos!!!

A mi camarada Marta, más que agradecer, reconocer su trabajo que materializamos en esta tesis. Marta sabes que la mitad de esto te corresponde!! Por todos los días juntos, siempre fue un placer trabajar codo a codo, alegrándonos por los éxitos y machacarnos por las cosas que no salían, un placer que hayas formado parte de mi vida, de esa que recuerdo como la mejor que pueda vivir un tipo salido de un Chiapas sin maquinas mágicas que expendan comida, jajajaja. De alguna forma estas en mi vida, en la defensa de la tesis y en mi familia, te espero con la minivan rumbo a la Patagonia. Gracias Marta!, no sabes cuánto! Vencimos camarada!

Al joven Bernat, jajajaja, que con tu presencia le diste un toque y alegría al laboratorio, activaste muchas cosas entre ellas el optimismo de que las cosas saldrían! Sabes que parte de esto, también es tuyo, compartimos esta alegría de formar parte de un gran equipo, muchas gracias!

A la Rita, por los cafés, los *pitís*, las alegrías y hasta los momentos de incertidumbre que todo buen doctorando pasa, jajajaja, verte transformar en una persona más fluida es una inspiración para mi, muchas gracias Ritus!

A la Paula, la chica del huerto y las mil cosas por hacer, tu exceso de energía me ha hecho pensar que siempre hay cosas en esta vida por hacer, gracias por la adopción, jajajaja.

A don David, Pulidopedia, jajajaja, ahora sé cómo debe ser un verdadero hombre!, jajajaja, un manresano de a verdad, casi un chiapaneco,jajaja.

A Gise, Laia mis mejores deseos con la segunda temporada de scFv-h3D6, seguro disfrutaran de esta molécula tanto como nosotros, jajajaja, muchas gracias por el tiempo compartido, sé que PFs queda en muy buenas manos.

Al Dr. Mohamed que siempre estuvo presente para apoyarnos y asesorarnos de la manera más atenta, así como, por realizarnos los análisis de RP-HPLC, muchas gracias!

A Silvia Bromsons (IBB) por su eficiencia y profesionalidad en los servicios de Proteómica que nos brinda.

A Salvador Bartolomé por la asesoría técnica en el uso de los equipos (por no castrarme, jajajaja), a Helena, Jordi por tener una mano solidaria.

A Lourdes, muchas gracias por tu amabilidad y disponibilidad en el laboratorio.

A los Kinasicos (Ton y Papito) por ser siempre tan solidarios, a todos aquellos que con un saludo o una sonrisa hacen amena la estancia en esta nuestra segunda casa (Xabí, Armando, Virginia, Laia, Roberto, Jordi, Chipi, Mar, Maria, etc, etc).

A los chicos Erasmus: Francesco, Phili, Giulia, Sandra, Paulo, etc, por su agradable compañía.

A la UAB que desde ahora se convierte en mi casa de estudios y por supuesto a la Fundación MAEC-AECI por proporcionarme la ayuda económica para la realización de estos estudios.

Y por supuesto, agradecer a mi familia, por aguantar las distancias y la mesita de madera que me dieron para escribir la tesis,jajajaja. Los quiero!

## ÍNDICE





## INDICE GENERAL

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	vi
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b> .....	vi
<b>ABREVIATURAS</b> .....	ix
<b>RESUMEN</b> .....	xii
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. Plegamiento de proteínas .....	3
1.1. Estructuras que estabilizan el plegamiento .....	3
1.2. Teorías sobre el plegamiento .....	5
1.3. Plegamiento in vivo .....	8
12. Enfermedades conformacionales .....	10
12.1. Características generales de las fibras amiloides .....	11
12.2. Amiloidosis: características generales .....	13
13. Alzheimer .....	15
13.1. Fisiopatología y anatomopatología de Alzheimer (AD) .....	15
13.2. Etiología de la enfermedad .....	16
13.3. Modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer .....	18
14. Inmunoterapia .....	21
14.1. Inmunización activa .....	21
14.2. Inmunización pasiva .....	22
15. Anticuerpos .....	24
15.1. Ingeniería de anticuerpos .....	25
15.2. Anticuerpos humanizados .....	27
15.3. ScFv ( <i>Single-chain variable Fragment</i> ) .....	29
15.3.1. Modelo tridimensional del scFv-h3D6 .....	33
<b>OBJETIVOS</b> .....	37
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	39
M1. Técnicas de DNA recombinante .....	41
M1.1. Extracción de DNA plasmídico .....	41
M1.2. Cuantificación de DNA plasmídico .....	41
M1.3. Digestión de DNA con enzimas de restricción .....	41
M1.4. Electroforesis en gel de agarosa .....	44
M1.5. Purificación de DNA procedente de bandas de agarosa .....	44
M1.6. Reacción de ligación .....	44
M1.7. Mutagénesis sitio dirigida por PCR .....	45
M1.8. Secuenciación de DNA .....	45
M1.9. Introducción de DNA foráneo a células bacterianas .....	46
M1.9.1. Obtención de células competentes de <i>E. coli</i> .....	46
M1.9.2. Transformación .....	47
M2. Sistemas de expresión y purificación .....	47
M2.1. Organismos .....	47
M2.1.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> .....	49
M2.1.2. Conservación de cepas bacterianas .....	49
M2.2. Medios de cultivos de bacterias .....	49
M2.2.1. Medio líquido .....	49
M2.2.2. Medio sólido .....	50
M2.2.3. Antibióticos .....	50
M2.3. Vectores de expresión .....	53
M2.4. Expresión analítica del scFv-h3D6 .....	53
M2.4.1. Inducción de la expresión .....	53
M2.4.2. Análisis de las muestras .....	53
M2.5. Expresión preparativa del scFv-h3D6 .....	49

M2.5.1. Inducción de la expresión y lisis celular .....	54
M2.6. Purificación del scFv-h3D6 .....	54
M2.6.1. Purificación de proteína de la fracción soluble .....	55
M2.6.1.1. Cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC) .....	55
M2.6.2. Purificación de proteína de la fracción insoluble .....	56
M2.6.2.1. Solubilización y replegamiento .....	56
M2.6.3. Digestión con la proteasa TEV .....	57
M2.6.4. Cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC) .....	57
M2.6.5. Cromatografía de gel filtración (GF) .....	58
M2.6.6. Cromatografía de fase reversa (RPC) .....	58
M2.6.7. Cromatografía de intercambio catiónico (CEX) .....	59
M2.7. Expresión y purificación de la proteasa TEV .....	59
M2.8. Cambio de tampón .....	61
M2.8.1. Diálisis .....	61
M2.8.2. PD10 ( <i>Desalting Columns</i> ) .....	61
M2.9. Concentración de proteínas por filtros de centrifuga Amicon® .....	61
M3. Métodos analíticos de proteínas .....	62
M3.1. Técnicas electroforéticas .....	62
M3.1.1. SDS-PAGE .....	62
M3.1.1.1. Preparación de geles .....	63
M3.1.1.2. Evento de separación de proteínas por SDS-PAGE.....	64
M3.1.2. Electroisoelectroforesis .....	65
M3.1.3. Análisis de Inmunodetección tipo <i>western-blot</i> para proteínas de fusión con 6His-tag .....	66
M3.1.4. Análisis de inmunodetección tipo <i>western-blot</i> para especies oligoméricas de A $\beta$ .....	67
M3.1.4.1. Preparación de geles con urea 8 M .....	67
M3.1.4.2. Preparación de las muestras y referencias internas .....	68
M3.1.4.3. Evento de SDS-PAGE, electrotransferencia e inmunodetección del péptido A $\beta$ .....	69
M3.1.5. <i>Stripping</i> de las membranas PVDF .....	70
M3.1.6. Inmunodetección de $\beta$ -actina .....	70
M3.1.7. Cuantificación de proteína por microensayo con BCA .....	71
M3.1.8. Tinción de proteínas .....	71
M3.1.8.1. Tinción con Coomassie .....	71
M3.1.8.2. Tinción para geles de electroisoelectroforesis (IEF) .....	72
M3.1.9. Digitalización y/o cuantificación de geles, membranas PVDF y <i>films</i> .....	72
M3.1.10. Ensayos de proteólisis limitada con termolisina .....	72
M3.2. Técnicas espectroscópicas .....	73
M3.2.1. Fluorescencia intrínseca de proteínas (Tryptófano, Trp) .....	73
M3.2.1.1. Obtención de espectros de emisión .....	73
M3.2.1.2. Análisis de agregación térmica por Fluorescencia Trp ..	74
M3.2.1.3. Análisis de desnaturalización química por Fluorescencia de Trp .....	74
M3.2.2. Dicroísmo Circular .....	75
M3.2.2.1. Obtención de espectros de dicroísmo circular .....	75
M3.2.2.2. Obtención de los perfiles térmicos por CD .....	76
M3.2.3. Espectroscopia de absorción de infrarrojo con transformada de Fourier .....	77
M3.2.4. Determinación de coeficientes de extinción molar .....	78
M3.2.5. Thermofluor .....	79
M3.2.6. Secuenciación N-terminal y espectrometría de masas MALDI-TOF .....	79
M4. Análisis funcional del scFv-h3D6 en un ratón 3xTg-AD .....	80
M4.1. Animales y tratamientos .....	80
M4.2. Diseño experimental .....	80
M4.3. Análisis a nivel conductual de los efectos del scFv-h3D6 .....	81
M4.4. Análisis a nivel molecular de los efectos del scFv-h3D6 .....	82
M4.4.1. Extracción y fraccionamiento de proteínas .....	82

M4.4.2. Inmunodetección tipo <i>western-blot</i> (WB) de especies A $\beta$ .....	83
M4.4.3. Inmunodetección tipo ELISA de las apolipoproteínas apoE y apoJ .....	83
M5. Programas informáticos .....	84
<b>RESULTADOS</b> .....	85
R1. Análisis de los sistemas de expresión .....	87
R2. Estandarización de la purificación del scFv-h3D6 .....	88
R2.1. Purificación de la proteína precursora .....	89
R2.1.1. Fracción soluble .....	89
R2.1.2. Fracción Insoluble .....	91
R2.2. Optimización de la digestión con la proteasa TEV .....	92
R2.3. Purificación de la proteína madura (26.4 kDa) .....	95
R3. Caracterización del scFv-h3D6 WT .....	103
R3.1. Caracterización térmica .....	103
R3.1.1. Desnaturalizaciones térmicas de plegamiento mediante fluorescencia Trp .....	103
R3.1.2. Caracterización de la estructura secundaria y desnaturalizaciones térmicas mediante dicroísmo circular (CD) .....	107
R3.1.3. Caracterización del intermediario térmico del scFv-h3D6 WT, mediante espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) .....	110
R3.2. Caracterización química .....	113
R3.2.1. Desnaturalización química seguida por CD .....	113
R3.2.2. Desnaturalización química seguida por fluorescencia de Trp .....	114
R3.3. Caracterización de los intermediarios químicos y térmicos del scFv-h3D6 mediante proteólisis con termolisina .....	117
R3.4. Determinación del coeficiente de extinción molar .....	121
R3.5. Punto isoeléctrico (pI) .....	121
R3.6. Ensayo ThermoFluor para la optimización de tampones .....	122
R4. Efecto del tratamiento con scFv-h3D6 en un modelo murino triple transgénico de la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD) .....	123
R4.1. Efecto del tratamiento a nivel conductual .....	123
R4.2. Efecto del tratamiento a nivel molecular .....	124
R4.2.1. Efecto del scFv-h3D6 en el perfil oligomérico de A $\beta$ <i>in vivo</i> .....	124
R4.2.1.1. Estandarización del método de electrotransferencia e inmunodetección tipo <i>western-blot</i> (WB) .....	124
R4.2.1.2. Análisis del perfil de agregación del péptido A $\beta$ <i>in vivo</i> y efecto del scFv-h3D6 .....	128
R4.2.2. Efecto del scFv-h3D6 sobre las concentraciones de clusterina (apoJ) y apoE en ratones 3xTg-AD .....	132
R5. Rediseño del plegamiento del scFv-h3D6 .....	134
R5.1. Clonación de las variantes proteicas de scFv-h3D6 .....	137
R5.2. Estructura secundaria, desnaturalización y estabilidad química de las variantes proteicas de scFv-h3D6 .....	140
R5.3. Cambios en la vía de agregación inducida térmicamente tras la elongación del C-terminal .....	148
<b>DISCUSIÓN</b> .....	155
D1. Expresión en <i>E. coli</i> y purificación del scFv-h3D6 WT nativo: relación de la actividad chaperona con la solubilidad y la contribución de los puentes disulfuro en la estabilidad .....	157
D2. Panorama conformacional del plegamiento de scFv-h3D6: presencia de intermediarios termodinámicos y cinéticos .....	160
D3. El tratamiento con scFv-h3D6 WT mejora las capacidades cognitivas, elimina los oligómeros de A $\beta$ y restaura los niveles de clusterina y apoE en ratones 3xTg-AD .....	165
D4. La elongación del C-terminal del dominio V <sub>L</sub> incrementa la estabilidad y disminuye la tendencia a la agregación del scFv-h3D6 .....	173
<b>CONCLUSIONES</b> .....	181
C1. Expresión y purificación de scFv-h3D6 .....	183

---

C2. Caracterización del scFv-h3D6 .....	184
C3. Efectividad <i>in vivo</i> del scFv-h3D6 .....	185
C4. Incremento de la estabilidad del dominio V <sub>L</sub> y disminución de la tendencia a la agregación del scFv-h3D6 .....	186
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	189
<b>ANEXOS</b> .....	201
ANEXO A: figuras .....	203
ANEXO B: publicaciones .....	

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
I1	2
I2	3
I3	4
I4	6
I5	8
I6	10
I7	11
I8	15
I9	16
I10	17
I11	19
I12	21
I13	22
I14	24
I15	26
I16	27
I17	29
I18	30
I19	33
M1	48
M2	48
M3	51
M4	77
R1	83

Figura	Página
R2	85
R3	87
R4	88
R5	90
R6	91
R7	92
R8	93
R9	94
R10	97
R11	101
R12	104
R13	106
R14	107
R15	109
R16	111
R17	114
R18	115
R19	115
R20	116
R21	120
R22	121
R23	122
R24	125
R25	126

Figura	Página
R26	127
R27	128
R28	130
R29	132
R30	134
R31	134
R32	136
R33	138
R34	140
R35	142
R36	143
R37	145
R38	147
D1	157
D2	164
D3	169
A1	191
A2	192
A3	193
A4	193
A5	194

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
I1	13
M1	46
M2	47
M3	76
R1	107
R2	112
R3	117
R4	133
R5	139
R6	146



## **ABREVIATURAS**





<u>Abreviaturas</u>	<u>Significado</u>
$\Delta$	Incremento
$\epsilon$	Coeficiente de extinción molar
$\lambda$	Longitud de onda
$\perp$	Corte proteolítico
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
$\mu\text{m}$	Micrómetro
$^{\circ}\text{C}$	Grado centigrado
Å	Angstrom
$A_{280}$	Absorbancia a 280 nm
A $\beta$	Péptido beta amiloide
AcP	Acilfosfatasa
AD	Enfermedad de Alzheimer (del inglés <i>Disease Alzheimer</i> )
ADA2h	Dominio de activación de la procarboxipeptidasa A2 humana
AI	Medio autoinducción
Amp	Ampicilina
APP	Proteína Precursora Amiloide (del inglés <i>Amyloid Precursor Proteína</i> )
b	Base nucleotídica
BBB	Barrera Hematoencefálica (del inglés <i>Blood-Brain Barrier</i> )
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Albúmina de suero bovino (del inglés <i>bovine serum albumin</i> )
CD	Dicroísmo circular (del inglés <i>circular dichroism</i> )
CDR	Regiones de unión al antígeno (del inglés <i>Complementary Determining Regions</i> )
CEx	Intercambio catiónico (del inglés <i>Cationic Exchange</i> )
CNS	<i>Sistema Nervioso Central</i> (del inglés <i>Central Nervous System</i> )
C-terminal	carboxiterminal
Cys-Cys	Cistina
Da	Dalton
deg	Grado de elipticidad
DNA	Acido desoxiribonucleico (del inglés <i>desoxiribonucleic acid</i> )
DO	Densidad Óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Tetraacetato de etildiamina
EMBL	Laboratorio Europeo de Biología Molecular (del inglés <i>European Molecular Biology Laboratory</i> )
EXPASY	<i>Expert Protein Analysis System</i>
FR	<i>Regiones de soporte</i> (del inglés <i>Framework Regions</i> )
FTIR	Espectroscopía de Infrarojo y Transformada de Fourier (del inglés <i>Fourier-transform Infrared spectroscopy</i> )
g	Gramos
g	Fuerza gravitatoria
h	hora
G	Energía libre (de Gibbs)
GdnHCl	Cloruro de Guanidinio
GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutation oxidado
6His-tag	Cola de histina
IBB	Instituto de Biotecnología y Biomedicina
Ile	Isoleucina
IMAC	Cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (del inglés <i>Immobilized Metal Ion Affinity Chromatography</i> )
IPTG	Isopropil- $\beta$ tiogalactósido
kDa	Kilodalton
L	Litro
LB	Medio Luria-Bertani
Leu	Leucina
LPS	Lipopolisacaridos
M	Molar

mA	Miliamperios
MALDI-TOF	Espectrometría de masas de desorción/ionización láser asistida por matriz y detección por tiempo de vuelo (del inglés <i>Matrix-Assisted-Laser-Desorption/Ionization-Time-Of-Flight</i> )
mer	monómero
min	minuto
mM	Milimolar
mL	Mililitro
N	Estado nativo
N-terminal	aminoterminal
ON	Toda la noche (del inglés <i>overnight</i> )
p/v	Peso/volumen
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>polymerase chain reaction</i> )
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
pH	Potencial de hidrógeno
Phe	Fenilalanina
pI	Punto isoelectrico
PrP	Proteína del prión o priónica
PVDF	Polivinilideno fluoruro (del inglés <i>Polyvinylidene Fluoride</i> )
rpm	Revoluciones por minuto
RP-HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia en fase reversa (del inglés <i>Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography</i> )
Seg	segundo
ScFv	Fragmentos variables de cadena sencilla (del inglés <i>Single-chain variable Fragment</i> )
SDS	Dodecilsulfato sódico (del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulphate</i> )
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
TA	Temperatura Ambiente
TAE	Tampón Tris-acetato-EDTA
TFA	Acido trifluoroacético (del inglés <i>Trifluoroacetic acid</i> )
TEM	Microscopía electrónica de transmisión (del inglés <i>Transmission Electron Microscopy</i> )
TEMED	N,N,N,N'-tetrametilnediamina
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusión (del inglés <i>melting temperature</i> )
™	Marca registrada (del inglés <i>trademark</i> )
Tris	Tris-hidroximetilaminometano
Trp	Triptófano
Tyr	Tirosina
U	Estado desplegado
UA	Unidades de Absorbancia
URF	Unidades Relativas de Fluorescencia
UV	Ultravioleta
V	Volt
Val	Valina
VC	Volumen de columna
v/v	Volumen/volumen
WB	<i>Western-blot</i>
WT	Variante salvaje (del inglés <i>wild-type</i> )

**RESUMEN**

---

---



La enfermedad de Alzheimer (AD) se ha convertido en un problema de primer orden en países desarrollados debido al coste sanitario social y humano que conlleva. La hipótesis de la cascada amiloide, la más aceptada por la comunidad científica, sitúa al péptido A $\beta$  como el responsable directo del proceso neuropatológico, concretamente a los oligómeros de A $\beta$ .

En la actualidad, existen múltiples tratamientos sintomáticos-paliativos, sin que ninguno se haya descrito como curativo. Recientemente, la inmunoterapia  $\beta$ -amiloide se ha revelado como una posible herramienta en el tratamiento de la AD. En contraste con los anticuerpos completos, la administración de los scFv (fragmentos variables de cadena sencilla) no produce ni meningoencefalitis ni hemorragia cerebral. El uso de moléculas tipo scFv ha conseguido resultados prometedores en estudios pre-clínicos. Se trata de proteínas quiméricas en donde se han fusionado los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> mediante un conector flexible, manteniendo la especificidad antigénica.

En la presente tesis, se abordó la expresión recombinante de scFv-h3D6, un derivado de un anticuerpo monoclonal específico para los oligómeros de A $\beta$  (mAb-h3D6, o bapineuzumab), en un sistema bacteriano (*E. coli*) deficiente en reductasas y en co-expresión con los *carriers* Trx y NusA; así como, su purificación mediante técnicas cromatográficas. La proteína presenta un plegamiento típico de las inmunoglobulinas. Su caracterización biofísica, permitió observar que bajo tratamiento térmico la molécula muestra tendencia a la agregación, promovida por la presencia de un estado intermedio con un componente- $\beta$  *worm-like* enriquecido. De igual forma se evidenció durante el proceso de desplegamiento inducido por urea, la acumulación de un estado intermedio metaestable compuesto por el dominio menos estable (V<sub>L</sub>) desplegado y el dominio V<sub>H</sub> plegado; sugiriendo al dominio V<sub>L</sub> como el blanco para el rediseño de la estabilidad termodinámica global de la molécula. Auxiliándose en un modelo de la estructura tridimensional, se crearon una serie de variantes proteicas con el fin de aumentar la estabilidad del dominio V<sub>L</sub>. Dicho modelo tridimensional también reveló que el dominio V<sub>L</sub>, localizado en el C-terminal de la molécula, terminaba antes de que la última cadena- $\beta$  fuera completada, por lo que decidimos extender dicho extremo en base a un alineamiento de 24 secuencias de scFvs depositados en el PDB.

De ellos, las tres variantes de elongación del C-terminal presentaron un incremento en la estabilidad termodinámica de hasta el 26% y una disminución en la tendencia a la agregación de unos 4°C. Esta mejora es deseable en una molécula de interés terapéutico, ya que ha de permitir una mayor vida media *in vivo*.

Por otro lado, se examinó el efecto *in vivo* del scFv-h3D6 *wild-type* en un modelo murino triple transgénico que desarrolla la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD). El tratamiento se aplicó en una única dosis intraperitoneal en ratones hembra de 5 meses de edad, correspondiente a los primeros estadios de la enfermedad. Los beneficios del potencial terapéutico del scFv-h3D6 se mostraron a los 5 días, tanto a nivel conductual, como celular y molecular; principalmente, por su capacidad de eliminar los oligómeros de A $\beta$  del córtex y el bulbo olfatorio, así como de restaurar los niveles de las apolipoproteínas apoE y apoJ (clusterina) en córtex y en hipocampo.

En resumen, la presente tesis hace un recorrido desde la obtención inicial y mejora de un fragmento de anticuerpo hasta la demostración de su eficiencia en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer.

**ABSTRACT**





Alzheimer's disease (AD) has become a public health problem in developed countries due to social and human health costs. The amyloid cascade hypothesis, the most accepted by the scientific community, places the A $\beta$  peptide as directly responsible for the neuropathological process, specifically A $\beta$ -oligomers.

Currently, there are multiple palliative-symptomatic treatments, but none has been described as curative. In recent years, A $\beta$  (amyloid  $\beta$ ) immunotherapy has been revealed as a possible tool in Alzheimer's disease treatment. In contrast with complete antibodies, the administration of scFv (single-chain variable fragments) produces neither meningoencephalitis nor cerebral haemorrhage. The use of scFv-like molecules has achieved promising results in pre-clinical studies. In these chimeric proteins, the V<sub>H</sub> domain and the V<sub>L</sub> domain had been fused by a flexible linker, while maintaining the antigenic specificity.

In the present thesis, the recombinant expression of scFv-h3D6, a derivative of a monoclonal antibody specific for A $\beta$ -oligomers (mAb-h3D6 or Bapineuzumab) was performed in a bacterial system (*E.coli*) defective for the two main redox pathways and Trx- and NusA- tagged. Purification of the isolated scFv-h3D6 was achieved by chromatographic techniques. The protein shows the typical immunoglobulin fold. Its biophysical characterization allowed for the observation that heat treatment initiates an aggregation pathway, characterized by a  $\beta$ -rich intermediate state which aggregates in the form of WL (worm-like) fibrils. In the same way, it was shown that its urea-induced unfolding pathway is characterized by the presence of a meta-stable intermediate state composed of the unfolded V<sub>L</sub> domain and the folded V<sub>H</sub> domain, which suggests the V<sub>L</sub> domain as a target for thermodynamic stability redesign. The modeling of the 3D structure revealed that the V<sub>L</sub> domain, located at the C-terminal of the molecule, was ending before its latest  $\beta$ -strand was completed, so, a number of protein variants were created in order to increase the stability of the V<sub>L</sub> domain. Three elongation mutants, beyond VL-K107, showed increased thermodynamic stability up to 26% and lower aggregation tendency at around 4°C. These traits should be of interest for a molecule with therapeutic potential, since its mean life *in vivo* should be longer.

Additionally, we examined the *in vivo* effects of the WT scFv-h3D6 in the triple-transgenic 3xTg-AD mouse model of Alzheimer disease. The treatment was applied in a single intraperitoneal dose to five-month-old females, corresponding to the early stages of the disease. Our results suggest that the benefit of scFv-h3D6 occurs at the behavioral cellular and molecular levels; mainly, decreasing A $\beta$ -oligomers in the cortex and olfactory bulb and recovered the non-pathological levels of some apolipoproteins in the cortex (apoE and apoJ) and hippocampus (apoE).

In summary, this thesis makes a journey from the initial obtaining and improvement of an antibody fragment to the demonstration of its efficiency in a mouse model of Alzheimer's disease.



# INTRODUCCIÓN



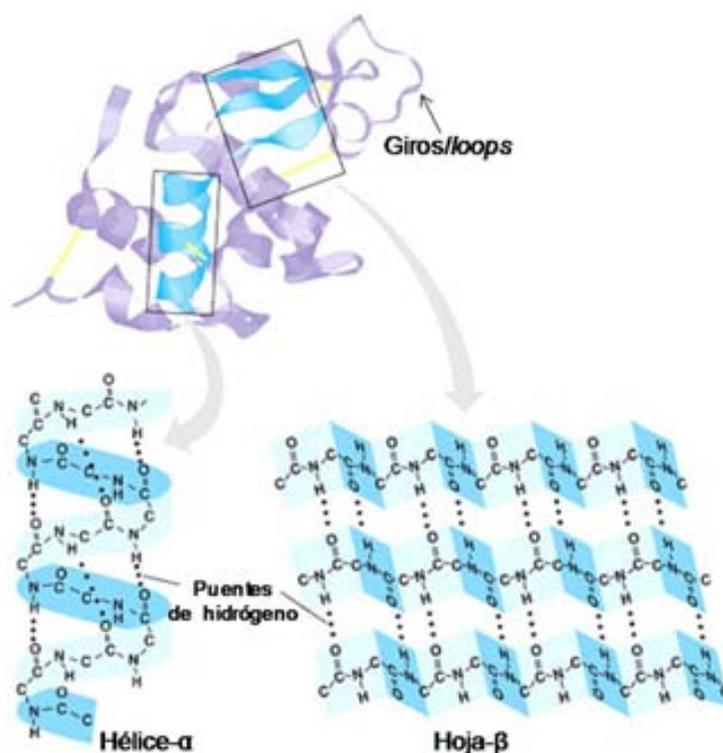


## I1. Plegamiento de proteínas

### I1.1. Estructuras que estabilizan el plegamiento

El plegamiento de proteínas es el proceso por el que una proteína, partiendo de su secuencia de aminoácidos (o estructura primaria), alcanza espontáneamente su estructura tridimensional (o estructura terciaria) característica en condiciones fisiológicas. Éste estado, conocido como estado nativo, corresponde a la conformación más estable, por lo que el proceso se encuentra favorecido termodinámicamente (Creighton, 1995; Kim y col., 2013).

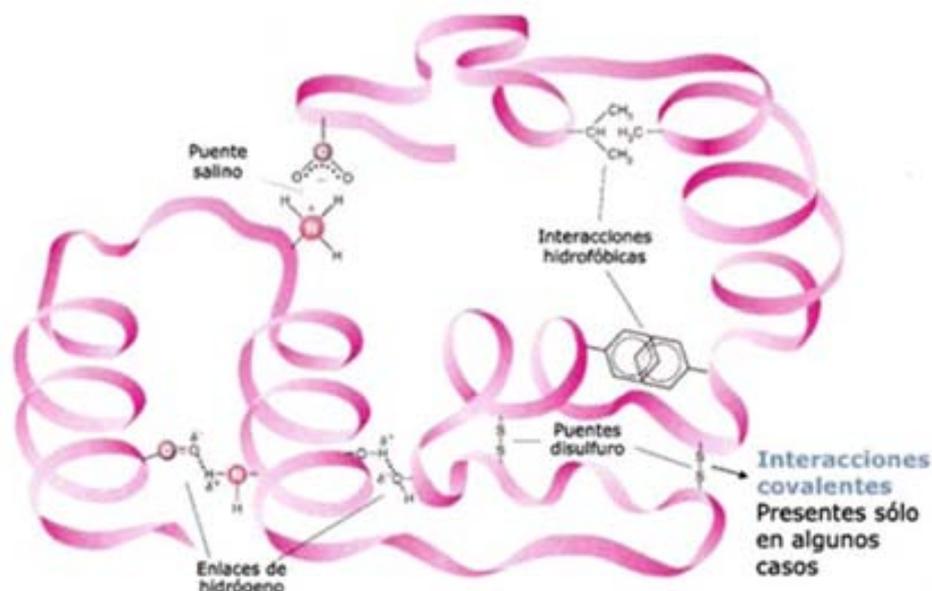
La estabilidad del estado nativo se debe a la presencia de interacciones locales y de larga distancia. Las interacciones locales dan lugar a una serie de estructuras denominadas secundarias. Las estructuras secundarias regulares más frecuentes en las proteínas son las hélices- $\alpha$  y las hojas- $\beta$  (figura I1) (Branden y Tooze, 1991), ya que permiten aumentar el nivel de compactación de la molécula y por ende su estabilidad. Estas estructuras regulares se encuentran conectadas por otras estructuras con un patrón más variable, y por tanto conocidas como estructuras secundarias irregulares, como son los giros- $\beta$ , los *loop* y las hélices- $3_{10}$ .



**Figura I1. Estructuras secundarias regulares más frecuentes en las proteínas.** Las hélices- $\alpha$  tiene 3.6 residuos por vuelta, y se estabilizan gracias a que el grupo N-H de cada residuo forma un puente de hidrógeno con el grupo C=O del aminoácido situado cuatro residuos más adelante. Las hojas- $\beta$  se forman por el empaquetamiento antiparalelo/paralelo de dos cadenas polipeptídicas dentro de la misma proteína, en el que los grupos N-H de una de las cadenas forman puentes de hidrógeno con los grupos C=O de la opuesta. Reproducido de McMurry y Fay (2004).

Por otro lado, la estructura terciaria viene determinada por interacciones a larga distancia que entierran los residuos hidrofóbicos en el núcleo de la molécula, dejando las cadenas laterales de residuos cargados expuestos a la superficie. Con ello se expulsa el agua del interior de la molécula y se consigue el grado de compactación del estado nativo.

Las fuerzas estabilizantes del estado nativo son: interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas) y puentes disulfuro (interacción covalente) (figura I2); siendo la interacción hidrofóbica la fuerza más importante en el proceso del plegamiento de las proteínas. Las interacciones moleculares que estabilizan una proteína pueden ser alteradas por la temperatura, pH y fuerza iónica (Rose y Wolfenden, 1993; Pace, 1995, 1996).



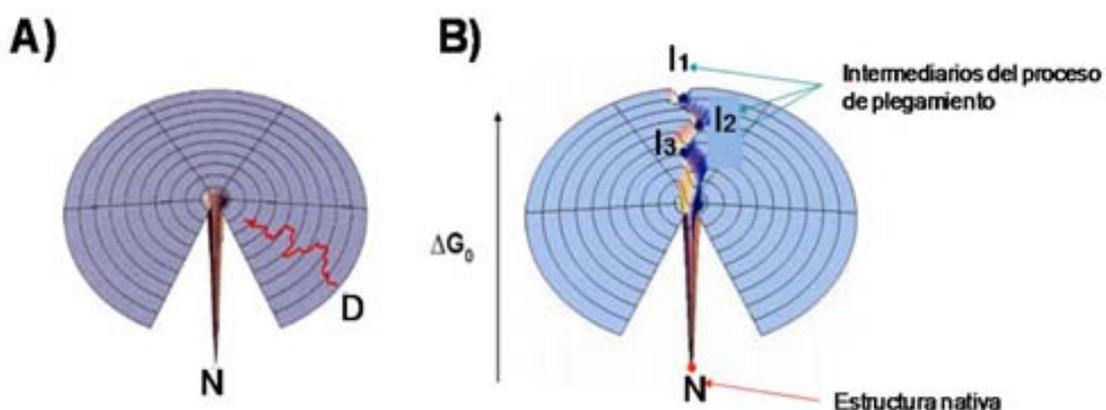
**Figura I2. Fuerzas estabilizadoras del estado nativo.** Entre las principales fuerzas que estabilizan el plegamiento nativo se encuentran: puentes de hidrógeno, interacciones electrostáticas, fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro. Adaptado de <http://www.ehu.es/biomoleculas/proteinas/prot43.htm>

La función biológica de una proteína depende de su correcto plegamiento. Si una proteína no se pliega correctamente, no será funcional. Actualmente se sabe que el estado nativo no es una estructura rígida, si no que se encuentra constituido por una multitud de subestados dinámicos en equilibrio, cuya diferencia es ínfima, confiriendo a la molécula la flexibilidad necesaria para cumplir con su función biológica (Monzon y col., 2013).

## 11.2. Teorías sobre el plegamiento

A finales de la década de los 50 Anfinsen logró el replegamiento *in vitro* de la ribonucleasa A, demostrando que toda la información necesaria para la adquisición de la estructura nativa de una proteína se encuentra contenida en su secuencia aminoacídica (Anfinsen y col., 1961).

Ahora bien, el entender cómo a partir de esa secuencia de aminoácidos la proteína logra adquirir su conformación nativa constituye desde hace tiempo uno de los grandes interrogantes a los que se enfrenta la comunidad científica. El llamado problema del plegamiento proteico puede ser dividido en dos cuestiones principales: la cuestión termodinámica de cómo las proteínas llegan a un mínimo energético, y la cuestión cinética de cómo la proteína es capaz de plegarse tan rápido (Sali y col., 1994; Karplus y col., 1997; Rooman y col., 2002). Estas cuestiones fueron planteadas por primera vez hace 40 años por Levinthal (1968, 1969), dando lugar a lo que se conoce como la paradoja de Levinthal, que plantea que si una proteína pequeña (de solo 100 residuos) explorara aleatoriamente todas las conformaciones posibles, tardaría más tiempo en alcanzar su conformación nativa que la edad del universo; no obstante las proteínas se pliegan de manera muy rápida, en el orden de milisegundos. Levinthal llegó a la conclusión de que el plegamiento de proteínas no puede ser un proceso de prueba y error, proponiendo que este proceso está guiado; siguiendo caminos cinéticos determinados (o vías de plegamiento) que llevan a la disminución de la energía libre, de manera que durante el plegamiento nada más se ensayan unas pocas conformaciones para llegar a la estructura nativa (figura 13) (Bryngelson y col., 1995; Diner y col., 2000).



**Figura 13. Paradoja de Levinthal adaptada a la representación en forma de embudo del espacio conformacional. A) Proceso de plegamiento de prueba y error. B) Proceso de plegamiento por vías cinéticas determinadas.** D: estructura desplegada; N: estructura nativa; a, b, c: estados intermedios de plegamiento. Adaptado de Chan y Dill (1998).

A partir de aquí, se fueron desarrollando diferentes modelos de plegamiento basados en la teoría de las “vías de plegamiento”, en los cuales se distinguen fundamentalmente dos grupos: i) las secuenciales, en las que se propone primeramente la formación de la estructura secundaria y después la terciaria (por ejemplo, el modelo de *framework*) y; ii) las del colapso, en las que la formación de ambas estructuras se da de manera simultánea (por ejemplo, el modelo del colapso hidrofóbico). Sin embargo, ninguno de estos modelos era lo suficientemente general para explicar el proceso global del plegamiento proteico (Yang y col., 2013).

Estos planteamientos sirvieron de base para el surgimiento de una nueva visión del proceso, conocida como el modelo de los embudos de plegamiento. En este, se hace referencia a los diferentes estados de plegamiento como un conjunto de conformaciones, en lugar de hablar de conformaciones discretas, teniendo en cuenta múltiples rutas de plegamiento paralelas en función de la conformación inicial (Dill y col., 1995; Wolynes y col., 1995; Dill y Chan, 1997). El modelo se basa en unas superficies tridimensionales, donde la dimensión vertical representa el número de contactos nativos (entalpía) y las otras dimensiones corresponden a la entropía y el número de conformaciones posibles. La forma del embudo resulta del hecho de que parte de un conjunto muy amplio y variado de conformaciones desplegadas (D), de energía superior al estado nativo (N), y se va reduciendo a medida que disminuye tanto la energía libre como la entropía durante el proceso de plegamiento. En el fondo del embudo culmina la estructura nativa (mínimo energético global), donde el número de conformaciones es extremadamente limitado, prácticamente único (Wolynes y col., 1995). Este modelo parece explicar bien el plegamiento característico de diferentes proteínas, ajustando las formas del embudo en función de cada proteína (de su secuencia) y de cada condición (figura I4.B).

La existencia de intermediarios de plegamiento (mínimos energéticos locales) es también considerada por este modelo. Estos intermediarios resultan ser estados parcialmente plegados que tienen que saltar barreras energéticas para alcanzar el estado nativo (figura I4.A). Estos se pueden clasificar de diferentes maneras (Tsytlonok e Itzhaki, 2013).

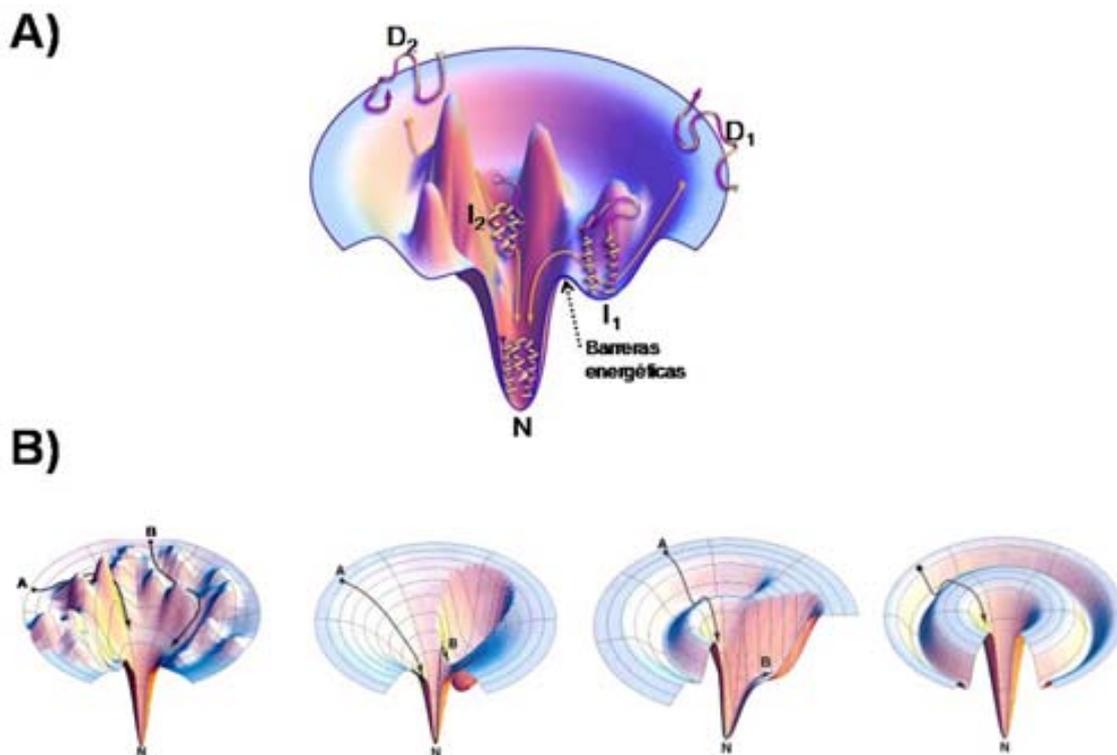
Según su naturaleza los podemos clasificar en dos grupos:

- Termodinámicos: son los que se encuentran en equilibrio, de manera que se acumulan y pueden ser aislados. También son denominados metaestables.
- Cinéticos: son detectables por cambios en la velocidad de replegamiento entre el principal estado de transición y el estado nativo, pero no se acumulan y, por tanto, no pueden ser aislados.

Según su papel en el proceso de plegamiento, podemos clasificarlos igualmente en dos grupos:

- *On-pathway*: intermediarios por los cuales se ha de pasar forzosamente para llegar al estado plegado (formados por interacciones nativas, es decir, forman parte de la vía de plegamiento).
- *Off-pathway*: intermediarios que se encuentran fuera de la vía productiva de plegamiento (formados principalmente por interacciones no nativas, es decir, que no forman parte de la vía de plegamiento).

Estas conformaciones parcialmente plegadas son de vital importancia en el presente trabajo, ya que como se verá mas adelante en los resultados, están involucradas tanto en el proceso de agregación y fibrilación del agente etiológico de la enfermedad de Alzheimer (AD), como en el mecanismo por el cual el scFv-h3D6, proteína de estudio en esta tesis, constituye una terapia efectiva.



**Figura I4. Modelo de los embudos de plegamiento. A) Modelo general.** El modelo de los embudos de plegamiento considera la existencia de intermediarios de plegamiento (I) que tienen que saltar barreras energéticas para alcanzar el estado nativo (N). **B) Modelos específicos.** Acoplamiento de diferentes modelos de acuerdo a la particularidad de cada proteína y sus respectivas condiciones de plegamiento. Adaptado de Chan y Dill (1998).

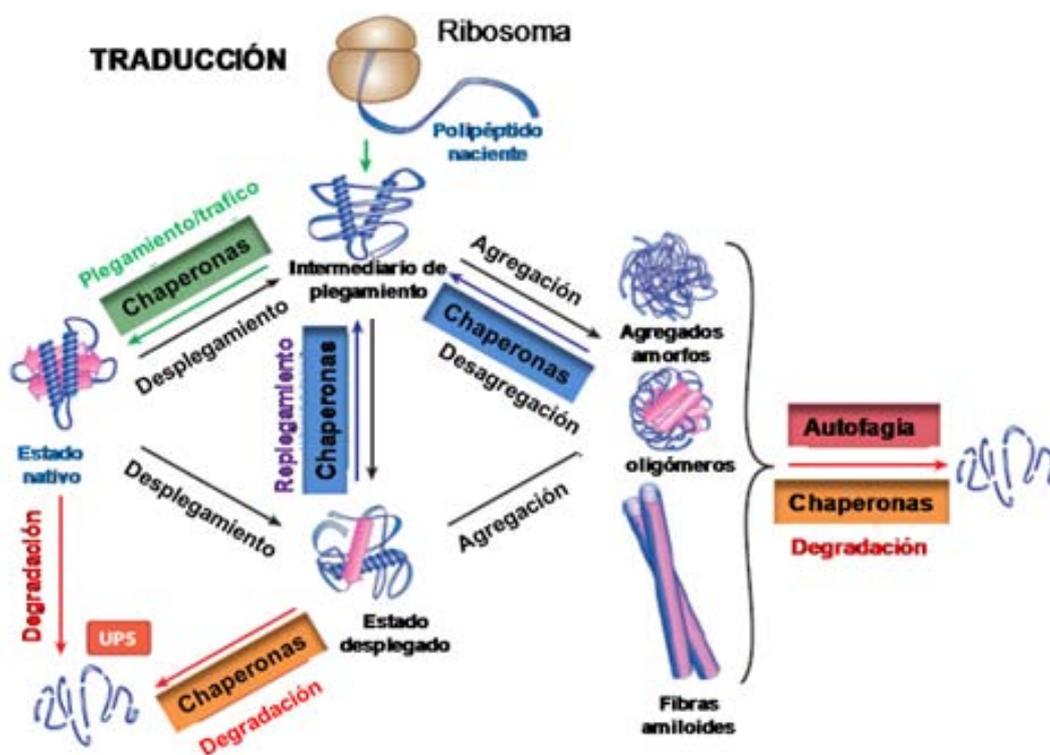
### 11.3. Plegamiento *in vivo*

Todas las teorías expuestas anteriormente se basan en experimentos de replegamiento y desplegado realizadas *in vitro*. Los cuales suelen ser efectuados mediante el uso de agentes y/o condiciones desnaturizantes que promueven el desplegado. Ahora bien, entender el plegamiento proteico *in vivo* implica considerar una serie de diferencias existentes entre el ambiente celular y las condiciones de replegamiento *in vitro* (Kim y col., 2013). Entre estas diferencias destacan: i) la alta concentración de proteínas (300-400 mg/mL) y otras macromoléculas en el citoplasma; ii) el acoplamiento de la maquinaria celular responsable de la síntesis de la cadena polipeptídica (ribosoma), con sistemas multiprotéicos de control de plegamiento (incluyendo el propio ribosoma, las chaperonas moleculares, proteasas especializadas, etc) y; iii) al transporte de la cadena polipeptídica recién sintetizada, así como modificaciones postraduccionales, dentro compartimentos subcelulares (aparato de Golgi, mitocondrias, retículo endoplasmático, etc) (Hartl, 1996, 2002; Frydman, 2001; Araki y Nagata, 2011).

Uno de los componentes fundamentales de los sistemas de control de calidad de plegamiento son las chaperonas y chaperoninas moleculares. Esta clase de proteínas, que no son consideradas catalizadores ya que no aumentan la velocidad de la reacción de plegamiento, se une reversiblemente a regiones hidrofóbicas expuestas de cadenas polipeptídicas recién sintetizadas y, mediante diversos mecanismos (que pueden requerir la hidrólisis de ATP) rompen interacciones no nativas, ayudando a alcanzar el estado nativo (Hartl, 1996, 2002; Lee y Tsai, 2005; Kim y col., 2013). Adicionalmente, la interacción de las chaperonas con la cadena polipeptídica desplegada o mal plegada protege de la degradación y evita la agregación con otras proteínas (Tang y col., 2006; Clare y col., 2009). Algunas chaperonas (por ejemplo, Hsp 70) pueden revertir el plegamiento de las moléculas que están plegadas incorrectamente estirándolas, y por tanto dándoles una nueva oportunidad de replegarse correctamente (figura 15) (Bukau y Horwich, 1998; Martin, 2000). Por otro lado, las chaperoninas (por ejemplo, el complejo GroEL/GroES) forman las denominadas cavidades de Anfinsen, donde, además de romperse las interacciones no nativas, se aísla a la cadena polipeptídica del entorno celular, y por lo tanto se crea un efecto de dilución que permite que la reacción de plegamiento avance en función de su potencial termodinámico. Además, muchas chaperonas y chaperoninas pueden mostrar dos actividades enzimáticas adicionales que controlan la cinética de la reacción: la actividad disulfuro isomerasa (PDI), que cataliza la correcta formación de puentes disulfuro intra- e intercatenario (Gruber y col., 2006) y la actividad prolil-isomerasa, que cataliza la isomerización cis-trans de las prolinas (Gothel y Marahiel,

1999). Estas actividades enzimáticas también pueden proceder de enzimas sin actividad chaperona propiamente dicha, pero que se asocian a las chaperonas y chaperoninas para participar en el proceso de plegamiento.

Una de las características de los sistemas de control de calidad de plegamiento es su dinamismo, ya que la concentración celular, localización y actividad de cada proteína deben estar cuidadosamente controlados en respuesta a los cambios ocurridos en el microambiente celular (por ejemplo: estrés celular). Este control, que permite un balance saludable del proteoma, o proteostasis, se logra mediante la cooperación entre los sistemas de chaperonas en conjunción con el transporte de proteínas y la maquinaria de degradación (compuesta por varias proteasas muy especializadas) (Kim y col., 2013; Tyedmers y col., 2010). Estas proteasas degradan a aquellas proteínas que no consiguieron plegarse correctamente o que por alguna razón perdieron su estado nativo. La degradación se da ya sea por el sistema ubiquitin-proteosoma (UPS: *ubiquitin-proteasome system*) o por el sistema autofagosoma-lisosomal/vacuolar (ALP: *autophagosome-lysosome system*) (Takalo y col., 2013; Kim y col., 2013). Para el primer caso, las proteínas mal plegadas son marcadas mediante la unión covalente con un número variable de moléculas de ubiquitina y posteriormente son degradadas en el complejo proteosoma. El segundo caso ocurre si las proteínas agregadas no pueden ser degradadas por el proteosoma (figura I5).



**Figura I5. Plegamiento *in vitro* y sistemas de control de calidad de plegamiento.** Los sistemas de chaperonas, el transporte de proteínas y la maquinaria de degradación se encuentran íntimamente relacionados. La degradación se da por el sistema UPS (*ubiquitin-proteasome system*) o por el sistema autofagosoma-lisosomal/vacuolar (ALP: *autophagosome-lysosome system*). Adaptado de Kim (2013).

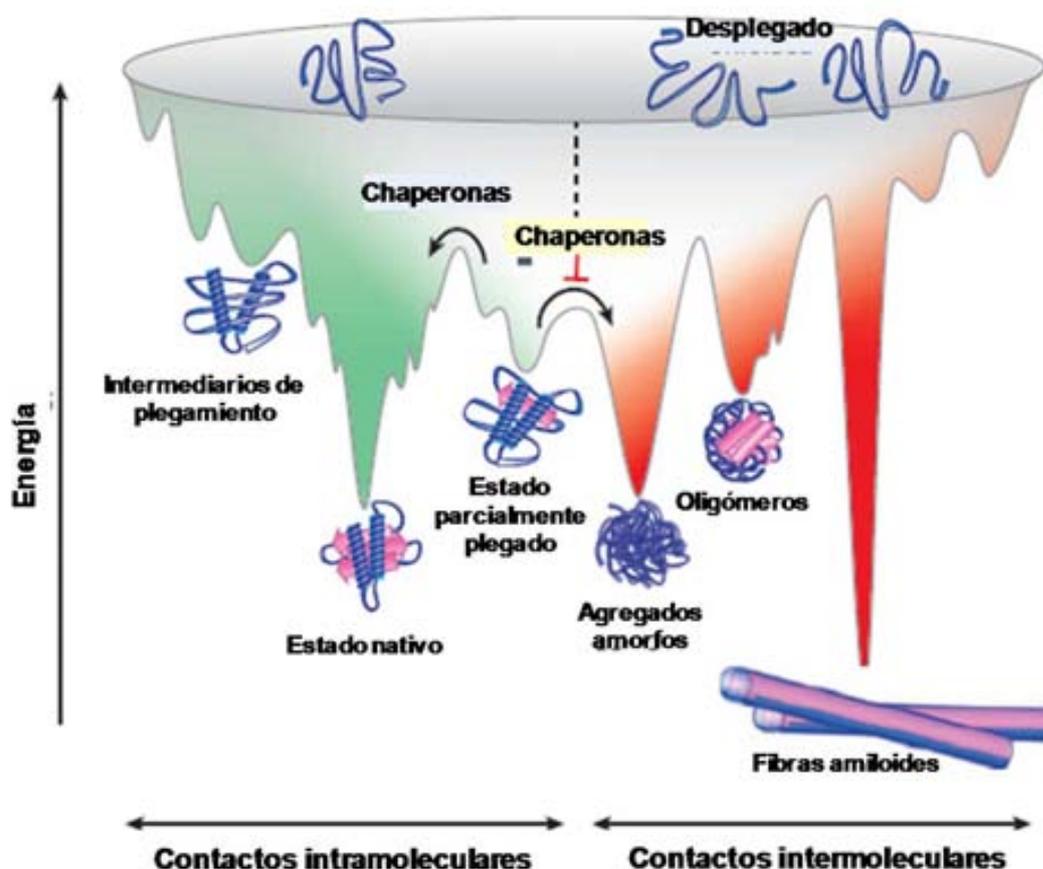
## **12. Enfermedades conformacionales**

La existencia en todos los organismos vivos de sistemas de control de plegamiento, así como el enorme gasto energético para su manutención; nos da una idea de la importancia que tiene para la célula tanto, alcanzar el correcto plegamiento de sus estructuras proteicas, como evitar la agregación de las mismas (Dobson, 2004; Jahn y Radford, 2005). La habilidad de los tejidos y células de mantener la proteostasis de manera natural declina durante la vejez, manifestándose en una acumulación de proteínas mal plegadas que permite la formación de depósitos agregados, toxicidad celular y muerte de la célula (Kim y col, 2013). Adicionalmente a este proceso natural, el plegamiento incorrecto puede ser causado por mutaciones en la proteína que modifican la cinética de plegamiento o disminuyan la estabilidad del estado nativo (Bross y col., 2008). Así también, moléculas mal plegadas se pueden formar bajo ciertas condiciones de estrés celular, como en los casos de choque térmico y de incremento sostenido de la síntesis de proteínas, con la consecuente disminución de la capacidad funcional de los sistemas de control del plegamiento (Edor y Durham, 2006; Gregersen y col., 2006).

El plegamiento anómalo de las proteínas puede producir la pérdida parcial o total de la función de la proteína involucrada (Gregersen y col., 2001; Waters, 2001), así como la acumulación, en los diferentes compartimentos celulares y el espacio extracelular, de oligómeros solubles con propiedades citotóxicas, agregados amorfos o bien, agregados específicos estructurados de tipo fibrilar (denominados fibras amiloides) (figura 1.6).

En los últimos 20 años estos estados agregados han sido relacionados con una serie de patologías reunidas bajo el término de “enfermedades por plegamiento incorrecto de las proteínas” (Dobson, 1999; Gregersen y col., 2006), también conocidas como enfermedades conformacionales. Dentro de este grupo de enfermedades, las relacionadas con fibras amiloides (denominadas amiloidosis), han sido extensamente estudiadas debido a que muchas de ellas representan problemas de salud de primer orden para los humanos (Alzheimer, encefalopatías espongiiformes o las amiloidosis sistémicas) (Hirschfield, 2004).

Toda esta información ha dado pie al surgimiento de un nuevo panorama energético de plegamiento (modelo del embudo doble) (figura 1.6), donde el plegamiento y la agregación se encuentran en constante competencia. En este modelo, las fibras amiloides representan un estado de organización estructural final de menor energía que el estado nativo (estabilizado por contactos intramoleculares), que se adquiere mediante una serie de contactos intermoleculares entre varias moléculas de la misma proteína (Jahn y Radford, 2005).

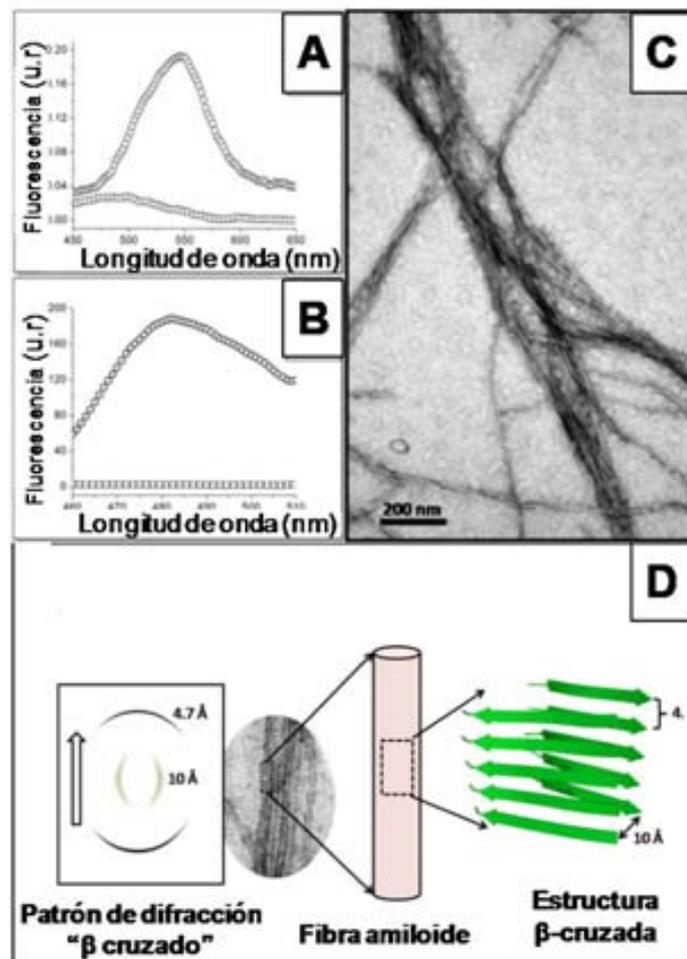


**Figura I6. Nuevo panorama energético del plegamiento.** Dos embudos paralelos y conectados por la parte superior muestran de manera más correcta las posibilidades conformacionales durante el plegamiento de las proteínas. El embudo que lleva al estado nativo está regido por contactos intramoleculares, mientras que el embudo que lleva a la formación de diferentes tipos de agregados se rige por contactos intermoleculares. Adaptado de Kim (2013).

### 12.1. Características generales de las fibras amiloides

El componente fundamental de los depósitos en cada tipo de amiloidosis son agregados fibrilares insolubles de una proteína particular o sus fragmentos (Hirschfield, 2004; Chiti y Dobson, 2006). Las fibras amiloides son agregados proteicos ordenados y muy inertes, los cuales poseen propiedades comunes de apariencia microscópica y sub-microscópica, así como tintoreales y espectroscópicas, lo cual sugiere que comparten elementos estructurales fundamentales (Sunde y Blake, 1998). Entre estas características comunes de los amiloides se encuentra la capacidad de unir colorantes y fluoróforos específicos, Congo red y la tioflavina-T, lo cual modifica las propiedades de absorción y fluorescencia respectivamente; al provocar un desplazamiento hacia el rojo en el espectro de absorción, en el primer caso y, un aumento del máximo de fluorescencia en el segundo caso (figura 17.A-B) (LeVine, 1993).

Al microscopio electrónico de transmisión (TEM), los depósitos de amiloide están compuestos por un conjunto de unos 2 a 6 protofilamentos entreligados entre ellos, de aspecto recto y rígido, de longitud variable, pero con diámetros en el orden de los 75 a los 120 Å (figura 17.C) (Serpell y col., 2000). Los estudios de difracción de rayos X de fibras alineadas, obtenidas tanto de muestras *ex vivo* como producidas *in vitro*, dan un patrón común denominado “β-cruzado”, que indica que las fibras amiloides están formadas por hojas-β extendidas orientadas paralelamente al eje longitudinal de la fibra, mientras las hebras que las forman se disponen perpendicularmente a éste eje (figura 17.D) (Makin y Serpell, 2005).



**Figura 17. Propiedades espectroscópicas, morfológicas y patrón de difracción de agregados fibrilares obtenidas *in vitro*.** **A)** Espectro de absorción de luz de rojo Congo. **B)** Espectro de emisión de fluorescencia de tioflavina T en presencia de agregados fibrilares (○) y de la forma soluble (□) de un dominio V<sub>L</sub> recombinante. **C)** Imágenes TEM de la morfología de las fibras amiloides. **D)** Patrón de difracción de rayos X y estructura β cruzada de las fibras amiloides. Adaptado de Makin y Serpell (2005).

**I2.2. Amiloidosis: características generales**

Las amiloidosis son un grupo de enfermedades degenerativas, clínica y bioquímicamente muy heterogéneas, que se caracterizan por la deposición extracelular de agregados fibrilares insolubles de naturaleza proteica. A este grupo pertenecen enfermedades muy relevantes de la patología humana como la diabetes mellitus tipo II, las enfermedades de Parkinson y Alzheimer, la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (variante en humanos de la encefalopatía espongiforme bovina), la polineuropatía familiar amiloidótica, la amiloidosis asociada a la diálisis renal crónica y la amiloidosis derivada de las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas (AL), entre otras (Hirschfield, 2004; Buxbaum, 2006).

La heterogeneidad clínica de las amiloidosis deriva de la amplia y diversa distribución tisular de los depósitos amiloides. Las amiloidosis localizadas, como el término lo indica, se limitan a un único órgano o tipo de tejido; por ejemplo, en la diabetes mellitus tipo II y la enfermedad de Alzheimer los órganos afectados son el páncreas y el cerebro, respectivamente. En contraste, en las amiloidosis sistémicas, como es la amiloidosis AL, varios órganos están involucrados (tabla I1). La deposición amiloide se asocia a la aparición de un conjunto de signos y síntomas que reflejan el grado de disfunción del órgano u órganos involucrados, condición que generalmente se profundiza con el tiempo si no se modifica mediante acciones terapéuticas. La distribución y cuantía de los depósitos varían notablemente de un tipo de amiloidosis a otro, e incluso, pueden diferir entre pacientes afectados por la misma variante, lo cual determina la considerable heterogeneidad observada en la evolución clínica de los pacientes. Muchas amiloidosis afectan órganos vitales, como el corazón, los riñones, el hígado y el cerebro, por lo que su evolución suele ser generalmente fatal (Jacobson y col., 1998; Hirschfield, 2004; Westermark y col., 2005; Buxbaum, 2003, 2006; Chiti y Dobson, 2006).

**Tabla 11. Amiloidosis humanas.**

Las amiloidosis humanas hacen referencia a un grupo de enfermedades de etiología diversa, pronóstico y tratamiento variables, con una característica común: todas ellas están causadas por el depósito extracelular de un material, denominado material amiloide. En la siguiente tabla, se indican las principales amiloidosis humanas ya sea de tipo sistémica (S, involucrando varios órganos) o localizada (L, involucrando un único órgano o tipo de tejido), así como, las proteínas amiloides precursoras.

<u>Precursor</u>	<u>Tipo de plegamiento (estructura secundaria)</u>	<u>Amiloide</u>	<u>Sistémica (S) o localizada (L)</u>	<u>Síndrome</u>
Cadena ligera de inmunoglobulinas	Inmunoglobulinas (todo- $\beta$ )	AL	S,L	Primario y secundario a mieloma múltiple
Cadena pesada de inmunoglobulinas	Inmunoglobulinas (todo- $\beta$ )	AH	S,L	Primario y secundario a mieloma múltiple
$\beta_2$ microglobulina	Inmunoglobulinas (todo- $\beta$ )	A $\beta_2$ M	S, ¿L? (Articulaciones)	Asociado a hemodiálisis
Transtiretina (mutantes silvestres)	Prealbúmina ( $\alpha+\beta$ )	ATTR	S	Familiar Senil sistémico
Apoproteína sérica AA	Desconocido (Todo- $\alpha$ )	AA	S	Secundario a inflamación crónica
Apolipoproteína AI (Fragmento N-terminal)	No estructurado en condiciones nativas	AApoAI	S	Familiar
Apolipoproteína II (Fragmento N-terminal)	Desconocido	AApoAII	S	Familiar
Apolipoproteína IV (Fragmento N-terminal)	Desconocido	AApoAIV	S	Esporádico asociado al envejecimiento
Gelsolina (Mutantes)	No estructurado en condiciones nativas	AGel	S	Familiar (Variante finlandesa)
Lisozima (Mutantes)		ALys	S	Familiar
Cadena $\alpha$ del Fibrinógeno	Desconocido	AFib	S	Familiar
Proteína precursora A $\beta$	No estructurado en condiciones nativas	A $\beta$	L	Enfermedad de Alzheimer, demencia senil
Proteína prion	No estructurado en condiciones nativas (segmento 1-120) y hélice- $\alpha$ (121-230)	APrP	L	Encefalopatías espongiformes transmisibles
Pro-Calcitonina	No estructurado en condiciones nativas	Acal	L	Carcinoma medular del tiroide
Polipéptido amiloide insular (Amilina)	No estructurado en condiciones nativas	AIAPP	L	Diabetes mellitus tipo II
Polipéptido atrial natriurético	No estructurado en condiciones nativas	AANF	L	Deposición en Aurículas (Atrios)
Prolactina	Cuatro hélices de citoquinas (Todo- $\alpha$ )	APro	L	Senil (Glándula pituitaria ) Prolactinomas
Insulina	Insulina (Todo- $\alpha$ )	AIns	L	Latrogénico (Sitio de inyección)
Lactaderina (Medina)	Desconocido	AMed	L	Senil aórtico
Keratoepitelina	Desconocido	AKer	L	Familiar (Córnea)
Lactoferina	Proteína periplásmica de unión ( $\alpha+\beta$ )	ALac	L	Córnea

### **I3. Alzheimer**

La enfermedad de Alzheimer (de la traducción: *Alzheimer's disease*, AD) es una de las patologías neurodegenerativas más frecuentes, constituyendo la causa más habitual de demencia en adultos mayores de 65 años (Solomon, 2007). Estudios epidemiológicos realizados recientemente por la Organización Mundial de la Salud (de la traducción: *World Health Organization*, WHO) estiman que en el año 2011 hubo una incidencia de 36 millones de personas con demencia a nivel mundial, de igual forma, estiman la aparición anual de 7.7 millones de nuevos casos y, pronostican que para el año 2050 se esperan 115 millones de personas afectadas por demencia (WHO y ADI, 2012). Es por esto, que la AD es considerada un problema de salud pública en países desarrollados, con importantes implicaciones a nivel médico, económico y social (Selkoe y Schenk, 2003).

#### **I3.1. Fisiopatología y anatomopatología de Alzheimer (AD)**

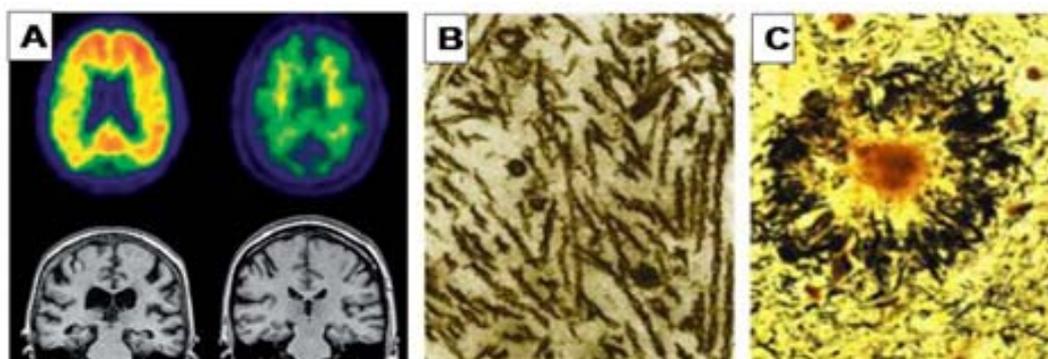
La patología se caracteriza en su forma típica por una pérdida progresiva e irreversible de la memoria y de otras capacidades mentales, a medida que las células nerviosas (neuronas) mueren y diferentes zonas del cerebro se atrofian, principalmente la corteza cerebral y el hipocampo (figura I8.A). En particular, estas afectaciones se dan en la neocorteza, el área entorrinal, el hipocampo, el núcleo amigdalino, el núcleo basal, el tálamo anterior y varios núcleos monoaminérgicos del tronco encefálico. La progresión de la neuropatología de Alzheimer inicia desde el córtex transentorrinal, en los primeros estadios, extendiéndose al resto del sistema límbico hasta una expansión difusa en el neocórtex e hipocampo (Braak y Braak, 1991; Selkoe y Schenk, 2003).

El paciente manifiesta un deterioro cognitivo general, como pérdida del sentido de la orientación espacio-temporal, trastornos conductuales y deficiencias en funciones motoras (Selkoe y Schenk, 2003).

Fisiológicamente, la patología se caracteriza por la presencia de alteraciones típicas (Sangram y col., 2002; Selkoe y Schenk, 2003; Mattson, 2004):

- i. La acumulación intracelular de ovillos neurofibrilares de proteína tau (normalmente asociada a microtubulos) hiperfosforilada y con modificaciones oxidativas (figura I8.B).
- ii. La presencia extracelular de placas amiloides compuestas por fibrillas del péptido  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ) rodeadas de dendritas y axones distróficos, microglia activada y astrocitos reactivos (figura I8.C). Estas se observan en el hipocampo, la amígdala y en la corteza que asocia los lóbulos frontal, parietal y temporal.

- iii. Depósitos difusos extracelulares del péptido A $\beta$  que generalmente no presentan fibras amiloides ni se encuentran asociados a glia o neuronas distróficas.
- iv. Activación de procesos inflamatorios y de respuesta inmune innata.



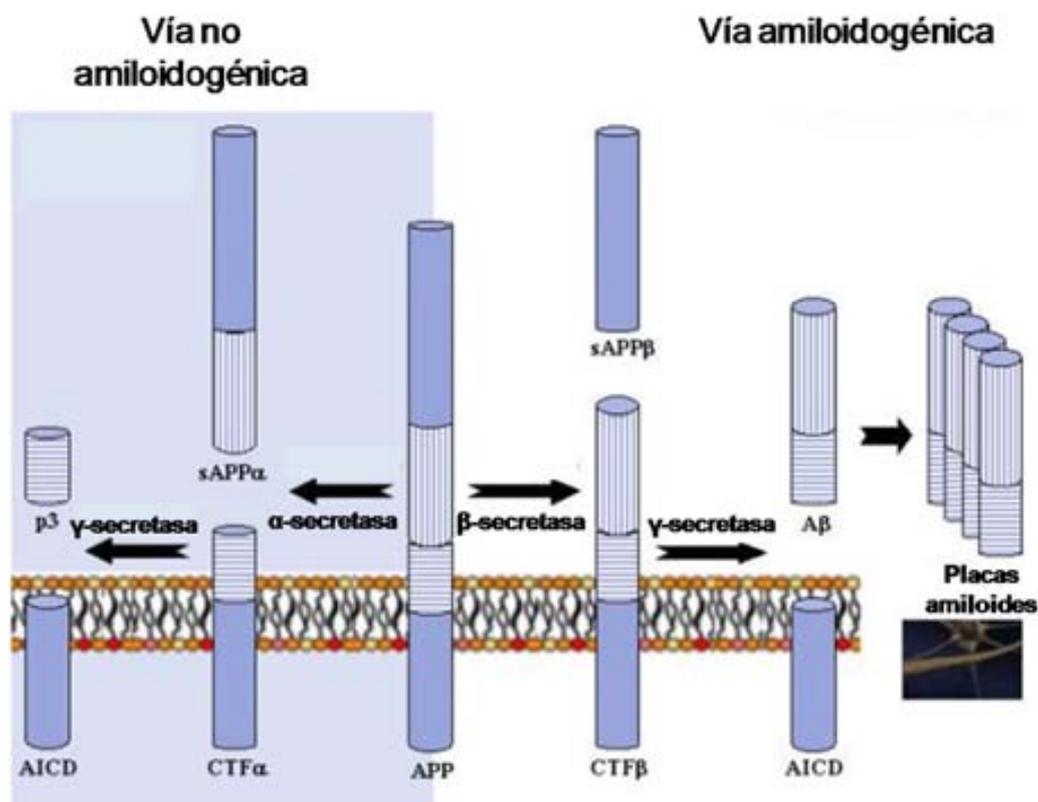
**Figura 18. Lesiones y fisiología cerebral en pacientes de AD. A) Visualización del cerebro en diferentes fases de la enfermedad.** La degeneración y muerte neuronal se manifiesta principalmente en la corteza cerebral y el hipocampo. Izquierda: paciente con AD en fase severa; imagen por PIB PET donde se observa una importante carga amiloide (superior izquierda) e imagen por MRI (inferior izquierda). Derecha: paciente con AD en fase temprana; carga amiloide menor (superior derecha) e hipocampo normal (inferior derecha). **B) ovillos neurofibrilares de tau** y **C) Placas amiloides.** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica. Adaptado de Sangram y col. (2002) y de Clifford y col. (2010).

### 13.2. Etiología de la enfermedad

La teoría más aceptada de la etiología y patogénesis de la enfermedad se relaciona con la hipótesis de la “cascada amiloide”, la cual postula la sobreproducción, agregación y deposición de péptidos A $\beta$  (particularmente el péptido A $\beta_{1-42}$ , el de mayor potencial fibrilogénico) en las placas amiloides, como el inicio de la cascada de procesos neurodegenerativos que ocasionan la pérdida neuronal y demencia (Selkoe y Schenk, 2003). En apoyo de esta hipótesis, se ha observado que mutaciones cerca de los sitios de procesamiento de la APP (*Amyloid Precursor Protein*) y/o en los genes de las presenilinas (PS1 y PS2), componentes catalíticos de los complejos de secretasas que procesan la APP, se asocian al incremento en la producción del péptido A $\beta_{1-42}$  y causan una forma hereditaria, autosómica dominante, de la enfermedad de Alzheimer (Selkoe, 2001; Sangram y col., 2002). Normalmente, la proteína APP (glicoproteína de 770 residuos, presente en todos los tipos neuronales y también en otros tejidos) es procesada por la acción proteolítica secuencial de dos enzimas: la  $\alpha$ -secretasa y la  $\gamma$ -secretasa (vía no amiloidogénica).

Los productos resultantes son péptidos solubles útiles para el normal funcionamiento de las células. Pero en AD, la actuación de la  $\beta$ -secretasa en lugar de la  $\alpha$ -secretasa (vía amiloidogénica), ocasiona la liberación de péptidos A $\beta$  (péptidos de 39 a 43 residuos) de carácter insoluble (Kang y col., 1987) (figura 19). La forma más común es la de 40 residuos (A $\beta_{1-40}$ ), poco soluble, existiendo otras formas como la de 42

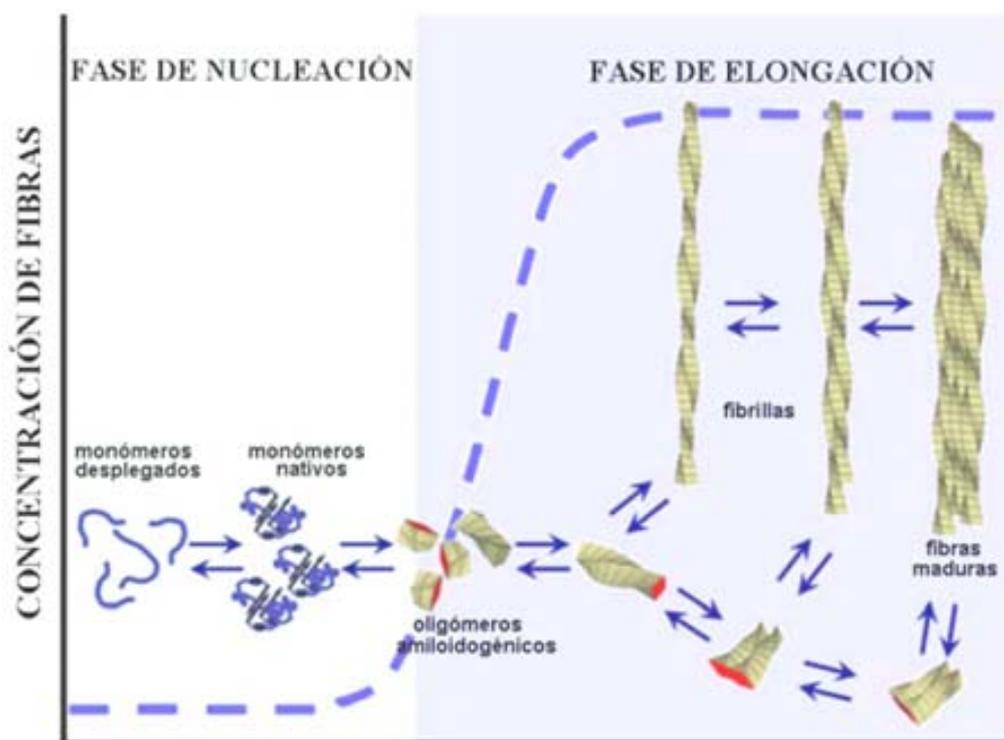
residuos ( $A\beta_{1-42}$ ) o la de 43 residuos ( $A\beta_{1-43}$ ), que son más insolubles que la forma  $A\beta_{1-40}$  y forman fibrillas de manera más rápida. Respecto a la APP, la resultante de la proteólisis con  $\alpha$ -secretasa (vía no amiloidogénica) se denomina  $sAPP\alpha$  (s de soluble), mientras que la resultante de la proteólisis con  $\beta$ -secretasa (vía amiloidogénica) se denomina  $sAPP\beta$ .



**Figura I9. Procesamiento de la APP.** La APP puede ser procesada de diferentes maneras por diferentes conjuntos de enzimas, una vía conduce a la formación de la placa amiloide (amiloidogénica), mientras que la otra no (no amiloidogénica). En la vía no amiloidogénica actúa el  $\alpha$ -secretasa produciendo inicialmente un fragmento N-terminal soluble ( $sAPP\alpha$ ) y un fragmento C-terminal ( $CTF\alpha$ ), para finalmente, actuar el  $\gamma$ -secretasa y producir un fragmento N-terminal soluble ( $p3$ ) y un fragmento C-terminal unido a membrana ( $AICD$ ). La vía amiloidogénica se genera cuando actúa el  $\beta$ -secretasa en lugar del  $\alpha$ -secretasa produciendo un fragmento N-terminal soluble ( $sAPP\beta$ ) y un fragmento C-terminal unido a membrana ( $CTF\beta$ ). El producto mayoritario de la vía amiloidogénica es el péptido  $A\beta_{1-40}$ , mientras que el  $A\beta_{1-42}$  es menos abundante, pero tiene un carácter más hidrofóbico y una mayor tendencia a formar agregados. Adaptado de [http://www.nature.com/.../v3/n4/fig\\_tab/nrn785\\_F4.html](http://www.nature.com/.../v3/n4/fig_tab/nrn785_F4.html).

El modelo de agregación del péptido  $A\beta$  más aceptado hoy en día, consiste en un mecanismo de polimerización dependiente de nucleación (figura I10). El péptido secretado al espacio extracelular en forma monomérica actúa como núcleo de agregación, dando lugar a oligómeros solubles que se asocian dando lugar a la formación de protofibrillas que, a su vez, se ensamblan entre sí para dar lugar a las conocidas fibras amiloides. Recientemente se han dado evidencias que sugieren a los oligómeros solubles y a las protofibrillas, pero no a las fibras maduras (de las que se

creé resultan un mecanismo de autoprotección), como las principales especies neurotóxicas que inician la cascada neuropatológica (Haass y Selkoe, 2007).



**Figura I10. Modelo de agregación del péptido A $\beta$ .** El modelo es dependiente de nucleación y está basado en observaciones experimentales, entre otras, una cinética sigmoide característica, con una lenta fase de nucleación, seguida de una fase rápida de elongación que da lugar a las fibras maduras. Adaptado de Kirkitadze y col. (2001).

