




ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=ca>

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=es>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

TESI DOCTORAL

**Fragments d'anticòs com a model d'estudi de
l'amiloïdosi de cadena lleugera i com agents
terapèutics per a la malaltia d'Alzheimer**

Gabriel Serra Mir

Desembre 2021



Universitat Autònoma de Barcelona

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Fragments d'anticòs com a model d'estudi de l'amiloïdosi de cadena lleugera i com agents terapèutics per a la malaltia d'Alzheimer

Tesi presentada per Gabriel Serra Mir per optar al grau de Doctor en
Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina, sota la direcció de la Dra.
Sandra Villegas Hernández

Treball realitzat a la Unitat de Biociències del Departament de Bioquímica i
Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona

Gabriel Serra Mir

Dra. Sandra Villegas Hernández

Bellaterra, Desembre 2021

AGRAÏMENTS

En primer lloc agrair a la **Dra. Sandra Villegas** la oportunitat que hem va donar ara fa 6 anys de realitzar les pràctiques i el treball final de màster al seu grup. També, per haver confiat amb jo per a la realització del doctorat i per la seva supervisió i correcció.

En segon lloc, agrair a la **Dra. Marina Ramírez-Alvarado**, a la **Dra. Mar Hernández-Guillamón** i a la **Dra. Vicenta Llorente-Cortés** la oportunitat d'haver pogut col·laborar amb elles i els seus equips.

També vull agrair a na **Sílvia**, qui em va despertar la curiositat per la investigació i per animar-me a continuar amb la meva carrera investigadora. Si no hagués estat per ella, possiblement no estaria avui aquí.

Dels companys de laboratori, els antics PFs, **Gisela** i **Laia**, gràcies per voler incloure'm fins i tot abans de ser part del grup. He de fer una menció especial a en **Jofre**, qui va ser el meu mestre fins que va acabar la tesi i em va guiar en els meus primers passos per ca'n PFs. També, agrair als nous PDIs, **Paula** i **Lídia**, i en especial, a l'**Alejandro**, qui ha estat un company i un amic tant dins com fora del laboratori, no ha estat sempre fàcil, però sempre agrairé la teva paciència, la teva amabilitat i la teva serenor.

Companys de departament, en **Guillem**, **Lu**, **Li**, **Pablo** de RIBOs, en **Valen**, **Jordi**, **Jaime**, **Samu** i **Francisca** de PROs, **Pilar** i **Lucia** de RMNs, **Marta** i **Dani** de DNAs, **Núria** de Plantes, **Raquel** d'ADHs, a na **Jara**. Gràcies a tots, per aquests anys que, com podeu imaginar, gràcies a vosaltres repetiria.....

A n'**Helena**, que no importava si era dilluns o no, ella sempre estava disposada a salvar-me el dia (o fins i tot la setmana) i preparar fins i tot la cosa més absurda. També a en **Salva**, qui ara que em té ben ensenyat, me'n vaig. A na **Magda** i en **Santi** per que tampoc tenien problemes en que no m'apuntés mai i els anés perseguint per un rentaplats urgent.

Adrià, Elías, Francesc, Madico, Pau, Pep i Pere, mos hem vist poc en aquests anys, però sempre que ho hem fet ha estat com si seguíssim vivint tots a Mallorca.

No puc oblidar-me de **sa meva família**, qui tot i sa distància que mos ha separat en tot aquest procés sempre han estat allà, per discutir, per fer broma, per reunir-mos es dies que tornava a casa. Especialment a **munpare** i a **mumare**, que tot i que no vos hagi cridat totes ses vegades que vos ho mereixeu mai m'ho heu tingut en compte, vos estim. També a en **Joan** i na **Maria**, qui sempre estan disposats a fer un CATAN i una mica de menjar per emportar, una de ses millors medicines per es doctorat.

M'agradaria també donar les gràcies a **la meva nova família** (política) qui em va acollir com un més des del primer dia, que tot i que van ser moments difícils per ells no van dubtar ni un segon en incloure'm i fer-me sentir estimat. En especial a n'**Anna**, qui m'ha demostrat que pots estimar a algú que no és la teva mare com si quasi ho fos. També agrair a na **Júlia** sa increïble portada que ha dissenyat i maquetat.

També **Turias** i **Ferran**, per que des de que mos vam conèixer ara fa 10 anys, a nes bar de ciències entre classes i pràctiques heu estat de lo millor que m'he endut de Girona.

Finalment, agrair a na **Laia**, per tot, no crec que hi hagi paraules per descriure tot lo que m'has aportat en aquests anys. T'estim més que res i esper poder seguir demostrant-ho cada dia que passi.

Índex

Índex de figures	v
Índex de taules	viii
Índex d'equacions	viii
Abreviacions	ix
Resum	xv
Abstract	xvii
Introducció	1
Estructura i plegament de proteïnes	3
Agregació amiloide	6
Amiloïdosis	9
Amiloïdosi de cadena lleugera.....	9
Fisiopatologia	11
Fragments d'anticòs	13
Malaltia d'Alzheimer	14
Principals factors implicats en la malaltia d'Alzheimer	15
Hipòtesi de la cascada amiloide	28
Models animals	29
Teràpies per a l'AD	31
Immunoteràpia	32
Fragments d'anticòs	37
Ressonància Magnètica nuclear (RMN)	37
Fonaments de la tècnica.....	37
Temps de relaxació.....	40
Polsos de radiofreqüència.....	43
Gradients	43
Imatges per ressonància magnètica (MRI)	44

Imatges ponderades en T_1	45
Imatges ponderades en T_2	46
Imatges ponderades en T_2^*	48
Imatges de difusió	48
Objectius.....	53
Materials i Mètodes	57
Tècniques del DNA recombinant	59
Reacció en cadena de la polimerasa	59
Enzims de restricció	60
Reacció de lligació	60
Purificació de DNA.....	61
Quantificació de DNA i proteïna.....	61
Expressió de proteïnes.....	62
Soques bacterianes	62
Soques de llevat.....	63
Vectors d'expressió	64
Medis de cultiu.....	65
Transformació d'Escherichia coli.....	67
Transformació de Pichia pastoris	68
Expressió de proteïnes recombinants en Escherichia coli	69
Expressió de proteïnes recombinants en Pichia pastoris	70
Purificació de proteïnes.....	70
Expressió i purificació d'anticossos monoclonals (m3D6)	72
scFvs expressats	74
VVK08	74
VVA09	74
h3D6.....	75
Caracterització de proteïnes	75
Dicroisme circular	75
Espectroscòpia de fluorescència.....	77
Desnaturalització química	78

Reflectància total atenuada.....	79
Microscòpia electrònica de transmissió.....	80
Espectrometria de masses.....	81
Estudis in vivo	81
Animals	81
Disseny experimental i anàlisi estadístic	82
Homogeneïtzació de teixits	85
Histoquímica	86
Western blot	87
Enzime-linked immunosorbent assay (ELISA)	87
Imatges per ressonància magnètica (MRI)	88
ARIA-H.....	88
ARIA-E	89
Imatges per tensor de difusió (DTI)	91
Mesura del volum cerebral	92
Resultats	95
I- La dimerització forçada del fragment variable d'un anticòs implicat en l'amiloidosi de cadena lleugera modifica la seva via d'agregació	97
El VVK08 forma trímers i el VVA09 dímers i tetràmers.....	97
El VVK08 i el dímer del VVA09 presenten el plegament VL canònic.....	99
El VVK08 i el dímer del VVA09 exhibeixen diferents intermediaris durant la desnaturalització tèrmica.....	101
El VVK08 i el VVA09 tenen intermediaris en l'embut d'agregació diferents	103
II- Tant el pèptid Aβ com la proteïna tau es veuen afectades per un fragment d'anticòs anti-Aβ en ratolins 3xTg-AD d'edat avançada.....	113
L'scFv-h3D6 redueix els nivells de tau total.....	113
L'scFv-h3D6 millora lleugerament l'estat proinflamatori.....	116

III- L'eliminació del domini Fc d'un anticòs monoclonal contra el pèptid Aβ augmenta la seguretat i manté l'eficàcia en el model murí APP23.....	119
El model APP23 desenvolupa major número de lesions hemorràgiques al còrtex que la soca control del mateix fons genètic	120
El model APP23 presenta dany axonal i deteriorament de la mielina en el cos callós frontal.....	121
El volum del cervell no es veu afectat per la immunoteràpia contra l'A β ...	125
La presència de regió Fc provoca més ARIA-H en el còrtex i el teixit estriat, però no més ARIA-E.....	127
La immunoteràpia contra el pèptid A β no reverteix el dany axonal ni el deteriorament de la mielina	132
Discussió	137
I- La dimerització forçada del fragment variable d'un anticòs implicat en l'amiloïdosi de cadena lleugera modifica la seva via d'agregació	139
II- Tant el pèptid Aβ com la proteïna tau es van veure afectades per un fragment d'anticòs anti-Aβ en ratolins 3xTg-AD d'edat avançada.....	145
III- L'eliminació del domini Fc d'un anticòs monoclonal contra el pèptid Aβ augmenta la seguretat i manté l'eficàcia en el model murí APP23.....	151
Conclusions	157
Publicacions durant la tesi.....	163
Bibliografia.....	165

Índex de figures

Introducció

Figura I-1 Estructura de les proteïnes	4
Figura I-2. Representació de l'embut energètic de plegament i agregació de proteïnes	5
Figura I-3. Mecanisme de formació de les fibres amiloides	7
Figura I-4. Model de l'agregació amiloide dependent de nucleació	8
Figura I-5. Resum de la patologia AL.....	10
Figura I-6. Representació esquemàtica dels dominis de les IgGs i els scFvs	12
Figura I-7. Principals marcadors histològics de l'AD	15
Figura I-8. Isoformes de la proteïna precursora amiloide (APP).....	17
Figura I-9. Possibles vies de processament de l'APP.....	20
Figura I-10. Estructura tridimensional dels oligòmers d'A β	22
Figura I-11. Esquema de les isoformes de tau i la seva estructura tridimensional	24
Figura I-12. Representació esquemàtica de nuclis dotats d'espins	40
Figura I-13. Representació de l'efecte de la magnetització sobre una mostra rotant a la freqüència de ressonància.....	41
Figura I-14. Representació del temps de relaxació longitudinal (T_1) i transversal (T_2).....	42
Figura I-15. Representació esquemàtica de l'aplicació de gradients per a obtenir seccions específiques d'un teixit	44
Figura I-16. Relació entre temps de repetició i contrast en T_1	46
Figura I-17. Relació entre temps d'eco i contrast en T_2	48
Figura I-18. Representació esquemàtica de la difusió de l'aigua en un vòxel	50

Figura I-19. Model que resumeix els coneixements sobre els canvis en la difusivitat en diferents estats del dany axonal i de la mielina	51
--	-----------

Mètodes

Figura M-1. Funcionament de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR)	59
Figura M-2. Mapa dels vectors d'expressió d'<i>E. coli</i> i <i>P. pastoris</i>	65
Figura M-3. Dicroisme circular (CD)	76
Figura M-4. Imatges ponderades en T_2^* del cervell.....	89
Figura M-5. Determinació de les ROIs per ADC i T_2.....	91
Figura M-6. Regions d'interès utilitzades per mesurar el volum del cervell.....	93

Resultats

Figura R-1.1. El VVK08 forma trímers i el VVA09 dímers i tetràmers	98
Figura R-1.2. El VVK08 i el dímer del VVA09 adopten el plegament canònic dels dominis V_L de les cadenes lleugeres de les immunoglobulines	100
Figura R-1.3. El VVK08 és tèrmicament més estable que el VVA09	102
Figura R-1.4. El VVK08 i el VVA09 presenten intermediaris en l'agregació diferents.....	104
Figura R-1.5. El dímer de VVA09 presenta fibres WL que coexistien amb fibres amiloides.....	111
Figura R-1.6. La formació de l'intermediari metastable per part del dímer del VVA09 afavoreix la formació de fibres amiloides	111
Figura R-2.1. El tractament amb scFv-h3D6 redueix els nivells de tau total a l'hipocamp.....	115
Figura R-2.2. El tractament amb scFv-h3D6 redueix els nivells de tau total a l'hipocamp.....	116

Figura R-2.3. L'scFv-h3D6 no provoca cap resposta neuroinflamatòria detectable en l'hipocamp.....	118
Figura R-3.1. El model APP23 presenta més lesions microhemorràgiques que els ratolins no transgènics	121
Figura R-3.2. Quantificació del número de microhemorràgies a partir d'imatges ponderades en T2* en diferents regions del cervell	123
Figura R-3.3. L'APP23 presenta dany axonal i alteracions en la mielina en el cos callós frontal.....	124
Figura R-3.4. El volum del cervell no es veu afectat per l'administració d'immunoteràpia contra l'Aβ	125
Figura R-3.5. L'immunoteràpia contra l'Aβ redueix els nivells d'Aβ₁₋₄₀ insoluble en l'hipocamp.....	127
Figura R-3.6. L'scFv-h3D6 no provoca ARIA-H i el mAb-m3D6 sí	129
Figura R-3.7. La immunoteràpia contra el pèptid Aβ no té efecte sobre el volum de les hemorràgies	132
Figura R-3. 8. Els diferents tractaments no provoquen l'aparició d'ARIA-E.....	133
Figura R-3. 9. La immunoteràpia contra l'Aβ no és capaç de revertir el dany axonal ni la degradació de la mielina en el cos callós	134

Discussió

Figura D-1. Esquema de l'embut d'agregació dels scFvs de l'AL.....	143
---	------------

Índex de taules

Taula 1. Coeficients determinats espectrofotomètricament per avaluar la puresa del DNA	62
Taula 2. Calibració de la columna d'exclusió molecular HiLoad 16/60 Superdex 75 PrepGrade.....	98

Taula 3. Ajust al model de dos estats de les corbes de desnaturalització química del VVK08 i el VVA09 i les proteïnes de les quals deriven.	101
Taula 4. Contribució dels diferents components a l'àrea de l'espectre d'ATR	107
Taula 5. Resum del número total i de noves hemorràgies en els ratolins APP23	129

Índex d'equacions

Equació 1. Equació de la freqüència de precessió de Larmor (ν_0) en MHz.....	38
Equació 2. Equació de la diferència energètica (ΔE) entre els nivells d'energia ...	39
Equació 3. Equació dels paràmetres en l'equilibri per a un desplegament en dos estats	78
Equació 4. Equació del coeficient r de Wendt	84
Equació 5. Equació de l'anisotropia fraccional (FA)	91
Equació 6. Equació de la difusivitat axial ($\lambda_{ }$) i la difusivitat radial (λ_{\perp})	92

Abreviacions

- ΔE** Separació energètica entre les diferents orientacions dels espins nuclears
- θ** Angle de gir
- λ** Longitud d'ona
- $\vec{\mu}$** Moment magnètic nuclear
- 2xYT** Medi de cultiu amb doble quantitat de llevat i triptona, de l'anglès *Yeast and triptone*
- 3xTg-AD** Model de ratolí, triple transgènic, de la malaltia d'Alzheimer
- A β** Pèptid beta-amiloide
- Ab** Anticòs, de l'anglès *antibody*
- ABCA7** Gen que codifica per la proteïna del mateix nom, de l'anglès *ATP-binding cassette sub-family A member 7*
- AD** Malaltia d'Alzheimer, de l'anglès *Alzheimer's Disease*
- ADAM** de l'anglès *a disintegrin and metalloproteinase*
- ADC** Coeficient de difusió aparent, de l'anglès *apparent diffusion coefficient*
- AICD** Domini C-terminal intracel·lular de l'APP, de l'anglès *APP intracellular C-terminal domain*
- AL** Amiloïdosi de cadena lleugera, de l'anglès *light chain amyloidosis*
- AOX** Gen de l'alcohol deshidrogenasa
- apoE** Apolipoproteïna E
- APOE** Gen que codifica per l'apolipoproteïna E
- apoJ** Apolipoproteïna J
- APOJ** Gen que codifica per l'apolipoproteïna J
- APP** Proteïna precursora amiloide, de l'anglès *amyloid precursor protein*
- ARIA** Anomalies en la imatge relacionades amb el pèptid amiloide, de l'anglès *Amyloid-related imaging abnormalities*
- ARIA-E** ARIA-edema
- ARIA-H** ARIA-microhemorrage
- ATCC** De l'anglès *american type culture collection*

ATR	De l'anglès <i>attenuated total reflectance</i>	CD33	Gen que codifica per la proteïna del mateix nom, de l'anglès <i>sialic acid binding Ig-like lectin 3</i>
b	Factor de difusió	CDR	Regions determinants de complementarietat, de l'anglès <i>complementary determining regions</i>
B₀	Camp magnètic extern	CEEAH	Comitè d'ètica d'experimentació animal i humana
B₁	Camp magnètic addicional	C_H	Domini constant de la cadena pesada, de l'anglès <i>heavy chain constant domain</i>
BACE	Enzim de tall de l'APP pel lloc β, de l'anglès <i>β-site APP-cleaving enzyme</i>	ChEI	de l'anglès <i>cholinesterase inhibitors</i>
BBB	Barrera hematoencefàlica, de l'anglès <i>blood brain barrier</i>	CIBER-BBN	Centre d'Investigació Biomèdica en Xarxa – Bioenginyeria, Biomaterials i Nanomedicina
BCA	De l'anglès <i>bicinchoninic acid assay</i>	CSF	Líquid cefalorraquidi, de l'anglès <i>cerebrospinal fluid</i>
BMGY	de l'anglès <i>buffered glycerol-complex medium</i>	CNS	Sistema nerviós central, de l'anglès <i>central nervous system</i>
BMMY	de l'anglès <i>buffered methanol-complex medium</i>	C-terminal	Extrem carboxil terminal
bp	Parells de bases, de l'anglès <i>base pairs</i>	C_V	Domini constant de la cadena lleugera, de l'anglès <i>light chain constant domain</i>
BSA	Albúmina de sèrum boví, de l'anglès <i>bovine serum albumin</i>		
CA	<i>Cornus Ammonis</i>		
CAA	Angiopatia amiloide cerebral, de l'anglès <i>cerebral amyloid angiopathy</i>		
CD	Dicroisme circular, de l'anglès <i>circular dichroism</i>		