### I3.3. Modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer

Dada la importancia del rol genético en la AD, al día de hoy, se han desarrollado diversos modelos experimentales de AD procedentes de la tecnología de los transgenes. Estos modelos han permitido, tanto el mejor entendimiento de la patogénesis (por ejemplo, factores neurotróficos implicados), como el desarrollo y la evaluación de nuevos tratamientos (test de vacunas, agentes neuroprotectores y terapia génica) (hmad-Annular y col., 2003; Trancikova y col., 2011).

Aunque hay trabajos sobre modelos experimentales celulares (cultivos de neuronas hipocámpicas maduras) (Lacor y col., 2007), modelos experimentales en ratas (Iwata y col., 2000), en embriones de pollo (Carrodegua y col., 2005), en invertebrados como *Drosophila melanogaster* o *Caenorhabditis elegans* (Langui y col., 2007), y se postule la conveniencia de emplear otros modelos como el perro, los primates o cetáceos por su proximidad filogenética y su mayor longevidad (similar al hombre) (Sarasa, 2006), la mayor parte de los trabajos se fundamentan en modelos murinos transgénicos (Sarasa y col., 2006; Hall y Roberson, 2013). La principales ventajas de

los modelos murinos transgénicos son: i) el alto grado de conservación filogenética con los humanos en la arquitectura y función del hipocampo y la corteza entorrinal (regiones involucradas en la memoria episódica y vulnerables en la AD) (hmad-Annuar y col., 2003); ii) la similitud en el número de genes y una considerable homología a nivel del 99% del genoma humano (*Mouse Genoma Sequencing Consortium*, 2002); iii) el hecho que presentan características fenotípicas de AD, como la acumulación de componentes tóxicos ( $A\beta$ , tau), patrones de conducta y deficiencias cognitivas estandarizadas; iv) constituyen modelos ideales para la evaluación de la efectividad de tratamientos en etapas tempranas presintomáticas (preclínicas) de AD (Zahs y Ashe, 2010) y; v) la relativa facilidad del mantenimiento de los modelos, entre otras.

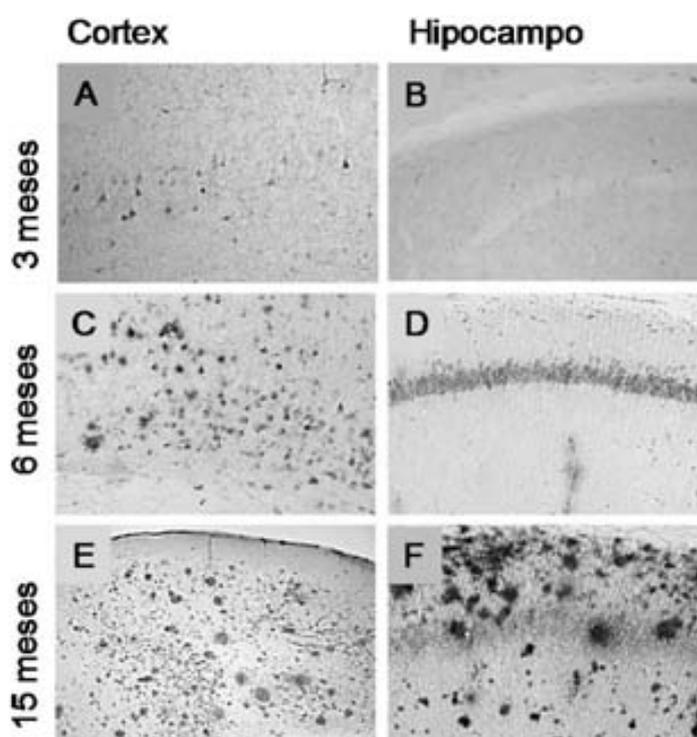
Los modelos actuales de ratones transgénicos, se clasifican en función de la proteína humana mutada que codifica el transgen (McGowan y col., 2006):

1. Modelos de *hAPP*. Ratones transgénicos que sobreexpresan APP humana-*wild-type* (WT), o, más comúnmente, formas mutadas que presentan algunos humanos. En estos ratones se secreta el péptido  $A\beta_{1-42}$ .
2. Modelos basados en la mutación de presenilina 1 (*PS1*) y modelos doble transgénicos de *hAPP/PS1*. En estos ratones se incrementan la cantidad de péptido  $A\beta_{1-42}$  secretada.
3. Modelos basados en el transgen *APOE4*. Los estudios de asociación del genoma completo en humanos (GWAS, *Genome-wide association studies*, o WGAS, *Whole genome association studies*) apuntan que el alelo *APOE4* es un factor de riesgo para la AD, incrementando la posibilidad de desarrollar la enfermedad y la edad de inicio.
4. Modelos basados en tau humana. Ratones que expresan la proteína tau humana mutada  $\tau_{P301L}$  que causa la degeneración de los neurofilamentos.
5. Modelo triple transgénico (3xTg-AD). Ratones que expresan los transgenes *APP<sub>Swe</sub>*, *TAU<sub>P301L</sub>* y *PS1<sub>M146V</sub>*, y muestran deposición de  $A\beta$  y formación de ovillos neurofibrilares de tau de manera dependiente de la edad y en las mismas regiones en las que se dan en humanos, así como déficits cognitivos (Oddo y col., 2003).

El modelo ideal de AD debería desarrollar todo el rango de características clínicas y patológicas de la enfermedad: incluyendo las deficiencias cognitivas y de conducta, las placas amiloides y ovillos neurofibrilares, gliosis, pérdida sináptica, axonopatía, pérdida neuronal y neurodegeneración. Y, aunque a la fecha existen numerosos modelos de ratones transgénicos que reproducen en diferente grado las características de la enfermedad, aun no existe un modelo que las exhiba todas. A

pesar de eso, el modelo 3xTg-AD es el que incorpora la mayoría de las características propias de la enfermedad, considerándosele el más adecuado para la evaluación preclínica de tratamientos (Hall y Roberson, 2013).

Dentro de las características patológicas humanas de AD incorporadas en el modelo murino 3xTg-AD, se encuentra la progresión neuroanatomica. En este sentido, el grupo que desarrolló dicho modelo encontró en animales jóvenes de 3 meses de edad (correspondiente a estadios tempranos de la enfermedad) la presencia de depósitos A $\beta$  en córtex, no así en el hipocampo. De igual forma, dicho modelo presenta una progresión de la carga A $\beta$ , intra y/o extracelular, que va desde el córtex hacia el hipocampo. Finalmente señalar que en animales viejos de 15 meses de edad (correspondiente a estadios tardios de la enfermedad) los depósitos A $\beta$  se encuentran fuertemente extendidos tanto en córtex como en hipocampo (figura I11) (Oddo y col., 2003).



**Figura I11. Progresión neuroanatómica cerebral de los depósitos A $\beta$  en ratones 3xTg-AD.** Cortes Inmunohistológicos de secciones coronales de córtex (A, C y E) e hipocampo (B, D y F) en ratones de 3, 6 y 15 meses de edad, utilizando anticuerpos específicos para A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Los depósitos A $\beta$  se inician en córtex a partir de los 3 meses de edad y progresivamente avanzan hacia el hipocampo, encontrándose extendidos tanto en córtex como en hipocampo a los 15 meses de edad. Reproducido de Oddo y col. (2003).

## **I4. Inmunoterapia**

Actualmente la terapia existente para pacientes de AD se sigue basando en tratamientos sintomáticos, por lo que son únicamente paliativos. Entre las nuevas líneas de investigación más prometedoras se encuentra la denominada inmunoterapia, que consiste en provocar una respuesta inmune frente a los depósitos de péptidos patógenos causantes de la enfermedad, de tal forma que se estimula la reducción de las placas de A $\beta$  del cerebro (Schenk y col., 1999; Sakai y Yamada, 2013; Lambracht-Washington y Rosenberg, 2013; Kanemaru, 2013). Básicamente pueden distinguirse 2 estrategias de inmunización para la AD: la inmunización activa (mediante administración del antígeno, es decir, el péptido A $\beta$  o un fragmento de él) y la inmunización pasiva (mediante administración de anticuerpos monoclonales, o derivados, anti-A $\beta$ ) (Schenk y col., 1999; Moreth y col., 2013).

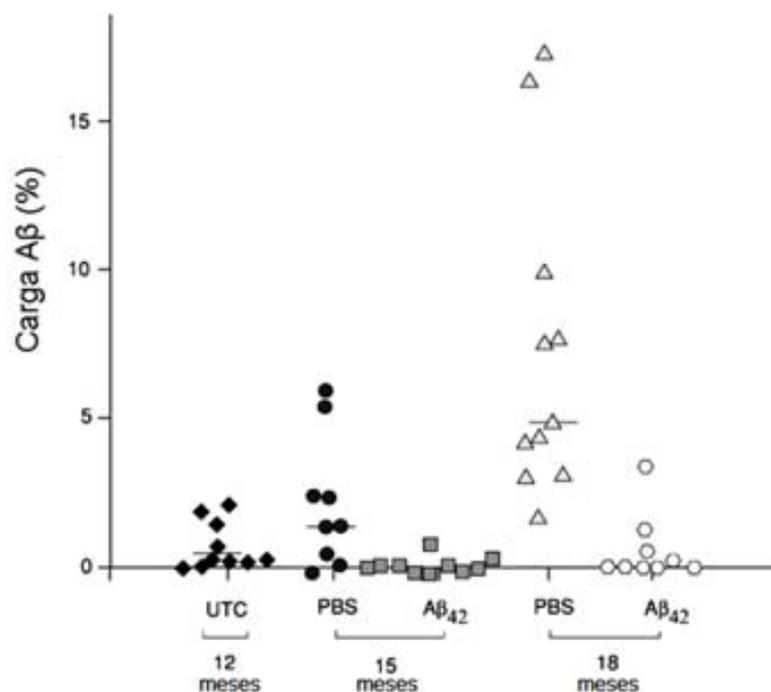
### **I4.1. Inmunización activa**

Hoy día existen diversos estudios de este tipo de inmunización en los que se han empleado distintas vías de administración del antígeno, tipos de coadyuvante, uso de epítomos A $\beta$  modificados y/o conjugados inmunológicos A $\beta$ . En particular, se han realizado diversos ensayos con el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> (o fragmentos derivados de él) administrándolo a ratones transgénicos PDAPP que desarrollaron y mantuvieron un alto título de anticuerpos contra dicho péptido en el suero sanguíneo, así como, una marcada reducción del número y densidad de los depósitos de A $\beta$  en el cerebro (Schenk y col., 1999); e incluso, una reducción en paralelo de las neuritas distróficas y astrocitosis (figura I12) (Lombardo y col., 2003).

Trabajos posteriores encontraron que la inmunización anti-A $\beta$  se asocia con una mejoría en las funciones cognitivas en ratones transgénicos, tanto si se acompañaba de reducción en la carga amiloide del cerebro (Morgan y col., 2000; Janus y col., 2001) como si no (Dodart y col., 2002).

En vista de los excelentes resultados obtenidos en extensos estudios preclínicos de seguridad en varias especies animales (ratones, conejos, hamsters y primates no humanos), *Elan Pharmaceuticals* procedió a la inmunización con un formulado de A $\beta$ <sub>1-42</sub> sintético pre-agregado junto al adyuvante inmunogénico QS-21 en un ensayo internacional, multicéntrico, randomizado que se inició en el año 2001 para evaluar la seguridad, tolerabilidad y eficacia clínica (AN1792). El ensayo clínico fue detenido en fase IIa debido a que el 6% de los pacientes inmunizados desarrollaron meningoencefalitis aséptica subaguda tras la inmunización. El examen postmortem de dos pacientes que habían participado en el ensayo AN-1792 reveló escasez de placas en el neocórtex y ausencia de neuritas distróficas y astrocitos reactivos; sin embargo,

se detectó microglía activada (Senior, 2002; Gilman y col., 2005). Adicionalmente, aquellos pacientes que participaron en el estudio y se inmunizaron correctamente mostraron, incluso 1 año después de la última dosis, un menor declive cognitivo que los pacientes que no se inmunizaron (Hock y col., 2003).

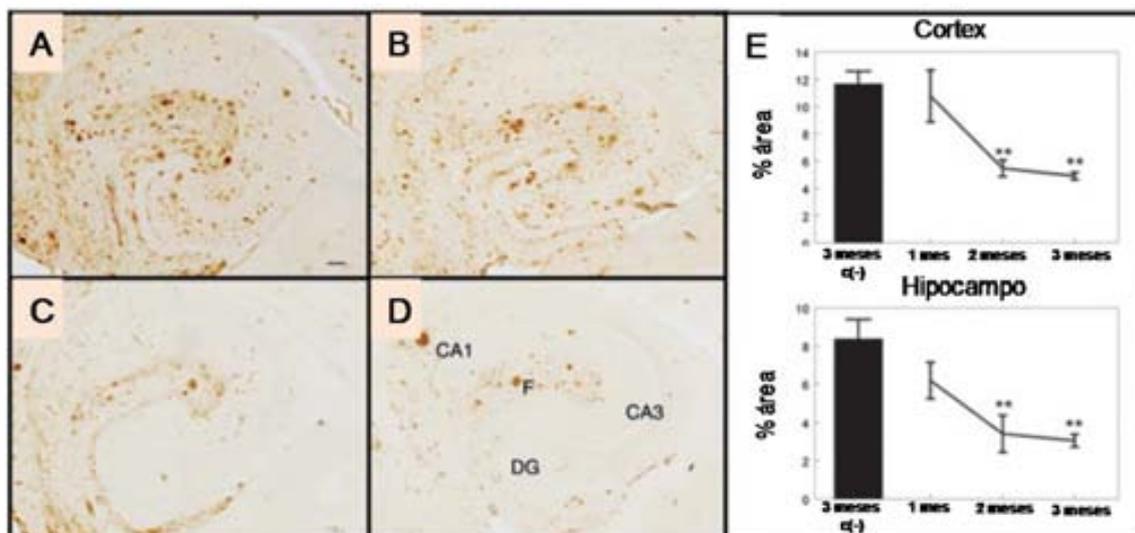


**Figura I12. Análisis cuantitativo de la carga amiloide en células corticales de ratones PDAPP.** El tratamiento comenzó a los 11 meses de edad. La carga de amiloide se redujo significativamente en el grupo vacunado con el péptido A $\beta$ , en comparación con los controles con PBS, a los 15 y 18 meses de edad. El valor medio de la carga amiloide para cada grupo se muestra como una línea horizontal. UTC: controles no tratados; PBS: controles con tampón fosfato salino; A $\beta$ <sub>42</sub>: animales vacunados con el péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Reproducido de Schenk y col. (1999).

#### I4.2. Inmunización pasiva

La eficacia, alta especificidad y selectividad de la interacción anticuerpo-antígeno para neutralizar o secuestrar venenos, toxinas o agentes patológicos, entre otras cosas, hacen que las terapias con anticuerpos monoclonales y sus derivados representen hoy en día una de las áreas de mayor crecimiento en la farmacología (Fu y col., 2010).

Los estudios con inmunización pasiva incluyen el uso de anticuerpos monoclonales (mAb) o fragmentos de anticuerpos específicos dirigidos contra epítomos estratégicos de A $\beta$ <sub>1-42</sub> (tales como el extremo N-terminal, EFRH) (Frenkel y col., 2003). En sistemas murinos transgénicos para APP se ha mostrado su efectividad para prevenir o eliminar la deposición amiloide (figura I13), dependiendo de si el tratamiento se inicia antes o tras el comienzo de la deposición, pudiendo incluso prevenir el deterioro cognitivo en dicho modelo animal (DeMattos y col., 2001; Wilcock y col., 2004).



**Figura 113. Inmunohistoquímica A $\beta$ .** Marcaje de A $\beta$  en el hipocampo de ratones transg $\acute{e}$ nicos APP despu $\acute{e}$ s de 3 meses de tratamiento. **A)** Control a los 3 meses:  $\acute{a}$ rea marcada en esta secci $\acute{o}$ n 9%; **B)** al mes de tratamiento:  $\acute{a}$ rea proporcional 7%; **C)** a los 2 meses de tratamiento:  $\acute{a}$ rea 3%; **D)** a los 3 meses de tratamiento:  $\acute{a}$ rea 2.5%. Amplificaci $\acute{o}$ n 40x. **E)** Gr $\acute{a}$ fico de la cuantificaci $\acute{o}$ n del  $\acute{a}$ rea proporcional ocupada por el p $\acute{e}$ ptido A $\beta$  en el l $\acute{o}$ bulo frontal e hipocampo. Reproducido de Wilcock y col. (2004).

Se han propuesto tres mecanismos de acci $\acute{o}$ n de los anticuerpos anti-A $\beta$  en la reducci $\acute{o}$ n de los dep $\acute{o$ sitos cerebrales de amiloide:

- i. El primer mecanismo requiere que los anticuerpos anti-A $\beta$  atraviesen la barrera hematoencef $\acute{a}$ lica (BBB, *Blood-Brain Barrier*) accediendo al sistema nervioso central (CNS, *Central Nervous System*) donde se unen a los agregados A $\beta$  (fibrillas y/o olig $\acute{o}$ meros de bajo peso molecular), eliminando las placas amiloides al desplazar el equilibrio (Solomon y col., 1997).
- ii. El segundo mecanismo sugiere que el anticuerpo anti-A $\beta$  induce la reducci $\acute{o}$ n de los agregados A $\beta$  por la activaci $\acute{o}$ n de la microglia y fagocitosis mediada por receptores Fc (Schenk y col., 1999; Bart y col., 2000).
- iii. El tercer mecanismo postula que el anticuerpo anti-A $\beta$  reduce la concentraci $\acute{o}$ n efectiva libre de A $\beta$  en el sistema perif $\acute{e}$ rico (torrente sangu $\acute{i}$ neo), generando una alteraci $\acute{o}$ n en el flujo neto de p $\acute{e}$ ptidos A $\beta$  del cerebro al plasma. Se basa en la modulaci $\acute{o}$ n de un proceso cin $\acute{e}$ tico y termodin $\acute{a}$ micamente reversible, como lo es la formaci $\acute{o}$ n de placas amiloides, modificando el estado de equilibrio entre las formas A $\beta$  solubles presentes en el CNS y en el sistema perif $\acute{e}$ rico (DeMattos y col., 2001).

Aún se desconoce el mecanismo exacto por el que los anticuerpos consiguen los efectos descritos, existiendo evidencias a favor y en contra de estas hipótesis; sin embargo, se considera que estos mecanismos no son mutuamente excluyentes (Arbel y Solomon, 2007).

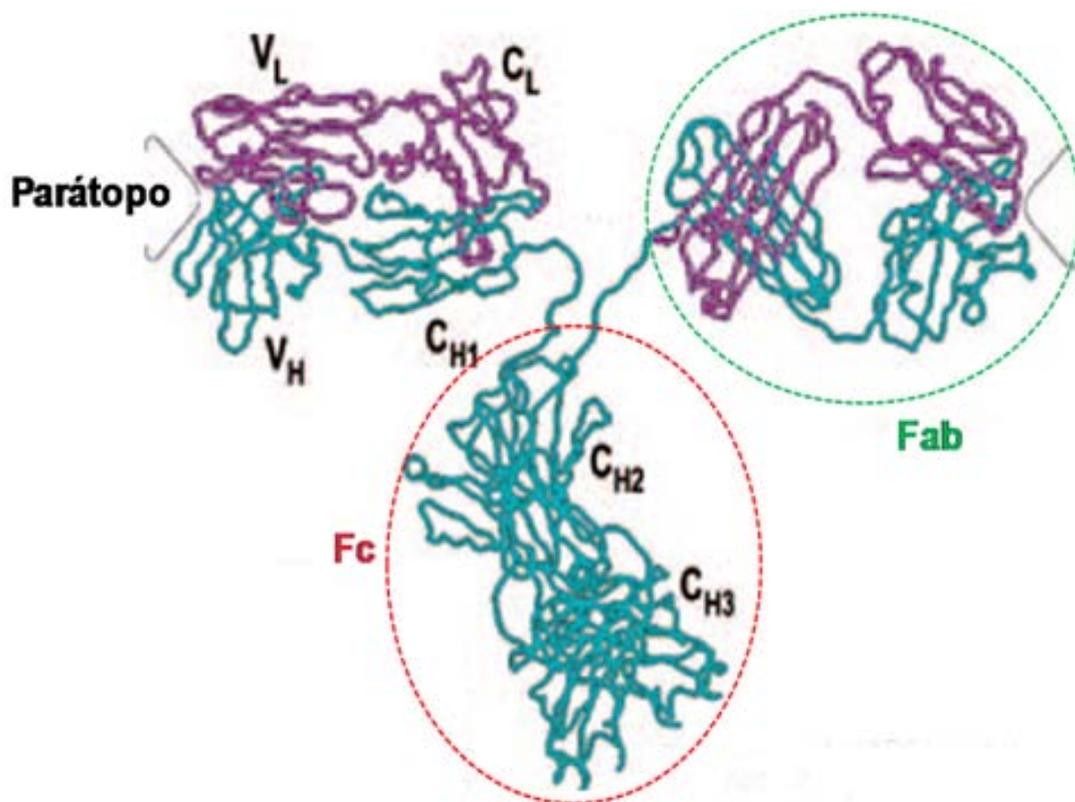
## 15. Anticuerpos

Los anticuerpos (Ab, de *antibodies*) o inmunoglobulinas son producidas por las células B plasmáticas y se producen naturalmente como parte del sistema inmune de los mamíferos mediante el reconocimiento de antígenos en un modelo “llave-cerradura”.

El repertorio de anticuerpos humanos comprende cinco Clases diferentes de anticuerpos: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM (que estructuralmente difieren en sus dominios constantes de la cadena pesada), algunas de las cuales se encuentran subdivididas dentro de diferentes subclases. Y aunque las diferentes Clases tienen diferentes roles en la respuesta inmune natural, en la industria farmacológica la Clase IgG es de las más utilizadas, ya que es el anticuerpo más abundante en la sangre, constituyendo hasta el 80%, además de ser la inmunoglobulina más pequeña, con un peso molecular de 150 kDa, logrando fácilmente pasar del sistema circulatorio a los tejidos; aunado a esto, su síntesis es principalmente controlable por estímulo de los antígenos (Brekke y Sandlie, 2003; Honegger, 2008).

En la figura 14 se muestra la estructura típica de una inmunoglobulina G, que consiste en dos cadenas pesadas (H, cadena azul) y dos cadenas ligeras (L, cadena magenta). La cadena ligera consiste en dos dominios: el dominio variable de la cadena ligera ( $V_L$ ) y el dominio constante de la cadena ligera ( $C_L$ ). En cambio, la cadena pesada consiste en cuatro dominios: el dominio variable de la cadena pesada ( $V_H$ ) y tres dominios constantes ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ ). Cada dominio forma un sándwich- $\beta$  con plegamiento globular compacto (plegamiento de las inmunoglobulinas) y contienen al menos un puente disulfuro intradominio. Las cadenas ligeras y pesadas están conectadas por un puente disulfuro entre el C-terminal de la cadena ligera y el dominio  $C_{H1}$  o la bisagra entre  $C_{H1}$  y  $C_{H2}$ . Las dos cadenas pesadas están conectadas por puentes disulfuro entre las regiones que forman la bisagra. Los dos sitios de reconocimiento al antígeno (parátipo) están localizados al final de los dos brazos de la molécula (en el heterodímero  $V_H/V_L$ ), concretamente cada dominio ( $V_H$  y  $V_L$ ) posee tres pequeñas secuencias hipervariables que son las responsables de la unión al antígeno, denominadas: CDR (*Complementary-Determining Regions*), las cuales están flanqueadas por regiones denominadas FR (*Framework Regions*). Cada brazo de la

molécula (fragmento Fab, *antigen-binding fragments*), consiste en los dominios  $V_L$  y  $C_L$  de la cadena ligera y los primeros dos dominios de la cadena pesada ( $V_H$  y  $C_{H1}$ ). Los dominios  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$  de las dos cadenas pesadas forman parte de la región constante (Fc) de la molécula, el cual contiene los sitios de unión para el complemento y la interacción con el receptor-Fc, siendo responsable de la biodistribución y el aprovechamiento de las funciones inmunes efectoras *in vivo* de los anticuerpos, como por ejemplo la activación de la microglia (Roque y col., 2004; Honegger, 2008).



**Figura I14. Estructura del anticuerpo monoclonal IgG2a.** Las cadenas pesadas se muestran en color azul y las cadenas ligeras se muestran en color magenta. Uno de los brazos del anticuerpo (fragmento Fab:  $V_H$ ,  $C_{H1}$ ,  $V_L$  y  $C_L$ ) se muestra en el círculo verde. Los sitios de unión al antígeno (parátipo) se muestran en triángulos. La región constante (Fc:  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ ) se muestra en el círculo rojo). Adaptado de Harris y col. (1997).

### I5.1. Ingeniería de anticuerpos

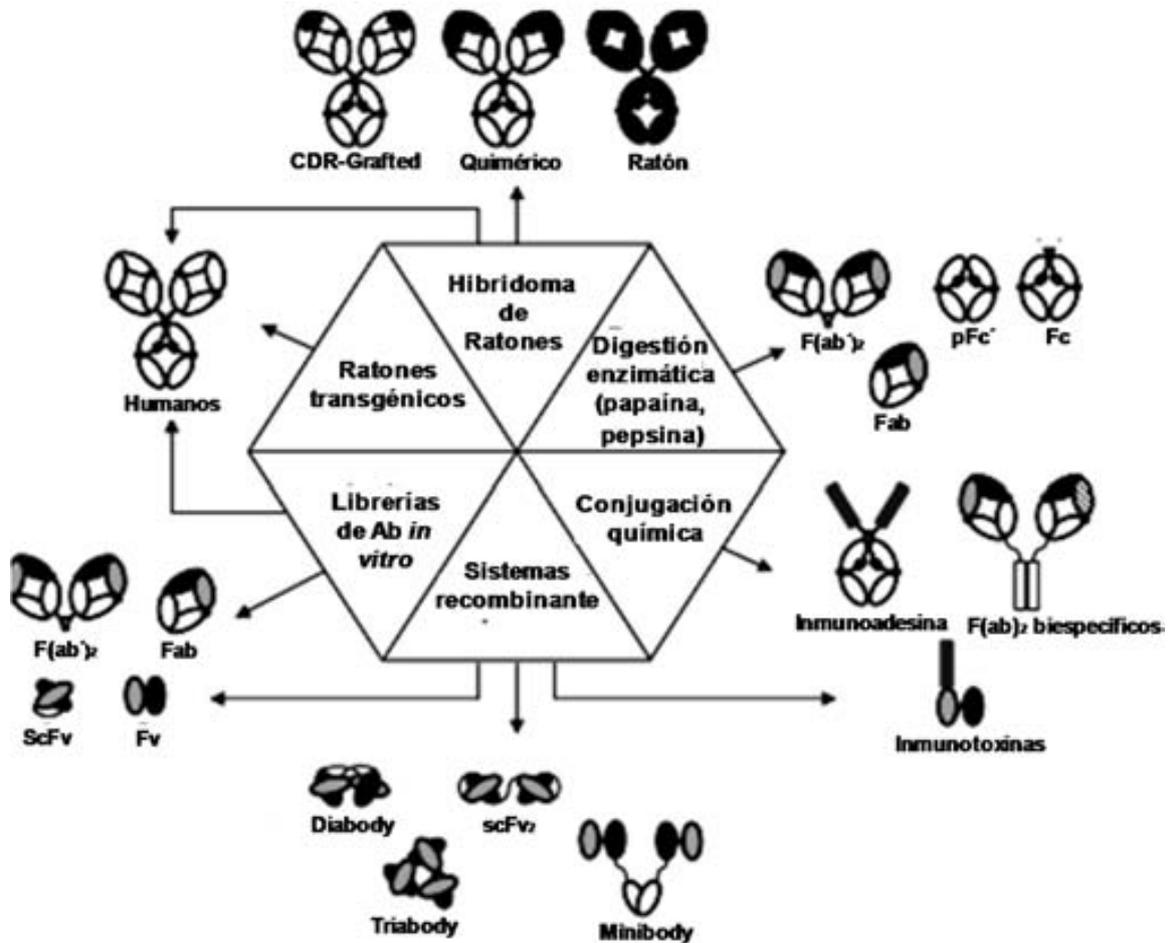
Aunque los anticuerpos se producen de manera natural por el sistema inmune, las necesidades de producir a gran escala anticuerpos con características específicas, aunado a los avances de la ingeniería genética, ha permitido la generación de nuevos anticuerpos o construcciones derivadas de ellos (ingeniería de anticuerpos) con grado farmacéutico y con una alta aplicación en las inmunoterapias. Se estima que en el año

2008, cerca de 200 anticuerpos y derivados formaban parte de ensayos clínicos para el tratamiento de enfermedades específicas (Winter y Milstein, 1991; van Dijk y col., 2001; Honegger, 2008).

La ingeniería de anticuerpos resultó de la integración de la tecnología del hibridoma (Köhler y Milstein, 1975; Tomita y Tsumoto, 2011) con la tecnología del DNA recombinante (Peterson, 1996; Siegel, 2002) y con la técnica del *phage-display* (Pande y col., 2010); dando poderosas herramientas para el diseño y producción de construcciones derivadas de anticuerpos humanos con propiedades deseables de afinidad/especificidad y baja inmunogenicidad (Maynard y Georgiou, 2000; Roque y col., 2004; Honegger, 2008; Buss y col., 2012).

Entre estas construcciones (figura 115) se encuentran: i) anticuerpos completos quiméricos humanizados; ii) fragmentos Fab; iii) fragmentos Fv; iv) moléculas tipo scFv (incluyendo sus formas diméricas, *diabodies*; trimericas, *triabodies*) y; v) multímeros de dominios variables ( $V_H$  o  $V_L$ ).

La creación de estas nuevas moléculas, permite solucionar problemas de inmunogenicidad, provocados tanto por las regiones Fc, como por el uso de anticuerpos murinos. Además, permite mejorar características farmacocinéticas, esto gracias a: i) el uso de anticuerpos monoclonales humanizados (HumAb) en lugar de los Ab murinos (MumAb), evitando inducción de la respuesta de anticuerpos humanos anti-mouse (HAMAb) que aclararían los MumAb del torrente sanguíneo; ii) el uso de construcciones de menor tamaño que el anticuerpo completo, que permite que las moléculas tengan una mejor internalización en los tejidos (por ejemplo: barrera hematoencefalica); iii) la mejora de las propiedades biofísicas de la molécula, tales como una mayor estabilidad termodinámica, una disminución de la propensidad a la agregación y plegamientos más eficientes, y; iv) el aumento de la multivalencia produciendo un aumento en la afinidad funcional (avidez) por el uso de multímeros de: Fabs, scFv y dominios simples de anticuerpos (Roque y col., 2004; Honegger, 2008; Buss y col., 2012; Swartz y col., 2012)

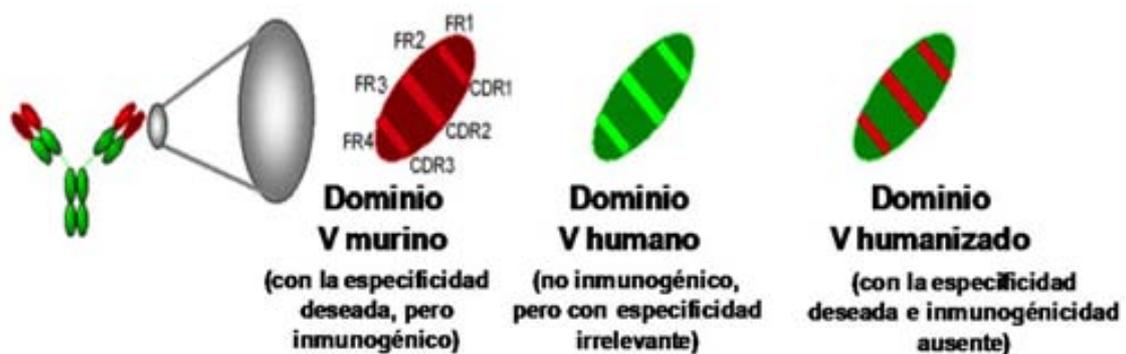


**Figura 115. Ingeniería de anticuerpos y construcciones derivadas.** Ejemplos de construcciones derivadas de anticuerpos y las respectivas vías para su generación. La tecnología del híbrido de ratón ha proporcionado una manera de producir anticuerpos monoclonales de ratón. La ingeniería genética ha permitido el diseño y la producción de construcciones derivadas de anticuerpos humanos con propiedades deseables de afinidad/especificidad, tales como: anticuerpos quiméricos, humanizados, fragmentos de anticuerpos (tradicionalmente obtenidos por digestión parcial de inmunoglobulinas con proteasas), fragmentos de anticuerpos multiméricos, anticuerpos de fusión (inmunoadesinas y inmunotoxinas) y anticuerpos biespecíficos. Los fragmentos de anticuerpos multiméricos (*diabodies*, *triabodies* y *tetrabodies*) se representan como estructuras multivalentes, aunque también pueden ser diseñados para ser multiespecíficos. Adaptado de Roque y col. (2004).

## 15.2. Anticuerpos humanizados

Los anticuerpos monoclonales (mAbs) murinos, pese a ser muy utilizados terapéuticamente, presentan algunos problemas en su utilización en seres humanos, ya que el sistema inmune los identifica como cuerpos extraños y reacciona para destruirlos, por lo que su eficacia terapéutica se ve claramente disminuida. Además pueden presentar posibles efectos secundarios como nefrotoxicidad y reacciones

anafilácticas al estimular la formación de anti-anticuerpos (Brüggemann y col., 1989). Por ello, mediante ingeniería genética se ha podido obtener la humanización de los anticuerpos monoclonales de ratón, evitando así el rechazo del sistema inmune al ser introducidos en humanos. Son los llamados anticuerpos quiméricos. Un anticuerpo quimérico se crea de tal manera que incorpora parte animal (30%) y parte humana (70%) (Brüggemann y col., 1989a). La humanización es una técnica que se basa en la estructura terciaria del sitio de combinación con el antígeno, el parátipo, donde existen unas regiones responsables de la unión al antígeno (CDR) mientras que otras regiones sólo sirven de soporte estructural al parátipo (FR) (figura I16). Por lo tanto, las regiones de soporte estructural se obtienen de un anticuerpo humano mientras que las regiones responsables de la unión al antígeno proceden del anticuerpo generado en ratón (Boulianne y col., 1984; Presta, 2006; Cogne y col., 2009; Bennett y col., 2010).



**Figura I16. Anticuerpo humanizado.** Las regiones que reconocen el antígeno (CDR) provienen de un dominio V murino, mientras que las regiones que no presentan especificidad relevante (FR) funcionan como soporte estructural y provienen de un dominio V humano. Adaptado de: [http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeSiete/Articulos/Inmunologia/ArchivosHTML/ SegGener.htm](http://caibco.ucv.ve/caibco/vitae/VitaeSiete/Articulos/Inmunologia/ArchivosHTML/SegGener.htm).

Hasta la fecha, casi todos los estudios realizados con inmunoterapia pasiva se han realizado en animales transgénicos y por tanto su interpretación debe ser evaluada con precaución a pesar de sus excelentes resultados. De la experiencia en humanos tan sólo existen algunos estudios con inmunoglobulinas humanas policlonales IVIG (que incluyen anticuerpos anti-A $\beta$ ), que nos muestran que la aplicación intravenosa de estas inmunoglobulinas en 6 pacientes con AD esporádica causó una mejoría significativa en el rendimiento cognitivo tras 6 meses de tratamiento (Dodel y col., 2004). Así mismo, hay ensayos clínicos en desarrollo de inmunoterapia pasiva con anticuerpos monoclonales anti-A $\beta$  (de los cuales existen varios con diferentes especificidades), entre los que se pueden destacar los emprendidos por los

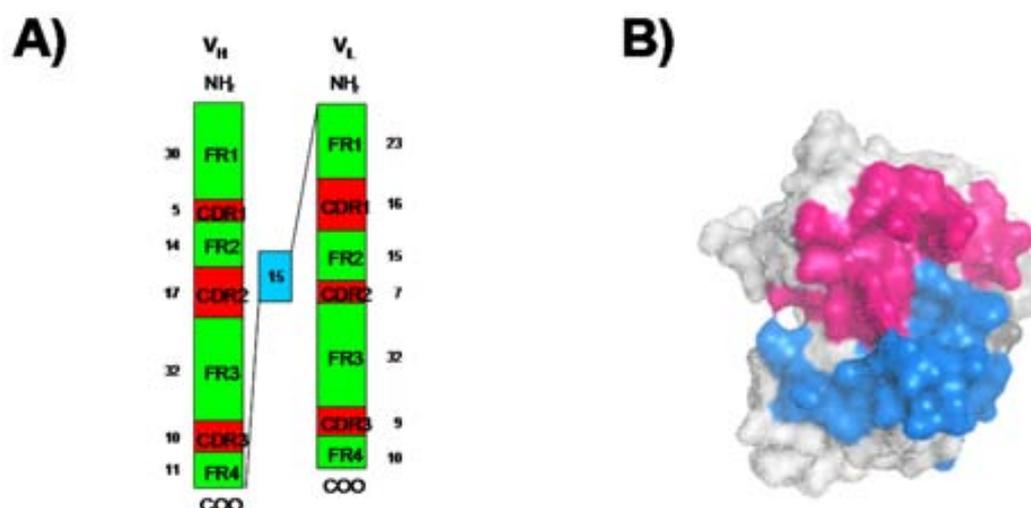
Laboratorios *Elan Pharmaceuticals* con el anticuerpo monoclonal humanizado AAB-001 (mAb-h3D6 ó bapineuzumab) dirigido contra el extremo N-terminal del péptido A $\beta$ ; o por los laboratorios Eli Lilly con el anticuerpo monoclonal humanizado LY2062430 dirigido contra el dominio central. Desafortunadamente, el ensayo más avanzado (fase III con bapineuzumab) se tuvo que detener en Agosto de 2012 debido a la aparición de resultados contradictorios sobre su seguridad (Thomas, 2012). Ya en fase II se había observado la aparición de edema vasogénico en aquellos individuos portadores del alelo *APOE4* que habían sido tratados con altas dosis de bapineuzumab. El reclutamiento de pacientes no *APOE4* y la disminución de la dosis en la subsecuente fase III no fueron suficientes para garantizar la eficacia y seguridad del fármaco.

Las regiones Fc del complejo antígeno-anticuerpo que se unen a los receptores Fc de la microglía pueden iniciar una respuesta inflamatoria, produciendo, entre otros efectos adversos, el mencionado edema vasogénico. Por lo tanto, la inmunoterapia pasiva con fragmentos de anticuerpos humanizados sin las regiones Fc promete ser una terapia eficaz para el aclaramiento de las placas amiloides sin la sobreactivación de la microglía que origina una respuesta neuroinflamatoria no deseada, y demuestra que no se requiere del anticuerpo completo para retener su actividad biológica (Liu y col., 2004; Tammer y col., 2002). Por ello, en el grupo de investigación en el que se enmarca la presente tesis se construyó un gen sintético para scFv-h3D6, derivado de bapineuzumab (AAB-001 o mAb-h3D6).

### **15.3. ScFv (*Single-chain variable Fragment*)**

En 1988 se reportó por primera vez mediante dos artículos la producción en *E. coli* de una versión recombinante del fragmento Fv en la que los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se encontraban unidos físicamente a través de un conector peptídico (Bird, y col., 1988; Huston y col., 1988). Dicho conector tiene la longitud (~15 residuos) y flexibilidad necesarias para permitir el empaquetamiento espacial adecuado de los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, generándose un Fv funcional (figura I17) (Honegger, 2008; Ahmad y col., 2012).

Tales construcciones fueron denominadas Fv de cadena sencilla (del inglés *single-chain Fv*, scFv), son más estables, en comparación con los Fv convencionales, y conservan la capacidad de reconocer y ligar al antígeno; siendo uno de los formatos más populares de anticuerpos recombinantes con aplicaciones medicas. Su empleo terapéutico exige que mantengan su actividad por varias horas o días después de haber sido inyectados en el suero humano a 37°C, sin que se degraden o precipiten, por lo que deben tener una alta estabilidad (Wörn y Plückthun, 2001; Honegger, 2008).



**Figura I17. ScFv humanizado. A) Estructura modular del fragmento scFv-h3D6.** Los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> se encuentran unidos físicamente a través de un conector peptídico ((Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>, 15 residuos). Las regiones que reconocen el antígeno (CDR) provienen de un dominio V murino (en rojo), mientras que las regiones que no presentan especificidad relevante (FR) funcionan como soporte estructural y provienen de un dominio V humano (en verde). **B) Representación de la superficie del scFv-h3D6.** La región de parátipo se indica de color azul y magenta y está compuesta por 6 regiones de CDR, 3 por cada dominio. Adaptado del modelo de Marin-Argany (2009, 2013).

Ahora bien, cuando se habla de estabilidad en este tipo de moléculas, se tiene que entender que la estabilidad global de la molécula depende de la estabilidad intrínseca de los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>, así como, de la estabilidad de la interficie interdominio. Una insuficiente estabilidad de la interficie V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> del scFv provocaría que el empaquetamiento global de la molécula fuera deficiente y que regiones hidrofóbicas se encontraran expuestas, promoviendo agregación; por lo que a menudo, la tendencia a la agregación inducida por temperatura se encuentra correlacionada con la estabilidad termodinámica (Wörn y Plückthun, 1999, 2001). Dada su naturaleza de inmunoglobulina, la molécula presenta el típico puente disulfuro intracatenario en ambos dominios variables (V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>), jugando un papel importante en la estabilidad de la estructura, ya que presenta una contribución de cerca de 14 KJ mol<sup>-1</sup> a la estabilidad del dominio que pertenece (Wörn y Plückthun, 2001; Ewert y col., 2004).

En el año 1999, Wörn y Pluckthun, estudiaron y clasificaron en cuatro clases el comportamiento de desplegamiento en el equilibrio de diferentes scFv; los cuales están determinados por la estabilidad relativa intrínseca de los dominios (V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>) y la estabilidad extrínseca de la interficie V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub> (figura I18).

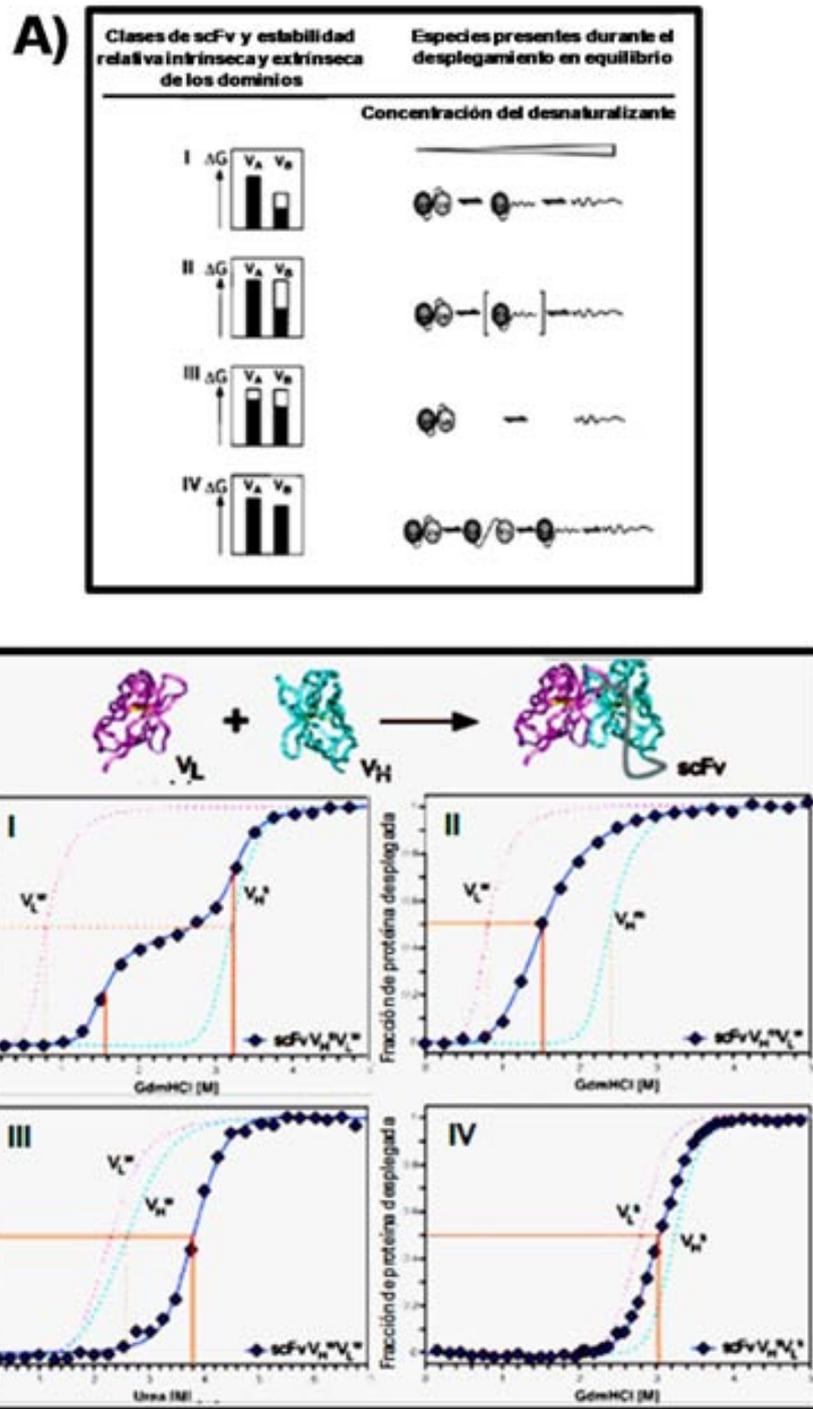


Figura 118. Clasificación de scFv de acuerdo a su comportamiento de desplegamiento en el equilibrio. **A)** Esquema de las Clases de scFv. Las estabilidades intrínsecas de los dominios están representadas por las barras negras, las contribuciones extrínsecas de la interficie están representadas por las barras vacías.  $V_A$  y  $V_B$  son los dominios del scFv ( $V_H$  y  $V_L$ ) y  $V_A$  es definido como el dominio más estable.  $\Delta G$  es la energía libre del plegamiento. **B)** Curvas de desplegamiento características de cada Clase de scFv. En los scFv de Clase I, se forman intermediarios de plegamiento metaestables, en los cuales  $V_B$  se encuentra desplegado y  $V_A$  se encuentra aun nativo, como resultado de grandes diferencias de estabilidad entre ambos dominios. En los scFv de Clase II, la estabilidad de la interficie estabiliza el plegamiento del dominio menos estable. En los scFv de Clase III, ambos dominios son estables y la estabilidad de la interficie estabiliza aun más el plegamiento de la molécula. En los scFv de Clase IV, ambos dominios son estables, con un dominio ligeramente más estable que el otro. Adaptado de Worn y Pluckthun (1999).

Por otro lado, en general estas moléculas presentan problemas de solubilidad y de plegamiento, incluso cuando se expresan en *cis* con proteínas del sistema Dsb (con actividad disulfuro isomerasa y chaperona), lográndose en ocasiones rendimientos mínimos que únicamente permiten ensayos tipo ELISA para confirmar la interacción con el antígeno (Sun y col., 2012).

Inicialmente se describió la expresión de este tipo de moléculas en el espacio periplasmático, donde un complejo de enzimas Dsb catalizan la oxidación e isomerización de los puentes disulfuro (Kadokura y col., 2003; Messens y Collet, 2006). En ocasiones, algunos fragmentos de anticuerpos expresados en condiciones reductoras, por ejemplo en el citoplasma de *E. coli*, no pueden formar eficientemente los puentes disulfuro, por lo que se encuentran desestabilizados y solo una pequeña fracción puede alcanzar el plegamiento nativo (Cattaneo y Bioca, 1999). Recientemente, el uso de cepas mutantes deficientes en las reductasas de las vías de la tiorredoxina (*trxB*) y de la glutarredoxina (*gor*), las dos vías principales de óxidoreducción en *E. coli*, han permitido la obtención de scFvs con puentes disulfuro nativos en el citoplasma (Jurado y col, 2002; 2006). Esta expresión se ve aumentada al co-expresar intracelularmente chaperonas como DsbC y Trx, aunque se ha demostrado que ejercen una función chaperona, no actuando como disulfuroisomerasas en el citoplasma de estas células deficientes en reductasas (Jurado y col., 2006).

En cualquier caso, los rendimientos de purificación de este tipo de moléculas resultan bajos, por ejemplo, uno de los mayores rendimientos reportado en la bibliografía sobre la purificación de un scFv es de 3 mg/L de cultivo; y los mismos autores señalan que su sistema sólo ha sido útil en la expresión de un scFv concreto entre varios intentados (Zheng y col., 2003).

El hecho de que la expresión de scFvs tenga un rendimiento tan bajo, nulo en muchos casos, abre la posibilidad de un rediseño racional de la molécula para aumentar la estabilidad y disminuir la tendencia a la agregación.

### I5.3.1. Modelo tridimensional del scFv-h3D6

En el grupo de investigación se construyó un gen sintético para scFv-h3D6 a partir de la secuencia del mAb bapineuzumab y se elaboró un modelo tridimensional de la molécula mediante el programa MODELLER 9v2 (Marin-Argany, 2009, 2013; Rivera-Hernández y col., 2013). Para ello se usó como molde la estructura cristalina de un scFv dirigido contra el receptor de un coronavirus causante de un síndrome respiratorio en humanos (SARS, *spike protein receptor binding domain*) (código PDB: 2GHW:B), con el que comparte un alto grado de homología, lo que hace que el modelo sea muy fiable.

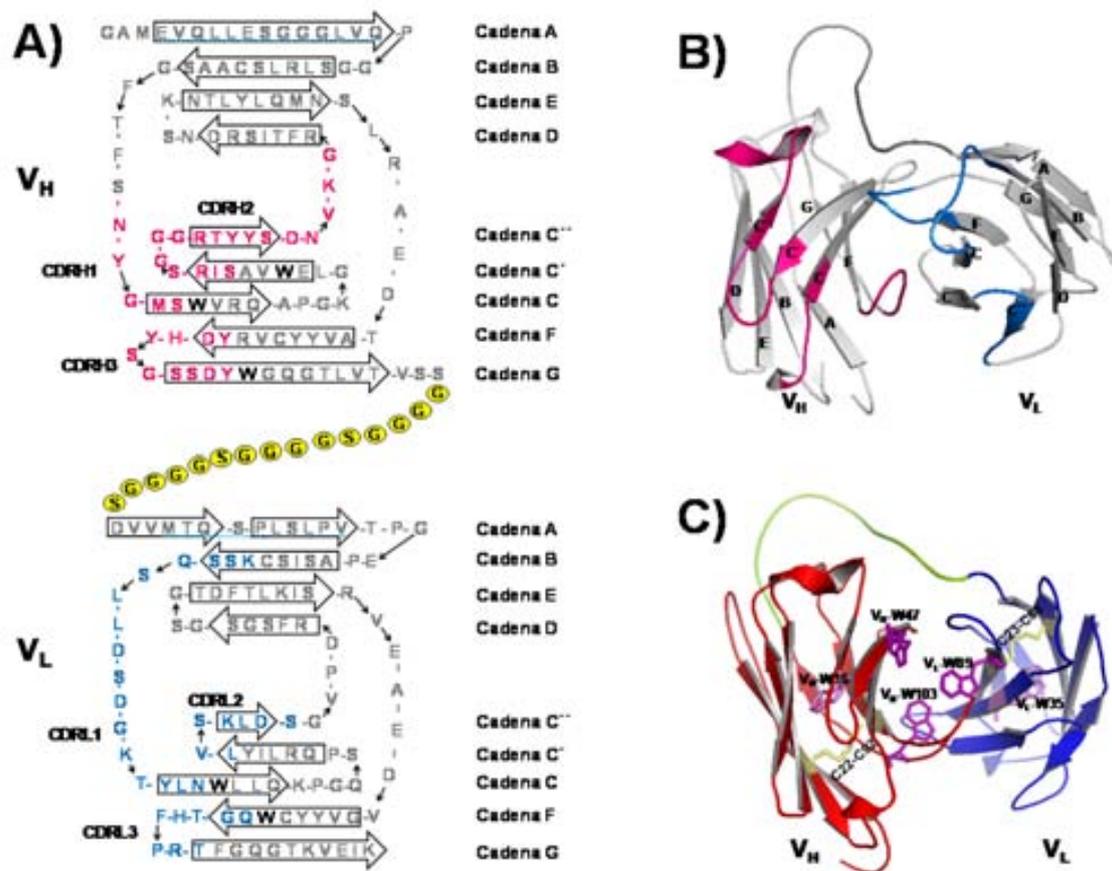
El modelo final presenta un plegamiento de tipo inmunoglobulina consistente en dos dominios variables ( $V_H$  y  $V_L$ ), unidos por un conector flexible  $(Gly_4Ser)_3$ . El plegamiento de cada dominio variable consiste, en un barril- $\beta$  abierto formado por dos hojas- $\beta$  antiparalelas empaquetadas, una que contiene 4 cadenas- $\beta$  (A, B, E, D) y la otra que contiene 5 cadenas- $\beta$  (C, C', C'', F, G). Los 3 CDR (*Complementary-Determining-Region*) de cada dominio son *loop* que conectan las cadenas- $\beta$  B-C, C'-C'' y F-G, agrupándose en un extremo del barril- $\beta$ , expuestos al solvente y por tanto accesible a la unión con el antígeno (oligómeros del péptido A $\beta$ ). Por otro lado, el conector flexible se encuentra en el lado opuesto del barril- $\beta$ , presentando también accesibilidad al solvente. El N- y C-terminal de cada dominio están separados y localizados en los extremos opuestos del barril- $\beta$  (figura I19.A-B).

El scFv-h3D6 contiene cinco residuos de triptófano, de los cuales, tres se localizan en el dominio  $V_H$  (el residuo conservado W36, W47 y W103, en las cadenas- $\beta$  C, C' y G, respectivamente; numeración de Kabat: Wu y Kabat 1970; Kabat y col., 1987; Johnson y Wu, 2001) y dos en el dominio  $V_L$  (el residuo conservado W35 en la cadena- $\beta$  C, y el W89, que es el primer residuo del CDR3 en la cadena- $\beta$  F). Los residuos conservados  $V_H$ -W36 y  $V_L$ -W35, constituyen los centros de los núcleos hidrofóbicos de cada dominio, mientras que los residuos  $V_H$ -W47,  $V_H$ -W103 y  $V_L$ -W89, están localizados en la interficie de los dominios (figura I19.C). Para tener una idea de la relevancia de las interacciones hidrofóbicas que se dan entre estos residuos de la interficie, la distancia entre  $V_H$ -W103-CZ2 y  $V_L$ -W89-CH2 es de 3.3 Å, y entre  $V_H$ -W47-CD1 y  $V_L$ -W89-CZ2 es de 5.7 Å.

El plegamiento está estabilizado por puentes de hidrógeno entre las cadenas- $\beta$  de cada hoja, además de interacciones hidrofóbicas entre residuos de hojas- $\beta$  opuestas y puentes disulfuro entre dos hojas- $\beta$  (cadena- $\beta$  B y F, C22-C92 en  $V_H$  y C23-C88 en  $V_L$ ) (figura I19.C).

Mediante este modelo tridimensional se examinó a aquellos residuos con interacciones poco favorables en cuanto a la estabilidad de las estructuras secundarias de las cuales

forman parte y su empaquetamiento terciario, permitiéndonos de tal forma, diseñar mutaciones con el fin de mejorar la estabilidad de la molécula.



## **OBJETIVOS**

---

---



Una de las principales características de la patología de Alzheimer es la presencia extracelular de placas amiloides formadas por agregados ordenados del péptido A $\beta$ . La efectividad de anticuerpos dirigidos contra el péptido A $\beta$  en la eliminación de las placas amiloides ha sido demostrada hasta fase clínica III con bapineuzumab, aunque la aparición de efectos secundarios hizo que el ensayo se suspendiera en Agosto del año 2012. A diferencia de los anticuerpos, los scFv no producen ni meningoencefalitis ni angiopatía amiloide cerebral (CAA) y, dadas sus dimensiones, presumiblemente son capaces de atravesar la barrera hematoencefálica, por lo que presentarían una mejor farmacocinética que el anticuerpo completo. Sin embargo, es conocido que en general este tipo de moléculas presentan problemas de estabilidad en su plegamiento.

Es por todo ello, que el grupo *Protein Folding and Stability* se inició con el diseño de un gen sintético, scFv-h3D6, derivado de bapineuzumab. Como parte del inicio de la principal línea de investigación del grupo, esta tesis tiene como objetivo general: caracterizar el plegamiento, y evaluar el efecto *in vivo* del scFv-h3D6; así como crear variantes proteicas que permitan incrementar su estabilidad y, por lo tanto, aumentar su potencial terapéutico.

Para alcanzar este objetivo global se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Poner a punto la expresión del scFv-h3D6 WT mediante la utilización de una serie de plásmidos y cepas de *E. coli*.
- Estandarizar la purificación de la proteína WT nativa mediante técnicas cromatográficas.
- Determinar la estabilidad y la vía de plegamiento del scFv-h3D6 WT, mediante técnicas espectroscópicas (fluorescencia Trp, CD y FTIR).
- Evaluar el potencial de la molécula como agente terapéutico en el modelo murino 3xTg-AD, determinando el efecto sobre los niveles de las especies oligoméricas de A $\beta$  y de las apolipoproteínas apoE y apoJ (clusterina), en diferentes regiones del cerebro.
- Crear variantes proteicas que permitan aumentar la estabilidad de la molécula para aumentar su potencial terapéutico.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**





## **M1. Técnicas de DNA recombinante**

### **M1.1. Extracción de DNA plasmídico**

Para la extracción de DNA plasmídico de *E.coli*, se utilizó el kit *illustra plasmidPrep Mini Spin* (No. Ref.: 28-9042-69, GE Healthcare). El protocolo de extracción descrito en el kit, está basado en el método de lisis alcalina (Bimbolm y Doly, 1979), e incluye la unión específica y reversible del DNA plasmídico a una membrana de sílica y posterior elución.

### **M1.2. Cuantificación de DNA plasmídico**

La cuantificación se realizó de manera espectrofotométrica en un nanodrop 2000 (Thermo Scientific), registrando un espectro de absorbancia de la región 200 a 340 nm y considerando que una unidad de absorbancia a 260 nm equivale a 50 µg/mL de DNA de doble cadena. La pureza del DNA fue valorada mediante el coeficiente UDO 260/280, que debió ser cercano a 1.8, indicando valores inferiores una contaminación con proteínas y valores superiores una contaminación con RNA.

### **M1.3. Digestión de DNA con enzimas de restricción**

Se utilizaron enzimas de restricción para la caracterización de plásmidos y la clonación de fragmentos de DNA en construcciones plasmídicas. La caracterización del plásmido se realizó para comprobar su estado, así como para visualizar la presencia del inserto del fragmento de ADN que codifica para scFv-h3D6 en las construcciones realizadas. El inserto de DNA sintético para el scFv-h3D6 (750 pb) fue subclonado en diversos plásmidos (ver apartado M2.3); para ello se realizaron cortes en los sitios de restricción *XhoI* y *NcoI* tanto del inserto como del plásmido receptor para dejar los extremos cohesivos que permitieron un posterior evento de ligación. Cuando se hicieron varias digestiones con la misma combinación de enzimas, se realizó una mezcla de digestión madre cuyo volumen dependió del número de digestiones efectuadas (ej: para 5 digestiones se realiza una mezcla 6X). En condiciones analíticas se procedió a hacer una mezcla de digestión 1X de 10 µL, mientras que en condiciones preparativas (purificación del inserto) el volumen de la mezcla de digestión 1X fue de 50 µL.

La mezcla de reacción 1X para la liberación del inserto con los sitios de restricción *NcoI* y *XhoI*, ya sea con fines de analíticos o preparativos, se realizó de la siguiente manera:

	<u>1X analítico</u>	<u>1X preparativo</u>
<u>Reactivo</u>	<u>Volumen (µL)</u>	<u>Volumen (µL)</u>
<i>NcoI</i> (20u/uL)	0.2	1
<i>XhoI</i> (20u/uL)	0.1	0.5
BSA 100X	0.1	0.5
NEB2 10X	1	5
DNA ((0.2 ug/uL): miniprep)	8.6	43
<u>Volumen total</u>	<u>10</u>	<u>50</u>

Para linealizar los plásmidos bastó con realizar un solo corte en un sitio de restricción (ej: *NcoI*), realizándose la mezcla de reacción 1X de la siguiente forma:

	<u>1X analítico</u>
<u>Reactivo</u>	<u>Volumen (µL)</u>
<i>NcoI</i> (20u/uL)	0.2
BSA 100X	0.1
NEB2 10X	1
DNA ((0.2 ug/uL): miniprep)	8.7
<u>Volumen total</u>	<u>10</u>

Las digestiones con *XhoI*, *NcoI* y *NotI* se realizaron a 37°C durante 1.5 h deteniéndose la reacción mediante la adición de 2 µL de tampón de carga DNA 6X (composición descrita en el siguiente apartado) por cada 10 µL de muestra. Para visualizar los productos de digestión se utilizaron dos tipos de geles de agarosa (uno al 2% para visualizar los insertos y otro al 0.7% para visualizar los plásmidos), como se describe en el siguiente apartado.

#### **M1.4. Electroforesis en gel de agarosa**

La electroforesis en agarosa permite separar moléculas de DNA gracias a su carga negativa (debida al grupo fosfato), cuando éstas son sometidas a un campo eléctrico y atraídas hacia el polo opuesto a su carga neta (ánodo). Las mezclas de DNA de diferentes tamaños se hacen migrar a través de un gel de agarosa durante cierto tiempo y se obtiene una separación en la que la distancia migrada por una molécula es inversamente proporcional al logaritmo de su longitud en pares de bases (tamaño). El gel de agarosa se comporta como un tamiz molecular en donde el tamaño del poro

puede ser controlado variando la concentración de agarosa. Se utilizan ciertos porcentajes de agarosa de acuerdo a los tamaños del DNA que se quieran separar (Sambrook y col., 1989), a continuación se presentan los más utilizados y su rango de separación:

<u>% agarosa (p/v)</u>	<u>Rango de separación (kb)</u>
0.7	0.8-10
1.2	0.4-6
1.5	0.2-3
2	0.1-2

De tal modo que el % de agarosa utilizado para la separación y visualización de nuestros plásmidos (que generalmente comprendieron un rango de peso molecular de 5 a 7 kb) fue del 0.7%. Para la separación y visualización de los insertos (700-800 pb) el porcentaje de agarosa fue del 2% y cuando se deseó cortar bandas de DNA se utilizó un 1.5%.

El protocolo de preparación de los geles de agarosa para cada porcentaje se describe a continuación, siendo el mismo para todas las concentraciones con la excepción de la cantidad de agarosa necesaria:

1. Disolver la cantidad de agarosa correspondiente al porcentaje que se quiere obtener en tampón TAE 1X. El tampón de electroforesis TAE 50X (Tris-Acetato-EDTA) tiene la siguiente formulación para 1 L:

<u>Reactivo</u>	<u>Masa o volumen necesario (g ó mL)</u>
Tris base (2 M)	242 g
Ácido acético glacial	57 mL
EDTA 0.5 M (pH 8)	100 mL

2. Calentar la solución de agarosa hasta que se disuelva en su totalidad y se consiga una solución transparente. Añadir EtBr (Bromuro de etidio) a la solución de agarosa antes de que solidifique (cuando pueda tocarse con la mano), a una concentración final de 0.5 µg/mL y se vierte sobre un molde habilitado para la polimerización con peines para la formación de pocillos donde se coloca la muestra.
3. Preparar las muestras, aplicando tampón de carga de DNA 1X. El tampón de carga de DNA 6X tiene la siguiente formulación para 5 mL:

<u>Reactivo</u>	<u>Masa o volumen necesaria (g o mL)</u>
Azul bromofenol (0.25% (p/v))	0.0125 g
Xileno cianol FF (0.25% (p/v))	0.0125 g
Glicerol (30% (p/v))	1.875 mL

4. Aplicar las muestras y dos marcadores de peso molecular de DNA, con rangos de 0.5-10 kb y de 100-2000 pb (*Molecular BioLaboratory*), al gel de agarosa y poner a correr en una cubeta con tampón TAE 1X a un voltaje constante de 75 V.
5. Visualizar las bandas de DNA en un transUV (Fotodyne Inc).

**M1.5. Purificación de DNA procedente de bandas de agarosa**

Se utilizó el kit *illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification* (No. Ref.: 28-9034-70, GE Healthcare) para extraer DNA procedente de geles de agarosa.

**M1.6. Reacción de ligación**

Para la introducción del inserto (de ~750 pb) dentro de un plásmido receptor, se utilizó un evento de ligación en una relación molar de inserto:vector de 4:1. El evento de ligación se realizó utilizando la siguiente mezcla de reacción incubada a 16°C durante toda la noche.

<u>Reactivo</u>	<u>Volumen ( <math>\mu</math>L)</u>
Tampón de la ligasa	1
Vector (10 ng/ $\mu$ L)	1
Inserto (1.2 ng/ $\mu$ L)	4
T4 DNA ligasa (Invitrogen)	1
H <sub>2</sub> O	3
<u>Volumen total</u>	<u>10</u>

**M1.7. Mutagénesis sitio dirigida por PCR**

La reacción en cadena de la polimerasa, PCR (*polymerase chain reaction*) es una de las técnicas en biología molecular más ampliamente utilizadas. Es una técnica que permite amplificar un fragmento de DNA *in vitro* de manera rápida y sencilla (Mullis y Falona, 1987). Entre las diversas aplicaciones que tiene esta técnica, en el presente trabajo se utilizó para la creación de variantes proteicas de estabilidad del scFv-h3D6 mediante mutagénesis sitio dirigida.

Con el kit comercial *QuikChange*, se realizaron todas las mutaciones deseadas sobre el scFv-h3D6-WT clonado en los plásmidos pETtrx1a y pCri5a. Se siguieron las indicaciones del kit que a continuación se resumen:

1. Preparar la reacción de PCR de la manera siguiente.

<u>1 reacción de PCR</u>	<u>Volumen</u>
Tampón de reacción 10X	5 $\mu$ L
DNA molde (150 ng/ $\mu$ L)	0.5 $\mu$ L
<i>Primer Fw</i> (125 ng)	1.5 $\mu$ L
<i>Primer Rv</i> (125 ng)	1.5 $\mu$ L
Mezcla de dNTPs	1 $\mu$ L
<i>Quik solution reagent</i>	1.5 $\mu$ L
Agua MQ	39 $\mu$ L
DNA polimerasa Pfu Turbo (2.5 U/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L
<u>Volumen total</u>	<u>50 <math>\mu</math>L</u>

2. Programar el termociclador con los siguientes parámetros:

Temperatura	tiempo	Ciclos
95°C	2 min	1
95°C	20 seg	18
60°C	10 seg	
68°C	6 min	
68°C	5 min	1
4°C	ON	1

3. Realizar un tratamiento para eliminar el DNA molde, añadiendo 1  $\mu$ L de la enzima de restricción *DpnI* (10 U/ $\mu$ L) directamente a cada reacción de amplificación e incubar por 1 h a 37°C.
4. Visualizar el producto de PCR en un gel de agarosa al 0.7%, usando patrones de peso molecular 0.5-10 kb (*Molecular BioLaboratory*).
5. Transformar células ultracompetentes XL10-Gold con 2  $\mu$ L del producto de PCR según el protocolo descrito por el kit.
6. Seleccionar las transformantes mediante la siembra en placa de LB agar suplementadas con kanamicina (50  $\mu$ g/mL).
7. Tomar dos colonias por cada construcción y se hacen crecer cultivos toda la noche (*overnight*, ON).
8. Extraer DNA plasmídico de acuerdo al apartado M1.1.
9. Realizar una secuenciación del DNA plasmídico de cada mutante de acuerdo al siguiente apartado.

### M1.8. Secuenciación de DNA

La secuenciación de DNA se realizó en el servicio de Genómica del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la UAB en un equipo secuenciador ABI 3130XL mediante la metodología de Sanger con una polimerasa termoestable que permite una reacción de secuenciación ciclica utilizando *primers* universales, tales como: el promotor ó el terminador de T7 (Sanger y col., 1977). Las muestras que se enviaron provenían de extracciones de DNA (ver apartado M1.1).

### M1.9. Introducción de DNA foráneo a células bacterianas

El plásmido con el inserto de interés se introduce dentro de la bacteria ya sea para estabilizar el plásmido recién ligado o bien para realizar una expresión heteróloga. Hay distintos métodos para conseguirlo (conjugación, transducción, etc.), pero la mas empleada es la transformación debido a la sencillez de la técnica. Para ello es necesario crear poros en la pared celular que permitan la entrada de los ácidos nucleicos, es decir hacer competente a la célula.

### **M1.9.1. Obtención de células competentes de *E. coli***

Se han preparado células quimiocompetentes con CaCl<sub>2</sub> (Sambrook y col., 1989), mediante el siguiente protocolo:

1. Incubar en 5 mL de LB, ON a 37°C y 300 rpm.
2. Inocular 50 mL de medio LB (en Erlenmeyer de 0.5 L) con 0.5 mL del cultivo, y posteriormente incubar a 37°C y 300 rpm hasta que la DO<sub>550</sub> llegue a las 0.4-0.5 unidades (unas 2-3 h, dependiendo de la cepa).
3. Transferir el cultivo a un tubo estéril y se centrifuga a 2900 g durante 15 min a 4°C. Decantar y dejar boca abajo en papel filtro por 5 min.
4. Resuspender el precipitado en 25 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM enfriado en hielo (guardar a 4°C). Realizar una resuspensión primero pipeteando suavemente unos 2.5 mL y después el resto.
5. Dejar en hielo durante 15 min.
6. Centrifugar a 2900 g durante 15 min a 4°C. Posteriormente decantar el sobrenadante y finalmente dejar boca abajo en papel filtro por 2 min.
7. Resuspender el precipitado en 2.5 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM previamente enfriado en hielo.
8. Dejar en hielo durante 1 h como mínimo.
9. Si se quiere transformar el mismo día, separar las alícuotas de 100 µL necesarias y mantener a 0°C.
10. Distribuir el material restante en alícuotas de 100 µL en eppendorfs (previamente enfriados en hielo) que contienen glicerol de tal manera que la concentración final sea del 11.5% (300 µL de glicerol al 50%/mL de células competentes). Congelar en N<sub>2</sub> líquido y guardar a -80°C hasta su utilización.

### **M1.9.2. Transformación**

Si las células competentes no fueron preparadas el mismo día, se procedió a descongelar en hielo durante 20 min las alícuotas necesarias que se encuentran guardadas a -80°C. Se utilizó el método del choque térmico (Sambrook y col., 1989) bajo el siguiente protocolo:

1. Colocar a cada alícuota un máximo de 50 ng de DNA, en un volumen 1/10 (o menor) y mezclar por inversión suavemente.
2. Incubar en hielo durante 30 min (mínimo).
3. Transferir en los eppendorfs a un baño a 42°C y mantener sumergidos durante 90-120 seg.
4. Transferir en los eppendorfs a hielo y mantener ahí durante 5 min.
5. A cada eppendorf poner 1 mL de LB líquido e incubar a 37°C con agitación suave durante 45-60 min.
6. Plaques alícuotas de 100 µL en placas de LB con el antibiótico adecuado.
7. Incubar las placas a 37°C durante unas 16 h.

## M2. Sistemas de expresión y purificación

### M2.1. Organismos

#### M2.1.1. Cepas de *Escherichia coli*

Las cepas de *E.coli* utilizadas en este trabajo para expresión hetereróloga son sistemas basados en la RNA polimerasa del bacteriófago T7 (DE3) (Studier y Moffatt, 1986). El gen a expresar se ha de introducir *downstream* del promotor reconocido por la RNA polimerasa que caracteriza diversos plásmidos, como son los de la serie pET. La RNA polimerasa de T7 se expresa en las cepas DE3 gracias a que son lisógenas estables para el bacteriófago  $\lambda$ DE3, que contienen una copia del gen para dicha polimerasa bajo el control del promotor *lacUV5*, inducible por IPTG. De este modo se controla que la proteína recombinante no sea expresada hasta el momento de la inducción, con lo que se intenta evitar problemas asociados a la potencial toxicidad de una expresión temprana.

La cepa donde se realizó toda la parte de la clonación de los plásmidos fue:

XL1Blue (Bullock y col., 1987):

Genotipo: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lac<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15 Tn10 (Tet<sup>r</sup>)]*. Esta cepa, derivada de *E.coli* K-12, presenta mutaciones artificiales que la hacen apropiada para el trabajo con plásmidos recombinantes, ya que por ejemplo: la deficiencia en el gen de la endonucleasa (*endA*) mejora la calidad de las extracciones de ADN y, la deficiencia en el gen de recombinación (*recA*) mejora la estabilidad de la inserción. De igual forma, las mutaciones en *lac<sup>q</sup>Z $\Delta$ M15* permiten la detección de colonias color azul-blanco mediante  $\alpha$ -complementación. Así mismo, es de especial interés la resistencia a la tetraciclina, codificada en el transposon *Tn10*, que permite seleccionar la cepa.

Estudios preliminares que formaron parte de las tesis de máster de Rivera-Hernández (2009) y Blasco-Moreno (2011), incidieron directamente en la elección del sistema de expresión para el scFv-h3D6 que se presenta en esta tesis, en dichos estudios se utilizó la cepa:

BL21 (DE3) (Novagen):

Genotipo: *F*<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>*(*r<sub>B</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>B</sub>*<sup>-</sup>), *dcm*, *gal*,  $\lambda$ (DE3). Esta cepa, derivada de *E.coli* B834, presenta mutaciones en las proteasas lon y ompT, reduciendo la potencial degradación de la proteína recombinante.

Así como la cepa:

BL21 (DE3) pLysS (Novagen):

Genotipo: *F*<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS<sub>B</sub>*(*r<sub>B</sub>*<sup>-</sup>, *m<sub>B</sub>*<sup>-</sup>), *dcm*, *gal*,  $\lambda$ (DE3), pLysS (*Cm<sup>r</sup>*). Esta cepa contiene el plásmido pLysS que expresa el gen para el lisozima de T7, inhibidor de la actividad de la RNA polimerasa del mismo bacteriófago. El plásmido pLysS, a diferencia de pLysE, expresa niveles bajos de dicho enzima. Es un derivado de pACYC184 y por ello contiene el origen de replicación *p15A*, compatible con plásmidos derivados de pBR322 y pUC. Aunque los sistemas DE3 expresan niveles basales mínimos de la RNA polimerasa de T7, existe cierta expresión debido a la competencia por unir el represor *lac* por parte de los operadores de los promotores implicados en el sistema, *lacUV5* (cepa) y T7lac (plásmido). De este modo se mantiene totalmente anulado el nivel basal de expresión de proteínas altamente tóxicas. Se selecciona por resistencia a cloramfenicol.

La cepa utilizada para la expresión heteróloga preparativa del scFv-h3D6 fue:

Origami 2 (DE3) (Novagen):

Genotipo: *D(ara-leu)7697 DlacX74 DphoA Pvull phoR araD139 ahpC galE galK rpsL F<sup>+</sup>[lac<sup>+</sup>lac<sup>f</sup>pro]* (DE3) *gor522::Tn10 trxB (Str<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>)*. Esta cepa, derivada de *E.coli* K12, presenta mutaciones en los genes de la tiorredoxina reductasa (*trxB*) y de la glutation reductasa (*gor*), cuya deficiencia favorece un ambiente oxidativo en el citoplasma de *E.coli*, promoviendo la formación correcta de puentes disulfuro y de proteínas bien plegadas. Presenta resistencia cromosómica a estreptomycin (*rpsL*) y resistencia en el transposon Tn10 a tetraciclina (selección *gor522*). A diferencia de la cepa original, Origami (DE3), la mutación del gen *trxB* es debida a delección, por lo que la cepa es sensible a kanamicina (no contiene Tn5).

La expresión heteróloga preparativa de la proteasa TEV se realizó en la cepa:

C41 (DE3):

Genotipo: *F*<sup>-</sup> *ompT hsdSB (r<sub>B</sub> m<sub>B</sub>) gal dcm* (DE3). Esta cepa, derivada de BL21 (DE3), tiene al menos una mutación sin caracterizar que impide la muerte celular asociada con la expresión de proteínas recombinantes tóxicas (Miroux y Walker, 1996).

### **M2.1.2. Conservación de cepas bacterianas**

Todas las cepas bacterianas pueden conservarse a 4°C en una placa con LB-agar por un periodo máximo de un mes. Para la conservación por periodos prolongados de tiempo se realizaron glicerizados al 11.5% de la siguiente manera:

1. Colocar en un vial de criocongelación 1 mL de cultivo saturado con 300 µL de glicerol al 50% previamente esterilizado. Realizar toda la manipulación en hielo y en condiciones de esterilidad.
2. Congelar inmediatamente en N<sub>2</sub> líquido y almacenar a -80°C.

### **M2.2. Medios de cultivos de bacterias**

Los medios de cultivo están constituidos por una serie de nutrientes necesarios para el crecimiento de las bacterias, así como de factores de selección, los antibióticos.

#### **M2.2.1. Medio líquido**

El medio de cultivo para el crecimiento de *E. coli* ha sido el Luria-Bertani (LB) según el protocolo descrito por Sambrook y col., (1989). Para la preparación de 1 L de medio LB se realizó los siguientes:

1. Disolver 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl en 900 mL de agua MQ.
2. Ajustar el pH a 7 y se enrasa a 1 L.
3. Esterilizar mediante el uso de autoclave en matraces de volumen a conveniencia.

#### **M2.2.2. Medio sólido**

Para el aislamiento de las colonias de *E. coli* es adecuado el uso de placas con medio sólido. Siguiendo el mismo protocolo que para la preparación de medio líquido, se le agregó agar al 15% (p/v) para que gelifique.

Para la preparación de 500 mL de solución (20 placas aproximadamente) se procedió a realizar lo siguiente bajo condiciones de esterilidad:

1. Preparar 500 mL de LB según apartado M2.2.1 y agregar 7.5 g de agar.
2. Autoclavar.
3. Enfriar hasta unos 60°C y agregar la cantidad deseada del antibiótico, si se requiere.
4. Repartir en unas 20 placas, dejar enfriar y guardar a 4°C.

### M2.2.3. Antibióticos

Los antibióticos son sustancias químicas que tienen la capacidad de evitar el crecimiento celular o de producir muerte de las bacterias, debido a que interfieren en funciones celulares vitales. Los plásmidos empleados en biología molecular para la introducción de genes foráneos en bacteria contienen genes que confieren resistencia a un determinado antibiótico, de tal forma que los antibióticos son utilizados como marcadores de selección. En la Tabla M1, se mencionan los antibióticos utilizados, así como la concentración de la solución stock y el factor de dilución de trabajo. Los antibióticos acuosos se esterilizaron por filtración a 0.22  $\mu\text{m}$  ((Millex-GP-PES estéril, Millipore).

**Tabla M1. Principales antibióticos y factores de dilución de trabajo.** Antibióticos utilizados en biología molecular y en expresión heteróloga de proteínas (Sambrook, 1989).

Antibiótico	Concentración madre	Factor de dilución	Solvente	Conservación
Cloramfenicol (Cm)	113 mg/mL	1:2000	EtOH	4°C
Kanamicina (Kn)	50 mg/mL	1:1000	agua	-20°C
Tetraciclina (Tc)	5 mg/mL	1:500	EtOH	4°C
Ampicilina (Ap)	100 mg/mL	1:1000	agua	-20°C
Streptomycin (St)	50 mg/mL	1:5000	agua	-20°C

### M2.3. Vectores de expresión

Para la expresión del gen sintético (*NcoI-NotI* de 750 pb) de un scFv derivado del anticuerpo h3D6.V2 (AAB-001, bapineuzumab), se subclonó en una batería de diferentes plásmidos derivados de la serie pETM (obtenidos del EMBL) y la serie pCri(a) (proporcionados por el Dr. Xavier Gomis-Rüth), ambas series presentan un origen de replicación de pBR322 y son seleccionables por kanamicina.

En la tabla M2, se presenta un resumen de las construcciones resultantes con sus principales características.

De toda esta batería de plásmidos, estudios preliminares en el grupo de investigación delimitaron el uso a solo dos construcciones:

1. pETtrx1a-scFv que contiene, además del fragmento sintético (750 pb, *NcoI-NotI*), los siguientes módulos proteicos: una cola de histidinas (6His-tag), la tiorredoxina (una óxidoreductasa intracelular con actividad disulfuroisomerasa y chaperona), y

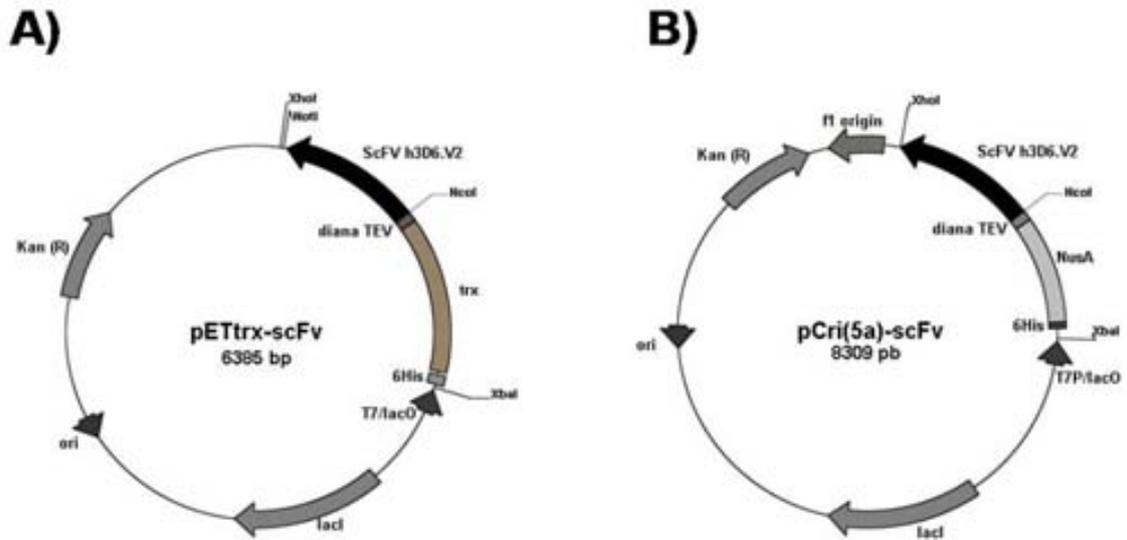
una diana para la proteasa TEV (*Tobacco Etch Virus*) que es altamente específica (figura M1.A).

2. pCri5a-scFv que contiene, además del fragmento sintético (750 pb, *NcoI-XhoI*), los siguientes módulos proteicos: una cola de histidinas (6His-tag), la proteína NusA y la diana para TEV (figura M1.B).

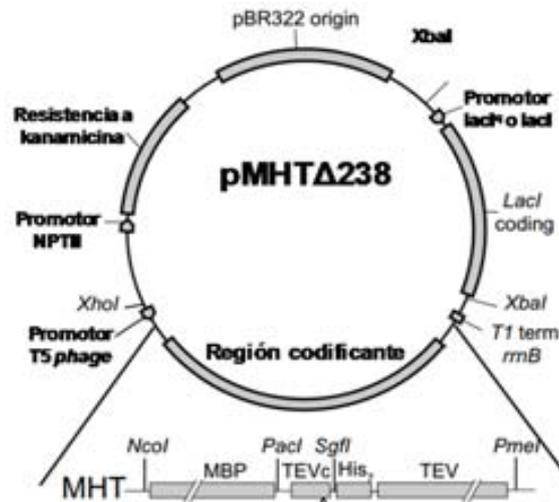
Por otro lado, para la expresión de la proteasa TEV se utilizó el plásmido pMHTΔ238 que tiene el origen de replicación de pBR322 y es seleccionable por kanamicina. Contiene además de la cola de histidinas y MBP (*Maltose-Binding Protein*), una diana de corte TEV para un auto-procesamiento (TEVc) (Blommel y col., 2007) (figura M2).

**Tabla M2. Plásmidos utilizados y características relevantes de las proteínas expresadas.** (a) Expresión intracelular, (b) expresión extracelular.

Plásmido	Características de la proteína expresada		
	Módulos de la quimera	pI, Mw	Comentarios
<b>Serie pETM</b>			
pETtrx1a-scFv <sup>a</sup>	6His-tag, tiorredoxina, diana TEV, scFv	6.3, 40.6 kDa	La tiorredoxina es una óxidoreductasa intracelular (Jurado y col., 2006).
pETM11-scFv <sup>a</sup>	6His-tag, diana TEV, scFv	8.3, 30.1 kDa	
pETM50-scFv <sup>b</sup>	Disulfuro-oxidasa DsbA, 6His-tag, diana TEV, scFv	6.8, 51.8 kDa	DsbA es una óxidoreductasa de periplasma (Messens y col., 2006).
pETM80-scFv <sup>b</sup>	Disulfuro-isomerasa DsbC, 6His-tag, diana TEV, scFv	6.9, 54.4 kDa	DsbC es una óxidoreductasa de periplasma (Jurado y col., 2002).
pETM50-peIB-scFv <sup>b</sup>	péptido señal peIB, scFv	8.6, 28.5 kDa	PeIB es un péptido señal de utilidad en la expresión de otros scFv (Sletta y col., 2006). No contiene His-tag ni diana TEV.
<b>Serie pCri(a)</b>			
pCri(1a)-scFv <sup>a</sup>	6His-tag, MBP- diana TEV, scFv	69 kDa	MBP es una chaperona que incrementa la solubilidad y estabilidad de proteínas recombinantes en <i>E.coli</i> . (Kapust y col., 1999; Fox y col., 2001; Nallamsetty y col., 2007).
pCri(5a)-scFv <sup>a</sup>	6His-tag, NusA, diana TEV, scFv	4.8, 83.4 kDa	NusA es una proteína relacionada con el plegamiento cotraduccional que incrementa la solubilidad de proteínas recombinantes (De Marco y col., 2006).
pCri(7a)-scFv <sup>a</sup>	ScFv	8.3, 26 kDa	No contiene módulos proteicos.
pMHTΔ238 <sup>a</sup>	MBP, diana TEV, 6His-tag, TEV	8.9, 27 kDa	La porción fusionada de MBP es eliminada <i>in vivo</i> por auto-escisión de TEV, liberando la proteína de fusión 6His-TEV (Blommel y col., 2007).



**Figura M1. Mapa de los vectores de expresión para scFv-h3D6.** Construcciones de la serie pETM. **A) pETtrx1a-scFv.** Contiene además del fragmento sintético (750 pb, *NcoI-NotI*), los siguientes módulos proteicos: una cola de histidinas (6His-tag), la tiorredoxina y una diana para la proteasa TEV. **B) pCri5a-scFv.** Contiene además del fragmento sintético (750 pb, *NcoI-XhoI*), los siguientes módulos proteicos: una cola de histidinas (6His-tag), la proteína NusA y la diana para corte TEV.



**Figura M2. Mapa del vector pMHTΔ238.** Contiene además de la cola de histidinas y MBP (*Maltose-Binding Protein*), una diana de corte TEV para auto-procesamiento (TEVc). Tiene el origen de replicación de pBR322 y es seleccionable por kanamicina.

## **M2.4. Expresión analítica del scFv-h3D6**

En los estudios preliminares efectuados en el grupo de investigación, la expresión analítica nos dio información útil para la elección del sistema de expresión a utilizar.

### **M2.4.1. Inducción de la expresión**

1. Transformar células competentes con los correspondientes plásmidos (ver tabla M.2) según apartado M1.9.2).
2. Picar una colonia de cada transformación en 5 mL de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. Incubar a 37°C y 250 rpm ON.
3. Inocular 50 µL del cultivo saturado en 5 mL de medio LB con los respectivos antibióticos.
4. Monitorear el crecimiento hasta obtener valores de  $DO_{550}$  entre 0.4-0.7 y, probar dos tiempos de inducción (6 y 15 h) con IPTG 0.5 mM a distintas temperaturas (20, 30 y 37°C). Tomar muestras para análisis posteriores.

### **M2.4.2. Análisis de las muestras**

1. Tomar 2 alícuotas de 500 µL. Utilizar una alícuota para el análisis de proteína total, y la otra para el análisis de solubilidad (fracción soluble e insoluble).
2. Centrifugar por 5 min a 14000 g, obteniendo la pastilla celular para posteriormente resuspender con 100 µL de tampón de lisis ( $Na_2HPO_4$  5 mM, pH 6.4).
3. Para el análisis de la solubilidad, lisar la alícuota mediante 2 ciclos de congelación/descongelación seguidos de 10 ciclos de 30 seg de sonicación al 50% de frecuencia y potencia 6 (Sonicador Sonifier 450, Branson). Siendo esencial mantener la muestra en frío y asegurar que la sonicación no la calienta.
4. Fraccionar las células rotas mediante centrifugación a 20800 g, 14000 rpm (rotor FA-45-24-11, Microcentrifuga Eppendorf 5424) por 30 min a 4°C. Separar el sobrenadante (fracción soluble) y la pastilla resultante (fracción insoluble) .
5. Resuspender la fracción insoluble con 100 µL de urea 8M.
6. Añadir 32.5 µL de tampón de aplicación de SDS-PAGE 5X a las muestras: proteína total, fracción soluble y fracción insoluble. Calentar las muestras durante 5 min a 100°C, con la excepción de la fracción insoluble que no puede ser calentada por contener urea.
7. Guardar las muestras a -20°C hasta su análisis.

## **M2.5. Expresión preparativa del scFv-h3D6**

Una vez que se supo qué sistema de expresión se iba a utilizar, se procedió a expresar la proteína de forma preparativa para luego purificarla. Esta expresión se realizó en volúmenes de 4 L de cultivo.

### M2.5.1. Inducción de la expresión y lisis celular

1. Transformar células competentes según apartado M1.9.2.
2. Picar una colonia en 5 mL de medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes. Incubar a 37°C y 250 rpm ON.
3. Preinocular el cultivo ON en 50 mL de medio de cultivo LB nuevo (dilución 1:10), con los antibióticos correspondientes, e incubar a 37°C y 250 rpm durante 3 h.
4. Inocular con 5 mL de preinóculo cada uno de los 8 matraces de 2 L que contienen 0.5 L de LB suplementado con antibióticos, e incubar a 37°C y 250 rpm durante 6 h.
5. Ate mperar el incubador a 20°C lo más rápido que sea posible.
6. Inducir con IPTG 0.5 mM (disolución madre 1 M, dilución 1:2000) a 20°C y 200 rpm por 15 h.
7. Tomar muestra para análisis por SDS-PAGE (proteína total) y centrifugar los cultivos a 5520 g por 30 min a 4°C.
8. Eliminar el sobrenadante y resuspender la pastilla celular con 40 mL de tampón de unión IMAC (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 0.5 M, pH 7.4) suplementado con un cóctel de inhibidores (Leupeptina + Benzamidina + BPTI a 1 µg/mL c/u + PMS 1 mM) por cada litro de expresión.
9. Lisar las células mediante 2 ciclos de congelación/descongelación y posterior sonicación en 5 ciclos de 30 seg al 50% de frecuencia con intensidad 9 (Sonicador Sonifier 450, Branson), manteniendo la muestra en hielo para evitar sobrecalentamiento.
10. Centrifugar a 43700 g por 30 min a 4°C para separar el sobrenadante (fracción soluble) de la pastilla, que contiene además de restos celulares proteína insoluble en los cuerpos de inclusión (fracción insoluble).

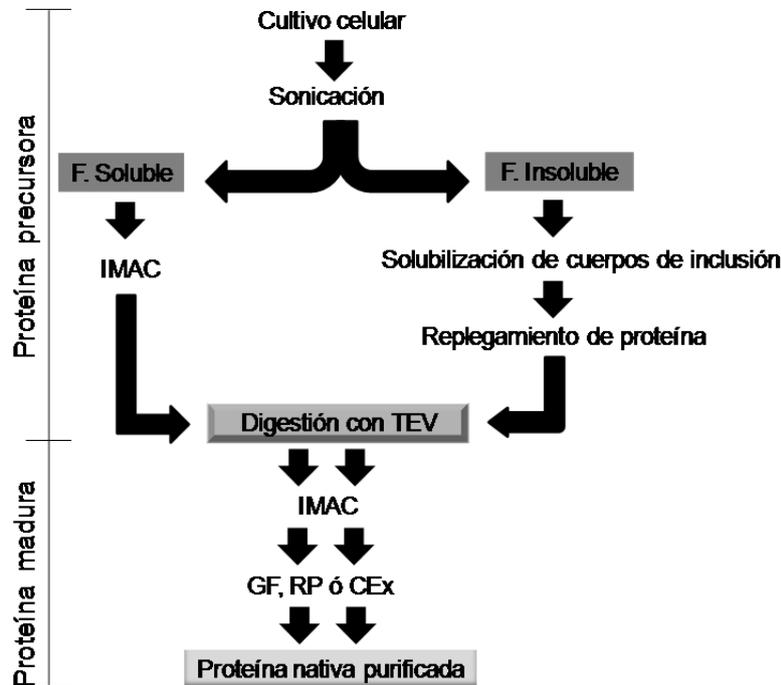
### M2.6. Purificación del scFv-h3D6

La purificación del scFv-h3D6, conllevó el uso de técnicas cromatográficas. La cromatografía es una técnica que se emplea en la separación de mezclas de proteínas, y se basa en alguna propiedad de la proteína de interés que es diferente entre las proteínas de dicha mezcla, por ejemplo: peso molecular, carga eléctrica, afinidad de una de ellas por un ligando, entre otros.

Durante el proceso de purificación, nuestra proteína se encontró de dos formas: como proteína de fusión expresada con sus módulos proteicos (proteína precursora), y como scFv-h3D6 libre de módulos proteicos (proteína madura) después de realizar una proteólisis limitada mediante la proteasa TEV.

La proteína fue obtenida tanto de la fracción soluble como de la fracción insoluble. Ambas fracciones presentaron tratamientos diferentes, que serán descritos en los siguientes apartados, hasta el punto donde fue digerida por la proteasa TEV. A partir de este punto, ambas fracciones compartieron el mismo protocolo de purificación, pero sin ser mezcladas. La total purificación de la proteína madura nativa es resultado de una serie de técnicas cromatográficas, tales como cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC), de gel filtración (GF), de fase reversa (RP) e intercambio

catiónico (CEx). En la figura M3, se presenta a modo de resumen el evento de purificación global de la proteína proveniente de las fracciones solubles e insolubles.



**Figura M3. Resumen de la purificación de scFv-h3D6.** El proceso de purificación del scFv-h3D6, incluye desde la sonicación del cultivo celular hasta la obtención de la proteína nativa, pasando por una serie de técnicas cromatográficas tales como: cromatografía afinidad (IMAC), gel filtración (GF), fase reversa (RP) e intercambio catiónico (CEx). La proteína expresada se presenta como una proteína de fusión con diversos módulos proteicos (proteína precursora), que fueron eliminados mediante una proteólisis limitada con TEV, dando lugar al scFv-h3D6 liberado (proteína madura).

### M2.6.1. Purificación de proteína de la fracción soluble

Para el caso de la fracción soluble, dado que la proteína precursora (entre sus módulos proteicos tiene fusionada una cola de histidinas) se encontraba presente en una fracción tan heterogénea en composición proteica, se realizó una pre-purificación mediante cromatografía de afinidad IMAC, previa a la digestión con TEV.

#### M2.6.1.1. Cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC)

Esta técnica cromatográfica se basa en la afinidad de la cola de histidinas de la proteína recombinante por un metal que se encuentra inmovilizado. En este caso, la fracción soluble se hizo pasar por una columna HisTrap™ HP de 5 mL que contiene

Níquel inmovilizado en Sepharose (GE Healthcare). La cromatografía se realizó a un flujo aproximado de 1 mL/min, bajo el siguiente protocolo:

1. Lavar la columna con 15 VC (1 VC=5 mL) de H<sub>2</sub>O.
2. Equilibrar con 10 VC de tampón de unión IMAC (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 0.5 M, EDTA 0.5 mM, pH 7.4).
3. Introducir la muestra en la columna mediante una bomba P1 (GE Healthcare) a un flujo aproximado de 1 mL/min.
4. Lavar con 10 VC de tampón de unión IMAC.
5. Lavar con 15 VC de tampón de lavado (tampón de unión que contiene Imidazol 50 mM).
6. Eluir la proteína de interés con 6 VC de tampón de elución (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 0.5 M, imidazol 200 mM, pH 7.4), recogiendo fracciones de 500 µL en tubos eppendorf previamente enfriados que contienen 500 µL de EDTA 1 mM.
7. Analizar las diferentes fracciones por SDS-PAGE para determinar cuáles formarán parte del *pool* con el que se continuará la purificación.

### **M2.6.2. Purificación de proteína de la fracción insoluble**

En el caso de la fracción insoluble, fue necesario realizar una solubilización y un replegamiento de la proteína presente en los cuerpos de inclusión, y dada la composición más homogénea de la fracción (la proteína expresada es el mayor componente), no fue necesario una pre-purificación para la digestión con TEV.

#### **M2.6.2.1. Solubilización y replegamiento**

La pastilla de restos celulares producto de la lisis celular presenta gran cantidad de proteína mal plegada contenida de forma insoluble en cuerpos de inclusión, por lo que fue necesario desnaturalizarla y solubilizarla para posteriormente replegarla, mediante el siguiente protocolo:

1. Solubilizar la pastilla celular con 40 mL de Urea 8 M en tampón Tris-HCl 100 mM pH 8.5, Glutation reducido (GSH) 10 mM, para los 4 L de cultivo procesados, agitado suavemente en un orbital por 2 h a 4°C.
2. Centrifugar la muestra a 43700 g, 19000 rpm (rotor JA20, Beckman) por 45 min a 4°C.
3. Recuperar el sobrenadante y filtrar por 0.45 µm (Millex-HV-PVDF, Millipore).
4. Realizar una dilución 1:10 goteando la muestra lentamente en tampón de replegamiento (Tris-HCl 100 mM, L-Arginina 400 mM, glutatión oxidado (GSSG) 0.15mM, pH 8.5) previamente frío. La proporción final del par redox GSH:GSSG es de 1 mM:0.15 mM (Proba K. y col., 1997).
5. Dejar la muestra a 4°C en agitación muy suave por 36 h.
6. Centrifugar la muestra a 43700 g, 19000 rpm (rotor JA20, Beckman) por 30 min a 4°C, y recuperar el sobrenadante.
7. Concentrar la proteína a la mitad del volumen original (400 mL→200 mL) para facilitar su posterior manejo.

### M2.6.3. Digestión con la proteasa TEV

La proteasa TEV (*Tobacco Etch Virus*) proviene del virus del tabaco y es altamente específica debido a que reconoce una secuencia diana de 7 residuos (ENLYFQ↓G). Disponemos de la construcción en el plásmido pMHTΔ238, resistente a Kan, expresado en la cepa C41, por lo que se expresó y purificó la proteasa TEV como se describe en el protocolo del apartado M2.7. La digestión con TEV se realizó en las siguientes condiciones, de acuerdo a Nallamsetty y col., (2004):

1. Dializar la muestra a tampón de digestión TEV (Tris-HCl 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0.5 mM, pH 8.3), de acuerdo al protocolo del apartado M2.8.1.
2. Centrifugar la muestra a 43700 g, 19000 rpm (rotor JA20, Beckman) por 30 min a 4°C, y recuperar el sobrenadante.
3. Cuantificar la proteína sin procesar a 280 nm.
4. Añadir el par redox (GSH:GSSG) a una concentración final de 3 mM:0.3 mM.
5. Añadir la proteasa TEV en la muestra en una proporción 1:50 (p:p).
6. Incubar a 30°C con una agitación suave de 50 rpm durante 4 h.

### M2.6.4. Cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC)

Una vez ocurrido el evento de digestión con la proteasa TEV, la muestra contenía una mezcla de proteína scFv madura, scFv precursora (proteína no digerida, que aun contiene el 6His-tag), y el modulo proteico fusionado con 6His-tag, además de la misma proteasa TEV.

En este paso de purificación, lo que se pretendió fue separar la proteína madura de la mezcla aprovechando que es la única especie que no poseía la cola de histidinas. Para ello se utilizó el siguiente protocolo general, haciendo pasar la muestra por 2 columnas acopladas en serie HisTrap™ HP de 5 mL (VC= 10 mL), a un flujo aproximado de 1 mL/min:

1. Dializar la muestra a tampón de unión IMAC (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8.3).
2. Lavar la columna con 10 VC de H<sub>2</sub>O.
3. Equilibrar la columna con 10 VC de tampón de unión IMAC (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8.3).
4. Filtrar la muestra con un filtro de 0.45 μm y aplicar la muestra en las columnas acopladas a un flujo de ~1 mL/min.
5. Recoger el *flow* que sale de la columna (aquí se encuentra el scFv procesado, ya que no presenta afinidad por la columna).
6. Lavar la columna con 5 VC de tampón de unión IMAC (permite eluir proteína madura residual sin afinidad pero con interacción inespecífica). Mezclar la fracción del lavado con el *flow* para formar el *pool* de proteína madura.
7. Lavar la columna con 20 VC de tampón B (Tris-HCl 80 mM, NaCl 4 M, Imidazol 2 M, pH 8.3).
8. Tomar muestra en cada paso de la cromatografía (50 μL) y analizar por SDS-PAGE.

Una vez colectado el *flow*, la proteína fue concentrada mediante filtros de centrifuga Amicon®, según protocolo de apartado M2.9; posteriormente se realizó la total

purificación del scFv-h3D6 nativo mediante una serie de cromatografías que a continuación se describen.

#### **M2.6.5. Cromatografía de gel filtración (GF)**

La cromatografía de GF (también referida como cromatografía de exclusión molecular, SEC), nos permite una separación de proteínas de acuerdo a las diferencias de tamaño cuando estas pasan a través de un gel filtrante (matriz porosa) empaquetado en una columna. El fundamento de la separación es que las moléculas más grandes eluyen primero de la columna ya que no quedan atrapadas por los poros de la matriz, situación que sí sucede con las moléculas más pequeñas que tienen que atravesar todo el tamizado molecular del gel. Las proteínas son eluidas isocráticamente, por lo que no hay necesidad de utilizar diferentes tampones durante la separación, pero existe la necesidad de que el volumen de la muestra inyectada no sobrepase el 2% del total del volumen de columna (VC) para lograr una buena resolución de separación.

En el presente trabajo se utilizaron dos columnas de GF, la primera fue la columna Superdex75 Hiloal 26/60 (VC= 360 mL) con fines de la purificación final del scFv-h3D6, y la segunda fue la columna Superdex75 10/300 GL (VC= 25 mL) usada con fines analíticos para evaluar la posible oligomerización del scFv-h3D6 puro a altas concentraciones.

El protocolo general de esta técnica es el siguiente:

1. Acoplar la columna al sistema AKTA y lavar la columna con 3 VC de agua MQ.
2. Equilibrar la columna con 3 VC de PBS pH 7.4.
3. Filtrar la muestra e inyectarla a la columna, auxiliándose de un filtro de 0.2  $\mu\text{m}$  (Millipore) y del correspondiente *loop* (GE Healthcare), respectivamente; cuidando que el volumen inyectado no sobrepase el 2% del VC.
4. Aplicar un programa con un gradiente isocrático a un flujo de 2 mL/min que aparece por defecto para este tipo de cromatografías (dependiendo la columna usada) en el sistema AKTA y coleccionar cada 1 mL.
5. Realizar el *pool* de proteína de acuerdo al cromatograma y al perfil de electroforesis SDS-PAGE observados.

#### **M2.6.6. Cromatografía de fase reversa (RPC)**

La cromatografía de fase reversa (RPC) es una técnica altamente resolutive que permite separar proteínas con diferencias pequeñas en su hidrofobicidad, basada en la interacción reversible entre la fase estacionaria altamente hidrofóbica y las regiones hidrofóbicas de la proteína expuestas por el uso de TFA en el tampón de unión.

La cromatografía fue efectuada en un cromatógrafo ÄKTApurifier UPC 10 equipado con un detector UV<sub>280</sub> (Monitor UV-900). La muestra se inyectó en una columna

Resource RPC 3 mL, previamente equilibrada con tampón A (unión) (H<sub>2</sub>O, TFA 0.1%). La separación se realizó mediante un gradiente lineal creciente (10-50%/45 CV) de tampón B (Acetonitrilo, TFA 0.1%) a un flujo de 5 mL/min.

### M2.6.7. Cromatografía de intercambio catiónico (CEX)

La cromatografía de intercambio catiónico (CEX) se basa en las cargas positivas que pueden adquirir las proteínas según las condiciones del medio en que se encuentren y su interacción electrostática complementaria con una matriz cargada negativamente. La proteína se carga positivamente bajando el pH del tampón en que se encuentra por debajo de su punto isoeléctrico (pI) y se potencia su interacción con la resina utilizando un tampón de baja fuerza iónica.

Se utilizó una columna Resource S de 6 mL (GE Healthcare), a un flujo de 1 mL/min, en el cromatógrafo ÄKTApurifier UPC 10 y un colector de fracciones (Frac-920, GE Healthcare) programado a 1 mL/fracción. Los tampones utilizados para el gradiente isocrático fueron: Tampón A: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.3 mM, pH 6.5; y Tampón B: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.3 mM, NaCl 1 M, pH 6.

El protocolo de purificación es el siguiente:

1. Dializar la muestra a tampón A de CEX (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.3 mM, pH 6.5).
2. Lavar la columna con 15 VC (1 VC= 6 mL) de H<sub>2</sub>O.
3. Equilibrar la columna con 20 VC de tampón A.
4. Filtrar la muestra con un filtro de 0.45 µm e introducir a la columna auxiliándose de un *superloop* de 50 mL a un flujo de 2 mL/min.
5. Aplicar un programa que contenga: lavado inicial: tampón A, 2.5 VC; elución de separación: gradiente lineal 0.06% tampón B/mL (de 0 a 10% de tampón B en 28 VC); lavado intermedio: gradiente lineal 7.5% tampón B/mL (de 10 a 100% de tampón B en 2 VC); lavado final: 100% tampón B, 5 VC; reequilibrado de la columna: 0% tampón B, 5 VC.
6. Analizar el cromatograma resultante, visualizar por SDS-PAGE, y realizar el *pool* con las fracciones adecuadas.
7. Dializar a PBS el *pool* seleccionado.

### M2.7. Expresión y purificación de la proteasa TEV

La obtención de la proteasa TEV recombinante en el laboratorio se logró gracias a que dispusimos de una construcción (plásmido pMHTΔ238), que nos permitió la expresión heteróloga de dicha proteasa. Por lo que, se expresó en 4 L de cultivo (*E. coli* cepa C41) y purificó TEV como se describe a continuación:

1. Picar una colonia de C41 recién transformada en 5 mL de medio LB suplementado con kanamicina. Incubar a 37°C y 250 rpm, ON.

2. Inocular con 5 mL de cultivo saturado cada uno de los 8 matraces de 2 L que contienen 0.5 L de LB suplementado con kanamicina e incubar a 37°C y 250 rpm durante 4 h ( $D.O_{550} = 0.7-1.2$ ).
3. Atemperar el incubador a 25°C lo más rápido que sea posible.
4. Inducir con IPTG 0.5 mM (disolución madre 1 M, dilución 1:2000) a 25°C y 250 rpm por 4 h (tomando muestra para SDS-PAGE cada hora para monitorear la expresión).
5. Centrifugar los cultivos a 5520 g por 30 min a 4°C.
6. Eliminar el sobrenadante y pesar la pastilla celular.
7. Resuspender la pastilla lavada en tampón A de IMAC-TEV ( $Na_2HPO_4$  20 mM; NaCl 500mM, pH 7.5), en una proporción de 6 mL de tampón/g de pastilla celular.
8. Lisar las células mediante 3 ciclos de congelación/descongelación y posterior sonicación en 6 ciclos de 1 min al 50% de frecuencia con intensidad 9 (Sonicador Sonifier 450, Branson), manteniendo la muestra en hielo para evitar sobrecalentamiento.
9. Centrifugar a 43700 g, 19000 rpm (rotor JA20, Beckman) por 30 min a 4°C y recuperar el sobrenadante.
10. De forma paralela al punto 9, lavar 2 columnas HisTrap™ HP 5 mL con 10 VC (considerar 1 VC= 10 mL) de H<sub>2</sub>O y equilibrar columna con 10-20 VC de tampón A IMAC-TEV auxiliándose de una bomba P1 a un flujo de ~2 mL/min.
11. Acoplar las 2 columnas e inyectar la muestra en las columnas (fuera del sistema AKTA) utilizando una bomba P1 a un flujo de ~2 mL/min. Posteriormente, el resto de la cromatografía se realiza dentro del sistema AKTA.
12. Montar en el cromatógrafo ÄKTApurifier UPC10 las 2 columnas acopladas en serie de 5 mL HisTrap™ HP.
13. De forma paralela al punto 11, equilibrar el sistema AKTA utilizando los siguientes tampones:
  - Tampón A IMAC-TEV (T. A, unión):  $Na_2HPO_4$  20 mM, NaCl 500 mM, pH 7.5.
  - Tampón B IMAC-TEV (T. B, elución):  $Na_2HPO_4$  20 mM, NaCl 350 mM, Imidazol 500 mM, pH 7.5.
14. Aplicar un programa conteniendo los siguientes gradientes escalonados: lavado 0% T.B, 2 VC; lavado 15% T.B, 4 VC; elución final 100% T.B, 5 VC. Utilizar un flujo de 2.5 mL/min y realizar fracciones de 2.5 mL.
15. Visualizar el cromatograma y analizar por SDS-PAGE las diferentes fracciones.
16. Realizar un *pool* con las fracciones del pico resultante de la elución final 100% T.B.
17. Cambiar el tampón del *pool* por tampón de almacenamiento (Tris-HCl 20 mM pH 7.3, NaCl 150 mM, glicerol 10%), mediante una columna *PD-10 Desalting Columns* (GE Healthcare), según el protocolo M2.8.2.
18. Cuantificar la proteína a 280 nm y determinar la concentración. Nota 1: utilizar una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. Nota 2: para el cálculo de la concentración considerar un  $\epsilon_{280}^{0.1\%}$  (coeficiente de extinción molar expresado en Absorción de una muestra a 1 mg/mL) para TEV de 1.384.
19. Hacer alícuotas de 1 mL en *ependorfs*, congelar con N<sub>2</sub> líquido y almacenar a -20°C.

## **M2.8. Cambio de tampón**

Muchas veces, como parte del proceso de purificación o de preparación para un análisis de la proteína, fue necesario realizar cambios de tampón, mediante una diálisis, o bien, mediante el uso de una columna PD10.

### **M2.8.1. Diálisis**

El uso de membranas porosas para dializar moléculas es de los procedimientos de laboratorio más comunes. Tiene el inconveniente de la duración del proceso, pero los beneficios de realizar el cambio en condiciones lentas y de equilibrio, permitiendo disminuir las posibilidades de precipitaciones no deseadas.

En el grupo de investigación se utilizaron membranas de poro MWCO 12-14 kDa (Iberlabo), que mediante una doble diálisis en volúmenes de 5 L/diálisis, permitió dializar muestras de proteína con un factor de dilución de 50X50. Cada diálisis se realizó a 4°C, durante un mínimo de 6 h en agitación suave.

### **M2.8.2. PD10 (*Desalting Columns*)**

El uso de columnas pre-empaquetadas PD10 (Amersham Bioscience), que contienen una matriz de Sephadex™ G-25, permitió realizar cambios de tampón de manera rápida a proteínas mayores de 5 kDa siguiendo el siguiente protocolo:

1. Si la columna es nueva, cortar la punta inferior y eliminar el exceso de líquido que tenga la columna.
2. Acoplar en un soporte universal la columna PD10.
3. Lavar la columna con 25 mL de agua MQ y posteriormente equilibrar con 25 mL del tampón de elución (tampón al que se pretende cambiar) frío.
4. Añadir un volumen total de 2.5 mL de muestra.
5. Eluir con 3.5 mL de tampón de elución frío y coleccionar el *flow* (la proteína se encuentra presente aquí) en un recipiente con un baño de hielo.
6. Repetir los pasos 3 y 4 hasta completar el volumen total de la muestra inicial.
7. Para el almacenamiento de la columna, al terminar el proceso de elución, lavar la columna con 25 mL de agua y posteriormente con 25 mL de etanol al 20%.

## **M2.9. Concentración de proteínas por filtros de centrifuga Amicon®**

En algunas ocasiones fue necesario concentrar la proteína, para esto se utilizaron filtros de centrifuga Amicon Ultra® 10K (Millipore). Dadas las características de estos filtros, la concentración de proteínas se realizó en condiciones de centrifugación de baja velocidad y mediante el uso de una membrana que impidió el paso de moléculas

mayores de 10 kDa, dejando pasar solo el tampón en el que se encuentran. La concentración se efectuó siguiendo el siguiente protocolo:

1. Lavar el filtro Amicon® con agua MQ y realizar un ciclo de centrifugación a 3500 g por 5 min.
2. Equilibrar los filtros con el tampón en el que se encuentra la proteína mediante un ciclo de centrifugación a 3500 g por 5 min.
3. Añadir la muestra en la unidad del filtro y realizar un ciclo de centrifugación a 3500 g por un tiempo variable de acuerdo a la concentración a la que se desea llegar.
4. Recuperar la proteína concentrada insertando una pipeta en la parte inferior de la unidad de filtro, cuidando en resuspender suavemente para sustraer todo el volumen sin tocar la membrana.
5. Para la limpieza y el almacenamiento de los filtros, al terminar el proceso de concentración, lavar abundantemente los filtros con agua MQ y posteriormente con etanol al 20%.

### **M3. Métodos analíticos de proteínas**

#### **M3.1. Técnicas electroforéticas**

Los métodos electroforéticos se basan en la separación de proteínas mediante la aplicación de un campo eléctrico externo. Para fines organizativos de la tesis, en este bloque se agrupan las técnicas de SDS-PAGE, electroisoeñóque, inmunodetección tipo WB, así como técnicas auxiliares como teñido de geles, revelado de membranas PVDF, cuantificación de proteínas por BCA y ensayos de proteólisis limitada con termolisina.

##### **M3.1.1. SDS-PAGE**

La SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) es la electroforesis de proteínas más ampliamente usada. Se trata de un tipo de electroforesis en la que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia del detergente SDS y, generalmente, con agentes reductores ( $\beta$ -mercaptoetanol) que eliminan los puentes disulfuro, anulando de este modo efectos conformacionales (Laemmli, 1970). El SDS es un detergente iónico de acción desnaturalizante que se une a las cadenas polipeptídicas en una relación de 1.4 g de SDS por 1 g de proteína. Esta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula proteica y confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas en complejo con SDS viajen hacia el ánodo. La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional sólo a la masa de la

proteína, pues todas tienen la misma carga por unidad de masa. Esta relación lineal desaparece para proteínas de masa molecular inferior a 12 kDa debido a que el tamaño micelar mínimo del SDS es del mismo orden, por lo que proteínas de diferente masa molecular quedan atrapadas en micelas del mismo tamaño y carga (Neville, 1971).

### M3.1.1.1. Preparación de geles

La separación por SDS-PAGE, se realizó sobre geles de poliacrilamida que se forman por la polimerización de la acrilamida gracias a la acción de un agente entrecruzador (*cross-linker*), la bis-acrilamida, en presencia de un iniciador (TEMED: N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y un catalizador (persulfato amónico). El método discontinuo es el más empleado actualmente, y se basa en un gel de electroforesis formado por dos fases con porcentajes de acrilamida y pH diferentes:

- Gel concentrador: permite la concentración de la muestra cargada, proporcionando un punto de partida igual para todas las proteínas que entran al gel separador (acrilamida 5%, pH 6.8).
- Gel separador: con un porcentaje de acrilamida variable, permite la separación de las proteínas de acuerdo a su masa molecular (generalmente acrilamida 12-15%, pH 8.8).

Para preparar los geles se utilizaron 3 soluciones diferentes, utilizando agua lo más pura que sea posible (MilliQ, MQ):

- Solución A: Acrilamida:bisacrilamida (37.5:1) al 30% (Proteogel, Conda-Pronadisa).
- Solución B: Tris-HCl 1.5 M, SDS 0.4% (pH 8.8).
- Solución C: Tris-HCl 0.5 M, SDS 0.4% (pH 6.8).

Para la preparación del gel separador (*running*) se realizó lo siguiente:

1. Montar el sistema para la preparación de geles *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* (Bio-Rad).
2. Realizar en un vaso de precipitados la mezcla de soluciones correspondientes para la preparación de un par de geles de acrilamida al 12, 15 o al 18%, con la siguiente relación en el gel separador (*running*):

Separador	A (mL)	B (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)
12%	4	2.5	3.5
15%	5	2.5	2.5
18%	6	2.5	1.5

3. Tomar 10 µL de TEMED y añadir 100 µL de persulfato amónico al 10% (p/v) para polimerizar.

4. Verter la solución en el cristal espaciador y poner unas gotas de N-butanol para nivelar el gel y dejar que polimerice.
5. Una vez polimerizado, retirar el N-butanol y lavar 3 veces con agua destilada. Eliminar el resto de agua destilada con papel de filtro.

Una vez realizado el gel separador, se procedió a la preparación del gel concentrador (*stacking*) de la siguiente manera:

1. Realizar en un vaso de precipitados la mezcla de soluciones correspondientes a la preparación de dos geles, con la siguiente relación en el gel concentrador (*stacking*):

Concentrador	A (mL)	C (mL)	H <sub>2</sub> O (mL)
4%	0.67	1.25	3

2. Tomar 5 µL de TEMED y añadir 50 µL de persulfato amónico al 10% (p/v) para polimerizar.
3. Verter la solución del gel concentrador en el cristal espaciador y colocar los peines correspondientes para dejar polimerizar.

### M3.1.1.2. Evento de separación de proteínas por SDS-PAGE

1. Montar los geles en la cámara de electroforesis (Sistema *Mini-PROTEAN® Tetra Cell*, Bio-Rad).
2. Preparar la muestra añadiendo 32.5 µL de tampón de aplicación 5X por cada 100 µL de muestra. Calentar 3 min a 100°C (siempre que la muestra no contenga urea). El tampón de aplicación 5X tiene la siguiente formulación para 5 mL:

Tampón de aplicación SDS-PAGE 5X	Masa ó volumen necesario (µL, mL ó g)
2-mercaptoetanol 6%	300 µL
glicerol 50% (v/v)	2.5 mL
azul bromofenol 0.4% (p/v)	0.02 g
SDS 10% (p/v)	0.50 g
Tris-HCl (200 mM) (pH 6.8)	0.121 g

3. Preparar tampón de elución 1X mediante dilución 1:10 de la solución stock 10X. El tampón de elución 10X tiene la siguiente formulación para 1L.

Stock 10X tampón de elución	Masa necesaria (g)
Tris (0.25 M)	30.29
Glicina (1.87 M)	140.38
SDS 1% (p/v)	10

4. Llenar la cámara de electroforesis con tampón de elución 1X.
5. Cargar 5 µL de marcador de peso molecular de proteínas (*Precision plus protein Unstained standards*, Bio-Rad). Cargar las muestras (volúmenes diferentes en función del peine utilizado) vigilando que no difundan excesivamente.

6. Aplicar un amperaje constante de 20 mA/gel y dejar hasta que el colorante del tampón de aplicación haya desaparecido de la parte inferior del gel.
7. Una vez finalizada la electroforesis, retirar el gel de los cristales para disponer a teñir las proteínas por los métodos que se describen en el apartado M3.1.8.1.

### M3.1.2. Electroisoeofoco

La determinación del punto isoelectrico teórico de la proteína se realizó utilizando el sitio online: <http://web.expasy.org/protparam>.

Para la determinación práctica del punto isoelectrico se utilizaron geles de electroisoeofoco (IEF) que separan las proteínas en base a su carga neta en vez de a su peso molecular. Estos geles están cargados con moléculas anfotéricas que crean un gradiente de pH. Las proteínas migran a su punto isoelectrico, que es el punto donde el total de sus cargas netas es cero.

Los geles utilizados eran prefabricados, no desnaturizantes [5% T (Acilamida), 3% C (Crosslinker), 2% de anfolitos] (No. Ref. 161-1111, Biorad) cubriendo un rango de pH de 4 a 8.5. Se utilizó el protocolo descrito en *Ready Gels Application Guide* (No.Ref. 161-0993, Biorad):

1. Montar los geles en la cámara de electroforesis (Sistema *Mini-PROTEAN® Tetra Cell*, Bio-Rad).
2. Preparar la muestra añadiendo tampón de aplicación nativo 10X, 5  $\mu$ L por cada 50  $\mu$ L de muestra. El tampón de aplicación nativo 10X tiene la siguiente formulación para 5 mL:

<u>Tampón de aplicación nativo 10X</u>	<u>Masa o volumen necesario (mL ó g) para 5 mL</u>
glicerol 50% (v/v)	2.5 mL
azul bromofenol 0.1% (p/v)	0.005 g

3. Preparar el tampón del cátodo 1X mediante dilución 1:10 de la solución stock 10X. El tampón del cátodo 10X tiene la siguiente formulación para 500 mL.

<u>Stock 10X</u>	<u>Masa necesaria (g) para 500 mL</u>
<u>Tampón del cátodo</u>	
Lisina (1 M)	72.5
Arginina (1 M)	87.1

4. Preparar el tampón del ánodo 1X mediante dilución 1:10 de la solución stock 10X. El tampón del ánodo 10X tiene la siguiente formulación para 500 mL.

<u>Stock 10X</u>	<u>Volumen necesario (mL) para 500 mL</u>
<u>Tampón del ánodo</u>	
Acido fosfórico 4% (v/v)	21

5. Llenar el interior del tanque (espacio creado entre los geles) con el tampón del cátodo 1X.
6. Llenar el resto de la cámara de electroforesis con tampón de ánodo 1X frío colocando además un porta-hielo para evitar sobrecalentamiento de la electroforesis.
7. Cargar 10 µL de estándares de IEF de rango de pI de 4.5 a 9.6 (IEF Standards, No. Ref. 161-0310, Bio-Rad). Cargar las muestras (20 µL por pocillo) vigilando que no difundan excesivamente.
8. Realizar la electroforesis con tres voltajes escalonados: i) aplicar durante 1 h un voltaje constante de 100 V (~5-25 mA), posteriormente; ii) aplicar durante 1 h un voltaje constante de 250 V, y por último; iii) aplicar durante 30 min un voltaje constante de 500 V.
9. Una vez finalizada la electroforesis, retirar el gel de los cristales para disponer a teñir las proteínas por el método de tinción de IEF que se describe en el apartado M3.1.8.2.

### M3.1.3. Análisis de Inmunodetección tipo *western-blot* para proteínas de fusión con 6His-tag

Para asegurar la presencia de nuestra proteína recombinante en muestras complejas (por ejemplo en las fracciones de proteína total y soluble) incluso a bajas concentraciones, se realizó una inmunodetección con un anticuerpo Anti His-tag, aprovechando la presencia de una cola de histidinas (6His-tag) en las proteínas recombinantes expresadas. Para esto, se siguió el siguiente protocolo:

1. Realizar una electroforesis de SDS-PAGE al 12%.
2. Mientras corre la electroforesis, activar la membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF 0.45 µm, Immobilon®-P) con metanol al 100% durante 2 min y posteriormente realizar un lavado con H<sub>2</sub>O.
3. Una vez finalizada la electroforesis, retirar el gel de los cristales y dejar equilibrando tanto el gel, el papel Whatman (3mm) y la membrana PVDF en tampón de transferencia 1X (100 mL tampón de transferencia 10X, 200 mL metanol absoluto, 700 mL H<sub>2</sub>O bi-destilada) durante 10 min. El tampón de transferencia 10X, pH 8.3, tiene la siguiente formulación para 2 L:

<u>Tampón de transferencia</u> <u>10X</u>	<u>Masa necesaria (g)</u> <u>para 2 L</u>
Tris (0.5 M)	116.4 g
Glicina (0.5 M)	58.6 g
SDS 0.4 % (p/v)	8 g

4. Montar el sándwich de transferencia, en el siguiente orden: el papel Whatman, encima el gel, la membrana PVDF y el papel Whatman. Cuidando de no tener presencia de burbujas entre el espacio del gel y la membrana.
5. Realizar la transferencia utilizando el sistema *MiniTrans-Blot Electroforesis Transfer Cell* (Bio-Rad) a voltaje constante (100 V) durante 1 h en tampón de transferencia, según el método descrito por Renart y col. (1979).
6. Bloquear la membrana durante 1 h con BSA al 1% en tampón de bloqueo (T-TBS: 100 mL TBS 10X, 900 mL H<sub>2</sub>O bi-destilada, 1 mL Tween-20, pH 8). El tampón TBS 10X, pH 8, tiene la siguiente formulación para 2 L:

Tampón TBS 10X	Masa necesaria (g) para 2 L
NaCl (1.5 M)	176 g
Tris (0.2 M)	60 g
KCl (30 mM)	4.4 g

7. Incubar ON a 4°C con el anticuerpo primario *monoclonal IgG1 mouse Anti His-tag* (Dianova, GmbH) a dilución 1:2000 en tampón de bloqueo.
8. Realizar 3 lavados de 15 min con T-TBS.
9. Incubar durante 1 h a TA con el anticuerpo secundario *IgG goat anti-mouse* conjugado con fosfatasa alcalina (*Dianova GmbH*) a dilución 1:2000 en tampón de bloqueo. Debido al revelado con fosfatasa alcalina, se han de evitar protocolos con PBS.
10. Repetir el paso 8.
11. Revelar con el kit *AP conjugate Substrate* (Bio-Rad).
12. Secar la membrana y digitalizarla como se indica en el apartado M3.1.9.
13. Guardar la membrana seca protegida de la luz (en papel de aluminio).

#### **M3.1.4. Análisis de inmunodetección tipo *western-blot* para especies oligoméricas de A $\beta$**

El deterioro cognitivo en la enfermedad de Alzheimer ha sido relacionado con la presencia de especies citotóxicas del péptido A $\beta$  de amplio rango de oligomerización. Para la inmunodetección de dichas especies fue necesario un protocolo especial, que entre sus características se encuentran:

- i. Uso de geles con presencia de urea 8 M.
- ii. Uso de membranas PVDF con un tamaño de poro de 0.2  $\mu$ m.
- iii. Fijación y exposición del epítipo de reconocimiento del A $\beta$  mediante ebullición de la membrana.
- iv. Uso del anticuerpo 6E10 (Signet Labs) que es un anticuerpo que detecta todas las formas de A $\beta$ .

##### **M3.1.4.1. Preparación de geles con urea 8 M**

Para la preparación de los geles se utilizaron 3 soluciones diferentes, con agua MQ:

- Solución A: Acrilamida: bisacrilamida (19:1) al 30% (No. Ref.: A3449, Sigma-Aldrich).
- Solución B: Tris 1.6 M, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.4 M, (pH 8.1).
- Solución C: BisTris 0.8 M, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.2 M, (pH 6.7).
- Solución D: SDS 20% (p/v).

Para la preparación del gel separador (*running*) se realizó lo siguiente:

1. Montar el sistema para la preparación de geles *Mini-PROTEAN® Tetra Cell* (Bio-Rad).
2. Realizar en un vaso de precipitados la mezcla de soluciones correspondientes para la preparación de un par de geles al 12% de acrilamida, con la siguiente relación en el gel separador (*running*):

<u>Separador</u>	<u>A (mL)</u>	<u>B (mL)</u>	<u>D (μL)</u>	<u>H<sub>2</sub>O (mL)</u>	<u>Urea (g)</u>
12%	4	2.5	50	Hasta 10 mL	4.8

3. Tomar 10 μL de TEMED y añadir 100 μL de persulfato amónico al 10% (p/v) para polimerizar.
4. Una vez vertida la solución del gel separador en el cristal espaciador, poner unas gotas de N-butanol para nivelar el gel y dejar que polimerice.
5. Una vez polimerizado, retirar el N-butanol y lavar 3 veces con agua destilada. Eliminar el resto de agua destilada con papel de filtro.

Una vez realizado el gel separador, se procedió a la preparación del gel concentrador (*stacking*) de la siguiente manera:

1. Realizar en un vaso de precipitado la mezcla de soluciones correspondientes, con la siguiente relación en el gel concentrador (*stacking*):

<u>Concentrador</u>	<u>A (mL)</u>	<u>C (mL)</u>	<u>D (μL)</u>	<u>H<sub>2</sub>O (mL)</u>	<u>Pironina Y 0.1% (μL)</u>
4%	1	2.5	25	1.5	50

2. Tomar 8 μL de TEMED y añadir 50 μL de persulfato amónico al 10% (p/v) para polimerizar.
3. Verter la solución del gel concentrador en el cristal espaciador y colocar los peines correspondientes para dejar polimerizar.

### M3.1.4.2. Preparación de las muestras y referencias internas

Las muestras fueron preparadas de acuerdo a lo siguiente:

1. Preparar las muestras, por cada 100 μL de muestra añadir el mismo volumen de tampón de aplicación WB 2X, calentar a 95°C por 5 min. El tampón de aplicación WB 2X tiene la siguiente formulación para 50 mL:

<u>Tampón de aplicación WB 2X</u>	<u>Masa necesaria (g)</u>
BisTris (0.72 M)	7.5
Bicina (0.32 M)	2.6
Glicerol 25% (p/v)	12.5
DTT (100 mM)	0.8
Azul bromofenol 0.08% (p/v)	0.004

La referencia interna (péptido sintético Aβ<sub>1-42</sub> monomérico) fue preparada bajo el siguiente protocolo (Dahlgren y col., 2002):

1. Realizar un pretratamiento para la preparación de péptidos monodispersos, mediante la rotura de las fuerzas hidrofóbicas y la estructura de hoja- $\beta$  presente en el péptido, para ello, disolver a 200  $\mu$ M con HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-isopropanol) el péptido sintético liofilizado A $\beta$ <sub>1-42</sub> purificado con HCl como contra-ion (Caslo Laboratories ApS).
2. Preparar alícuotas de 150  $\mu$ L y eliminar el HFIP mediante un secado al vacío en un SpeedVac (Savan instrument), para posteriormente almacenar las alícuotas del péptido seco a -80°C.
3. Tomar una alícuota y resuspender el péptido con 6  $\mu$ L de DMSO para posteriormente diluir con agua a un volumen de 150  $\mu$ L (200  $\mu$ M). Realizar alícuotas de trabajo de 5  $\mu$ L y almacenar a -80°C.
4. Tomar una alícuota de trabajo y realizar una dilución 1:200 (4.5 ng/ $\mu$ L).
5. Preparar la referencia interna, tomando 100  $\mu$ L de la dilución 1:200 y añadir 100  $\mu$ L de tampón de aplicación WB 2X para posteriormente calentar a 95°C por 5 min.

### M3.1.4.3. Evento de SDS-PAGE, electrotransferencia e inmunodetección del péptido A $\beta$

1. Montar los geles en la cámara de electroforesis (Sistema *Mini-PROTEAN® Tetra Cell*, Bio-Rad).
2. Llenar el interior del tanque con el tampón del cátodo 1X (Bicina 0.2 M, SDS 0.25% (p/v), NaOH 0.1 M, pH 8.2).
3. Llenar el resto de la cámara de electroforesis con tampón de ánodo 1X (Tris-HCl 0.2 M, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05 M, pH 8.1).
4. Cargar 5  $\mu$ L de marcador de peso molecular de proteínas preteñido (*Precision Plus Protein™ Dual Xtra Standards*, No. Ref.161-0377, Bio-Rad). Cargar 4.5 ng y 18 ng del péptido A $\beta$  (referencia interna) en los pocillos extremos del gel y por último cargar 45-120  $\mu$ g de las muestras (concentración previamente determinada, de acuerdo al apartado M.3.1.7) vigilando que no difundan excesivamente. Antes de cargar cada pocillo realizar una limpieza de cada uno de ellos, pipeteando vigorosamente para eliminar residuos de acrilamida no polimerizada completamente i/o restos de urea.
5. Aplicar un voltaje constante de 100 V y dejar hasta que el colorante del tampón de aplicación haya desaparecido de la parte inferior del gel.
6. Mientras corre la electroforesis, activar la membrana de difluoruro de polivinilideno (PVDF, Immobilon®-PSQ).
7. Una vez finalizada la electroforesis, retirar el gel de los cristales y dejar equilibrando tanto el gel, el papel Whatman (3mm) y la membrana PVDF en tampón de transferencia 1X (100 mL tampón de transferencia 10X, 100 mL metanol absoluto, 800 mL H<sub>2</sub>O bi-distilada) durante 10 min. El tampón de transferencia 10X, pH 8.3, tiene la siguiente formulación para 2 L:

Tampón de transferencia 10X	Masa necesaria (g)
CAPS (100 mM)	116.4 g
Glicina (0.4 M)	58.6 g
SDS 0.4% (p/v)	8 g

8. Montar el sándwich y realizar la transferencia utilizando el sistema MiniTrans-Blot Electroforesis Transfer Cell (Bio-Rad), a amperaje constante (200 mA), durante 1.5 h; en tampón de transferencia frío nuevo y en agitación constante según el método descrito por Renart y col., (1979). Utilizar solo un cassette del sistema y no reutilizar el tampón de transferencia.

9. Una vez terminada la transferencia, realizar un lavado con PBS e incubar la membrana en PBS hirviendo durante 7 min, regresar la membrana a PBS a temperatura ambiente. Esto se realiza con el fin de exponer mejor el epítipo del péptido A $\beta$  (Wiltfang y col., 1997; Klafki y col., 1996).
10. Bloquear la membrana durante 1 h con leche descremada en polvo al 5% en T-PBS (100 mL PBS 10X, 900 mL H<sub>2</sub>O bi-destilada, 1 mL Tween-20, pH 7.5).
11. Realizar 3 lavados de 15 min con T-PBS.
12. Incubar toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario 6E10 (dilución 1:375 en PBS con BSA 0.1%, azida 0.02% (p/v)).
13. Realizar 3 lavados de 15 min con T-PBS.
14. Incubar durante 1 h a TA con el anticuerpo secundario *IgG goat anti-mouse* conjugado con HRP (BioRad) (dilución 1:2500 en PBS con 2% leche descremada en polvo).
15. Realizar 5 lavados, de 15 min con T-PBS para asegurar la ausencia de azida (que inhibe la actividad de la HRP).
16. Detectar mediante el sistema de quimioluminiscencia ECL (*Supersignal Pico Western system*, Ref.: 34078, Pierce), añadiendo en una proporción 1:1 la solución A y B e incubando durante 5 min en la oscuridad, eliminando el exceso de líquido.
17. Exponer y revelar la película en cuarto oscuro, procurando obtener distintos tiempos de exposición (15 seg, 30 seg, 1 min, 5 min, 15 min).
18. Digitalizar las películas y cuantificar densitométricamente las bandas que aparezcan, con el programa *Quantity One* (BioRad), de acuerdo al apartado M3.1.9.
19. En caso necesario, realizar una inmunodetección de  $\beta$ -actina para la normalización de proteína total de acuerdo al apartado M3.1.6.

### **M3.1.5. Stripping de las membranas PVDF**

*Stripping* es el tratamiento usado para la eliminación de los anticuerpos primarios y secundarios de una membrana de *western-blot*. Es comúnmente utilizado cuando se quiere investigar más de una proteína en un mismo *blot*, por ejemplo, una proteína de interés y un control de carga. Existe un tratamiento suave basado en la disminución de pH y otro fuerte que utiliza  $\beta$ -mercaptoetanol en los tampones. En el grupo de investigación se utilizó el primero de éstos métodos, que se describe a continuación (Kaufmann, 1998):

1. Realizar 3 lavados a la membrana PVDF de 15 min con T-PBS.
2. Incubar la membrana con el tampón de *stripping* (Glicina 25 mM, SDS 2%, pH 2.2) durante media hora en agitación suave, realizando cambios de tampón cada 10 min.
3. Realizar 5 lavados a la membrana PVDF de 15 min con T-PBS.

### **M3.1.6. Inmunodetección de $\beta$ -actina**

Con fines de asegurar que en todos los carriles se cargó la misma cantidad de proteína, así como un exitoso evento de electrotransferencia, se procedió a realizar un control de carga con una proteína constitutiva celular, en este caso se empleó la  $\beta$ -actina; que en el modelo murino 3xTg-AD (modelo *in vivo* donde se evaluó la

funcionalidad del scFv-h3D6 en la presente tesis) es ampliamente utilizada como control de carga (Oddo y col., 2003; Caccamo y Oddo, 2010; Sung y col., 2013; Chu y col., 2012). Para esto se realizó lo siguiente:

1. Realizar un *stripping* a las membranas PVDF utilizadas en el apartado anterior (para la eliminación de los anticuerpos), de acuerdo al apartado M3.1.5.
2. Repetir el protocolo del apartado M3.1.4.3 a partir del paso 10, con la diferencia de la utilización del anticuerpo primario Anti- $\beta$ -actina (dilución 1:375 en PBS con BSA 0.1%, azida 0.02% (p/v)).
3. Normalizar la señal del péptido A $\beta$  (obtenida en el apartado M3.1.4.3), en base a la cuantificación de la  $\beta$ -actina.

### **M3.1.7. Cuantificación de proteína por microensayo con BCA**

La cuantificación de proteína se realizó por el método colorimétrico de BCA en microplacas (Thermo scientific, Rockford, IL), siguiendo las indicaciones del kit *Pierce™ BCA Protein assay* (Ref.: 23227):

1. Preparar las disoluciones estándares de BSA (de acuerdo a la tabla 1 del Kit), con el tampón correspondiente (tampón en que se encuentra la proteína a cuantificar).
2. Preparar el reactivo de trabajo mezclando 50 partes del reactivo A con una parte del reactivo B.
3. Pipetear 200  $\mu$ L del reactivo de trabajo en una microplaca tipo ELISA.
4. Añadir a los pozos de la microplaca, 25  $\mu$ L de los estándares de BSA por duplicado.
5. Añadir a los pozos de la microplaca, 25  $\mu$ L de las muestras a analizar por duplicado.
6. Agitar suavemente, cubrir la microplaca con papel aluminio y dejar incubar a 37°C por 30 min.
7. Leer la absorbancia a 560 nm en un lector de microplacas (Victor 3 1420 Multilabel Counter).
8. Realizar una curva patrón de BSA y determinar la concentración de las muestras.

### **M3.1.8. Tinción de proteínas**

Las proteínas que se han separado en un gel de poliacrilamida pueden ser visualizadas por diferentes métodos, entre los que destaca, la tinción con Coomassie Blue que puede detectar normalmente bandas de proteína de 50 ng. En el caso de la tinción para electroisoelectroforesis (IEF) se utiliza una solución de Bromofenol/Crocein que permite prevenir el ruido de fondo de la tinción que ocasionan las moléculas anfólicas del gel, a la vez que fija las proteínas al gel.

#### **M3.1.8.1. Tinción con Coomassie**

El tampón de tinción se preparó disolviendo 2 pastillas de azul de Coomassie R350 (Pharmacia LKB) en 500 mL de metanol al 30% y ácido acético al 10%.

El gel de policrilamida donde se efectuó SDS-PAGE, fue teñido durante 1 h con Coomassie R350 en agitación suave y el proceso de desteñido consistió en lavados sucesivos con una solución de ácido acético al 10%, hasta la visualización de las bandas de proteína.

#### **M3.1.8.2. Tinción para geles de electroisoelectroforesis (IEF)**

La tinción de los geles de IEF se efectuó utilizando una solución de Bromofenol/Crocein (azul de Bromofenol al 0.04% y escarlata de Crocein al 0.05% en isopropanol al 27% y ácido acético al 10%), durante 45 min con agitación suave. El proceso de desteñido se realizó durante 2-3 h con lavados múltiples con la solución desteñidora (metanol 40% y ácido acético 10%).

#### **M3.1.9. Digitalización y/o cuantificación de geles, membranas PVDF y *films***

La digitalización de los geles, membranas y *films* se realizó mediante el escaneado en un *GS-700 Imaging Densitometer* equipado con el software *QuantityOne®* (Bio-Rad) que permitió la cuantificación densitométrica de las bandas en términos de: OD mm<sup>2</sup>. Dicho servicio fue efectuado en el laboratorio de Luminiscencia y Espectroscopia de Biomoléculas del Departamento de Bioquímica de la UAB.

#### **M3.1.10. Ensayos de proteólisis limitada con termolisina**

La caracterización de las especies intermediarias en equilibrio, presentes en las curvas de desnaturalización química y térmica de la proteína, se realizó por medio de la técnica de proteólisis limitada con termolisina en urea. La termolisina es una metaloendopeptidasa que tiene como cofactores el Zinc y el Calcio, hidroliza el enlace peptídico en el N-terminal de los residuos hidrofóbicos tales como: Leu, Ile, Val, Ala, Met y Phe; por lo que tiene una baja especificidad de escisión, produciendo una serie de fragmentos cortos que son adecuados para la secuenciación. Se utiliza frecuentemente para el estudio de cambios conformacionales y estructura de proteínas. Se siguió el siguiente protocolo de acuerdo a Wörn y Plünckthun, 1998:

1. Dializar durante una noche la proteína al tampón de digestión de la termolisina (Tris-HCl 20 mM, CaCl<sub>2</sub> 10 mM (pH 7.8)).
2. Preparar un stock de urea 9 M en el mismo tampón en el que se encuentra dializada la proteína.

3. Realizar la mezcla correspondiente para tener la proteína a 0 M, 3 M y 5 M de Urea a una concentración de 1 mg/mL.
4. Equilibrar ON la proteína en urea a 4°C.
5. Realizar las digestiones a 25, 37 y 60°C en una proporción de termolisina:proteína a digerir, de 1:200 (p/p).
6. Tomar una muestra inicial antes de iniciar la digestión como control.
7. Realizar tomas de muestra a los 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 y 32 h.
8. Detener la reacción añadiendo inmediatamente a las muestras tampón de carga SDS-PAGE (apartado M3.1.1.2).
9. Realizar una electroforesis SDS-PAGE en un gel al 18% con las muestras cargando en cada pocillo 20 µL.
10. Realizar la cuantificación densitométrica de las bandas digeridas con el programa *Quantity One* (BioRad) de acuerdo al apartado M3.1.9.
11. Identificar la banda principal resultante de la digestión mediante secuenciación N-terminal y espectrometría MALDITOF según apartado M3.2.6.

## **M3.2. Técnicas espectroscópicas**

### **M3.2.1. Fluorescencia intrínseca de proteínas (Triptófano, Trp)**

La fluorescencia de una proteína es una mezcla de la fluorescencia individual de los residuos aromáticos (Phe, Tyr y Trp), aunque la mayoría de las emisiones fluorescentes intrínsecas de una proteína son debidas a la excitación de los residuos de triptófano, que es el aminoácido que más contribuye y el más sensible a su entorno. En el estado nativo de las proteínas, el Trp generalmente se encuentra localizado en el núcleo hidrofóbico y cuando la proteína se encuentra parcial o completamente desnaturizada, estos quedan expuestos al solvente, por lo que la fluorescencia Trp puede ser usada para monitorear cambios en el plegamiento de proteínas.

#### **M3.2.1.1. Obtención de espectros de emisión**

Se conoce como un espectro de emisión a las diferentes longitudes de onda de luz fluorescente emitida por una muestra cuando ésta es excitada con una luz de una longitud de onda constante.

Los espectros de emisión se realizaron a una concentración de proteína de 20 µM (en el estudio de desnaturación térmica) y a 2 µM (en el estudio de desnaturación química) en PBS, utilizando para ello un espectrofluorímetro *Cary Eclipse Fluorescence spectrophotometer* (Varian Inc.) equipado con una lámpara de arco de Xenón y empleando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso óptico. En primer lugar, se

realizó un espectro de excitación en la región 220-320 nm (25°C, apertura de las ventanas a 5) para determinar la longitud de onda ( $\lambda$ ) óptima para incidir en los subsecuentes espectros de emisión.

Los espectros de emisión se midieron entre 310 y 400 nm (ventanas a 5), realizándose 10 barridos que fueron posteriormente promediados.

### **M3.2.1.2. Análisis de agregación térmica por Fluorescencia Trp**

Mediante el análisis del espectro de emisión obtenido, se localizó el máximo de emisión de la proteína a una concentración de 20  $\mu$ M en PBS, a 25°C, a 290 nm. Esta longitud de onda fue la seleccionada para seguir la agregación de la proteína, utilizando un rango de temperatura de 25-95°C (rampa térmica de 1°C/min), ventanas a 5. Para evaluar el estado del plegamiento a 25°C y a 95°C se obtuvieron los respectivos espectros de emisión de acuerdo al apartado M3.2.1.1. Finalmente, se volvió a tomar otro espectro al regresar a la temperatura inicial de 25°C.

### **M3.2.1.3. Análisis de desnaturalización química por Fluorescencia de Trp**

Para determinar la estabilidad de las proteínas se realizó una curva de desplegamiento químico usando como agente desnaturalizante la Urea, dicho desplegamiento se fue monitoreando usando la fluorescencia de Trp, obteniéndose espectros de emisión de la proteína expuesta en equilibrio a diferentes concentraciones progresivas de Urea, a 25°C. Para esto se siguió el protocolo que se detalla a continuación:

1. Dializar toda la noche la proteína stock (22  $\mu$ M) en PBS modificado (NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, pH 7.4).
2. Preparar las muestras en duplicado mezclando suavemente 100  $\mu$ L de proteína stock con alícuotas de 1 mL de urea (en agua) a concentraciones progresivas de tal forma que se tenga una serie de puntos cada 0.25 M que cubran el rango de 0 M a 9.5 M de urea. Dejar equilibrar la mezcla toda la noche a 4°C. Un par de horas antes de realizar las medidas en el fluorímetro, dejar atemperar las muestras a 25°C. La concentración final de la proteína en la mezcla es de 2  $\mu$ M.
3. Obtener 5 barridos por cada espectro de emisión en cada punto de urea, por duplicado, a 25°C, ventana de excitación a 5 y la de emisión a 10.
4. Para obtener el máximo de emisión de cada espectro realizar un promedio de los 5 barridos y realizar el ajuste con una función polinomial de 3 parámetros (Knappik y col., 1995):

$$F(x) = Ax^4+Bx^3+Cx^2+Dx+C$$

5. Calcular la concentración real de urea en cada punto por medio de la medición de los índices de refracción con un refractómetro manual (ATAGO HSR-500) y la sustitución en la siguiente fórmula:

$$[M_{urea}] = 117.66(\Delta n) + 29.753(\Delta n)^2 + 185.56(\Delta n)^3$$

Donde:  $[M_{urea}]$  es la concentración real de urea obtenida y  $\Delta n$  es la diferencia de los índices de refracción entre la solución con urea y el agua.

6. Graficar la concentración de urea contra el máximo de emisión de cada punto de urea.
7. Calcular los parámetros del equilibrio en el proceso de desnaturalización a partir del ajuste de los datos, utilizando un modelo de tres estados  $[N] \leftrightarrow [I] \leftrightarrow [U]$  con la siguiente fórmula [Ec.1]:

$$f = F_N + (F_I * k_1 / (1 + k_1 + k_1 * k_2)) + (F_U * k_1 * k_2 / (1 + k_1 + k_1 * k_2)) \quad [Ec.1]$$

Donde:  $F_N = a + (b * x)$ ;  $F_I = c + (d * x)$ ;  $F_U = e + (h * x)$ ;  $k_1 = \exp(-\Delta G_1 / (R * T))$ ;  $k_2 = \exp(-\Delta G_2 / (R * T))$ ;  $\Delta G_1 = G_1 - m_1 * x$ ;  $\Delta G_2 = G_2 - m_2 * x$ ; y en el que la dependencia de la fluorescencia intrínseca en los estados nativo ( $F_N$ ), intermediario ( $F_I$ ) y desplegado ( $F_U$ ) bajo el incremento de la concentración del agente desnaturalizante ( $x$ ) es tomado en cuenta por los términos  $b * x$ ,  $d * x$  y  $h * x$  respectivamente (aproximación lineal).

Este tipo de análisis con un modelo de tres estados para la desnaturalización química, asume que aparte de las especies nativas y desplegadas se está acumulando significativamente una especie intermediaria en la reacción.

Con el fin de comparar los parámetros obtenidos, se realizaron dos ajustes por separado, por un lado un ajuste que va de 0-5.5 M mediante un modelo de dos estados  $[N] \leftrightarrow [I]$  que utiliza la [Ec.2] y por otro lado, un ajuste que va de 5-9.2 M de urea mediante un modelo de dos estados  $[I] \leftrightarrow [U]$  que utiliza la ecuación [Ec.3] (Pace, 1986):

$$f = F_N + F_I * k_1 / (1 + k_1) \quad [Ec.2]$$

$$f = F_I + F_U * k_2 / (1 + k_2) \quad [Ec.3]$$

Donde:  $F_N = a + (b * x)$ ;  $F_I = c + (d * x)$ ;  $F_U = e + (h * x)$ ;  $k_1 = \exp(-\Delta G_1 / (R * T))$ ;  $k_2 = \exp(-\Delta G_2 / (R * T))$ ;  $\Delta G_1 = G_1 - m_1 * x$ ;  $\Delta G_2 = G_2 - m_2 * x$ ; y en el que la dependencia de la fluorescencia intrínseca en los estados nativo ( $F_N$ ), intermediario ( $F_I$ ) y desplegado ( $F_U$ ) bajo el incremento de la concentración del agente desnaturalizante ( $x$ ) es tomado en cuenta por los términos  $b * x$ ,  $d * x$  y  $h * x$ , respectivamente (aproximación lineal).

### M3.2.2. Dicroísmo Circular

Es una técnica espectroscópica fundamentada en la luz polarizada circularmente, que incide sobre una muestra: las proteínas absorben esta luz y la desvían con cierto ángulo según su estructura.

#### M3.2.2.1. Obtención de espectros de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (350 a 250 nm) y lejano (250 a 180 nm) de la radiación

electromagnética. En la región del ultravioleta cercano, los cromóforos más importantes son los grupos aromáticos de las cadenas laterales de Trp, Tyr, y Phe, así como los puentes disulfuro; por tanto, los espectros en esta región son un reflejo de la conformación global de la proteína. Los espectros de dicroísmo en la región del ultravioleta lejano, se deben principalmente al enlace peptídico. Los espectros de CD del ultravioleta lejano son útiles para tener una visión global del plegamiento secundario de la proteína, y son más informativos que los obtenidos en la región cercana.

Los experimentos de CD se realizaron en el ultravioleta lejano (260-190 nm) mediante un espectropolarímetro Jasco J-715 y usando una cubeta de cuarzo de paso óptico de 0.2 cm. La adquisición de los espectros se realizó con una resolución de 0.1 nm, una amplitud de banda de 1 nm, una respuesta de 2 seg a una velocidad de 50 nm min<sup>-1</sup>, acumulando 20 barridos, siguiendo las siguientes indicaciones:

1. Adquirir espectros de CD del blanco (tampón en el que se encuentra la proteína, PBS).
2. Adquirir espectros de la proteína a una concentración de 20 μM.
3. Restar el espectro del blanco del espectro de la proteína.
4. Normalizar el espectro utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{MRE} = \theta / (10 * L * M * N)$$

Donde: MRE (*Molar Residue Ellipticity*) está expresada en deg cm<sup>-2</sup> dmol<sup>-1</sup>, θ: elipticidad en mdeg, 10 es un factor de conversión intrínseco a la medida, L es el paso óptico de la cubeta en cm (0.2 cm), M es la concentración de la proteína expresada en Molar, y N es el número de enlaces peptídicos de la proteína (249 a.a - 1 = 248 enlaces).

### M3.2.2.2. Obtención de los perfiles térmicos por CD

Los perfiles térmicos de CD permiten observar la evolución del espectro completo o de un punto del espectro de una proteína frente a la temperatura, que puede ser relacionado con cambios producidos en la estructura secundaria, por lo que suelen ser usados en las desnaturalizaciones térmicas. El protocolo general para la obtención de dichos perfiles se describe a continuación:

1. Colocar la proteína (a una concentración de 20 μM en PBS) en una cubeta de paso óptico de 0.2 cm.
2. Termotalizar durante 5 min la muestra a 25°C.
3. Realizar un espectro inicial a 25°C, entre 260 y 190 nm.
4. Seguir la elipticidad en el mínimo global del espectro inicial de la proteína, entre 25 y 90°C con una rampa térmica de 60°C/h, con una resolución de 0.1°C y una respuesta de 2 seg.
5. Una vez alcanzada la temperatura de 90°C, se mantiene esta temperatura por 5 min y se adquiere un espectro a 90°C.

6. Regresar la temperatura a 25°C, equilibrar por 5 min y adquirir un espectro final a 25°C para observar si el proceso es reversible.
7. Normalizar el perfil térmico usando la misma fórmula que la utilizada para la normalización de los espectros de CD.

### M3.2.3. Espectroscopia de absorción de infrarrojo con transformada de Fourier

La espectroscopia de infrarrojo es una técnica ampliamente utilizada en la obtención de información sobre la estructura secundaria de una proteína. Esta técnica se basa en el hecho de que la absorción de la luz infrarroja por parte de la muestra depende de la vibración de los enlaces que la forman. En el caso de las proteínas, la zona del espectro de infrarrojo más utilizada es la comprendida entre las longitudes de onda 1700 y 1600  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde a la banda amida I que refleja la forma vibracional del enlace C=O. La espectroscopia de infrarrojo requiere de una elevada concentración de proteína para que la relación señal/ruido sea suficientemente elevada y por tanto fiable. Así mismo, es bastante recomendable el uso de agua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ) en las muestras ya que la banda correspondiente a la vibración del enlace O-H del agua enmascara la zona de absorción del enlace C=O, evitando la visualización de la conformación protéica. En general el protocolo realizado para la obtención de espectros y su respectivo análisis se describe a continuación:

1. Dializar la proteína a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  (2.6 mg/mL), durante toda la noche a 4°C contra PBS deuterado usando las unidades de MINI diálisis de 15000 MWCO (*molecular mass cut-off*) (G-Biosciences).
2. Purgar el equipo con  $\text{N}_2$  durante la noche anterior y durante la adquisición de los espectros para eliminar el vapor de agua presente en la atmosfera.
3. Usando un espectrómetro Variant Resolution Pro (acoplado con una montura Peltier) crear/abrir un método para registrar y promediar 1000 espectros a una velocidad de barrido de 95  $\text{cm}^{-1}/\text{min}$ .
4. Adquirir el espectro de fondo (*background*).
5. Colocar la muestra/blanco en una celda excavada (Reflex Analytical) con un paso óptico de 50  $\mu\text{m}$ , atemperar a 25°C durante 15 min (permitiendo la total purga del sistema) y adquirir un espectro. Comprobar que la banda de la amida II (1545  $\text{cm}^{-1}$ ) no aparece, y por lo tanto, el intercambio H→D ha sido completo.
6. Adquirir espectros a 37, 50 y 60°C, atemperando previamente 5 min, y regresar a 25°C para adquirir espectros a los 5, 10, 15 min.
7. Finalmente adquirir un espectro de vapor (retirar previamente el soporte de la celda). De la serie de espectros obtenidos, realizar el tratamiento y la descomposición de la banda original amida I', mediante el software GRAMS (Thermo Scientific). El tratamiento matemático de los datos consiste, a modo de resumen, primeramente en restar el blanco y el vapor de los espectros. A continuación deconvolucionar el espectro utilizando una función lorentziana con una anchura de banda entre 16-20  $\text{cm}^{-1}$  y un factor K en apodización besel entre 1.6-2.4, manteniendo los parámetros en toda la serie. Una vez obtenido el centro de los máximos del espectro deconvolucionado, volver al espectro original y definir la línea base. Suavizar el espectro, mediante una función polinomial de 2 parámetros, antes de realizar el ajuste mediante iteración. La posición de las bandas se

mantiene fija en una primera iteración y se libera en una segunda iteración. Identificar el centro de los componentes y calcular se contribución al área total de la amida I'.

### M3.2.4. Determinación de coeficientes de extinción molar

La concentración de una proteína pura se puede determinar a partir de los espectros de absorción en el ultravioleta, usando la siguiente formula (Lambert-Beer):

$$C = (A_{280\text{nm}}) / (\epsilon_{280\text{nm}} * L)$$

Donde: C es la concentración molar,  $A_{280}$  es la medida de absorbancia a 280 nm, L es el paso de luz de la cubeta empleada expresado en cm y  $\epsilon_{280}$  es el coeficiente de extinción molar a esa longitud de onda.