Da	Daltons	endA	Gen de la endonucleasa A
DAB	Diaminobenzidina	EOAD	AD d'aparició precoç, de l'anglès <i>early-onset Alzheimer's disease</i>
ddH2O	Aigua doblement desionitzada	Fab	Fragment d'unió a l'antigen, de l'anglès <i>fragment antigen-binding</i>
deg	Unitats d'elipticitat	FAD	AD familiar, de l'anglès <i>familiar Alzheimer's disease</i>
DMEM	De l'anglès <i>dulbecco's modified eagle's medium</i>	FBS	Sèrum fetal boví, de l'anglès <i>fetal bovine serum</i>
DMSO	Dimetil sulfòxid	Fc	Fragment cristalitzable
DNA	Àcid desoxiribonucleic	FCS	de l'anglès <i>fetal calf sèrum</i>
dNTP	Desoxiribonucleòtid trifosfat	FDA	Administració de medicaments i d'aliments d'Estats Units, de l'anglès <i>Food and Drug Administration</i>
DPX	De l'anglès <i>di-N-butyle phthalate in xylene</i>	FOV	Camp de visió, de l'anglès <i>field of vision</i>
DTI	Imatges basades en tensors de difusió, de l'anglès <i>diffusion tensor imaging</i>	FTD	Demència frontotemporal, de l'anglès <i>frontotemporal dementia</i>
DTT	Ditiotreitòl	Fv	Fragment variable
DWI	Imatges de difusió, de l'anglès <i>Diffusion Weighted Imaging</i>	g	Unitats de força centrífuga
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	GABA	Àcid γ -aminobutíric, de l'anglès <i>gamma-aminobutyric acid</i>
EDTA	De l'anglès <i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>		
ELISA	Assaig immunoabsorbent lligat a enzim, de l'anglès <i>enzyme-linked immunoabsorbent assay</i>		

GFAP De l'anglès <i>glial fibrillary acidic protein</i>	KPI Inhibidor tipu Kunitz de proteases, de l'anglès <i>Kunitz protease inhibitor</i>
gor Gen de la glutatió reductasa	LB Luria-Bertani
GSH Glutatió reduït	LDLR de l'anglès <i>low-density lipoproteins receptor</i>
GSSG Glutatió oxidat	LOAD AD d'aparició tardana, de l'anglès <i>late-onset Alzheimer's disease</i>
HC Cadena pesada, de l'anglès <i>heavy chain</i>	LPS Lipopolisacàrids
HCl Àcid clorhídric	LRP1 de l'anglès <i>LDL-related protein receptor 1</i>
HD De l'anglès <i>Huntington's disease</i>	LTP Potenciació a llarg termini, de l'anglès <i>long-term potentiation</i>
His-Tag Cua d'histidines	M₀ Magnetització en estat d'equilibri
Hz Herzt	mAb Anticòs monoclonal, de l'anglès <i>monoclonal antibody</i>
I Espín nuclear	mAb-m3D6 Anticòs monoclonal 3D6 de ratolí, de l'anglès <i>monoclonal antibody-mouse 3D6</i>
Iba1 De l'anglès <i>ionized calcium binding adaptor molecule 1</i>	MALDI de l'anglès <i>matrix assisted laser desorption ionization</i>
IDP Proteïna intrínsecament desordenada, de l'anglès <i>intrinsically disordered protein</i>	MAPT Gen que codifica per la proteïna tau, de l'anglès <i>microtubule-associated protein tau</i>
Ig Immunoglobulina	
IPTG de l'anglès <i>isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>	
Kn Kanamicina	
Knr Resistència a kanamicina, de l'anglès <i>kanamycin resistance</i>	

MCS	De l'anglès <i>multiple cloning site</i>	PCR	Reacció en cadena de la polimerasa, de l'anglès <i>polymerase chain reaction</i>
MRE	De l'anglès <i>mean residue ellipticity</i>	PD	De l'anglès <i>Parkinson's disease</i>
MRI	Imatges de ressonància magnètica, de l'anglès <i>magnetic resonance imaging</i>	PDB	Protein Data Bank
MTX	Matriu, de l'anglès <i>matrix</i>	PEN	De l'anglès, <i>presenilin enhancer protein</i>
Mw	Massa molecular, de l'anglès <i>molecular weight</i>	PET	De l'anglès <i>positron emission tomography</i>
M_{xy}	Component longitudinal de la magnetització	PMF	De l'anglès <i>peptide mass fingerprinting</i>
M_z	Component transversal de la magnetització	PSEN	Presenilina
NFTs	Cabdells neurofibril·lars, de l'anglès <i>neurofilament tangles</i>	PVDF	De l'anglès <i>Polyvinylidene Difluoride</i>
NGS	de l'anglès <i>normal goat serum</i>	RARE	De l'anglès <i>rapid acquisition with relaxation enhancement</i>
NMDAN	metil-D-aspartat	recA	Gen de recombinació A
N-terminal	Extrem amino-terminal	RF	Pols de radiofreqüència
NTg	No transgènic	RMN	Ressonància magnètica nuclear
OD₆₀₀	Densitat òptica a 600 nm, de l'anglès <i>optical density at 600 nm</i>	RNA	Àcid ribonucleic, de l'anglès <i>ribonucleic acid</i>
PBS	Tampó fosfat salí, de l'anglès <i>phosphate buffer saline</i>	ROI	Regió d'interès, de l'anglès <i>region of interest</i>
		Rpm	Revolucions per minut

SAD	AD esporàdic, de l'anglès <i>sporadic Alzheimer's disease</i>		inhomogeneïtats del camp magnètic
SCAC	Servei de cultius cel·lulars, producció d'anticossos i citometria de la UAB	T_a	Temperatura a la qual el 50% de la proteïna es troba agregada
scFv	Fragment variable de cadena senzilla, de l'anglès <i>single-chain variable fragment</i>	TEM	Microscòpia electrònica de transmissió, de l'anglès <i>transmission electron microscopy</i>
scFv-h3D6	Fragment variable de cadena senzilla provinent de l'anticòs 3D6 humanitzat, de l'anglès <i>single chain variable fragment of humanized 3D6</i>	T_m	Temperatura a la qual el 50% de la proteïna es troba desplegada, de l'anglès <i>melting temperature</i>
SDS-PAGE	De l'anglès <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>	TNF	De l'anglès <i>tumor necrosis factor</i>
SePBioEs	Servei de proteòmica i biologia estructural de la UAB	TOF	Temps de vol, de l'anglès <i>time of flight</i>
ssNMR	De l'anglès <i>solid state nuclear magnetic resonance</i>	V_H	Domini variable de la cadena pesada, de l'anglès <i>heavy chain variable domain</i>
Syk	De l'anglès <i>spleen tyrosine kinase</i>	V_L	Domini variable de la cadena lleugera, de l'anglès <i>light chain variable domain</i>
T₁	Temps de relaxació longitudinal	YPD	de l'anglès <i>yeast extract peptone dextrose</i>
T₂	Temps de relaxació transversal	YNB	de l'anglès <i>yeast nitrogen base</i>
T₂*	Temps de relaxació transversal que incorpora les	WL	De l'anglès <i>worm-like</i>

RESUM

Els mecanismes de l'amiloidogènesi segueixen sent desconeguts. Les amiloïdosis són malalties incurables que solen acabar amb la vida dels pacients, i engloben un grup heterogeni de proteïnes. Les proteïnes amiloidogèniques agreguen formant dipòsits tant en els compartiments intracel·lulars com en els extracel·lulars, cosa que provoca la mort cel·lular i, posteriorment, el deteriorament dels teixits. Dues de les amiloïdosis més destructives són la malaltia d'Alzheimer, una amiloïdosis neurodegenerativa amb una alta prevalença, i l'amiloidosi de cadena lleugera, una amiloïdosis sistèmica rara i mortal.

L'amiloidosi de cadena lleugera és difícil de diagnosticar i no existeix un tractament curatiu. De la mateixa manera, existeix una variabilitat de seqüència extremadament alta dins de la mateixa malaltia, que confereix a cada proteïna patogènica propietats bioquímiques i estructurals exclusives. L'AL-09 és un domini variable de cadena lleugera (V_L) que es diferencia en set aminoàcids de la seva línia germinal, anomenada κI O18/O8. Aquestes mutacions fan que l'AL-09 presenti una interfície dimèrica alterada respecte a la seva línia germinal. S'ha postulat que aquesta interfície alterada és la principal responsable de la gran amiloidogenicitat de l'AL-09.

En aquest treball, es van produir de manera recombinant el VVK08 i el VVA09, dos fragments variables de cadena senzilla formats per dos dominis V_L idèntics de les proteïnes esmentades anteriorment, amb l'objectiu principal d'estudiar aquesta interfície. Els resultats van permetre determinar que l'agregació del trímer del VVK08 passava per un estat intermediari que mostrava components β i *random coil* i que, a diferència del domini V_L parental, seguia la via *worm-like* (WL). Així mateix, el dímer del VVA09 també va mostrar la capacitat d'agregar com a fibres WL, però, en condicions que afavorien un estat intermediari, l'agregació va transcórrer per la via amiloide. Aquest intermediari va mostrar un plegament tot β metaestable que corresponia a la forma tetramèrica del VVA09. Així, el sistema VVK08-VVA09 facilita l'estudi de la interfície responsable de l'amiloidogenicitat dels dominis V_L i constitueix un sistema putatiu per al cribratge de fàrmacs.

La malaltia d'Alzheimer és la demència més estesa. Segons la hipòtesi de la cascada amiloide, l'acumulació primerenca del pèptid A β desencadena la fosforilació de tau, la disfunció sinàptica i, en última instància, la mort neuronal i el deteriorament cognitiu. L'aparició d'anomalies en la imatge relacionades amb el pèptid amiloide (ARIA), com l'edema vasogènic (ARIA-E) o les lesions hemorràgiques (ARIA-H), trobades en assajos clínics d'immunoteràpia contra l'A β , s'ha relacionat amb la funció efectora de la fracció cristal·litzable (Fc) dels anticossos en l'activació glial. El grup on s'emmarca aquesta Tesi proposa l'ús de fragments variables de cadena senzilla, que no contenen la regió Fc, per establir una estratègia terapèutica més segura.

L'scFv-h3D6 és un fragment variable de cadena lleugera derivat de l'anticòs monoclonal bapineuzumab (també anomenat mAb-h3D6), que ja ha demostrat la seva capacitat per reduir els nivells d'A β . En aquest estudi, es va avaluar l'efecte de l'scFv-h3D6 en la càrrega de tau en ratolins 3xTg-AD d'edat avançada. Breument, el tractament amb scFv-h3D6 no només va reduir els nivells d'A β , sinó també els nivells de tau total. És important remarcar que el tractament no va incrementar l'estat proinflamatori típic del model en aquesta edat. En conclusió, aquest estudi demostra la interconnexió entre els dos marcadors histopatològics de l'AD.

Per altra banda, es van comparar els tractaments amb mAb-m3D6, versió del bapineuzumab de ratolí, amb l'scFv-h3D6 utilitzant un altre model murí d'AD, l'APP23. Aquest model, a diferència del 3xTg-AD, desenvolupa angiopatia amiloide cerebral (CAA) i constitueix un model adient per a estudiar l'aparició d'ARIA emprant imatges per ressonància magnètica (MRI). Tot i que el mAb-m3D6 i l'scFv-h3D6 van reduir els nivells d'A β en la mateixa mesura, no es va observar cap efecte significatiu en el volum cerebral, ni en el dany axonal i el deteriorament de la mielina al cos callós, de manera que, com era d'esperar en etapes avançades de la malaltia, cap dels dos tractaments van ser capaços de revertir la neurodegeneració. No obstant això, l'anticòs sencer va produir un clar augment del nombre de noves lesions hemorràgiques, o ARIA-H, principalment al còrtex, mentre que l'scFv-h3D6 no. Per tant, els resultats permeten afirmar que el format scFv és més segur que el mAb sencer.

ABSTRACT

Mechanisms of amyloidogenesis remain poorly understood. Amyloidoses are incurable life-threatening diseases, which encompass a heterogeneous group of proteins. Amyloid proteins aggregate as deposits either intracellularly or extracellularly, leading to cell death and subsequently to tissue impairment. Two of the most devastating amyloidosis are Alzheimer's disease, a neurodegenerative amyloidosis with a high prevalence, and light chain amyloidosis, a rare and deadly systemic amyloidosis.

Light chain amyloidosis is arduous to diagnose, and a curative treatment does not exist. Likewise, extremely high sequence variability occurs within the same disease, conferring exclusive biochemical and structural properties to each pathological protein. AL-09 is a light chain variable domain that differs by seven amino acids from its germline, called κ I O18/O8. Such mutations generate an altered AL-09 dimer interface with respect to that by its germline. It has been postulated that the altered interface is the main responsible for the enhanced amyloidogenicity of AL-09.

Here, we recombinantly produced VVK08 and VVA09, two single chain variable fragments composed of two identical V_L domains from both proteins mentioned above, with the main aim of studying such interfaces. Results allowed us to determine that VVK08 trimer aggregation proceeds through an intermediate state that shows both β and random coil components and that, in contrast to the parental V_L domain, follows the worm-like (WL) aggregation pathway. Likewise, VVA09 dimer demonstrated the ability to aggregate as worm-like fibrils as well but, in conditions favoring the occurrence of an intermediated state, aggregation proceeded through the amyloid pathway. This intermediate showed a metastable, all- β fold that corresponded to the tetrameric form of VVA09. Thus, the VVK08-VVA09 system facilitates the study of the interface behind amyloidogenicity of V_L domains and constitutes a putative system for drug screening.

Alzheimer's disease is the most widespread dementia. According to the amyloid cascade hypothesis, the early accumulation of the A β -peptide triggers tau phosphorylation, synaptic dysfunction, and ultimately neuronal death and cognitive impairment. The occurrence of amyloid-related imaging abnormalities (ARIA), i.e., vasogenic edema (ARIA-E) and hemorrhagic events (ARIA-H), found in clinical trials for A β -immunotherapy, has been related to the antibody's effector function on glial activation by the Fc portion of the antibody. The use of single chain variable fragments, lacking the Fc portion, has been proposed by the research group hosting this work to constitute a safer therapeutic strategy.

ScFv-h3D6 is a single-chain variable fragment derived from the monoclonal antibody bapineuzumab (also known as mAb-h3D6), that has already shown its ability to reduce amyloid burden. In this study, the effect of scFv-h3D6 on tau load has been assessed in elderly 3xTg-AD mice. Briefly, the treatment with scFv-h3D6 was, a part of effective in reducing A β levels, effective in reducing total tau levels as well. Interestingly, the pro-inflammatory state characterizing the model at this age did not increase. In conclusion, this study demonstrates the interplay between the two histopathological markers of AD.

Besides, treatments with mAb-m3D6, the mouse version of bapineuzumab, and scFv-h3D6 were compared using the APP23 AD mouse model. APP23, unlike 3xTg-AD, develops cerebral amyloid angiopathy (CAA) and represents a suitable model to study the occurrence of ARIA by magnetic resonance imaging (MRI). Although mAb-m3D6 and scFv-h3D6 reduced A β levels to the same extent, no significant effect was observed in cerebral volume, nor axonal damage and myelin impairment were found in the corpus callosum, as expected at advanced stages of AD, where neither treatment could reverse neurodegeneration. Interestingly, mAb-m3D6 induced an increase in the number of new hemorrhagic events, mainly in the cortex, whereas scFv-h3D6 did not. In conclusion, our findings demonstrate that the scFv format is safer than the full-length mAb.

Introducció



Estructura i plegament de proteïnes

L'estructura nativa de les proteïnes està, generalment, estabilitzada per interaccions intramoleculares no covalents (ponts d'hidrogen, interaccions electrostàtiques i hidrofòbiques) o covalents (ponts disulfur) entre les cadenes laterals dels aminoàcids. Aquestes interaccions, poden ser locals, donant lloc a l'estructura secundària, o distants, en el cas de l'estructura terciària. L'estructura secundària de les proteïnes es defineix com la orientació espacial que adopta l'esquelet polipeptídic i consta de diverses estructures, però les més freqüents són l'hèlix α , la fulla β i els girs. Per altra banda l'estructura terciària de les proteïnes és la distribució tridimensional d'aquesta, que es forma al expulsar-se les molècules d'aigua del nucli hidrofòbic durant el plegament (Figura I-1).

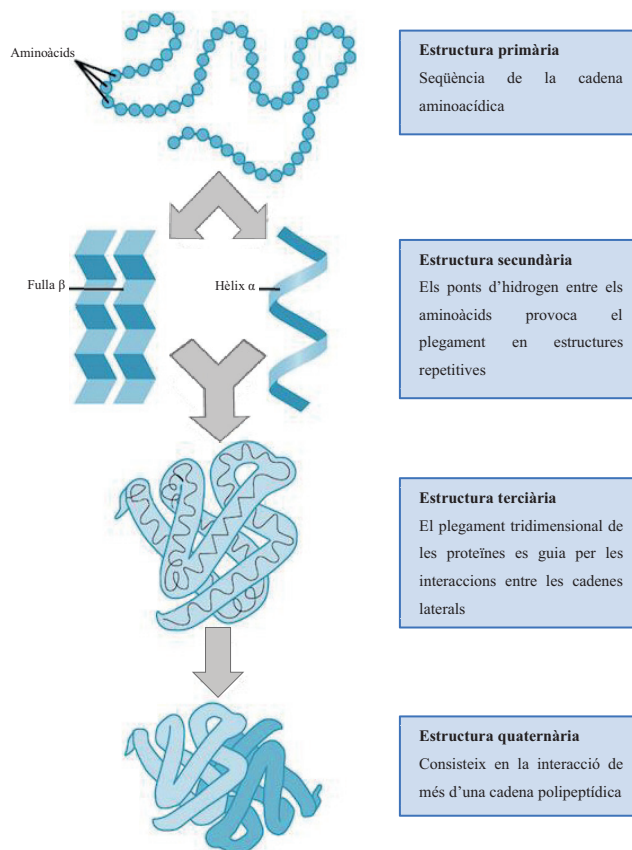


Figura I-1. Estructura de les proteïnes. L'estructura primària fa referència a la seqüència d'aminoàcids que formen la cadena polipeptídica. Les interaccions locals de les cadenes laterals dels residus donen lloc a l'estructura secundària. L'estructura terciària és la conformació tridimensional de la cadena i l'estructura quaternària implica la interacció entre diferents cadenes amb estructura terciària.