El coeficiente de extinción molar también puede ser expresado como  $\epsilon_{280}^{0.1\%}$ , es decir, como la absorbancia de una disolución de la proteína a 1 mg/mL. Una expresión simplificada de la ecuación de Lambert-Beer es la que hace referencia a la densidad óptica (DO), la cual corresponde con la absorbancia medida con un paso de luz de 1 cm.

$$C = DO_{280\text{nm}} / \epsilon_{280\text{nm}}$$

La ecuación de Lambert-Beer deja de ser lineal en valores cercanos a 2 UA, debido a la saturación del detector. Uno de los métodos para la determinación del coeficiente de extinción molar experimental de una proteína es el descrito por Gill y Von Hippel (1989). Este método se basa en la medición a 280 nm, u otras longitudes de onda ( $\lambda$ ), de la muestra en condiciones nativas y en condiciones desnaturizantes (con un agente caotrópico: Gdn-HCl 6 M) y en relacionar dichos valores con el coeficiente de extinción molar teórico mediante la siguiente ecuación:

$$\epsilon_{\text{experimental}, 280\text{nm}} = (\epsilon_{\text{teórico}, 280\text{nm}}) * (A_{\text{nativa}, 280\text{ nm}}) / (A_{\text{desnaturalizada}, 280\text{ nm}})$$

Donde: A es la medida de absorbancia a 280 nm ya sea en condiciones nativas (en PBS) o en condiciones desnaturizantes (Gdn-HCl 6 M). Para calcular el  $\epsilon_{\text{teórico}, 280}$  se utilizaron los siguientes valores: Trp ( $5690 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), Tyr ( $1280 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), Cys-Cys ( $120 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ).

### M3.2.5. Thermofluor

Thermofluor es una técnica, que mediante una lectura de fluorescencia en un barrido de temperatura, nos permite testar en términos de  $T_m$  (*temperature melting*: temperatura de fusión), la estabilidad de una proteína bajo diferentes condiciones, tales como la concentración de iones en solución, el pH o factores adicionales que pueden afectar la estabilidad proteica.

Se enviaron muestras del scFv-h3D6 nativo al servicio externo del laboratorio *Protein Facility* del Instituto del cáncer de Amsterdam (NKI) con la finalidad de encontrar las mejores condiciones en los tampones de purificación y almacenamiento que permitan que la proteína se encuentre más estable. Se realizó un escrutinio en un rango de valores de pH de 2-12 y de un rango de concentración de NaCl de 0-300 M. Utilizando un tampón universal ( $H_3BO_3$  0.04 M,  $H_3PO_4$  0.04 M y  $CH_3COOH$  0.04 M, titulado con NaOH 0.2M para alcanzar el pH deseado).

### M3.2.6. Secuenciación N-terminal y espectrometría de masas MALDI-TOF

Para confirmar la identidad de la proteína de interés se han realizado dos tipos de análisis en el Servicio de Bioinformática y Proteómica del IBB (UAB): secuenciación N-terminal y determinación de la masa molecular relativa por MALDI-TOF.

Para la secuenciación N-terminal, se realizó una SDS-PAGE de la proteína y se transfirió a una membrana PVDF, de donde se cortó la banda de interés manualmente después de visualizar con Coomassie. A continuación se secuenció, por el método de degradación de Edman, los primeros residuos del N-terminal en un cromatógrafo *HPLC Prouse 492 (Applied Biosystems)*.

Para la determinación de la masa molecular, se depositó 1  $\mu$ L de muestra en una placa, se mezcló con el mismo volumen de matriz (ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico), y se dejó secar. La muestra cristalizada se analizó en un espectrómetro MALDI-TOF *Voyager DE PRO (Applied Biosystems)*, utilizando el reflectrón en modo de iones positivos. Los análisis se realizaron en modo automático promediando los espectros obtenidos a partir de 450 disparos en el rango de 750 a 4500 m/z. Los espectros se calibraron externamente, utilizando una mezcla estándar de 5 péptidos (des-Arg1-bradiquinina (Mr 904.46), Glu1-fibrinopéptido B (Mr 1570.68), angiotensina-1, (Mr 1296.69), ACTH 1-17 (Mr 2093.09), ACTH 18-39 (Mr 2465.20), ACTH 7-38 (Mr 3657.93).

## M4. Análisis funcional del scFv-h3D6 en un ratón 3xTg-AD

### M4.1. Animales y tratamientos

Con el fin de evaluar la funcionalidad de la molécula scFv-h3D6 se realizaron ensayos *in vivo* en dos grupos de ratones de 5 meses de edad:

- 15 hembras 3xTg-AD (homocigotas triple transgénicas de los transgenes PS1<sub>M146V</sub>, APP<sub>Swe</sub> y TAU<sub>P301L</sub>, y modelo del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (AD); Oddo y col., 2003).
- 15 hembras NTg (B6129SF2/J, contexto genético sobre el que se contruyó el 3xTg-AD).

Estos animales pertenecen a una colonia española establecida en la unidad de Psicología medica de la Universidad Autónoma de Barcelona (Gimenez-Llort y col., 2007).

Se administró una única inyección intraperitoneal de 85 µg de scFv-h3D6 en dos grupos de n=8 (3xTg-AD, y NTg), con los correspondientes grupos control (n=7) tratados con PBS. Los grupos formados para este ensayo y la dosificación administrada se describen en la tabla M3:

**Tabla M3. Grupos de animales y tratamiento.** NTg: no transgénicas, B6129SF2/J, contexto genético sobre el que se contruyó el 3xTg-AD. 3xTg-AD: ratones homocigotas triple transgénicas de los transgenes PS1<sub>M146V</sub>, APP<sub>Swe</sub> y TAU<sub>P301L</sub>, y modelo del desarrollo de la enfermedad de Alzheimer (AD) (Oddo y col., 2003). PBS: tampón fisiológico pH 7.4, -LPS: libre de lipopolisacaridos.

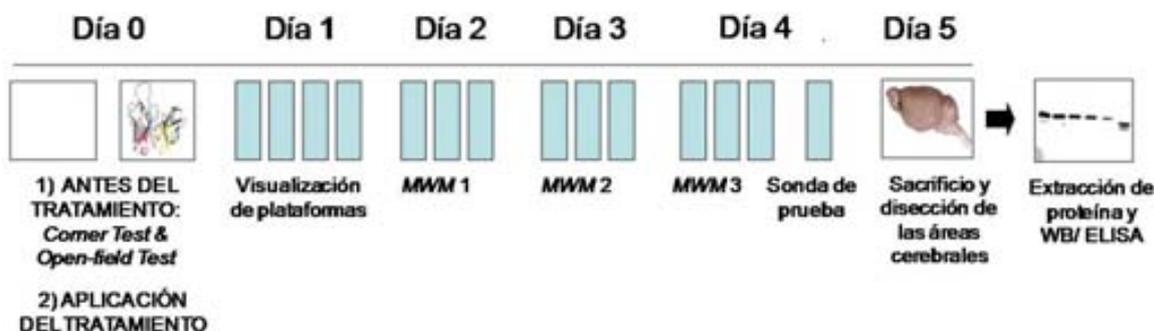
Grupo de animales	Tratamiento	Tamaño del grupo	Dosificación
NTg	ScFv-h3D6 en PBS	8	200 µL de scFv-h3D6 (a 0.42 µg/µL) en PBS estéril (-LPS)
	PBS	7	200 µL de PBS estéril
3xTg-AD	ScFv-h3D6 en PBS	8	200 µL de scFv-h3D6 (a 0.42 µg/µL) en PBS estéril (-LPS)
	PBS	7	200 µL de PBS estéril

### M4.2. Diseño experimental

La evaluación del efecto del tratamiento con scFv-h3D6 se realizó a dos niveles:

- A nivel conductual y cognitivo (Dra. Lydia Giménez-Llort, UAB).
- A nivel molecular: inmunodetección de especies oligoméricas de Aβ (WB) y determinación de las concentraciones de apoJ y apoE (ELISA) (éste trabajo).

A modo de resumen, en la figura M4, se visualiza el diseño experimental tanto de los análisis conductuales y cognitivos como de la extracción-inmunodetección de especies A $\beta$  y apolipoproteínas.



**Figura M4. Resumen del diseño experimental.** Día 0: caracterización de la conducta inicial de todos los grupos de animales (*corner test* y *open-field test*) y aplicación del tratamiento. Día 1: visualización de plataformas y aprendizaje de señales en el laberinto acuático de Morris (*MWM: Morris Water Maze, Morris y col., 1984*). Día2-Día4: *MWM* consecutivos con plataformas escondidas. Día 4: adicionada al ultimo test de *MWM*, se realizó una sonda de prueba mediante la eliminación de la plataforma. Día 5: sacrificio de todos los animales y disección de las áreas cerebrales (hipocampo: HC; córtex: CX; cerebelo: CR; bulbo olfatorio: OB). Días posteriores: extracción de proteína e inmunodetección tanto de especies A $\beta$  (por *western-blot*), como de apoE y apoJ (por ELISA).

#### M4.3. Análisis a nivel conductual de los efectos del scFv-h3D6

Estas pruebas fueron realizadas en su totalidad por la Dra. Lydia Gimenez-Llort, de la unidad de Psicología medica y el Instituto de Neurociències de la UAB (Gimenez-Llort y col., 2013).

Se realizó una serie de pruebas iniciales para evaluar los síntomas psicologicos-conductuales característicos de la demencia (*BPSD-like behaviors*) de los animales 3xTg-AD (n=15) y NTg (n=15) mediante las pruebas *Corner Test* y *Open-field test*. A continuación se dividieron los grupos en dos para realizar tratamiento con 85  $\mu$ g de scFv-h3D6 o con PBS y el efecto del tratamiento se evaluó mediante el laberinto acuático de Morris (*MWM: Morris water maze*), durante los siguientes 4 días a su administración. La conducta fue evaluada mediante la observación directa y el análisis de imágenes grabadas. Los experimentos fueron realizados bajo condiciones de luz blanca tenue (16-20 lux) en un horario de 10:00 a 13:00, de acuerdo a la legislación española de "Protección de animales usados para fines experimentales u otros propositos y científicos" y el "Consejo Directivo de la Comunidad Europea" (86/609/EEC Council).

#### M4.4. Análisis a nivel molecular de los efectos del scFv-h3D6

Una vez finalizadas las pruebas a nivel conductual y cognitivo, 5 días después de la aplicación del tratamiento, se realizó el sacrificio de los animales. Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso corporal disuelto en PBS), se perfundieron a través del corazón con paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7,4) y se guillotinaron. A continuación se realizó una disección-congelación de los tejidos procedentes de las diferentes áreas del cerebro, tales como hipocampo (HC), córtex (CX), cerebelo (CR) y bulbo olfatorio (OB), para posteriormente realizar un fraccionamiento secuencial de proteínas y estudios tipo *western-blot* para la detección de especies A $\beta$ , así como un estudio tipo ELISA para la detección de apoE y apoJ.

##### M4.4.1. Extracción y fraccionamiento de proteínas

La extracción y fraccionamiento de proteínas se realizó mediante una serie continua de sonicaciones y ultracentrifugaciones, sobre el tejido proveniente de las diferentes áreas del cerebro diseccionadas (HC, CX, CR, OB). Esto se aplicó sobre los cuatro grupos de ratones utilizados en este experimento (tabla M3). El protocolo descrito a continuación es una modificación del utilizado por Lesne y col., (2006):

1. Pesar los tejidos congelados y homogenizar mecánicamente (auxiliado con un homogenizador manual, Sigma-aldrich, Ref.: Z 359971) en TBS (Tris 20 mM, NaCl 137 mM, pH 7.6) frío y suplementado con inhibidores de proteasas (Roche tablet 1836153) en una proporción de 8  $\mu$ L TBS/mg tejido.
2. Sonicar suavemente con un 1 ciclo de 35 seg, a un ciclo de trabajo del 35% y a potencia 4 en un sonicador (Dynatech Sonic Dismembrator ARTEK 300), utilizando la punta pequeña.
3. Centrifugar mediante una micro-ultracentrifuga (Sorvall MTX 150 Series Micro-Ultracentrifuge, Thermo Scientific) a 100,000 g durante 1 h a 4°C. Colectar, congelar y guardar el sobrenadante marcándolo como *Fracción TBS-proteína extracelular*. Guardar por separado 10  $\mu$ L para cuantificación de proteínas por BCA.
4. Rehomogenizar el *pellet* insoluble resultante (en el mismo volumen que en el paso 1), utilizando una solución fría de Tritón X-100 al 1% en TBS suplementada con inhibidores de proteasa. Repetir los pasos 2 y 3, marcando el sobrenadante como *Fracción Tritón-proteína intracelular*. Guardar por separado 10  $\mu$ L para cuantificación de proteínas.
5. Rehomogenizar el *pellet* insoluble resultante (en el mismo volumen que el paso 1), utilizando una solución fría de SDS 2% en agua suplementada con inhibidores de proteasa. Repetir pasó 2 y 3, marcando el sobrenadante como *Fracción SDS-proteínas asociadas a membranas*. Guardar por separado 10  $\mu$ L para cuantificación de proteínas.
6. Finalmente, sonicar el material insoluble en solución de ácido fórmico 70% en agua, centrifugar y al sobrenadante obtenido, secarlo durante toda la noche mediante un concentrador al vacío (Savant SpeedVac® concentrator). Resuspender el extracto proteico seco obtenido en 40  $\mu$ L de DMSO.
7. Alicuotar (100  $\mu$ L) y guardar a -80°C todas las fracciones obtenidas.
8. Determinar la concentración de proteínas de cada fracción mediante un ensayo de BCA (Thermo Scientific, Rockford, IL), según el apartado M3.1.7.

#### **M4.4.2. Inmunodetección tipo *western-blot* (WB) de especies A $\beta$**

La proteína extraída y fraccionada fue utilizada para la inmunodetección tipo *western-blot*. Para el WB de especies oligoméricas de A $\beta$ , se siguió la metodología descrita en el apartado M3.1.4.

Utilizando para fines de estandarización de la técnica geles de 12% de poliacrilamida sin y con urea, según apartado M3.1.1 y M3.1.4.1, respectivamente.

Se realizaron curvas patrón del péptido A $\beta$  en rangos que comprendieron entre 15-225 ng y entre 4.5-30 ng. De igual forma se utilizaron como control positivo, muestras de CX de ratones 3xTg-AD de 7 meses de edad sin tratamiento, cargando 45  $\mu$ g de proteína total por cada muestra.

Una vez estandarizada la técnica se utilizaron los extractos de los grupos que se muestran en la tabla M3, y se realizaron tres eventos de inmunodetección-WB cargando 120  $\mu$ g de proteína total por cada muestra, además, se utilizaron como patrones de referencia interna al péptido A $\beta_{1-42}$  monomérico, colocados en los lados del gel. Se realizó una ponderación de la señal de cada gel en base a las referencias internas y se promediaron las señales de los 3 eventos. Se realizó una normalización de la señal mediante el uso del control de carga (apartado M3.1.6). La semicuantificación se realizó auxiliándose en las dos referencias internas presentes en cada gel, cuidando previamente que la señal de las muestras se encontrara dentro del rango lineal de las referencias internas.

#### **M4.4.3. Inmunodetección tipo ELISA de las apolipoproteínas apoE y apoJ**

A las fracciones de proteínas resultantes del apartado M4.4.1, además de realizarles la inmunodetección A $\beta$ , también se les realizó una inmunodetección y cuantificación de las apolipoproteínas apoE y apoJ; mediante un ensayo tipo ELISA, siguiendo las instrucciones de los Kits: *ELISA Kit for Apolipoprotein E* (Ref.: E90704Ra, USCN Life Scienc Inc.) y *ELISA Kit for Clusterin* (Ref.: E91180Ra, USCN Life Scienc Inc.).

## M5. Programas informáticos

El modelo tridimensional de la proteína scFv-h3D6 fue realizado por Marin-Argany, 2009. Durante su desarrollo, el uso de las herramientas informáticas *online* como la base de datos **PDB** (*Protein Data Base*) permitió realizar homologías de secuencia y, la herramienta **BLAST** (*Basic Local Alignment Search Tool*) permitió realizar alineamientos de secuencias. De igual forma el uso del programa bioinformático **MODELLER 9v2** (Sali y Blundell, 1993), permitió la construcción del modelo 3D.

La visualización del modelo molecular en 3D se obtuvo con el programa **PyMol** ([www.pymol.org](http://www.pymol.org)), permitiendo además trabajar sobre la imagen marcando regiones y residuos específicos, así como calcular distancias entre residuos. Estas características permitieron utilizarlo en el grupo de investigación para la definición de posibles mutaciones en la proteína.

La graficación de las construcciones plasmídicas se realizó con el programa **Plasm** ([www.biofreesoftware.com](http://www.biofreesoftware.com)).

El sitio online ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam>), permitió la determinación del punto isoeléctrico teórico y el peso molecular de las proteínas precursoras y maduras de las diferentes construcciones realizadas. De igual forma permitió obtener el coeficiente de extinción molar teórico ( $\epsilon$ ) de la proteasa TEV para efectos de cuantificación.

La graficación de los espectros de CD y Fluorescencia Trp, así como las desnaturalizaciones térmicas y químicas, fueron realizadas en el programa **KaleidaGraph** (Synergy Software).

El ajuste matemático para la obtención de los parámetros termodinámicos del desplegamiento inducido por urea tanto del WT como de las variantes proteicas, fue realizado en el programa **SigmaPlot** (Systat Software Inc).

La digitalización de imágenes y la cuantificación densitométrica, fueron realizadas mediante el programa **Quantity One** (Biorad).

La adquisición y deconvolución de los espectros FTIR, fue realizado mediante una serie de *softwares* de licencia Varian y GRAMS (Thermo Scientific).

## **RESULTADOS**

---

---



## R1. Análisis de los sistemas de expresión

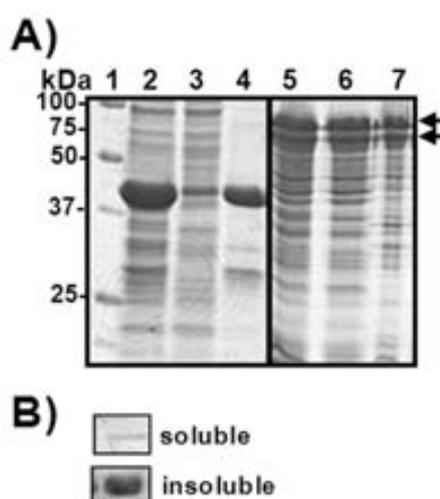
En el grupo de investigación *Protein Folding and Stability* del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la UAB, se diseñó y se mandó a sintetizar (GenScript) un fragmento de DNA (750 pb) flanqueado por las dianas de restricción *NcoI-NotI*. Dicho DNA codifica un derivado del Bapineuzumab (mAb-h3D6.v2) de tipo scFv (*single-chain variable fragment*), consistente en las secuencia de los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> unidos por un conector flexible (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>. El fragmento fue subclonado mediante técnicas de DNA recombinante en diferentes plásmidos derivados de pET (serie pETM y pCri(a)) que contienen generalmente una cola de histidinas, para fines de purificación, así como diversos módulos proteicos, entre los que tenemos: un péptido señal (pelB), o una disulfuro-isomerasa (DsbC), o una disulfuro-oxidasa (DsbA), o una óxidoreductasa intracelular con actividad disulfuroisomerasa y chaperona (Trx) o alguna proteína con capacidad solubilizadora (MBP, o NusA) así como una secuencia diana para la proteasa TEV (Blasco-Moreno, 2008; Rivera-Hernández, 2009).

En estudios preliminares del grupo de investigación, se evaluaron analíticamente, mediante la visualización SDS-PAGE, la expresión proteica de las construcciones arriba mencionadas. La combinación de estas construcciones plasmídicas creadas y el uso tanto de cepas mutantes deficientes en las reductasas (por ejemplo: Origami 2 (DE3)), como de cepas de expresión en el espacio periplasmático (por ejemplo: BL21 (DE3) pLysS) permitió obtener sistemas de expresión intracelulares y extracelulares. Los resultados de dichos preliminares indicaron que las condiciones de expresión heteróloga óptima del scFv-h3D6 eran mediante la inducción durante 12 h con IPTG a una concentración final de 0.5 mM y a una temperatura de 20°C en medio LB. Así mismo, se evidenció que los sistemas intracelulares de los vectores de serie pETM (en particular la construcción con Trx) expresaban mayores cantidades de proteína (aunque en todos los casos la proteína se encontraba mayoritariamente insoluble) que los sistemas extracelulares, de hecho, la secreción de la proteína provocó lisis celular en cepas de membrana debilitada, tal como BL21 (DE3) pLysS (Blasco-Moreno, 2008; Rivera-Hernández, 2009).

Por otro lado, un preliminar usando los vectores de la serie pCri(a) indicó que la fusión con la proteína NusA mejoraba significativamente la expresión soluble del scFv-h3D6 (Rivera-Hernández, 2009).

En base a estos preliminares, se decidió trabajar con las construcciones plasmídicas pETtrx1a-scFv y pCri5(a)-scFv y la cepa de Origami 2 (DE3). La expresión intracelular resultante permitió la obtención de scFv-h3D6 fusionado a Trx y NusA, respectivamente. Así mismo, se decidió trabajar con las siguientes condiciones de expresión: 12 h de inducción con 0.5 mM de IPTG a 20°C en medio LB.

Mediante SDS-PAGE se visualizó una sobre-expresión de la proteína de fusión Trx-scFv (~40.6 kDa), evidenciando su carácter insoluble, al encontrarse mayoritariamente en los cuerpos de inclusión (carril 2-4 de la figura R1.A). Así mismo, de manera tenue fue posible localizar e inmunodetectar (aprovechando la fusión a una cola de histidinas) parte de la proteína de fusión expresada en forma soluble (figura R1.B). Por otro lado se observó que la expresión de NusA-scFv (~83.4 kDa), permite que una gran parte de la proteína de fusión se encuentre de manera soluble y, aunque también se encontró formando parte de los cuerpos de inclusión, es notable la solubilización de la proteína por la fusión con NusA. Así mismo, es llamativo que en el perfil SDS-PAGE de esta expresión siempre se visualizó un efecto electroforético anómalo (flechas negras en la figura R1.A, presencia de dos bandas para una misma proteína) a pesar de las condiciones reductoras y desnaturizantes de la electroforesis.



**Figura R1. Análisis de expresión proteica. A) Análisis SDS-PAGE de la expresión en Origami 2 (DE3) de los vectores pETtrx1a-scFv y pCri5(a)-scFv.** Sistema de expresión pETtrx1a-scFv / Origami 2 (DE3): carriles 2-4; sistema de expresión pCri5(a)-scFv / Origami 2 (DE3): carriles 5-7). Marcador de peso molecular: carril 1; proteína total: carriles 2 y 5; fracción soluble: carriles 3 y 6); fracción insoluble solubilizada: carriles 4 y 7. Las flechas negras indican un efecto electroforético de la proteína fusionada a NusA. **B) Inmunodetección en las fracciones solubles e insolubles del sistema de expresión pETtrx1a-scFv / Origami 2 (DE3).** (Anti His-tag 1:2500). Todas las expresiones son en medio LB inducido 12 h con 0.5 mM de IPTG a 20°C.

## R2. Estandarización de la purificación del scFv-h3D6

Después de la expresión, el scFv-h3D6 se encuentra fusionado ya sea a Trx o a NusA (proteína precursora), además de contar con una cola de histidinas y una diana de corte TEV; la presencia de estos módulos proteicos se debe a que facilitan el plegamiento y la purificación del scFv-h3D6. Debido a que para posteriores estudios se requiere que la proteína se encuentre pura y sin estos módulos proteicos (proteína

madura), en el siguiente apartado se describe la optimización de las condiciones de purificación, incluida la eliminación de la fusión mediante una proteólisis limitada con la proteasa TEV.

## **R2.1. Purificación de la proteína precursora**

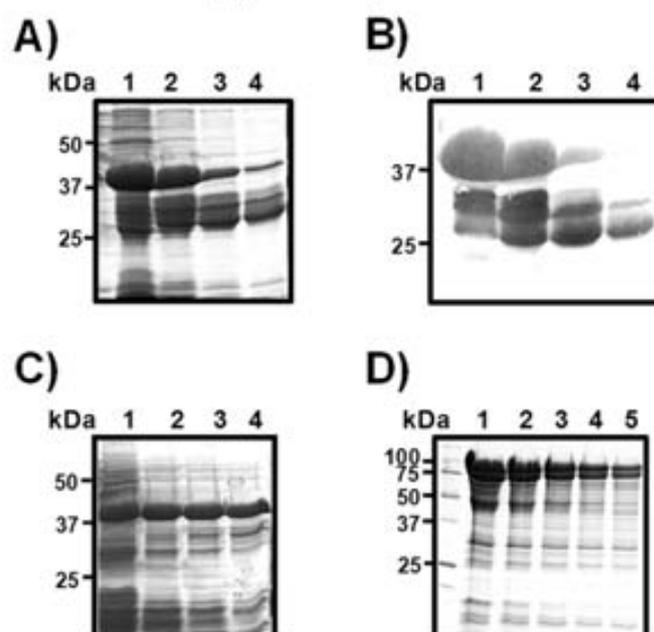
La proteína precursora se obtuvo ya sea de la fracción soluble mediante la recolección del sobrenadante de células lisadas-centrifugadas, o de la fracción insoluble mediante la solubilización y replegamiento de la proteína presente en los cuerpos de inclusión con un agente desnaturalizante y condiciones específicas de oxido-reducción. La purificación del Trx-scFv se realizó tanto para la proteína proveniente de la fracción soluble como para la proveniente de la fracción insoluble. Para el caso de NusA-scFv solo se purificó la proveniente de la fracción soluble.

### **R2.1.1. Fracción soluble**

Tanto las proteínas de fusión Trx-scFv como NusA-scFv cuentan con la presencia de colas de histidinas, por lo que, se realizaron múltiples ensayos de cromatografía de afinidad en una columna HisTrap<sup>TM</sup> (IMAC) para la purificación de proteína proveniente de la fracción soluble. Partiendo de que según el análisis bioinformático realizado en el servidor *online* EXPASY, el punto isoeléctrico (pI) teórico de Trx-scFv es de 6.3 y el de NusA-scFv es de 4.8, se usó el tampón Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> que permitió trabajar a un pH 7.4 en la cromatografía para ambas proteínas de fusión. Así mismo, se probaron varias condiciones del tampón de unión a la columna tales como la presencia de Imidazol (0 y 20 mM) y fuerza iónica (0.15, 0.25, 0.5 y 1 M de NaCl); así mismo, se probaron distintas concentraciones de Imidazol (10, 50, 100, 200 y 500 mM) en gradientes escalonados para eluir la proteína.

Para el caso de la proteína fusionada con Trx, se encontró que la proteína se une mejor a la columna en ausencia de Imidazol con 500 mM de NaCl en el tampón de unión, y que la proteína (~40.6 kDa) empieza a eluir a 100 mM, logrando una elución total a una concentración de 200 mM de Imidazol. El perfil electroforético SDS-PAGE en condiciones reductoras nos indicó que las fracciones obtenidas estaban parcialmente puras, ya que contenían contaminantes de menor peso molecular (figura R2.A) que presentaron incluso una mayor afinidad por la columna. Curiosamente en diversos eventos de purificación IMAC se obtuvieron estos mismos patrones en las fracciones eluidas, que incluso aumentaron al prolongarse el tiempo de exposición de la muestra en el interior de la columna (disminuyendo el flujo de la cromatografía); por

lo que se sugiere la actividad de una metaloproteasa potencializada por el ambiente divalente del Níquel inmovilizado en la columna y que dichos fragmentos de menor peso molecular son de naturaleza degradativa. Esta conjetura se sustenta en base a un análisis de inmunodetección tipo *western-blot* (figura R2.B), y al hecho de la presencia de un coctel de inhibidores de proteasas pero no de un agente quelante como el EDTA que inhibiría la actividad de la presunta metaloproteasa. De tal forma que para evitar esta actividad catalítica no deseada, se utilizó 0.5 mM de EDTA en todos los tampones durante la cromatografía, apreciándose que la digestión inespecífica no deseada fue inhibida (figura R2.C), aunque también fue apreciable el efecto quelante sobre el metal inmovilizado en la columna, ya que la proteína empezó a eluir con solo 50 mM de Imidazol y con una mayor cantidad de proteínas contaminantes, alcanzándose una completa elución a una concentración de 200 mM, este hecho nos indicó las condiciones astringentes en que se realiza la cromatografía y que el uso de condiciones más severas podría comprometer el rendimiento final. Para la proteína fusionada con NusA, se encontró que las condiciones de la cromatografía son similares a la de Trx, con la diferencia de que no fue necesario el uso de EDTA durante el proceso de purificación, ya que al analizar el perfil electroforético SDS-PAGE visualizamos que aunque las fracciones obtenidas estaban parcialmente puras no estaban degradadas por acción inespecífica de metaloproteasas en la columna (figura R2.D).



**Figura R2. Análisis de las fracciones IMAC de la proteína soluble scFv-h3D6 fusionada a Trx o a NusA. A) SDS-PAGE de cromatografía IMAC en ausencia de EDTA de proteína fusionada a Trx. Tinción de Coomassie de las fracciones eluidas: carriles 1-4. B) Inmunodetección en las fracciones eluidas de la cromatografía en ausencia de EDTA. Uso del anticuerpo Anti His-tag a un título de 1:2500. C) SDS-PAGE de cromatografía en presencia de 0.5 mM de EDTA. Tinción de Coomassie de las fracciones eluidas: carriles 1-4. D) SDS-PAGE de cromatografía IMAC en ausencia de EDTA de proteína fusionada a NusA. Tinción de Coomassie de las fracciones eluidas: carriles 1-5.**

El hecho de que la fusión Trx-scFv se vea afectada por proteólisis durante la IMAC y, la NusA-scFv no, podría indicar que, en el primer caso exista un inapropiado empaquetamiento entre el dominio Trx y el scFv (lo que permitiría que alguna metaloproteasa endógena de *E.coli* se uniera), y en el segundo caso podría deberse a un empaquetamiento apropiado o al tamaño del *carrier* NusA (54.8 kDa), que podría realizar un efecto de protección por impedimento estérico a la metaloproteasa.

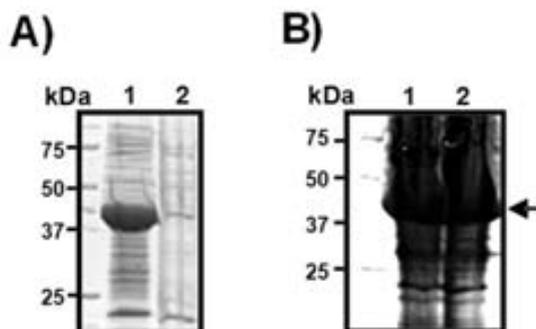
Aunque las proteínas obtenidas (ya sea fusionada a Trx o a NusA) de la cromatografía IMAC no estaban totalmente puras, el grado de pureza fue suficiente para realizar la liberación de los módulos proteicos mediante una proteólisis limitada con la proteasa TEV. La digestión con TEV es abordada en el apartado R2.2.

### **R2.1.2. Fracción Insoluble**

Las proteínas presentes en los cuerpos de inclusión se caracterizan por ser formas mal plegadas y, dada la presencia de dos puentes disulfuro en la estructura de los scFv, es necesario realizar una desnaturalización reductora previa al replegamiento de dicha molécula. Para esto, se solubilizaron los cuerpos de inclusión con Urea 8 M o con Cloruro de Guanidinio (Gdn-HCl) 6 M, en presencia de glutatión reducido (GSH) 10 mM. Se realizó el replegamiento por dilución 1:10 en presencia de L-Arginina 100 mM y glutatión oxidado (GSSG) 0.15 mM a un pH de 8.5 durante 36 h, según Proba y col., (1997). Estas condiciones permiten: i) tanto favorecer la solubilización como reducir la agregación proteica, dada la interacción entre la estructura guanidinio de la arginina con los residuos triptófano de la proteína y la tensión superficial proporcionada por la arginina (Tsumoto y col., 2004) y; ii) favorecer la formación de puentes disulfuro, ya que tanto la adición de una mezcla de agentes tiol reducidos y oxidados (Glutation) da lugar a la oxidación de los puentes disulfuro, así como el uso de pHs alcalinos en los tampones de replegamiento (mayores a valores de 8) aceleran el intercambio del tiol-disulfuro (Li y col., 2004; Singh y Panda, 2005). Como se observa en la figura R3.A, la proteína solubilizada con Urea 8 M replegó correctamente, no así la solubilizada con Gdn-HCl. Es así como la solubilización de la proteína se realizó únicamente con urea 8 M, con un rendimiento estimado de replegamiento de unos 40 mg a partir de 1 L de cultivo.

Dada la presencia de la cola de histidinas en la proteína, se planteó realizar a la proteína solubilizada con urea, una cromatografía de afinidad. Por lo que se realizaron ensayos de purificación IMAC con la fracción insoluble solubilizada con urea 8 M en tampón Tris-HCl 100 mM con NaCl 500 mM pH 8.5, como describe Robert R. y col (2006). Encontramos que las proteínas solubilizadas no se unieron a la columna

HisTrap™ (figura R3.B), por lo que se intentó aumentar la fuerza iónica llegando a 1 M de NaCl en el tapón de unión, sin conseguir afinidad por la columna. Ante la imposibilidad de realizar una cromatografía de afinidad durante la solubilización de la proteína y aprovechando que el scFv-h3D6 es el principal componente de las proteínas replegadas (figura R3.A, carril 1), se optó por realizar directamente la digestión con TEV.

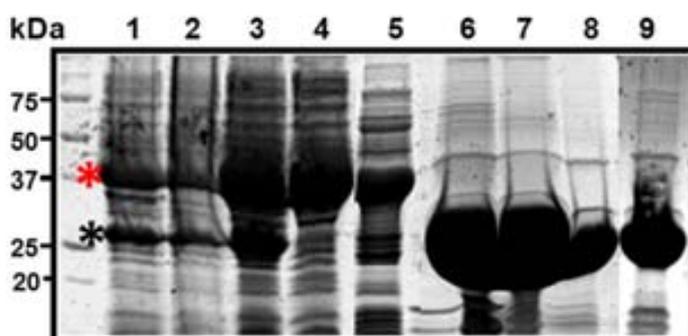


**Figura R3. Tratamientos a la proteína insoluble de los cuerpos de inclusión. A) Replegamiento de proteína insoluble.** Urea 8 M: carril 1; Gdn-HCl 6 M: carril 2. **B) Cromatografía de afinidad (IMAC) de la fracción insoluble solubilizada con Urea 8 M.** Muestra que entra a la columna HisTrap: carril 1; proteína no enganchada a la columna (*flow* IMAC): carril 2.

## R2.2. Optimización de la digestión con la proteasa TEV

La proteasa TEV recombinante fue expresada como una fusión con MBP (*Maltose-Binding Protein*) en 2 L de un cultivo de *E. coli* cepa C41. La MBP es eliminada *in vivo* por autoprocésamiento usando una diana interna de TEV (ENLYFQ<sup>L</sup>-G) en la proteína de fusión, de tal forma que en 4 h de expresión de la proteasa TEV, ésta se encontraba directamente separada de la MBP (figura R4, carril 1-3). Mediante la cromatografía de afinidad (IMAC) se logró un buen nivel de pureza, aunque una buena parte de la proteína no se unió a la columna (carriles 3-4), obteniéndose un rendimiento de hasta 21 mg de proteasa TEV por litro de cultivo (figura R4, carril 9). Esta proteasa recombinante purificada fue utilizada tanto para los ensayos de digestión de la proteína precursora como para la obtención preparativa de de todas las variantes proteicas.

Se sabe que la mayor actividad catalítica de TEV ocurre cuando ésta se da en ausencia de NaCl, así mismo que la relación de la proteasa TEV con respecto a la proteína a cortar (proteína precursora) es de 1:100 (Nallamsetty y col., 2004). Además se sabe que la proteasa TEV tiene actividad en un amplio rango de valores de pH, entre 4 y 9, considerándose como condición estándar el pH de 8 (Waugh. *TEV protease FAQ*).



**Figura R4. Análisis SDS-PAGE de la purificación IMAC de la proteasa TEV.** Proteína total de la expresión de TEV después de 4 h de inducción con IPTG 0.5 mM: carril 1; fracción insoluble solubilizada: carril 2; fracción soluble que entra a la columna HisTrap: carril 3; proteína no unida a la columna (flow): carril 4; lavado con 75 mM de imidazol: carril 5; elución con 500 mM de imidazol: carriles 6-8; *pool* final de proteasa TEV a 2.7 mg/mL: carril 9. El asterisco rojo indica al *carrier* MBP libre (~41 kDa). El asterisco negro indica la proteasa TEV auto-procesada.

Partiendo de que la proteína precursora para el caso de Trx-scFv y de NusA-scFv tienen puntos isoeléctricos teóricos de 6.3 y 4.8, respectivamente, así como el scFv procesado con un *pI* de 8.3; podemos ver que las condiciones de la digestión con TEV se ven limitadas a la posibilidad de una precipitación isoeléctrica del scFv. Por ésta razón, inicialmente se consideró realizar el proceso de digestión con TEV a pH 7.3.

Como nuestra proteína contiene puentes disulfuro, se prefirió el uso del par redox Glutation GSSG:GSH (0.3 mM:3 mM) en lugar de  $\beta$ -mercaptoetanol, ya que permite mantener los puentes disulfuro a la vez que proporciona el suficiente poder reductor para la actividad de la proteasa TEV.

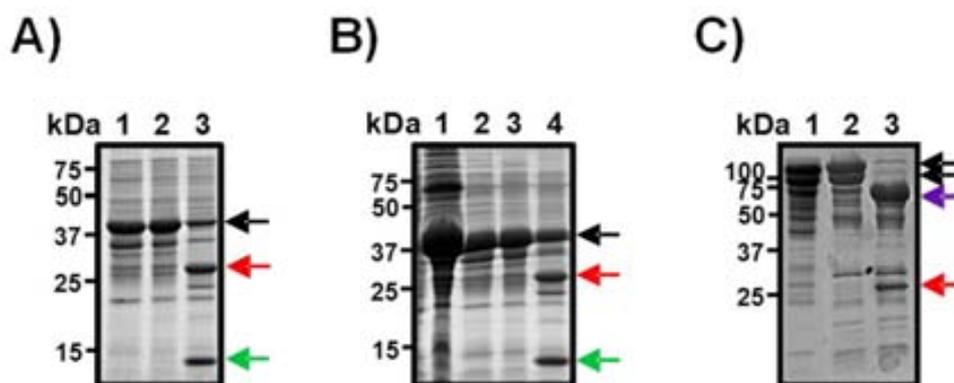
Ensayos preliminares sugirieron problemas de solubilidad y estabilidad de la proteína precursora bajo las condiciones consideradas inicialmente, ocasionando precipitaciones masivas de hasta el 50% de la proteína presente (tanto de proteína proveniente de la fracción soluble como de la proveniente de la fracción insoluble), al dializar la proteína precursora a tampón de digestión TEV pH 7.3; y digestiones no deseadas en ausencia de la proteasa TEV (digestiones 2 residuos N-terminal respecto a la diana de corte de TEV). Estos problemas fueron disminuidos mediante el uso de una concentración mínima de NaCl 100 mM (a pesar de que trabajar a una concentración por encima de NaCl 100 mM limita la actividad de la proteasa reduciendo a un 50% la eficiencia de la reacción), así como de la presencia de EDTA 0.5 mM para evitar digestiones inespecíficas. Otros ensayos preliminares usando la proporción 1:100 de proteína a cortar con respecto a la TEV, indicaron una baja eficacia del proceso de digestión a pH 7.3 (<50% de digestión) ya sea a temperatura

ambiente (~25°C) o a 4°C, llegando a extenderse el proceso hasta 72 h sin alcanzar un buen rendimiento de la digestión (Rivera-Hernández, 2009).

Un estudio de estabilidad realizado mediante la técnica de *thermo*fluor, comentado posteriormente en el apartado R3.6, nos indicó que la proteína madura (26.4 kDa), a pesar de que su punto isoeléctrico teórico es de 8.3, presenta una buena estabilidad a pH 8 cuando se mantiene suficiente fuerza iónica en el tampón y que además su estabilidad no se ve comprometida cuando se encuentra a temperaturas inferiores a 45°C (apartado R3.1).

Ante estos preliminares, se decidió aumentar tanto la cantidad de proteasa TEV a la proporción de 1:50 (proteína a digerir:proteasa), como la temperatura del proceso de digestión a 30°C, y utilizar un pH de 8.3. Además, se mantuvo la concentración de NaCl 100 mM y EDTA 0.5 mM con el par redox GSSG:GSH (0.3 mM:3 mM).

El rendimiento de la proteólisis limitada por TEV, mejoró notablemente, alcanzando una eficiencia de digestión de hasta 90% de la proteína soluble proveniente de NusA y de 70% de la soluble proveniente de Trx, así como de 60% de la replegada proveniente de Trx. Los tiempos de digestión se disminuyeron a tan solo 4 h, sin precipitaciones masivas de proteína antes (diálisis a tampón de digestión TEV), durante y después de la catálisis (figura R5). Mediante análisis de secuenciación N-terminal y MALDI-TOF se comprobó la identidad de los productos de digestión, entre los que se encontraba la proteína scFv-h3D6 madura con un procesamiento proteolítico correcto. Cabe mencionar que en el caso de NusA-scFv, aunque el perfil electroforético de la proteína precursora se presenta como dos bandas, la proteólisis limitada con TEV generó únicamente dos productos de digestión bien diferenciados (NusA y scFv-h3D6 procesado), mostrándonos que la presencia de doble banda para la proteína precursora se debía a la existencia de dos conformaciones de la forma precursora que, en principio, no afectan al scFv.

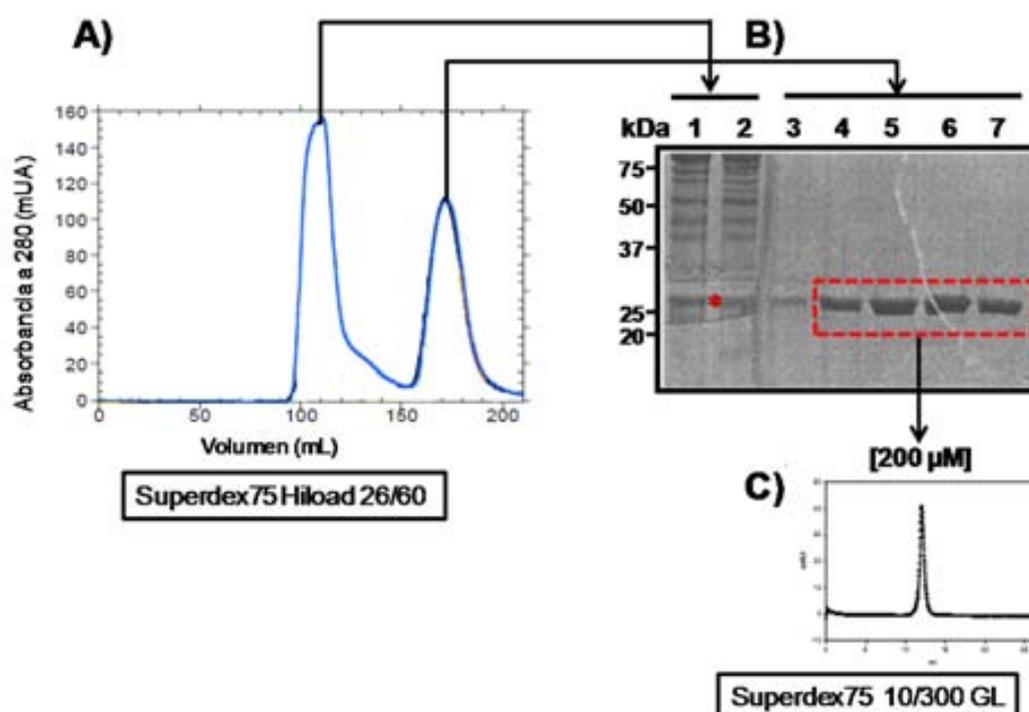


**Figura R5. Análisis de digestión con la proteasa TEV de la proteína precursora.** **A) Digestión de la proteína fusionada con Trx proveniente de la fracción soluble.** Proteína precursora (40.6 kDa) en tampón de elución IMAC: carril 1; proteína precursora en tampón de digestión TEV: carril 2; digestión con TEV: carril 3. **B) Digestión de la proteína fusionada con Trx proveniente de la fracción insoluble.** Proteína precursora (40.6 kDa) solubilizada en Urea 8 M: carril 1; proteína precursora replegada: carril 2; proteína precursora replegada en tampón de digestión TEV: carril 3; digestión con TEV: carril 4. **C) Digestión de la proteína fusionada con NusA proveniente de la fracción soluble.** Proteína precursora (83.4 kDa) en tampón de elución IMAC: carril 1; proteína precursora en tampón de digestión TEV: carril 2; digestión con TEV: carril 3. Las flechas negras indican a la proteína precursora fusionada ya sea con Trx o con NusA. Las flechas rojas indican al scFv-h3D6 maduro. Las flechas verdes indican al péptido Trx liberado. Las flechas moradas indican a la proteína NusA liberada.

### R2.3. Purificación de la proteína madura (26.4 kDa)

Una segunda cromatografía de afinidad IMAC permitió eliminar, de la mezcla post-digestión TEV, aquellas proteínas con cola de histidinas que se unían de forma específica a la columna: la proteasa TEV (6His-TEV), el *carrier* NusA procesado (6His-NusA) ó el péptido Trx procesado (6His-Trx) y la proteína de fusión que no logró procesarse (6His-NusA-dianaTEV-scFv ó 6His-Trx-dianaTEV-scFv), así como proteínas contaminantes de unión inespecífica.

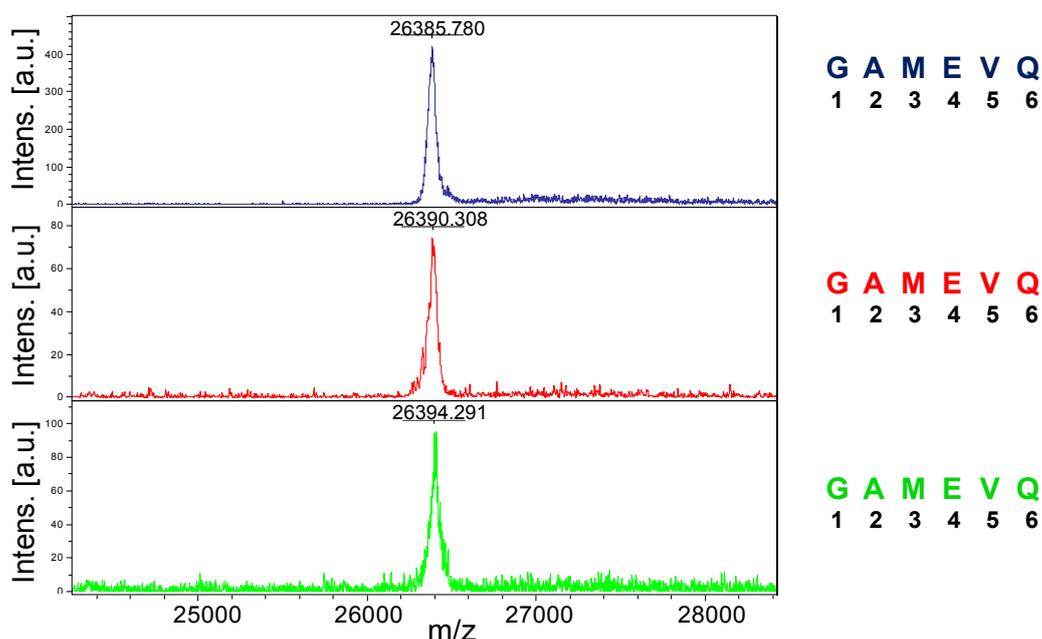
Después de este punto, el grado de pureza de la proteína madura aun no era el adecuado para las pruebas de caracterización, por lo que se realizaron una serie de cromatografías preliminares de exclusión molecular (o gel filtración: GF) usando una columna preparativa Superdex75 Hiload 26/60 para separar el scFv-h3D6 de los contaminantes que aún permanecen en la solución. En estos preliminares se logró obtener un pico de elución simétrico para la proteína madura, indicándonos que la proteína es pura (corroborado por SDS-PAGE) y monodispersa (figura R6.A-B).



**Figura R6. Purificación de la proteína madura (scFv-h3D6) mediante cromatografía gel filtración (GF). A) Cromatograma de la separación de la mezcla post-digestión TEV en una columna Superdex75 HiLoad 26/60.** El primer pico corresponde al volumen vacío ( $V_0$ , proteínas de alto peso molecular fuera del rango de separación de la columna y proteínas oligomerizadas), el segundo pico corresponde a la proteína madura (26.4 kDa). **B) Análisis SDS-PAGE de las fracciones cromatográficas de GF.**  $V_0$ : carriles 1-2; fracciones monoméricas del scFv-h3D6 maduro: carriles 4-7. El asterisco rojo indica la presencia de proteína madura que se oligomerizó y que eluye en el  $V_0$ . El cuadro rojo indica las fracciones purificadas del scFv-h3D6 maduro monomérico que concentrado a 200  $\mu$ M para una cromatografía GF analítica. **C) Cromatograma del scFv-h3D6 monomérico purificado a altas concentraciones (200  $\mu$ M) en una columna analítica Superdex75 HiLoad 26/60.** Único pico de elución de la proteína madura concentrada, que corresponde, según la curva patrón de exclusión molecular previamente realizada (figura A1 de anexos), a la forma monomérica del scFv h3D6.

Por otro lado en la misma cromatografía, se pudo observar que en el pico correspondiente al volumen vacío ( $V_0$ ) había parte del scFv-h3D6, lo que podría significar una oligomerización soluble de cerca del 15% de la proteína madura cuando ésta se concentra junto a proteínas contaminantes dada las condiciones iniciales de la GF. Aunque, esta tendencia de oligomerizar, que ha sido descrita para moléculas tipo scFv, presumiblemente por interacción cruzada (*swapping*) entre dominios de la misma (Arndt y col., 1998), no se presentó en la proteína monomérica purificada cuando fue llevada a altas concentraciones (200  $\mu$ M) y analizada por el mismo método auxiliándose con una curva estándar de patrones de peso molecular (figura A1 de Anexos), en una columna analítica Superdex75 10/300 GL, encontrándose 100% monomérica (figura R6.C).

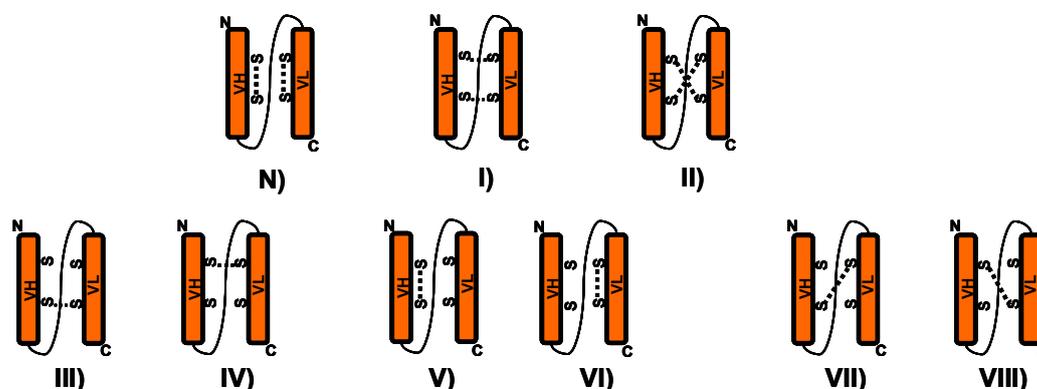
Posteriormente, al caracterizar térmicamente a la proteína purificada (descrito en el apartado R3.1) mediante dicroísmo circular y fluorescencia Trp, se encontraron diferencias en la tendencia de agregación de la proteína de acuerdo al sistema de expresión y procedencia de la proteína obtenida (NusA-scFv y Trx-scFv, fracción soluble y fracción insoluble). Teniendo en cuenta esto, se realizó un análisis MALDI-TOF y de secuenciación N-terminal encontrándose que todas las proteínas presentaban básicamente el mismo peso molecular y la misma secuencia N-terminal (figura R7), evidenciando diferencias a nivel conformacional.



**Figura R7. Espectrometría de masas MALDI-TOF y secuenciación N-terminal de las proteínas purificadas mediante cromatografía GF.** El espectro de masas de color azul corresponde a la proteína proveniente de Trx-scFv soluble (26385.780 m/z). El espectro de masas de color rojo corresponde a la proteína proveniente de Trx-scFv insoluble (26390.308 m/z). El espectro de masas de color verde corresponde a la proteína proveniente de NusA-scFv insoluble (26394.291m/z). Nota 1: las diferencias de masas entre las muestras ( $\pm 4$  m/z) son atribuibles al margen de error de la propia técnica. Nota 2: todas las muestras tienen la misma secuencia N-terminal en los primeros 6 residuos: GAMEVQ.

Dada la presencia de dos puentes disulfuro intradominio (C22-C92 en  $V_H$  y C23-C88 en  $V_L$ , figura I19.C de la introducción) en la estructura del scFv-h3D6, la hipótesis del *scrambling* era la más plausible para explicar estas diferencias. Las especies *scrambled* son isómeros conformacionales derivados de las distintas posibilidades de combinación en la formación de puentes disulfuro, tanto nativos como no nativos.

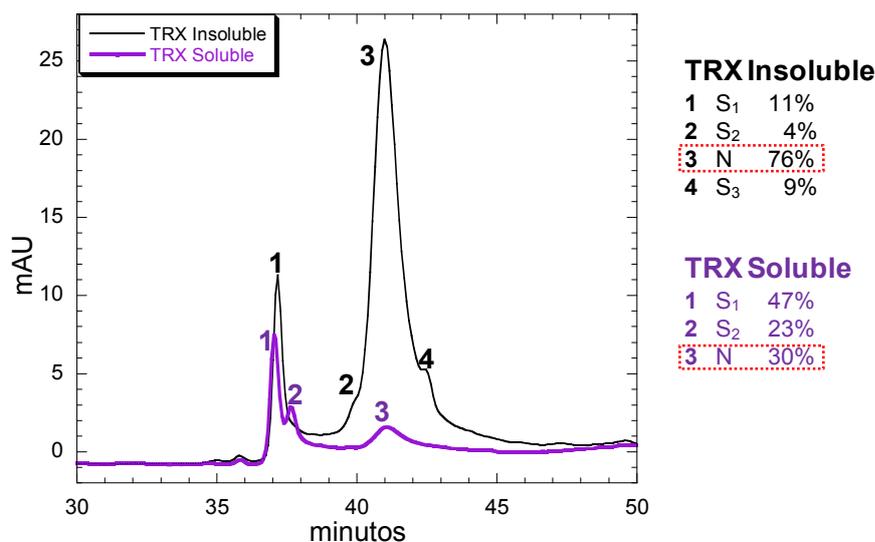
En el caso de nuestra proteína, el hecho de contar con cuatro cisteínas susceptibles a formar puentes disulfuro hace que existan teóricamente ocho posibilidades de formación especies *scrambled*, además de la especie nativa (figura R8).



**Figura R8. Representación de la conformación nativa del scFv-h3D6 y de las especies *scrambled* posibles.** Especie nativa: N); especies con dos puentes disulfuro: I y II); especies con un puente disulfuro: III al VIII). Los puentes disulfuro nativos son C22-C92 en el dominio V<sub>H</sub> y el C23-C88 en el dominio V<sub>L</sub>.

La cromatografía de fase reversa (RPC) es una técnica altamente resolutive que permite separar proteínas con diferencias pequeñas en su hidrofobicidad, siendo incluso capaz de separar diferentes especies conformacionales de una misma proteína, como las generadas por especies *scrambled*.

Esta técnica se basa en la interacción reversible entre la fase estacionaria altamente hidrofóbica y las regiones hidrofóbicas superficiales de la proteína. Para exponer los núcleos hidrofóbicos de las proteínas al solvente, manteniéndolas solubles, la muestra es aplicada generalmente en presencia de ácido trifluoroacético. La elución se logra mediante el aumento gradual del componente orgánico apolar (acetonitrilo) en la fase móvil. Por medio de esta técnica fue posible confirmar la presencia de al menos tres isómeros conformacionales del scFv-h3D6, encontrando que la composición de estos isómeros variaban considerablemente entre la proteína obtenida de la fracción insoluble y la obtenida de la fracción soluble (figura R9), desafortunadamente no fue posible la recuperación de las distintas especies obtenidas para una caracterización, ya que la proteína precipitó durante el proceso cromatográfico, dada las condiciones astringentes a las que se efectúa la cromatografía RP.



**Figura R9. Análisis RP-FPLC de proteína madura.** Diferencias en la composición de las especies *scrambled* entre las proteínas maduras provenientes de la fracción insoluble y soluble de Trx-scFv. Se identifican 4 diferentes conformaciones en la muestra proveniente de Trx-scFv insoluble, siendo la especie nativa el componente mayoritario (76%). Se identifican 3 diferentes conformaciones en la muestra proveniente de Trx-scFv soluble, teniendo la especie nativa presencia solo del 30% en la composición. Nota 1: la identidad de la especie nativa se realiza de manera indirecta en el apartado R3.1. Nota 2: las estimaciones de proporciones porcentuales de las especies *scrambled* se realizan en base al área de los picos. Nota 3: la detección se hizo a 280 nm.

En la bibliografía existen reportes de separación de isómeros conformacionales proteicos mediante cromatografía de Intercambio Catiónico (CEX) (Rothwarf y col., 1998; English y col., 2001; Liu y col., 2011; Zhang y col., 2011).

La CEX permite separar las proteínas en función de su carga superficial global, ésta dependerá del punto isoeléctrico (pI) de la proteína y del pH del tampón en que se encuentre; de tal forma que cuando la proteína se encuentre en un tampón con un pH por debajo de su pI, la carga global adquirida por ésta será positiva, uniéndose a la fase estacionaria de la cromatografía cargada negativamente. Para que la interacción entre la proteína cargada positivamente y las fase estacionaria sea optima, generalmente se utilizan tampones de baja fuerza iónica, ya que la sal apantalla las cargas compitiendo por la unión a la columna, de hecho, la elución de la proteína ocurre mediante este efecto, al aumentar en la fase móvil el contenido de sales.

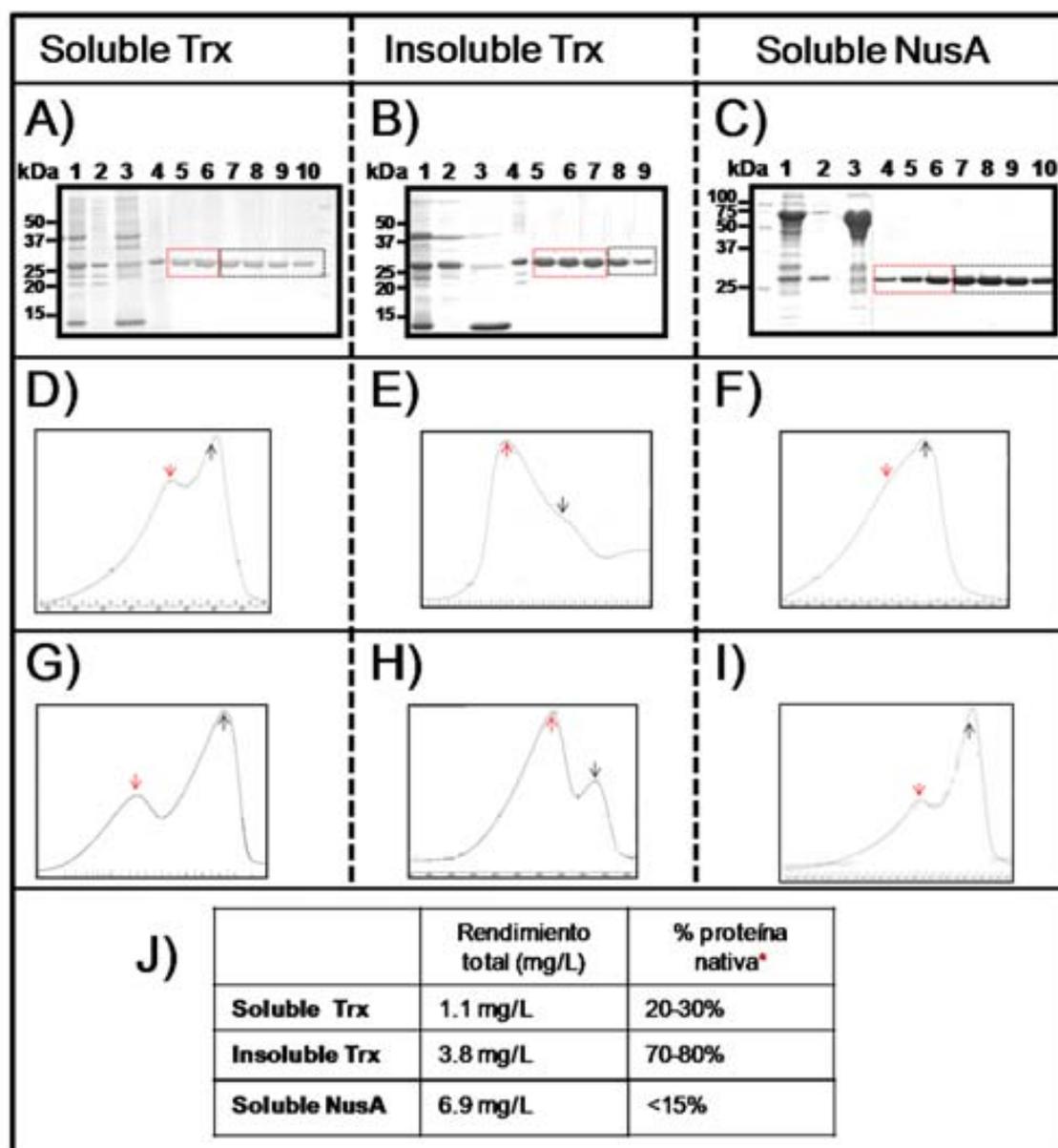
La separación de isómeros estructurales, tales como las especies *scrambled*, tiene su fundamento al considerar la carga neta de una proteína no como algo puntual, sino como una distribución asimétrica de carga superficial, dependiente, entre otras cosas,

de la estructura terciaria. Modificaciones conformacionales de las especies *scrambled* pueden ocasionar diferencias en los residuos expuestos al solvente, siendo las especies con puentes disulfuro no nativos los que presenten un plegamiento menos compacto, variando ligeramente la distribución de carga superficial de la proteína y con ello la retención de la proteína en la columna (Kopaciewicz y col., 1983; Zhang y col., 2011). Por lo que, aprovechando que las condiciones de esta técnica son menos astringentes que la RP, se decidió utilizarla como técnica de separación de la especie nativa de las *scrambled* presentes en la proteína madura; tanto de la proveniente de la fracción soluble de Trx-scFv y NusA-scFv, como de la fracción insoluble de trx-scFv.

El *pI* teórico de la proteína madura es de 8.3, por lo que la cromatografía se realizó a un *pH* constante de 6.5 (casi dos unidades debajo del *pI*), con un gradiente de 0.33% tampón B/mL, en un tampón NaHPO<sub>4</sub> 5 mM. Los perfiles SDS-PAGE de las fracciones de CEx para todas las muestras (soluble-Trx, insoluble-Trx y soluble-NusA) nos indicaron, que la proteína madura se encontraba en forma pura y con una movilidad electroforética homogénea (figura R10.A-C); contrastando con el hecho de que en los perfiles cromatográficos de CEx (columna Resource S 1mL), se presentaban claras asimetrías e irregularidades en la forma de los picos de elución (elución de proteína a NaCl 60 mM), este hecho nos indicó una cierta heterogeneidad en la distribución de carga superficial de las diferentes formas *scrambled* presentes en la muestra; manifestándose de manera marcada (presencia de dos picos), en la muestra obtenida de la fracción soluble de Trx-scFv. Tal como se puede ver en la figura R10.D-F, la resolución de la CEx aun no se encontraba optimizada para la separación de las especies *scrambled*.

Mediante la optimización de los tampones y gradientes de la cromatografía, usando una columna Resource S 6mL, enlenteciendo el gradiente a 0.06% tampón B/mL y aumentando ligeramente la fuerza iónica de los tampones (NaHPO<sub>4</sub> 8.3 mM); así como la formación de un pequeño gradiente de *pH* durante la cromatografía (*pH* inicial: 6.5 y *pH* final 6.0), se logró mejorar notablemente la resolución de la técnica, al separar parcialmente dos picos bien diferenciados (figura R10.G-I) (Blasco-Moreno, 2010). La total separación de los picos se logró mediante una serie de repurificaciones de la zona comprometida mezclada entre los picos. El primer pico eluía a 85 mM de NaCl y el segundo pico lo hacía a 93 mM de NaCl, con una diferencia de valor de *pH* de 0.04 entre ellos, es decir, las diferencias de retención de proteína son casi ínfimas. A pesar de eso, la tendencia de agregación de estos dos picos son marcadamente diferentes, correspondiendo el primer pico a la especie nativa y el segundo pico a una mezcla de especies *scrambled*, según la caracterización de los picos descrita más adelante en el apartado R3.1.

Los rendimientos globales de la purificación de la proteína nativa fueron, de la proveniente de Trx-scFv soluble: 1.1 mg/L, con un contenido previo a la CEx del 20-30% de proteína nativa; de Trx-scFv insoluble: 3.8 mg/L, con un 70-80% de proteína nativa previo; y de la proveniente de NusA-scFv soluble: ~7 mg/L, con menos del 15% de proteína nativa previo; dependiendo del lote de purificación (figura R10.J). De tal forma, que aunque en términos globales de cantidad el mejor rendimiento se obtuvo de la proteína soluble proveniente de la fusión con NusA, en términos de calidad, la que mejor rendimientos nos ofreció, es la proteína obtenida del replegamiento de Trx-scFv insoluble; por esta razón se decidió utilizar ésta proteína para pruebas posteriores, así como este método para la obtención de las posteriores variantes proteicas. La proteína madura nativa fue dializada a PBS pH 7.4, concentrada a 20  $\mu$ M, congelada y almacenada a -20°C hasta su utilización.



**Figura R10. Purificación de la proteína madura (scFv-h3D6) mediante cromatografía de intercambio catiónico (CEx). A) SDS-PAGE de la purificación final de la proteína madura proveniente de la fracción soluble Trx.** Digestión con TEV: carril 1; *flow* de IMAC2: carril 2; lavado C de IMAC2 (segunda cromatografía de afinidad): carril 3; *pool* de proteína que entra a CEx (cromatografía de intercambio catiónico): carril 4; elución del scFv-h3D6 maduro en CEx: carriles 5-10. **B) SDS-PAGE de la purificación final de la proteína madura proveniente de la fracción insoluble Trx.** Digestión con TEV: carril 1; *flow* de IMAC2: carril 2; lavado C de IMAC2: carril 3; *pool* de proteína que entra a CEx: carril 4; elución del scFv-h3D6 en CEx: carriles 5-9. **C) SDS-PAGE de la purificación final de la proteína madura proveniente de la fracción soluble NusA.** Digestión con TEV: carril 1; *flow* de IMAC2: carril 2; lavado C de IMAC2: carril 3; elución del scFv-h3D6 en CEx: carriles 4-10. **D), E) y F) Cromatogramas de purificación CEx de proteína madura provenientes de las fracciones: soluble Trx, insoluble Trx y soluble NusA, respectivamente; a pH constante de 6.5.** Las cromatografías se realizan con tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  5 mM, presentando la proteína madura una elución a NaCl 60 mM. **G), H) e I) Cromatogramas de repurificación CEx de proteína madura provenientes de las fracciones: solubles Trx, insolubles Trx y solubles NusA, respectivamente; a pH variable de 6.5 a 6.0.** Las cromatografías se realizan con tampón  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8.3 mM, presentando la proteína madura dos picos de elución: a 85 mM de NaCl y a 93 mM de NaCl. **J) Rendimientos totales de las diversas purificaciones en CEx del scFv-h3D6.** Los mg de proteína total obtenidos vienen de una expresión de 2 L. El rendimiento total se obtiene de dividir los mg obtenidos entre litros de cultivo expresados. El porcentaje de proteína nativa se realiza en base a la cuantificación proteica resultante de separar los dos picos mediante sucesivas repurificaciones y al conocimiento de que el primer pico corresponde a la especie nativa. Las flechas rojas indican los picos de elución de la especie nativa, y las negras los picos correspondientes a las especies *scrambled*.

### **R3. Caracterización del scFv-h3D6 WT**

#### **R3.1. Caracterización térmica**

Ya que el scFv-h3D6 purificado se obtuvo a partir de las proteínas de fusión Trx-scFv y NusA-scFv, tanto de la fracción soluble como insoluble, fue necesario la evaluación y comparación de la calidad de las proteínas purificadas; por lo que, se realizaron desnaturalizaciones térmica seguidas mediante fluorescencia Trp y dicroísmo circular (CD). De igual forma, se caracterizó el efecto de la temperatura en la estructura secundaria de la proteína mediante CD y FTIR.

##### **R3.1.1. Desnaturalizaciones térmicas de plegamiento mediante fluorescencia Trp**

El scFv-h3D6 procesado obtenido del primer evento de purificación por GF fue evaluado y caracterizado mediante una desnaturalización térmica seguida por fluorescencia de Trp.

La técnica de fluorescencia Trp permite evaluar cambios en el entorno del triptófano que en las proteínas suele formar parte del núcleo hidrofóbico; el caso del scFv-h3D6 cuenta con cinco triptófanos, dos en los núcleos hidrofóbicos y tres en la interficie entre dominios. La desnaturalización de la proteína implica la exposición de los triptófanos al solvente y dado que el máximo de emisión de fluorescencia del triptófano en medio acuoso está en entorno a 355 nm, se considerara este valor como indicador del desplegamiento de la proteína.

En la determinación de la longitud de onda ( $\lambda$ ) óptima para incidir en los subsecuentes espectros de emisión, se realizó un espectro de excitación en la región 220-320 nm a 25°C. Como en la mayor parte de las proteínas, este máximo se localizó a 290 nm (resultado no mostrado).

Como se puede observar de forma genérica en la figura R11.A, el espectro de emisión a 25°C en tampón PBS, de la proteína proveniente de Trx-scFv insoluble, muestra un máximo de emisión a 338 nm (longitud de onda seleccionada para seguir la desnaturalización de la proteína inducida por temperatura). En el punto final de la desnaturalización térmica (95°C), el espectro de emisión muestra una fuerte disminución de cerca del 88% de la intensidad relativa de fluorescencia y un desplazamiento del máximo de emisión de 8 nm hacia el rojo, localizándose en 346 nm. Al volver a las condiciones iniciales de temperatura, el espectro de emisión 25°C renaturalizado (aunque recupera parte de la intensidad relativa), se evidencia una disminución del 65% de ésta con respecto a la intensidad inicial a 25°C; de igual

forma, el máximo de emisión característico de la forma plegada no se recupera (343 nm), encontrándose desplazado 5 nm hacia el rojo (figura R11.A). Esto indica que: i) los residuos Trp no se han expuesto totalmente al solvente al desnaturalizar, y por lo tanto no se ha dado un proceso de desplegamiento y; ii) no se recupera el plegamiento nativo al renaturalizar.

En términos generales las desnaturalizaciones térmicas de todas las muestras (los diferentes *pool* obtenidos por GF provenientes de las fracciones solubles e insolubles de Trx-scFv y NusA-scFv), nos indicaron que, aunque hay una ligera disminución de intensidad de fluorescencia al aplicar pocos grados de temperatura (presuntamente atribuido a un efecto de la temperatura en la disminución del rendimiento cuántico de la fluorescencia por aumento de la frecuencia de colisiones, más que a un efecto de estabilidad del plegamiento inicial), la región de mayor cooperatividad (indicativa de una transición) se encuentra en el rango de 47-62°C (figura R11.B). Visualmente se pudo apreciar que las muestras se encontraban agregadas al final del proceso térmico, hecho corroborado mediante un seguimiento de la desnaturalización térmica por turbidimetría (comentado más adelante, figura R11.D: línea discontinua azul).

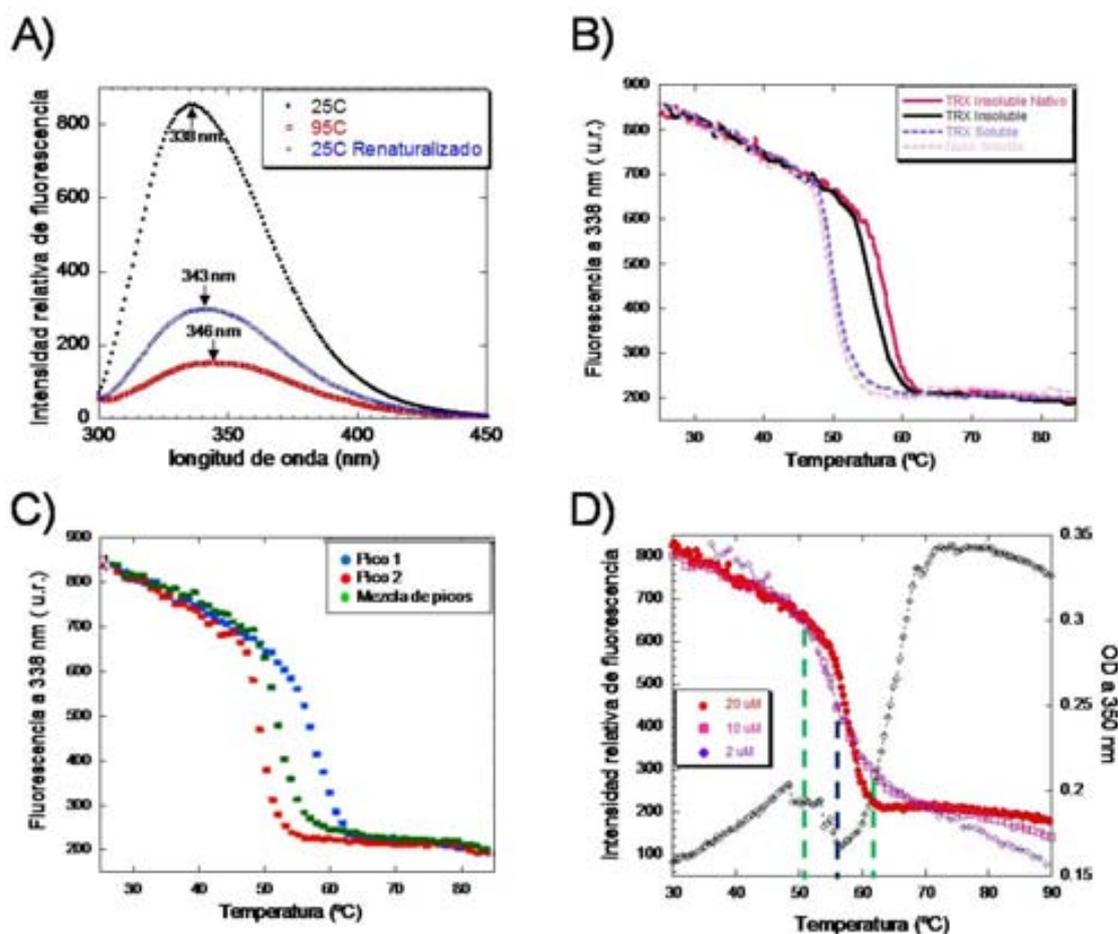
Por todo ello, podemos concluir que el proceso de desnaturalización térmica en el scFv-h3D6 es irreversible y que más que un proceso de desplegamiento, lo que observamos fue un proceso de agregación, por lo que no podemos hablar de  $T_m$  en términos de una desnaturalización, sino más bien en términos de una transición hacia una conformación con alta tendencia a agregar y, por ello, le denominaremos  $T_{1/2}$ . Señalar que este tipo de proteínas, los scFv, han sido reiteradamente descritas como moléculas con alta tendencia a la agregación (Worn y Pluckthun, 1999, 2001; Honegger, 2008).

Los perfiles térmicos de los diferentes *pool* de proteínas (obtenidos por GF y provenientes de las fracciones solubles e insolubles de Trx-scFv y NusA-scFv), presentaron marcadas diferencias en la tendencia de agregación. Como se puede apreciar en la figura R11.B, la proteína proveniente de la fracción insoluble de Trx, presenta una transición conformacional hacia la agregación entre los 50 y 62°C, con una  $T_{1/2}$  estimada de ~55°C. Por otro lado, las proteínas provenientes de la fracción soluble tanto de Trx como de NusA, presentan perfiles de agregación muy parecidas entre ellas, con transiciones de agregación tempranas (47-54°C) y unos valores de  $T_{1/2}$  estimados en torno a los 50°C. De tal forma que estas diferencias en la tendencia a la agregación, visualizadas en los 5°C de diferencia de  $T_{1/2}$ , son indicadores de una disminución sensible en la estabilidad de la proteína obtenida de la fracción soluble, en

comparación con la de la fracción insoluble. Estos hechos, se explican mediante la hipótesis de la presencia de formas o especies *scrambled* en las muestras.

Como se describe en el apartado R2.3, mediante la técnica CEx se logró la separación de las formas *scrambled* del scFv-h3D6 (proveniente de la fracción soluble Trx-scFv), en dos picos bien diferenciados. Al ser caracterizados térmicamente estos dos picos, se encontró que el *pool* del pico 1 presentaba una estabilidad notablemente mayor respecto al pico 2, siendo incluso ligeramente más estable que la proteína obtenida de la fracción insoluble (figura R11.B-C). Este hecho apuntó, a que la identidad del pico 1 corresponde a la conformación nativa de la proteína. Por otro lado, la fracción total del evento de CEx (pico 1+ pico 2) presentó una estabilidad intermedia, lo que indica que, la estabilidad global de la proteína dependerá de la proporción en que se encuentren la población con conformación nativa con respecto a las poblaciones *scrambled* (figura R11.C).

Una vez que se dispuso de un método para la obtención de la proteína nativa, se evaluó si el proceso de agregación era dependiente de la concentración, por lo que se realizaron desnaturalizaciones térmicas a diferentes concentraciones (2  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$ ). Como se muestra en la figura R11.D, lo que se encontró fueron transiciones en torno a los 52-63°C (líneas discontinuas verdes) y una  $T_{1/2} \sim 57^\circ\text{C}$  (línea discontinua azul), independientemente de la concentración del scFv-h3D6 utilizada. Aunque la transición fue más marcada a altas concentraciones en comparación con las otras dos concentraciones, los perfiles térmicos en términos generales no presentaron variaciones, lo cual implica que, la agregación del scFv-h3D6 sigue una cinética no dependiente de nucleación. Una desnaturalización térmica seguida por turbidimetría ( $\text{OD}_{350 \text{ nm}}$ ) de la proteína nativa a 20  $\mu\text{M}$ , nos indicó que la muestra comienza a agregar a partir de los 57°C, temperatura descrita anteriormente como la  $T_{1/2}$  de la transición.



**Figura R11. Desnaturalizaciones térmicas de proteína madura seguidas mediante fluorescencia de Trp.** A) Espectros de emisión de la muestra al inicio y al final del proceso de desnaturalización térmica. Espectro negro: muestra inicial a 25°C con un máximo de emisión a 338 nm; espectro rojo: muestra a 95°C con un máximo de emisión a 346 nm; espectro azul: muestra a 25°C renaturalizada con un máximo de emisión a 343 nm. B) Térmicas de proteína proveniente de las fracciones solubles e insolubles de Trx-scfFv y NusA-scfFv purificadas mediante GF. Perfil térmico rojo: proteína nativa proveniente de Trx-scfFv insoluble; perfil térmico negro: proteína proveniente de Trx-scfFv insoluble; perfil térmico morado discontinuo: proteína proveniente de Trx-scfFv soluble; perfil térmico rosado discontinuo: proteína proveniente de NusA-scfFv soluble. C) Térmicas de proteína proveniente de la fracción soluble Trx-scfFv purificada mediante CEX. Perfil térmico azul: *pool* del pico 1; perfil rojo: *pool* del pico 2; perfil verde: mezcla de *pool* (pico 1 + pico 2). D) Térmicas de proteína nativa a diferentes concentraciones. Perfil rojo: 20  $\mu$ M; perfil lila: 10  $\mu$ M; perfil morado: 2  $\mu$ M; perfil negro: desnaturalización a 20  $\mu$ M seguida por turbidimetría a 350 nm. A excepción del perfil negro todas las desnaturalizaciones están seguidas por fluorescencia Trp. Nota 1: la concentración de proteína es de 20  $\mu$ M en las figuras A, B y C. Nota 2: para las desnaturalizaciones térmicas se utiliza el rango de temperatura de 25 a 90°C con una rampa térmica de 1°C/min. La longitud de onda de excitación es de 290 nm, los espectros de emisión son adquiridos en un rango de 300-450 nm y las desnaturalizaciones térmicas se siguen a 338 nm. Nota 3: las mediciones se realizan en una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico con agitación. Nota 4: las unidades de fluorescencia son expresadas como unidades relativas de fluorescencia (u.r).

### R3.1.2. Caracterización de la estructura secundaria y desnaturalizaciones térmicas mediante dicroísmo circular (CD)

El dicroísmo circular en la región del ultravioleta lejano (260-190 nm) es una técnica espectroscópica que permite estudiar la estructura secundaria global de las proteínas, así mismo nos permite evaluar los cambios conformacionales ocurridos bajo diferentes condiciones, tales como la temperatura.

Como podemos observar en la figura R12.A, de manera general, los espectros de CD en el UV lejano del scFv-h3D6 a 25°C presentan peculiaridades en sus formas; resaltando la presencia de dos mínimos locales de elipticidad (218 nm y 230 nm), así como de un máximo de elipticidad a 200 nm y una señal positiva a 237 nm.

En la bibliografía se describen para moléculas tipo scFv, espectros típicos de hoja- $\beta$  para proteínas de la familia de las inmunoglobulinas, con un máximo de elipticidad a 200 nm y un mínimo de elipticidad a 215 nm (Berger y col., 1999; Vendel y col., 2012; Kim y col., 2009). El mínimo de elipticidad de 230 nm y la señal positiva a 237 nm han sido descritos como resultado de las contribuciones de los residuos aromáticos presentes (en el caso de nuestra proteína se cuenta con 13 Tyr, 5 Trp y 7 Phe), así como a la cadena cistinil (Sreerama y col., 1999). Particularmente el mínimo a 230 nm ha sido reportado para una IgG1-Fc (Traxlmayr y col., 2012) y descrito para un dominio V<sub>L</sub> (Tsybovsky y col., 2007; Baden y col., 2008), atribuyéndose a la interacción de los residuos aromáticos con el residuo conservado Trp35. Por otro lado, en el grupo recientemente se ha comprobado que la señal positiva a 237 nm se debe a un fenómeno similar en el dominio V<sub>H</sub> (Trp 36), y no a la cadena cistinil (Montoliu-Gaya, 2013).

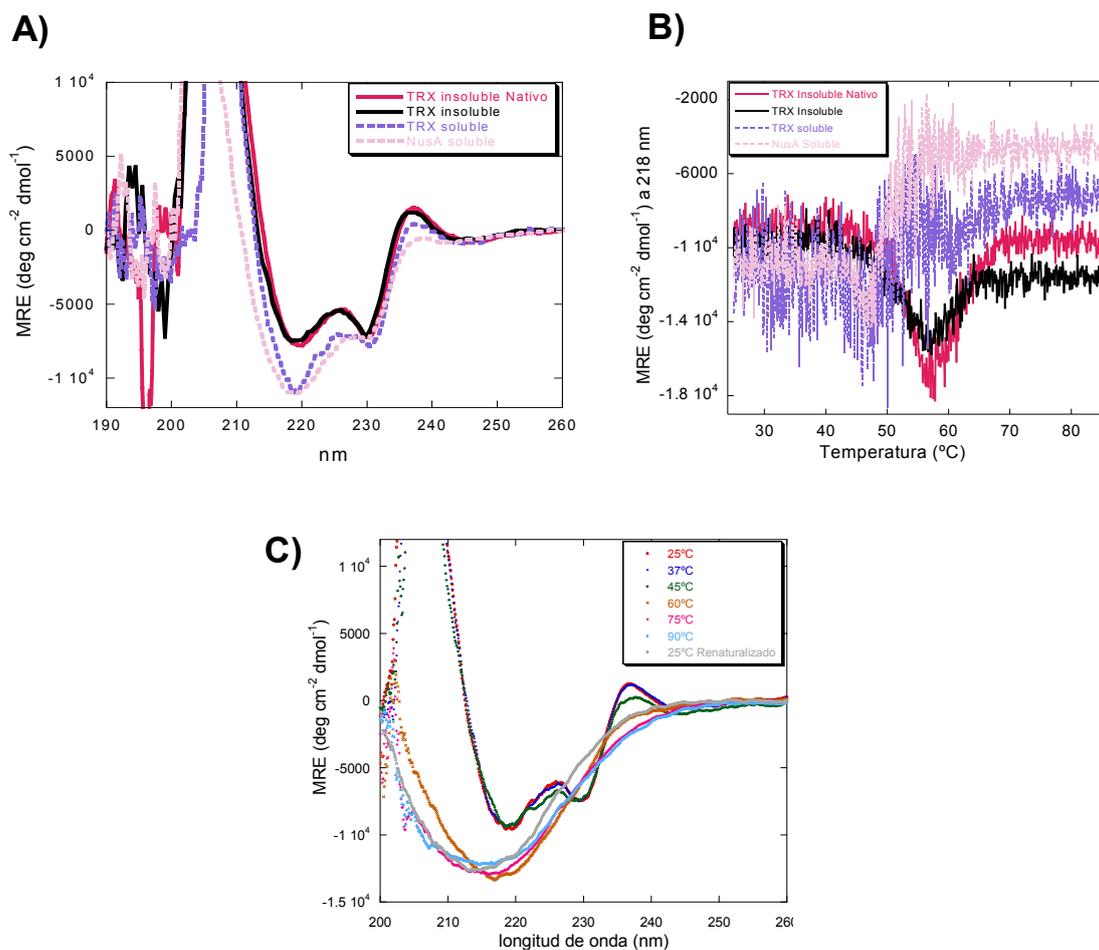
Con el propósito de corroborar las diferencias en el plegamiento de la proteína obtenida de las fracciones solubles e insolubles de Trx-scFv y NusA-scFv, se obtuvieron espectros de CD en el UV lejano a 25°C. Como se puede observar en la figura R12.A, existen diferencias marcadas en las características de los espectros de éstas proteínas. De tal forma que, con respecto a la estructura secundaria de la proteína proveniente de la fracción insoluble, los obtenidos de las fracciones solubles (Trx-scFv y NusA) presentan una secundaria con un mayor contenido de hoja- $\beta$  (218 nm); así como la señal positiva (237 nm) ligeramente atenuada. Este aumento del contenido de hoja- $\beta$  en las muestras solubles (atribuible a la composición en su mayoría de especies *scrambled*), podría explicar la mayor tendencia de agregación observada en estas muestras. Y el atenuamiento de la señal positiva a 237 nm podría indicar que los conformeros *scrambled* difieren en el entorno del núcleo hidrofóbico creado alrededor del Trp 36 del dominio V<sub>H</sub>. Señalar que la proteína obtenida de la

fracción insoluble de Trx presentó prácticamente la misma estructura secundaria que la presentada por la proteína nativa.

Para las desnaturalizaciones térmicas se realizó un seguimiento del cambio en la elipticidad producida a 218 nm (mínimo correspondiente al contenido de hoja- $\beta$ ). Al analizar los perfiles térmicos de la proteína nativa, se visualizó que a partir de los 48-50°C comienza un aumento en la señal a 218 nm, lo que representa una reorganización conformacional que lleva a un enriquecimiento del componente- $\beta$ ; dando lugar a un estado intermediario, el cual promueve la agregación y la generación de componentes de tipo WL-fibrilares (descrito posteriormente en la caracterización térmica por FTIR del apartado R3.1.3), ocurriendo esto en torno a los 60°C; temperatura a la cual ocurre una disminución de la señal atribuible a la formación de agregados insolubles de la proteína (Schaefer y Pluckthun, 2012). El perfil térmico de la proteína proveniente de la fracción insoluble de Trx-scFv presenta en términos generales el mismo comportamiento que la proteína nativa (figura R12.B, líneas continuas roja y negra).

Un análisis detallado de los espectros de CD a diferentes temperaturas, nos indica que aun a los 45°C la proteína nativa mantiene prácticamente la integridad de su estructura secundaria (salvo una ligera disminución en la señal positiva a 237 nm). Pero al visualizar los espectros adquiridos de 60-90°C, podemos observar un cambio hacia la conformación canónica de hoja- $\beta$ , presentando un único mínimo de elipticidad a 215 nm; esta conformación canónica se mantuvo incluso después de regresar a la temperatura inicial de 25°C, corroborando la irreversibilidad del proceso (figura R12.C). Este enriquecimiento del contenido en hoja- $\beta$ , ya ha sido descrito durante el proceso de desnaturalización acida de la transtiretina (TTR) dando lugar a la generación de intermediarios oligoméricos, agregados prefibrilares y protofibrillas (Lindgren y col., 2005).

Podemos visualizar en las desnaturalizaciones térmicas seguidas a 218 nm (figura R12.B, líneas discontinuas morada y rosada) para el caso de las proteínas obtenidas de fracciones solubles, un comportamiento caracterizado por una marcada dispersión en el proceso térmico (atribuible a las diferentes contribuciones que puedan ofrecer las diferentes especies *scrambled* presentes en la muestra). Y aunque se registró un ligero aumento de la señal del componente- $\beta$  a los 45°C, después de los 48°C lo que observamos es una pérdida de ésta señal, ocasionada por una agregación temprana (atribuible a que inicialmente la muestra ya se encuentra enriquecida en el componente- $\beta$ , y por tanto muestra una mayor tendencia a agregar).



**Figura R12. Análisis de la estructura secundaria y caracterización térmica mediante dicroísmo circular (CD) en el ultravioleta lejano. A) Espectros de CD a 25°C de proteína proveniente de Trx-scfFv soluble e insoluble y NusA-scfFv soluble.** Espectro rojo: Trx-scfFv insoluble; espectro negro: *pool* de proteína proveniente de Trx-scfFv insoluble; espectro morado discontinuo: *pool* de proteína proveniente de trx-scfFv soluble; espectro rosado discontinuo: *pool* de proteína proveniente de NusA-scfFv soluble. **B) Perfiles térmicos seguidos por CD a 218 nm de proteína proveniente de Trx-scfFv y NusA-scfFv de las fracciones solubles e insolubles.** Perfil rojo: *pool* de proteína nativa proveniente de Trx-scfFv insoluble; perfil negro: *pool* de proteína proveniente de Trx-scfFv insoluble; perfil morado discontinuo: *pool* de proteína proveniente de Trx-scfFv soluble; perfil rosado discontinuo: *pool* de proteína proveniente de NusA-scfFv soluble. **C) Espectros de CD de proteína nativa a diferentes temperaturas.** Espectro rojo: 25°C; espectro azul: 37°C; espectro verde: 45°C; espectro naranja: 60°C; espectro magenta: 75°C; espectro azul claro: 90°C; espectro gris: 25°C renaturalizado. Nota 1: las unidades de elipticidad están normalizadas y expresadas en términos de MRE ( $\text{deg cm}^{-2} \text{dmol}^{-1}$ ). Nota 2: la concentración de todas las proteínas analizadas es de 20  $\mu\text{M}$ . Nota 3: el paso óptico de la cubeta es de 0.2 cm. Nota 4: la rampa de las desnaturalizaciones térmicas es de 1°C/min.

### R3.1.3. Caracterización del intermediario térmico del scFv-h3D6 WT, mediante espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

Debido a la particular forma de los espectros de CD iniciales que presentó el scFv-h3D6, no fue posible deconvolucionarlos para calcular el porcentaje de estructura secundaria por esa técnica.

La técnica espectroscópica conocida como FTIR es útil en la elucidación de la estructura secundaria de proteínas, proporcionando una herramienta poderosa para la comparación de propiedades estructurales en proteínas agregadas, permitiendo diferenciar y calcular los constituyentes de hojas- $\beta$  con diferente grado de empaquetamiento (Zandomeneghi y col., 2004; Jahn y col., 2008). De tal forma que un análisis por FTIR a diferentes temperaturas permitió caracterizar y calcular los componentes del estado intermediario en el proceso de agregación térmica del scFv-h3D6 (figuras R13, R14 y tabla R1).

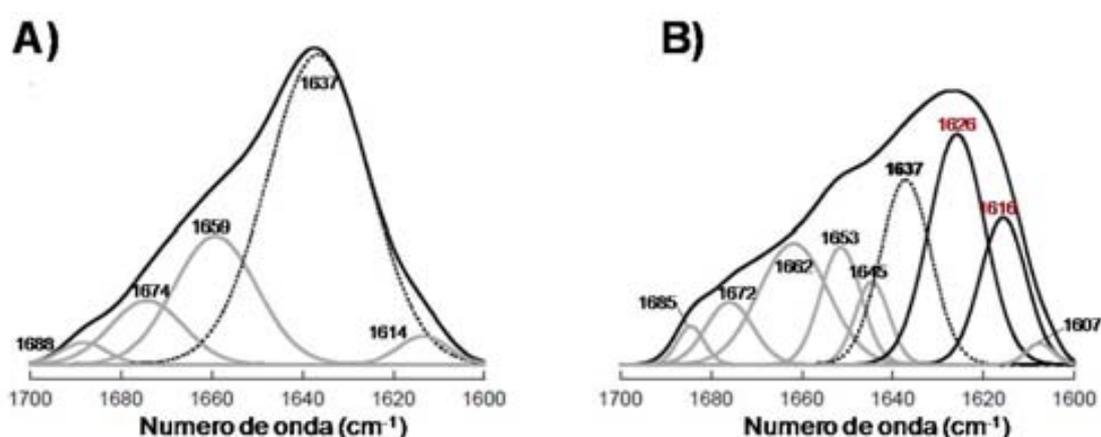
La descomposición del espectro infrarrojo de la región de la banda amida I' a 25°C, generó tres bandas principales, localizadas a 1674  $\text{cm}^{-1}$ , 1659  $\text{cm}^{-1}$  y 1637  $\text{cm}^{-1}$ , así como dos bandas menores localizadas a 1688  $\text{cm}^{-1}$  y a 1614  $\text{cm}^{-1}$  (figura R13.A). De estas bandas, los componentes de hoja- $\beta$  antiparalela de baja y alta frecuencia, característicos del plegamiento de inmunoglobulinas, corresponden a las localizadas a 1637  $\text{cm}^{-1}$  y 1681  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente. Los *loop*/giros corresponden a la banda localizada a 1659  $\text{cm}^{-1}$ , existiendo un componente adicional para los giros- $\beta$  localizado a 1674  $\text{cm}^{-1}$  (Byler y Susi, 1986; Walther y col., 2010). El componente mayoritario corresponde a la hoja- $\beta$  antiparalela de baja frecuencia (considerada como la hoja- $\beta$  nativa) con un 64%, seguida de la secundaria de *loop*/giros con un 22%, y de giros- $\beta$  con un 9% (tabla R1).

Como podemos ver en la tabla R1 y figura R14, los componentes del espectro obtenido a 50°C (inicio de la reorganización del estado nativo, descrito en el apartado R3.1.2) son muy similares a los componentes presentes a 25°C. En contraste, una vez que la reorganización ha dado lugar al estado intermediario a los 60°C, se pudieron distinguir diversos componentes- $\beta$  en la distribución del espectro de FTIR. Esta transición conformacional del estado nativo al estado intermediario, implicó una acusada disminución, del 65% al 16%, del componente de hoja- $\beta$  nativa (1637  $\text{cm}^{-1}$ ) a favor de la generación emergente de componentes más compactos de hoja- $\beta$  no nativos. La identidad de estos componentes- $\beta$ , que gobiernan el espectro a 60°C, fueron atribuidas tanto a la fibra de hoja- $\beta$  tipo *worm-like* (WL) localizada a 1627  $\text{cm}^{-1}$  con un 23% de contribución al espectro global, como a la fibra  $\beta$ -amiloide localizada a

1616  $\text{cm}^{-1}$  con un 10%. Además de estos componentes, se generaron dos bandas adicionales localizadas a 1650  $\text{cm}^{-1}$ , 1643  $\text{cm}^{-1}$  que corresponden a hélice- $\alpha$  y *random coil*, respectivamente (Zandomeneghi y col., 2004; Jahn y col., 2008); así como, un incremento del componente de *loop*/giros.

Finalmente, cuando se recuperaron las condiciones iniciales de temperatura (retorno a 25°C), se observó un ligero incremento de las tres bandas de componente- $\beta$  (hoja- $\beta$  nativa, WL y  $\beta$ -amiloide) a expensas del componente *loop*/giros; siendo el componente WL el que más contribuye, con un 26% del área del espectro (Tabla R1, figura R13.B y figura R14).

A manera de recapitulación: La molécula scFv-h3D6 sigue una desnaturalización térmica que lleva a una agregación independiente de nucleación, que se caracteriza por una reorganización conformacional directamente desde el estado nativo y un enriquecimiento de los componentes- $\beta$ , en específico, del componente tipo WL. Cabe señalar, que la ruta de agregación que desemboca en fibras WL es diferente a la que genera fibras amiloides. Caracterizándose la ruta amiloide por presentar una cinética lenta y dependiente de nucleación (sigmoideal) y, la ruta de WL por ser rápida y no dependiente de nucleación (exponencial) (Gosal y col., 2005). De hecho, estas fibras tipo WL pudieron ser visualizadas mediante microscopía TEM, en un estudio paralelo realizado en nuestro laboratorio por Marin-Argany (Marin-Argany y col., 2011); en dicho estudio, fue posible observar la morfología característica de las fibras WL (anteriormente descritas por Gosal y col., 2005) en el inicio de su formación, a 60°C, siendo más evidentes a 90°C (figura A2.C de anexos).

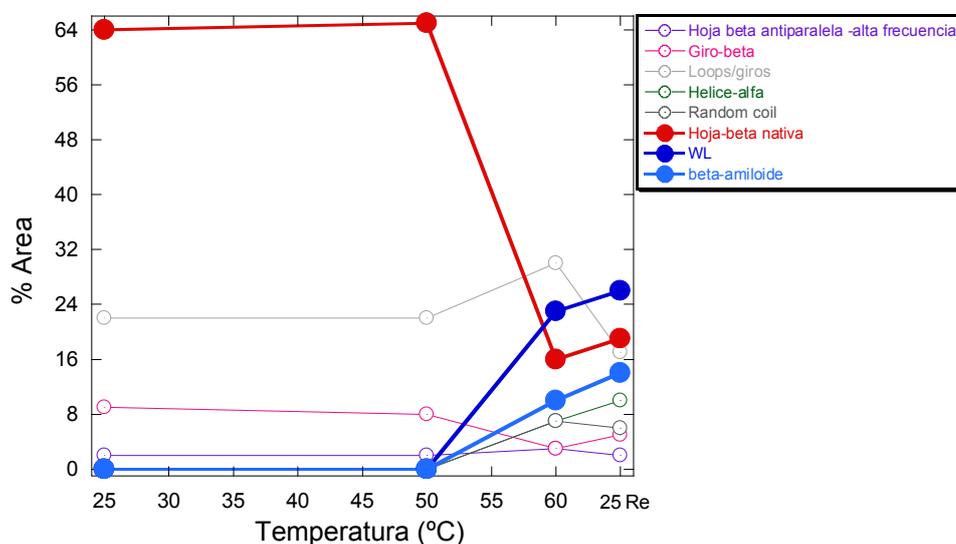


**Figura R13. Deconvolución y comparación de los espectros de FTIR. A) 25°C nativo. B) 25°C renaturalizado.** La banda discontinua indica el componente hoja- $\beta$  nativa (1637  $\text{cm}^{-1}$ ). Las bandas negras indican los componentes- $\beta$  fibrilares (*worm-like*, WL: 1626  $\text{cm}^{-1}$  y  $\beta$ -amiloide: 1616  $\text{cm}^{-1}$ ). Los demás componentes del espectro se muestran como bandas grises que corresponden a los componentes de hoja- $\beta$  antiparalela de alta frecuencia (1685-1688  $\text{cm}^{-1}$ ), giros- $\beta$  (1672-1674  $\text{cm}^{-1}$ ), *loop*/giros (1659-1662  $\text{cm}^{-1}$ ), hélice- $\alpha$  (1653  $\text{cm}^{-1}$ ), *random coil* (1645  $\text{cm}^{-1}$ ).

**Tabla R1. Descomposición del espectro infrarrojo de la región de la banda amida I, adquiridas a diferentes temperaturas (25°C, 50°C, 60°C y 25°C Re: renaturalizado).**

	25°C		50°C		60°C		25°C Re	
	Centro (cm <sup>-1</sup> )	Área (%)						
Hoja-β antiparalela de alta frecuencia	1688	2	1689	2	1685	3	1685	2
Giros-β	1674	9	1677	8	1676	3	1672	5
Loop/giros	1659	22	1662	22	1661	30	1662	17
Hélice-α					1650	7	1653	10
Random coil					1643	7	1645	6
Hoja-β nativa	1637	64	1637	65	1636	16	1637	19
Hoja-β WL					1627	23	1626	26
Hoja-β Amiloide					1616	10	1616	14
Cadena lateral aminoacídica	1614 <sup>a</sup>	3	1613 <sup>a</sup>	3	1607	1	1607	1

<sup>a</sup> Esta banda, es cuantitativamente despreciable, podría deberse también al componente amiloide.



**Figura R14. Evolución de los componentes de la amida I' en función de la temperatura.** Perfil rojo: hoja-β nativa (1636-1637 cm<sup>-1</sup>); perfil gris claro: *loop/giros* (1659-1662 cm<sup>-1</sup>); perfil lila: giro-β (1672-1676 cm<sup>-1</sup>); perfil morado: hoja-β antiparalela de alta frecuencia (1685-1689 cm<sup>-1</sup>); perfil azul: WL (1626-1627 cm<sup>-1</sup>); perfil azul claro: β-amiloide (1616 cm<sup>-1</sup>); perfil gris: *random coil* (1643-1645 cm<sup>-1</sup>); perfil verde: hélice-α (1650-1653 cm<sup>-1</sup>). No hay variación en la distribución de los componentes hasta 50°C. A partir de 60°C disminuye fuertemente el componente de hoja-β nativa y aparecen marcadamente tanto el componente WL, como el componente de fibra amiloide; además, de manera tenue aparecen también los componentes en hélice-α y *random coil*. Al retornar a las condiciones iniciales al finalizar el proceso térmico (25°C Re), hay un ligero aumento en la mayoría de los componentes a expensas del componente para *loop/giros*, siendo más evidente para WL, hoja-β nativa y amiloide.

## R3.2. Caracterización química

El scFv-h3D6 nativo fue caracterizado químicamente mediante una desnaturalización seguida por CD y fluorescencia Trp, utilizando como agente desnaturalizante a la urea en concentraciones progresivas hasta 9 M.

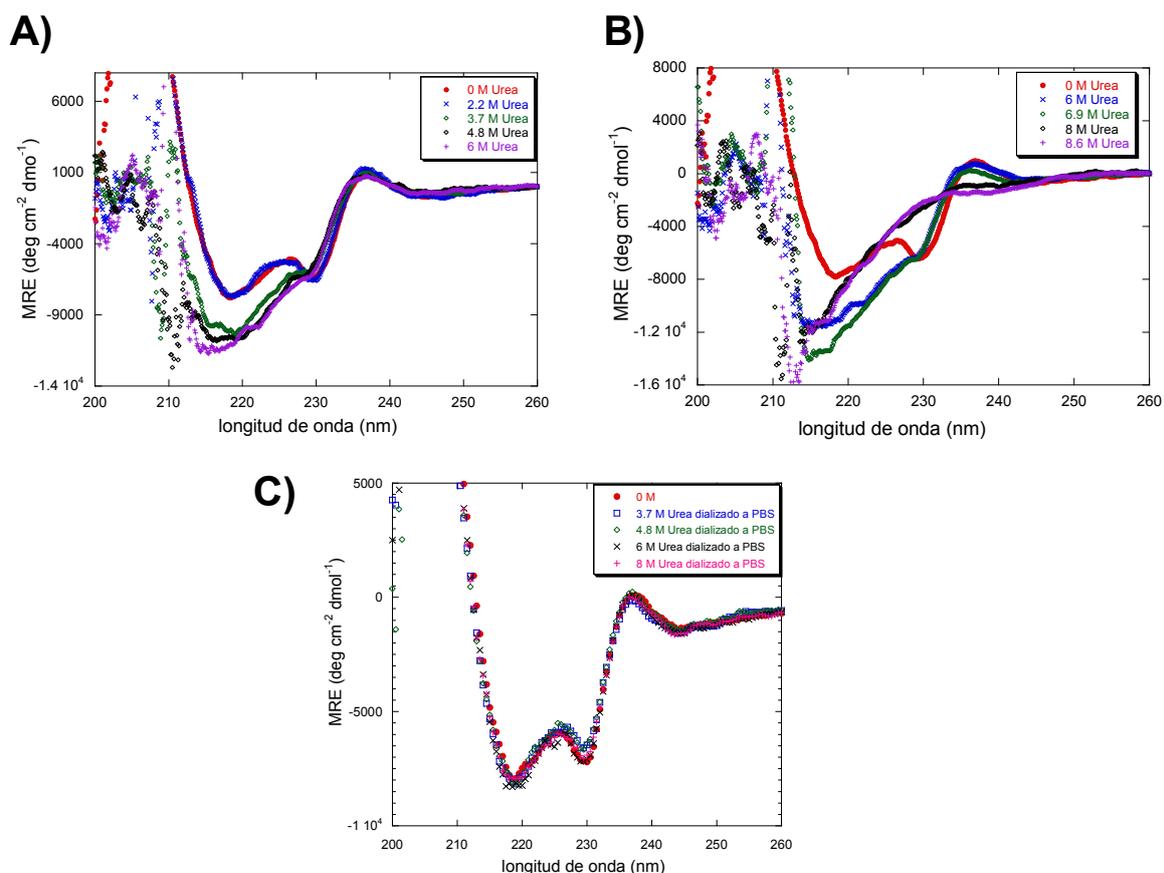
### R3.2.1. Desnaturalización química seguida por CD

Como podemos observar en los espectros de CD en el UV lejano (figura R15.A-B), la proteína conservó íntegramente su estructura secundaria hasta una concentración de 2 M de urea. A partir de esta concentración, ocurrió un aumento en la señal de hoja- $\beta$  (218 nm) y un ligero desplazamiento hacia al azul (215 nm); de igual forma, se dió una pérdida progresiva (prolongándose hasta una concentración de 6.9 M de urea) del mínimo de elipticidad inicial a 230 nm. Entre las concentraciones de 6.9 a 8 M de urea, ocurrió una completa desaparición tanto del mínimo de elipticidad a 230, como de la señal positiva a 237 nm. Aunque a partir de 8 M de urea se puede considerar que la proteína adquiere un estado desnaturalizado, éste no se corresponde a un estado completamente desplegado, ya que no se alcanzó un espectro *random coil* puro, ni siquiera a una concentración de urea de 8.6 M. Por lo tanto, el estado desnaturalizado con urea contiene estructura secundaria residual.

Todas las muestras de scFv-h3D6 a diferentes concentraciones de urea fueron dializadas a PBS, para posteriormente obtener espectros de CD UV lejano y fluorescencia Trp. Lo que se observó fue una completa recuperación de los espectros iniciales nativos tanto vistos por CD UV lejano (figura R15.C), como por fluorescencia Trp (figura R16.C); revelándose que el desplegamiento químico del scFv-h3D6 es 100% reversible.

Una vez comprobada la reversibilidad del proceso, se realizó una curva de desnaturalización química trazando puntos discretos en el equilibrio, para la determinación de parámetros termodinámicos. El seguimiento de la desnaturalización mediado por CD tiene la desventaja de que el cambio en la señal en la desnaturalización de una proteína de hoja- $\beta$ , como la nuestra, es más bien pequeña; y requiere de altas concentraciones de proteína (Worn y Pluckthun, 2001). Por otro lado, el seguimiento por fluorescencia de Trp presenta la ventaja de que requiere mucha menos concentración de proteína, por la sensibilidad de la técnica. Típicamente los residuos de triptófano se encuentran enterrados en el núcleo hidrofóbico de las proteínas, o bien fuertemente empaquetados en la interficie entre dominios, y tanto la intensidad como la localización del máximo de emisión en los espectros de fluorescencia Trp son susceptibles a cambiar de acuerdo a la exposición al solvente

(Jager y Pluckthun, 1999), por lo que, se decidió que era la mejor forma de seguir el proceso de desplegamiento.



**Figura R15. Espectros de CD lejano del scFv-h3D6 nativo a diferentes concentraciones de urea. A) 0-6 M de urea.** Espectro rojo: 0 M; espectro azul: 2.2 M; espectro verde: 3.7 M; espectro negro: 4.9 M; espectro morado: 6 M. **B) 6-8.6 M de urea.** Espectro rojo: 0 M; espectro azul: 6 M; espectro verde: 6.9 M; espectro negro: 8 M; espectro morado: 8.6 M. **C) Espectros de scFv-h3D6 renaturalizado al dializar contra PBS.** Todas las muestras de las figuras A y B están dializadas contra PBS y todas recuperan el espectro típico del scFv-h3D6 nativo. Nota 1: el mínimo de elipticidad a 230 y la señal positiva a 237 nm se pierde completamente entre 6.9 y 8 M de urea. Nota 2: la conformación de *random coil* puro no se alcanza incluso a 8.6 M de urea.

### R3.2.2. Desnaturalización química seguida por fluorescencia de Trp

Es conocido que la intensidad de los espectros de emisión de los residuos Trp puede aumentar o disminuir durante el proceso de desplegamiento dependiendo del entorno hidrofóbico del residuo en cuestión. Por ello, para proteínas con más de un residuo Trp en su estructura se pueden dar compensaciones que hacen que el seguimiento de la desnaturalización mediante la intensidad del espectro no sea una medida real del desplegamiento (Jager y Pluckthun, 1999). Tal es el caso del scFv-h3D6, que presenta cinco residuos de triptófano, de los cuales, tres se localizan en el dominio V<sub>H</sub> (W36, W47 y W103,) y dos en el dominio V<sub>L</sub> (W35, y W89) (ver figura I19.C de la

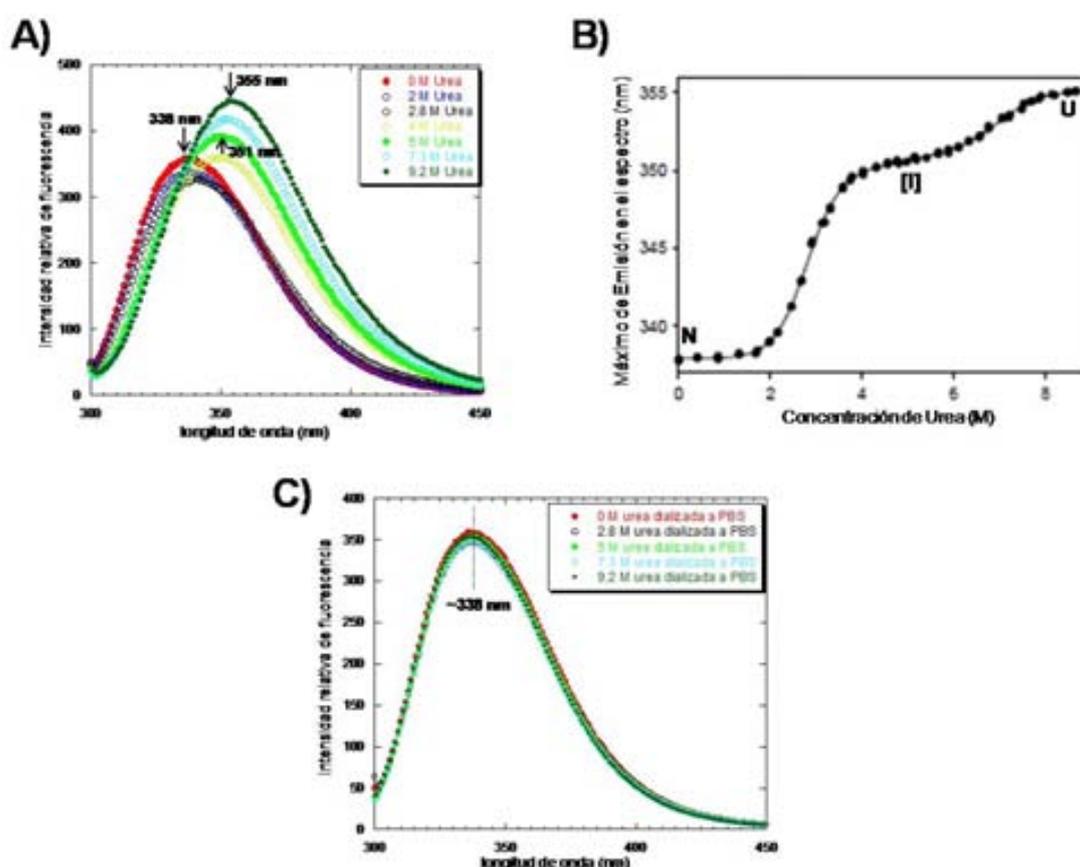
introducción), siendo los W36 y W35 los situados en el núcleo de cada dominio y localizándose los otros tres en la interficie entre ambos. Una de las alternativas al efecto descrito anteriormente para moléculas con más de un Trp, como nuestro scFv, es el seguimiento de la desnaturalización mediante el máximo de emisión en los espectros, ya que conforme la proteína se va desplegando, el máximo de emisión se va desplazando siempre en la misma dirección, hacia el rojo, hasta un máximo de 355 nm (máximo de emisión del Trp en solución acuosa, considerándose como un indicador de que la proteína se encuentra totalmente desplegada) (Jager y Pluckthun, 1999). Por tanto, esta aproximación fue la elegida para el seguimiento de la desnaturalización química del scFv-h3D6.

En la figura R16.A se puede apreciar tanto el efecto de la intensidad de fluorescencia en los espectros, descrito anteriormente, como el desplazamiento hacia el rojo del máximo de emisión hasta los 355 nm. Efectivamente, la intensidad del espectro de emisión disminuyó desde el estado nativo hasta llegar a valores sobre el 3-4 M de urea y, a partir de ahí aumentó hasta llegar al estado desnaturalizado. En cambio, el desplazamiento del máximo hacia el rojo fue progresivo y nos permitió afirmar que la estructura terciaria se ha perdido completamente al final de la desnaturalización.

Al analizar la curva de desnaturalización, podemos visualizar que durante el proceso global de desplegamiento, ocurre un desplazamiento hacia el rojo de 17 nm del máximo de emisión, y que la desnaturalización completa de la molécula comprende dos transiciones, pasando por tres estados: nativo, intermediario de plegamiento y desplegado. La primera transición ocurre en la región de 0-4 M de urea con un desplazamiento de 13 nm hacia el rojo, presentando un *plateau* a ~351 nm que es indicativo de la existencia de un estado intermediario en la vía de plegamiento que es metaestable en el rango de concentraciones 4-6 M urea. La segunda transición ocurre en la región de 6-8 M urea con un desplazamiento de 4 nm hacia el rojo, presentando un *plateau* a 355 nm que corresponde a un estado completamente desplegado de la proteína.

Los parámetros termodinámicos de la curva de desnaturalización en equilibrio, fueron obtenidos considerando el proceso de desnaturalización tanto de manera global (0-9 M urea) mediante un modelo matemático de tres estados, como de manera parcial tratando individualmente las dos transiciones (de 0-5.5 M de urea y de 5-9.2 M de urea) con un modelo matemático de dos estados (ambos descritos en el apartado M3.2.1.3 de los materiales y métodos). Señalar, que los parámetros termodinámicos obtenidos tanto con el modelo de tres estados como el de dos estados, son similares. Como podemos ver en la tabla R2, la primera transición corresponde al desplegamiento del dominio menos estable (aunque la ruptura de la interficie también contribuye a esta

transición). La energía libre del desplegamiento de este dominio ( $\Delta G_{I-N}$ ), junto con la ruptura de la interficie, es de  $19.3 \pm 0.7 \text{ KJ mol}^{-1}$ . El valor de la urea media,  $[D]_{50\%}$ , que es la concentración de urea a la cual la mitad de las moléculas se encuentran desplegadas, es de 2.8 M. El valor de la pendiente  $m_{I-N}$ , que refleja la diferencia de accesibilidad al solvente entre el estado nativo y el estado intermediario, es de  $7.0 \pm 0.3 \text{ KJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ; este valor es similar a valores de  $m$  publicados para dominios de tamaños similares y plegados correctamente (Myers y col., 1995). La segunda transición corresponde al desplegamiento del dominio más estable, presente en el estado intermediario. La energía libre del desplegamiento de este dominio ( $\Delta G_{U-I}$ ) es de  $36.9 \pm 5.7 \text{ KJ mol}^{-1}$ . El valor  $m_{U-I}$ , que indica la diferencia de accesibilidad al solvente entre el estado intermediario y el estado desplegado, es de  $5.2 \pm 0.8 \text{ KJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$  y el valor de  $[D]_{50\%}$  es de 7.1 M.



**Figura R16. Desnaturalización química del scFv-h3D6 nativo seguida mediante fluorescencia de Trp. A) Espectros a diferentes concentraciones de urea (0-9 M).** Espectro rojo: 0 M; espectro azul: 2 M; espectro negro: 2.8 M; espectro verde claro: 4 M; espectro verde: 5 M; espectro celeste: 7.3 M; espectro verde oscuro: 9.2 M. **B) Curva de desnaturalización química con urea.** La desnaturalización química del scFv-h3D6 presenta tres estados de desplegamiento: N= nativo (máximo de emisión, 338 nm), [I]= intermediario de desplegamiento (máximo de emisión, ~351 nm) y U= desplegado (máximo de emisión, 355 nm). El desplazamiento global del máximo de emisión en todo el proceso de desplegamiento es de 17 nm. **C) Espectros de scFv-h3D6 renaturalizado al dializar contra PBS.** Todas las muestras cuyo espectro se muestra en la figura A están dializadas ON contra PBS y todas recuperan el espectro típico del scFv-h3D6 nativo.

**Tabla R2. Ajuste de la curva de desnaturalización química en el equilibrio del scFv-h3D6 WT, mediante un modelo matemático de tres y dos estados.** El ajuste mediante el modelo de tres estados, maneja el proceso de manera global (0-9.2 M urea). El ajuste mediante el modelo de dos estados, maneja el proceso de manera parcial, tratando individualmente las dos transiciones (0-5.5 M de urea y 5-9.2 M de urea). Las unidades de  $\Delta G$  están dadas en  $\text{KJ mol}^{-1}$ ; para  $m$  en  $\text{KJ mol}^{-1} \text{M}^{-1}$ . N= estado nativo; I= estado intermediario; U= estado desplegado; [D] entre estados= 50% de desnaturalizante en Molar.

Parámetros Modelo matemático	Primera transición			Segunda transición		
	$\Delta G_{I-N}$	$[D]_{I-N}$	$m_{I-N}$	$\Delta G_{U-I}$	$[D]_{U-I}$	$m_{U-I}$
Tres estados	$19.3 \pm 0.7$	2.76	$7.0 \pm 0.3$	$36.9 \pm 5.7$	7.10	$5.2 \pm 0.8$
Dos estados	$19.7 \pm 0.7$	2.78	$7.1 \pm 0.3$	$32.0 \pm 4.2$	7.11	$4.5 \pm 0.6$

### R3.3. Caracterización de los intermediarios químicos y térmicos del scFv-h3D6 mediante proteólisis con termolisina

Una proteína plegada que carece de regiones desestructuradas no es un buen sustrato para las proteasas, debido a que los enlaces peptídicos están protegidos por el plegamiento de la molécula. En cambio, cuando la proteína se encuentra desplegada, ya sea local o globalmente, las proteasas pueden digerir eficientemente los enlaces peptídicos expuestos. Por tanto, la susceptibilidad proteolítica de una proteína es altamente sensible a los cambios de su conformación. La técnica conocida como proteólisis limitada, es un método para determinar la fracción de proteína plegada bajo una determinada condición, aprovechando las diferencias en la susceptibilidad proteolítica entre proteínas plegadas y desplegadas, resultando efectivo en la distinción de conformaciones de los estados desplegados de los plegados (Park y Marqusee, 2005; Na y Park, 2008). Señalar que la termolisina (TL) es una proteasa termoestable (actividad incluso a los 80°C) que tiene preferencia para hidrolizar el enlace peptídico de residuos hidrofóbicos expuestos, específicamente Phe, Leu, Ile, Val, en un rango de pH de 5.5 a 9 y con actividad remanente en presencia de altas concentraciones de agentes caotrópicos, tales como un 8 M de urea. La TL presenta inhibición por EDTA, además de que el ion  $\text{Ca}^{+2}$  es esencial para su actividad (Minde y col., 2012). Con el fin de caracterizar los intermediarios presentes en la desnaturalización química y la desnaturalización térmica (que teóricamente son diferentes ya que pertenecen a embudos paralelos, el de plegamiento y el de agregación, respectivamente), se realizó el seguimiento de la proteólisis con termolisina.

Como se menciona en el apartado anterior, el estado intermediario de desplegamiento en equilibrio en urea, comprende la región de 4-6 M urea. De tal forma que la proteólisis con termolisina fue efectuada a 5 M de urea, tanto a 25°C como a 37°C.

En la figura R17.A, podemos observar que para la proteólisis efectuada a 25°C en los primeros 10 min se digirió ~60% de la proteína inicial, apreciándose un característico perfil proteolítico. A partir de las 2 h fue posible apreciar casi una total desaparición de la banda de 26 kDa, que corresponde a la proteína completa, dando lugar a la acumulación de una banda principal de ~17 kDa, que incluso se mantuvo a las 24 h de iniciado el proceso proteolítico.

De igual forma en la figura R17.B, podemos visualizar la proteólisis efectuada a 37°C, y lo que se observa es que después de los primeros 10 min cerca de ~80% de la proteína fue digerida, bastando tan solo 30 min de proteólisis para que la banda de los 26 kDa desapareciera y, como es de esperar, se originó un característico perfil de proteólisis. A partir de la primera hora del proceso proteolítico se produjo la acumulación de la banda principal de ~17 kDa, que desapareció casi en su totalidad a las 32 h de iniciada la digestión. La banda principal de ~17 kDa que se acumuló tanto en la proteólisis a 25°C como a 37°C, fue transferida a una membrana PVDF e identificada mediante secuenciación N-terminal. La secuencia N-terminal obtenida fue la secuencia inicial del dominio  $V_H$  (GAMEVQ), quedando evidenciada la mayor estabilidad de este dominio. Además una espectrometría de masas MALDITOF nos permitió conocer que la masa exacta de la banda resistente a proteólisis era de 17,155.3 m/z, comprendiendo el dominio  $V_H$  (13.13 kDa) mas la región del conector flexible (0.96 kDa) y una pequeña parte del dominio  $V_L$  (3.01 kDa: FR1 y la mitad del CDR1; plausiblemente finalizando en el residuo  $V_L$ -L27B, según numeración Kabat [Wu y Kabat 1970; Kabat y col., 1987; Johnson y Wu, 2001]).

La resistencia a proteólisis de las cadenas- $\beta$  A y B del dominio  $V_L$ , en el estado intermediario, podría deberse al hecho de que estas dos cadenas- $\beta$  forman una larga horquilla- $\beta$  (figura R17.C-D).

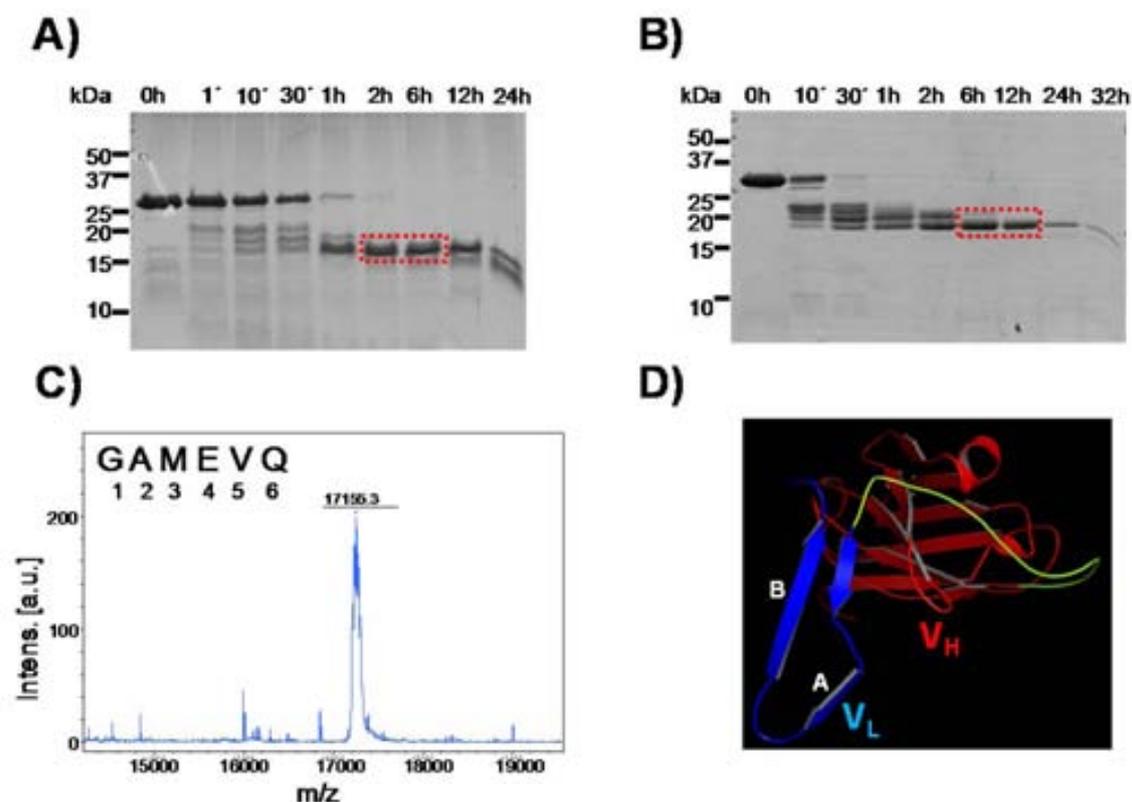
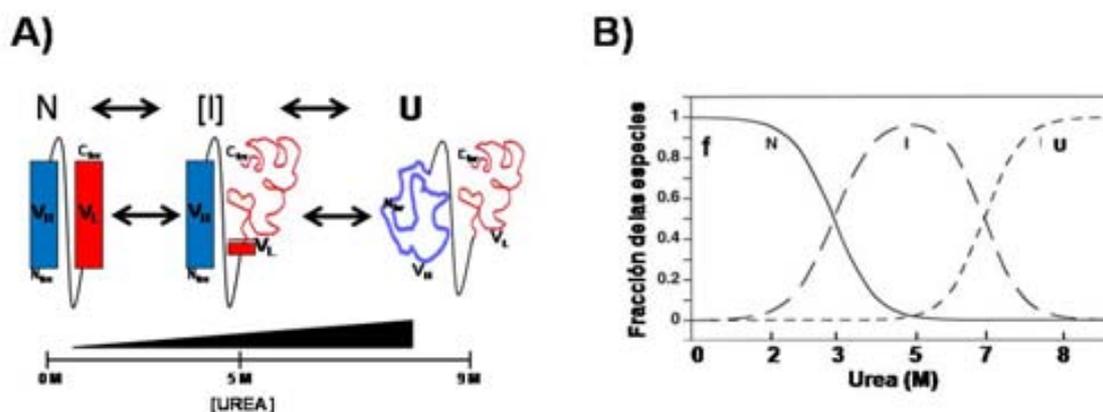


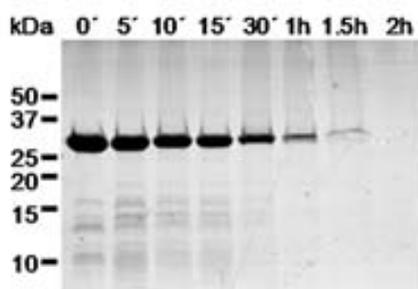
Figura R17. Caracterización del intermediario de la vía de plegamiento mediante proteólisis limitada con termolisina a 5 M urea. A) Análisis SDS-PAGE de la proteólisis a 25°C. B) Análisis SDS-PAGE de la proteólisis a 37°C. C) Análisis MALDI-TOF y secuenciación N-terminal de la banda resistente a la proteólisis. La principal banda acumulada (cuadro rojo discontinuo en figura A y B) presenta una masa de 17,155.316 m/z y una secuencia N-terminal correspondiente al inicio de la secuencia del dominio V<sub>H</sub> (GAMEVQ). D) Representación tridimensional de la región del intermediario de desplegamiento químico resistente a la proteólisis. Dominio V<sub>H</sub>: rojo; conector flexible: verde limón; fragmento del dominio V<sub>L</sub> resistente a proteólisis: azul. Las cadenas-β A y B, del dominio V<sub>L</sub> forman una horquilla-β resistente a proteólisis.

Recapitulando toda esta información, se llegó a la conclusión que el estado intermediario que se acumula a 5 M en la curva de desnaturalización, consiste en el dominio  $V_L$  desplegado y el dominio  $V_H$  plegado (figura R18); sugiriendo que el dominio  $V_L$  es el blanco adecuado para un rediseño de estabilidad termodinámica.



**Figura R18. Análisis de la curva de desnaturalización con urea. A) Esquema del proceso de desplegamiento de los dominios  $V_H$  y  $V_L$ .** El proceso global de la desnaturalización del scFv-h3D6 incluye el desplegamiento diferencial de acuerdo a las estabilidades termodinámicas de los dominios  $V_H$  y  $V_L$ . **B) Especies presentes durante la curva de desnaturalización.** La especie nativa inicial (N) da lugar a partir del 2 M de urea a la formación de la especie intermediaria (I), cuya máxima acumulación ocurre en torno a los 5 M de urea; dicha especie consiste en el dominio  $V_L$  desplegado y el dominio  $V_H$  plegado. Al final de la curva de desnaturalización prevalece la especie desplegada (U).

Por otro lado, el estado intermediario resultante de la reorganización de las hojas- $\beta$  en la agregación térmica (descrito en los apartados R3.1.2 y R3.1.3), fue también caracterizado mediante proteólisis limitada con termolisina; para ello, el scFv-h3D6 fue preincubado durante 15 min a 60°C. Como podemos ver en la figura R19, durante todo el proceso proteolítico no se generó la acumulación de alguna banda principal, siendo la proteína completamente proteolizada transcurrida las 2 h. Esto indica que el intermediario térmico, que es el precursor de la vía de agregación WL, presenta una conformación global donde ambos dominios ( $V_H$  y  $V_L$ ) son igualmente susceptibles a la digestión.



**Figura R19. Análisis SDS-PAGE de la proteólisis del intermediario de la vía de agregación.** El scFv-h3D6 es preincubado durante 15 min a 60°C y proteolizado completamente con termolisina a las 2 h del proceso, sin acumulación de bandas resistentes a la proteólisis.

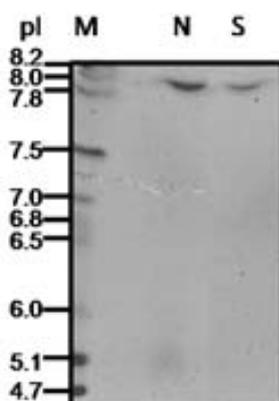
### R3.4. Determinación del coeficiente de extinción molar

La secuencia del scFv-h3D6 contiene 5 Trp, 13 Tyr y 2 Cistinas, por lo que el coeficiente de extinción molar teórico ( $\epsilon_{\text{teórico}}$ ) es de  $45330 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , que expresado al 0.1% (1 mg/mL) corresponde a 1.7 (ver apartado M3.2.4 de materiales y métodos).

La proteína madura nativa, fue dividida en 2 y diluida 1:5, con agua o con Gdn-HCl 8 M (en agua), para medir la absorbancia en estado nativo y estado desnaturalizado respectivamente, obteniéndose valores de 0.59 y 0.65 respectivamente; por lo que el coeficiente extinción molar experimental ( $\epsilon_{\text{experimental}}$ ) expresado al 0.1% (1 mg/mL) corresponde a 1.5.

### R3.5. Punto isoeléctrico (pI)

Como podemos ver en la figura R20, el valor del pI experimental encontrado para el scFv-h3D6 nativo gira en torno al valor de 7.9, estando en concordancia con un análisis bioinformático realizado en el servidor online *EXPASY*, que nos arrojó un valor de punto isoeléctrico (pI) teórico de 8.3. Además no se encontraron diferencias significativas entre el pI de la proteína nativa con respecto a la mezcla *scrambled* obtenida en la separación CEx, posiblemente porque las diferencias de pI entre estas especies y la proteína nativa son tan pequeñas, que no es posible distinguir las en el rango de separación superior del gel utilizado (preCasting, Biorad).



**Figura R20. Electroisoelectrofoque (IEF) del scFv-h3D6.** El *pool* nativo (N) y el *pool* de mezcla *scrambled* (S) que se obtiene durante la separación de CEx son analizados mediante IEF en geles prefabricados con un gradiente de pH. El valor del pI de las dos muestras se encuentran en torno al valor de 7.9. No se encuentran diferencias significativas entre el pI de la proteína nativa con respecto a la mezcla *scrambled*. El proceso electroforético ocurre en tres voltajes escalonados (100-250-500 V). El estándar (M) de IEF cubre un rango de pI de 4.5-9.6.

### R3.6. Ensayo ThermoFluor para la optimización de tampones

Thermofluor es una técnica, que mediante una lectura de fluorescencia en un barrido de temperatura, nos permite analizar en términos de  $T_m$  (*temperature melting*: temperatura de fusión) la estabilidad de una proteína bajo diferentes condiciones, tales como la concentración de iones en solución, el pH o factores adicionales que pueden afectar la estabilidad proteica. Sin embargo, es importante mencionar que en el caso del scFv-h3D6 sabemos que la desnaturalización térmica lleva a la agregación y que, aunque tendencia a la agregación y estabilidad no están siempre directamente relacionadas (Cerdà-Costa y col., 2007), sí que es cierto que la tendencia a la agregación puede considerarse una medida indirecta de la estabilidad, tal y como observamos en las desnaturalizaciones térmicas de fracciones nativas *versus* fracciones *scrambled* (apartado R3.1).

Como podemos observar en la tabla R3, el pH bajo el cual la proteína presentó una menor tendencia a la agregación comprende un rango de 6-8 y una concentración de NaCl en un rango de 129 mM-300 mM. Es curioso observar que la menor tendencia a la agregación presentada por la proteína, fue obtenida a un pH de 8 y a 257 mM de NaCl, a pesar de estar prácticamente en el pI. De igual forma, el tampón de digestión con TEV se encuentra a un pH de 8.3 y posteriormente de ser procesada la proteína no sufrió precipitación isoeléctrica. El hecho de, ya no solo mantener, sino mostrar la menor tendencia a la agregación a un pH cercano al pI indica que la distribución de las cargas no es homogénea; esta hipótesis se ve corroborada con la necesidad de una cierta fuerza iónica para mantener un plegamiento óptimo. Por ello, para el almacenamiento, la caracterización termodinámica y los estudios funcionales del scFv-h3D6, el tampón PBS, presenta las características adecuadas para mantener la mayor estabilidad de la proteína, ya que cuenta con una buena fuerza iónica, debida tanto al uso del tampón fosfato como a una concentración de NaCl de 140 mM, a pH 7.4, además de ser considerado el tampón fisiológico por excelencia.

**Tabla R3. Valores de  $T_m$  obtenidos bajo diferentes condiciones de pH y concentración de NaCl.** Escrutinio en un rango de valores de pH de 2-12 y de un rango de concentración de NaCl de 0-300 M. El scFv-h3D6 presenta una menor tendencia a la agregación en un rango de pH de 6-8 y a una concentración de NaCl en un rango de 129 mM-300 mM.

		pH										
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
[mM NaCl]	0	33	43	49	50	50	50	50	54	52	47	40
	43	33	43	51	53	51	51	51	51	52	46	40
	86	33	43	51	53	52	51	53	53	52	46	40
	129	33	53	50	53	54	54	54	50	52	46	41
	172	33	51	51	54	54	54	56	52	53	48	41
	214	33	43	50	55	54	55	56	54	52	46	43
	257	33	43	50	54	54	56	58	54	54	49	43
	300	33	43	50	54	56	55	55	55	54	46	49

#### **R4. Efecto del tratamiento con scFv-h3D6 en un modelo murino triple transgénico de la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD)**

El scFv-h3D6 desarrollado por nuestro equipo ha mostrado su efectividad *in vitro* en células de neuroblastoma SY5H-SY (Marin-Argany y col., 2011), al revertir el efecto citotóxico de los oligómeros A $\beta$  en un relación equimolar (figura A3, de anexos). En el mismo estudio, se describe y demuestra que dicho efecto se debe a que el scFv-h3D6 desvía la ruta de agregación amiloide del péptido A $\beta$  hacia la ruta no citotóxica de agregación WL al formar el complejo scFv-h3D6:A $\beta$ <sub>1-42</sub>, previniendo la formación de oligómeros de A $\beta$  citotóxicos (figura A4, de anexos).

Es por ello que nos dispusimos a evaluar el efecto del scFv-h3D6 a nivel conductual y molecular *in vivo*, en un modelo murino triple transgénico de la enfermedad de Alzheimer (3xTg-AD) (Oddo y col., 2003) con la colaboración de la Dra. Lydia Gimenez LLort (UAB); que dispone de una colonia bien caracterizada de dichos animales (Gimenez-Llort y col., 2007), así como de ratones no transgénicos (NTg) con el mismo fondo genético. Tanto los ratones 3xTg-AD como los NTg fueron inyectados intraperitonealmente con una única dosis de 85  $\mu$ g del scFv-h3D6, o del tampón vehículo PBS a modo de control negativo.

Es importante remarcar que las posibles trazas de los lipopolisacáridos (LPS), principales endotoxinas de las bacterias gram negativas y con capacidad de inducir una respuesta celular, fueron eliminados antes del tratamiento mediante cromatografía de afinidad (Marin-Argany, 2013).

##### **R4.1. Efecto del tratamiento a nivel conductual**

La Dra. Gimenez-Llort, realizó una serie de pruebas conductuales durante 5 días. Inicialmente, se analizaron los síntomas *BPSD-like* (no cognitivos) mediante el *corner* y el *open-field test*, para proceder a continuación a evaluar el efecto del tratamiento en el declive cognitivo característico de la AD mediante la cuantificación indirecta de la memoria y aprendizaje espacial en el laberinto acuático de Morris (MWM: *Morris Water Maze*). Inicialmente, el grupo 3xTg-AD (n=15) mostró ansiedad y miedo (Gimenez-Llort y col., 2013). El grupo se dividió en dos para realizar el tratamiento con scFv-h3D6 (tratado, n=8, no tratado, n=7) y se pudo observar una mejora cognitiva tanto en la memoria a corto como a largo plazo, así como la recuperación del patrón de natación desde un estado hiperactivo (Gimenez-Llort y col., 2013).

## **R4.2. Efecto del tratamiento a nivel molecular**

Posteriormente a las pruebas conductuales, se sacrificaron los animales y se seccionaron las áreas cerebrales de hipocampo (HC), córtex (CX), bulbo olfatorio (OB) y cerebelo (CR). Dichas áreas fueron fraccionadas, como se señala en el apartado M4.4.1 de materiales y métodos, y analizadas tanto para las especies A $\beta$  (mediante un ensayo tipo *western-blot*, WB) como para las apolipoproteínas apoJ (clusterina) y apoE (mediante un ensayo tipo ELISA).

### **R4.2.1. Efecto del scFv-h3D6 en el perfil oligomérico de A $\beta$ *in vivo***

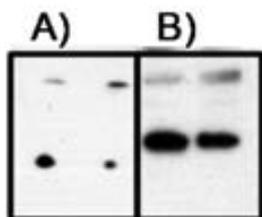
Recientemente se han dado evidencias que sugieren a los oligómeros solubles del péptido A $\beta$  como los principales responsables de la pérdida de sinapsis y el daño neuronal, con el consecuente deterioro cognitivo característico de la enfermedad de Alzheimer (Walsh y Selkoe, 2007; Klein, 2013). Dicho péptido puede presentar un diverso rango de oligomerización, comprendiendo especies de bajo peso molecular (LMW: dímeros y trímeros), especies de mediano peso molecular (MMW: hexámeros, nonámeros y dodecámeros), así como protofibrillas y fibras (Larson y Lesné, 2012). El anticuerpo completo del cual deriva nuestra molécula (mAb-h3D6.v2) tiene afinidad por los oligómeros de A $\beta$  solubles de hasta 5-6 *mer* (Jacobson, 2006), por lo que se espera que el tratamiento con el scFv modifique el perfil oligomérico de A $\beta$  encontrados en este modelo murino.

Dada la naturaleza de las muestras se utilizó un protocolo especial, el cual se tuvo que estandarizar para permitirnos, de manera reproducible y fiable, visualizar molecularmente los efectos del scFv-h3D6 en los perfiles oligoméricos de A $\beta$  en distintos extractos de diversas áreas del cerebro.

#### **R4.2.1.1. Estandarización del método de electrotransferencia e inmunodetección tipo *western-blot* (WB)**

Para estandarizar la técnica se utilizaron muestras de fracciones TBS extracelular del córtex (CX) de cinco ratones 3xTgAD hembras de 7 meses de edad no tratados, proporcionados por la Dra. Lydia Giménez-Llort. Estas muestras teóricamente presentan el péptido A $\beta$  en diferentes formas de oligomerización. Primeramente se realizó un ensayo WB siguiendo un protocolo canónico (ver apartado M3.1.3 de materiales y métodos), utilizando como anticuerpo primario el 6E10, anticuerpo monoclonal que reconoce todas las formas A $\beta$ .

La señal que se obtenía de los WB fue de tipo *spots* irregulares (redondeados), por lo que se realizó un tratamiento post-transferencia a la membrana, el cual consistió en calentarla a ebullición durante 7 min. El uso del tratamiento nos permitió mejorar notablemente la señal, siendo ésta de tipo banda definida, tal como se puede apreciar en la figura R21. Esto es porque el tratamiento térmico permite que en la membrana se exponga de mejor manera el epítipo de las especies A $\beta$  al anticuerpo 6E10 (Wiltfang y col., 1997; Klafki y col., 1996).

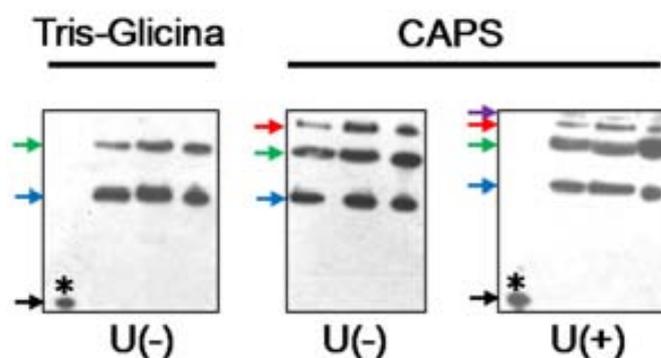


**Figura R21.** Señal de especies A $\beta$  presentes en CX de animales 3xTg-AD de 7 meses de edad. A) Sin tratamiento de ebullición a la membrana. B) Con tratamiento de ebullición a la membrana. La membrana se calienta a ebullición por 7 minutos. Título del anticuerpo 6E10, 1:500.

El hecho de tener especies A $\beta$  de distintos tamaños nos planteaba un problema, ya que posiblemente no todas las especies se transferían de igual forma a la membrana, considerándose que las especies A $\beta$  de menor tamaño (monómeros, dímeros o trímeros) lo hacían más rápido que las de mayor tamaño. Por lo que tuvimos que asegurarnos de que todas las especies oligoméricas presentes en la muestra se transferían a la membrana, siendo este uno de los puntos más críticos de la técnica. Para esto se utilizó una membrana de un tamaño de poro de 0.2  $\mu$ m (Inmobilon®-PSQ, Millipore) y se ensayó con un tampón de transferencia que contiene CAPS (10 mM). Es así que se probaron dos tipos de tampones de transferencia, el canónico Tris-Glicina y CAPS. La figura R22 presenta eventos de transferencia de una misma muestra (CX) usando estos dos tampones para poder compararlos y, cómo podemos observar, aunque el tampón Tris-Glicina transfirió las especies monoméricas, nonaméricas y dodecaméricas; el uso de CAPS como tampón de transferencia mejoró la homogeneidad de dicho evento, ya que además de las especies oligoméricas anteriormente mencionadas permitió transferir la APP, lográndose una mejor representatividad de las poblaciones oligoméricas presentes en la muestra.

Encontrar la especie monomérica del péptido sintético A $\beta_{1-42}$  transfiriéndose junto a oligómeros de A $\beta$  de mayor tamaño de las muestras, nos indicó una adecuada homogeneidad de transferencia independiente del tamaño. Dímeros del péptido A $\beta$  han sido reportados y asociados con una fuerte citotoxicidad presente en la

enfermedad de Alzheimer (Kawarabayaashi y col., 2004; Shankar y col., 2008, 2009; McDonald y col., 2010), por lo que la ausencia en las inmunodetecciones de estas especies consideradas LMW hicieron sospechar que éstas, o bien, se encontraban formando parte de un ensamblaje artefactual asociándose entre ellas o con otras proteínas originando que se visualizaran con un tamaño superior; o bien que sencillamente no estuvieran presentes en la muestra o por lo menos a una concentración superior al límite inferior de detección de la técnica. Con el fin de descartar que las especies oligoméricas de mediano peso molecular (MMW), visualizadas hasta ahora, no resultaran ser una asociación artefactual de oligómeros de bajo peso molecular (LMW) que no terminan por separarse en una electroforesis SDS-PAGE normal; se realizó en la primera parte de la inmunodetección una separación electroforética SDS-PAGE con geles conteniendo 8 M de urea. Como se puede apreciar en la figura R22, los perfiles de separación con respecto a una SDS-PAGE sin urea no se alteraron, por lo que, el ensamblaje observado de las especies oligoméricas MMW se mantenía unido por puentes de hidrógeno resistentes a condiciones desnaturalizantes (urea y SDS) y no era resultado de asociaciones artefactuales (Lesne y col., 2006).



**Figura R22. Señal de especies A $\beta$  presentes en CX de animales 3xTg-AD de 7 meses de edad.** Se utilizan dos tipos de tampones de transferencia: Tris-Glicina y CAPS. Geles SDS-PAGE sin urea: U(-); geles SDS-PAGE con urea: U(+). Las flechas indican las especies A $\beta$  detectadas: 12 *mer* (verde), 9 *mer* (azul) y 1 *mer* (negra), así como sAPP $\alpha$  (morada) y sAPP $\beta$  (roja). En el primer carril marcado con (\*) se trata del péptido sintético A $\beta$ <sub>1-42</sub> monomérico. Todas las muestras corresponden a la fracción TBS del córtex de ratones hembra 3xTg-AD de 7 meses de edad. La carga de proteína total es de 45  $\mu$ g para cada carril. Título del anticuerpo 6E10, 1:500.

También se evaluó el título del anticuerpo, partiendo del título del límite superior propuesto por la casa comercial del anticuerpo (Signet, Covance) que es de 1:1000 y se encontró mediante una curva estándar del péptido sintético A $\beta$ <sub>1-42</sub>, una sensibilidad de hasta 15 ng y una linealidad de hasta 45 ng, aunque la relación señal-concentración fue todavía buena hasta los 100 ng, concentración donde la señal se

saturó (figura R23.A). Al aumentar el título del anticuerpo hasta 1:350 se logró mejorar la sensibilidad hasta 3 ng y una linealidad hasta 30 ng (Figura R23.B-C) y se visualizó que la señal proporcionada por las muestras de CX de ratones de 7 meses en las distintas fracciones TBS, Tritón y SDS se encontraba comprendida en dicho rango de linealidad (figura R23.C).

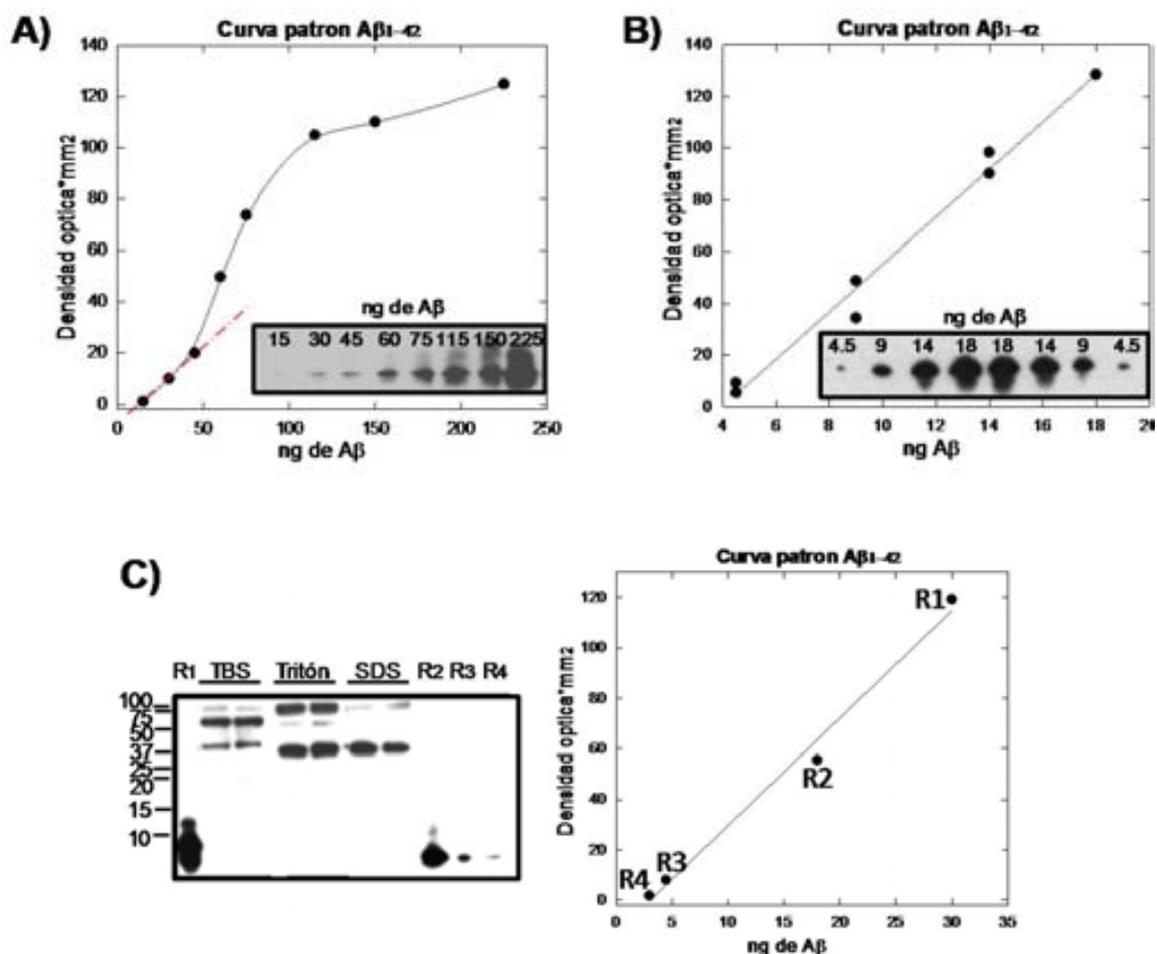


Figura R23. Curvas patrón con el péptido sintético Aβ<sub>1-42</sub>. A) Curva estándar del péptido sintético Aβ<sub>1-42</sub> en un rango de 15-225 ng. Anticuerpo 6E10, 1:1000. B) Curva estándar del péptido sintético Aβ<sub>1-42</sub> en un rango de 4.5-18 ng. Anticuerpo 6E10, 1:350. C) Señal de las muestras de distintas fracciones TBS, Tritón y SDS. Se carga en cada pocillo 45 µg de proteína total dentro de un rango lineal de detección en la curva estándar del péptido sintético Aβ<sub>1-42</sub>, donde R1: 30 ng; R2: 18 ng; R3: 4.5 ng y R4: 3 ng. Anticuerpo 6E10, 1:350.

#### **R4.2.1.2. Análisis del perfil de agregación del péptido A $\beta$ *in vivo* y efecto del scFv-h3D6**

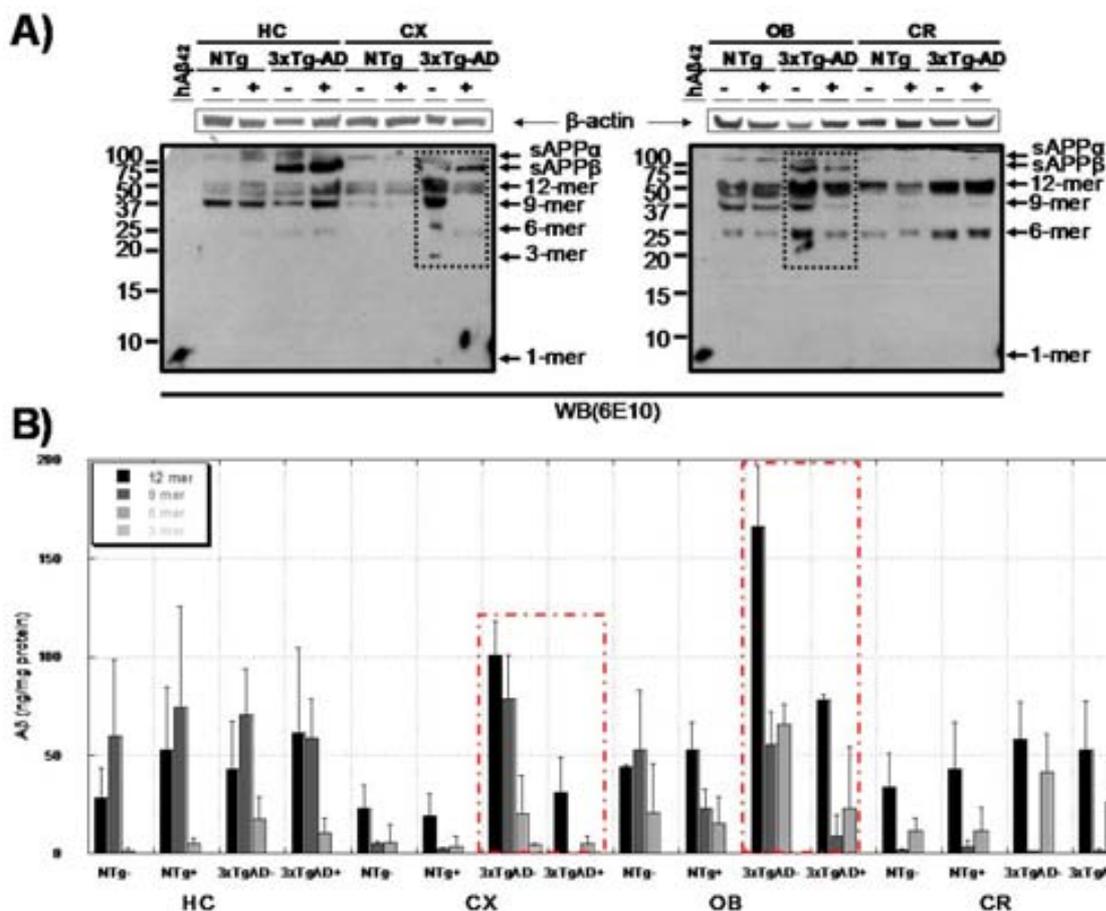
Una vez estandarizada la técnica se evaluó el efecto del scFv-h3D6 en ratones hembras 3xTg-AD de 5 meses de edad (etapa temprana de la enfermedad de Alzheimer), así mismo a modo de control se utilizaron ratones no transgénicos (NTg) de la misma edad.

Mediante un análisis tipo *western-blot*, lo que se encontró de manera general en las diferentes fracciones (TBS, Tritón y SDS) fue la presencia de múltiplos de oligómeros triméricos (dodecámeros, nonámeros, hexámeros y trímeros), no así de especies diméricas, a pesar de que el anticuerpo utilizado 6E10 es capaz de detectar todas las formas de A $\beta$ . Adicionalmente también se detectó la presencia de APP. De hecho, aunque en menor grado, también se detectaron estos múltiplos triméricos en extractos de ratones NTg, posiblemente por una expresión basal del metabolismo neuronal junto a alguna reactividad cruzada del mAb 6E10, ya que existen antecedentes de que en modelos no transgénicos y en pacientes no enfermos de AD también se visualizan, aunque sea a niveles inferiores, dichas especies (Ma y col., 2007; Larson y Lesné, 2012).

Se realizaron 3 ensayos tipo *western-blot* que posteriormente fueron promediados con fines cuantitativos, de tal forma que, en la figura R24.A se muestra de manera representativa un *blot* donde se visualiza la detección de oligómeros de A $\beta$  solubles y de sAPP presentes en extractos extracelulares (fracción TBS). En primer lugar es destacable que la APP de los grupos NTg tiene mayor peso molecular que la detectada en los grupos 3xTg-AD, lo cual concuerda con la formación de la sAPP $\alpha$  en los grupos NTg (vía no amiloidogénica) y la sAPP $\beta$  en los grupos 3xTg-AD (vía amiloidogénica). Al comparar cuantitativamente (figura R24.B) el perfil de los oligómeros de A $\beta$  en ratones transgénicos 3xTg-AD con respecto a los ratones NTg (sin tratamiento), lo que se encontró fue un incremento significativo en los niveles de especies oligoméricas de A $\beta$  en extractos de córtex y bulbo olfatorio, por lo que estos tejidos podrían ser considerados como los blancos de acción del tratamiento. Particularmente, en el caso de especies dodecaméricas en CX el incremento fue de 4 veces, y en OB de 3 veces. En el caso de las especies nonaméricas en CX dicho incremento fue de 15 veces y en OB de 2 veces. Para las especies hexaméricas se incrementó 3 veces tanto en CX como en OB. Los niveles alcanzados en estos tejidos pueden considerarse como los niveles patológicos en hembras 3xTg-AD de 5 meses de edad, ya que muestran síntomas de demencia y deterioro cognitivo (R4.1.). Estos incrementos no se observaron de manera significativa en los extractos de hipocampo y cerebelo. Las especies triméricas fueron visualizadas únicamente en el córtex de

ratones 3xTg-AD sin tratar, mientras que el resto de especies fueron observadas en todas las áreas. Adicionalmente se detectó la presencia de APP en todos los extractos menos en el proveniente de cerebelo.