El plegament de les proteïnes és el procés pel qual una cadena polipeptídica adopta estructura secundària, terciària i, en alguns casos, quaternària. Sota condicions fisiològiques, les proteïnes es pleguen seguint una via termodinàmicament favorable mentre romanen unides al ribosoma (1). El procés de plegament proteic és guiat més que lineal i segueix una complexa via que pot ser representada per un embut de plegament (**Figura I-2**). Les proteïnes desplegadas es troben en un “pla” d'energia lliure com un conjunt de conformacions intercanviables, que convergeixen restringidament en estats metaestables que condueixen el procés de plegament a una conformació única que mostra l'energia lliure mínima a l'embut de la via de plegament. En alguns casos, el mínim assolit no es correspon amb la conformació nativa, sinó amb un producte intermedi que, al ser altament estable i propens a l'agregació, desvia la proteïna de l'embut de plegament cap a un embut d'agregació (2). La principal diferència és que l'embut de plegament està governat per interaccions intramoleculares, mentre que l'embut d'agregació és dirigit per interaccions intermoleculares. Tot i que les cèl·lules posseeixen mecanismes, com les xaperones, per ajudar a plegar de manera correcta aquelles proteïnes que es troben desplegadas, aquestes eines poden fallar, com a conseqüència, per exemple, d'elevats nivells d'expressió proteica, que poden comprometre la funció de la maquinària de plegament de proteïnes (3–5). En aquesta situació s'inicia la ubiquitinació i el sistema proteosoma, amb l'objectiu de degradar proteïnes mal plegades no funcionals. Tot i això, aquests sistemes no són infal·libles i les proteïnes poden caure en estats d'agregació coneguts com amiloides (1).

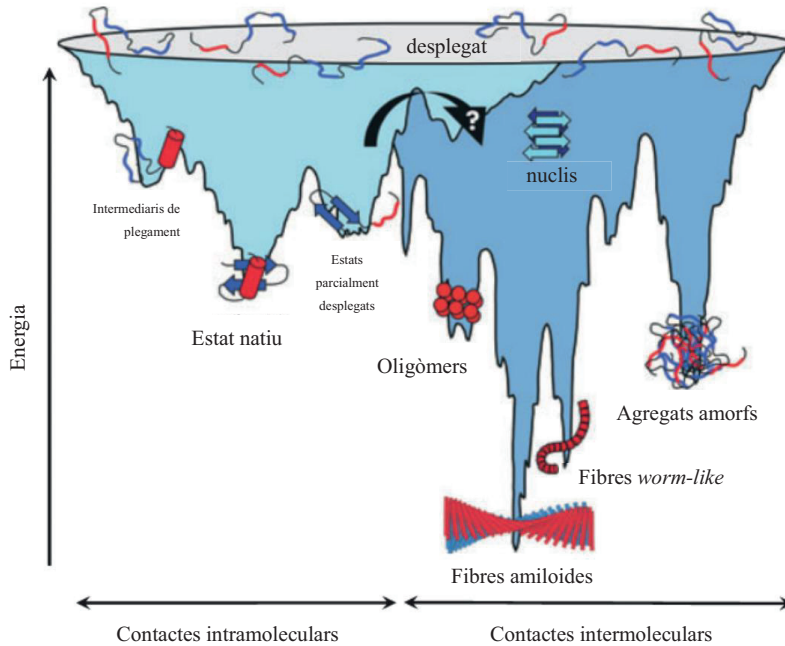


Figura I-2. Representació de l'embut energètic de plegament i agregació de proteïnes. Aquesta imatge mostra la multitud de possibles conformacions que pot adoptar una proteïna en el procés de plegament cap a l'estat natiu (embut de la via de plegament, blau clar) o cap a la formació amiloide (embut de la via d'agregació, blau fosc). L'estat natiu s'assoleix mitjançant contactes intramoleculars, mentre que les fibres amiloides, i altres agregats, con les fibres *worm-like* (WL), es formen mitjançant contactes intermoleculars. Presa de (2).

En aquest sentit, aquests agregats amiloides s'han associat a moltes malalties, el nom de les quals depèn de la proteïna, i tot i que tots es classifiquen com a amiloïdosis, la capacitat de formar agregats amiloides no és única per a les proteïnes associades a l'amiloïdosi clínica. La capacitat de formar agregats amiloides és una propietat intrínseca de la cadena polipeptídica, ja que moltes proteïnes poden formar fibres amiloides *in vitro* mitjançant la desestabilització de l'estructura, ja sigui degut a mutacions, mitjançant una desnaturalització parcial amb agents desnaturalitzants, canvis de pH o augment de la temperatura, entre d'altres, que permet una parcial o total exposició de grups hidrofòbics o regions propenses a l'agregació que, en l'estat natiu, es troben enterrades en el

nucli de la proteïna i aquesta exposició dirigeix la formació de interaccions intermoleculares (6–9).

Agregació amiloide

L'agregació amiloide és el procés pel qual una proteïna pateix una reestructuració cap a un estat no natiu que li confereix unes característiques determinades. Aquestes característiques són la formació de dipòsits insolubles formats principalment per fibres allargades no ramificades que presenten un patró de difracció de fibra β creuada quan són examinades mitjançant rajos X (7,10). Durant el procés d'agregació amiloide, inicialment es dona la fase de nucleació, on un reduït nombre de proteïnes autopolimeritzen formant un primer cúmul o nucli. Aquestes proteïnes generalment retenen una certa estructura, donant lloc a oligòmers altament desordenats, parcialment estructurats o amb estructura nativa, depenent de si s'originen a partir d'estats monomèrics desplegats, parcialment plegats o plegats, respectivament (**Figura I-3**). L'agregació amiloide és la més freqüent, però a l'embut d'agregació també trobem fibres *worm-like* (WL), que són curtes, corbes i no dependents de nucleació (9). És important remarcar que la formació de fibres WL es troba fora de la via d'agregació de les fibres amiloides, el que representa que ambdues vies competeixen (11). Tots els estats primerencs en l'embut d'agregació són altament inestables, ja que es donen interaccions intermoleculares febles i es poden dissociar per a tornar a generar espècies solubles. En canvi, quan l'agregació tira endavant, es poden donar reorganitzacions internes dels monòmers cap a espècies més estables, adoptant estructura en fulla β , procés que sol estar acompanyat per un augment en la mida i grau de compactació de les fibres (12).

Després de la primera fase de nucleació, i quan s'assoleix una concentració òptima, comença el procés d'elongació de les fibres. Aquest procés és més favorable que el procés de nucleació i es produeix de manera ràpida. Els oligòmers amb estructura β tenen la capacitat de créixer en mida mitjançant

l'addició de monòmers, promovent-los un canvi estructural i afavorint la formació de fibres més ben definides (**Figura I-4**). Per altra banda, els agregats desordenats i els agregats nadius poden créixer sense un canvi estructural molt marcat dels monòmers (**Figura I-3**) (12). Finalment, es produeix una fase *plateau* o de saturació on ja no es produeix més incorporació de monòmers, i per tant es para el creixement de les fibres (6,13). La cinètica de formació de les fibres amiloides s'ajusta a una corba sigmoïdal (**Figura I-4**), mentre que la de les fibres WL s'ajusta a una logarítmica, on no es produeix la fase de nucleació. Per a les fibres amiloides, una vegada superat el llindar de la fase de nucleació, les fibres tenen una capacitat extraordinària de proliferar, no només com a resultat del seu creixement o la formació de nous nuclis, sinó també mitjançant processos secundaris com la fragmentació de les fibres o la nucleació secundària, que potencien la formació/elongació de fibres.

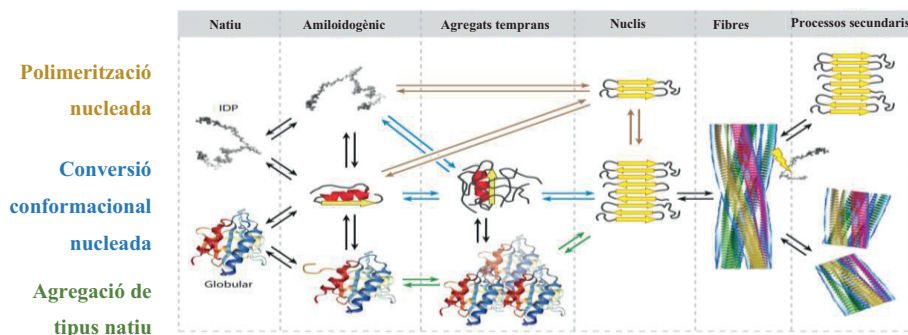


Figura I-3. Mecanisme de formació de les fibres amiloides. Possible mecanisme per a la formació dels nuclis i fibres amiloides a partir de proteïnes globulars o intrínsecament desordenades. Els requadres verticals indiquen diferents estadis en el procés de formació dels agregats amiloides mentre que horitzontalment es representen diferents models d'agregació, incloent la polimerització nucleada (*fletxes marrons*), transformació conformacional nucleada (*fletxes blaves*) i la agregació mantenint conformacions natives (*fletxes verdes*). El darrer requadre de la dreta, representa dos mecanismes secundaris de formació de fibres, com la nucleació secundària o la fragmentació de les fibres. Presa de (12).

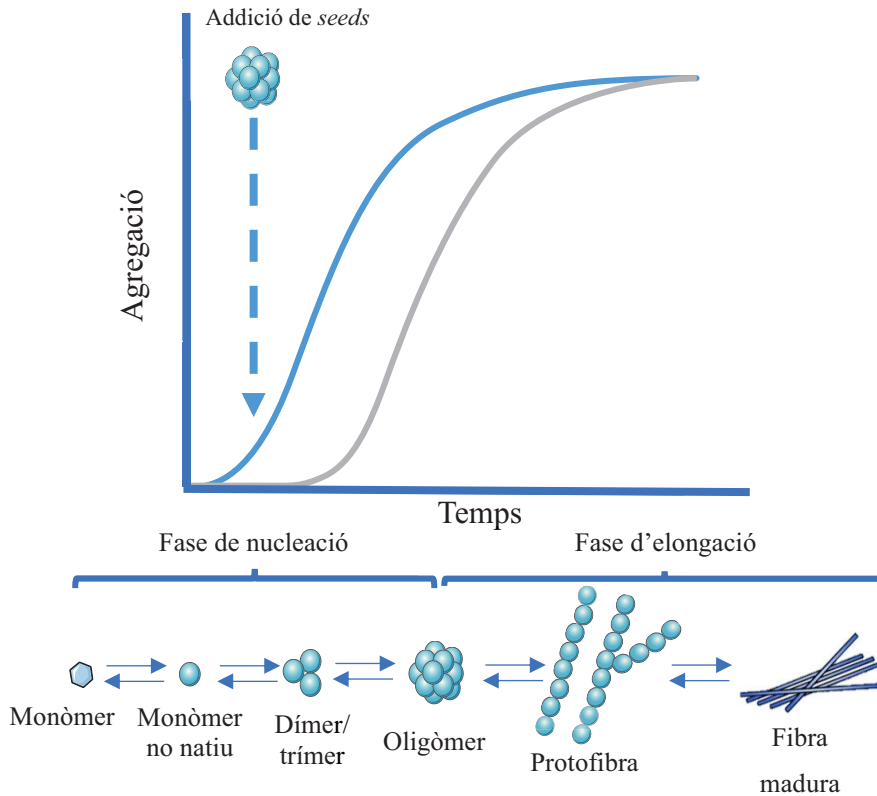


Figura I-4. Model de l'agregació amiloide dependent de nucleació. La formació d'amiloides consisteix de dues fases: (i) la fase de nucleació o fase *lag*, en la qual els monòmers pateixen un canvi de conformació cap a un plegament no natiu i posteriorment s'associen per formar el nucli oligomèric. (ii) A continuació, es produeix la fase d'elongació o creixement, on els nuclis creixen ràpidament a través de l'addició de monòmers i es formen polímers/fibres fins a la saturació. La fase de nucleació és termodinàmicament desfavorable i passa de manera gradual, mentre que la fase d'elongació és un procés molt més favorable i es produeix més ràpidament. La cinètica de formació d'agregats amiloides encaixa molt bé en una corba sigmoïdal amb una fase *lag* seguida per una fase de creixement ràpida (corba grisa). El procés limitant és la formació dels nuclis/*seeds* per promoure l'agregació. El procés d'agregació amiloide es pot accelerar de manera substancial mitjançant l'addició de *seeds* preformades (procés de *seeding*) el que redueix el temps de nucleació i induïx una formació d'agregats més ràpida (corba blava). Adaptada de (13).

Amiloïdosis

Les amiloïdosis són un grup de malalties heterogènies i incurables caracteritzades per dipòsits de proteïna mal plegada i insoluble en l'espai extracel·lular o intracel·lular, normalment condueixen a la mort cel·lular i el dany tissular i, fins i tot, a la mort del pacient. Es poden dividir en dos grans grups, les sistèmiques i les localitzades. La diferència principal entre ambdós tipus és que mentre en les amiloïdosis localitzades la deposició (intra- i/o extracel·lular) només es produeix en el teixit o òrgan d'expressió, en les amiloïdosis sistèmiques l'expressió del precursor amiloide es produeix en un lloc i la deposició es produeix, principalment, en un lloc diferent. Alguns exemples d'amiloïdosis localitzades són el Parkinson (PD, de l'anglès *Parkinson's disease*), el Huntington (HD, de l'anglès *Huntington's disease*) o l'Alzheimer (AD, de l'anglès *Alzheimer's disease*). Per altra banda, exemples d'amiloïdosis sistèmiques són l'amiloïdosi sistèmica senil, amiloïdosis secundària o l'amiloïdosi de cadena lleugera (AL). La heterogeneïtat de les amiloïdosis sistèmiques recau tant en la diversitat d'òrgans que afecten així com la implicació d'un ampli espectre de proteïnes precursors (14). Actualment, s'ha suggerit que són els monòmers o els intermediaris solubles (o les protofibrilles) les causant de l'efecte citotòxic de les proteïnes amiloides que porten a la mort cel·lular (15–17). De fet, s'ha vist que les espècies solubles presents en la circulació en pacients d'AL són tòxiques per a cardiomiòcits en cultius (18–20).

Amiloïdosi de cadena lleugera

L'AL és una de les amiloïdosis sistèmiques més diagnosticades, amb una incidència d'aproximadament deu pacients per milió cada any (21) el que fa que sigui una malaltia rara. D'acord amb els informes de la Clínica Mayo, els pacients diagnosticats tenen una esperança de vida d'entre 1 i 4 anys (22). L'AL és una malaltia progressiva potencialment mortal caracteritzada per la deposició extracel·lular de cadenes lleugeres (LC, de l'anglès *light chain*)

Introducció

insolubles d'immunoglobulines (Ig) lliures a través d'un mecanisme que encara no està del tot clar. Tot i que l'agregació es pot produir en qualsevol part del cos, el principal lloc de la deposició és el cor (la variant més severa), els ronyons, els nervis perifèrics, el tracte gastrointestinal, el fetge i, en menor mesura, el cervell (21,23–27) (**Figura I-5**).

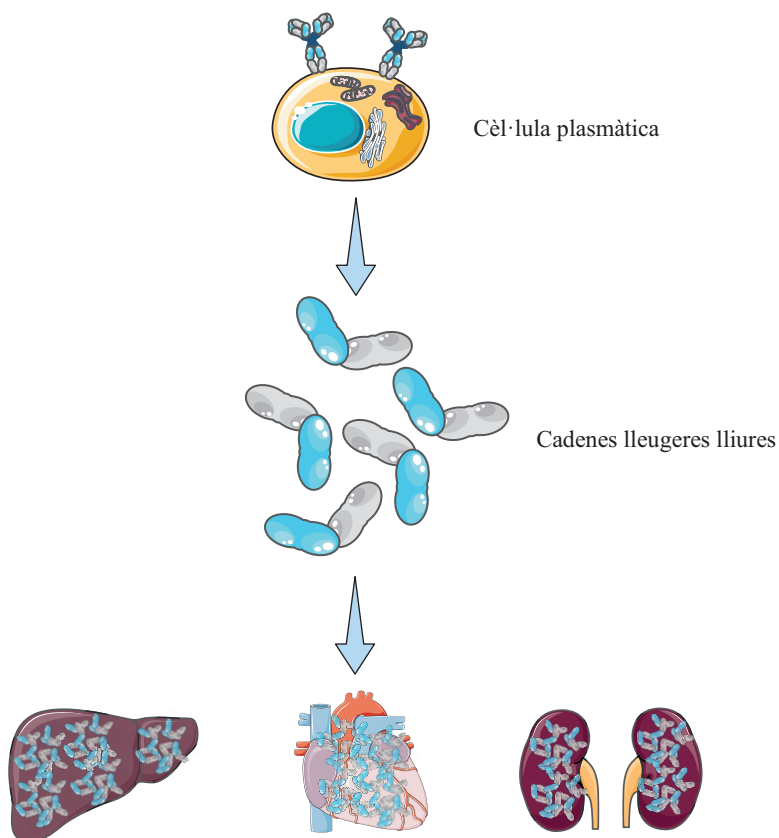


Figura I-5. Resum de la patologia AL. En l'AL es produeix una proliferació aberrant de cèl·lules plasmàtiques que expressen LC lliures al torrent sanguini, on dimeritzen, afavorint la seva deposició com a fibres amiloïdes en els òrgans vitals, sobretot en aquells que pateixen una alta pressió sanguínia. Adaptada de (14).