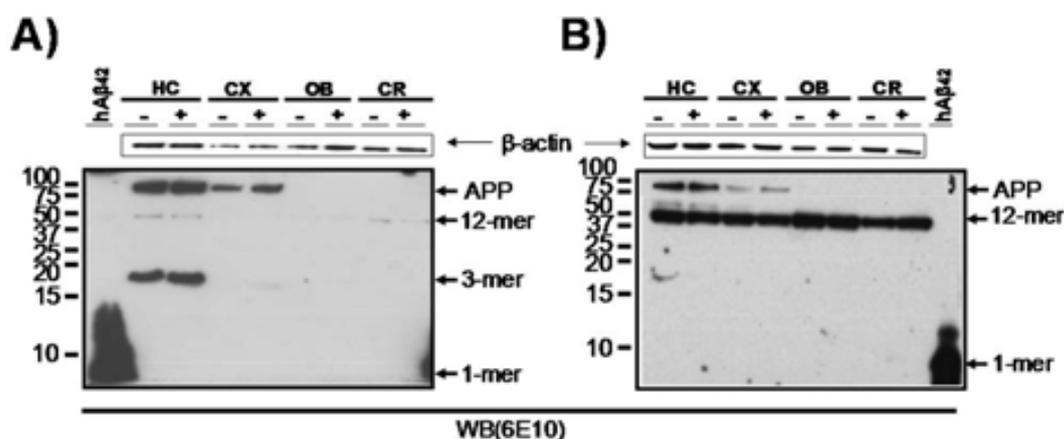
Así mismo, en los recuadros discontinuos de la misma figura R24.A se puede apreciar el efecto del tratamiento en el perfil de oligomerización del péptido A $\beta$ . El perfil de agregación se vió modificado en precisamente aquellas áreas cerebrales de los ratones 3xTg-AD que fueron señaladas anteriormente como los blancos de acción del tratamiento; en contraste con las correspondientes a ratones NTg, donde no se apreciaron cambios significativos. En el córtex y bulbo olfatorio de ratones 3xTg-AD tratados, ocurrió una significativa disminución de especies de A $\beta$  dodecaméricas, nonaméricas y hexaméricas hasta niveles considerados como no patológicos (similares a los presentados por las muestras de ratones NTg); de hecho, las especies trimérica y nonamérica detectadas en el córtex no tratado desaparecieron totalmente. El hipocampo y el cerebelo no presentaron variación significativa en el perfil oligomérico de A $\beta$ . Adicionalmente, aunque la APP fue detectado en la fracción TBS de todos los tejidos de ratones 3xTg-AD, con la excepción del cerebelo, ésta no se vió alterada por el tratamiento con scFv-h3D6.



**Figure R24. Inmunodetección y semicuantificación de los oligómeros solubles de los extractos extracelulares de hembras no transgénicas (NTg) y triple transgénicas (3xTg-AD) de 5 meses de edad.** Se analizan los extractos extracelulares de diferentes regiones cerebrales (HC, hipocampo; CX, córtex; OB, bulbo olfatorio y CR, cerebelo) de animales tratados intraperitonealmente (I.P.) con 85  $\mu$ g de scFv-h3D6 (+) y tratados I.P. con PBS (-). No se observan cambios en el perfil de agregación del péptido A $\beta$  en el grupo NTg tratado. **A) Análisis tipo western-blot (WB).** Los perfiles de oligómeros de A $\beta$  solubles extracelulares en CX y OB muestran una clara disminución en especies de A $\beta$  trimericas, hexaméricas, nonaméricas y dodecaméricas en ratones 3xTg-AD tratados con scFv-h3D6, mientras que en HC y CR no se observan cambios significativos. Las flechas indican la posición respectiva de la migración de monómeros (1-mer), trimeros (3-mer), hexámeros (6-mer), nonámeros (9-mer), dodecámeros (12-mer), sAPP $\alpha$  y sAPP $\beta$ . El péptido sintético humano A $\beta$ <sub>1-42</sub> (hA $\beta$ <sub>42</sub>) es usado como control positivo y referencia interna: 4.5 ng (carril izquierdo). La proteína total aplicada en cada carril es de 120  $\mu$ g. **B) Semicuantificación de especies oligoméricas de A $\beta$ .** La grafica muestra el promedio de la cuantificación de especies oligoméricas de A $\beta$  solubles extracelulares de 3 experimentos WB con sus respectivas desviaciones estándar ( $\pm$  SD). El análisis es normalizado mediante la concentración de  $\beta$ -actina y semicuantificado con respecto a la señal de dos referencias internas: 4.5 y 18 ng de hA $\beta$ <sub>42</sub>. La concentración de A $\beta$  está expresada en ng/mg de proteína total.

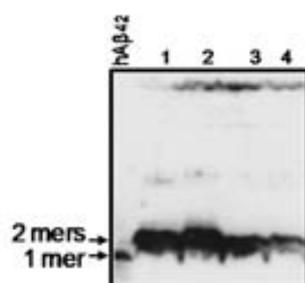
Debido a que el A $\beta$  intracelular ha sido propuesto como el responsable de los primeros síntomas conductuales observados en el modelo 3xTg-AD (Oddo y col., 2003; Billings y col., 2005; Gimenez-Llort y col., 2007; España y col., 2010), las fracciones intracelulares fueron analizadas por inmunodetección WB. Como se puede ver en la figura R25.A, aunque en la inmunodetección intracelular se detectaron APP y especies oligoméricas de A $\beta$  tales como: dodecámeros y trimeros, no se encontró un cambio significativo en el perfil de estas especies entre los grupos de ratones 3xTg-AD tratados y no tratados con el scFv-h3D6. Concretamente, la APP fue visualizada en hipocampo y córtex, así como el A $\beta$  trimérico en los extractos de hipocampo, no se detectaron especies oligoméricas de A $\beta$  hexaméricas, nonaméricas en ninguna de las muestras; adicionalmente de manera tenue se apreció la presencia de especies dodecaméricas en todas las muestras en niveles límites del rango de detección de la técnica. Fue difícil asignar la banda de APP a una variante concreta.

Resultados similares a la fracción intracelular fueron observados en las inmunodetecciones de las fracciones de proteínas asociadas a membrana (figura R25.B), donde la APP fue visualizada tanto en hipocampo como en córtex y una banda correspondiente a la especie A $\beta$  dodecamérica se presentó en todas las muestras sin variaciones significativas entre los diversos grupos.



**Figure R25. Inmunodetección de los oligómeros de A $\beta$  solubles de los extractos intracelulares y proteínas asociadas a membrana de ratones triple transgénicos de Alzheimer (3xTg-AD) de 5 meses de edad. (A)** Extractos de las fracciones intracelulares y **(B)** fracciones de proteínas asociadas a membrana de diferentes regiones cerebrales (HC, hipocampo; CX, córtex; OB, bulbo olfatorio y CR, cerebelo) de ratones triple transgénicos (3xTg-AD), tratados intraperitonealmente (I.P) con 85  $\mu$ g de scFv-h3D6 (+) y tratados I.P con PBS (-). Solamente APP y las especies A $\beta$  dodecaméricas y triméricas son detectadas en las fracciones intracelulares y, en las fracciones de proteínas asociadas a membrana solo se detecta APP y la especie A $\beta$  dodecamérica. Es difícil de interpretar a qué forma de APP corresponden ambos casos. No hay cambios en el perfil de agregación A $\beta$  en ratones 3xTg-AD bajo el tratamiento. Las flechas indican la posición respectiva de la migración de monómeros (1-mer), trimeros (3-mer), nonámeros (9-mer), dodecámeros (12-mer) y APP. El péptido sintético humano A $\beta$ <sub>1-42</sub> (hA $\beta$ <sub>42</sub>) es usado como control positivo y referencia interna: 4.5 ng (carriles laterales). La proteína total aplicada en cada carril es de 120  $\mu$ g.

Adicionalmente, con el fin de comparar el perfil A $\beta$  presentado por los ratones 3xTg-AD de temprana edad (5 meses) con perfiles de ratones envejecidos, y en colaboración con la Dra M.A. Baltrons, se realizó una inmunodetección usando muestras homogenizadas de ratones de 10 meses de edad, y lo que se encontró es un perfil oligomérico muy distinto, en el sentido de que solamente fueron detectadas, especies diméricas en todas las muestras (figura R26). Por lo que, se descartó la baja inmunoreactividad del anticuerpo por especies diméricas, sirviendo además como marco de referencia para apoyar la teoría de la no presencia de especies diméricas en la vía no fibrilar trimérica de la etapa preclínica de AD (Larson y Lesné, 2012).



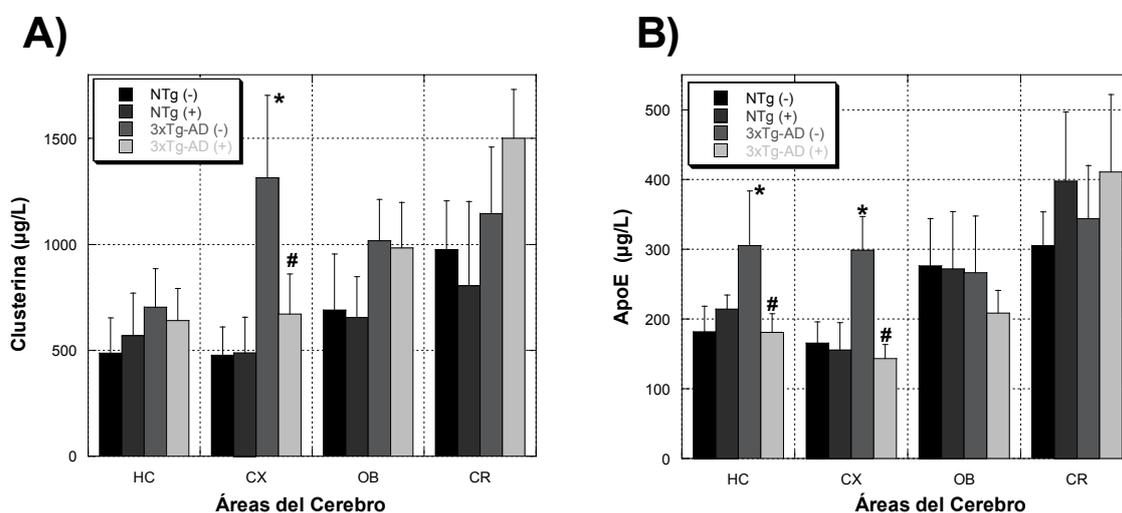
**Figure R26. Inmunodetección de los oligómeros de A $\beta$  solubles de extractos homogenados de ratones triple transgénicos de Alzheimer (3xTg-AD) de 10 meses de edad.** Se detectan únicamente especies diméricas en todas las muestras. El péptido sintético humano A $\beta$ <sub>1-42</sub> (hA $\beta$ <sub>42</sub>) es usado como control positivo y referencia interna: 4.5 ng (primer carril). La proteína total aplicada en cada carril es de 120  $\mu$ g.

#### **R4.2.2. Efecto del scFv-h3D6 sobre las concentraciones de clusterina (apoJ) y apoE en ratones 3xTg-AD**

Existen diversas evidencias que relacionan la presencia y participación de la clusterina (apoJ) y la apoE en la formación y aclaramiento de fibras A $\beta$  amiloides, siendo incluso consideradas como factores de riesgo de la enfermedad de Alzheimer (AD) (Calero y col., 2000; Narayan y col., 2011). Por tal motivo, y con el fin de tener otro marcador de evaluación en la eficacia del tratamiento con el scFv-h3D6 y poder comparar mejor los resultados obtenidos por la técnica de *western-blot*, se realizó una cuantificación de apoJ y apoE presente en la fracción TBS extracelular mediante un inmunoensayo tipo ELISA, cuyos resultados se pueden visualizar en la figura R27. Lo que observamos es que, en términos generales, los niveles de clusterina se incrementaron en prácticamente todos los tejidos de las áreas analizadas de los ratones 3xTg-AD sin tratamiento con scFv-h3D6 (-), con respecto al grupo NTg(-). Aunque hay que aclarar que este incremento, solo resultó significativo para el córtex (CX), que llegó a incrementarse hasta 2.8 veces; considerándose estos niveles como los patológicos (figura R27A).

En el caso de la cuantificación de apoE (figura R27B), lo que podemos apreciar es que en ratones 3xTg-AD(-), comparados con ratones NTg(-), no hubo diferencias significativas en los niveles presentes en los tejidos de las áreas del bulbo olfatorio (OB) y cerebelo (CR), pero si que ocurrió un incremento significativo en los niveles presentes en las áreas del córtex (CX, 1.8 veces) y del hipocampo (HC, 1.7 veces); considerándose estos niveles como patológicos. Los niveles de apoJ y apoE que presentan los ratones NTg son básicamente los más bajos por lo que pueden ser considerados como los niveles no patológicos.

Al evaluar el efecto del tratamiento con scFv-h3D6 (+) en ratones NTg, lo que pudimos notar es que no provoca diferencias significativas, con respecto a los ratones NTg no tratados (-), tanto en los niveles de apoJ como de apoE. Dado que los ratones NTg no presentan niveles patológicos, la acción del scFv fue prácticamente nula. Al evaluar el tratamiento en ratones 3xTg-AD, lo que se observó es que no hubo efectos significativos en los niveles de apoJ presentes en los tejidos de HC, OB y CR, ni de apoE presente en OB y CR. Pero si hubo un marcado efecto en los niveles de apoJ presente en CX y de apoE presente en CX e HC, justo los anteriormente considerados como tejidos blancos. Dicho efecto se observó como una disminución significativa de la concentración de apoJ y apoE hasta los niveles presentados por el grupo de ratones NTg, considerados como no patológicos.



**Figura R27. Concentración de clusterina (apoJ) y apoE en extractos extracelulares de TBS determinado mediante ELISA.** Las muestras provienen de los siguientes grupos de ratones: no transgénico sin tratamiento con scFv-h3D6 (NTg(-)); no transgénico con tratamiento (NTg(+)); triple transgénico de Alzheimer sin tratamiento (3xTg-AD(-)), triple transgénico de Alzheimer con tratamiento (3xTg-AD(+)). Las áreas del cerebro estudiadas son: hipocampo (HC), córtex (CX), bulbo olfatorio (OB) y cerebelo (CR). La barra de error muestra sus respectivas desviaciones estándar ( $\pm$  SD), con  $n=5$ . Se utilizó el método estadístico de Mann-Whitney U; \* $p<0.05$  con respecto a NTg(-); # $<0.05$  con respecto a 3xTg-AD(-).

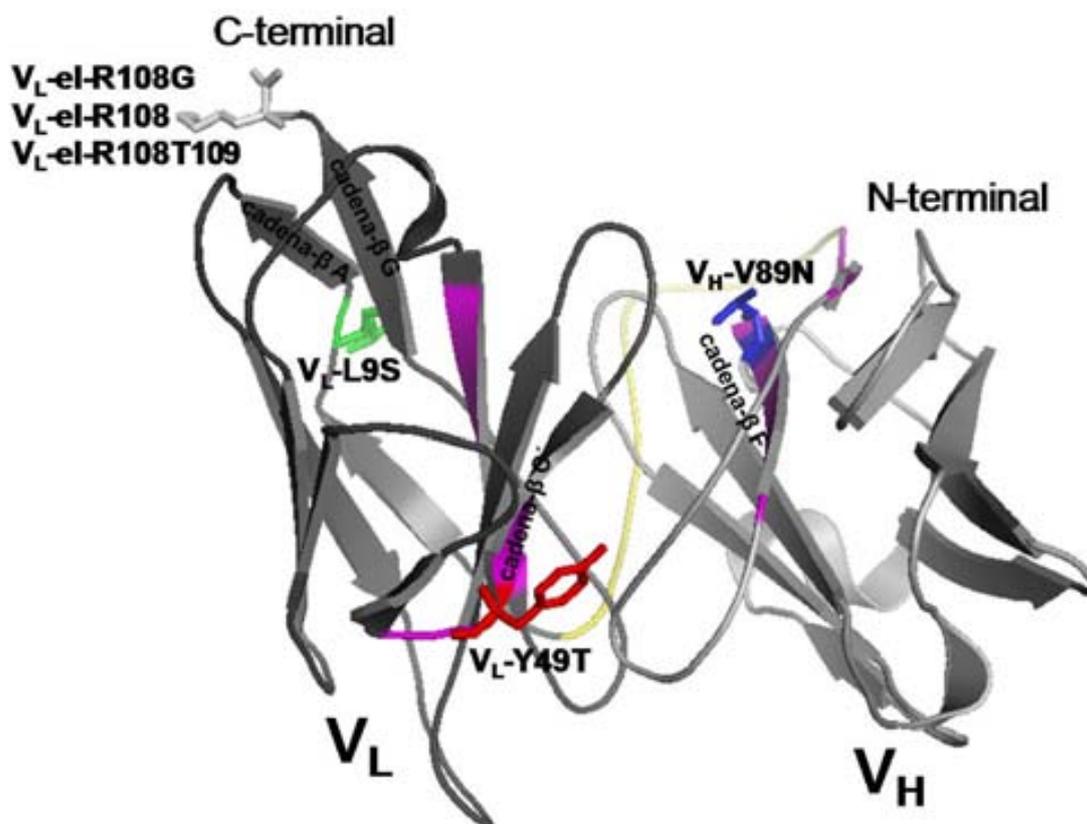
## R5. Rediseño del plegamiento del scFv-h3D6

En el grupo de investigación se cuenta con un modelo tridimensional del scFv-h3D6 (figura I19.B de la introducción; Marin-Argany, 2009, 2013; Rivera-Hernández y col., 2013). Examinando el modelo tridimensional se obtuvieron parámetros a considerar, tales como la exposición de los residuos al solvente mediante DSSP (*Definition of Secondary Structure of Proteins, given a set of 3D coordinates*), así como las distancias e interacciones entre residuos mediante PYMOL; que permitieron definir qué residuos presentan interacciones que no deberían modificarse (bien porqué forman parte de núcleos hidrofóbicos, o porqué son interacciones intra- y/o interdominio estabilizadoras) (Marin-Argany, 2013). En contraparte, se determinó qué residuos presentaban interacciones poco favorables, en cuanto a la estabilidad de las estructuras secundarias y/o del empaquetamiento terciario de las que forman parte, siendo estos residuos candidatos a ser sustituidos. De igual forma, se realizó un alineamiento múltiple con 24 secuencias de moléculas de scFv depositadas en el PDB, que permitió determinar el grado de conservación en cada posición. Por otro lado, mediante el algoritmo TANGO (Fernández-Escamilla y col., 2004; Linding y col., 2004) se determinaron a nivel de residuo las regiones con mayor tendencia a la agregación; encontrándose cuatro regiones: V<sub>H</sub> A88-V93, V<sub>H</sub> T107-V111, V<sub>L</sub> L47-V51 y V<sub>L</sub> V85-W89) (figura R28: regiones de color magenta; figura A5, de anexos) (Marin-Argany, 2009, 2013).

Además de las consideraciones anteriores, es importante señalar que: i) por un lado la secuencia del scFv-h3D6 deriva del anticuerpo completo h3D6.v2 humanizado (W02006066171), siendo importante el conocimiento de la secuencia original antes de la humanización del anticuerpo para usarlos como posibles sustitutos en las mutaciones y; ii) que las regiones CDR no pueden ser modificadas, dado que en ellas radica el reconocimiento del epítipo.

Como se ha mencionado en el apartado R3.3, el dominio con menor estabilidad termodinámica es el dominio V<sub>L</sub>, siendo por tanto el dominio más susceptible a realizar un rediseño que permita mejorar su plegamiento, y por ello realizamos 5 mutaciones. Adicionalmente, se estudió una mutación que en teoría estabiliza el dominio V<sub>H</sub>.

Las mutaciones elegidas en el dominio V<sub>L</sub> fueron: V<sub>L</sub>-L9S (cadena-β A, FRL1), V<sub>L</sub>-Y49T (cadena-β C', FRL2) y tres elongaciones del C-terminal (V<sub>L</sub>-el-R108G, V<sub>L</sub>-el-R108 y V<sub>L</sub>-el-R108T109; cadena-β G, FRH4). La mutación adicional realizada en el dominio V<sub>H</sub> fue: V<sub>H</sub>-V89N (cadena-β F, FRH3) (figura R28).



**Figura R28. Localización de las mutaciones en el modelo tridimensional del scFv-h3D6.** La mutación  $V_H$ -V89N (color azul) se localiza en la cadena- $\beta$  F del dominio  $V_H$ ; Las mutaciones  $V_L$ -L9S (color verde) y  $V_L$ -Y49T (color rojo) se localizan en la cadena- $\beta$  A y cadena- $\beta$  C' del dominio  $V_L$ , respectivamente. Las mutaciones de elongación del C-terminal ( $V_L$ -el-R108G,  $V_L$ -el-R108 y  $V_L$ -el-R108T109; color gris) se localizan en la cadena- $\beta$  G. Dominio  $V_H$ : color gris claro; dominio  $V_L$ : gris oscuro. Regiones con alta tendencia a la agregación obtenidas por TANGO: color magenta. Adaptado del modelo tridimensional del scFv-h3D6 realizado por Marin-Argany (2009, 2013) y Marin-Argany y col. (2011).

En el primer mutante del dominio  $V_L$  ( $V_L$ -L9S), la leucina, un aminoácido alifático bastante hidrofóbico que no ha sido modificado por la humanización del anticuerpo, presenta un alto grado de exposición al solvente (con un valor de DSSP de 76) sin presentar ningún tipo de interacción hidrofóbica que compense tal exposición. Este residuo no se encuentra en ninguna de las regiones predichas con alta tendencia a la agregación, y nuestra hipótesis fue que su mutación podría aumentar la solubilidad del plegamiento global. Además, el alineamiento múltiple mostró que en esa posición existe una frecuencia de 10G, 9S, 2D, 1A, una delección y nuestro residuo de leucina. Aunque la glicina es el residuo más frecuente en este alineamiento, se descartó por resultar una mutación desestabilizante en una cadena- $\beta$  debido a su alta flexibilidad, eligiéndose como opción más plausible a la serina (el segundo aminoácido más frecuente en el alineamiento), que además de ser un aminoácido polar sin carga, y por

lo tanto acomodable a una alta exposición al solvente, no desestabiliza la estructura de cadena- $\beta$ .

La elección del mutante  $V_L$ -Y49T se debe a, que se encuentra en una región con alta tendencia a la agregación (región  $V_L$  L47148Y49), muy enterrada y que comprende el inicio del CDRL2, además del FRL2. Una vez descartados los residuos del CDRL2, se eligió el residuo con un DSSP mayor (8). Debido a que este residuo es muy importante para la interacción entre los dominios del scFv (interficie de los dominios  $V_H$  y  $V_L$ ), se consideró realizar la mutación con un residuo de características parecidas, especialmente la presencia del hidroxilo, por lo que se eligió a la treonina.

La mutación realizada en el dominio  $V_H$  ( $V_H$ -V89N) también se encuentra en una región con alta tendencia a la agregación ( $V_H$  A88-V93), igualmente muy enterrada y cercana a un CDR; lo que limitó las opciones para realizar la mutación, eligiéndose al residuo menos enterrado ( $V_H$ -V89) con un DSSP de 15. El residuo en esta posición antes de la humanización era una leucina, pero se descartó por aumentar la tendencia a la agregación. Finalmente se eligió a la asparagina que según la predicción por TANGO la disminuye.

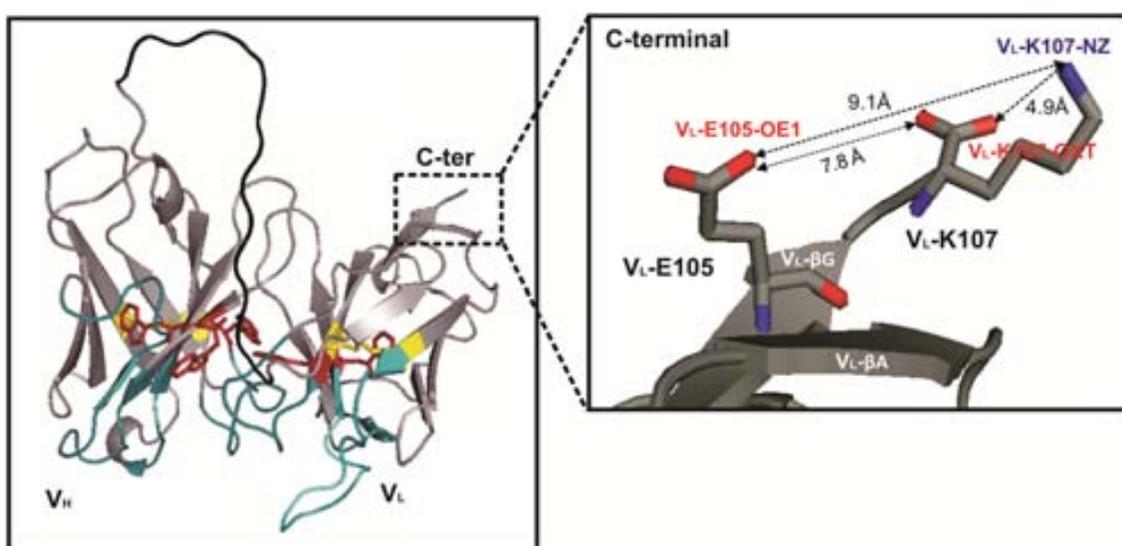
Mencionar que las mutaciones realizadas en las regiones con alta tendencia a la agregación ( $V_H$ -V89N y  $V_L$ -Y49T) son de pronóstico reservado en cuanto el efecto que puedan tener sobre la estabilización de la molécula.

Por otro lado, examinando gráficamente la estructura en el modelo se encontró que la finalización del C-terminal en la molécula, que corresponde a  $V_L$ -K107, aun pertenece a la cadena- $\beta$  G. Por tanto, las cadenas laterales de los residuos  $V_L$ -E105 y  $V_L$ -K107, situadas en el mismo lado de la cadena- $\beta$  G, establecen una interacción electrostática (figura R29). Esta interacción no se realiza correctamente, ya que, a modo de ejemplo, la distancia entre el grupo amino del C-terminal ( $V_L$ -K107-NZ) y el grupo carboxilo del antepenúltimo residuo ( $V_L$ -E105-OE1) es de 9.1 Å. Ello es indicativo de un debilitamiento en la interacción entre las cadenas laterales de dichos residuos. Nuestra hipótesis inicial fue que la presencia de la carga negativa del C-terminal podría estar atrayendo a la cadena lateral de  $V_L$ -K107, ya que la distancia entre  $V_L$ -K107-OXT y  $V_L$ -E105-OE1 es de solo 4.9 Å (figura R29).

En resumen, la hipótesis que se intenta probar es que el efecto de OXT107-O debilitaba la interacción entre  $V_L$ -K107 y  $V_L$ -E105, ocasionando una desestabilización del final de la cadena- $\beta$  G. En base a esto, y con el fin de eliminar el efecto del OXT107-O, se decidió extender la cadena principal del C-terminal mediante la adición de un residuo pequeño y neutro como la glicina, generando una forma mutante

denominada C1 ( $V_L$ -el-R108G) que tentativamente estabilizaría y reforzaría el empaquetamiento del extremo C-terminal de la cadena- $\beta$  G.

Además, a partir del alineamiento múltiple se observó que 16 de estas secuencias acababan con el mismo residuo en el C-terminal ( $V_L$ -K107) que el scFv-h3D6 (de hecho, se eligió esa posición como C-terminal cuando se diseñó la molécula debido a que es la más frecuente en scFvs); 6 secuencias presentaban una arginina adicional ( $V_L$ -R108) y, 2 secuencias terminaban con dicha arginina más una treonina ( $V_L$ -T109), y se decidió generar las formas mutantes denominadas C2 ( $V_L$ -el-R108) y C3 ( $V_L$ -el-R108T109).



**Figura R29. Detalle del extremo C-terminal en el modelo tridimensional del scFv-h3D6.** Regiones azules: CDRs; regiones negras: conector flexible; residuos amarillos: puentes disulfuro; residuos rojos: Trp. La ampliación muestra las principales interacciones entre los residuos  $V_L$ -E105 y  $V_L$ -K107, así como el efecto del OXT107-O. Reproducido de Rivera-Hernández y col. (2013).

### R5.1. Clonación de las variantes proteicas de scFv-h3D6

El trabajo de clonación y obtención de mutantes ha sido realizado en estrecha colaboración con dos compañeros de grupo: los mutantes de las regiones con alta tendencia a la agregación ( $V_H$ -V89N y  $V_L$ -Y49T) con Marin-Argany (Marin-Argany, 2013) y los mutantes de extensión (C1-C3) con Blasco-Moreno (Blasco-Moreno, 2010; Rivera-Hernández, 2013), siendo el mutante que pretende aumentar la solubilidad ( $V_L$ -L9S) exclusivo de este trabajo, al igual que ocurre con la caracterización biofísica profunda de los mutantes de extensión y de solubilidad.

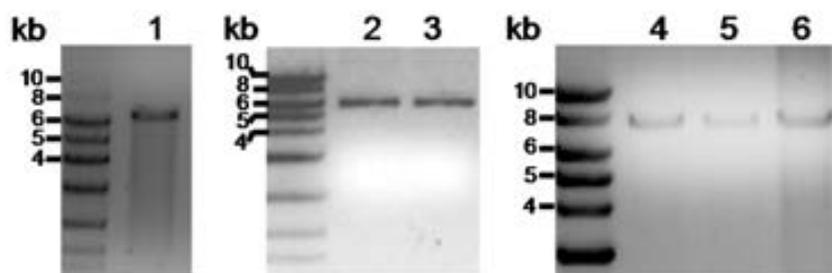
Para introducir las mutaciones mencionadas en el apartado anterior, en el grupo de investigación se diseñaron los oligonucleótidos mutagénicos que se muestran en la tabla R4 para amplificar y modificar el gen sintético scFv-h3D6 mediante el protocolo de QuikChange™ (Blasco-Moreno, 2011; Marin-Argany, 2013; Rivera-Hernández y col., 2013). Para las mutaciones internas se utilizó como molde el plásmido pETtrx1a-scFv. Mientras que las extensiones se realizaron sobre el plásmido pCri5(a)-scFv. Esta diferencia se debe únicamente a que se utilizó el vector de expresión con el que se estaba estandarizando la purificación y la caracterización del scFv-h3D6 WT (*wild-type*) en el momento de realizar dichos mutantes.

**Tabla R4. Mutaciones realizadas y secuencias de los primers utilizados.** *Fw*: Forward. *Rv*: Reverse.

Mutaciones		
V <sub>H</sub> -V89N	<i>Fw</i> <i>Rv</i>	5' GAAGATACCGCGaacTATTATTGCGTGCGTTATGATC 3' 5' ATAACGCACGCAATAATAggttCGCGGTATCTTCGGCACG 3'
V <sub>L</sub> -L9S	<i>Fw</i> <i>Rv</i>	5' GATGACCCAGAGCCCGtcGAGCCTGCCGGTGACCCC 3' 5' GTCACCGGCAGGCTCgaCGGGCTCTGGGTCATCACC 3'
V <sub>L</sub> -Y49T	<i>Fw</i> <i>Rv</i>	5' CGCAGCGCCTGATCacTCTGGTGAGCAAAGTGGATAGC 3' 5' CCAGTTTGCTCACCAGAgTGATCAGGCGCTGCGGGC 3'
C1 (V <sub>L</sub> -el-R108G)	<i>Fw</i> <i>Rv</i>	5' CAAAGTGGAAATCAAAggtTAATAAGCGGCCGCACTCGAG 3' 5' AGTGCGGCCGCTTATTAaccTTTGATTTCCACTTTGGTGC 3'
C2 (V <sub>L</sub> -el-R108)	<i>Fw</i> <i>Rv</i>	5' CAAAGTGGAAATCAAAcgtTAATAAGCGGCCGCACTCGAG 3' 5' AGTGCGGCCGCTTATTAacgTTTGATTTCCACTTTGGTGC 3'
C3 (V <sub>L</sub> -el-R108T109)	<i>Fw</i> <i>Rv</i>	5' AAGTGGAAATCAAAcgtaccTAATAAGCGGCCGCACTCGAG 3' 5' TGCGGCCGCTTATTAaggtacgTTTGATTTCCACTTTGGTGC 3'

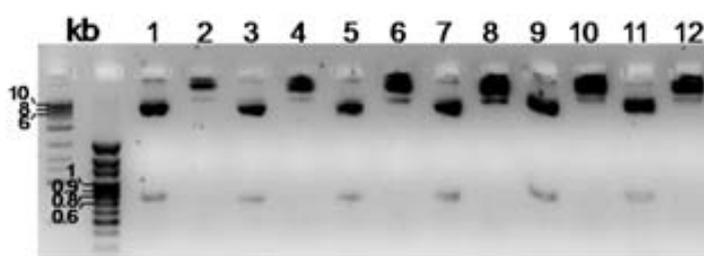
Dado que el sistema QuikChange™ permite amplificar todo el plásmido, como podemos ver en la figura R30, los productos de PCR resultantes presentan un tamaño de 6.5 kb y 7.6 kb, para pETtrx1a y pCri5(a) respectivamente. Como parte del protocolo del sistema QuikChange™, después de realizar un tratamiento con *DpnI* para la eliminación del DNA molde, se transformaron los productos de PCR en la cepa de *E.coli* XL10Gold. Posteriormente se obtuvo el DNA plasmídico de dos clones por

mutante y se confirmaron las mutaciones por secuenciación (Blasco-Moreno, 2011; Marin-Argany, 2013).



**Figura R30. Productos de PCR obtenidos por QuikChange™.** Amplificaciones efectuadas en el plásmido pETtrx1a de 6.5 kb: carriles 1 al 3. Amplificaciones efectuadas en el plásmido pCri5(a) de 7.6 kb: carriles 4 al 6. V<sub>H</sub>-V89N: carril 1; V<sub>L</sub>-L9S: carril 2; V<sub>L</sub>-Y49T: carril 3; C1 (V<sub>L</sub>-el-R108G): carril 4; C2 (V<sub>L</sub>-el-R108): carril 5; C3 (V<sub>L</sub>-el-R108T109): carril 6. Gel de agarosa al 0.7%.

Al quedar demostrado que la expresión de la proteína WT en la construcción pCri5(a) daba lugar a un alto porcentaje de proteína soluble de conformación no nativa, se decidió realizar la expresión con el plásmido pETtrx1a, ya que nos permitió obtener mejores rendimientos de proteína nativa (ver apartado R2.3). De tal forma, que las mutaciones de elongación C-terminal tuvieron que ser subclonadas en dicho plásmido. Para esto, se realizaron cortes de restricción con *XhoI* y *NcoI* tanto para la liberación del inserto del scFv-h3D6 (750 pb) con las mutaciones incorporadas, como para dejar compatibles los sitios cohesivos en el plásmido receptor (pETtrx1a, 5635 pb). Los insertos con las mutaciones incorporadas, fueron ligados al plásmido pETtrx1a. Finalmente, mediante una caracterización molecular con cortes de restricción que flanquean los insertos (figura R31) y una nueva secuenciación del DNA, se verificó el buen estado y la presencia de los insertos en las nuevas construcciones plasmídicas.



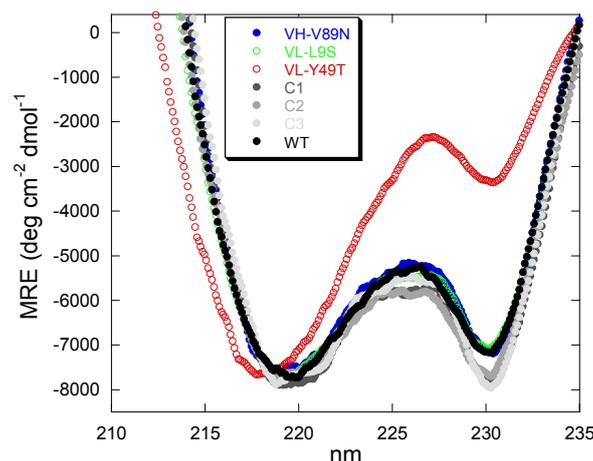
**Figura R31. Caracterización de las construcciones pETtrx1a con las mutaciones incorporadas.** V<sub>H</sub>-V89N: carriles 1 y 2; V<sub>L</sub>-L9S: carriles 3 y 4; V<sub>L</sub>-Y49T: carriles 5 y 6; C1 (V<sub>L</sub>-el-R108G): carriles 7 y 8; C2 (V<sub>L</sub>-el-R108): carriles 9 y 10; C3 (V<sub>L</sub>-el-R108T109): carriles 11 y 12. Digestión con *XhoI* y *NcoI*: carriles impares. Vectores sin digerir: carriles pares. Gel de agarosa al 1.2%.

La expresión y purificación de las variantes proteicas se realizó siguiendo la metodología estandarizada descrita en los apartados R1 y R2. De tal forma que todas las variantes proteicas fueron expresadas como proteínas de fusión a Trx y después del procesamiento de la proteína y purificación por CEx se obtuvieron las formas nativas de todos los mutantes. Los rendimientos globales de purificación obtenidos para las variantes proteicas son muy parecidos a los obtenidos para el WT (~3 mg/L).

Las variantes proteicas V<sub>H</sub>-V89N y V<sub>L</sub>-Y49T fueron purificadas y caracterizadas por Marin-Argany (Marin-Argany, 2013), su incorporación a la presente tesis obedece a que los resultados obtenidos de dichas variantes son interesantes y permiten la generación de una discusión más completa.

## **R5.2. Estructura secundaria, desnaturalización y estabilidad química de las variantes proteicas de scFv-h3D6**

Como fue descrito en el apartado R3.1.2, la estructura secundaria del scFv-h3D6 WT nativo presenta un plegamiento típico de las inmunoglobulinas, aunque con la particularidad de la presencia de un mínimo a 230 nm y un codo positivo a 237 nm; atribuibles a la contribución del entorno hidrofóbico de los triptófanos de los núcleos hidrofóbicos de los dominios V<sub>H</sub> (W36) y V<sub>L</sub> (W35), respectivamente. En la figura R32, podemos observar en general que los espectros de CD de las variantes proteicas, a excepción del mutante V<sub>L</sub>-Y49T que parece estar fuertemente desestabilizado, presentaron ligeras variaciones en los espectros con respecto al WT. Los mutantes V<sub>H</sub>-V89N y V<sub>L</sub>-L9S presentaron un espectro de CD casi idéntico al WT; en contraste, la mutación V<sub>L</sub>-Y49T indujo una notable disminución del mínimo local a 230 nm, así como un ligero desplazamiento del mínimo de 218 nm hacia el azul. Las variantes de elongación del C-terminal (C1, C2 y C3) indujeron a un ligero aumento o acentuación del mismo mínimo local (230 nm). Plausiblemente estos efectos estén relacionados a cambios en el empaquetamiento del dominio V<sub>L</sub>, sugiriendo una mejoría en las variantes de elongación. No se observaron claras diferencias a 237 nm (no mostrado).



**Figura R32. Espectros de CD UV lejano a 25°C de las variantes proteicas de scFv-h3D6.** Espectro azul:  $V_H$ -V89N; espectro verde claro:  $V_L$ -L9S; espectro rojo:  $V_L$ -Y49T; espectro gris oscuro: C1 ( $V_L$ -el-R108G); espectro gris: C2 ( $V_L$ -el-R108); espectro gris claro: C3 ( $V_L$ -el-R108T109) y espectro negro: WT. Las unidades de elipticidad están normalizadas y expresadas en términos de MRE ( $\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$ ). La concentración de todas las proteínas analizadas es de 20  $\mu\text{M}$ .

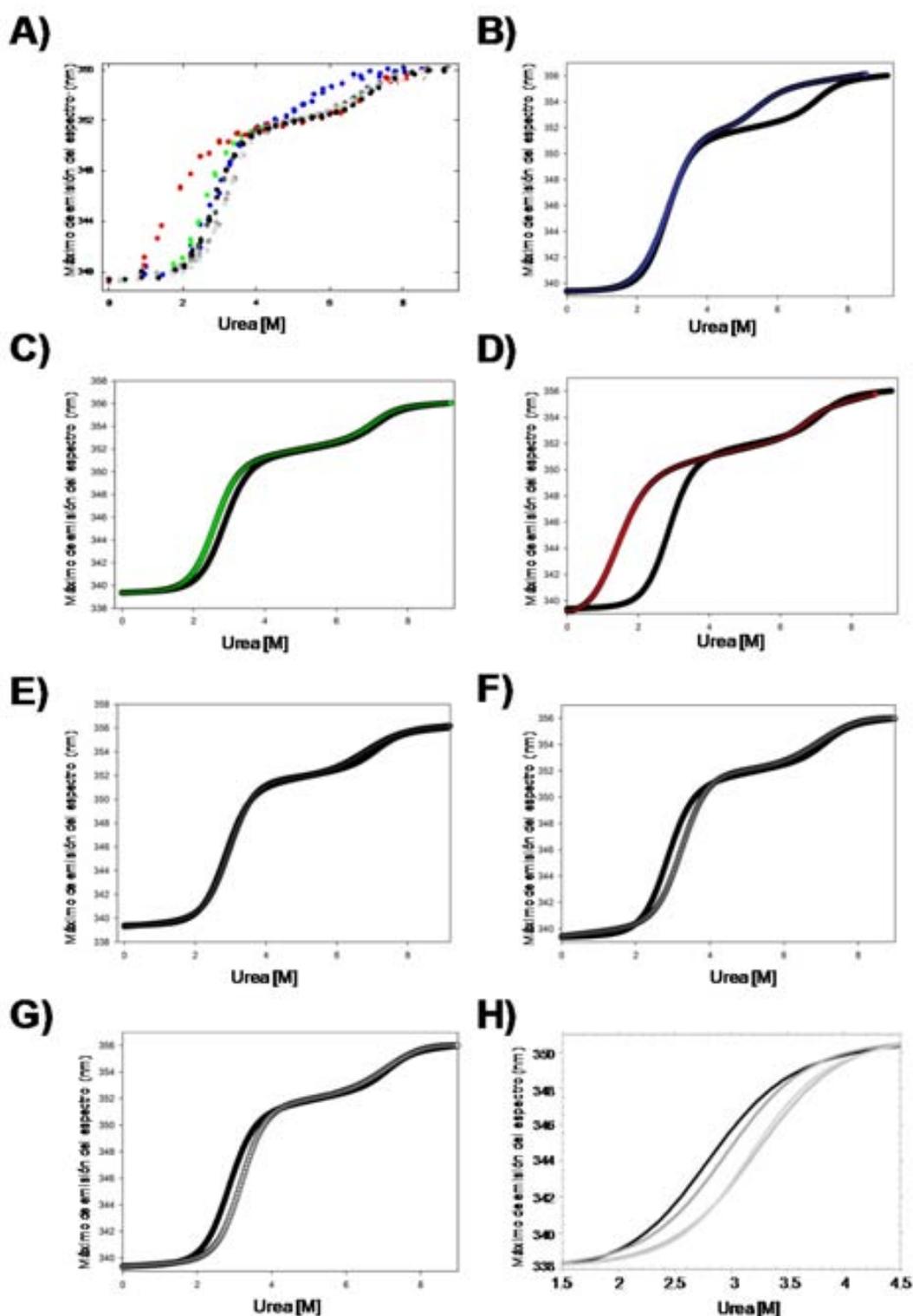
Por otro lado, como se describe en el apartado R3.2.2, la desnaturalización química del scFv-h3D6 WT (en función del desplazamiento hacia el rojo del máximo de emisión del espectro de fluorescencia de Trp), es un proceso de 3 estados que por lo tanto involucra dos transiciones de desplegamiento, donde además de los estados plegado y desplegado, se forma un estado intermedio (compuesto del dominio  $V_L$  desplegado y el dominio  $V_H$  plegado, según apartado R3.3).

En la figura R33 se muestra las curvas de desnaturalización química tanto del scFv-h3D6 WT, como de sus variantes proteicas. Lo que podemos observar de forma general es que, aunque todas las variantes proteicas presentaron cambios en la curva de desnaturalización química, especialmente las variantes  $V_H$ -V89N y  $V_L$ -Y49T, aun se conservó la forma de ésta con respecto al WT; indicándonos que el proceso de desnaturalización química sigue presentando un estado intermedio.

Como se puede ver en la figura 33.A-B, la variante  $V_H$ -V89N, la cual ya se sabía que era una mutación comprometida, presentó una desnaturalización química con una segunda transición muy modificada, en el sentido que el plegamiento del dominio  $V_H$  se encontró severamente desestabilizado, requiriendo una menor concentración del agente desnaturalizante para desplegarlo; en contraparte, la primera transición, que corresponde al desplegamiento del dominio  $V_L$ , no se vió alterada.

Las variantes correspondientes del dominio  $V_L$  modificaron en diferente grado la primera transición, correspondiente al desplegamiento de dicho dominio. La segunda transición, atribuida al desplegamiento del dominio  $V_H$ , prácticamente no se vió modificada para ninguna de estas variantes proteicas, necesitando en todos los casos

concentraciones mayores a 8 M de urea para el total desplegamiento de la molécula. En ese sentido, podemos observar en las figuras R33.A,C-D, que las mutaciones localizadas más internamente en el dominio  $V_L$  ( $V_L$ -L9S y  $V_L$ -Y49T), provocaron un desplegamiento temprano de dicho dominio en comparación con el WT, requiriendo menores concentraciones del agente desnaturizante (urea) para lograr su desplegamiento, lo que indica que estas dos mutaciones son desestabilizadoras; ello es especialmente cierto para la variante  $V_L$ -Y49T, que disminuyó tanto la estabilidad intrínseca del dominio como la estabilidad de la interficie interdominio, como se comentara en el apartado D4 de la discusión. En cambio, como podemos ver en las figuras R33.A, E-H; las variantes de elongación del C-terminal ocasionaron en diferente grado (en forma progresiva a la elongación: C1, C2 y C3, respectivamente), un retraso de la primera transición de desplegamiento, y por tanto una estabilización del plegamiento del dominio  $V_L$ .



**Figura R33. Desnaturalización química de las variantes proteicas de scFv-h3D6.** El máximo de emisión del espectro de fluorescencia de Trp graficada en función de la concentración de urea. **A) Curvas de desnaturalización química de las variantes proteicas.** El proceso de desnaturalización química involucra dos transiciones comprendidas en las regiones de 2-4 M urea y de 6-8 M urea para el desplegamiento de los dominios V<sub>L</sub> y V<sub>H</sub>, respectivamente. El *plateau* en la región de 4-6 M urea es indicativo de la presencia de un estado intermedio. **B-G) Comparación del ajuste de las curvas a 3 estados de las variantes proteicas con respecto al WT.** Negro. **B) V<sub>H</sub>-V89N.** Azul. **C) V<sub>L</sub>-L9S.** Verde. **D) V<sub>L</sub>-Y49T.** Rojo. **E) C1 (V<sub>L</sub>-el-R108G).** Gris oscuro. **F) C2 (V<sub>L</sub>-el-R108).** Gris. **G) C3 (V<sub>L</sub>-el-R108T109).** Gris claro. **H) Amplificación de la primera transición de las variantes de elongación del C-terminal.** Ajuste negro: WT; ajuste gris oscuro: C1 (V<sub>L</sub>-el-R108G); ajuste gris: C2 (V<sub>L</sub>-el-R108) y ajuste gris claro: C3 (V<sub>L</sub>-el-R108T109).

Como se puede apreciar en la tabla R5, se obtuvieron los parámetros termodinámicos de las variantes proteicas más estables, mediante un ajuste de las curvas. Si bien, la variante C1 presentó un desplegamiento del dominio  $V_L$  similar con respecto al WT, al analizar sus parámetros se encontró que presenta un ligero aumento en la estabilidad termodinámica ( $\Delta G \sim 1.7 \text{ KJ mol}^{-1}$ ). Este efecto estabilizador es más evidente en las variantes C2 ( $\Delta G \sim 3.0 \text{ KJ mol}^{-1}$ ) y C3 ( $\Delta G \sim 5.1 \text{ KJ mol}^{-1}$ ) que requirieron además una mayor concentración de urea para el desplegamiento del dominio  $V_L$  (figura R33.H y tabla R5).

**Tabla R5. Ajustes de la curva de desnaturalización química en el equilibrio de las variantes proteicas de scFv-h3D6, mediante un modelo matemático de tres o dos estados.** El ajuste mediante el modelo de tres estados, maneja el proceso de manera global (0-9.2 M urea). El ajuste mediante el modelo de dos estados, maneja el proceso de manera parcial, tratando individualmente las dos transiciones (0-5.5 M de urea y 5-9.2 M de urea). Las unidades de  $\Delta G$  están dadas en  $\text{KJ mol}^{-1}$ ; para  $m$  entre estados, en  $\text{KJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ; para  $[D]$  entre estados, en concentración molar (M) de urea en el 50% de la transición. N = estado nativo; I = estado intermediario; U= estado desplegado.

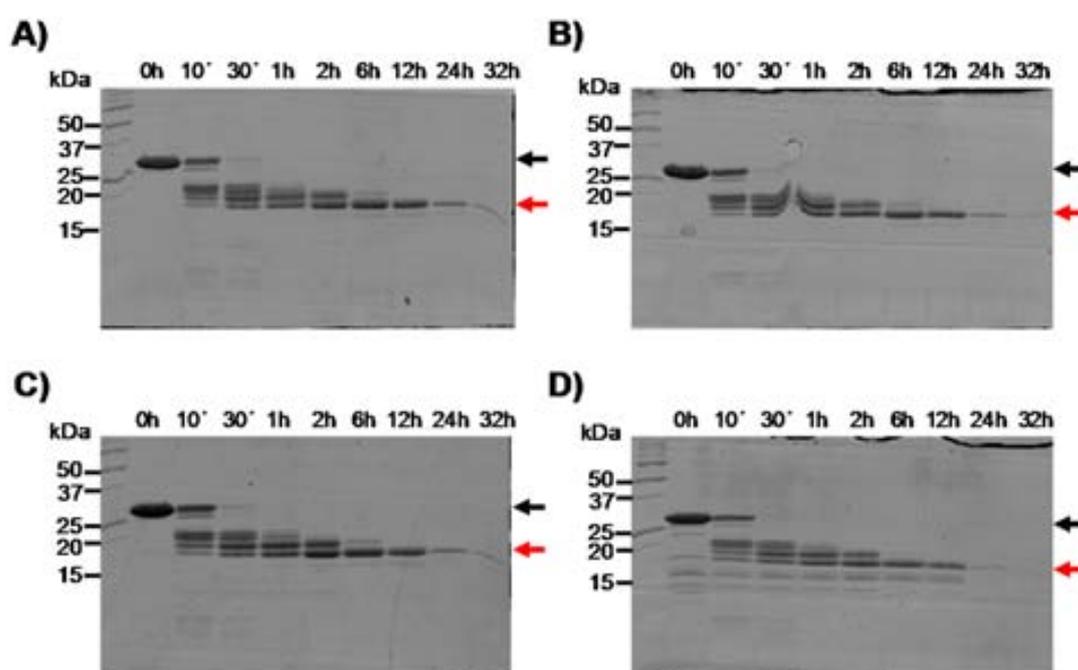
Parámetros Variante, modelo matemático	Primera transición			Segunda transición		
	$\Delta G_{I-N}$	$[D]_{I-N}$	$m_{I-N}$	$\Delta G_{U-I}$	$[D]_{U-I}$	$m_{U-I}$
<b>WT</b>						
Tres estados	$19.3 \pm 0.7$	2.76	$7.0 \pm 0.3$	$36.9 \pm 5.7$	7.10	$5.2 \pm 0.8$
Dos estados	$19.7 \pm 0.7$	2.78	$7.1 \pm 0.3$	$32.0 \pm 4.2$	7.11	$4.5 \pm 0.6$
<b>C1</b> ( $V_L$ -el-R108G)						
Tres estados	$21.0 \pm 0.9$	2.96	$7.1 \pm 0.3$	$31.1 \pm 6.4$	6.91	$4.5 \pm 0.9$
Dos estados	$21.1 \pm 1.0$	2.93	$7.2 \pm 0.4$	$35.7 \pm 3.7$	7.00	$5.1 \pm 0.5$
<b>C2</b> ( $V_L$ -el-R108)						
Tres estados	$22.3 \pm 0.7$	3.23	$6.9 \pm 0.2$	$36.2 \pm 5.8$	7.10	$5.1 \pm 0.8$
Dos estados	$22.5 \pm 0.8$	3.21	$7.0 \pm 0.3$	$37.7 \pm 3.6$	7.11	$5.3 \pm 0.5$
<b>C3</b> ( $V_L$ -el-R108T109)						
Tres estados	$24.4 \pm 0.5$	3.17	$7.7 \pm 0.2$	$38.6 \pm 3.9$	7.28	$5.3 \pm 0.6$
Dos estados	$24.6 \pm 0.5$	3.15	$7.8 \pm 0.2$	$36.5 \pm 4.8$	7.30	$5.0 \pm 0.6$

La cooperatividad de la primera transición ( $m_{I-N}$ ) en las variantes C1 y C2 se mantuvo respecto al WT ( $\sim 7 \text{ KJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ), para la variante C3 existió un incremento de la cooperatividad de  $\sim 0.7 \text{ KJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ . El aumento de la estabilidad de las variantes de elongación también se vió reflejado en el aumento de los valores de la urea media de la primera transición ( $[D]_{I-N}$ ), donde para C1 se observó un aumento de  $\sim 0.2 \text{ M}$ , para

C2 y C3 un aumento de  $\sim 0.5$  M. Estos datos nos indicaron que la variante más estable era la C3 ( $V_L$ -el-R108T109).

Por otro lado, los parámetros termodinámicos determinados en la segunda transición, que corresponde al desplegamiento del dominio  $V_H$ , tuvieron que ser interpretados de manera cuidadosa, ya que el desplazamiento hacia el rojo de los máximos de emisión en esa transición es pequeña (3-4 nm) y el rango de desviación estándar ( $SD \pm$ ) de los datos es más alta que en la primera transición. En base a esto, es muy probable que no existan diferencias significativas entre el desplegamiento del dominio  $V_H$  por parte de las variantes proteicas de elongación del C-terminal con respecto al WT.

El aumento en la estabilidad del dominio  $V_L$  por parte de las variantes de elongación del C-terminal, fue también evaluada mediante una cinética de proteólisis con termolisina en urea a  $37^\circ\text{C}$ , en un lapso de tiempo de 32 h. Para esto, se realizó primeramente una proteólisis de las variantes de elongación a 5 M de urea en equilibrio, que corresponde una concentración donde la mayoría de la población proteica tanto el WT como de todas las variantes proteicas de elongación se encuentran en el estado intermediario (ver figura R33).



**Figura R34.** Proteólisis limitada con termolisina de las variantes proteicas de elongación del C-terminal a 5 M urea y a  $37^\circ\text{C}$ . **A)** scFv-h3D6 WT. **B)** Variante C1 ( $V_L$ -el-R108G). **C)** Variante C2 ( $V_L$ -el-R108). **D)** Variante C3 ( $V_L$ -el-R108T109). La flecha negra indica la proteína completa no digerida de 26.4 kDa; la flecha roja indica la acumulación del intermediario de plegamiento de 17 kDa resistente a la proteólisis.

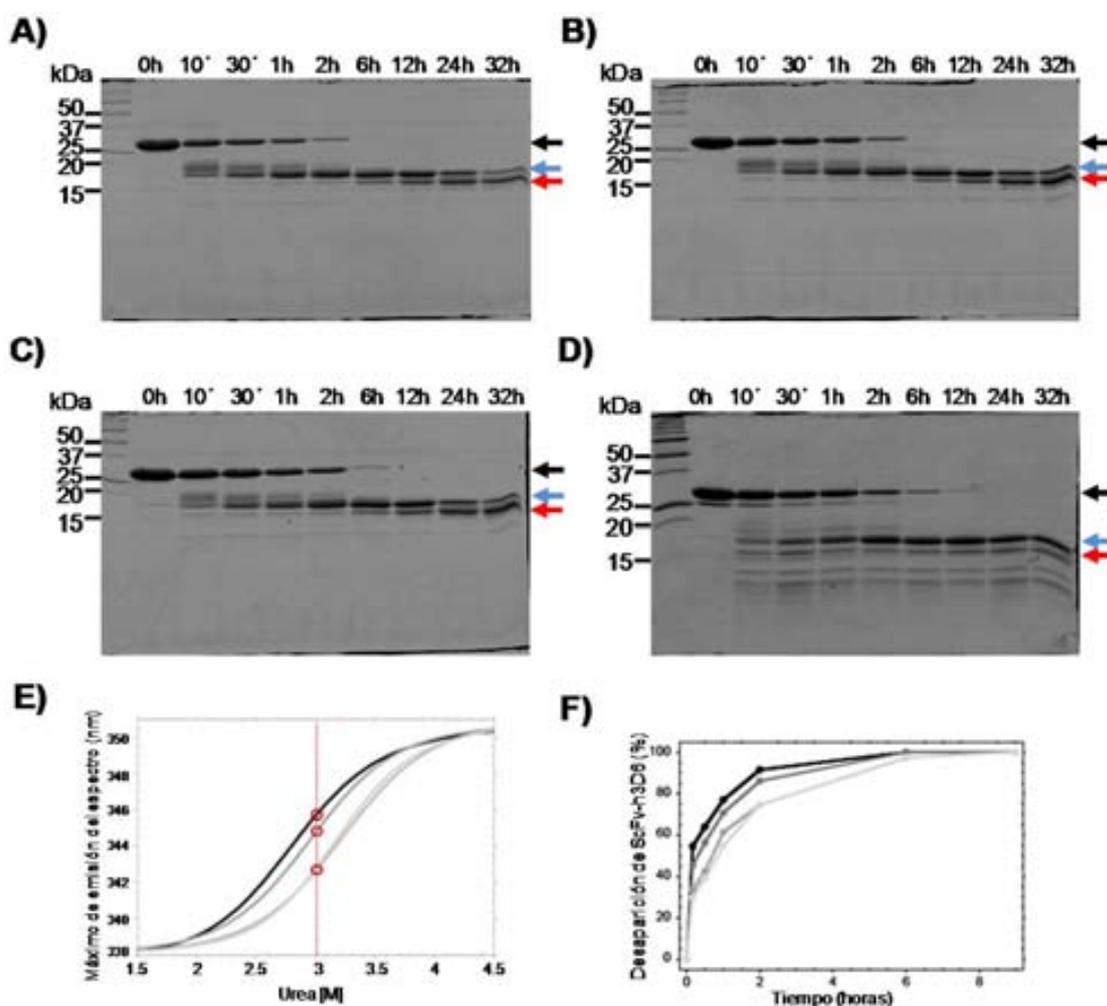
Como era de esperar, Los perfiles de proteólisis (5 M de urea) de todas las variantes de elongación C-terminal fueron exactamente los mismos que el mostrado por el WT, siendo necesario menos de 30 min para la proteólisis de la banda de 26.4 kDa; originando la acumulación de una única banda de 17 kDa a las 6 h, correspondiente al dominio  $V_L$  plegado (figura R34).

Por otro lado, al observar los parámetros obtenidos de la tabla R5, nos dimos cuenta de que en la primera transición de desplegamiento existía un aumento en el punto medio de urea por parte de las variantes proteicas con respecto al WT. Aprovechando esta situación, se realizó una proteólisis a 3 M de urea, que aproximadamente correspondería la concentración de urea en el cual la mitad de la población de la proteína WT presentaría desplegado el dominio  $V_L$  (ver figura R18.B).

En la figura R35.E se puede apreciar que en el punto medio de urea de la primera transición del WT, las variantes proteicas de elongación presentan gran parte de sus poblaciones con el plegamiento aun nativo; siendo más evidente en las variantes C2 y C3.

Al analizar mediante SDS-PAGE los perfiles de proteólisis a 3 M de urea (figura R35.A), podemos visualizar que para el caso del WT se necesitó más de 2 h para la completa desaparición de la banda de 26.4 kDa, correspondiente a la proteína entera; dando lugar en la primera hora, a la acumulación de una banda de 18.5 kDa, que posteriormente a las 24 h es desplazada por la acumulación de una banda de 17 kDa (dominio  $V_H$  plegado, junto a la horquilla  $\beta A-\beta B$  del dominio  $V_L$ , apartado R3.3). Como se puede apreciar en las figuras R35.B-D, los perfiles de proteólisis obtenidos por parte de las variantes de elongación (C1, C2 y C3) presentaron un retraso general en la desaparición de la banda de 26.4 kDa. Concretamente, al graficar el porcentaje de desaparición de dicha banda (obtenido por densitometría) con respecto al tiempo, se observó claramente que las variantes C2 y C3 son las que presentan mayor resistencia a la proteólisis (figura R35.F), siendo incluso necesarias más de 6 y 12 h para la completa desaparición de la banda, para C2 y C3 respectivamente. Esto es debido a que la población de proteínas no desplegadas, en equilibrio a 3 M, es mayor que la del WT; y por tanto, presentan una conformación en donde sus residuos aminoacídicos son menos accesibles a la digestión por termolisina.

Estos hechos confirman el efecto estabilizador que tiene la elongación del C-terminal sobre el dominio  $V_L$ , siendo de especial interés: la variante proteica C3 ( $V_L$ -el-R108T109).



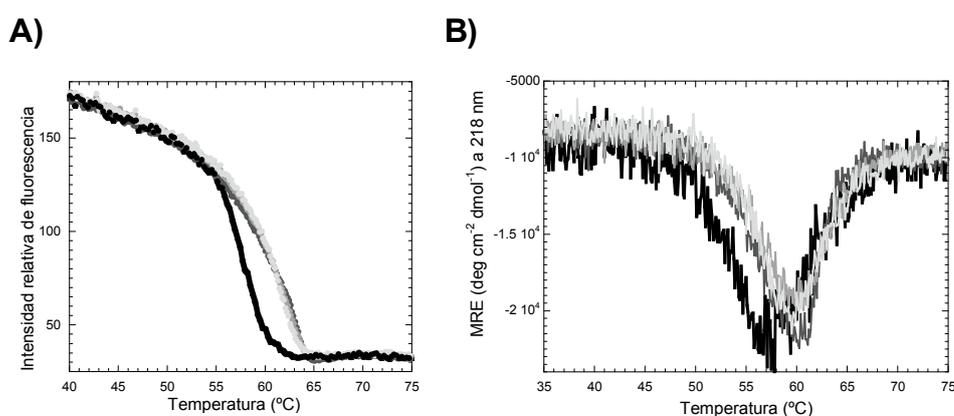
**Figura R35. Proteólisis limitada de las variantes proteicas de elongación del C-terminal, mediante termolisina a 3 M urea y 37°C. A) scFv-h3D6 WT. B) Variante C1 (V<sub>L</sub>-el-R108G). C) Variante C2 (V<sub>L</sub>-el-R108). D) Variante C3 (V<sub>L</sub>-el-R108T109).** La flecha negra indica la proteína completa no digerida de 26.4 kDa; la flecha azul indica la acumulación de una banda de 18.5 kDa; la flecha roja indica la acumulación del intermediario de plegamiento de 17 kDa resistente a la proteólisis. **E) Punto medio de urea del WT en la primera transición de desplegamiento.** Círculos rojos: superposición del punto medio de urea del WT sobre la curva de desnaturalización de las variantes proteicas C1, C2 y C3. Ajuste negro: WT; ajuste gris oscuro: C1 (V<sub>L</sub>-el-R108G); ajuste gris: C2 (V<sub>L</sub>-el-R108) y ajuste gris claro: C3 (V<sub>L</sub>-el-R108T109). **F) Cinética de proteólisis de las variantes proteicas de elongación del C-terminal, a 3 M de urea y 37°C.** Mismo orden que figura E. La cinética está dada en términos de desaparición de la banda de 26.4 kDa (molécula entera) en un rango de tiempo de hasta 12 h.

### R5.3. Cambios en la vía de agregación inducida térmicamente tras la elongación del C-terminal

Una vez visto que la elongación C-terminal estabiliza el plegamiento del dominio  $V_L$ , se analizaron los intermediarios térmicos de dichas variantes proteicas.

A modo de recapitulación, la caracterización térmica del scFv-h3D6 WT (mediante fluorescencia de Trp, CD, FTIR y proteólisis limitada), nos indicó que la molécula presenta una vía de agregación irreversible que se inicia con una reorganización conformacional del estado nativo en torno a los 50°C, dando lugar a la formación de un estado intermediario (enriquecido con componentes- $\beta$  de tipo WL) abundante en torno a los 60°C y, que es completamente diferente al intermediario de desplegamiento químico.

Mediante técnicas de CD en el UV lejano y fluorescencia de Trp (figura R36), se observó que en todas las variantes de elongación C-terminal la reorganización conformacional ocurre a temperaturas más elevadas, respecto al WT; presentando de forma general un desplazamiento aproximado de  $\sim 4^\circ\text{C}$  en sus respectivas  $T_{1/2}$  (en términos de transición conformacional). Esto significa que todas las variantes de elongación C-terminal presentaron una clara disminución en la tendencia a la agregación.



**Figura R36. Perfiles térmicos del scFv-h3D6 WT y sus variantes proteicas. A) fluorescencia Trp de emisión a 338 nm. B) Elipticidad a 218 nm.** Perfil negro: WT; perfil gris oscuro: C1 ( $V_L$ -el-R108G); perfil gris: C2 ( $V_L$ -el-R108) y perfil gris claro: C3 ( $V_L$ -el-R108T109).

Con el fin de estudiar el componente WL en las diferentes variantes de elongación C-terminal, se adquirieron espectros de FTIR a diferentes temperaturas y se les realizó sus respectivas deconvoluciones para la obtención de las bandas componentes.

Lo que se pudo observar es que a 25°C prácticamente no hay diferencias en la composición del espectro amida I' para las diferentes variantes proteicas, con respecto al WT (tabla R6). Por ejemplo, el componente en hoja- $\beta$  nativa ( $1637\text{ cm}^{-1}$ ) a 25°C,

tanto para el WT como para todas las variantes de elongación, se encontró en torno al 65% del área total del espectro (figura R38.A). De igual forma, el resto de los componentes del espectro (comprendido entre 1700-1660  $\text{cm}^{-1}$ ) no presentaron cambios significativos, por ejemplo, el componente *loop*/giros (1659-1663  $\text{cm}^{-1}$ ), representó alrededor del 26% del área total del espectro para el WT y todas las variantes de elongación.

A la temperatura donde inicia la reorganización del estado nativo (50°C), la estructura secundaria fue similar a la presentada a 25°C, tanto para el WT como para las diferentes variantes proteicas (tabla R6 y figuras R38.A-C). El no encontrar diferencias en la estructura secundaria a 25 y 50°C en todas las variantes proteicas no es de sorprender, ya que si consideramos que la técnica de FTIR es una espectroscopia de baja resolución y que el tratamiento de datos podría enmascarar pequeñas diferencias en la estructura secundaria; a no ser que las diferencias de sus componentes sean significativas los cambios en la estructura secundaria no podrán ser discernidos.

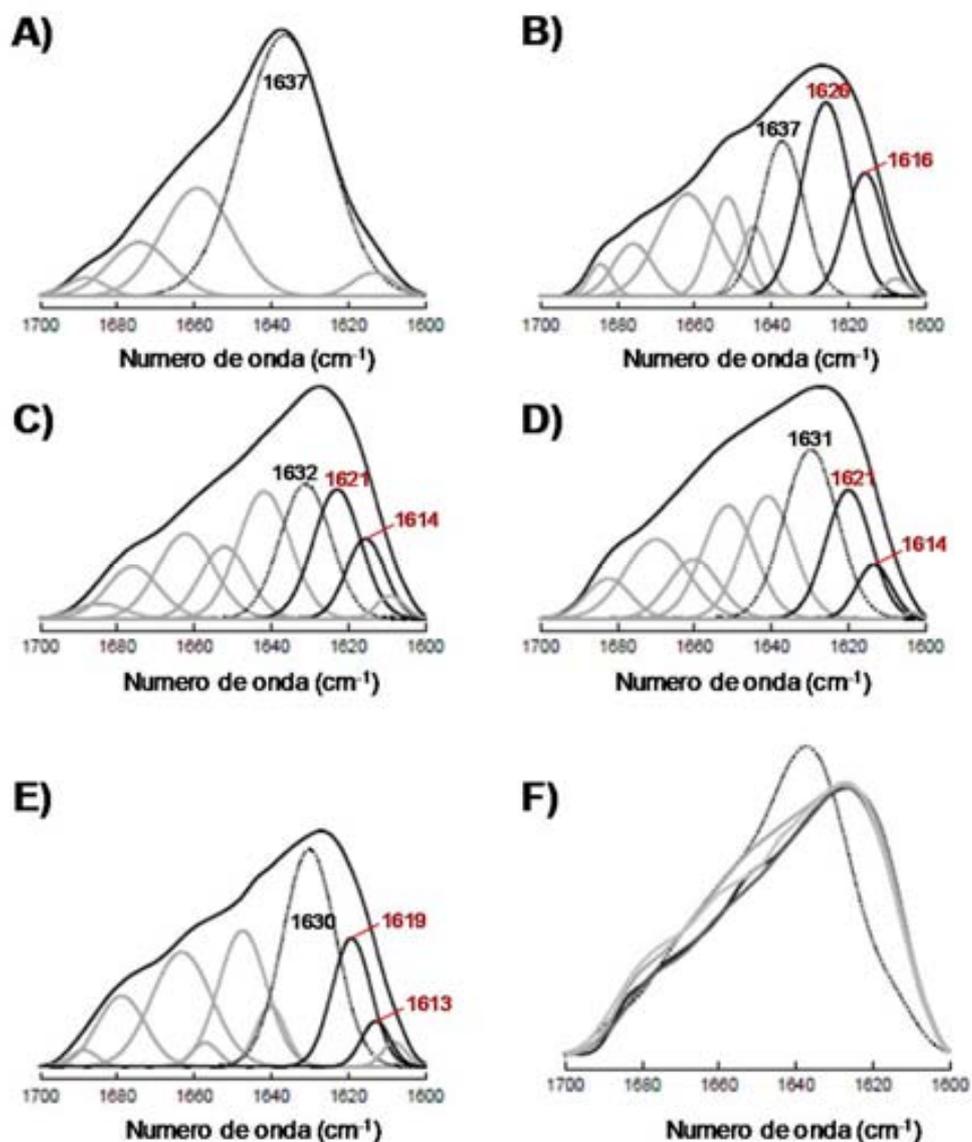
Como se describe para el WT en el apartado R3.1.3, una vez que la reorganización conformacional da lugar a la formación del estado intermediario (60°C), se observó una disminución del componente en hoja- $\beta$  nativa a favor de la aparición de los componentes- $\beta$ : WL (componente mayoritario del espectro) y fibras amiloides. A diferencia de lo observado a 25 y 50°C, en el estado intermediario de las variantes de elongación C-terminal, respecto al WT, sí existieron cambios en cuanto a la distribución de los componentes- $\beta$  del espectro FTIR; este hecho explica las diferencias en la tendencia a la agregación observadas en dichas variantes.

En la tabla R6 y en las figuras R37.B-E y R38, se pueden observar la evolución de los componentes- $\beta$  a lo largo del incremento de la temperatura por parte de las variantes proteicas, con respecto al WT. Siendo notorio que, a diferencia del estado intermediario del WT a los 60°C y al renaturalizar (espectro obtenido a 25°C posteriormente de haber estado la muestra a 60°C), en todas las variantes de elongación, la estructura secundaria en hoja- $\beta$  WL ya no era el componente mayoritario en el espectro de FTIR. Ocurriendo además, una disminución del componente fibrilar en hoja- $\beta$  amiloide en todas las variantes de elongación.

En la agregación de la variante C1 (25°C renaturalizado, figura R37.C y figura R38), con respecto al WT; ocurrió una disminución de los componentes WL y amiloide, manteniéndose constante la proporción del componente hoja- $\beta$  nativa.

Donde sí existió un aumento en la composición de hoja- $\beta$  nativa, es en el agregado de la variante C2 (25°C Renaturalizado, figura R37.D y figura R38), que además presentó

una disminución de los componentes WL y amiloide más acusada que la presentada por la variante C1.



**Figura R37. Deconvolución y comparación de algunos espectros de FTIR obtenidos del scFv-h3D6 WT y sus variantes proteicas de elongación del C-terminal. A) WT nativo a 25°C. B) WT renaturalizado a 25°C. C) C1 (V<sub>L</sub>-el-R108G) renaturalizado a 25°C. D) C2 (V<sub>L</sub>-el-R108) renaturalizado a 25°C. E) C3 (V<sub>L</sub>-el-R108T109) renaturalizado a 25°C. La banda discontinua indica el componente hoja- $\beta$  nativa (1637  $\text{cm}^{-1}$  ó 1632  $\text{cm}^{-1}$  ó 1631  $\text{cm}^{-1}$  ó 1630  $\text{cm}^{-1}$ ). Las bandas negras indican los componentes- $\beta$  fibrilares (*worm-like*, WL: 1626  $\text{cm}^{-1}$  ó 1621  $\text{cm}^{-1}$  ó 1619  $\text{cm}^{-1}$ ; y  $\beta$ -amiloide: 1616  $\text{cm}^{-1}$  ó 1614  $\text{cm}^{-1}$  ó 1613  $\text{cm}^{-1}$ ). F) Comparación de espectros de las variantes proteicas adquiridos a diferentes temperaturas. Espectro de línea discontinua: WT nativo a 25°C; espectro de línea negra solida: WT renaturalizado a 25°C; espectro de línea gris oscura: C1 renaturalizado a 25°C; espectro de línea gris: C2 renaturalizado a 25°C; espectro de línea gris clara: C3 renaturalizado a 25°C.**

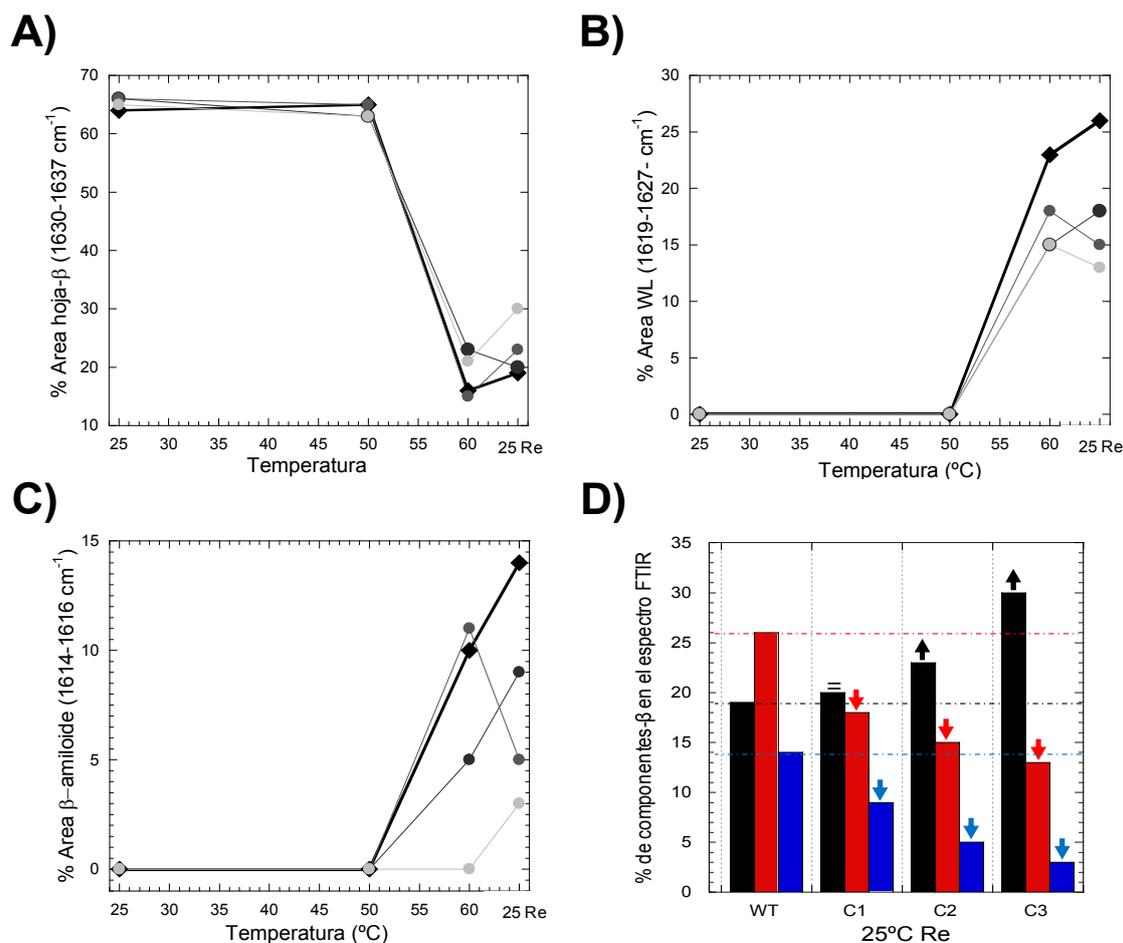
**Tabla R6. Descomposición del espectro infrarrojo de la región de la banda amida I', adquirida a diferentes temperaturas (25°C, 50°C, 60°C y 25°C Re: renaturalizado).**

WT	25°C		50°C		60°C		25°C Re	
	Centro (cm <sup>-1</sup> )	Área (%)						
Hoja-β antiparalela de alta frecuencia	1688	2	1689	2	1685	3	1685	2
Giros-β	1674	9	1677	8	1676	3	1672	5
Loop/giros	1659	22	1662	22	1661	30	1662	17
Hélice-α					1650	7	1653	10
Random coil					1643	7	1645	6
Hoja-β nativa	1637	64	1637	65	1636	16	1637	19
Hoja-β WL					1627	23	1626	26
Hoja-β Amiloide					1616	10	1616	14
Cadena lateral	1614 <sup>a</sup>	3	1613 <sup>a</sup>	3	1607	1	1607	1
C1	25°C		50°C		60°C		25°C Re	
	Centro (cm <sup>-1</sup> )	Área (%)						
Hoja-β antiparalela de alta frecuencia	1685	3	1689	1	1685	0	1685	2
Giros-β			1675	13	1678	9	1679	8
Loop/giros	1663	30	1659	21	1662	16	1667	14
Hélice-α					1653	13	1655	10
Random coil					1643	18	1643	19
Hoja-β nativa	1637	66	1637	63	1632	23	1632	20
Hoja-β WL					1623	15	1621	18
Hoja-β Amiloide					1614	5	1614	9
Cadena lateral	1611	1	1614 <sup>a</sup>	2	1607	1	1607	2
C2	25°C		50°C		60°C		25°C Re	
	Centro (cm <sup>-1</sup> )	Área (%)						
Hoja-β antiparalela de alta frecuencia	1688	2	1683	4	1683	3	1681	5
Giros-β	1678	5	1675	0	1671	14	1669	13
Loop/giros	1662	26	1663	30	1662	5	1659	8
Hélice-α					1652	20	1652	15
Random coil					1643	12	1643	16
Hoja-β nativa	1637	66	1638	65	1636	15	1631	23
Hoja-β WL					1627	18	1621	15
Hoja-β Amiloide					1617	11	1614	5
Cadena lateral	1612 <sup>a</sup>	1	1613 <sup>a</sup>	1	1607	1	1607	1
C3	25°C		50°C		60°C		25°C Re	
	Centro (cm <sup>-1</sup> )	Área (%)						
Hoja-β antiparalela de alta frecuencia	1689	2	1689	2	1685	4	1689	1
Giros-β	1677	9	1678	10	1676	7	1679	9
Loop/giros	1661	22	1661	23	1666	6	1663	18
Hélice-α					1657	23	1657	2
Random coil					1650	5	1648	17
Random coil					1640	18	1640	5
Hoja-β nativa	1637	65	1637	63	1630 <sup>b</sup>	21	1630 <sup>b</sup>	30
Hoja-β WL					1619 <sup>b</sup>	15	1619 <sup>b</sup>	13
Hoja-β Amiloide							1613 <sup>b</sup>	3
Cadena lateral	1612 <sup>a</sup>	2	1613 <sup>a</sup>	1	1608	1	1608	2

<sup>a</sup> Esta banda, cuantitativamente despreciable, podría deberse también al componente amiloide.

<sup>b</sup> Estas bandas son difíciles de atribuir, debido a que se encuentran en la frontera entre dos componentes.

El agregado de la variante C3 (25°C renaturalizado, figura R37.E y figura R38), es el que presentó la mayor diferencia en cuanto a la distribución de los componentes- $\beta$ . Concretamente se observó un mayor aumento del componente hoja- $\beta$  nativa, que las ocurridas en las variantes C1 y C2; de igual forma, la proporción de los componentes- $\beta$  WL y amiloide fueron los más bajo de entre todas las variantes proteicas de elongación, indicando una menor agregación..



**Figura R38. Evolución de los componentes- $\beta$  de las variantes proteicas, a lo largo de un proceso térmico. A) Evolución del componente de hoja- $\beta$  nativa (1630-1637  $\text{cm}^{-1}$ ). B) Evolución del componente WL (1619-1627  $\text{cm}^{-1}$ ). C) Evolución del componente amiloide (1614-1616  $\text{cm}^{-1}$ ). Rombos negro: WT; círculo gris oscuro: C1; círculo gris: C2; círculo gris claro: C3. D) Comparación de los componentes- $\beta$  de las variantes proteicas. Barra negra: componente hoja- $\beta$  nativa; barra roja: componente hoja- $\beta$  WL; barra azul: componente hoja- $\beta$  amiloide. Flecha hacia arriba indica incremento del componente respecto al WT; flecha hacia abajo indica disminución del componente respecto al WT; el signo de igualdad (=) indica que no hay variación respecto al WT. 25°C Re (renaturalizado) significa que el espectro es obtenido a 25°C posteriormente de haber estado la muestra a 60°C.**

Es de señalar que en el estado intermediario de todas las variantes de elongación, los 3 componentes hoja- $\beta$  (nativa, WL y amiloide) presentaron un desplazamiento del centro de sus respectivas bandas hacia números de onda menores (alrededor de  $5\text{ cm}^{-1}$ ), lo cual podría indicar un aumento en el número de puentes de hidrógeno respecto al WT. Así mismo, señalar que en el espectro a  $25^{\circ}\text{C}$  para C3 renaturalizado, la banda correspondiente al componente amiloide ( $1613\text{-}1614\text{ cm}^{-1}$ ) fue de difícil interpretación debido a ser prácticamente despreciable y a que se encontraba en la frontera entre dos componentes. Esta situación entre dos componentes también se dió para el componente WL ( $1619\text{ cm}^{-1}$ ), por lo que su asignación se trató de una interpretación a partir de los resultados globales.

Por todo esto, la variante de elongación C3 ( $V_L\text{-el-R108T109}$ ), que presenta un aumento del 26% en su estabilidad termodinámica y una disminución de  $\sim 4^{\circ}\text{C}$  en su tendencia a la agregación, es una buena candidata para ser probada a dosis menores que la forma WT en un sistema murino de AD, o a la misma dosis con la hipótesis de obtener un mayor efecto.



**DISCUSIÓN**





El principal objetivo de este trabajo era la obtención recombinante de un scFv específico contra el péptido A $\beta$  que pudiera ser útil como terapia contra la enfermedad de Alzheimer. Por ello, una vez lo obtuvimos, demostramos su efectividad en un modelo *in vivo* de AD y mejoramos el plegamiento de la molécula para que sea aun más eficiente. Durante el desarrollo de la tesis, y conforme se alcanzaban los objetivos, surgieron una serie de situaciones que a continuación son discutidas.

#### **D1. Expresión en *E. coli* y purificación del scFv-h3D6 WT nativo: relación de la actividad chaperona con la solubilidad y la contribución de los puentes disulfuro en la estabilidad**

Las moléculas de scFv son de difícil obtención, debido principalmente a la falta de estabilización por parte de los dominios constantes, especialmente C<sub>L</sub> y C<sub>H1</sub> que interaccionan mediante un puente disulfuro. Otro de los factores que dificulta la obtención recombinante de scFvs en *E. coli* es la presencia de un puente disulfuro en cada uno de los dominios variables (V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>). Por ello, la mayor parte de los scFvs obtenidos en *E. coli* han sido expresados mediante *phage display* y/o secreción a periplasma. Aunque el *phage display* es un método esencial en la obtención de librerías de scFvs, no es un sistema óptimo para su producción recombinante (Martin y col., 2006). La expresión dirigida a periplasma es, por el momento, la manera más frecuente de obtener pequeñas cantidades de scFvs funcionales; sin embargo, la eficiencia del plegamiento en dicho compartimento es altamente dependiente de la secuencia expresada (Wall y Pluckthun, 1999). Durante los estudios preliminares que nos llevaron a la selección del sistema de expresión de nuestro scFv, no se obtuvieron resultados satisfactorios y concluyentes en cuanto a los sistemas extracelulares, ya que no se detectó la secreción de la proteína ni al periplasma ni al medio de cultivo, pero sí se observó que la co-expresión en *cis* en los 3 sistemas probados (mediante el uso de disulfuro-isomerasas como DsbA, DsbC o de un péptido señal como PelB) inducía la lisis celular, hecho que indica una disfunción probablemente debida a la secreción de un plegamiento incorrecto. En *E.coli*, la oxidación e isomerización de puentes disulfuro se da en el periplasma por acción de una serie de enzimas denominados Dsb. Aunque DsbA se ha descrito como el responsable de la oxidación de otros scFvs en el periplasma (Jurado y col., 2002), en nuestro caso ni siquiera la fusión a dicho enzima con su péptido señal ha resultado eficiente.

Por otro lado, sabiendo de los problemas para la obtención de scFvs con puentes disulfuro nativos en un ambiente reductor como es el citoplasma bacteriano, en la expresión intracelular del scFv-h3D6 se utilizó una cepa defectiva en las reductasas de las 2 vías de oxidoreducción principales de *E.coli*, la vía de la tiorredoxina (*trxB*) y la vía de la glutarredoxina (*gor*) (Jurado y col., 2002; 2006); de igual forma se co-expresó en *cis* con péptidos o proteínas conocidas como promotoras de la solubilidad. De los estudios preliminares realizados en el grupo de investigación se seleccionaron las fusiones con Trx y NusA, que además en la bibliografía ya han sido descritos como proteínas de fusión que pueden mejorar la solubilidad de moléculas tipo scFv (Zheng y col., 2003; Jurado y col., 2006; Sun y col., 2012). La co-expresión en *cis* con ambos *carriers* generó proteína insoluble contenida en los cuerpos de inclusión pero, también fue posible obtener proteína soluble.

Aunque en la literatura existen numerosos casos en los que la fusión a tiorredoxina (Trx) incrementa el rendimiento de la expresión debido a su actividad chaperona, más que a su actividad disulfuroisomerasa (Jurado y col., 2006), lo cierto es que esta estrategia no es válida para todas las secuencias de scFv. De hecho en nuestro caso, a pesar de que ciertamente se incrementó la expresión de nuestra proteína, solo fue posible obtener ~5% de proteína recombinante soluble, encontrándose la mayoría de la proteína en forma de cuerpos de inclusión. Y dado que en la bibliografía una gran parte de los scFv expresados intracelularmente se obtienen mediante la solubilización de los cuerpos de inclusión y de su replegamiento, decidimos que para aprovechar la proteína insoluble disponible, se realizara un replegamiento de dicha proteína. El replegamiento permitió obtener cerca de 40 mg/L de proteína fusionada, que después del procesamiento con TEV se redujo a un rendimiento cercano a los 4 mg/L. Aunque es mucho lo que se pierde al aislar el scFv-h3D6 de la fusión a Trx, la obtención de la forma precursora es cuatro veces mayor que la reportada por Jurado y col. para el precursor de otro scFv (Jurado y col., 2006), quien no pudo separar su scFv de Trx con suficiente eficiencia. Paralelamente, la proteína obtenida de forma soluble mostró una curiosa susceptibilidad proteolítica en el ambiente iónico divalente de la IMAC, que fue solucionado mediante la adición de EDTA en los tampones de dicha cromatografía. Este evento evidenció un problema de plegamiento en la molécula, y de la cual finalmente se obtuvo un rendimiento ~1 mg/L de proteína madura.

Por otro lado, la co-expresión en *cis* con NusA, nos permitió mejorar notablemente la solubilización de la proteína hasta un 60%, estando en concordancia con reportes donde se señala su gran capacidad para aumentar la solubilidad de scFvs, incluso mejor que la presentada por Trx (Zheng y col., 2003; Sun y col., 2012). Señalar que la fusión a este *carrier* permitió que no se presentaran problemas de susceptibilidad

proteolítica durante el paso de purificación IMAC, esto posiblemente relacionado más con un efecto estérico, dada las dimensiones de NusA (54 kDa), que a un efecto derivado del correcto plegamiento del scFv. Señalar además que la expresión del scFv fusionado a NusA presentó un perfil electroforético anómalo, con dos bandas para la fusión. Aunque la presencia del doble bandeo en los geles SDS-PAGE ya ha sido justificado anteriormente como remanentes resultado de una degradación no deseada de la proteína fusionada a NusA (Zheng y col., 2003), en nuestro caso, dicho argumento no explica que durante el procesamiento con TEV no se observe un perfil proteolítico más diverso que la simple acumulación de una banda de 26 kDa que corresponde al scFv y una banda de 54 kDa correspondiente a NusA. De cualquier forma, la estimación final de proteína madura obtenida a partir de esta fusión es de 7 mg/L, siendo el rendimiento más alto registrado hasta el momento en la bibliografía, ya que el mejor rendimiento para un scFv igualmente obtenido por fusión con NusA era de 3 mg/L (Zheng y col., 2003).

Es importante señalar que la mayoría de estos estudios de la bibliografía no han incluido un análisis exhaustivo de la funcionalidad ni de la calidad de plegamiento de los scFv obtenidos, y que si bien la solubilidad de una proteína es un pre-requisito para su correcto plegamiento y funcionalidad que muchas veces se consideran inherentes, en algunos casos esto no necesariamente se cumple; por ejemplo, se ha reportado que la capacidad de solubilización del *carrier* NusA es tan grande que una vez que es eliminada por proteólisis limitada ocurre una agregación de scFv-A15 o del scFv-E34 (Sun y col., 2012); de igual forma, se ha reportado que el scFv-4D9 conserva su forma soluble, a pesar de no encontrarse apropiadamente plegada y con una alta vulnerabilidad a la acción proteolítica inespecífica (Zheng y col., 2003). Esta información es mencionada porque en nuestro caso, contrastando con la relación solubilidad y plegamiento nativo, nos encontramos que la proteína de la fracción soluble, independientemente si provenía de la co-expresión con Trx o NusA, presentaba un alto contenido de especies *scrambled* con puentes disulfuro no nativos (~70-80%). Las especies *scrambled* son isómeros conformacionales producto de la ausencia o la incorrecta formación de los puentes disulfuro nativos. La presencia de estas especies, explica el aumento observado en la tendencia a la agregación por parte de estas fracciones. Dicho aumento en la tendencia a la agregación se debe a que la población con conformaciones no nativas presenta plegamientos menos compactos, con residuos hidrofóbicos más accesibles al solvente, y a la desestabilización de los dominios componentes del scFv-h3D6 por la ausencia o la incorrecta formación de cada puente disulfuro intradominio, llegando a perder hasta

$\sim 14 \text{ KJ mol}^{-1}$  en la estabilidad por dominio afectado (Duan y col., 1994; Ewert y col., 2004).

La presencia de dichas especies *scrambled*, es un hecho que generalmente no se tiene en cuenta en los procesos de obtención recombinante publicados, y se realizan determinaciones con muestras que no contienen el 100% de la proteína nativa.

Curiosamente la proteína obtenida por el replegamiento de los cuerpos de inclusión nos permitió la obtención de una mayor proporción de proteína con los puentes disulfuro nativos (hasta un 80%), siendo éste el método utilizado para la obtención de proteína nativa, dado su mejor rendimiento. Este hecho puede ser explicado debido a que las condiciones de oxido-reducción *in vitro* están optimizadas para la correcta formación de puentes disulfuro (Proba y col., 1997; Li y col., 2004; Tsumoto y col., 2004; Singh y Panda, 2005), cosa que desafortunadamente no ocurre en el citoplasma de *E. coli*, aun utilizando cepas deficientes en reductasas y temperaturas bajas de expresión.

Todas estas evidencias indican que, a pesar del uso de cepas con citoplasma oxidante y de *carriers* solubilizadores, el plegamiento de nuestro scFv tiene ciertos requerimientos que van mas allá de tan solo la solubilización, correspondiendo más bien a condiciones adecuadas para la correcta formación de sus puentes disulfuro nativos.

## **D2. Panorama conformacional del plegamiento de scFv-h3D6: presencia de intermediarios termodinámicos y cinéticos**

El scFv-h3D6 presenta la estructura secundaria típica de una inmunoglobulina plegada, concretamente un análisis de FTIR determinó que la composición nativa de dicha estructura presenta un 64% de hoja- $\beta$  antiparalela, un 22% de giros- $\beta$ , y un 11% de *random coil*. De forma paralela se encontró que la estructura secundaria de la proteína nativa registrada por CD en el UV lejano presenta, además del característico espectro canónico de hoja- $\beta$  (con un mínimo  $\sim 215\text{-}218 \text{ nm}$  y un máximo  $\sim 200 \text{ nm}$ ) frecuente en moléculas scFvs (Martsev y col., 2000; Pedroso y col., 2002; Umetsu y col., 2003), un peculiar mínimo local de elipticidad a  $230 \text{ nm}$  y una señal positiva a  $237 \text{ nm}$  que son considerados clásicamente como afectaciones originarias de las contribuciones de residuos aromáticos y/o cistinil de la cadena polipeptídica (Sreerama y col., 1999). El mínimo a  $230 \text{ nm}$  de nuestra molécula ya sido descrito para dominios  $V_L$ , concretamente a  $235 \text{ nm}$ , siendo atribuido a la interacción de los residuos aromáticos con el residuo conservado Trp35 de dicho dominio (Baden y col., 2008). La señal positiva a  $237 \text{ nm}$  ha sido relacionada con el dominio  $V_H$  en el presente trabajo, y en el

grupo se acaba de demostrar que se debe a un fenómeno similar (Trp 36), y no a la cadena cistinil, ya que su eliminación por mutagénesis dirigida no elimina dicha señal (Montoliu-Gaya, 2013).

Por otro lado, el seguimiento de la desnaturalización térmica del scFv-h3D6 por técnicas espectroscópicas tales como CD, fluorescencia de Trp y turbidimetría; permitió observar un proceso de agregación. La tendencia a la agregación por parte de este tipo de moléculas ya ha sido múltiplemente referenciada, siendo atribuible a las interacciones intermoleculares de regiones hidrofóbicas que puedan quedar expuestas al solvente (Worn y Pluckthun, 2001; Pedroso y col., 2002; Honegger, 2008). Y si bien, no se pudieron obtener parámetros termodinámicos, ya que la agregación es un proceso irreversible y por lo tanto no está en el equilibrio (Honegger, 2008); si fue posible de manera cualitativa observar en un espectro de CD en el UV lejano que en el punto medio de la transición (60°C) aparece un estado intermedio enriquecido en componentes- $\beta$ , con una conformación similar que la que se encuentra a 90°C. Este estado intermedio es generado por una reorganización del estado nativo sin que sea requerido que la proteína despliegue parcial o totalmente para entrar en el embudo de agregación desde el embudo de plegamiento nativo. Existe evidencia de mecanismos de agregación parecidos que involucran reorganizaciones hacia estructuras *cross*- $\beta$  de precursores tanto desde el estado plegado, como por ejemplo en el caso de la microglobulina- $\beta$ 2 (Jahn y col., 2008) como desde estados parcial o totalmente desplegados, como por ejemplo en el caso de la agregación de ADA2h (Villegas y col., 2000; Cèrda-Costa y col., 2007). Adicionalmente, un análisis detallado realizado por FTIR nos mostró que la distribución de los componentes- $\beta$  en este estado intermedio inducido por temperatura era mayoritariamente de tipo fibrilar WL (*worm-like*), siendo mínimo el de tipo fibrilar amiloide. La atribución de la banda a 1626  $\text{cm}^{-1}$  como el componente WL se describió inicialmente para procesos de fibrilación de una molécula que presentan el mismo tipo de plegamiento que la nuestra: plegamiento de las inmunoglobulinas, concretamente la de la microglobulina- $\beta$ 2 (Jahn y col., 2008). Recientemente, se ha descrito la formación de fibras WL por parte de plegamientos que no se corresponden a un todo- $\beta$ , como es el caso de la proteína priónica de ratón (moPrP) (Jain y Udgaonkar, 2011; Singh y col., 2012). Lo observado en el análisis FTIR está en concordancia con el hecho de que este estado intermedio rico en componentes- $\beta$ , se acumula de forma independiente a la concentración proteica, siguiendo por lo tanto; una cinética no dependiente de nucleación, que es propia de la vía de agregación WL (Gosal y col., 2005; Jahn y col., 2008). Así mismo, está en concordancia con un estudio mediante microscopía electrónica (TEM) realizado en el grupo de investigación de forma paralela por Marin-Argany (Marin-Argany y col., 2011;

Marin-Argany, 2013), en el que se visualiza que la incubación del scFv-h3D6 a 60°C inicia un proceso de agregación mediante la formación de fibras del tipo *worm-like* (WL), siendo la fibrilación WL más evidente a 90°C (ver figura A2 de anexos). Mencionar también que en dicho estudio se demostró que el scFv-h3D6 era capaz de formar un complejo con los oligómeros de A $\beta$ , desviando la ruta citotóxica de fibrilación amiloide hacia una ruta no citotóxica de fibrilación WL y demostrando que la fibrilación WL era una propiedad intrínseca del scFv-h3D6 (Marin-Argany y col., 2011).

Cuando se intentó caracterizar este intermediario mediante susceptibilidad proteolítica con termolisina, se encontró que la proteína era digerida sin que hubiera un perfil de digestión definido, sugiriendo que los dos dominios que componen la proteína (V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub>) presentaban una conformación que los hace igualmente susceptibles a la proteólisis.

Otros plegamientos similares son conocidos por agregar *in vivo formando* fibras amiloides, como es el caso de: i) las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas, especialmente sus dominios variables (V<sub>L</sub>) (Baden y col., 2008) y de; ii) la microglobulina- $\beta$ 2, una proteína pequeña de 99 residuos y con una secundaria todo hoja- $\beta$  que forma parte del complejo de histocompatibilidad Clase I. De hecho, la fibrilación *in vitro* tipo WL de la microglobulina- $\beta$ 2 se encuentra inducida por condiciones de alta fuerza iónica y pHs ácidos. Por el contrario, la fibrilación WL en el scFv-h3D6 se da en condiciones fisiológicas (PBS) después de la inducción térmica. Aunque la tendencia general a la agregación por parte de las moléculas de scFv bajo una desnaturalización térmica ya ha sido previamente reportada en la literatura, esta es la primera vez que se describe la conformación de estos agregados.

En contraste con lo ocurrido con la desnaturalización térmica, la desnaturalización química con urea permitió el desplegamiento total de la molécula sin agregación. Debido a que durante el proceso de desnaturalización los cambios en la intensidad de los espectros de emisión de Trp pueden incrementarse o disminuirse por un efecto derivado de la contribución y compensación de cada uno de los Trp presentes en la proteína, se determinó que la mejor manera de cuantificar la exposición al solvente de dichos residuos era mediante la medición del desplazamiento hacia el rojo del máximo de emisión de los espectros de fluorescencia Trp, ya que esta ocurre de manera unidireccional (Jager y Pluckthun, 1999). El proceso de desplegamiento del scFv-h3D6 sigue dos transiciones derivadas de la presencia de 3 estados de plegamiento (nativo, intermediario y desplegado). La presencia de intermediarios de plegamiento ya ha sido previamente descrita para otras moléculas tipo scFv (Worn y Pluckthun, 1998; Ramm y col., 1999; Jagüer y Pluckthun, 1999). De hecho, Pluckthun y colaboradores notificaron que durante el desplegamiento de la molécula del scFv ocurrían tres procesos: la

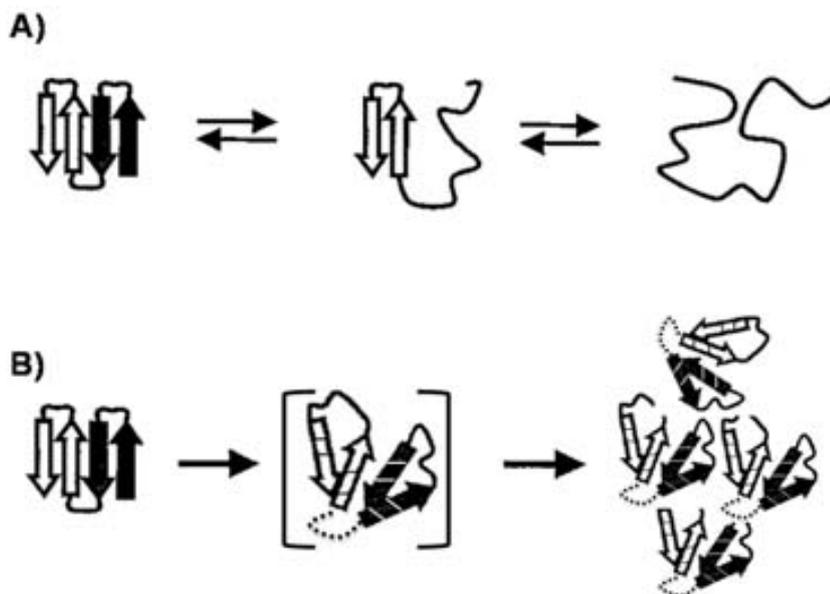
disrupción de la interficie interdominio, la desnaturalización de un dominio y la desnaturalización del otro dominio; así mismo, propusieron un modelo donde el desplegamiento de estas moléculas es secuencial dependiendo de la estabilidad de la interficie entre dominios y de la estabilidad intrínseca de cada dominio. Así, este modelo clasifica a los scFv en cuatro Clases, de entre ellos nuestra molécula cae dentro de la Clase I, que se caracteriza por presentar grandes diferencias de estabilidad entre los dos dominios ( $V_H$  y  $V_L$ ); de tal forma, que la estabilidad intrínseca de uno de los dominios es superior a la estabilidad del otro dominio (incluyendo la contribución de la estabilidad extrínseca de la interficie). En consecuencia, un estado intermedio metaestable puede acumularse en el equilibrio y detectarse durante la curva de desplegamiento (Worn y Pluckthun, 1998, 1999, 2001), justo lo que ocurrió en nuestro caso.

El scFv-h3D6 contiene cinco residuos Trp, uno por cada núcleo hidrofóbico de cada dominio ( $V_H$ -W36 y  $V_L$ -W35) y tres están localizados en la interficie interdominio ( $V_H$ -W47,  $V_H$ -W103 y  $V_L$ -W89) (figura I19.C de la introducción). Cuando el dominio menos estable ( $V_L$ ) se despliega, ocurre además la disrupción de la interficie; provocando la exposición tanto de los residuos de la interficie desaparecida como del residuo del núcleo hidrofóbico del dominio  $V_L$ , de tal forma, que en la primera transición se observa un gran desplazamiento del máximo de emisión (13 nm en nuestro caso). Alrededor de 5 M de urea ocurre la acumulación de un estado intermedio, que consiste en el dominio  $V_L$  desplegado y el dominio  $V_H$  plegado. Finalmente durante la segunda transición se despliega el dominio más estable  $V_H$  exponiendo el último residuo Trp del núcleo hidrofóbico y observándose solamente un pequeño desplazamiento del máximo de emisión (4 nm en nuestro caso). La determinación de los parámetros termodinámicos de la curva de desnaturalización, permitió conocer que la estabilidad intrínseca del dominio  $V_H$  es de  $-37 \text{ KJ mol}^{-1}$ , y que la suma de la estabilidad intrínseca del dominio  $V_L$  más la contribución de la interficie es de  $-19 \text{ KJ mol}^{-1}$ .

La asignación de cada dominio para las transiciones observadas durante el desplegamiento del scFv-h3D6, ha sido corroborada siguiendo la proteólisis del estado intermedio con la subsecuente secuenciación N-terminal del dominio resistente a la proteólisis ( $V_H$ ). Estando en concordancia con lo observado en los espectros de CD, donde el mínimo de elipticidad a 230 nm, característico de algunos dominios  $V_L$  (Tsybovsky y col., 2007; Baden y col., 2008), va progresivamente desapareciendo durante la primera transición; mientras que la señal positiva a 237 nm desaparece durante la segunda transición.

Los procesos de desnaturalización química y térmica ocasionan dos intermediarios perfectamente diferenciables, el primero de ellos, corresponde a un intermediario termodinámico metaestable reversible, que forma parte de la vía de plegamiento del scFv-h3D6, y muestra susceptibilidad proteolítica por parte del dominio desplegado ( $V_L$ ) (figura D1.A); y el segundo intermediario es de tipo cinético irreversible, ya que se encuentra fuera de la vía productiva del plegamiento nativo al promover agregación, y ambos dominios muestran la misma susceptibilidad frente a la proteólisis (figura D1.B). A pesar de dichas diferencias, existe un acoplamiento entre la tendencia a la agregación y la estabilidad termodinámica que relaciona ambos intermediarios, de tal forma que un incremento en la estabilidad del estado nativo mediante un rediseño racional puede evitar o disminuir la agregación (Villegas y col., 2000). Sin embargo lo contrario no siempre es cierto: aunque la desestabilización de un plegamiento facilite el salto al embudo de agregación, el residuo desestabilizante ha de cumplir una serie de propiedades, especialmente en cuanto a su tendencia a formar estructura  $\beta$  y no contener cargas que pudieran interferir en la formación de dicha estructura (Cerdà-Costa y col., 2007, 2009).

Todas estas observaciones, señalan al dominio  $V_L$  del scFv como el blanco para el rediseño de la estabilidad termodinámica de la proteína y de la disminución en su tendencia a la agregación.



**Figura D1. Intermediarios de plegamiento del scFv-h3D6. A) Intermediario termodinámico inducido químicamente.** Durante el proceso de desplegamiento se da lugar la formación de una especie intermedia (I), que consiste en el dominio  $V_L$  desplegado y el dominio  $V_H$  plegado y que forma parte de la vía productiva de plegamiento. Al final del proceso prevalece la especie desplegada (U). **B) Intermediario cinético inducido térmicamente.** El intermediario térmico, que es el precursor de la vía de agregación WL, se encuentra fuera de la vía productiva de plegamiento y presenta una conformación global donde ambos dominios ( $V_H$  y  $V_L$ ) son igualmente susceptibles a la digestión.

### **D3. El tratamiento con scFv-h3D6 WT mejora las capacidades cognitivas, elimina los oligómeros de A $\beta$ y restaura los niveles de clusterina y apoE en ratones 3xTg-AD**

Recientemente en el grupo de investigación se ha demostrado que en condiciones nativas el scFv-h3D6 tiene la habilidad de prevenir *in vitro* la toxicidad inducida por la formación de oligómeros de A $\beta$  en cultivos celulares de neuroblastoma humano. El mecanismo molecular consiste en el desvío de la ruta de fibrilación del péptido A $\beta$ , por captura de sus oligómeros, hacia la ruta no citotóxica de fibrilación tipo WL gobernada por el scFv-h3D6 (Marin-Argany y col., 2011).

Para la evaluación funcional del scFv-h3D6 *in vivo*, se probó el potencial terapéutico, tanto a nivel conductual como molecular, de una única dosis vía intraperitoneal de 85  $\mu$ g de la molécula en ratones hembras de un modelo triple transgénico (3xTg-AD) de 5 meses de edad, el cual corresponde a una etapa temprana de la enfermedad (Oddo y col., 2003). Esta elección se debe a varias razones: i) a nivel molecular, el modelo triple transgénico es el modelo fisiopatológicamente más completo existente hasta la fecha, exhibiendo una aparición de A $\beta$  correlacionada con el deterioro cognitivo a partir de los 4 meses de edad (Oddo y col., 2003; Hall y col., 2012); ii) existen múltiples reportes que indican los ratones hembras exhiben una mejor muestra del deterioro cognitivo y anomalías conductuales relacionados a la AD (Clinton y col., 2007; Gimenez-Llort y col., 2007) y; iii) la vía intraperitoneal, es una ruta de administración de fácil translación a humanos.

En ratones hembras 3xTg-AD jóvenes (4-7 meses de edad), las características comunes relacionadas con las primeras anomalías conductuales y sintomatología psicológica propia del deterioro cognitivo son: i) deficiencia de la memoria y aprendizaje a corto y largo plazo e; ii) hiperactividad en los patrones de nado (en términos de un aumento de la velocidad (cm/s) de navegación) en una serie de pruebas MWM (*Morris water maze*) (Gimenez-Llort y col., 2007, 2010, 2013; García-Mesa y col., 2011).

A nivel conductual, el tratamiento con scFv-h3D6 demostró su efectividad al ser capaz de: i) revertir los patrones de nado de los ratones 3xTg-AD a los valores normales mostrados por los ratones NTg, así como; ii) atenuar las deficiencias en memoria y aprendizaje manifestadas, mejorando las estrategias de búsqueda de la plataforma en las pruebas del laberinto acuático (MWM) (Gimenez-Llort y col., 2013).

Ante la amplia evidencia de la mala correlación existente entre la cantidad de depósitos amiloides insolubles y el deterioro cognitivo en humanos (Terry y col., 1991; Dickson y col., 1995), además de los múltiples reportes que señalan a los oligómeros

de A $\beta$  solubles como las especies más citotóxicas y por tanto responsables de la pérdida de la sinapsis y la muerte neuronal. (McLean y col., 1999; Lue y col., 1999; Cheng y col., 2007; Larson y Lesné, 2012), hoy en día el papel de estas especies A $\beta$  solubles como los responsables de la fisiopatología de AD está ampliamente aceptado. Por ello, es importante desarrollar estrategias terapéuticas dirigidas a la eliminación de dichos oligómeros de A $\beta$  solubles, especialmente en etapas tempranas de la AD. Con esa finalidad, el scFv-h3D6 desarrollado en el grupo de investigación deriva del anticuerpo monoclonal mAb-h3D6 (también conocido como bapineuzumab) que reconoce específicamente oligómeros de A $\beta$  (Jacobson, 2006; Marin-Argany y col., 2011). Recordar que bapineuzumab es el mAb que ha llegado a fase III, y que los estudios se detuvieron en el año 2012 por la aparición de edemas vasogénicos (Thomas, 2012); también señalar que somos diversos grupos de investigación los que pensamos que utilizar fragmentos de anticuerpos que no contengan la región Fc, como es el caso de los scFv, es más seguro (Wang y col., 2009, 2010; Cattepoel y col., 2011).

Para comparar el nivel de la extensión de los oligómeros de A $\beta$  en las diferentes áreas del cerebro de hembras jóvenes 3xTg-AD y NTg que recibieron o no tratamiento, se analizaron extractos proteicos de hipocampo, córtex, bulbo olfatorio y cerebelo mediante una inmunodetección tipo *western-blot* con el anticuerpo 6E10.

Aunque la presencia de especies oligoméricas múltiples de trímeros fue localizada en prácticamente todas las áreas examinadas, fue en el córtex y bulbo olfatorio de ratones 3xTg-AD sin tratamiento donde se manifestaron cantidades mayores de estas especies. Y es precisamente en dichas áreas donde el tratamiento con scFv-h3D6 provoca una marcada disminución global de los oligómeros de A $\beta$  de 12-, 9- y 6- *mer*, sin que ocurra un efecto detectable con esta técnica en el perfil oligomérico de A $\beta$  en el hipocampo y/o el cerebelo.

Es interesante mencionar que en un estudio paralelo realizado recientemente en nuestro grupo de investigación con el modelo 3xTg-AD (hembras de 5 meses de edad), se demostró que en hipocampo y cerebelo se da una pérdida neuronal dependiente del tipo neuronal y el claro efecto protector de una única dosis de scFv-h3D6 contra la muerte neuronal (Esquerda-Canals y col., 2013; Esquerda-Canals, 2013). El estudio sobre la muerte neuronal en el córtex y el efecto del scFv-h3D6 se encuentra en progreso. Adicionalmente, se detectó A $\beta$  intracelular por inmunohistoquímica (IHC) en las cuatro áreas estudiadas (hipocampo, córtex, bulbo olfatorio y cerebelo), pero no placas amiloides por estudiar una fase temprana; y, aun más interesante, se visualizó

el aclaramiento debido a el tratamiento con scFv-h3D6 en todas las áreas (Esquerda-Canals, 2013).

Las diferentes cargas amiloides del córtex y el bulbo olfatorio descritas por WB en esta tesis ya habían sido descritas anteriormente en la literatura (Hedberg y col., 2010), en concordancia con una progresión neuroanatomica característica de las afectaciones cerebrales que sufren los pacientes humanos, que se inicia en la corteza entorrinal. El bulbo olfatorio, el cual es principalmente colinérgico, también es una de las áreas de mayor sensibilidad. Por todo esto, el córtex resulta la mejor área blanco para el estudio en estadios tempranos de la AD, siendo por tanto idónea para evaluar el efecto de tratamientos preclínicos.

A pesar del hecho de que teóricamente el anticuerpo 6E10 tiene la capacidad de detectar todas las formas de A $\beta$ , en la inmunodetección por WB realizada no se detectaron especies de pesos moleculares menores (principalmente monómeros o dímeros), esto podría deberse a que la presencia de estas especies de bajo peso molecular se encuentra fuera del límite inferior de detección de la técnica, o a la total ausencia de estas especies en los tejidos analizados. Ahora bien, esta especie dimérica ha sido relacionada con el deterioro cognitivo de la enfermedad por sus elevados niveles encontrados en modelos murinos y en pacientes de AD (Kawarabayashi y col., 2004; Shankar y col., 2008, 2009; Mc Donald y col., 2010); aunque, hay que señalar que su detección principalmente se ha reportado en las etapas avanzadas o clínicamente diagnosticadas de la enfermedad acompañadas de las características placas amiloides, sugiriendo la relación entre la especie A $\beta$  dimérica y las fibras amiloides (Kawarabayashi y col., 2004; Shankar y col., 2008, 2009; Meilandt y col., 2009; McDonald y col., 2010). En consonancia con esta relación, en cerebros de ratones jóvenes transgénicos libres de placas amiloides estas especies A $\beta$  diméricas no han sido encontradas (Kawarabayashi y col., 2004), al igual que ocurre en sujetos sanos de hasta 50-60 años de edad (Lesné y col., 2013). Toda esta evidencia, está en concordancia con un experimento puntual paralelo de WB realizado en colaboración con la Dra. M.A. Baltrons, donde en muestras homogenadas provenientes de ratones envejecidos (10 meses) 3xTg-AD fue posible detectar a estas especies A $\beta$  diméricas.

Por otro lado, las especies que sí fueron detectadas en nuestros experimentos a los 5 meses de edad fueron las variantes de APP y una serie de oligómeros de A $\beta$ . En la fracción extracelular del grupo NTg se observa una banda correspondiente a la sAPP $\alpha$  (forma soluble de APP generada por proteólisis por la  $\alpha$ -secretasa de la vía no

amiloidogénica), mientras que en el grupo 3xTg-AD se observa, además de dicha banda, una banda algo menor en masa molecular correspondiente a la sAPP $\beta$  (forma soluble de APP generada por proteólisis por la  $\beta$ -secretasa de la vía amiloidogénica). Respecto a los oligómeros detectados en todos los extractos, estos se corresponden con múltiples triméricos (dodecámeros, nonámeros, hexámeros y trímeros). El planteamiento de que sean múltiples de tres, además de la evidente coincidencia en las masas moleculares, obedece a que hoy en día existen una serie de evidencias que sugieren a los trímeros como los bloques constitutivos de esta serie de oligómeros de A $\beta$ , que son considerados no fibrilares y son la primera especie oligomérica endógena en ser producida y secretada por las neuronas (Lesne y col., 2006; Ma y col., 2007). Y aunque podríamos hablar de una expresión basal dado que su expresión persiste durante prácticamente toda la vida, siendo incluso detectada en estadios muy tempranos de desarrollo (por ejemplo: a los 14 días en un embrión de tejidos neuronales de ratón Tg2576 o en tejidos humanos de 1 año de edad), su formación *in vivo* es dependiente de los niveles de producción de A $\beta$  (Larson y Lesné, 2012; Lesné y col., 2013). Adicionalmente a lo anteriormente expuesto, es de gran relevancia que las especies de A $\beta$  detectadas en las fracciones extracelulares, las cuales disminuyeron o fueron eliminadas bajo el tratamiento con scFv-h3D6, han sido múltiplemente relacionadas con la patología de AD; siendo consideradas las responsables de la disfunción cognitiva previa a la formación de las placas amiloides, en especial la especie dodecamérica (A $\beta$ \*56) (Kayed y col., 2003; Cheng y col., 2007; Lesné y col., 2006, 2013; Larson y Lesné, 2012). Por ello, estas especies son señaladas como los blancos de acción en los tratamientos preclínicos, por ejemplo: i) Movsesyan y col. (2008), desarrollaron una vacuna basada en DNA que fue capaz de disminuir los niveles de especies triméricas y hexaméricas en un modelo 3xTg-AD; ii) Hara y col. (2011), desarrollaron una vacuna de administración nasal basada en el virus recombinante Sendai (SeV) que redujo el contenido de la especie dodecamérica; iii) Lesné y col. (2006), relacionaron la expresión diferencial de especies dodecaméricas (A $\beta$ \*56) y nonaméricas con el primer deterioro cognitivo que ocurre en ratones Tg2576 de mediana edad, de igual forma, demostraron concretamente que el A $\beta$ \*56 es el principal responsable de pérdida de la memoria, mediante la inyección directa sobre una rata joven y sana, causándole un declive cognitivo.

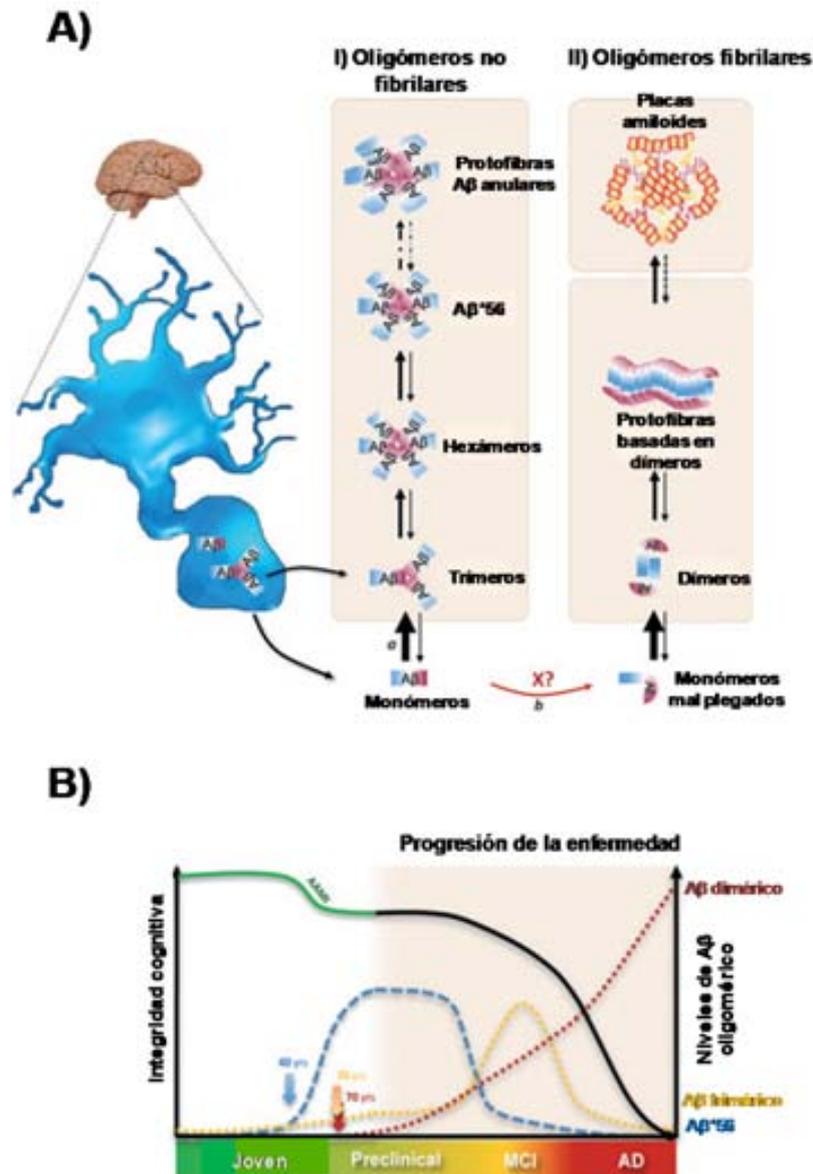
Por otro lado, se analizaron las fracciones de membrana e intracelulares, detectándose APP en hipocampo y córtex (que debería de corresponder con la forma no procesada). En las fracciones de membrana del hipocampo se detectaron trímeros, mientras el A $\beta$  intracelular de todas las áreas analizadas se encontraba en forma de

dodecámeros. En este punto hay que señalar que en la actualidad el análisis del A $\beta$  intracelular se realiza por dos metodologías diferentes: i) mediante un análisis inmunohistoquímico con un previo tratamiento ácido de los tejidos (Oddo y col., 2003) ó; ii) mediante un análisis de inmunodetección (ELISA o WB) con ó sin un previo fraccionamiento celular auxiliado de detergentes (Lesne y col., 2006). En la presente tesis se decidió emplear la segunda metodología, ya que su análisis nos permite determinar el grado de oligomerización del péptido A $\beta$  presente en las muestras. Resulta interesante, como el efecto de la inmunoterapia con scFv-h3D6 solo fue apreciable en extractos extracelulares, no así, en los intracelulares; ya que de entrada, contrasta con los últimos experimentos realizados en el grupo a nivel celular (Esquerda-Canals y col., 2013; Esquerda-Canals, 2013). Además, Laferla y col., (2007) señalan la acumulación de A $\beta$  intraneuronal como el iniciador de la patogénesis de AD, correlacionando la pérdida de sinapsis y memoria con la cantidad de A $\beta$  intracelular en el modelo 3xTg-AD; y describiendo que la eliminación de las placas A $\beta$  extracelulares se encuentra inmediatamente seguida por un aclaramiento de A $\beta$  intraneuronal, indicando que estos dos *pool* de A $\beta$  se encuentran directamente relacionados mediante un equilibrio dinámico (Oddo y col., 2004). Al día de hoy, esta hipótesis se encuentra inmersa en una controversia dada la existencia de múltiples reportes que ponen en duda el rol de A $\beta$  intracelular en la patología y la relación de los dos *pool* de A $\beta$ , por ejemplo: i) existe evidencia documentada sobre la presencia de A $\beta$  intraneuronal tanto en cerebros de personas saludables como enfermas de AD (Gouras y col., 2012); ii) se ha señalado que el A $\beta$  intracelular no es indicador del declive cognitivo en AD ni en DS (síndrome de Down, que sufre la patología debido a que la APP se codifica en el cromosoma 21), ya que sus niveles se mantienen durante la progresión de ambas enfermedades (Wegiel y col., 2007) y; iii) en un análisis de expresión diferencial-temporal de oligómeros de A $\beta$  relacionados con el declive de la memoria en ratones Tg2576 de edad media, no se encontró relación de los oligómeros de A $\beta$  intracelular con dicho declive (Lesne y col., 2006). Finalmente señalar que recientemente se ha avivado más la polémica, debido a la publicación de un reporte donde se señala que la acumulación del material A $\beta$  intraneuronal correlacionado con la pérdida de sinapsis y memoria en la bibliografía se corresponde en realidad a la APP completa, pero no al péptido A $\beta$  libre o en estado oligomérico. Su argumentación es que, en las inmunohistoquímicas se emplearon anticuerpos que no discriminan entre los epítomos de la APP entera y de los péptidos generados por acción de las secretasas (Winton y col., 2011). En cualquier caso, se sabe que la demencia característica de la AD se encuentra fuertemente correlacionada con los niveles de A $\beta$  soluble (McLean y col., 1999; Larson y Lesné, 2012), los cuales, son claramente

disminuidos (a los 5 días de administrar intraperitonealmente un único tratamiento con scFv-h3D6) en el córtex y el bulbo olfatorio de ratones hembra 3xTg-AD de 5 meses de edad.

A modo de concluir toda la información generada por parte de los perfiles oligoméricos de A $\beta$  solubles observados, señalar que el hecho de encontrar especies múltiples de trímeros y no A $\beta$  dimérico en las muestras de ratones 3xTg-AD jóvenes, coincide con un modelo propuesto por Larson y Lesne (2012) para los perfiles de expresión oligomérico de A $\beta$  endógeno en tejidos de cerebro humano (figura D2). Dicho modelo propone la existencia de dos vías de oligomerización en el proceso neurodegenerativo de AD (figura D2.A). Consistiendo la primer vía en un proceso de oligomerización del A $\beta$  trimérico, favorecido termodinámicamente bajo condiciones fisiológicas en edades tempranas y estadios preclínicos de AD. Los oligómeros resultantes, en especial el A $\beta$ \*56 que alcanza un *plateau* en esta etapa, evaden la formación fibrilar y son responsables de una primera disminución cognitiva. Posteriormente debido a una posible desestabilización de la vía de oligomerización no fibrilar a favor de la vía de oligomerización fibrilar, por un factor que aún se desconoce; ocurre un aumento de los niveles de especies trimericas y diméricas a expensas de la disminución de la especie A $\beta$ \*56 (figura D2.B) que coincide con una segunda disminución de las capacidades cognitivas. Finalmente en la etapa clínica de AD, los niveles de las especies A $\beta$  trimericas y A $\beta$ \*56 se encuentran en cantidades discretas, mientras se incrementa la formación de la especie A $\beta$  dimérica que rápidamente crea protofibras que contribuyen a la formación de las placas amiloides.

Por todo esto, señalar que el tratamiento con scFv-h3D6 constituye una prometedora y efectiva terapia en la eliminación y prevención de la formación de especies oligoméricas de A $\beta$  citotóxicas ya en las primeras fases de la enfermedad.



**Figura D2. Modelo de la producción oligomérica de Aβ endógeno propuesto por Larson y Lesné (2012).** **A)** Las especies monoméricas y trimericas de Aβ son producidas y secretadas por las neuronas. Una vez en el fluido intersticial, éstas siguen un proceso de oligomerización del Aβ trimérico favorecido termodinámicamente en una vía no fibrilar que ocurre bajo condiciones fisiológicas en edades tempranas y estadios preclínicos de AD, con la subsecuente formación de la especie Aβ\*56. Después de la presencia de un factor no identificado, ocurre una desestabilización de la vía de oligomerización no fibrilar a favor de la vía de oligomerización fibrilar. Cuya primera etapa corresponde a la formación de la especie Aβ dimérica que rápidamente crea protofibras que contribuyen a la formación de las placas amiloides. **B)** El modelo de los perfiles de expresión endógena de oligómeros de Aβ en tejidos de cerebro humano, indica que en torno a los 40 años existe un incremento en la expresión de especies trimericas, en especial el Aβ\*56, coincidiendo con una primera disminución de las capacidades cognitivas que alcanza un plateau en etapas preclínicas de AD. Posteriormente al inicio de la etapa de deterioro cognitivo leve (MCI) ocurre un aumento de los niveles de especies trimericas y diméricas a expensas de la disminución de la especie Aβ\*56, que coincide con una segunda disminución de las capacidades cognitivas. Finalmente en la etapa clínica de AD, los niveles de las especies Aβ trimericas y Aβ\*56 se encuentran en cantidades discretas, mientras se incrementa la formación de la especie Aβ dimérica que rápidamente crea protofibras que contribuyen a la formación de las placas amiloides. Reproducido de Larson y Lesne (2012).

De forma complementaria se realizó una cuantificación mediante ELISA de las concentraciones de clusterina (apoJ) y apoE en las diferentes áreas analizadas. Lo que se encontró fue un incremento en los niveles de clusterina y apoE en el córtex de animales 3xTg-AD, así como un incremento de los niveles de apoE en el hipocampo. Interesantemente el tratamiento con scFv-h3D6 provocó en los tejidos anteriormente mencionados, una restauración a niveles no patológicos de las concentraciones de dichas apolipoproteínas. Las diferentes sensibilidades observadas en el córtex y el hipocampo esta en concordancia con la progresión neuroanatomica de las afectaciones que se dan en los cerebros de ratones 3xTg-AD (Oddo y col., 2003). Incluso hay diversos estudios en humanos, donde los tejidos en los que se observaron los niveles patológicos en nuestro modelo, han sido relacionados con AD; por ejemplo se ha reportado un incremento en los niveles de mRNA y proteína de clusterina en la área cortical e hipocampal en cerebros de pacientes AD (Duguid y col., 1989; May y col., 1990; Oda y col., 1994); así mismo, estudios inmunohistoquímicos con anticuerpos anti-clusterina la han identificado en asociación con placas amiloides y depósitos amiloides vasculares en córtex e hipocampo de pacientes AD (McGeer y col., 1992, 1994; Pasinetti y col., 1994; Kida y col., 1995; Choi-Miura y col., 1996).

La clusterina también conocida como apoJ (codificada por el gen CLU), es principalmente secretada por los astrocitos, y, aparte de las funciones en el transporte de lípidos, es una chaperona extracelular independiente de ATP; ha sido localizada en asociación con los depósitos extracelulares de proteínas agregadas de enfermedades degenerativas tales como la AD (Calero y col., 2000; Narayan y col., 2011). Se sabe que la clusterina inhibe la formación de agregados mediante la unión a la superficie de residuos hidrofóbicos (Humphreys y col., 1999), y que oligómeros de A $\beta$  de diferentes tamaños (desde dímeros hasta 50-*mer*) interactúan con la clusterina para formar complejos estables (Narayan y col., 2011). Estos complejos son eliminados mediante la interacción con la megalina (LRP-2) (Hammad y col., 1997; Nuutinen y col., 2009) y otros receptores de la familia LDLR (Mahon y col., 1999). Por otro lado, en un estudio en paralelo realizado en nuestro grupo de investigación se encontró que el complejo scFv-h3D6:A $\beta$  presenta una alta exposición de los residuos hidrofóbicos (Marin-Argany y col., 2011; Marin-Argany, 2013), por lo que resulta tentador proponer que la clusterina podría internalizar el complejo y, como consecuencia, tanto la clusterina como los oligómeros de A $\beta$  podrían verse disminuidos en las fracciones extracelulares de animales tratados.

Existe fuerte evidencia de que la clusterina y la apoE se encuentran reguladas de manera cooperativa (DeMattos y col., 2004). Células no neuronales, en particular la astrogliá y la microgliá son las principales productoras del transportador de lípidos

apoE, mientras que las neuronas preferencialmente expresan receptores de apoE. Esta apolipoproteína ha sido co-localizada con placas amiloides, jugando un papel al potenciar su aclaramiento y degradación (Koistinaho y col., 2004; Deane y col., 2008). De hecho, el alelo *APOE4* humano incrementa los riesgos de desarrollar AD, plausiblemente porque la avidéz de unión al A $\beta$  se ve disminuida aproximadamente 20 veces con respecto al alelo más abundante *APOE3* (LaDu y col., 1994; Manelli y col., 2004). Se ha descrito que cambios específicos de la concentración de apoE4 en ratones EFAD-Tg derivan en la acumulación de A $\beta$  (LaDu y col., 1994; Youmans y col., 2012). Por otro lado, se ha descrito que la haploinsuficiencia de *APOE* humano reduce los depósitos amiloides en un modelo murino de amiloidosis A $\beta$  simultáneamente a una significativa disminución de la activación de la microglía (Kim y col., 2011), sugiriendo una relación entre la apoE y los procesos inflamatorios.

En base a toda esta información e integrando los resultados de los perfiles oligoméricos de A $\beta$  con los análisis de apoE y apoJ, podemos relacionar la disminución de las especies oligoméricas de A $\beta$  solubles, que son el principal blanco de acción del scFv-h3D6, con la restauración de los niveles de apoE y apoJ a valores no patológicos. Esto, tiene implicaciones importantes, ya que es probable que como parte del efecto del tratamiento con scFv-h3D6 no se presenten efectos secundarios, concretamente los relacionados con procesos neuroinflamatorios, siendo necesario realizar estudios complementarios para verificarlo. De comprobarse esto, estaría en concordancia con la hipótesis del grupo de investigación, apoyada por diversos estudios de inmunoterapia (Wang y col., 2009, 2010; Cattepoel y col., 2011), que propone una mayor seguridad en el empleo de las moléculas scFv en comparación con el uso de anticuerpos completos.

A modo de conclusión en la presente tesis, se sugieren los beneficios del scFv-h3D6 a nivel conductual y molecular. Principalmente, por su capacidad para eliminar oligómeros de A $\beta$ , señalados como citotóxicos, y restaurar los niveles de clusterina y apoE en un modelo murino 3xTg-AD que desarrolla la enfermedad de Alzheimer.

#### **D4. La elongación del C-terminal del dominio V<sub>L</sub> incrementa la estabilidad y disminuye la tendencia a la agregación del scFv-h3D6**

El dominio de menor estabilidad en nuestra molécula de scFv es el dominio V<sub>L</sub> (considerándose tanto la estabilidad intrínseca del propio dominio como la contribución proporcionada por la estabilidad de la interficie). Ahora bien, en principio, tanto la estabilidad intrínseca de los dominios V<sub>H</sub> y V<sub>L</sub> como la estabilidad de la interficie

pueden ser incrementados mediante la introducción de mutaciones puntuales estabilizadoras (Wörn y Pluckthun, 2001). Siendo por tanto, el dominio  $V_L$  sobre el cual se centró mayoritariamente el rediseño para la mejora de su plegamiento. Adicionalmente, en la revisión de las regiones con alta tendencia a la agregación mediante el algoritmo TANGO se encontraron cuatro regiones con alta tendencia a la agregación: del dominio  $V_H$  (A88-V93 y T107-V111) y del dominio  $V_L$  (L47-V51 y V85-W89), que sirvieron también como referencia para la elección de las mutaciones que pretendían disminuir la tendencia a la agregación. Las mutaciones elegidas en el dominio  $V_L$  fueron:  $V_L$ -L9S localizada en la cadena- $\beta$  A del FRL1,  $V_L$ -Y49T localizada en la cadena- $\beta$  C' del FRL2 (región con alta tendencia a la agregación) y tres variantes que extienden el C-terminal, descritos más adelante de forma específica, localizados en la cadena- $\beta$  G del FRH4 ( $V_L$ -el-R108G,  $V_L$ -el-R108 y  $V_L$ -el-R108T109). Adicionalmente se incluyó la mutación  $V_H$ -V89N realizada concretamente en una región con alta tendencia a la agregación ubicada en la cadena- $\beta$  F del FRH3 en el dominio  $V_H$ .

El modelo tridimensional del scFv-h3D6 permitió la observación de que la finalización del C-terminal de la molécula, el cual corresponde a  $V_L$ -K107, aun pertenece a la cadena- $\beta$  G. De tal forma, que las cadenas laterales de los residuos  $V_L$ -E105 y  $V_L$ -K107 se encuentran enfrentadas hacia el mismo lado de la cadena- $\beta$  y establecen interacciones electrostáticas, las cuales pueden encontrarse debilitadas debido a la proximidad del OXT107-O. La proposición de la presente tesis en este punto es que la elongación del C-terminal podría separar el OXT-O de la cadena lateral del residuo  $V_L$ -K107 y propiciar una estabilización de la estructura secundaria. Para probar la posibilidad de incrementar la estabilidad intrínseca del dominio  $V_L$  por elongación de su C-terminal, se examinó mediante un alineamiento estructural los residuos del C-terminal de 24 moléculas de scFv; encontrando que en 16 de estas moléculas se finaliza con  $V_L$ -K107, en 6 se finaliza con  $V_L$ -R108 y en 2 ocasiones se finaliza con  $V_L$ -T109. En base a esta información, se generaron los mutantes de elongación:  $V_L$ -el-R108 (C2),  $V_L$ -el-R108T109 (C3) y adicionalmente se construyó el mutante  $V_L$ -el-R108G (C1) para probar la hipótesis del efecto del OXT107-O en el empaquetamiento de la cadena- $\beta$  G.

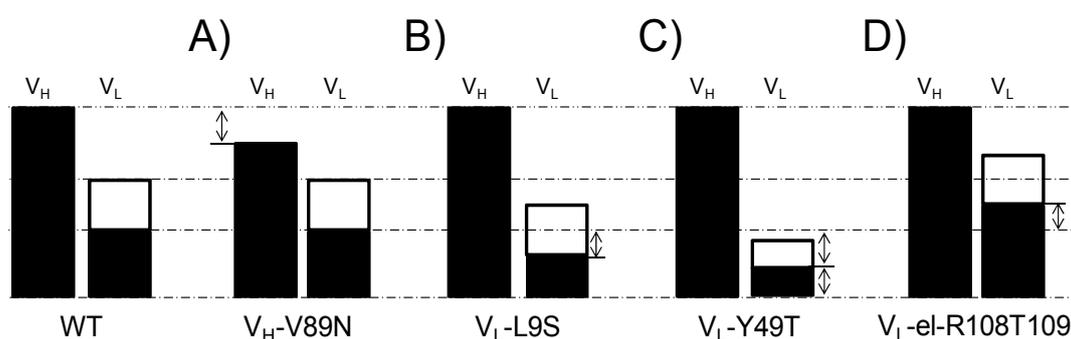
En términos generales, el comportamiento de las seis variantes proteicas en su desplegamiento inducido por un agente desnaturizante (urea) nos mostró, que tres de ellas resultan ser mutaciones desestabilizadoras de los dominios en donde se encuentran localizados, y que las tres variantes de elongación del C-terminal estabilizaron en diferente grado el plegamiento del dominio  $V_L$ . Y es en este punto, donde podría resultar contrastante que a pesar de los efectos observados de cada

variante en las estabildades de tanto los dominios  $V_H$  y  $V_L$ , los rendimientos globales de expresión y purificación obtenidos de todas las variantes proteicas no se vieron modificados con respecto a los obtenidos por el WT: ~40 mg/L de proteína precursora y de ~3 mg/L de proteína madura nativa. Si bien a menudo se cree que la estabilidad de fragmentos tipo scFv está directamente correlacionada con el rendimiento en la expresión, esto es solo parcialmente cierto, ya que como se evidenció en ciertos casos no necesariamente existe una relación directa entre la estabilidad termodinámica y los niveles de expresión funcional. Por mencionar algunos ejemplos, tenemos que: i) se ha reportado mutaciones con prolina en la posición L8 que resultan estabilizadoras tanto en el scFv anti-hemaglutinina 17/9 (Spada y col., 1998), como en el scFv A48 anti-levan (Wörn y Pluckthun, 1999), y que provocan una disminución en la expresión periplasmática, e incluso una disminución en el rendimiento del replegamiento; ii) Knappik y Pluckthun (1995), identificaron mutaciones en los *loops* de scFvs que afectaban a la agregación y al rendimiento del plegamiento *in vivo* sin que la estabilidad integral de la molécula se viera afectada y; iii) mutaciones desestabilizadoras de la interficie de un scFv derivado del anticuerpo anti-fluoresceína 4-4-20 mostraron un incremento en la expresión soluble en periplasma (Nieba y col., 1997), siendo en algunos casos excluyente la alta estabilidad con una alta expresión soluble para mutaciones realizadas en la región de la interficie de scFvs (Jung y col., 1999).

Concretamente, en las variantes más desestabilizadas observamos que por ejemplo: i) a pesar de que la variante  $V_H$ -V89N en condiciones nativas presenta un espectro de CD UV lejano sin cambios en la estructura secundaria, la evaluación de las curvas de urea evidenció una severa disminución de la estabilidad intrínseca del dominio  $V_H$ , sin afectar a la estabilidad del dominio  $V_L$  ni a la estabilidad de la interficie interdominio, implicando que la contribución de la estabilidad de la interficie es casi nula en la estabilidad global del dominio  $V_H$  (figura D3.A), por el contrario; ii) la variante  $V_L$ -Y49T presenta una fuerte disminución tanto de la estabilidad intrínseca del dominio  $V_L$  como de la estabilidad de la interficie interdominio (figura D3.C), manifestándose también como una notable disminución del mínimo local a 230 nm, que ha sido atribuido a la contribución de los aromáticos en dominios  $V_L$ , en el espectro de CD UV lejano en condiciones nativas. Si bien, la propuesta de estas variantes fue con fines de aumentar la estabilidad de la molécula, el resultado contrario puede ser justificado dada la localización de dichas mutaciones en zonas de alta tendencia de agregación con carácter hidrofóbico; siendo, por ejemplo, muy evidente la desestabilización que se da en la interficie interdominio en la variante  $V_L$ -Y49T, localizada precisamente en dicha región (ver figura R28). La variante  $V_L$ -L9S, aunque en menor grado que las señaladas

previamente, también resulto ser desestabilizadora para el dominio donde se encuentra; y, de acuerdo a lo observado y a su localización en el dominio afectado se presume que dicha disminución sea únicamente sobre la estabilidad intrínseca del dominio  $V_L$ , no así en la estabilidad de la interficie (figura D3.B).

Por otro lado las variantes estabilizadoras, que resultaron ser las variantes de elongación del C-terminal (C1, C2 y C3), presentan un ligero aumento o acentuación del mínimo local (230 nm) en los espectros de CD del UV lejano, relacionándolo con los incrementos de la estabilidad intrínseca del dominio  $V_L$ . Puntualmente, en el mutante de elongación que solo tiene una Gly (C1) se presentó un ligero incremento en su estabilidad termodinámica (tabla R5), y aunque este incremento fue pequeño ( $\sim 1.7 \text{ KJ mol}^{-1}$ ), la estabilización del estado nativo también se ve reflejada en el hecho de que la tendencia a la agregación fue disminuida. En el mutante C2, la elongación con Arg ocasionó un aumento de la estabilidad del dominio  $V_L$  de  $\sim 3 \text{ KJ mol}^{-1}$ . Y en el caso del mutante C3 que extiende la cadena- $\beta$  G con dos residuos (Arg-Thr), el aumento de la estabilidad es de  $\sim 5 \text{ KJ mol}^{-1}$ , llegando a representar un aumento de cerca del 26% de la estabilidad del dominio  $V_L$ . La cooperatividad del proceso de desplegamiento, tanto del dominio  $V_L$  como  $V_H$ , prácticamente no se ve modificada en los mutantes que solo extienden el C-terminal con un residuo, pero en el caso del mutante C3, la cooperatividad del desplegamiento del dominio  $V_L$  presenta un ligero aumento ( $\sim 0.7 \text{ KJ mol}^{-1} \text{ M}^{-1}$ ), lo cual nos indica que es el mutante más estable; ya que un incremento en la cooperatividad de la primera transición es indicativo de una mayor compactación del estado nativo y consecuentemente también de un incremento en la estabilidad intrínseca del propio dominio (figura D3.D).



**Figura D3. Representación de las estabilidades de los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de las variantes proteicas del scFv-h3D6.** Las estabilidades intrínsecas de los dominios están representadas por las barras negras, las contribuciones extrínsecas de la interficie están representadas por las barra vacías. La estabilidad del dominio  $V_H$  corresponde a la totalidad de la barra izquierda y la del dominio  $V_L$  a la de la barra derecha.

La desnaturalización térmica seguida tanto por CD como por fluorescencia Trp, permitió observar una reorganización del estado nativo del WT que inicia pasando los 50°C y finaliza alrededor de los 60°C dando lugar a un estado intermediario rico en componente- $\beta$  que promueve la agregación proteica. Ahora bien, en el caso de todos los mutantes de elongación del C-terminal, se observó que esta transición ocurre a temperaturas más elevadas, lo que es un indicador de que se disminuyó la tendencia a la agregación.

El acoplamiento entre la estabilidad termodinámica y las propiedades de agregación es uno de los fenómenos más comunes descritos en la literatura, ya sea para moléculas con plegamiento tipo inmunoglobulinas, por ejemplo: en mutaciones puntuales del scFv A48 (Wörn y Plückthun, 1999) y dominios variables ( $V_K$ ,  $V_L$ ) (Ewert y col., 2003); o bien, para otro tipo de plegamientos, como por ejemplo: mutantes de ADA2h (Villegas y col., 2000). Esta correlación se cree se deba al hecho de que la agregación usualmente se inicia a partir de intermediarios de plegamiento en lugar de desde un estado completamente desnaturalizado (Wetzel y col., 1990; Villegas y col., 2000; Cèrda-Costa y col., 2007). Aunque ciertamente la estabilidad termodinámica es una buena forma de predecir la estabilidad térmica en inmunoglobulinas (Honegger y col., 2008), en algunos casos esta correlación no es del todo perfecta; como ocurre en nuestro caso, en donde a pesar de que las variantes de elongación presentan diferentes grados en la estabilización del dominio  $V_L$  (comparar cooperatividad y  $\Delta G$  de C1 y C3, por ejemplo), prácticamente todas las variantes muestran la misma disminución de  $\sim 4^\circ\text{C}$  en la tendencia a la agregación; hecho que evidencia, que aunque existe una cierta correlación, esta no está perfectamente acoplada. En este aspecto, señalar que en la bibliografía también existen diversos casos en donde se señala este fenómeno, por ejemplo: en diferentes mutantes de la interleuquina-1 $\beta$  (Chrnyk y Wetzel, 1993), mutantes de acilfosfatasa de musculo humano (AcP) (Chiti y col, 2003) o en algunos mutantes desestabilizadores de ADA2h (Cèrda-Costa y col., 2007).

Para entender mejor que modificaciones en la distribución de los componentes- $\beta$  son las responsables de los cambios en la tendencia a la agregación, se realizó un análisis del IR de la banda de la amida I' a diferentes temperaturas, ya que esta técnica nos permite distinguir diferencias según el grado de empaquetamiento de las diferentes hojas- $\beta$ . La banda de la amida I' surge del estiramiento vibracional C=O de cada enlace peptídico, y la fuerza de acoplamiento depende en gran medida de la conformación de la cadena polipeptídica. Como regla general, la posición del componente en hoja- $\beta$  se desplaza a números de onda inferiores como resultado ya sea del incremento del número de los puentes de hidrógeno, de la adquisición de una

hoja- $\beta$  más planar, o del aumento del número de cadenas- $\beta$  (Zandomeneghi y col., 2004). El análisis FTIR nos mostró que antes de la transición térmica (25 y 50°C), no se encontraron diferencias en la distribución de las estructuras de hoja- $\beta$  de los mutantes de elongación C-terminal, con respecto al mostrado por el WT; siendo el componente de hoja- $\beta$  nativa (1637  $\text{cm}^{-1}$ ) el que domina el espectro FTIR. Una vez que la reorganización ha dado lugar al estado intermedio (60°C), en el espectro aparecen componentes de hoja- $\beta$  más compactos (centrados a frecuencias más bajas). Estos componentes fueron previamente atribuidos en el WT como fibras tipo *worm-like* (WL, 1627  $\text{cm}^{-1}$ ) y tipo amiloide (1616  $\text{cm}^{-1}$ ), siendo el componente WL el más abundante en los espectros a 60°C (Marin-Argany y col., 2011). La elongación del C-terminal del scFv-h3D6 de forma progresiva (del C1 al C3), permitió mantener un porcentaje mayor de componentes de hoja- $\beta$  nativa en el estado intermedio, disminuyendo además los componentes fibrilares WL y amiloide. Adicionalmente, los centros de las bandas correspondientes a las estructuras de hoja- $\beta$  de las variantes de elongación presentan un desplazamiento hacia números de onda inferiores, lo cual indica una red de interacción de mayor densidad entre las cadenas. Esto es especialmente claro para la variante más estable C3 (R108T109), en donde resulta difícil diferenciar entre las diferentes bandas, esto debido a que se encuentran en el límite de los valores previamente definidos en la literatura para las diferentes estructuras- $\beta$  (Zandomeneghi y col., 2004; Marin-Argany y col., 2011). Aunque resulta tentador correlacionar las diferencias observadas en el espectro de FTIR del intermedio inducido térmicamente de la variante C3 con la mayor cooperatividad del plegamiento de su dominio  $V_L$  (valor de  $m_{I-N}$ ); no se pudo concluir esta presunta correlación, ya que las variantes C1 y C2 mantienen sus valores de  $m_{I-N}$  semejantes al WT y también exhiben diferencias en el espectro FTIR (aunque no tan marcadas como la presentada por la variante C3).

En resumen, la estabilización del plegamiento del estado nativo tiene como resultado la desestabilización del estado intermedio térmicamente inducido y una subsecuente disminución en la tendencia de agregación, especialmente para la variante C3 que incrementa su estabilidad en ~26% y disminuye ~4°C su tendencia a la agregación.

En un trabajo paralelo a este, Marin-Argany (2013) observó que estas variantes de elongación C-terminal, en comparación con el WT, no disminuyen su capacidad en condiciones fisiológicas de formar un complejo con el péptido  $A\beta_{1-42}$  dando lugar a la aparición de agregados tipo WL no citotóxicos. Lo cual significa un mejoramiento en el plegamiento del scFv-h3D6 sin alterar el efecto protector de la molécula. Señalar que en términos generales los scFvs presentan vidas-medias cortas, por lo que, la principal repercusión del incremento en la estabilidad termodinámica y disminución en la

tendencia a la agregación de estas variantes es aumentarla, con una consecuente efectividad a dosis menores que la forma WT en un modelo *in vivo*; o, dicho de otra manera, con un aumento de la efectividad a la misma dosis

Dado que como se mencionó en el apartado anterior (D3), el scFv-h3D6 WT presenta beneficios a nivel conductual y molecular en un modelo murino de la enfermedad de Alzheimer, el siguiente propósito sería probar las variantes de elongación C-terminal aquí descritas en el mismo modelo. Señalar que, además de la importancia que tiene esta molécula por su potencial terapéutico para el tratamiento de la AD, los resultados obtenidos en esta tesis Doctoral podrían ser extrapolados a otras moléculas de scFv Clase I de interés terapéutico.



**CONCLUSIONES**

---

---



### C1. Expresión y purificación de scFv-h3D6

1. Los sistemas de expresión extracelular y periplasmática, utilizando disulfuroisomerasas DsbA, DsbC o un péptido señal pelB; así como cepas de *E. coli* BL21 (DE3) pLys, resultan deficientes para la expresión del scFv-h3D6.
2. Los sistemas de expresión intracelular mediante la fusión con los *carriers* Trx y NusA, en una cepa deficiente en las reductasas como es *E. coli* Origami 2 (DE3), permiten la obtención de una fracción de proteína soluble; siendo el carrier NusA el de mayor capacidad para solubilizar la proteína expresada.
3. Las condiciones de expresión heteróloga óptima del scFv-h3D6 en *E. coli* origami2 (DE3) son: inducción con IPTG a una concentración de 0.5 mM, durante 12 h y a una temperatura de 20°C.
4. El replegamiento utilizando como agente solubilizante a la Urea 8 M, incluso con diluciones tan bajas como 1/10, permite la recuperación de proteína insoluble con un alto rendimiento.
5. El procesamiento de la proteína fusionada, tanto con Trx como con NusA, mediante corte con la proteasa TEV, así como las condiciones de purificación, requiere de tampones con una alta fuerza iónica en una región de pH comprometida para mantener la solubilidad de la proteína.
6. La proteína obtenida a partir de las fracciones solubles e insolubles, ya sea provenientes de la fusión con Trx como con NusA, presentan diferencias en la tendencia a la agregación, así como en la susceptibilidad frente a proteasas de la cepa huésped. Estas diferencias para una misma secuencia aminoacídica aunado a la presencia de puentes disulfuro de la molécula, apuntan a la hipótesis del *scrambling* como la posible causa de dicho fenómeno.
7. Mediante técnicas cromatográficas como RP-RPLC y CEx fue posible separar la conformación nativa del scFv del resto de conformeros *scrambled*; aunque, la primera técnica resulta demasiado astringente para poder recuperar la proteína en forma funcional.
8. Las desnaturalizaciones térmicas seguidas por fluorescencia de Trp o CD en el UV lejano, confirman la hipótesis del *scrambling*, al evidenciar la existencia de dos poblaciones: una población nativa y una población que corresponde a una mezcla de varios conformeros *scrambled*; con propiedades biofísicas bien diferenciadas.
9. Un estudio mediante RP-FPLC reveló que el scFv proveniente de los cuerpos de inclusión presenta al menos 3 especies *scrambled*, encontrándose que la conformación nativa es la de mayor proporción; en contraste, el scFv proveniente de fracción soluble presenta una proporción inversa.

10. El paso de purificación por CEx, así como la optimización de tampones y gradiente resulta imprescindible para la separación de las especies *scrambled* de la especie nativa; permitiendo la obtención del scFv-h3D6 nativo a partir de la fracción insoluble de la fusión con Trx con un rendimiento de 3 mg/L.
11. El protocolo de expresión y purificación del scFv fusionado a Trx permite obtener un mayor rendimiento de scFv en conformación nativa en comparación con el sistema de fusión NusA, que si bien mejora la expresión soluble, no así en cuanto a calidad del plegamiento.

## C2. Caracterización del scFv-h3D6

1. Un análisis de FTIR determinó que la estructura secundaria nativa del scFv-h3D6 es la típica de una inmunoglobulina plegada, con un 64% de hoja- $\beta$  antiparalela, un 22% de *loop*/giros, y un 11% de giros- $\beta$ .
2. La estructura secundaria de la proteína nativa registrada por CD en el UV lejano presenta, además del característico espectro canónico de hoja- $\beta$  (mínimo a 218 nm y máximo a 200 nm) de una inmunoglobulina, un mínimo local de elipticidad a 230 nm y una señal positiva a 237 nm; atribuidos a las contribuciones de residuos aromáticos de los dominios  $V_L$  y  $V_H$  respectivamente.
3. La molécula scFv-h3D6 sigue una desnaturalización térmica que lleva a la agregación, de manera independiente de nucleación, y que se caracteriza por la presencia de un estado intermediario enriquecido con componentes- $\beta$  (en concreto, del componente *worm-like*, WL), generado por una reorganización conformacional del estado nativo iniciada entorno a los 60°C.
4. El desplegamiento inducido por urea del scFv-h3D6 es reversible y sigue un proceso de dos transiciones debido a la presencia de 3 estados de plegamiento (nativo, intermediario y desplegado). Durante el desplegamiento de la molécula del scFv-h3D6 ocurren tres procesos: la desnaturalización del dominio menos estable, la disrupción de la interficie interdominio, y la desnaturalización del otro dominio.
5. El scFv-h3D6 es una molécula de Clase I, según la clasificación de scFvs mediante estabilidades diferenciales propuesta por Pluckthun. El estado intermediario metaestable en equilibrio se acumula en la curva de desnaturalización en torno a 5 M de urea, y consiste en el dominio de menor estabilidad ( $V_L$ ) desplegado, la interficie interdominio eliminada y el dominio más estable ( $V_H$ ) plegado. Sugiriendo que el dominio  $V_L$  es el blanco adecuado para un rediseño de la estabilidad termodinámica.

6. Los procesos de desnaturalización química y térmica ocasionan dos estados intermediarios perfectamente diferenciables, el primero de ellos, corresponde a un intermediario termodinámico metaestable reversible, que forma parte de la vía de plegamiento del scFv-h3D6 con una susceptibilidad proteolítica por parte del dominio desplegado V<sub>L</sub>; y el segundo intermediario, es de tipo cinético irreversible por encontrarse fuera de la vía productiva del plegamiento promoviendo el fenómeno de agregación, con la misma susceptibilidad de ambos dominios a ser proteolizados.