L'AL té molts símptomes no específics que mimetitzen altres amiloïdosis sistèmiques, que poden conduir a un retard o un error de diagnòstic (14). Tot i així, en els darrers anys el diagnòstic ha millorat significativament degut a l'ús de la microdissecció amb làser acoblada a espectrometria de masses (28,29).

Per altra banda, un diagnòstic precoç no significa que existeixi una teràpia curativa, ja que actualment tan sols existeix la possibilitat d'augmentar l'esperança i la qualitat de vida. Actualment, el tractament consisteix en quimioteràpia per a reduir la població aberrant de cèl·lules secretores de LC combinada amb el transplantament de cèl·lules plasmàtiques (14,21,22,30,31).

Fisiopatologia

En l'AL es produeix una proliferació anormal de cèl·lules monoclonals plasmàtiques provinents de la medul·la òssia. Aquestes cèl·lules sintetitzen i secreten grans quantitats de LC monoclonals al torrent sanguini. Tradicionalment es pensava que tan sols estava implicat el domini variable de la cadena lleugera (V_L) com a proteïna amiloide, però recentment s'ha demostrat que la majoria dels agregats en l'AL contenen la LC completa així com regions constants senceres lliures (29,32,33). Els anticossos (Ab, de l'anglès *antibodies*) estan formats per dues cadenes pesades (HC, de l'anglès *heavy chain*) idèntiques i dues LC idèntiques, unides per enllaços disulfur entre cadenes. Les LCs tenen dos dominis diferents, un N-terminal altament variable (V_L) i un domini C-terminal altament conservat (C_L) (**Figura I-6A**). El domini C_L té una funció estructural, mentre que el domini V_L , el qual canvia entre els diferents anticossos, és responsable del reconeixement i unió dels antígens. Els encarregats del reconeixement i unió són uns llaços desestructurats anomenats CDR (de l'anglès *complementary determining region*). El plegament dels V_L es caracteritza per nou fulles β que s'empaqueten formant el que es coneix com topologia de barril β (34). L'estructura s'estabilitza per mitjà d'un pont disulfur intracatenari enterrat en el nucli hidrofòbic, prop d'un residu de triptòfan (Trp35) altament conservat (35).

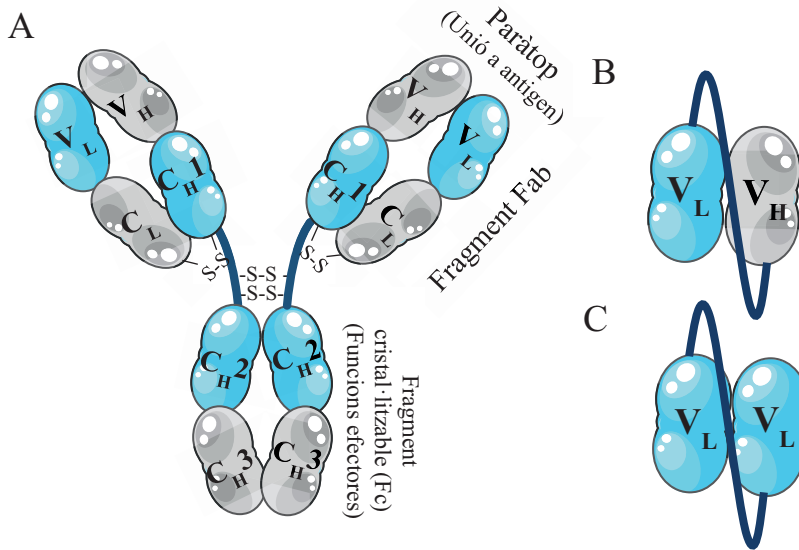


Figura I-6. Representació esquemàtica dels dominis de les IgGs i els scFvs. (A) Dominis i estructura quaternària dels anticossos IgG i (B, C) dels scFvs, els quals poden estar formats pels dominis variables de la cadena lleugera (V_L) i la pesada (V_H). Es troben indicats els ponts disulfur entre les cadenes i altres elements estructurals importants dels anticossos (la regió d'unió a antigen, el fragment Fab o la Fc). Els connectors entre els dominis dels scFv es troben representats en blau. Adaptada de (35).

Durant la formació dels anticossos es produeix una reordenació aleatòria de diversos segments de gens per recombinació somàtica, on la selecció individual dels fragments V, J i C o V, J, C i D (per les LC i les HC, respectivament) contribueix a la diversitat de seqüències de les Ig. La reordenació aleatòria dels segments dels gens generen les denominades línies germinals, les quals no han patit el procés natural de hipermutació somàtica. En el context de l'AL, la hipermutació somàtica resulta en un conjunt de mutacions diferents per a cada pacient amb AL i, alhora, té efectes directes sobre l'estabilitat de les proteïnes i sobre la cinètica de la formació de fibres (35).

Fins fa relativament poc, l'habilitat de les proteïnes implicades en la formació de fibres en les amiloïdosis s'havia correlacionat amb l'estabilitat termodinàmica, acceptant que els intermediaris parcialment plegats eren més propensos a l'agregació que els estats natius. Específicament, estava

àmpliament acceptat que una sola mutació podia disminuir l'estabilitat termodinàmica incrementant així la capacitat amiloidogènica. A més, en el context de l'AL, es pensava que la línia germinal produïa proteïnes més estables que les proteïnes amiloidogèniques de línies amb hipermutació somàtica aberrant (36–38). Després, el mateix laboratori, dirigit per la Dra. Marina Ramírez-Alvarado a la Clínica Mayo, va determinar que la combinació de mutacions específiques conduïen a canvis en l'estructura terciària i/o quaternària que estarien implicades en les primeres fases de l'amiloïdosi (39). De la mateixa manera, diversos grups van establir que l'entorn, juntament amb les mutacions puntuals, afectaven al procés d'agregació dels dominis V_L (40–43). Per altra banda, Qin i els seus companys de treball van reportar l'efecte protector de la dimerització, és a dir, que els monòmers eren més propensos a la formació de fibres que els dímers (44). Tot i així, el laboratori de la Clínica Mayo esmentat va determinar que algunes mutacions generen una interfície dimèrica alterada (diferent de la interfície canònica que es produeix entre V_L i V_L , i V_H i V_L) (45) que podria crear nous contactes intermoleculars que, en darrer lloc, indueixen la formació de les fibres amiloides (46,47).

Trencant amb l'idea establerta en el camp, els grups del Dr. Baltazar Becerril, de la Dra. Marina Ramirez-Alvarado i de la directora d'aquesta Tesi van determinar que la propensió de les LC a formar dipòsits amiloides no podia ser directament atribuït a la inestabilitat termodinàmica, sinó que existia un llindar d'estabilitat per a la formació de fibres amiloides, és a dir, que proteïnes molt estables o molt inestables, no produïrien fibres (48–50).

Fragments d'anticòs

En aquest estudi, es va produir l'scFv (de l'anglès, *single chain variable fragment*) anomenat VVK08, el qual deriva de la línia germinal κI O18/O8 (**Figura I-6C**). El VVK08 està format per la unió entre dos V_L idèntics units per un connector $(G_4S)_3$. El domini V_L del κI O18/O8 té 111 residus i una massa molecular d'11.6 kDa, per tant el VVK08 té 235 residus amb una massa molecular aproximada de 25 kDa. Per altra banda, l'scFv que vam anomenar

Introducció

VVA09 es troba format pels dominis V_L de la proteïna AL-09 (una proteïna amiloidogènica derivada de la línia germinal κI O18/O8). La seqüència de l'AL-09 es va obtenir d'un pacient amb una AL amb afectació cardíaca (51,52) i divergeix del κI O18/O8 en 7 residus: S30N, N34I, K42Q, N53T, D70E, I83L i Y87H. Cal destacar que l'AL-09 és la proteïna més amiloidogènica trobada en pacients amb AL (38).

El κI O18/O8 i el seu homòleg amiloidogènic han estat estudiats de manera extensa (41,43,46,47). Breument, l'AL-09 és més propens a la formació de fibres que κI O18/O8, degut a la seva menor estabilitat i la formació d'una interfície dimèrica rotada 90° respecte a κI O18/O8, provocada per la modificació dels residus que interactuen dins de la interfície (47). La producció recombinant del VVK08 i el VVA09 podria permetre la dimerització forçada amb l'objectiu de determinar la importància de la interfície en l'AL per tal d'incrementar el coneixement global sobre els principals factors que en darrer lloc porten a l'AL, a més de constituir un sistema per assajar possibles teràpies.

Malaltia d'Alzheimer

L'AD és una de les malalties més comuns arreu del món. S'estima que actualment 50 milions de persones pateixen demència, de les quals més de dues terceres parts conviuen amb la malaltia d'Alzheimer. És possible que en els propers 30 anys aquest nombre augmenti fins als 150 milions degut a l'envelliment de la població. A més del cost econòmic, que es va estimar al voltant de mil milions de dòlars estatunidencs només per l'any 2018, i que es podria duplicar al 2030 (53), l'AD té un elevat cost social derivat principalment del patiment que comporta tan a pacients com a cuidadors, normalment familiars del pacient, durant els més de 10 anys que pot arribar a allargar-se la malaltia (54).

L'AD és una malaltia neurodegenerativa que es caracteritza pel deteriorament progressiu de la memòria i afectacions en la parla i el raonament que provoquen la incapacitat de realitzar tasques de la vida diària. Va ser descrita per primera

vegada l'any 1906 pel psiquiatre alemany Alois Alzheimer com una afectació del còrtex cerebral caracteritzada per una important pèrdua de neurones i per l'aparició de depositis neurofibril·lars intracel·lulars i plaques extracel·lulars (55). Actualment, als dipòsits intracel·lulars, formats principalment per la proteïna tau (56) se'ls coneix com cabdells neurofibril·lars (NFT, de l'anglès *neurofibrillary tangles*), i les plaques extracel·lulars, el component principal de les quals és el pèptid β -Amiloide ($A\beta$), són anomenades plaques amiloides (**Figura I-7**). La història de la recerca moderna en l'AD comença cap als anys 80 quan es va purificar i seqüenciar l' $A\beta$, a partir de sediments amiloides cerebrovasculars i de parènquima cerebral (57,58). També de gran rellevància va ser el clonatge de la seqüència de la proteïna precursora amiloide (APP, de l'anglès *amyloid precursor protein*), una proteïna transmembrana que es localitza al cromosoma 21 humà (59). Anys després, amb el descobriment de mutacions en el gen de l'APP (60–62), juntament amb l'observació que els pacients amb la síndrome de Down pateixen AD (63), es va donar peu a la postulació de la hipòtesi de la cascada amiloide (64).

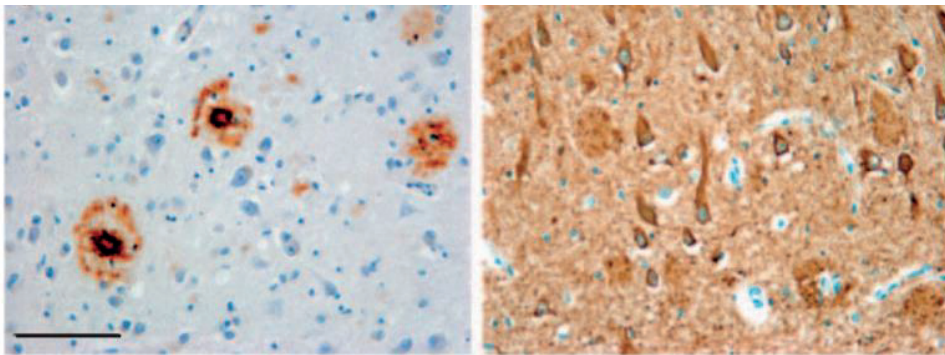


Figura I-7. Principals marcadors histològics de l'AD. A l'esquerra es pot veure una placa senil positiva per $A\beta$ i a la dreta els NFTs intracel·lulars positius per tau. La barra d'escala representa 100 μ m. Extreta de (65).

Principals factors implicats en la malaltia d'Alzheimer

Dins l'AD es distingeixen dues variants segons l'edat de desenvolupament dels símptomes de la malaltia. Quan els símptomes apareixen abans dels 65 anys es

parla de l'AD d'aparició precoç (EOAD, de l'anglès *early-onset Alzheimer's disease*), mentre que quan els símptomes apareixen a una edat avançada, posterior als 65 anys, es parla de l'AD d'aparició tardana (LOAD, de l'anglès *late-onset Alzheimer's disease*) (54). Ambdues formes de la malaltia mostren característiques clíniques i neuropatològiques molt similars, cosa que condueix a suposar que comparteixen una base molecular. Tot i així, l'EOAD tan sols representa entre l'1 i el 2 % dels casos diagnosticats, dels quals, tan sols una ínfima porció són considerats AD familiar (FAD), mentre que la resta, juntament amb els casos de LOAD, es consideren com a AD esporàdic (SAD) (66). Tot i que no totes les proteïnes involucrades en el desenvolupament de l'AD pateixen mutacions prèvies a la disfunció, i per tant a l'aparició de la malaltia, moltes sí (67). A continuació es detallen els principals elements involucrats en l'AD.

APP

El gen de la APP (*APP*) es troba localitzat al cromosoma 21 humà i codifica una proteïna transmembrana de tipus I, ubiqua, que està conformada per un llarg domini extracel·lular, un domini transmembrana hidrofòbic i un fragment intracel·lular curt (59) (**Figura I-8**). En condicions fisiològiques, l'APP soluble (sAPP) està relacionada amb el creixement de les neurites, la sinaptogènesi, la plasticitat sinàptica i la supervivència cel·lular a través de la modulació dels receptors de NMDA i GABA, els quals mantenen la homeòstasi del calci intracel·lular (68,69).

Una de les més de 50 mutacions descrites per l'APP més remarcables és la mutació *Swedish*, una doble mutació en la seqüència de tall de la β -secretasa (K670N/M671L) que provoca un augment en el processament d'APP per part d'aquesta secretasa, generant nivells més alts d'A β en comparació a individus sans (70–72). Per altra banda, existeix la mutació *Icelandic* (A673T), també localitzada en el lloc de tall de la β -secretasa, que evita el processament amiloidogènic de l'APP i en conseqüència protegeix davant l'AD (73). Altres mutacions rellevants del gen de l'APP es troben a l'extrem C-terminal del

pèptid A β (A692G (*Flemish*), E693Q (*Dutch*), E693K (*Italian*), E693G (*Arctic*), and D694N (*Iowa*)), o prop del lloc de tall de la γ -secretasa T714I (*Austrian*), V715M (*French*), V715A (*German*), I716V (*Florida*), V717I (*London*) i V717F (*Indiana*)) (60,61,74,75).

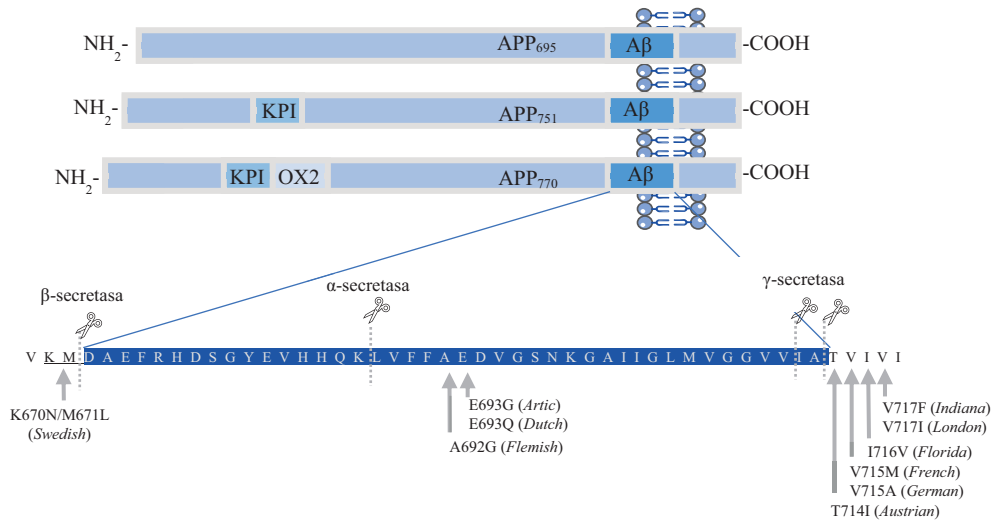


Figura I-8. Isoformes de la proteïna precursora amiloide (APP). Es mostren les tres isoformes més comunes de l'APP, les quals es diferencien per la presència o no de l'exó 7 (inhibidor de proteasa tipus Kunitz, KPI) i l'exó 8 (codifica pel domini OX2). A la part inferior es mostra el lloc de les mutacions més comunes dins l'APP juntament amb els llocs de tall de la β -secretasa, la γ -secretasa i l' α -secretasa. Adaptada de (76).

α -secretetasa

Actualment s'han descrit tres proteïnes amb activitat α -secretetasa, ADAM9, ADAM10 i ADAM17. ADAM (de l'anglès *a disintegrin and metalloproteinase*) és una família àmpliament expressada de proteïnes transmembrana de tipus I que són secretades amb una llargada aproximada de 750 aminoàcids, amb funcions relacionades amb l'adhesió cel·lular i el processament proteolític dels ectodomis de diversos receptors de la superfície cel·lular i molècules de senyalització (77,78). Tot i que han estat poc estudiades per la seva implicació en la via no-amiloidogènica (que no genera A β) en els darrers anys s'ha postulat com a diana terapèutica, ja que l'augment de la seva

activitat té efectes protectors davant l'AD (77). De les proteases mencionades anteriorment, l'ADAM10 es considera una participant clau en el processament de l'APP (79).