### **C3. Efectividad *in vivo* del scFv-h3D6**

1. El incremento de oligómeros de A $\beta$  solubles citotóxicos múltiples de trimeros (dodecámeros, nonámeros y hexámeros) en ciertas áreas cerebrales de ratones hembras 3xTg-AD de 5 meses de edad; se relaciona con la hiperactividad de navegación y con los déficits cognitivos (memoria y el aprendizaje) característicos de los estadios tempranos de la enfermedad en dicho modelo murino.
2. A su vez, el incremento de oligómeros de A $\beta$  solubles citotóxicos se relaciona con un aumento de las concentraciones de las apolipoproteínas apoE y apoJ (clusterina), implicadas en el aclaramiento de dichos oligómeros.
3. Una única dosis de 85  $\mu$ g de scFv-h3D6 administrada intraperitonealmente en hembras 3xTg-AD de 5 meses de edad provoca claros efectos beneficiosos a los 5 días del tratamiento, tanto a nivel conductual como a nivel molecular.
4. El efecto del tratamiento a nivel molecular se manifiesta tanto como una disminución o eliminación global de oligómeros de A $\beta$  solubles triméricos en córtex y bulbo olfatorio, así como, una recuperación a niveles no patológicos de las apolipoproteínas apoE y apoJ (clusterina) en córtex y de apoE en hipocampo.
5. No se encontró una correlación entre la sintomatología de los estadios tempranos de AD en los ratones 3xTg-AD con la cantidad y/o perfil de A $\beta$  intracelular, ni se apreció un cambio de dicho perfil por efecto del tratamiento.
6. Dada la relación entre la apoE y los procesos inflamatorios, es probable que el efecto del tratamiento con scFv-h3D6 no presente efectos secundarios a nivel de neuroinflamación.
7. La correlación entre la concentración de apoJ (clusterina) y la cantidad de oligómeros de A $\beta$  sugiere que dicha apolipoproteína está implicada en el aclaramiento de los oligómeros

8. El perfil oligomérico de A $\beta$  soluble encontrado en los tejidos de ratones en estadios tempranos de AD coincide con la vía de oligómeros de A $\beta$  trimericos no fibrilares, dentro del modelo de dos vías oligoméricas en el proceso neurodegenerativo de AD.
9. Se demuestra que los beneficios del scFv-h3D6 a nivel conductual y molecular se dan gracias a su capacidad para eliminar los oligómeros de A $\beta$  citotóxicos en un modelo murino 3xTg-AD que desarrolla la enfermedad de Alzheimer.

#### **C4. Incremento de la estabilidad del dominio V<sub>L</sub> y disminución de la tendencia a la agregación del scFv-h3D6**

1. La variante V89N del dominio V<sub>H</sub> y las variantes Y49T y L9S del dominio V<sub>L</sub>, resultan mutaciones desestabilizadoras de los dominios en donde se encuentran localizados, ya sea mediante la disminución de la estabilidad intrínseca de los dominios en cuestión o la disminución de la estabilidad de la interficie interdominio.
2. Las variantes de elongación C-terminal (V<sub>L</sub>-el-R108G, C1; V<sub>L</sub>-el-R108, C2 y V<sub>L</sub>-el-R108T109, C3) resultan mutaciones estabilizadoras, aumentando la estabilidad intrínseca del dominio V<sub>L</sub> al eliminar el efecto de las interferencias electrostáticas del OXT107-O y mejorar el empaquetamiento de la cadena- $\beta$  G.
3. El mutante de elongación que solo tiene una glicina (C1) presentó un ligero incremento en su estabilidad termodinámica ( $\sim 1.7$  KJ mol<sup>-1</sup>). El mutante de elongación con arginina (C2) ocasionó un aumento de la estabilidad de  $\sim 3$  KJ mol<sup>-1</sup>. El mutante que extiende la cadena- $\beta$  G con dos residuos: arginina y treonina (C3), aumentó la estabilidad en un  $\sim 5$  KJ mol<sup>-1</sup>, llegando a representar un aumento de cerca del 26% de la estabilidad del dominio V<sub>L</sub>.
4. El incremento en la estabilidad del dominio V<sub>L</sub> por parte de las variantes de elongación C-terminal, disminuye la tendencia a la agregación  $\sim 4^{\circ}\text{C}$ .
5. La disminución en la tendencia a la agregación se debe a una desestabilización del estado intermediario térmicamente inducido, dado los cambios en la distribución de los componentes- $\beta$  en dicho estado; concretamente, la permanencia del componente de hoja- $\beta$  nativa en el estado intermediario y la disminución de los componentes fibrilares WL y amiloide.
6. La mejora en el plegamiento del scFv-h3D6 ha de aumentar la vida-media de la molecula *in vivo*, y, por tanto, permitir mantener la efectividad a dosis menores, o bien incrementar el efecto a la misma dosis, en las futuras pruebas de

inmunoterapia con este fragmento de anticuerpo efectivo como agente terapéutico en la enfermedad de Alzheimer.



## **BIBLIOGRAFÍA**





- Ahmad, Z. A., Yeap, S. K., Ali, A. M., Ho, W. Y., Alitheen, N. B., & Hamid, M. (2012). scFv antibody: Principles and clinical application. *Clinical & Developmental Immunology*, 2012, 980250.
- Ahmad-Annur, A., Tabrizi, S. J., & Fisher, E. M. (2003). Mouse models as a tool for understanding neurodegenerative diseases. *Current Opinion in Neurology*, 16(4), 451-458.
- ANFINSEN, C. B., HABER, E., SELA, M., & WHITE, F. H., Jr. (1961). The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 47, 1309-1314.
- Araki, K., & Nagata, K. (2011). Protein folding and quality control in the ER. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 3(11), a007526.
- Arbel, M., & Solomon, B. (2007). Immunotherapy for alzheimer's disease: Attacking amyloid-beta from the inside. *Trends in Immunology*, 28(12), 511-513.
- Arndt, K. M., Muller, K. M., & Pluckthun, A. (1998). Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain fragment. *Biochemistry*, 37(37), 12918-12926.
- Baden, E. M., Owen, B. A., Peterson, F. C., Volkman, B. F., Ramirez-Alvarado, M., & Thompson, J. R. (2008). Altered dimer interface decreases stability in an amyloidogenic protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(23), 15853-15860.
- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R. L., Games, D., Grajeda, H., et al. (2000). Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of alzheimer disease. *Nature Medicine*, 6(8), 916-919.
- Berger, C., Weber-Bornhauser, S., Eggenberger, J., Hanes, J., Pluckthun, A., & Bosshard, H. R. (1999). Antigen recognition by conformational selection. *FEBS Letters*, 450(1-2), 149-153.
- Bernett, M. J., Karki, S., Moore, G. L., Leung, I. W., Chen, H., Pong, E., et al. (2010). Engineering fully human monoclonal antibodies from murine variable regions. *Journal of Molecular Biology*, 396(5), 1474-1490.
- Billings, L. M., Oddo, S., Green, K. N., McGaugh, J. L., & LaFerla, F. M. (2005). Intraneuronal abeta causes the onset of early alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron*, 45(5), 675-688.
- Bird, R. E., Hardman, K. D., Jacobson, J. W., Johnson, S., Kaufman, B. M., Lee, S. M., et al. (1988). Single-chain antigen-binding proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 242(4877), 423-426.
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513-1523.
- Blasco-Moreno, B. (2008). Construcción y expresión recombinante de la región variable de un anticuerpo monoclonal humanizado contra el agente etiológico de la enfermedad de Alzheimer. Universidad Autónoma de Barcelona Reporte de proyecto de colaboración y de prácticas en empresa.
- Blasco-Moreno, B. (2011). Estabilització de l'extrem terminal d'un fragment variable de cadena senzilla (scFv) específic per al pèptide A-beta. Universidad Autónoma de Barcelona. Tesina de Master.
- Boulianne, G. L., Hozumi, N., & Shulman, M. J. (1984). Production of functional chimaeric mouse/human antibody. *Nature*, 312(5995), 643-646.
- Braak, H. & Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol.* 82:239-259.
- Branden, C., & Tooze, J. (1991). Introduction to protein structure. *Garland Publishing: New York and London*,
- Brekke, O. H., & Sandlie, I. (2003). Therapeutic antibodies for human diseases at the dawn of the twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(1), 52-62.
- Bross, P., Andresen, B. S., & Gregersen, N. (1998). Impaired folding and subunit assembly as disease mechanism: The example of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, 58, 301-337.
- Bruggemann, M., Caskey, H. M., Teale, C., Waldmann, H., Williams, G. T., Surani, M. A., et al. (1989). A repertoire of monoclonal antibodies with human heavy chains from transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(17), 6709-6713.
- Bruggemann, M., Winter, G., Waldmann, H., & Neuberger, M. S. (1989). The immunogenicity of chimeric antibodies. *The Journal of Experimental Medicine*, 170(6), 2153-2157.
- Bryngelson, J. D., Onuchic, J. N., Socci, N. D., & Wolynes, P. G. (1995). Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: A synthesis. *Proteins*, 21(3), 167-195.
- Bukau, B., & Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92(3), 351-366.
- Bullock, W., Fernandez, J., & Short, J. (1987). XL1-BLUE: A high efficiency plasmid transforming *recA escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques* 5: 376-378,
- Buss, N. A., Henderson, S. J., McFarlane, M., Shenton, J. M., & de Haan, L. (2012). Monoclonal antibody therapeutics: History and future. *Current Opinion in Pharmacology*, 12(5), 615-622.
- Buxbaum, J. N. (2003). Diseases of protein conformation: What do in vitro experiments tell us about in vivo diseases? *Trends in Biochemical Sciences*, 28(11), 585-592.
- Buxbaum, J. N. (2006). Treatment and prevention of the amyloidoses: Can the lessons learned be applied to sporadic inclusion-body myositis? *Neurology*, 66(2 Suppl 1), S110-3.
- Byler, D. M., & Susi, H. (1986). Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers*, 25(3), 469-487.
- Caccamo, A., Magri, A., & Oddo, S. (2010). Age-dependent changes in TDP-43 levels in a mouse model of alzheimer disease are linked to abeta oligomers accumulation. *Molecular Neurodegeneration*, 5, 51-1326-5-51.
- Calero, M., Rostagno, A., Matsubara, E., Zlokovic, B., Frangione, B., & Ghiso, J. (2000). Apolipoprotein J (clusterin) and alzheimer's disease. *Microscopy Research and Technique*, 50(4), 305-315.

- Carrodeguas, J. A., Rodolosse, A., Garza, M. V., Sanz-Clemente, A., Perez-Pe, R., Lacosta, A. M., et al. (2005). The chick embryo appears as a natural model for research in beta-amyloid precursor protein processing. *Neuroscience*, *134*(4), 1285-1300.
- Cattaneo, A., & Biocca, S. (1999). The selection of intracellular antibodies. *Trends in Biotechnology*, *17*(3), 115-121.
- Cattepoel, S., Hanenberg, M., Kulic, L., & Nitsch, R. M. (2011). Chronic intranasal treatment with an anti- $\beta$ (30-42) scFv antibody ameliorates amyloid pathology in a transgenic mouse model of alzheimer's disease. *PLoS One*, *6*(4), e18296.
- Cerdà-Costa, N., Esteras-Chopo, A., Aviles, F. X., Serrano, L., & Villegas, V. (2007). Early kinetics of amyloid fibril formation reveals conformational reorganisation of initial aggregates. *Journal of Molecular Biology*, *366*(4), 1351-1363.
- Cerdà-Costa, N., de la Arada, I., Aviles, FX., Arrondo, JLR., & Villegas, S. (2009). Influence of Aggregation Propensity and Stability on Amyloid Fibril Formation As Studied by Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Two-Dimensional COS Analysis. *Biochemistry*, *48*, 10582-10590.
- Chan, H. S., & Dill, K. A. (1998). Protein folding in the landscape perspective: Chevron plots and non-arrhenius kinetics. *Proteins*, *30*(1), 2-33.
- Cheng, I. H., Searce-Levie, K., Legleiter, J., Palop, J. J., Gerstein, H., Bien-Ly, N., et al. (2007). Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in alzheimer disease mouse models. *The Journal of Biological Chemistry*, *282*(33), 23818-23828.
- Chiti, F., & Dobson, C. M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annual Review of Biochemistry*, *75*, 333-366.
- Chiti, F., Stefani, M., Taddei, N., Ramponi, G., & Dobson, C. M. (2003). Rationalization of the effects of mutations on peptide and protein aggregation rates. *Nature*, *424*(6950), 805-808.
- Choi-Miura, N. H., & Oda, T. (1996). Relationship between multifunctional protein "clusterin" and alzheimer disease. *Neurobiology of Aging*, *17*(5), 717-722.
- Chrnyk, B. A., & Wetzel, R. (1993). Breakdown in the relationship between thermal and thermodynamic stability in an interleukin-1 beta point mutant modified in a surface loop. *Protein Engineering*, *6*(7), 733-738.
- Chu, J., Giannopoulos, P. F., Ceballos-Diaz, C., Golde, T. E., & Pratico, D. (2012). 5-lipoxygenase gene transfer worsens memory, amyloid, and tau brain pathologies in a mouse model of alzheimer disease. *Annals of Neurology*, *72*(3), 442-454.
- Clare, D. K., Bakkes, P. J., van Heerikhuizen, H., van der Vies, S. M., & Saibil, H. R. (2009). Chaperonin complex with a newly folded protein encapsulated in the folding chamber. *Nature*, *457*(7225), 107-110.
- Clinton, L. K., Billings, L. M., Green, K. N., Caccamo, A., Ngo, J., Oddo, S., et al. (2007). Age-dependent sexual dimorphism in cognition and stress response in the 3xTg-AD mice. *Neurobiology of Disease*, *28*(1), 76-82.
- Cogne, M., Duchez, S., & Pascal, V. (2009). Transgenesis and humanization of murine antibodies. [Transgenese animale et humanisation des anticorps : des souris pour des hommes] *Medecine Sciences : M/S*, *25*(12), 1149-1154.
- Creighton, T. E. (1995). Protein folding. an unfolding story. *Current Biology : CB*, *5*(4), 353-356.
- Dahlgren, K. N., Manelli, A. M., Stine, W. B., Jr, Baker, L. K., Krafft, G. A., & LaDu, M. J. (2002). Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(35), 32046-32053.
- Deane, R., Sagare, A., Hamm, K., Parisi, M., Lane, S., Finn, M. B., et al. (2008). apoE isoform-specific disruption of amyloid beta peptide clearance from mouse brain. *The Journal of Clinical Investigation*, *118*(12), 4002-4013.
- DeMattos, R. B., Bales, K. R., Cummins, D. J., Dodart, J. C., Paul, S. M., & Holtzman, D. M. (2001). Peripheral anti-A beta antibody alters CNS and plasma A beta clearance and decreases brain A beta burden in a mouse model of alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *98*(15), 8850-8855.
- DeMattos, R. B., Cirrito, J. R., Parsadanian, M., May, P. C., O'Dell, M. A., Taylor, J. W., et al. (2004). ApoE and clusterin cooperatively suppress abeta levels and deposition: Evidence that ApoE regulates extracellular abeta metabolism in vivo. *Neuron*, *41*(2), 193-202.
- Dickson, D. W., Crystal, H. A., Bevona, C., Honer, W., Vincent, I., & Davies, P. (1995). Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. *Neurobiology of Aging*, *16*(3), 285-98; discussion 298-304.
- Dill, K. A., Bromberg, S., Yue, K., Fiebig, K. M., Yee, D. P., Thomas, P. D., et al. (1995). Principles of protein folding--a perspective from simple exact models. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, *4*(4), 561-602.
- Dill, K. A., & Chan, H. S. (1997). From levinthal to pathways to funnels. *Nature Structural Biology*, *4*(1), 10-19.
- Dinner, A. R., Sali, A., Smith, L. J., Dobson, C. M., & Karplus, M. (2000). Understanding protein folding via free-energy surfaces from theory and experiment. *Trends in Biochemical Sciences*, *25*(7), 331-339.
- Dobson, C. M. (1999). Protein misfolding, evolution and disease. *Trends in Biochemical Sciences*, *24*(9), 329-332.
- Dobson, C. M. (2004). Principles of protein folding, misfolding and aggregation. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *15*(1), 3-16.
- Dodart, J. C., Bales, K. R., Gannon, K. S., Greene, S. J., DeMattos, R. B., Mathis, C., et al. (2002). Immunization reverses memory deficits without reducing brain abeta burden in alzheimer's disease model. *Nature Neuroscience*, *5*(5), 452-457.
- Duan, L., Bagasra, O., Laughlin, M. A., Oakes, J. W., & Pomerantz, R. J. (1994). Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by an intracellular anti-rev single-chain antibody. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(11), 5075-5079.

- Duguid, J. R., Bohmont, C. W., Liu, N. G., & Tourtellotte, W. W. (1989). Changes in brain gene expression shared by scrapie and alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86(18), 7260-7264.
- Eli Lilly and Company. (2012). *Effect of LY2062430 on the progression of alzheimer's disease*, NCT00905372. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00905372?term=LY2062430&rank=1>
- English, B. P., Welker, E., Narayan, M., & Scheraga, H. A. (2002). Development of a novel method to populate native disulfide-bonded intermediates for structural characterization of proteins: Implications for the mechanism of oxidative folding of RNase A. *Journal of the American Chemical Society*, 124(18), 4995-4999.
- Espana, J., Gimenez-Llort, L., Valero, J., Minano, A., Rabano, A., Rodriguez-Alvarez, J., et al. (2010). Intraneuronal beta-amyloid accumulation in the amygdala enhances fear and anxiety in alzheimer's disease transgenic mice. *Biological Psychiatry*, 67(6), 513-521.
- Esquerda-Canals, G., Marti, J., Rivera-Hernandez, G., Gimenez-Llort, L., & Villegas, S. (2013). Loss of deep cerebellar nuclei neurons in the 3xTg-AD mice and protection by an anti-amyloid beta antibody fragment. *Mabs*, 5(5).
- Esquerda-Canals, G. (2013). Neuronal vulnerability in the 3xTg-AD mouse and its protection by the anti-amyloid beta antibody fragment scFv-h3D6. Universidad Autónoma de Barcelona. *Tesina de Master*.
- Ewert, S., Honegger, A., & Pluckthun, A. (2004). Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering. *Methods (San Diego, Calif.)*, 34(2), 184-199.
- Ewert, S., Huber, T., Honegger, A., & Pluckthun, A. (2003). Biophysical properties of human antibody variable domains. *Journal of Molecular Biology*, 325(3), 531-553.
- Fernandez-Escamilla, A. M., Rousseau, F., Schymkowitz, J., & Serrano, L. (2004). Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins. *Nature Biotechnology*, 22(10), 1302-1306.
- Frenkel, D., Dewachter, I., Van Leuven, F., & Solomon, B. (2003). Reduction of beta-amyloid plaques in brain of transgenic mouse model of alzheimer's disease by EFRH-phage immunization. *Vaccine*, 21(11-12), 1060-1065.
- Frydman, J. (2001). Folding of newly translated proteins in vivo: The role of molecular chaperones. *Annual Review of Biochemistry*, 70, 603-647.
- Fu, H. J., Liu, B., Frost, J. L., & Lemere, C. A. (2010). Amyloid-beta immunotherapy for alzheimer's disease. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, 9(2), 197-206.
- Garcia-Mesa, Y., Lopez-Ramos, J. C., Gimenez-Llort, L., Revilla, S., Guerra, R., Gruart, A., et al. (2011). Physical exercise protects against alzheimer's disease in 3xTg-AD mice. *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 24(3), 421-454.
- Gershenson, A., & Gierasch, L. M. (2011). Protein folding in the cell: Challenges and progress. *Current Opinion in Structural Biology*, 21(1), 32-41.
- Gilman, S., Koller, M., Black, R. S., Jenkins, L., Griffith, S. G., Fox, N. C., et al. (2005). Clinical effects of abeta immunization (AN1792) in patients with AD in an interrupted trial. *Neurology*, 64(9), 1553-1562.
- Gimenez-Llort, L., Blazquez, G., Canete, T., Johansson, B., Oddo, S., Tobena, A., et al. (2007). Modeling behavioral and neuronal symptoms of alzheimer's disease in mice: A role for intraneuronal amyloid. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 31(1), 125-147.
- Gimenez-Llort, L., Garcia, Y., Buccieri, K., Revilla, S., Sunol, C., Cristofol, R., et al. (2010). Gender-specific neuroimmunoendocrine response to treadmill exercise in 3xTg-AD mice. *International Journal of Alzheimer's Disease*, 2010, 128354.
- Gimenez-Llort, L., Rivera-Hernandez, G., Marin-Argany, M., Sanchez-Quesada, J. L., & Villegas, S. (2013). Early intervention in the 3xTg-AD mice with an amyloid beta-antibody fragment ameliorates first hallmarks of alzheimer disease. *Mabs*, 5(5)
- Gosal, W. S., Morten, I. J., Hewitt, E. W., Smith, D. A., Thomson, N. H., & Radford, S. E. (2005). Competing pathways determine fibril morphology in the self-assembly of beta2-microglobulin into amyloid. *Journal of Molecular Biology*, 351(4), 850-864.
- Gothel, S. F., & Marahiel, M. A. (1999). Peptidyl-prolyl cis-trans isomerases, a superfamily of ubiquitous folding catalysts. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 55(3), 423-436.
- Gouras, G. K., Willen, K., & Tampellini, D. (2012). Critical role of intraneuronal abeta in alzheimer's disease: Technical challenges in studying intracellular abeta. *Life Sciences*, 91(23-24), 1153-1158.
- Gregersen, N., Bross, P., Andrese, B. S., Pedersen, C. B., Corydon, T. J., & Bolund, L. (2001). The role of chaperone-assisted folding and quality control in inborn errors of metabolism: Protein folding disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 24(2), 189-212.
- Gregersen, N., Bross, P., Vang, S., & Christensen, J. H. (2006). Protein misfolding and human disease. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 7, 103-124.
- Gruber, C. W., Cemazar, M., Heras, B., Martin, J. L., & Craik, D. J. (2006). Protein disulfide isomerase: The structure of oxidative folding. *Trends in Biochemical Sciences*, 31(8), 455-464.
- Haass, C., & Selkoe, D. J. (2007). Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nature Reviews.Molecular Cell Biology*, 8(2), 101-112.
- Hall, A. M., & Roberson, E. D. (2012). Mouse models of alzheimer's disease. *Brain Research Bulletin*, 88(1), 3-12.
- Hammad, S. M., Ranganathan, S., Loukinova, E., Twal, W. O., & Argraves, W. S. (1997). Interaction of apolipoprotein J-amyloid beta-peptide complex with low density lipoprotein receptor-related protein-2/megalin. A mechanism to prevent pathological accumulation of amyloid beta-peptide. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(30), 18644-18649.

- Hara, H., Mouri, A., Yonemitsu, Y., Nabeshima, T., & Tabira, T. (2011). Mucosal immunotherapy in an alzheimer mouse model by recombinant sendai virus vector carrying Abeta1-43/IL-10 cDNA. *Vaccine*, 29(43), 7474-7482.
- Harris, L. J., Larson, S. B., Hasel, K. W., & McPherson, A. (1997). Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry*, 36(7), 1581-1597.
- Hartl, F. U. (1996). Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381(6583), 571-579.
- Hartl, F. U., & Hayer-Hartl, M. (2002). Molecular chaperones in the cytosol: From nascent chain to folded protein. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5561), 1852-1858.
- Hedberg, M. M., Clos, M. V., Ratia, M., Gonzalez, D., Lithner, C. U., Camps, P., et al. (2010). Effect of huprine X on beta-amyloid, synaptophysin and alpha7 neuronal nicotinic acetylcholine receptors in the brain of 3xTg-AD and APP<sup>swe</sup> transgenic mice. *Neuro-Degenerative Diseases*, 7(6), 379-388.
- Hirschfield, G. M. (2004). Amyloidosis: A clinico-pathophysiological synopsis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15(1), 39-44.
- Hock, C., Konietzko, U., Streffer, J. R., Tracy, J., Signorell, A., Muller-Tillmanns, B., et al. (2003) Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in alzheimer's disease. *Neuron*. 38, 547-554
- Honegger, A. (2008). Engineering antibodies for stability and efficient folding. *Handbook of Experimental Pharmacology*, (181)(181), 47-68.
- Humphreys, D. T., Carver, J. A., Easterbrook-Smith, S. B., & Wilson, M. R. (1999). Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(11), 6875-6881.
- Huston, J. S., Levinson, D., Mudgett-Hunter, M., Tai, M. S., Novotny, J., Margolies, M. N., et al. (1988). Protein engineering of antibody binding sites: Recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain fv analogue produced in escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(16), 5879-5883.
- Iwata, N., Tsubuki, S., Takaki, Y., Watanabe, K., Sekiguchi, M., Hosoki, E., et al. (2000). Identification of the major Abeta1-42-degrading catabolic pathway in brain parenchyma: Suppression leads to biochemical and pathological deposition. *Nature Medicine*, 6(2), 143-150.
- Jack, C. R., Jr, Wiste, H. J., Vemuri, P., Weigand, S. D., Senjem, M. L., Zeng, G., et al. (2010). Brain beta-amyloid measures and magnetic resonance imaging atrophy both predict time-to-progression from mild cognitive impairment to alzheimer's disease. *Brain : A Journal of Neurology*, 133(11), 3336-3348.
- Jacobson, J. S. (2006). Antibodies specific for epitopes within amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ), for use in improving cognition. *PCT Int Appl*, WO 2006066171 A1 20060622.
- Jacobson, D. R., Gallo, G., & Buxbaum, J. N. (1998). The systemic amyloidoses. *The New England Journal of Medicine*, 338(4), 264; author reply 264-5.
- Jager, M., & Pluckthun, A. (1999). Domain interactions in antibody fv and scFv fragments: Effects on unfolding kinetics and equilibria. *FEBS Letters*, 462(3), 307-312.
- Jahn, T. R., & Radford, S. E. (2005). The yin and yang of protein folding. *The FEBS Journal*, 272(23), 5962-5970.
- Jahn, T. R., Tennent, G. A., & Radford, S. E. (2008). A common beta-sheet architecture underlies in vitro and in vivo beta2-microglobulin amyloid fibrils. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(25), 17279-17286.
- Jain S. & Udgaonkar JB. (2011). Defining the pathway of worm-like amyloid fibril formation by the mouse prion protein by delineation of the productive and unproductive oligomerization reactions. *Biochemistry*. 50(7):1153-61.
- Janus, C., Pearson, J., McLaurin, J., Mathews, P. M., Jiang, Y., Schmidt, S. D., et al. (2000). A beta peptide immunization reduces behavioural impairment and plaques in a model of alzheimer's disease. *Nature*, 408(6815), 979-982.
- Johnson, G., & Wu, T. T. (2001). Kabat database and its applications: Future directions. *Nucleic Acids Research*, 29(1), 205-206.
- Jung, S., Honegger, A., & Pluckthun, A. (1999). Selection for improved protein stability by phage display. *Journal of Molecular Biology*, 294(1), 163-180.
- Jurado, P., Ritz, D., Beckwith, J., de Lorenzo, V., & Fernandez, L. A. (2002). Production of functional single-chain fv antibodies in the cytoplasm of escherichia coli. *Journal of Molecular Biology*, 320(1), 1-10.
- Jurado, P., de Lorenzo, V., & Fernandez, L. A. (2006). Thioredoxin fusions increase folding of single chain fv antibodies in the cytoplasm of escherichia coli: Evidence that chaperone activity is the prime effect of thioredoxin. *Journal of Molecular Biology*, 357(1), 49-61.
- Kabashi, E., & Durham, H. D. (2006). Failure of protein quality control in amyotrophic lateral sclerosis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1762(11-12), 1038-1050.
- Kabat, E. A., Wu, T. T., Reid-Miller, M., & Perry, H. and Gottesman, K. (1987). Kabat numbering, sequences of proteins of immunological interest. (Fourth Edition ed., ) ed. US Govt. Printing Off.
- Kadokura, H., Katzen, F., & Beckwith, J. (2003). Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annual Review of Biochemistry*, 72, 111-135.
- Kanemaru, K. (2013). Immunotherapy targeting misfolded proteins in neurodegenerative disease. *Brain and Nerve = Shinkei Kenkyu no Shinpo*, 65(4), 469-474.
- Kang, J., Lemaire, H. G., Unterbeck, A., Salbaum, J. M., Masters, C. L., Grzeschik, K. H., et al. (1987). The precursor of alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325(6106), 733-736.
- Karplus, M. (1997). The levinthal paradox: Yesterday and today. *Folding & Design*, 2(4), S69-75.
- Kaufmann, S. H., & Kellner, U. (1998). Erasure of western blots after autoradiographic or chemiluminescent detection. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 80, 223-235.

- Kawarabayashi, T., Shoji, M., Younkin, L. H., Wen-Lang, L., Dickson, D. W., Murakami, T., et al. (2004). Dimeric amyloid beta protein rapidly accumulates in lipid rafts followed by apolipoprotein E and phosphorylated tau accumulation in the Tg2576 mouse model of alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(15), 3801-3809.
- Kayed, R., Head, E., Thompson, J. L., McIntire, T. M., Milton, S. C., Cotman, C. W., et al. (2003). Common structure of soluble amyloid oligomers implies common mechanism of pathogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5618), 486-489.
- Kida, E., Choi-Miura, N. H., & Wisniewski, K. E. (1995). Deposition of apolipoproteins E and J in senile plaques is topographically determined in both alzheimer's disease and down's syndrome brain. *Brain Research*, 685(1-2), 211-216.
- Kim, D. S., Lee, S. H., Kim, J. S., Lee, S. C., Kwon, M. H., & Kim, Y. S. (2009). Generation of humanized anti-DNA hydrolyzing catalytic antibodies by complementarity determining region grafting. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 379(2), 314-318.
- Kim, J., Jiang, H., Park, S., Eltorai, A. E., Stewart, F. R., Yoon, H., et al. (2011). Haploinsufficiency of human APOE reduces amyloid deposition in a mouse model of amyloid-beta amyloidosis. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(49), 18007-18012.
- Kim, Y. E., Hipp, M. S., Bracher, A., Hayer-Hartl, M., & Hartl, F. U. (2013). Molecular chaperone functions in protein folding and proteostasis. *Annual Review of Biochemistry*, 82, 323-355.
- Kirkitadze, M. D., Condron, M. M., & Teplow, D. B. (2001). Identification and characterization of key kinetic intermediates in amyloid beta-protein fibrillogenesis. *Journal of Molecular Biology*, 312(5), 1103-1119.
- Klafki, H. W., Wilfang, J., & Staufienbiel, M. (1996). Electrophoretic separation of betaA4 peptides (1-40) and (1-42). *Analytical Biochemistry*, 237(1), 24-29.
- Klein, W. L. (2013). Synaptotoxic amyloid-beta oligomers: A molecular basis for the cause, diagnosis, and treatment of alzheimer's disease? *Journal of Alzheimer's Disease : JAD*, 33 Suppl 1, S49-65.
- Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellenhofer, G., et al. (2000). Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *Journal of Molecular Biology*, 296(1), 57-86.
- Knappik, A., & Pluckthun, A. (1995). Engineered turns of a recombinant antibody improve its in vivo folding. *Protein Engineering*, 8(1), 81-89.
- Köhler, G. & Milstein, C. (1975). Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256,495-497
- Koistinaho, M., Lin, S., Wu, X., Esterman, M., Koger, D., Hanson, J., et al. (2004). Apolipoprotein E promotes astrocyte colocalization and degradation of deposited amyloid-beta peptides. *Nature Medicine*, 10(7), 719-726.
- Kopaciewicz, W., Rounds, M. A., Fausnaugh, J., & Regnier, F. E. (1983). Retention model for high-performance ion-exchange chromatography. *Journal of Chromatography A*, 266(0), 3-21.
- Lacor, P. N., Buniel, M. C., Furlow, P. W., Clemente, A. S., Velasco, P. T., Wood, M., et al. (2007). Abeta oligomer-induced aberrations in synapse composition, shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 27(4), 796-807.
- LaDu, M. J., Falduto, M. T., Manelli, A. M., Reardon, C. A., Getz, G. S., & Frail, D. E. (1994). Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(38), 23403-23406.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- LaFerla, F. M., Green, K. N., & Oddo, S. (2007). Intracellular amyloid-beta in alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(7), 499-509.
- Lambracht-Washington, D., & Rosenberg, R. N. (2013). Advances in the development of vaccines for alzheimer's disease. *Discovery Medicine*, 15(84), 319-326.
- Langui, D., Lachapelle, F., & Duyckaerts, C. (2007). Animal models of neurodegenerative diseases. [Modeles animaux des maladies neuro-degeneratives] *Medecine Sciences : M/S*, 23(2), 180-186.
- Larson, M. E., & Lesne, S. E. (2012). Soluble abeta oligomer production and toxicity. *Journal of Neurochemistry*, 120 Suppl 1, 125-139.
- Lee, S., & Tsai, F. T. (2005). Molecular chaperones in protein quality control. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 38(3), 259-265.
- Lesne, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., et al. (2006). A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*, 440(7082), 352-357.
- Lesne, S. E., Sherman, M. A., Grant, M., Kuskowski, M., Schneider, J. A., Bennett, D. A., et al. (2013). Brain amyloid-beta oligomers in ageing and alzheimer's disease. *Brain : A Journal of Neurology*, 136(Pt 5), 1383-1398.
- LeVine, H.,3rd. (1993). Thioflavine T interaction with synthetic alzheimer's disease beta-amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 2(3), 404-410.
- Levinthal, C. Are there pathways for protein folding? *J. Chim. Phys.* 65:44-45, 1968,
- Levinthal, C. (1969). How to fold graciously. In: "Mössbauer Spectroscopy in Biological Systems; Proceedings of a Meeting Held at Allerton House, Monticello, Illinois." Debrunner, P., Tsibris, J.C.M., Münck, E. (Eds.). Urbana, IL: University of Illinois Press., , 22-24.
- Li, M., Su, Z. G., & Janson, J. C. (2004). In vitro protein refolding by chromatographic procedures. *Protein Expression and Purification*, 33(1), 1-10.

- Lindgren, M., Sorgjerd, K., & Hammarstrom, P. (2005). Detection and characterization of aggregates, prefibrillar amyloidogenic oligomers, and protofibrils using fluorescence spectroscopy. *Biophysical Journal*, 88(6), 4200-4212.
- Linding, R., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Diella, F., & Serrano, L. (2004). A comparative study of the relationship between protein structure and beta-aggregation in globular and intrinsically disordered proteins. *Journal of Molecular Biology*, 342(1), 345-353.
- Liu, H. F., McCooney, B., Duarte, T., Myers, D. E., Hudson, T., Amanullah, A., et al. (2011). Exploration of overloaded cation exchange chromatography for monoclonal antibody purification. *Journal of Chromatography.A*, 1218(39), 6943-6952.
- Liu, R., Yuan, B., Emadi, S., Zameer, A., Schulz, P., McAllister, C., et al. (2004). Single chain variable fragments against beta-amyloid (abeta) can inhibit abeta aggregation and prevent abeta-induced neurotoxicity. *Biochemistry*, 43(22), 6959-6967.
- Lombardo, J. A., Stern, E. A., McLellan, M. E., Kajdasz, S. T., Hickey, G. A., Bacskai, B. J., et al. (2003). Amyloid-beta antibody treatment leads to rapid normalization of plaque-induced neuritic alterations. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 23(34), 10879-10883.
- Lue, L. F., Kuo, Y. M., Roher, A. E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., et al. (1999). Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in alzheimer's disease. *The American Journal of Pathology*, 155(3), 853-862.
- Ma, H., Lesne, S., Kotilinek, L., Steidl-Nichols, J. V., Sherman, M., Younkin, L., et al. (2007). Involvement of beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) in amyloid precursor protein-mediated enhancement of memory and activity-dependent synaptic plasticity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(19), 8167-8172.
- Mahon, M. G., Lindstedt, K. A., Hermann, M., Nimpf, J., & Schneider, W. J. (1999). Multiple involvement of clusterin in chicken ovarian follicle development. binding to two oocyte-specific members of the low density lipoprotein receptor gene family. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(7), 4036-4044.
- Makin, O. S., & Serpell, L. C. (2005). X-ray diffraction studies of amyloid structure. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 299, 67-80.
- Manelli AM., Stine WB., Van Eldik LJ., LaDu MJ. (2004). ApoE and Abeta1-42 interactions: effects of isoform and conformation on structure and function. *J Mol Neurosci*. 23(3):235-46.
- Marin-Argany, M. (2009). *Modelatge tridimensional d'un fragment variable de cadena senzilla (scfv) específic contra el pèptid Ab*. Universitat Autònoma de Barcelona. *Tesis de Master*.
- Marin-Argany, M., Rivera-Hernandez, G., Marti, J., & Villegas, S. (2011). An anti-abeta (amyloid beta) single-chain variable fragment prevents amyloid fibril formation and cytotoxicity by withdrawing abeta oligomers from the amyloid pathway. *The Biochemical Journal*, 437(1), 25-34.
- Marin-Argany, M. (2013). *Estudi de la via d'agregació de tres proteïnes implicades en diferents malalties conformacionals humanes: scFv-h3D6 com agent terapèutic per a la malaltia d'Alzheimer, AL-12 com a causa d'Amiloïdosi de cadena lleugera, i PDZ3 com a organitzador del proteoma*. Universitat Autònoma de Barcelona. *Tesis de Doctorado*.
- Martin, C. D., Rojas, G., Mitchell, J. N., Vincent, K. J., Wu, J., McCafferty, J., et al. (2006). A simple vector system to improve performance and utilisation of recombinant antibodies. *BMC Biotechnology*, 6, 46.
- Martin, J. (2000). Group II chaperonins as mediators of cytosolic protein folding. *Current Protein & Peptide Science*, 1(3), 309-324.
- Martsev, S. P., Chumanevich, A. A., Vlasov, A. P., Dubnovitsky, A. P., Tsybovsky, Y. I., Deyev, S. M., et al. (2000). Antiferritin single-chain fv fragment is a functional protein with properties of a partially structured state: Comparison with the completely folded V(L) domain. *Biochemistry*, 39(27), 8047-8057.
- Mattson, M. P. (2004). Pathways towards and away from alzheimer's disease. *Nature*, 430(7000), 631-639.
- May, P. C., Lampert-Etchells, M., Johnson, S. A., Poirier, J., Masters, J. N., & Finch, C. E. (1990). Dynamics of gene expression for a hippocampal glycoprotein elevated in alzheimer's disease and in response to experimental lesions in rat. *Neuron*, 5(6), 831-839.
- Maynard, J., Georgiou, G. (2000). Antibody engineering. *Annu.Rev. Biomed. Eng.* 2, 339-376.
- Mc Donald, J. M., Savva, G. M., Brayne, C., Welzel, A. T., Forster, G., Shankar, G. M., et al. (2010). The presence of sodium dodecyl sulphate-stable abeta dimers is strongly associated with alzheimer-type dementia. *Brain : A Journal of Neurology*, 133(Pt 5), 1328-1341.
- McGeer, P. L., Kawamata, T., & Walker, D. G. (1992). Distribution of clusterin in alzheimer brain tissue. *Brain Research*, 579(2), 337-341.
- McGeer, P. L., Klegeris, A., Walker, D. G., Yasuhara, O., & McGeer, E. G. (1994). Pathological proteins in senile plaques. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine*, 174(3), 269-277.
- McGowan, E., Eriksen, J., & Hutton, M. (2006). A decade of modeling alzheimer's disease in transgenic mice. *Trends in Genetics : TIG*, 22(5), 281-289.
- McLean, C. A., Cherny, R. A., Fraser, F. W., Fuller, S. J., Smith, M. J., Beyreuther, K., et al. (1999). Soluble pool of abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in alzheimer's disease. *Annals of Neurology*, 46(6), 860-866.
- McMurry, J., & Fay, R. (2004). *Chemistry*, (Prentice Hall: New jersey)
- Meilandt, W. J., Cisse, M., Ho, K., Wu, T., Esposito, L. A., Searce-Levie, K., et al. (2009). Neprilysin overexpression inhibits plaque formation but fails to reduce pathogenic abeta oligomers and associated cognitive deficits in human amyloid precursor protein transgenic mice. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 29(7), 1977-1986.

- Messens, J., & Collet, J. F. (2006). Pathways of disulfide bond formation in escherichia coli. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 38(7), 1050-1062.
- Minde, D. P., Maurice, M. M., & Rudiger, S. G. (2012). Determining biophysical protein stability in lysates by a fast proteolysis assay, FASTpp. *PLoS One*, 7(10), e46147.
- Miroux, B., & Walker, J. E. (1996). Over-production of proteins in escherichia coli: Mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *Journal of Molecular Biology*, 260(3), 289-298.
- Montoliu-Gaya, L. (2013). *Anàlisi de les conseqüències termodinàmiques i conformacionals d'eliminar el pont disulfur del domini VH d'un fragment d'anticòs anti-abeta (scFv-h3D6)*. Universidad Autónoma de Barcelona. *Tesina de Master*.
- Monzon, A. M., Juritz, E., Fornasari, M. S., & Parisi, G. (2013). CoDNaS: A database of conformational diversity in the native state of proteins. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(19):2512-4.
- Moreth, J., Mavoungou, C., & Schindowski, K. (2013). Passive anti-amyloid immunotherapy in alzheimer's disease: What are the most promising targets? *Immunity & Ageing : I & A*, 10(1), 18-4933-10-18.
- Morgan, D., Diamond, D. M., Gottschall, P. E., Ugen, K. E., Dickey, C., Hardy, J., et al. (2000). A beta peptide vaccination prevents memory loss in an animal model of alzheimer's disease. *Nature*, 408(6815), 982-985.
- Mouse Genome Sequencing Consortium, Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E., Rogers, J., Abril, J. F., et al. (2002). Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature*, 420(6915), 520-562.
- Movsesyan, N., Ghochikyan, A., Mkrtchyan, M., Petrushina, I., Davtyan, H., Olkhanud, P. B., et al. (2008). Reducing AD-like pathology in 3xTg-AD mouse model by DNA epitope vaccine - a novel immunotherapeutic strategy. *PLoS One*, 3(5), e2124.
- Mullis, K. B., & Faloona, F. A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335-350.
- Myers, J. K., Pace, C. N., & Scholtz, J. M. (1995). Denaturant m values and heat capacity changes: Relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 4(10), 2138-2148.
- Na, Y. R., & Park, C. (2009). Investigating protein unfolding kinetics by pulse proteolysis. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 18(2), 268-276.
- Nallamsetty, S., Kapust, R. B., Tozser, J., Cherry, S., Tropea, J. E., Copeland, T. D., et al. (2004). Efficient site-specific processing of fusion proteins by tobacco vein mottling virus protease in vivo and in vitro. *Protein Expression and Purification*, 38(1), 108-115.
- Narayan, P., Orte, A., Clarke, R. W., Bolognesi, B., Hook, S., Ganzinger, K. A., et al. (2011). The extracellular chaperone clusterin sequesters oligomeric forms of the amyloid-beta(1-40) peptide. *Nature Structural & Molecular Biology*, 19(1), 79-83.
- Neville, D. M., Jr. (1971). Molecular weight determination of protein-dodecyl sulfate complexes by gel electrophoresis in a discontinuous buffer system. *The Journal of Biological Chemistry*, 246(20), 6328-6334.
- Nieba, L., Honegger, A., Krebber, C., & Pluckthun, A. (1997). Disrupting the hydrophobic patches at the antibody variable/constant domain interface: Improved in vivo folding and physical characterization of an engineered scFv fragment. *Protein Engineering*, 10(4), 435-444.
- Nuutinen, T., Suuronen, T., Kauppinen, A., & Salminen, A. (2009). Clusterin: A forgotten player in alzheimer's disease. *Brain Research Reviews*, 61(2), 89-104.
- Oda, T., Pasinetti, G. M., Osterburg, H. H., Anderson, C., Johnson, S. A., & Finch, C. E. (1994). Purification and characterization of brain clusterin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 204(3), 1131-1136.
- Oddo, S., Billings, L., Kesslak, J. P., Cribbs, D. H., & LaFerla, F. M. (2004). Abeta immunotherapy leads to clearance of early, but not late, hyperphosphorylated tau aggregates via the proteasome. *Neuron*, 43(3), 321-332.
- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B. P., & LaFerla, F. M. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 24(8), 1063-1070.
- Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, M. P., Golde, T. E., Kaye, R., et al. (2003). Triple-transgenic model of alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular abeta and synaptic dysfunction. *Neuron*, 39(3), 409-421.
- Pace, C. Evaluating contribution of hydrogen bonding and hydrophobic bonding to protein folding. *Methods Enzymol.* 1995;259:538-54,
- Pace, C. N. (1986). Determination and analysis of urea and guanidine hydrochloride denaturation curves. *Methods in Enzymology*, 131, 266-280.
- Pace, C. N., Shirley, B. A., McNutt, M., & Gajiwala, K. (1996). Forces contributing to the conformational stability of proteins. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 10(1), 75-83.
- Pande, J., Szewczyk, M. M., & Grover, A. K. (2010). Phage display: Concept, innovations, applications and future. *Biotechnology Advances*, 28(6), 849-858.
- Park, C., & Marqusee, S. (2005). Pulse proteolysis: A simple method for quantitative determination of protein stability and ligand binding. *Nature Methods*, 2(3), 207-212.
- Pasinetti, G. M., Johnson, S. A., Oda, T., Rozovsky, I., & Finch, C. E. (1994). Clusterin (SGP-2): A multifunctional glycoprotein with regional expression in astrocytes and neurons of the adult rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, 339(3), 387-400.
- Peterson, N. C. (1996). Recombinant antibodies: Alternative strategies for developing and manipulating murine-derived monoclonal antibodies. *Laboratory Animal Science*, 46(1), 8-14.

- Plakoutsi, G., Taddei, N., Stefani, M., & Chiti, F. (2004). Aggregation of the acylphosphatase from *Sulfolobus solfataricus*: The folded and partially unfolded states can both be precursors for amyloid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 14111-14119.
- Presta, L. G. (2006). Engineering of therapeutic antibodies to minimize immunogenicity and optimize function. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 58(5-6), 640-656.
- Proba, K., Honegger, A., & Pluckthun, A. (1997). A natural antibody missing a cysteine in VH: Consequences for thermodynamic stability and folding. *Journal of Molecular Biology*, 265(2), 161-172.
- Ramm, K., Gehrig, P., & Pluckthun, A. (1999). Removal of the conserved disulfide bridges from the scFv fragment of an antibody: Effects on folding kinetics and aggregation. *Journal of Molecular Biology*, 290(2), 535-546.
- Renart, J., Reiser, J., & Stark, G. R. (1979). Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: A method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(7), 3116-3120.
- Rivera-Hernandez, G. (2009). Expresión recombinante, purificación y caracterización inicial de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) específico para el péptido A-beta. Universidad Autónoma de Barcelona. Tesina de Máster.
- Robert, R., Clofent-Sanchez, G., Hocquet, A., Jacobin-Valat, M. J., Daret, D., Noubhani, A. M., et al. (2006). Large-scale production, bacterial localization assessment and immobilized metal affinity chromatography purification of a human single-chain fv antibody against alphaIIb-beta3 integrin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 39(1-3), 51-59.
- Rooman, M., Dehouck, Y., Kwasigroch, J. M., Biot, C., & Gillis, D. (2002). What is paradoxical about Levinthal paradox? *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*, 20(3), 327-329.
- Roque, A. C., Lowe, C. R., & Taipa, M. A. (2004). Antibodies and genetically engineered related molecules: Production and purification. *Biotechnology Progress*, 20(3), 639-654.
- Rose, G. D., & Wolfenden, R. (1993). Hydrogen bonding, hydrophobicity, packing, and protein folding. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure*, 22, 381-415.
- Rothwarf, D. M., Li, Y. J., & Scheraga, H. A. (1998). Regeneration of bovine pancreatic ribonuclease A: Identification of two native-like three-disulfide intermediates involved in separate pathways. *Biochemistry*, 37(11), 3760-3766.
- Sakai, K., & Yamada, M. (2013). Abeta immunotherapy for Alzheimer's disease. *Brain and Nerve = Shinkei Kenkyu no Shinpo*, 65(4), 461-468.
- Sali, A., & Blundell, T. L. (1993). Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *Journal of Molecular Biology*, 234(3), 779-815.
- Sali, A., Shakhnovich, E., & Karplus, M. (1994). How does a protein fold? *Nature*, 369(6477), 248-251.
- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd ed ed.). Cold Spring, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463-5467.
- Sarasa, M. (2006). Experimental models for Alzheimer's disease research. [Modelos experimentales de la enfermedad de Alzheimer] *Revista De Neurologia*, 42(5), 297-301.
- Schaefer, J. V., & Pluckthun, A. (2012). Transfer of engineered biophysical properties between different antibody formats and expression systems. *Protein Engineering, Design & Selection : PEDS*, 25(10), 485-506.
- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., et al. (1999). Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature*, 400(6740), 173-177.
- Selkoe, D. J. (2001). Alzheimer's disease: Genes, proteins, and therapy. *Physiological Reviews*, 81(2), 741-766.
- Selkoe, D. J., & Schenk, D. (2003). Alzheimer's disease: Molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 43, 545-584.
- Senior, K. (2002). Dosing in phase II trial of Alzheimer's vaccine suspended. *Lancet Neurology*, 1(1), 3.
- Serpell, L. C., Sunde, M., Benson, M. D., Tennent, G. A., Pepys, M. B., & Fraser, P. E. (2000). The protofilament substructure of amyloid fibrils. *Journal of Molecular Biology*, 300(5), 1033-1039.
- Shankar, G. M., Leissring, M. A., Adame, A., Sun, X., Spooner, E., Masliah, E., et al. (2009). Biochemical and immunohistochemical analysis of an Alzheimer's disease mouse model reveals the presence of multiple cerebral Abeta assembly forms throughout life. *Neurobiology of Disease*, 36(2), 293-302.
- Shankar, G. M., Li, S., Mehta, T. H., Garcia-Munoz, A., Shepardson, N. E., Smith, I., et al. (2008). Amyloid-beta protein dimers isolated directly from Alzheimer's brains impair synaptic plasticity and memory. *Nature Medicine*, 14(8), 837-842.
- Siegel, D. L. (2002). Recombinant monoclonal antibody technology. *Transfusion Clinique Et Biologique : Journal De La Societe Francaise De Transfusion Sanguine*, 9(1), 15-22.
- Singh, S. M., & Panda, A. K. (2005). Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 99(4), 303-310.
- Singh, J., Sabareesan AT., Mathew MK. & Udgaonkar JB. (2012). Development of the structural core and of conformational heterogeneity during the conversion of oligomers of the mouse prion protein to worm-like amyloid fibrils. *J Mol Biol*. 423(2):217-31.
- Sisodia, S. S., & St George-Hyslop, P. H. (2002). Gamma-secretase, notch, Abeta and Alzheimer's disease: Where do the presenilins fit in? *Nature Reviews Neuroscience*, 3(4), 281-290.
- Solomon, B. (2007). A neuroimmunologist's perspective on Alzheimer's disease therapy. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 7(5), 439-441.

- Solomon, B., Koppel, R., Frankel, D., & Hanan-Aharon, E. (1997). Disaggregation of alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8), 4109-4112.
- Spada, S., Honegger, A., & Pluckthun, A. (1998). Reproducing the natural evolution of protein structural features with the selectively infective phage (SIP) technology. the kink in the first strand of antibody kappa domains. *Journal of Molecular Biology*, 283(2), 395-407.
- Sreerama, N., Manning, M. C., Powers, M. E., Zhang, J. X., Goldenberg, D. P., & Woody, R. W. (1999). Tyrosine, phenylalanine, and disulfide contributions to the circular dichroism of proteins: Circular dichroism spectra of wild-type and mutant bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry*, 38(33), 10814-10822.
- Studier, F. W., & Moffatt, B. A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *Journal of Molecular Biology*, 189(1), 113-130.
- Sun, W., Xie, J., Lin, H., Mi, S., Li, Z., Hua, F., et al. (2012). A combined strategy improves the solubility of aggregation-prone single-chain variable fragment antibodies. *Protein Expression and Purification*, 83(1), 21-29.
- Sunde, M., & Blake, C. C. (1998). From the globular to the fibrous state: Protein structure and structural conversion in amyloid formation. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 31(1), 1-39.
- Sung, Y. M., Lee, T., Yoon, H., DiBattista, A. M., Song, J. M., Sohn, Y., et al. (2013). Mercaptoacetamide-based class II HDAC inhibitor lowers abeta levels and improves learning and memory in a mouse model of alzheimer's disease. *Experimental Neurology*, 239, 192-201.
- Swartz, M. A., Hirosue, S., & Hubbell, J. A. (2012). Engineering approaches to immunotherapy. *Science Translational Medicine*, 4(148), 148rv9.
- Takalo, M., Salminen, A., Soininen, H., Hiltunen, M., & Haapasalo, A. (2013). Protein aggregation and degradation mechanisms in neurodegenerative diseases. *American Journal of Neurodegenerative Disease*, 2(1), 1-14.
- Tammer, A. H., Coia, G., Cappai, R., Fuller, S., Masters, C. L., Hudson, P., et al. (2002). Generation of a recombinant fab antibody reactive with the alzheimer's disease-related abeta peptide. *Clinical and Experimental Immunology*, 129(3), 453-463.
- Tang, Y. C., Chang, H. C., Roeben, A., Wischnewski, D., Wischnewski, N., Kerner, M. J., et al. (2006). Structural features of the GroEL-GroES nano-cage required for rapid folding of encapsulated protein. *Cell*, 125(5), 903-914.
- Terry, R. D., Masliah, E., Salmon, D. P., Butters, N., DeTeresa, R., Hill, R., et al. (1991). Physical basis of cognitive alterations in alzheimer's disease: Synapse loss is the major correlate of cognitive impairment. *Annals of Neurology*, 30(4), 572-580.
- Thal, D. R., Rub, U., Orantes, M., & Braak, H. (2002). Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, 58(12), 1791-1800.
- Thomas K. (2012). Trials for Alzheimer's drug halted after poor results. *The New York Times*.
- Tomita, M., & Tsumoto, K. (2011). Hybridoma technologies for antibody production. *Immunotherapy*, 3(3), 371-380.
- Trancikova, A., Ramonet, D., & Moore, D. J. (2011). Genetic mouse models of neurodegenerative diseases. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 100, 419-482.
- Traxlmayr, M. W., Faissner, M., Stadlmayr, G., Hasenbichl, C., Antes, B., Rucker, F., et al. (2012). Directed evolution of stabilized IgG1-fc scaffolds by application of strong heat shock to libraries displayed on yeast. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1824(4), 542-549.
- Tsumoto, K., Umetsu, M., Kumagai, I., Ejima, D., Philo, J. S., & Arakawa, T. (2004). Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. *Biotechnology Progress*, 20(5), 1301-1308.
- Tsybovsky, Y., Shubenok, D. V., Kravchuk, Z. I., & Martsev, S. P. (2007). Folding of an antibody variable domain in two functional conformations in vitro: Calorimetric and spectroscopic study of the anti-ferritin antibody VL domain. *Protein Engineering, Design & Selection : PEDS*, 20(10), 481-490.
- Tsytlonok, M., & Itzhaki, L. S. (2013). The how's and why's of protein folding intermediates. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 531(1-2), 14-23.
- Tyedmers, J., Mogk, A., & Bukau, B. (2010). Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nature Reviews.Molecular Cell Biology*, 11(11), 777-788.
- Umetsu, M., Tsumoto, K., Hara, M., Ashish, K., Goda, S., Adschiri, T., et al. (2003). How additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system. spectroscopic evidence for highly efficient refolding of a single-chain fv fragment. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(11), 8979-8987.
- van Dijk, M. A., & van de Winkel, J. G. (2001). Human antibodies as next generation therapeutics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 5(4), 368-374.
- Vendel, M. C., Favis, M., Snyder, W. B., Huang, F., Capili, A. D., Dong, J., et al. (2012). Secretion from bacterial versus mammalian cells yields a recombinant scFv with variable folding properties. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 526(2), 188-193.
- Villegas, V., Viguera, A. R., Aviles, F. X., & Serrano, L. (1996). Stabilization of proteins by rational design of alpha-helix stability using helix/coil transition theory. *Folding & Design*, 1(1), 29-34.
- Villegas, V., Zurdo, J., Filimonov, V. V., Aviles, F. X., Dobson, C. M., & Serrano, L. (2000). Protein engineering as a strategy to avoid formation of amyloid fibrils. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 9(9), 1700-1708.
- Wall, J. G., & Pluckthun, A. (1999). The hierarchy of mutations influencing the folding of antibody domains in escherichia coli. *Protein Engineering*, 12(7), 605-611.
- Walsh, D. M., & Selkoe, D. J. (2007). A beta oligomers - a decade of discovery. *Journal of Neurochemistry*, 101(5), 1172-1184.

- Walther, F. J., Waring, A. J., Hernandez-Juviel, J. M., Gordon, L. M., Wang, Z., Jung, C. L., et al. (2010). Critical structural and functional roles for the N-terminal insertion sequence in surfactant protein B analogs. *PLoS One*, 5(1), e8672.
- Wang, Y. J., Gao, C. Y., Yang, M., Liu, X. H., Sun, Y., Pollard, A., et al. (2010). Intramuscular delivery of a single chain antibody gene prevents brain abeta deposition and cognitive impairment in a mouse model of alzheimer's disease. *Brain, Behavior, and Immunity*, 24(8), 1281-1293.
- Wang, Y. J., Pollard, A., Zhong, J. H., Dong, X. Y., Wu, X. B., Zhou, H. D., et al. (2009). Intramuscular delivery of a single chain antibody gene reduces brain abeta burden in a mouse model of alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging*, 30(3), 364-376.
- Waters, P. J. (2001). Degradation of mutant proteins, underlying "loss of function" phenotypes, plays a major role in genetic disease. *Current Issues in Molecular Biology*, 3(3), 57-65.
- Waugh, D. S. TEV protease FAQ. [http://mc1.ncifcrf.gov/qaugh\\_tech/faq/tev.pdf](http://mc1.ncifcrf.gov/qaugh_tech/faq/tev.pdf)
- Wegiel, J., Kuchna, I., Nowicki, K., Frackowiak, J., Mazur-Kolecka, B., Imaki, H., et al. (2007). Intraneuronal abeta immunoreactivity is not a predictor of brain amyloidosis-beta or neurofibrillary degeneration. *Acta Neuropathologica*, 113(4), 389-402.
- Westermarck, P., Benson, M. D., Buxbaum, J. N., Cohen, A. S., Frangione, B., Ikeda, S., et al. (2005). Amyloid: Toward terminology clarification. report from the nomenclature committee of the international society of amyloidosis. *Amyloid : The International Journal of Experimental and Clinical Investigation : The Official Journal of the International Society of Amyloidosis*, 12(1), 1-4.
- Wetzel, R., Perry, L. J., & Mulkerrin, M. G. y Randall, M. (1990). Unfolding and inactivation: Genetic and chemical approaches to the stabilization of T4 lysozyme and interferon-gamma against irreversible thermal denaturation. In *Protein Design and the Development of New Therapeutics and Vaccines; Proceedings of the Sixth Annual Smith, Kline and French Research Symposium (Poste, G. & Hook, J. B., Eds), pp. 79-115*. Plenum, New York.
- Wilcock, D. M., Rojiani, A., Rosenthal, A., Levkowitz, G., Subbarao, S., Alamed, J., et al. (2004). Passive amyloid immunotherapy clears amyloid and transiently activates microglia in a transgenic mouse model of amyloid deposition. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(27), 6144-6151.
- Wiltfang, J., Smirnov, A., Schnierstein, B., Kelemen, G., Matthies, U., Klafki, H. W., et al. (1997). Improved electrophoretic separation and immunoblotting of beta-amyloid (A beta) peptides 1-40, 1-42, and 1-43. *Electrophoresis*, 18(3-4), 527-532.
- Winter, G., & Milstein, C. (1991). Man-made antibodies. *Nature*, 349(6307), 293-299.
- Winton, M. J., Lee, E. B., Sun, E., Wong, M. M., Leight, S., Zhang, B., et al. (2011). Intraneuronal APP, not free abeta peptides in 3xTg-AD mice: Implications for tau versus abeta-mediated alzheimer neurodegeneration. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 31(21), 7691-7699.
- Wolynes, P. G., Onuchic, J. N., & Thirumalai, D. (1995). Navigating the folding routes. *Science (New York, N.Y.)*, 267(5204), 1619-1620.
- World Health Organization and Alzheimer's Disease International. (2012). [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75263/1/9789241564458\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/75263/1/9789241564458_eng.pdf). *Dementia: A public health priority*.
- Worn, A., & Pluckthun, A. (1998). Mutual stabilization of VL and VH in single-chain antibody fragments, investigated with mutants engineered for stability. *Biochemistry*, 37(38), 13120-13127.
- Worn, A., & Pluckthun, A. (2001). Stability engineering of antibody single-chain fv fragments. *Journal of Molecular Biology*, 305(5), 989-1010.
- Wu, T. T., & Kabat, E. A. (1970). An analysis of the sequences of the variable regions of bence jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *The Journal of Experimental Medicine*, 132(2), 211-250.
- Yang, L. Q., Ji, X. L., & Liu, S. Q. (2013). The free energy landscape of protein folding and dynamics: A global view. *Journal of Biomolecular Structure & Dynamics*,
- Youmans, K. L., Tai, L. M., Nwabuisi-Heath, E., Jungbauer, L., Kanekiyo, T., Gan, M., et al. (2012). APOE4-specific changes in abeta accumulation in a new transgenic mouse model of alzheimer disease. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(50), 41774-41786.
- Zahs, K. R., & Ashe, K. H. (2010). 'Too much good news' - are alzheimer mouse models trying to tell us how to prevent, not cure, alzheimer's disease? *Trends in Neurosciences*, 33(8), 381-389.
- Zandomenighi, G., Krebs, M. R., McCammon, M. G., & Fandrich, M. (2004). FTIR reveals structural differences between native beta-sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 13(12), 3314-3321.
- Zhang, T., Bourret, J., & Cano, T. (2011). Isolation and characterization of therapeutic antibody charge variants using cation exchange displacement chromatography. *Journal of Chromatography.A*, 1218(31), 5079-5086.
- Zheng, L., Baumann, U., & Reymond, J. L. (2003). Production of a functional catalytic antibody ScFv-NusA fusion protein in bacterial cytoplasm. *Journal of Biochemistry*, 133(5), 577-581.

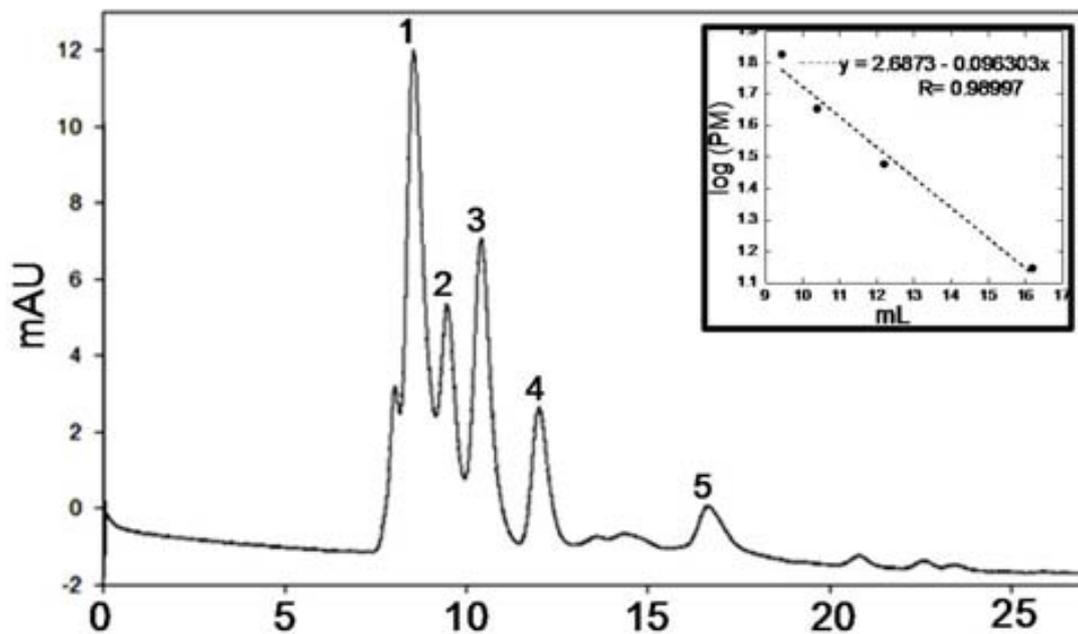
**ANEXOS**

---

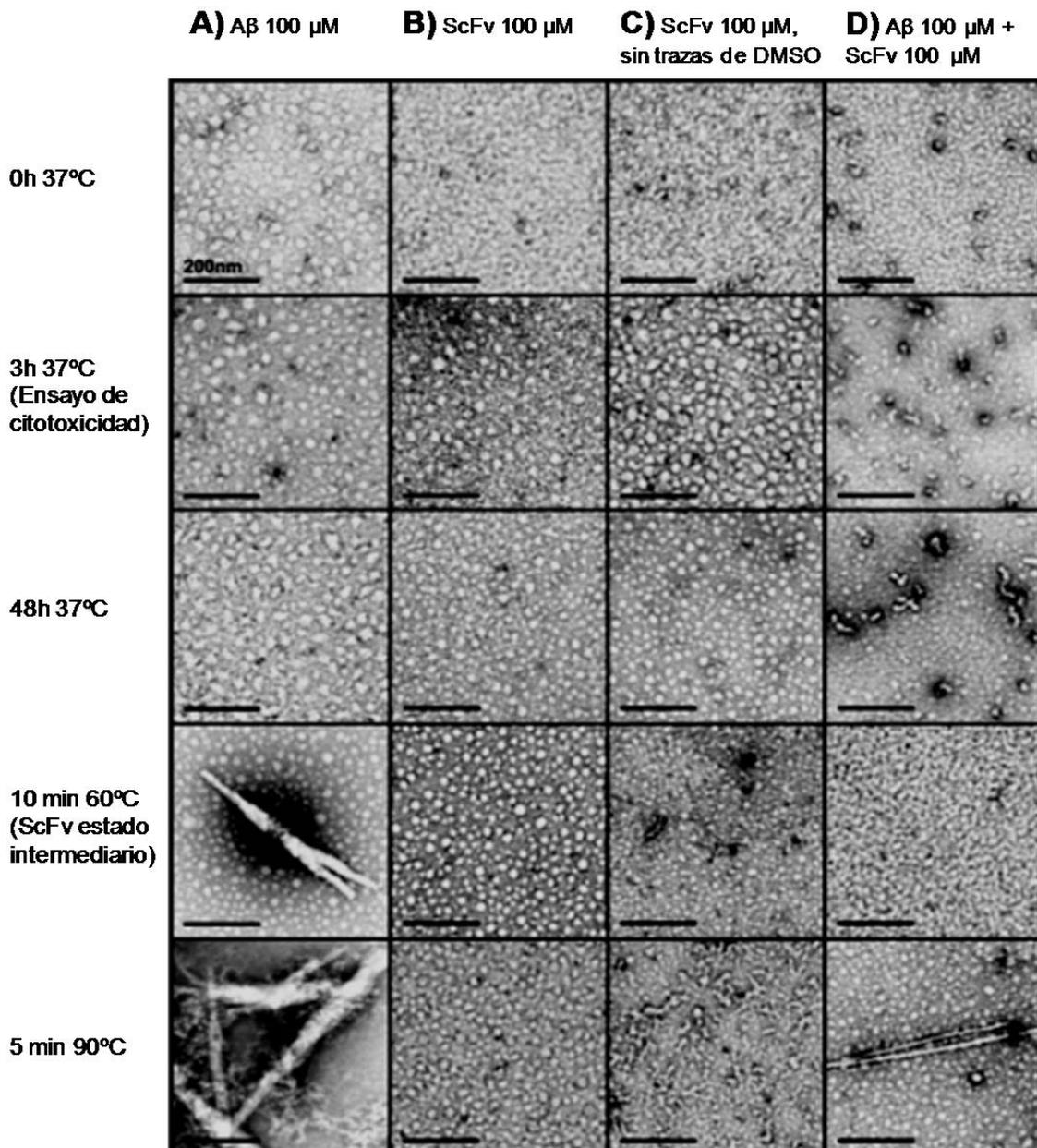
---



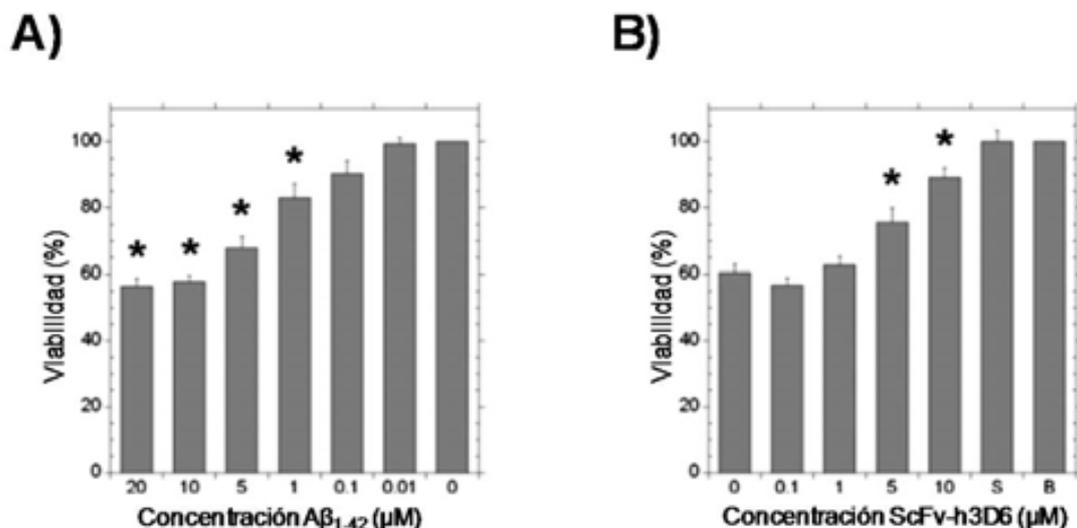
## ANEXO A: figuras



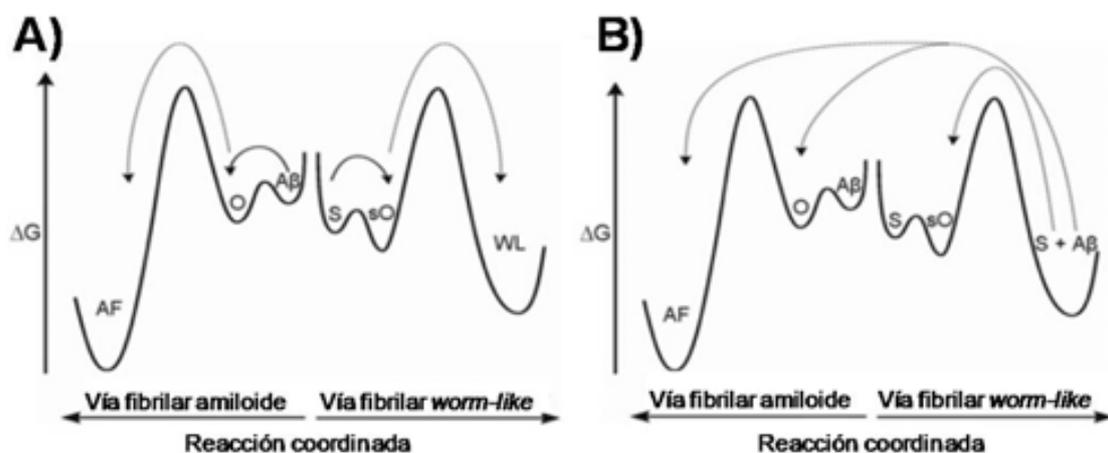
**Figura A1. Curva estándar de peso molecular en una columna analítica Superdex75 10/300 GL.** Pico 1: Volumen vacío ( $V_0$ ,  $\alpha$ -globulina, ~210 kDa); pico 2: BSA (albumina de suero bovino, ~66 kDa) y cadena pesada de  $\alpha$ -globulina (75 kDa); pico 3: ovoalbúmina (43 kDa); pico 4: cadena ligera de  $\alpha$ -globulina (30 kDa); pico 5: lisozima (14 kDa). Flujo de la cromatografía: 2 mL/ min. Tampón PBS. Medido a 280 nm en un equipo AKTA Purifier (GE Healthcare).



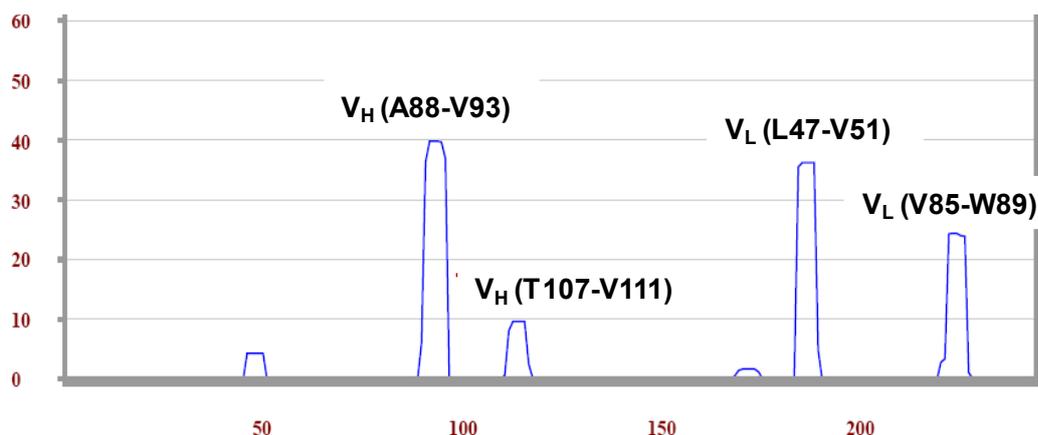
**Figura A2. Influencia en la formación de fibras amiloides y fibras WL de A $\beta$ <sub>1-42</sub>, por la presencia de scFv-h3D6, DMSO y aumento de la temperatura.** Imágenes de microscopía electrónica (*Transmission electron microscopy*, TEM) a diferentes temperaturas y tratamientos de **(A)** 100  $\mu$ M de A $\beta$ <sub>1-42</sub>, **(B)** 100  $\mu$ M de scFv-h3D6, **(C)** 100  $\mu$ M de scFv-h3D6 en ausencia de DMSO, **(D)** 100  $\mu$ M de A $\beta$ <sub>1-42</sub> más 100  $\mu$ M de scFv-h3D6. **(A)** Los oligómeros citotóxicos del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub> se visualizan a 37°C, el calentamiento a altas temperaturas induce la formación de fibras amiloides. **(B)** El scFv-h3D6 no forma fibras WL en presencia de DMSO. **(C)** El scFv-h3D6 en ausencia de DMSO forma pequeños oligómeros a 37°C y a 60°C (temperatura a la cual la mayoría de la población proteica se encuentra en un estado intermedio inducido térmicamente) e inicia la formación de fibras WL; estas fibras WL se encuentran mejor estructuradas después del tratamiento a 90°C. **(D)** El complejo scFv-h3D6:A $\beta$ <sub>1-42</sub> forma directamente fibras WL a 37°C, que desaparecen al disociar el complejo por el tratamiento térmico y permitir la formación de oligómeros del scFv-h3D6 y fibras amiloides del péptido A $\beta$ <sub>1-42</sub>. Reproducido de Marin-Argany y col. (2011).



**Figura A3. Ensayo de citotoxicidad MTT con células de neuroblastoma humano SH-SY5Y.** (A) Toxicidad inducida por diferentes concentraciones del péptido A $\beta_{1-42}$ . \* $P < 0.068$  comparado con 0  $\mu\text{M}$  de A $\beta_{1-42}$ . (B) Recuperación de viabilidad celular en presencia de 10  $\mu\text{M}$  del péptido A $\beta_{1-42}$  por adición de diferentes concentraciones de scFv-h3D6. S: 10  $\mu\text{M}$  del scFv-h3D6 (sin el péptido A $\beta_{1-42}$ ); B: tampón (sin el péptido A $\beta_{1-42}$  ni el scFv-h3D6). \* $P < 0.068$  comparado con 0  $\mu\text{M}$  de scFv-h3D6. Los resultados se expresan en términos de  $\pm$ S.E.M. La significancia se calcula usando el test de Wilcoxon para cuatro experimentos independientes (seis replicas para cada condición por experimento). Reproducido de Marin-Argany y col. (2011).



**Figura A4. Diagrama energético para la vía de agregación del péptido A $\beta_{1-42}$ , scFv-h3D6 y el complejo scFv-h3D6:A $\beta_{1-42}$ .** (A) A 37°C ( $\rightarrow$ ), el péptido A $\beta_{1-42}$  sigue una vía amiloide a través de la formación de oligómeros citotóxicos (O) y scFv-h3D6 (S) sigue una vía WL a través de la formación de oligómeros no citotóxicos (sO). El tratamiento térmico ( $\cdots\rightarrow$ ) es necesario tanto para la conversión de oligómeros de A $\beta$  hacia fibras amiloides (AF), como de la conversión de sO del scFv-h3D6 hacia fibras WL en ausencia de trazas de DMSO. (B) el complejo scFv-h3D6:A $\beta_{1-42}$  directamente forma fibras WL, y su disrupción por el tratamiento térmico ( $\cdots\rightarrow$ ) genera sO de scFv-h3D6, mientras que el péptido A $\beta_{1-42}$  salta hacia la vía fibrilar amiloide, formando oligómeros y AF. Reproducido de Marin-Argany y col. (2011).



**Figura A5. Regiones con alta tendencia a la agregación en scFv-h3D6.** Predicción realizada por TANGO de las regiones de la molécula con mayor tendencia a la agregación. Se diferencian cuatro regiones con fuerte tendencia, dos por cada dominio: V<sub>H</sub> (A88-V93 y T107-V111) y V<sub>L</sub> (L47-V51 y V85-W89), [numeración de Kabat]. Adaptado de Marin-Argany (2009, 2013).

## ANEXO B: publicaciones

1. Marin-Argany, M., **Rivera-Hernandez, G.\***, Marti, J., & Villegas, S. (2011). An anti- $\beta$  (amyloid  $\beta$ ) single-chain variable fragment prevents amyloid fibril formation and cytotoxicity by withdrawing  $\beta$  oligomers from the amyloid pathway. *The biochemical Journal*, 437(1), 25-34.  
**\*Co-first author**
2. Gimenez-Llort, L., **Rivera-Hernandez, G.\***, Marin-Argany, M., Sanchez-Quesada, J. L., & Villegas, S. (2013). Early intervention in the 3xTg-AD mice with an amyloid  $\beta$ -antibody fragment ameliorates first hallmarks of alzheimer disease. *Mabs*, 5(5), 665–677.  
**\*Co-first author**
3. Esquerda-Canals, G., Marti, J., **Rivera-Hernandez, G.**, Gimenez-Llort, L., & Villegas, S. (2013). Loss of deep cerebellar nuclei neurons in the 3xTg-AD mice and protection by an anti-amyloid  $\beta$  antibody fragment. *Mabs*, 5(5), 660–664.
4. **Rivera-Hernández, G.**, Marin-Argany M., Blasco-Moreno B., Bonet J., Oliva B., & Villegas, S. (2013). Elongation of the C-terminal domain of an anti-amyloid  $\beta$  single-chain variable fragment increases its thermodynamic stability and decreases its aggregation tendency. *Mabs*, 5(5), 678–689.