β -secretasa

La β -secretasa, també anomenada BACE1 (de l'anglès *beta-site amyloid precursor protein [APP] cleaving enzyme 1*), és una proteïna transmembrana de tipus I amb activitat aspartil proteasa que s'engloba dins la família de les pepsines (80,81). En l'AD, la β -secretasa està àmpliament expressada en les cèl·lules cerebrals, particularment en les neurones, els oligodendròcits i els astròcits (82). A nivell subcel·lular, BACE1 es localitza en la membrana plasmàtica i en els compartiments endosomals (83). En les terminals sinàptiques sanes i en les neurites distròfiques que envolten les plaques amiloides també hi ha presència de β -secretasa (84). BACE1 té un homòleg amb el qual comparteix un 59% d'homologia que s'anomena BACE2. Els nivells de BACE1 es veuen incrementats en AD, el que contribuiria a una major producció d'A β i, per tant, estaria implicada en la patogènesi. Al ser el principal actor en la via amiloïdògena ha estat postulada com a diana terapèutica (85). A part de l'APP, BACE1 té altres substrats, alguns importants en el neurodesenvolupament, com demostra el fet que ratolins deficients amb BACE1 presenten convulsions (86), dèficits en la mielina (87), deteriorament cognitiu (88) i defectes en el transport axonal (89).

En models murins d'amiloïdosi, la inhibició de la β -secretasa limita la formació de noves plaques, però no prevé el creixement de plaques ja existents (90). És per això que s'esperava que la inhibició de BACE1 actuaria de manera sinèrgica en la reducció de la deposició d'A β quan es combinessin amb la teràpia dirigida contra l'A β a través d'anticossos monoclonals, ja que s'atacaria tant l'eliminació com la producció del pèptid amiloide. En els darrers anys, una gran quantitat d'inhibidors han entrat en fases clíniques. Malauradament, dos inhibidors, LY2886721 i LY3202626 van caure en la fase 2 degut a la hepatotoxicitat i per la falta de millora cognitiva, respectivament. Altres cinc

inhibidors de BACE1 han fallat en la fase 3 degut a la falta d'eficàcia i/o efectes secundaris adversos (91).

γ -secretasa

El complex γ -secretasa consisteix en quatre subunitats proteiques: la presinilina (PSEN), el potenciador de la presinilina (PEN), l'APH (de l'anglès *anterior pharynx defective-1*) i la nicastrina. Existeixen múltiples isoformes de la presinilina (PSEN1/PSEN2) i de la APH (APHA, APH B/C) que poden formar fins a un total de quatre complexos diferents en una mateixa cèl·lula (92,93). La γ -secretasa talla diverses proteïnes transmembrana de tipus I importants com l'APP, Notch, la cadherina E, Erb4, el CD44, la tirosinasa, Trem2 o l'alcadeina, entre d'altres, el que suggereix que està implicada en un gran rang d'activitats biològiques (94).

Actualment s'han descrit més de 200 mutacions en el gen *PSEN1* i 16 en el gen *PSEN2* (95), les quals provoquen l'augment del nivell total d'A β , la modificació del rati entre A β ₁₋₄₀ i A β ₁₋₄₂ i/o modifiquen l'agregació d'A β (96). Els moduladors de la γ -secretasa tenen l'objectiu d'alterar el processament de l'APP i en conseqüència normalitzar el rati entre A β ₁₋₄₀ i A β ₁₋₄₂, sense alterar els processos d'altres substrats (93). El mecanisme amiloidogènic de la γ -secretasa sembla estar relacionat amb la reducció de la velocitat de dissociació del fragment C99 després del tall ϵ , per tant, el fàrmac hauria d'augmentar la capacitat de processament de l'enzim per tal que generés fragments d'A β més curts, com ara l'A β ₁₋₃₈, i en conseqüència, reduís la producció d'A β ₁₋₄₀ i A β ₁₋₄₂ (97).

A β

L'A β es produeix pel tall seqüencial de l'APP per part de la β -secretasa i la γ -secretasa (**Figura I-9**). L'enzim β -secretasa talla l'APP per l'extrem N-terminal de la seqüència de l'A β , alliberant sAPP- β i deixant el fragment C99 ancorat a la membrana. Seguint el tall de BACE1, el complex γ -secretasa s'uneix al fragment C99 i de manera intramembrana talla pel lloc de tall ϵ i s'allibera el

Introducció

fragment C-terminal (CTF) i l' $A\beta_{1-48}$. Després, la γ -secretasa processa el pèptid $A\beta$ al llarg del seu extrem C-terminal produint de manera seqüencial pèptids $A\beta$ més curts fins que el pèptid resultant s'allibera del complex (generalment es produeixen pèptids de 38, 40 o 42 aminoàcids de llargada). La BACE1, la γ -secretasa i la APP formen un gran complex molecular *in vivo*, suggerint que la producció d' $A\beta$ podria estar facilitada per la transferència directa de l'APP d'un enzim a l'altra (98) i seria predominantment realitzada en endosomes de les neurones que l'alliberen modulats per l'activitat sinàptica (99,100), de manera tant presinàptica (101,102) com postsinàptica (103).

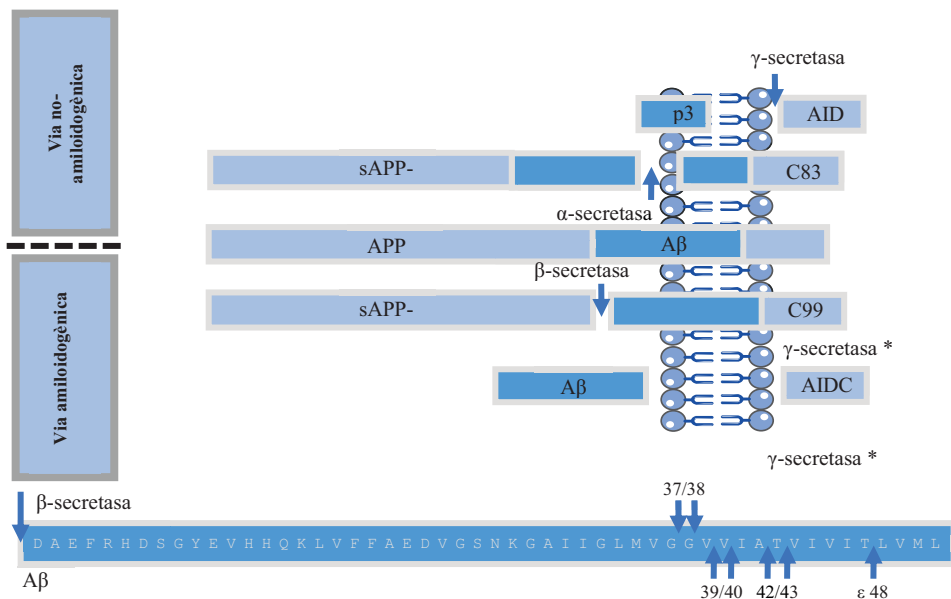


Figura I-9. Possibles vies de processament de l'APP. Existeixen dues possibles vies per al processament de l'APP, la via no-amiloidogènica i la via amiloidogènica. En la via no-amiloidogènica es produeix el tall seqüencial de l' α -secretasa i la γ -secretasa, alliberant sAPP- α i C83 després del primer tall i p3 i el domini C-terminal intracel·lular de l'APP (AICD, de l'anglès *APP intracel·lular C-terminal domain*) després del segon tall. Per altra banda, en la via amiloidogènica els tall es produeix per la β -secretasa en comptes de l' α -secretasa i s'allibera sAPP- β i el fragment C99. La γ -secretasa comença a tallar pel lloc ϵ produint $A\beta_{1-48}$. Després, processa l'extrem C-terminal produint pèptids $A\beta$ de diferents mides fins que el pèptid amiloide resultant s'allibera del complex. Adaptada de (76).

El pèptid A β és propens a agregar en conformacions riques amb fulla β i forma oligòmers, protofibrils i fibrils altament ordenades. Degut a la major hidrofobicitat de l'extrem C-terminal expandit, l'A β_{1-42} té una major propensió a l'agregació que l'A β_{1-40} . Existeixen evidències que el procés d'agregació d'A β requereix la internalització de l'A β per part de la microglia, seguit d'un procés de *seeding* i agregació intracel·lular (104). La fibril·lació d'A β pot ser induïda de manera de tipus priònic en presència de petites associacions d'A β plegat en forma de fulla β que serveixen com a nucli per a la formació d'agregats amiloides més grans (105).

En els cervells dels pacients amb AD coexisteix A β en diferents estats d'agregació, concretament monòmers, oligòmers, fibrils i plaques amiloides. Les evidències experimentals suggereixen que les plaques mantenen un equilibri dinàmic amb espècies d'oligòmers tòxics (106,107). L'A β monomèric és una proteïna intrínsecament desordenada (IDP, de l'anglès *intrinsically disordered protein*), per això, en un entorn aquós no adopta una única conformació plegada, sinó que adquireix un conjunt de conformacions (108). Per altra banda, els oligòmers d'A β són estats intermediaris transitoris entre els monòmers i la formació de fibrils. Tant els oligòmers com les fibrils són heterogènies en estructura i mida, i són tòxiques, especialment els oligòmers (107). Tot i que va resultar un repte, ha estat possible resoldre l'estructura tridimensional de les fibrils d'A β_{1-40} i d'A β_{1-42} (109,110). Emprant fibrils extretes de cervells de pacients humans i ssNMR (de l'anglès *solid-state nuclear magnetic resonance*) es va observar que diferents fenotips clínics d'AD presentaven una estructura predominant per les fibrils d'A β_{1-40} , mentre que les fibrils d'A β_{1-42} mostraven heterogeneïtat en les estructures que adopten amb dues estructures prevalents (109). El model estructural molecular per a les fibrils d'A β_{1-40} derivades d'un sol pacient mostren que els monòmers agreguen en oligòmers múltiples de tres (trímers, hexàmers, nonàmers i dodecàmers) (**Figura I-10A**), on l'extrem N-terminal (els residus 1 a 5, DAEFR) estan exposats al solvent i l'extrem C-terminal hidrofòbic es troba enterrat en el nucli del trímer (**Figura I-10B**, pdb 2M4J (110)). El nucli hidrofòbic dels trímers condueix a la formació de les fibrils, dins de les quals, tots els extrems N-

Introducció

terminals es troben exposats al solvent (110). Aquests oligòmers múltiples de tres s'han trobat en diferents models animals per a l'AD (com per exemple en el model 3xTg-AD (111)) ja que la concentració de pèptid $A\beta_{1-40}$ és molt major a la concentració d' $A\beta_{1-42}$ en aquest model murí (112). L'estructura atòmica de les fibres formades per $A\beta_{1-42}$ sintètic es van resoldre emprant crio-EM (de l'anglès *electron microscopy*) i mostra una estructura molt diferent, amb dos monòmers apilats en paral·lel amb estructura de fulla β (113) (**Figura I-10C**). Els monòmers estan plegats amb una topologia en forma de "LS", on l'extrem N-terminal està lleugerament exposat al solvent i l'extrem C-terminal es troba completament enterrat en la interfície entre les dues cadenes (**Figura I-10D**, pdb 5OQV).

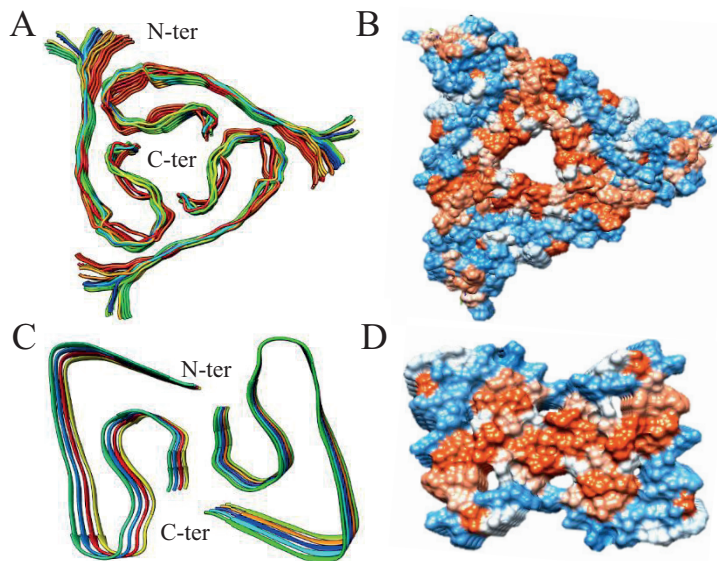


Figura I-10. Estructura tridimensional dels oligòmers d' $A\beta$. (A) Representació en cintes dels trímers d' $A\beta_{1-40}$ (PDB 2M4J). Els extrems N-terminals estan exposat al solvent mentre que els extrems C-terminals es troben enterrats en la interfície dels monòmers. (B) Representació de la superfície hidrofòbiques del trímer d' $A\beta_{1-40}$. (C) Representació en cintes dels dímers d' $A\beta_{1-42}$ (PDB 5OQV). Els extrems N-terminals estan lleugerament exposats al solvent i els C-terminals estan completament enterrats al nucli. (D) Representació de la superfície hidrofòbiques del dímer d' $A\beta_{1-42}$. En blau es representen els residus hidrofílics i en vermell els hidrofòbics.

Tau

La proteïna tau es troba codificada al gen *MAPT* (de l'anglès *microtubule-associated protein tau*), en el cromosoma 17 i s'expressa principalment en les neurones del cervell. Tau pot patir *splicing* alternatiu en el domini N-terminal (N) i en el domini *microtubule-binding repeat* (R) per a formar sis isoformes diferents (0N3R, 0N4R, 1N3R, 1N4R, 2N3R i 2N4R) (**Figura I-11A**), les quals s'expressen de manera diferencial durant el desenvolupament del cervell. Tot i que els NFT en l'AD contenen isoformes tant de 3R com de 4R, és a dir totes les isoformes, en agregats patològics d'altres taupaties humanes es troben sobrerepresentades isoformes concretes (114).

S'ha demostrat que el rol fisiològic de tau és molt més extens del que inicialment es pensava (91,115,116). Actualment existeixen dades que indiquen que tau es troba implicada en una gran diversitat de processos com ara la mielinització, el metabolisme de la glucosa, l'estabilització dels axons neuronals, la homeòstasis del ferro, la neurogènesi, l'aprenentatge i la memòria, la excitabilitat neuronal i fins i tot la protecció del DNA (117). Tau s'expressa principalment en el sistema nerviós central (CNS, de l'anglès *central nervous system*) i perifèric, on és més abundant en els axons de les neurones.

Introducció

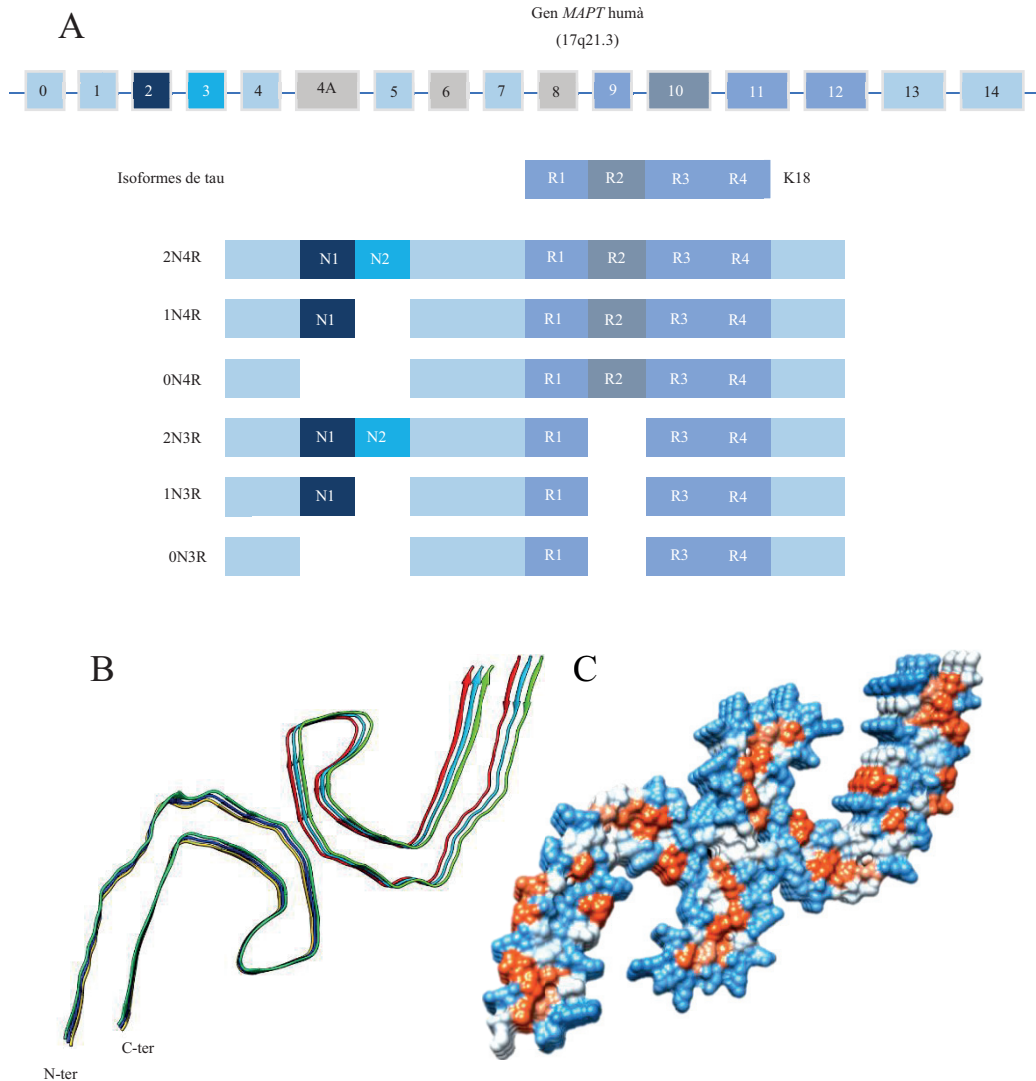


Figura I-11. Esquema de les isoformes de tau i la seva estructura tridimensional.

(A) Existeixen 6 isoformes de tau, que es formen mitjançant *splicing* alternatiu del gen *MAPT*. La presència o no dels exons 2 i 3 determina les isoformes amb 0, 1 o 2 inserts N-terminals (N), mentre que la exclusió o inclusió de l'exó 10 dona lloc a l'expressió de les isoformes amb tres (3R) o quatre (4R) dominis R. (B, C) Representació en cintes i superfícies hidrofòbiques de tau derivat de cervells amb AD (PDB 6HRE). En blau es representen els residus hidrofílics i en vermell els residus hidrofòbics.

La proteïna tau és subjecte de nombroses modificacions post-traduccionals, incloent fosforilacions, acetilacions, glicacions, O-GlcNAcilacions, nitracions, SUMOlacions, ubiquitinacions i truncacions (118). Tau es pot fosforilar en 85 residus diferents (114), i els tipus o patrons de fosforilació patològics poden produir-se abans de la formació dels NFTs. En molts casos, la fosforilació aberrant dona com a resultat el descens de l'afinitat d'unió pels microtúbuls (119,120). Un altre efecte de la hiperfosforilació és la redirecció de tau des del compartiment axonal cap al compartiment somatodendrític, on pot afectar la funció sinàptica via la inhibició del tràfic de receptors de glutamat o per l'ancoratge sinàptic (121). L'acetilació de tau redueix la degradació de la tau fosforilada i incrementa la patologia tau (122), però també s'ha vist que l'acetilació de tau inhibeix la fosforilació de tau en certs residus i limita l'agregació posterior (123). A més, s'ha vist que provoca la inestabilitat del citoesquelet del segment inicial de l'axó, seguit de la deslocalització de tau cap al compartiment somatodendrític (124).

La proteïna tau s'acobla en filaments a través del domini repetit (R) que es localitza en el nucli del dímer, suggerint que el rol fisiològic i l'acoblament patològic són mútuament excloents (pèrdua de funció) (**Figura I-11B, C** PDB 6HRE). Els cervells d'individus amb la mateixa taupatia presenten els mateixos tipus de filament de tau (125), mentre que cada malaltia es caracteritza per un únic plegament de tau (126).

Tot i que tau s'expressa principalment de manera intracel·lular, en el cervell i en el líquid intersticial hi ha tau extracel·lular present i es creu que es secreta sota condicions fisiològiques (127). Les cèl·lules microgials poden propagar tau a través de mecanismes dependents d'exosomes (128), tot i que també existeix la possibilitat de l'alliberament extracel·lular de tau i la posterior captació per part d'una cèl·lula receptora (129). La propagació dels agregats de tau, podria induir l'agregació al llarg de diferents regions cerebrals (130). En l'AD, la deposició de tau segueix un patró altament estereotipat, iniciant-se en el còrtex entorrinal i l'hipocamp i després es propaga a altres regions. La seva

aparició a les cèl·lules nervioses és la base de les etapes de Braak (131), segons les quals, les inclusions es formen primer en les regions subcorticals, el còrtex transentorrinal i el còrtex entorrinal (etapes I i II). Després apareixen a la formació hipocampal i en algunes parts del neocòrtex (etapes III i IV), seguit per la propagació a la majoria del neocòrtex (etapes V i VI). Els individus en les etapes I i II són asimptomàtics, mentre que aquells a les etapes V i VI es considera que tenen AD, amb alguns individus en les etapes III i IV mostrant alguns signes de deteriorament de la memòria (132).

Altres implicats/factors de risc

La proteïna ApoE és una apolipoproteïna, la major funció de la qual és servir com a proteïna d'unió a lípids formant partícules lipoproteïques per al transport i entrega de lípids. L'ApoE s'expressa en alts nivells al fetge i al cervell, on s'expressa majoritàriament en els astròcits i en menor mesura, en la micròglia. El gen *APOE* és el major factor de risc per al LOAD (133,134) i té 3 al·lels que codifiquen per a les isoformes ApoE2, ApoE3 i ApoE4, les quals difereixen en seqüència per un sol aminoàcid en dos residus diferents (E2 Cys112/Cys158, E3 Cys112/Arg158 i E4 Arg112/Arg158 (135)). Una sola còpia de l'al·lel $\epsilon 4$ de l'*APOE* incrementa el risc de patir LOAD unes 3 o 4 vegades, mentre que dues còpies incrementen el risc unes 12 vegades (133,136). Per altra banda, l'al·lel *APOE* $\epsilon 2$ és protector i els portadors de l'al·lel *APOE* $\epsilon 4$ desenvolupen una deposició amiloide cerebral incrementada, que es produeix abans i amb una major velocitat de deposició (137–141). ApoE4 també té efecte sobre la hiperfosforilació de tau (142). En ratolins P301S (model de taupatia) la presència d'ApoE va resultar en un augment de la hiperfosforilació de tau i l'augment dels nivells de tau insoluble, tot i que no va afectar als nivells de producció d'aquesta proteïna (143).

Diversos experiments han demostrat que l'ApoE s'uneix a l'A β present a les plaques i que regula l'eliminació d'aquest d'una manera dependent d'isoforma (135,144). Inicialment es va postular que l'ApoE regulava l'eliminació d'A β per via de la interacció directa, però actualment es sap que la interacció entre

ApoE i l'A β és molt dèbil *in vivo*. Enlloc d'això, sembla que l'ApoE regula l'eliminació d'A β a través d'un mecanisme de competència per la unió als receptors, com ara l'LRP1 (de l'anglès *low density lipoprotein receptor [LDLR] related protein 1*), el qual es troba a la superfície dels astròcits (145). Les vies que s'han proposat per a l'eliminació d'A β inclouen la captació per part dels astròcits (146), la fagocitosis per part de la micròglia (147), transport a través de la barrera hematoencefàlica (BBB, de l'anglès *blood-brain barrier*) (148,149), eliminació glimfàtica (150) i transport a través dels vasos limfàtics meningeals (151). L'ApoE també s'ha demostrat que té un efecte modulador sobre la patologia tau i la neurodegeneració relacionada amb tau (152) i *in vitro* s'ha demostrat que tau s'uneix a l'ApoE3, però no a l'ApoE4 (153).

L'ApoE4 podria intervenir en el risc de patir AD a través de la modulació de la resposta immune i microglial. Els portadors de l'al·lel d'*APOE* ϵ 4 tenen una resposta inflamatòria sistèmica major a l'administració intravenosa de lipopolisacàrids (LPS), a més, presenten hipertèrmia i una major secreció de TNF (de l'anglès *tumor necrosis factor*) al torrent sanguini (154). L'ApoE també promou l'acumulació de micròglia al voltant de les plaques d'A β i en absència d'expressió d'ApoE es veu una forta reducció del número de plaques amiloides, però, alhora, es veu un augment del total de dipòsits d'A β immunoreactius. Les plaques són menys compactes i presenten menor nombre de micròglia al voltant, però mostren un augment en la distròfia neurítica (155). Finalment, l'ApoE és necessària per la degradació endolítica intracel·lular de l'A β per part de la micròglia a través de la neprilisina i l'enzim degradador d'insulina (156)

Un altre gen que s'ha descrit com a factor de risc per a l'AD és *TREM2* que codifica per un receptor per lligands aniònics com fosfolípids, lipopolisacàrids o DNA (157). Concretament, Trem2 s'expressa en la micròglia, promovent la fagocitosis, modulant la senyalització inflamatòria i, a més, promou la supervivència de la micròglia. S'ha demostrat que Trem2 és capaç d'unir-se a l'A β soluble i promoure la seva fagocitosis (152,158).

En models animals d'AD, s'ha vist que Trem2 és necessari per a la transició de la micròglia des d'un estat homeostàtic a un estat activat en resposta a les plaques amiloides. La seva deficiència provoca plaques amiloides més difuses i un menor reclutament de micròglia al voltant de les plaques. A més, aquesta micròglia deficient en Trem2 mostra una sobreexpressió d'ApoE (159). Altres factors de risc descrits serien el gen *APOJ* (també conegut com a *CLU*), *SORL1*, *ABCA7*, *CD33*, *INPP5D*, *PLCG2*, *SPI1* i *FCER1G*, la majoria gens expressats en la micròglia i associats amb funcions com el tràfic vesicular, el metabolisme de lípids i la inflamació (95,160,161). Finalment, una proteïna molt interessant és la quinasa Syk (de l'anglès *spleen tyrosine kinase*) la qual semblaria que enllaça les patologies d'A β i tau (162).

Hipòtesi de la cascada amiloide

Tenint en compte les evidències sobre les mutacions en APP i PSEN1/2 que provoquen els casos de FAD, l'any 1992 es va proposar la hipòtesi de la cascada amiloide (64). La hipòtesi de la cascada amiloide postula que l'agregació d'A β és el punt d'inici d'una sèrie d'esdeveniments que en darrera instància condueix a l'AD. La formació gradual d'oligòmers amb baix nombre de monòmers i el seu assemblatge en agregats altament ordenats té un alt impacte en la funció sinàptica primer i, després, promou la hiperfosforilació progressiva de tau, la seva agregació i la deposició intracel·lular. El següent estadi inclou la neuroinflamació i finalment la neurodegeneració i la demència. Tot i que aquests passos es van proposar com un procés lineal en el temps, actualment es creu que A β i tau podrien començar i avançar de manera independent, retroalimentant-se en algunes ocasions (163,164). Per tant, tot i que els esdeveniments descrits en la hipòtesi de la cascada amiloide certament succeeixen, com ara l'acumulació d'A β , la qual es podria produir per una sobreproducció o una deficiència en el mecanismes d'eliminació, segueix essent una teoria vàlida per descriure la complexa patogènesi de l'AD (163).

Les evidències genètiques demostren la importància de l'agregació d'A β en la cascada de l'AD, però sembla que tot i ser necessari, no és suficient i, per tant,

hi ha altres factors *downstream* que juguen un paper clau. Per exemple, existeix una mínima correlació entre les fases de deposició d'A β i el grau de declivi cognitiu, a més, els patrons de deposició amiloide regional no correlacionen amb els patrons regionals de hipoactivitat cerebral detectats amb neuroimatge funcional. Per altra banda, amb el que sí correlaciona són amb les regions on es projecten les neurones afectades per la deposició amiloide. Finalment, tan sols una teràpia anti-amiloide ha estat capaç de limitar la progressió del declivi cognitiu, tot i la gran quantitat de potencials fàrmacs que han arribat a fases clíniques 3. Per tant, sembla que l'acumulació de l'A β ha de ser un iniciador clau, però que són altres esdeveniments, com la neuroinflamació i l'acumulació de tau els principals conductors de la neurodegeneració (91).

Models animals

Els models animals són una eina essencial per a l'estudi de la patogènesi i la progressió de l'AD, així com per al desenvolupament de fàrmacs. El major requeriment, i el més complicat, és reproduir no tan sols els factors implicats en la patofisiologia de l'AD, sinó també el patró temporal. Tot i que hi ha animals que presenten semblances amb l'AD, com la deposició d'A β o la formació de NFTs, ambdues característiques no es presenten alhora o es presenten en animals amb una esperança de vida relativament llarga, baixa taxa de reproducció o elevat cost de manteniment, el que fa que els models presentin limitacions (95). Des del descobriment de les mutacions que provoquen la FAD, i amb la millora de les tècniques d'enginyeria genètica, s'han desenvolupat multitud de models animals per diverses patologies, entre elles, els models animals per a l'AD. Els ratolins, degut a la seva facilitat d'estabular, la gran taxa de reproducció i la facilitat de generar organismes modificats genèticament són un dels animals més emprats com a model. Cal tenir en compte que els ratolins no desenvolupen AD, ja que les tres substitucions entre l'A β humana i la de ratolí són suficients per prevenir l'agregació del pèptid amiloide, per tant la introducció de les mutacions que provoquen la FAD són imprescindibles per a la generació de models murins d'AD (95). Tot i que les

Introducció

mutacions en l'*APP* i *PSEN1* són claus en el desenvolupament de l'AD, cada cop hi ha més models animals incorporant altres gens implicats en l'AD (95,165). En aquest treball s'han emprat dos models animals, que es detallaran a continuació.

El primer model, i un dels més utilitzats, és el triple transgènic (3xTg-AD), el qual conté tres transgens mutats d'*APP*, *PSEN1* i *MAPT*. Concretament, conté la mutació *Swedish* (K670M/N671L) en el gen de l'*APP*, la mutació M146V en el gen de la *PSEN1* i, finalment la mutació P301L en el gen de la proteïna tau (166). Cal destacar que, tot i que les dues primeres mutacions estan associades al FAD, la mutació al *MAPT* és una mutació que provoca demència frontotemporal (FTD, de l'anglès *frontotemporal dementia*) ja que no existeix cap mutació de tau associada a l'aparició d'AD. Aquest model és viable, fèrtil i no presenta anomalies físiques ni de comportament greus a edats primerenques. La sobreexpressió dels transgens tan sols es produeix en el CNS, incloent l'hipocamp i el còrtex. El 3xTg-AD desenvolupa una neuropatologia progressiva dependent d'edat, plaques amiloides i NFT, amb zones immunoreactives d'A β sobre els tres o quatre mesos d'edat. Els dipòsits d'A β extracel·lular apareixen primerament al còrtex frontal al voltant dels sis mesos d'edat i es tornen més extensives als 12 mesos. Els canvis en tau ocorren més tard, entre els dotze i quinze mesos es pot detectar tau agregada i hiperfosforilada a l'hipocamp. La disfunció sinàptica, incloent deficiències en la LTP (de l'anglès *long term potentiation*), apareix abans que les plaques i els NFTs (166,167). Una altra característica important és que als set mesos es comença a detectar un augment de la densitat d'astròcits i micròglia immunoreactives per GFAP i Iba-1, respectivament. La importància del sistema immunitari i la neuroinflamació, dia a dia estan guanyant un paper protagonista en l'AD.

Per altra banda, el segon model és el model murí APP23, el qual conté la mutació *Swedish* (K670M/N671L) en el gen de l'*APP* i presenta una sobreexpressió de la APP mutant humana unes set vegades major del normal

(168). Els ratolins APP23 homozigots són difícils de mantenir, doncs tenen una eficiència de reproducció molt baixa. Pel que fa a la neuropatologia, els ratolins APP23 desenvolupen una patologia β -amiloide extensiva, on s'observen els primers dipòsits d'A β al voltant dels sis mesos d'edat. De nou, el progrés de la patologia és dependent d'edat arribant a ocupar el 25% del neocòrtex i l'hipocamp als 24 mesos d'edat, però l'A β del neocòrtex es pot visualitzar mitjançant PET (de l'anglès *positron emission tomography*) als 12 mesos (169). Les plaques es rodegen de micròglia activada, astròcits i neurites distròfiques que contenen tau hiperfosforilada, tot i que no s'observen NFTs. S'ha reportat pèrdua neuronal en la CA1 de l'hipocamp. És interessant que aquest model desenvolupa CAA (de l'anglès *cerebral amyloid angiopathy*) i en darrera instància desenvolupen microhemorràgies espontànies (170,171) degut a l'acumulació de pèptid amiloide en els vasos sanguinis del cervell i la posterior ruptura d'aquests vasos.

Teràpies per a l'AD

Actualment existeixen quatre medicaments aprovats per la FDA (de l'anglès *food and drug administration*) per al tractament pal·liatiu de l'AD i un de recent aprovació, que, en principi, para la malaltia. Els medicaments pal·liatius inclouen tres inhibidors de la colinesterasa (ChEI, de l'anglès *cholinesterase inhibitors*) i un modulador no competitiu dels receptors de NMDA. Els inhibidors de la colinesterasa aprovats són el donepezil, la rivastigmina i la galantamina. Durant el curs de la patogènesi de l'AD es perden les neurones colinèrgiques en el nucli basalis de Meynert i altres nuclis septals que es projecten al llarg del còrtex, provocant un dèficit colinèrgic (172). Es creu que la pèrdua de l'entrada colinèrgica contribueix a la disfunció primerenca de l'atenció i la memòria i els ChEIs tenen la funció de revertir el seu dèficit incrementant el nivell sinàptics de l'acetilcolina. El seu benefici sobre els símptomes de l'AD s'ha demostrat a través de metanàlisis que avaluen el rendiment cognitiu i el funcionament global (173). Tot i així, l'efecte global és modest i no s'ha vist efecte en la progressió a llarg termini. El modulador dels

receptors de NMDA aprovat per la FDA s'anomena memantina, i actua inhibint la neurotoxicitat dependent de glutamat que provoca la mort neuronal durant la progressió de l'AD, tot i que el mecanisme exacte no és del tot clar (174,175). Els metanàlisis confirmen l'eficàcia de la memantina sobre la cognició, les activitats de la vida diària i els símptomes neuropsiquiàtrics en pacients amb AD de moderat a greu (176,177). Tot i així, sembla que els efectes són petits, com el dels ChEIs, i que no tenen un efecte beneficiós en la progressió de la malaltia a llarg termini. Els efectes en els estadis de lleu a moderat són marginals i, sembla ser que aquest medicament no és recomanable per a pacients amb AD lleu.

Recentment s'ha aprovat una immunoteràpia amb la capacitat de retirar el pèptid A β i de disminuir el declivi cognitiu, com es presenta al següent apartat.

Immunoteràpia

L'objectiu de moltes teràpies dirigides contra l'A β és reduir els nivells d'aquest pèptid tant en les seves formes solubles com la depositada en les plaques amiloides. Com s'ha esmentat anteriorment, la hipòtesi de la cascada amiloide suggereix que l'acumulació d'A β dispara la patogènesis de la malaltia, per tant les teràpies que redueixin els nivells d'A β s'esperaria que redueixin la progressió de l'AD. Malgrat els models animals d'AD són útils per assajar possibles fàrmacs, el fet que no reproduïxin la malaltia íntegrament ha fet que els resultats no s'hagin traslladat directament als assajos clínics en humans. Addicionalment, molts assajos clínics no s'han dissenyat adequadament per avaluar de manera robusta la hipòtesi de la cascada amiloide, ja que els pacients reclutats ja presentaven la malaltia en un grau difícil de tractar. Per tant, els resultats negatius no es poden interpretar com una refutació de la hipòtesi amiloide (54,178). Les principals estratègies per a reduir els nivells d'A β que han arribat a assajos clínics de fase 3 són la immunització activa i passiva.

La immunoteràpia activa es va basar en un primer moment en l'administració del pèptid A β ₁₋₄₂ humà que va demostrar la producció d'anticossos en ratolins

PDAPP de 6 setmanes d'edat i d'11 mesos. Els resultats van mostrar que en els ratolins joves, la producció d'anticossos derivats de la immunització prevenia el desenvolupament de plaques amiloides, distròfia neurítica i astrogliosi. Per altra banda en els ratolins d'edat avançada va demostrar reduït l'extensió i la progressió de la patologia (179). En el 2001 es va començar l'estudi conegut com AN-1792 (NCT00021723), un assaig clínic en fase 2 que va testar la immunització passiva en 372 pacients amb AD de lleu a moderat. Degut a que el 6% dels pacients immunitzats va patir neuroinflammació, i fins i tot un va morir, l'estudi es va parar (180). Tot i així, als 4-5 anys de parar l'estudi, els pacients immunitzats havien patit menys declivi cognitiu que els no immunitzats i el grup control (181). Recentment, s'han acabat d'assajar en fases clíniques 2, dos fragments del pèptid, un emprant la seqüència N-terminal 1-6 i l'altre amb el fragment N-terminal 1-14 (NCT02565511 i NCT03531710, respectivament) (182).

La immunoteràpia passiva es basa en l'administració d'anticossos monoclonals, per tal de reduir la variabilitat en l'eficàcia entre pacients i atès que els nivells de títols es poden controlar més estretament que amb la immunització activa, hi ha menys risc d'efectes adversos. Dels anticossos monoclonals dirigits contra l'A β que han arribat a fase 3 en assajos clínics el bapineuzumab va ser el primer en fer-ho. Alguns exemples d'anticossos monoclonals testats contra el pèptid A β són els següents:

a) Bapineuzumab (AAB 001): És la versió humanitzada de l'anticòs 3D6 de ratolí (m3D6) el qual es dirigeix contra l'extrem N-terminal del pèptid A β , concretament l'A β ₁₋₅, i s'uneix tant a les formes monomèriques i oligomèriques solubles de l'A β com al fibril·lar, induint la fagocitosi per part de la micròglia guiada per la regió cristal·litzable (Fc) de l'anticòs (183). El bapineuzumab es va testar en dos assajos clínics en pacients amb AD en estadis de lleu a moderat i no va tenir efecte en la cognició ni en les activitats de la vida diària a les dosis provades (184). A més, els assajos es van discontinuar degut que a altes dosis es va associar el bapineuzumab amb l'aparició d'ARIA-H i ARIA-E (de

l'anglès *amyloid-related imaging abnormalities-microhemorrhage* i *-edema*, respectivament), especialment en individus portadors de l'al·lel *APOE ε4*. Es creu que aquestes anomalies són degudes als vessaments produïts per la ruptura dels vasos sanguinis cerebrals durant la retirada de l'Aβ per part del bapineuzumab. Tot i així, s'ha hipotetitzat que el fracàs en el tractament seria que l'efecte beneficiós que podria suposar l'eliminació de l'Aβ no tindria una repercussió en la progressió de la malaltia degut a que a l'estat moderat-sever dels pacients reclutats per als estudis clínics ja hi havia mort neuronal (184).

b) Ponezumab (PF-04360365): Es tracta d'un anticòs humanitzat dirigit contra l'extrem C-terminal de l'Aβ, concretament contra els residus 33-40 del pèptid Aβ₁₋₄₀, que reconeix les formes monomèriques, oligomèriques i fibril·lars (185). Tot i que en cinc assajos clínics en fase 1 es va demostrar segur, i que en dos assajos clínics en fase 2 (NCT00722046 i NCT00945672) va mostrar un augment de la concentració d'Aβ₁₋₄₀ en el plasma, no va mostrar eficàcia en la modificació de la càrrega d'Aβ en el líquid cefalorraquidi (CSF, de l'anglès *cerebrospinal fluid*) ni millora en la cognició (186,187) i es va discontinuar el seu desenvolupament.

c) Solanezumab (LY2062430): Està dirigit contra la regió central del pèptid Aβ (l'Aβ₁₆₋₂₄), i reconeix les espècies monomèriques, però no les fibril·lars. En estudis preclínics es va demostrar que la injecció perifèrica del solanezumab era capaç de segrestar l'Aβ del plasma i, per tant, seria capaç de modificar les deposicions del CNS (188). Actualment, s'està realitzant un estudi en fase clínica 3 amb un total de 1150 participants en fase primerenca (NCT02008357), ja que anteriorment no va mostrar beneficis davant l'AD en fase moderada (182).

d) Gantenerumab (RO4909832, RG1450): Reconeix un epítip conformacional de les fibres amiloides, concretament un epítip que inclou l'extrem N-terminal i la regió central del pèptid Aβ. Interactua, sobretot, amb els agregats d'Aβ que es formen al cervell, tan l'Aβ acumulat al parènquima com el vascular (189).

Actualment hi ha dos estudis en paral·lel en fase clínica 3 (NCT03443973 i NCT03444870).

e) Crenezumab (MABT5102A, RG7412): Reconeix múltiples espècies d'A β entre elles les oligomèriques i fibril·lars, així com les plaques amiloides. També està dirigit contra la regió central del pèptid A β , en aquest cas, però, contra l'A β ₁₂₋₂₃. La base és d'una IgG4, el que pretén evitar són els efectes pro-inflamatoris comunament associats a la regió Fc, com l'activació de la micròglia que sembla desencadenar l'edema i les microhemorràgies (190). Els resultats de l'assaig clínic en fase 3 va ser decebedor, ja que no hi va haver diferències entre els pacients tractats amb crenezumab i els placebo (NCT02670083).

f) Aducanumab (BIIB037): S'uneix a formes agregades del pèptid A β , però no als monòmers i presenta preferència per l'A β parenquimal per sobre del vascular. El camí de l'aducanumab va començar al 2016 quan es va demostrar que era capaç de reduir els nivells d'A β de manera dosi i temps dependent, tant en ratolins transgènics com en humans (191). Arrel d'aquest estudi es van començar dos assajos de fase 3 coneguts com a "EMERGE" i "ENGAGE". Els pacients van rebre una administració mensual durant 18 mesos i en un terç del pacients que van rebre la dosi més alta es van detectar la presència d'ARIA's. El març de 2019 Biogen va anunciar que tot i reduir els nivells d'A β el fàrmac no era capaç de reduir el declivi cognitiu més del que ho feia el placebo i que retirava l'aducanumab de la seva cartera. L'octubre de 2019, Biogen va anunciar que la revisió de les dades de l'assaig "EMERGE" demostraven que els pacients que van rebre la dosi major d'aducanumab mostraven una reducció significativa del declivi cognitiu (192). Biogen va presentar la sol·licitud de llicència a la FDA el 8 de juliol de 2020 i el 6 de novembre de 2020 un comitè extern de la FDA va votar en contra de l'aprovació ja que consideraven que les dades aportades no demostraven que els efectes beneficiosos del fàrmac fossin majors als efectes negatius, tot i així, el passat mes de juny la FDA va aprovar per la via ràpida la seva comercialització, considerant que les reduccions en la

càrrega β -amiloide són un punt final acceptable, doncs “és probable que desencadenin en un benefici clínic” (193).

Encara que la immunoteràpia anti-tau no està tan desenvolupada com l'anti-A β , existeixen nombrosos anticossos monoclonals dirigits contra tau i que actualment es troben en assajos clínics, com els següents:

a) Tilavonemab (ABBV-8E12, C2N 8E12, HJ9.3): Reconeix les formes agregades extracel·lulars de tau, unint-se a l'extrem N-terminal. Una avantatge és que no és necessària la seva captació per part de les neurones, ja que va dirigit a evitar la propagació de tau quan la proteïna és alliberada a l'espai extracel·lular. Actualment es troba en fase clínica 2 (NCT02880956).

b) Semorinemab (RO7105705, MTAU9937A, RG6100): De nou, es tracta d'un anticòs dirigit a la proteïna tau extracel·lular. S'uneix a l'extrem N-terminal de les sis isoformes de la proteïna tau humana, tant monomèrica com oligomèrica, independentment del seu estat de fosforilació. En ratolins model de taupatia (P301L) es va veure que era capaç de reduir la patologia cerebral d'una manera dosi-dependent alhora que augmentava la concentració de tau en plasma. Recentment ha finalitzat un assaig clínic en fase 2 (NCT03289143) que indica una clara millora cognitiva en la meitat dels pacients amb Alzheimer lleu-moderat i s'espera amb impaciència el començament de la fase 3 (194). A més n'hi ha un altre estudi en fase 2 en marxa (NCT03828747).

c) Gosuranemab (BIIB092, BMS-986168, IPN007): També està dirigit contra l'extrem N-terminal de la proteïna tau extracel·lular. La idea és que al retirar tau extracel·lular eviten la propagació entre cèl·lules cerebrals. Els resultats demostren que no promou efectes secundaris adversos greus i que disminueix els nivells de fragments N-terminals de tau en el CSF (195). Desafortunadament, s'acaba d'aturar un assaig clínic en fase 2 (NCT03352557) per falta d'efectes cognitius (196).

Fragments d'anticòs

Com s'ha dit, els assajos clínics del bapineuzumab es van discontinuar al 2012. Tot i així, és una molècula important ja que, a part de ser el primer anticòs en arribar a fase 3, va ser el sistema en el que es van trobar i definir per primera vegada els ARIA. La idea que la Fc del bapineuzumab era la responsable de l'activació de la micròglia i en darrer lloc de l'aparició de ARIA-E i ARIA-H va ser el punt de partida per a redissenyar aquest anticòs per part del nostre grup de recerca. L'scFv-h3D6 consta dels dominis V_H i V_L del bapineuzumab units mitjançant una cadena polipeptídica $(G_4S)_3$ (**Figura I-6B**). La hipòtesis de partida va ser que amb aquest fragment d'anticòs s'aconseguiria mantenir l'avidesa, evitant els efectes adversos de l'activació de la micròglia (197). En cultius cel·lulars de la línia de neuroblastoma SH-SY5Y es va demostrar que l'scFv-h3D6 era capaç de reduir la citotoxicitat del pèptid $A\beta_{1-42}$ i que el mecanisme pel qual s'evitava aquesta toxicitat era a través de retirar el pèptid amiloide de la via d'agregació amiloide cap a la via d'agregació WL (197). A més, en cultius primaris d'astròcits, l'scFv-h3D6 va reduir la captació d' $A\beta$ per part dels astròcits i va prevenir el seu efecte citotòxic (198,199). Pel que fa al estudis *in vivo* l'scFv-h3D6 va demostrar ser capaç de reduir els nivells d' $A\beta$ i, alhora, l'atròfia del volum cerebral (200–202) i, també, va prevenir la pèrdua neuronal en l'hipocamp i l'amígdala i va millorar la memòria espacial (203).

Ressonància Magnètica nuclear (RMN)

La imatge per ressonància magnètica (MRI, de l'anglès *magnetic resonance imaging*) és una tècnica no invasiva que pot proporcionar informació multiparamètrica sobre la anatomia, funció i metabolisme de diferents òrgans, també del cervell, és per això que s'ha convertit en una eina amb un gran potencial de diagnòstic i seguiment de diverses malalties, com ara l'AD.

Fonaments de la tècnica

La ressonància magnètica utilitza una propietat intrínseca de quasi totes les partícules elementals per a la generació d'imatges, concretament l'anomenat

espín nuclear (I). Aquest paràmetre serveix per a representar la rotació dels àtoms sobre el seu propi eix, com una baldufa (**Figura I-12A**).

Com a masses rotatòries amb càrrega elèctrica, els nuclis posseeixen un moment magnètic ($\vec{\mu}$) diferent a zero i es comporten com a petits imants, que poden ser afectats per un camp magnètic extern o per ones electromagnètiques i quan es desplacen indueixen voltatge en una bobina receptora. El moment magnètic té una magnitud i una direcció concreta per a cada tipus de nucli (**Figura I-12A**).

Si un conjunt de nuclis amb espín no es troben sota l'efecte d'un camp magnètic extern (B_0) s'orienten en totes direccions i, per tant, s'anul·len uns amb altres i no hi ha una magnetització neta (**Figura I-12C**). Per altra banda, quan s'exposen a un camp magnètic, el moment magnètic, o espín, s'alinea amb la direcció del camp i es poden adoptar dues orientacions diferents: paral·lela o antiparal·lela respecte al camp magnètic (**Figura I-12D**).

El moment magnètic no s'alinea de manera perfectament paral·lela o antiparal·lela amb el camp magnètic, sinó que degut a la interacció de cada $\vec{\mu}$ amb el B_0 es forma un angle entre els dos vectors que fan que $\vec{\mu}$ giri al voltant de B_0 en un moviment denominat precessió de Larmor (**Figura I-12B**).

$$v_0 = -\frac{\gamma}{2\pi} \cdot B_0$$

Equació 1. Equació de la freqüència de precessió de Larmor (v_0) en MHz. On γ és la constant giromagnètica característica de cada àtom i B_0 és la intensitat del camp magnètic extern en tesles (T).

Les dues orientacions de $\vec{\mu}$ sota un camp magnètic suposen dos nivells d'energia, essent la orientació paral·lela lleugerament preferida ja que és un estat energètic més favorable, per tant en una situació d'equilibri, una porció més gran s'alinearà de manera paral·lela amb el camp magnètic. Com que cada nucli orientat de manera antiparal·lela anul·la la càrrega d'un nucli orientat paral·lelament, la magnetització neta (\vec{M}_0) final que es produeixi serà molt

baixa. El camp magnètic és capaç d'influir en l'estat energètic, a major camp magnètic, més nuclis queden orientats de manera paral·lela, per la impossibilitat d'assolir nivells energètics alts i, per tant, una major magnetització neta, el que permetrà una major captació de senyal durant les sessions de ressonància. La diferència energètica entre els estats ve determinada per la següent equació:

$$\Delta E = h \cdot \gamma \cdot B_0$$

Equació 2. Equació de la diferència energètica (ΔE) entre els nivells d'energia. On h és la constant de Plank ($6,6262 \times 10^{-34} \text{ J}\cdot\text{s}$) que correlaciona l'energia amb la freqüència de gir, γ és la constant giromagnètica característica de cada àtom i B_0 és la intensitat del camp magnètic extern en tesles (T).

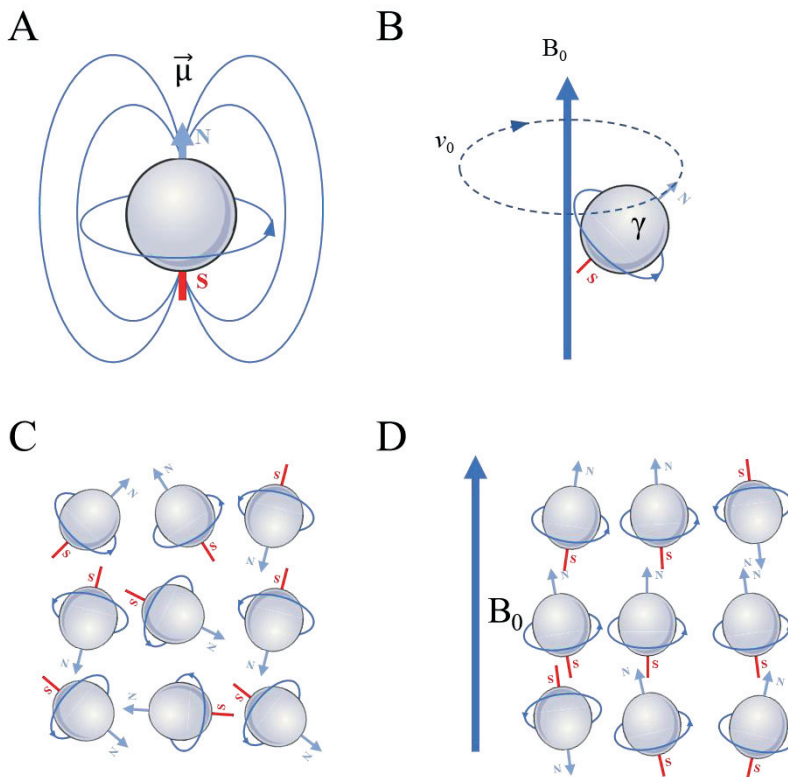


Figura I-12. Representació esquemàtica de nuclis dotats d'espins. (A) El moment magnètic ($\vec{\mu}$) causat pel gir del nucli amb un espín nuclear diferent a 0 provoca que el nucli es comporti com un imant amb un pol nord (N) i un pol sud (S). (B) Diagrama de la precessió de Larmor (ν_0) en aplicar un camp magnètic extern (B_0) sobre un nucli amb $\vec{\mu}$ i una constant giromagnètica (γ) única per a cada àtom. (C) Representació esquemàtica dels espins de nuclis que, en absència d'un camp magnètic extern, roten sobre el seu propi eix i s'orienten en direccions aleatòries. (D) En presència d'un camp magnètic, la majoria dels espins s'alineen en paral·lel a B_0 i generen una magnetització longitudinal. Adaptada de (204).

El registre del senyal de ressonància magnètica es basa en el canvi d'energia dels nuclis, el que es coneix com excitació del sistema, i enregistrant aquest canvi energètic per mitjà d'una bobina de recepció. El canvi d'energia succeeix al aplicar un camp magnètic addicional (B_1) en forma de pols de radiofreqüència (RF) que orienta la magnetització neta 90° respecte a B_0 , el que produeix una reorientació d'aquests des de l'eix z al pla xy. També s'aconsegueix que els àtoms tinguin coherència de fase, és a dir, que tots es trobin en el mateix punt del cicle precesional. Quan el pols secundari s'acaba, els nuclis tornen a l'estat inicial (eix z, paral·lel a B_0) mitjançant processos de relaxació (**Figura I-13**). Les bobines de recepció del pla xy determinen el canvi d'orientació degut a la pèrdua de voltatge durant la relaxació i reorientació.

Temps de relaxació

Tal i com s'ha esmentat en l'apartat anterior, els temps de relaxació determinen el senyal enregistrat per les bobines i es poden dividir essencialment en dos, temps de relaxació longitudinal i temps de relaxació transversal.

El temps de relaxació longitudinal (T_1) és el temps que tarda a realinear-se la magnetització neta transversal (M_{xy}) amb l'eix z després del pols transversal B_1 . La magnetització transversal disminueix i el senyal captat per les bobines de recepció decau de manera proporcional i es recupera la magnetització longitudinal (M_z) a l'eix z (**Figura I-14A, B**).

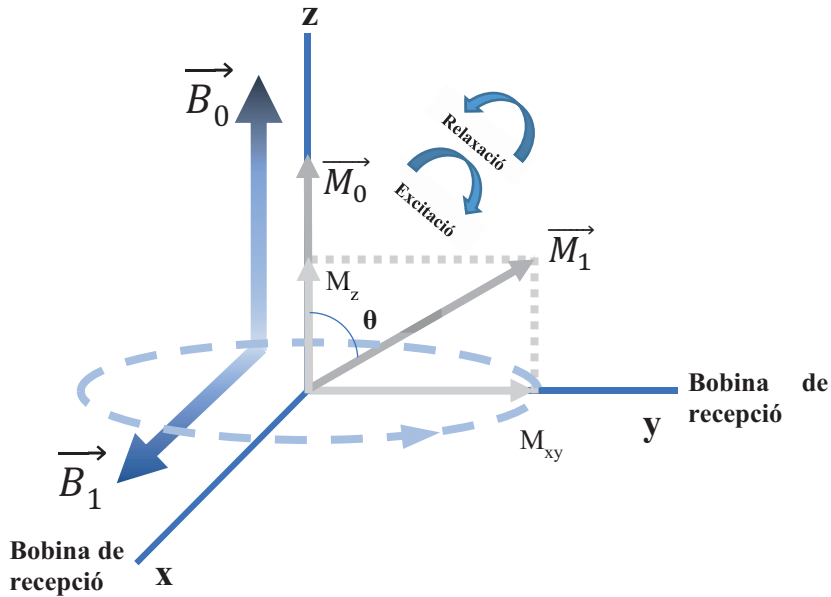


Figura I-13. Representació de l'efecte de la magnetització sobre una mostra rotant a la freqüència de ressonància. Al aplicar un camp magnètic addicional (B_1) (excitació), perpendicular al camp magnètic principal (B_0), es produeix un gir, d'angle θ , de la magnetització neta (M_1), que com qualsevol vector es divideix en les seves components longitudinal (M_z) i transversal (M_{xy}). Quan es deixa d'aplicar B_1 el sistema torna a l'estat d'equilibri (relaxació). La component transversal rota en el pla xy en torn a B_0 i indueix un senyal elèctric de corrent altern al ser captada per les bobines de recepció. Adaptada (204).

Per altra banda, el temps de relaxació transversal (T_2) es determina per la pèrdua de coherència de fase de la magnetització transversal (M_{xy}) després del pols de RF (B_1) (**Figura I-14C, D**). Durant el període de relaxació, els diferents espins precessen a diferents velocitats, per tant es perd la coherència i la intensitat de la M_{xy} disminueix a mesura que passa el temps, al contrarestar-se la intensitat de la magnetització dels diferents nuclis. La pèrdua de coherència es produeix per dues vies; la primera és la transferència d'energia entre espins com a resultat de fluctuacions locals en el camp magnètic, deguda a la interacció aleatòria entre els espins. També, es produeix per inhomogeneïtats intrínseques del camp magnètic extern que provoquen una pèrdua de senyal encara més ràpida que T_2 . Aquesta segona pèrdua de coherència es quantifica amb un paràmetre anomenat

Introducció

T_2^* . Les homogeneïtats d'aquest tipus es solen produir en les fronteres entre els teixits i l'aire o induïdes per camps magnètics locals (per exemple partícules de ferro). En resum, T_2 denota els processos de transferència energètica entre espins mentre que T_2^* fa referència als efectes de caps magnètics addicionals que contribueixen a la pèrdua de coherència de fase. T_1 i T_2 són independents l'una de l'altre, però ocorren més o menys simultàniament, tot i que la seva magnitud sol diferir per un ordre de magnitud.

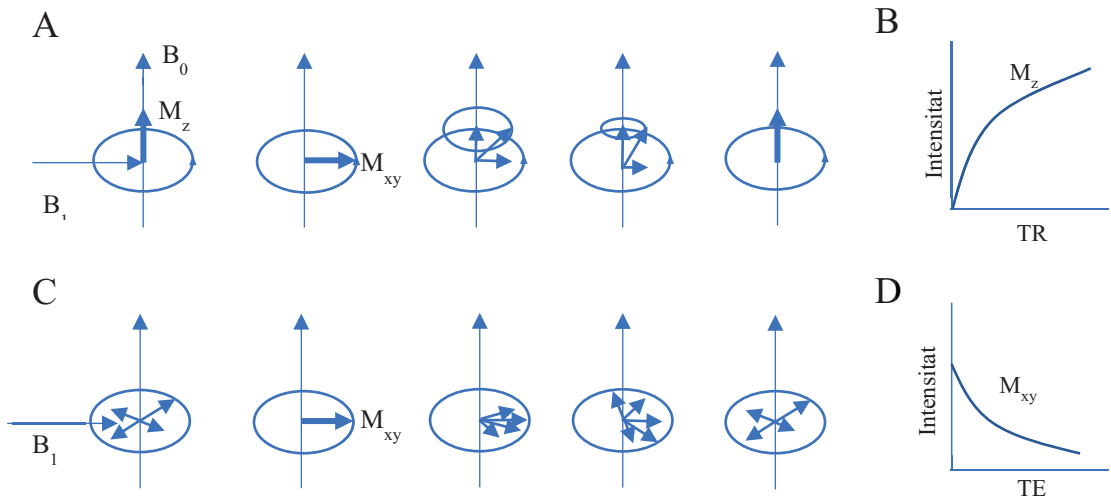


Figura I-14. Representació del temps de relaxació longitudinal (T_1) i transversal (T_2). (A) Representació del T_1 en diferents punts de temps, primer l'estat d'equilibri i l'aplicació del pols de 90° (B_1) que fa que la component longitudinal de la magnetització (M_z) sigui igual a 0 i apareix la component transversal (M_{xy}), a mesura que passa el temps, aquesta va disminuint fins a recuperar la component longitudinal i torna a l'estat d'equilibri tèrmic. (B) Corba d'intensitat que segueix M_z en funció del temps de repetició (TR). (C) Representació de T_2 en diferents punts del temps, primer l'estat d'equilibri, on no hi ha coherència de fase i els espins es neutralitzen mútuament, i l'aplicació del pols de 90° (B_1), els espins dels diferents nuclis adopten coherència de fase i el senyal M_{xy} és màxim. A mesura que va avançant el temps, aquesta coherència de fase es va perdent fins que al final tots els espins tornen a estar desfasats, moment en el qual M_{xy} és 0. (D) Corba d'intensitat que segueix M_{xy} en funció del temps d'eco (TE). Adaptada de (205).

Polsos de radiofreqüència

Els polsos de radiofreqüència serveixen per a excitar la mostra i obtenir un senyal de ressonància. Tot i així, la combinació de polsos permet obtenir imatges ponderades i augmentar el contrast d'una imatge. Per a poder treure el màxim partit de les diferències entre teixits, es combinen els següents paràmetres; el temps de repetició (TR) és l'interval entre dues excitacions successives i es mesura en mil·lsegons (ms). El temps d'eco (TE) és l'interval de temps entre l'aplicació del pols de RF d'excitació i la recopilació del senyal de ressonància (inducció de voltatge en la bobina de recepció) i es mesura en mil·lsegons (ms). Finalment, l'angle de gir (θ) és l'angle entre la magnetització longitudinal (M_z) i la magnetització transversal (M_{xy}) després del pols de RF.

Gradients

Una imatge de ressonància magnètica necessita de la localització espacial del senyal, per fer-ho s'apliquen gradients de camp magnètic que es superposen a B_0 en les tres direccions de l'espai (x, y i z). D'aquesta manera, es modifica el camp magnètic efectiu i els nuclis estan temporalment exposats a camps magnètics de diferent intensitat segons l'espai i la seva freqüència de precessió difereix entre ells.

Una imatge de ressonància magnètica és digital i consisteix en un conjunt de píxels disposats en files i columnes, als quals se li confereix un valor de intensitat de senyal a cada un. Cada un d'aquests píxels proporciona informació d'un volum tridimensional, per tant se'ls denomina vòxels. Per tal d'aconseguir aquestes imatges s'utilitzen els següents gradients:

- a) Gradient de selecció de tall (*slice-selection*) o codificació espacial. Determina la orientació del pla en el qual es vol obtenir la imatge 2D. El gruix de la secció es determina per l'amplitud del gradient i l'ample de banda del pols de RF (**Figura I-15**).

Introducció

- b) Gradient de lectura (*readout gradient*) o codificació en freqüència. És un gradient d'amplitud fixe que s'activa durant el temps d'adquisició del senyal i permet obtenir la codificació en freqüència.
- c) Gradient per a la codificació en fase (*phase encoding*). Gradient perpendicular al gradient de lectura i el de selecció de tall i entre ells i permet la codificació en fase. Aquest gradient no té una amplitud fixe i té efecte sobre la magnetització transversal dels espins.

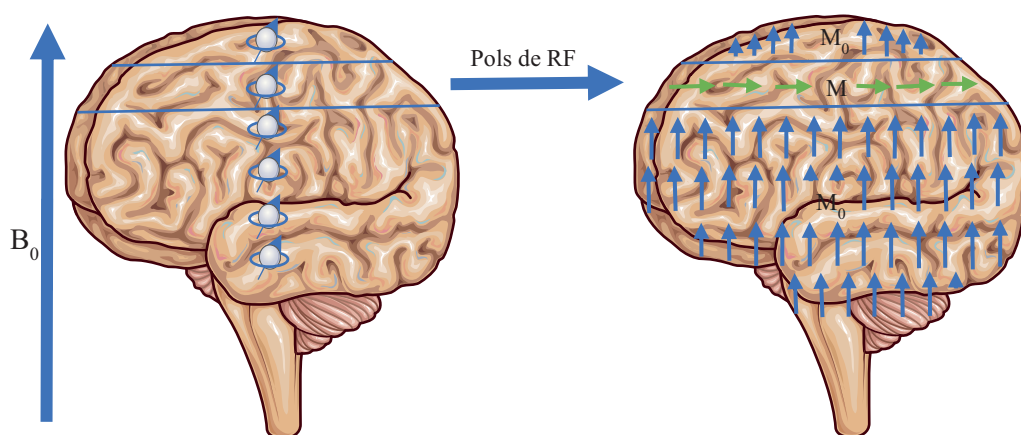


Figura I-15. Representació esquemàtica de l'aplicació de gradients per a obtenir seccions específiques d'un teixit. Per a obtenir una imatge d'una secció específica d'un teixit és necessari que l'excitació de la magnetització nuclear es produeixi exclusivament en un tall concret. L'excitació selectiva s'aconsegueix mitjançant l'aplicació d'un pols de radiofreqüència en presència d'un gradient de camp magnètic. Això condueix a una variació lineal de la intensitat del camp estàtic que provoca una variació espacial del valor de la freqüència de Larmor. Només s'excitaran els espins amb una freqüència de Larmor equivalent a la freqüència del pols de radiofreqüència aplicat. Adaptada de (206).

Imatges per ressonància magnètica (MRI)

Les imatges de ressonància normalment es realitzen amb el senyal generat per l' ^1H degut a la seva major sensibilitat i elevada concentració en els teixits. El

senyal està derivat principalment de l'aigua i el greix, considerant que el senyal d'altres espècies que contenen hidrogen és negligible en comparació, degut a la seva immobilitat molecular o a la baixa concentració a la qual es troben.

Existeixen tres característiques intrínseques dels teixits biològics que contribueixen a la intensitat del senyal i a millorar el contrast en les imatges de ressonància. La primera és la densitat protònica, és a dir, el nombre d'espins excitables per unitat de volum, que determina el senyal màxim que es pot obtenir d'un teixit concret. La densitat protònica pot ser despuntada minimitzant els altres dos paràmetres. Aquest tipus d'imatges s'anomenen imatges ponderades per densitat protònica. El temps T_1 és el temps que tarda un espín excitat en recuperar-se i tornar a estar disponible per a la següent excitació. El T_1 afecta indirectament la intensitat del senyal i pot variar a l'atzar. Les imatges, el contrast de les quals es determina principalment per T_1 , s'anomenen imatges ponderades en T_1 . Finalment, hi ha el temps T_2 , que determina la rapidesa amb la qual s'esvaeix el senyal de ressonància després de l'excitació. Les imatges, el contrast de les quals es determina principalment per T_2 , s'anomenen imatges ponderades en T_2 .

La densitat protònica i T_1 i T_2 són característiques intrínseques dels teixits biològics i poden variar àmpliament entre teixits. Depenent de quin paràmetre es destaca en una seqüència de ressonància, la imatge resultant difereix en el contrast entre teixits i permet la discriminació entre teixits.

Imatges ponderades en T_1

Per les imatges ponderades en T_1 s'ha de tenir en compte que com més es pugui excitar un nucli amb el següent pols, major serà el senyal de ressonància que es podrà adquirir. Per tant, l'adquisició es basa en la diferència entre teixits en el temps de relaxació després d'un pols de RF. Si s'utilitza un TR curt, un teixit amb un T_1 curt (relaxació ràpida) donarà un senyal major després del següent pols de RF. Per altra banda, un teixit amb un T_1 llarg (relaxació lenta) emetrà menys senyal que el teixit amb un T_1 curt i apareixerà més fosc. Una imatge adquirida amb un TR curt es considera ponderada en T_1 , ja que els teixits amb

Introducció

una relaxació ràpida, amb poc temps hauran recuperat gran part del senyal, mentre que aquells teixits amb un temps de relaxació llarg encara tindran una intensitat de senyal similar a l'inicial. Si es selecciona un TR llarg, tots els teixits, fins i tot aquells amb un temps de relaxació llargs tindran temps de retornar a l'estat d'equilibri, per tant, emetent tots una intensitat de senyal similar (**Figura I-16**).

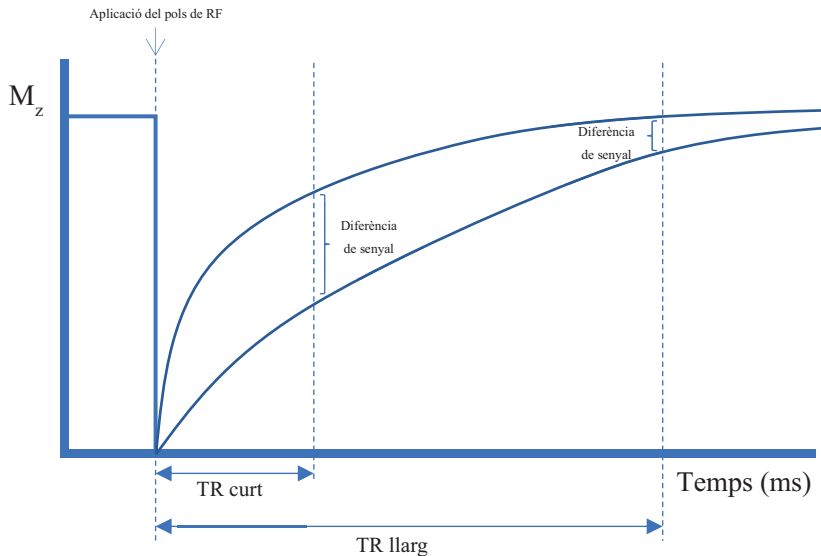


Figura I-16. Relació entre temps de repetició i contrast en T_1 . Entre dos teixits, un amb un temps de relaxació curt i un llarg, si s'utilitza un temps de repetició (TR) curt, el primer haurà recuperat gairebé el total de la seva magnetització longitudinal, per tant, mostrarà una intensitat de senyal alt, mentre que el segon teixit no haurà recuperat el senyal i el contrast entre ambdós teixits serà molt alt i la imatge serà ponderada en T_1 . Per altra banda, amb un TR llarg ambdós teixits recuperaran quasi la totalitat del senyal i el contrast entre elles quasi inexistent, minimitzant l'efecte de T_1 . Adaptada de (205).

Imatges ponderades en T_2

Les imatges ponderades en T_2 utilitzen la pèrdua de coherència de fase després d'un pols de RF, ja que diferents teixits presentaran diferents temps de pèrdua de coherència de fase. En aquest tipus d'imatge, si s'utilitzen TE curts, les diferències entre teixits seran petites per que la relaxació tan sols haurà

començat a decaure el senyal i no hi haurà una diferència entre aquells teixits amb un TE curt i un TE llarg i per tant la imatge resultant estarà poc ponderada en T_2 . Per altra banda, amb un TE més llarg, els teixits amb un T_2 més curt hauran perdut més senyal, apareixent més obscurs, mentre que aquells amb T_2 llarg apareixeran més brillants, ja que no hauran perdut tanta intensitat del senyal.

En el cas de l'aigua que es troba immobilitzada en compartiments cel·lulars, per exemple, els nuclis percebran petites diferències en el camp magnètic i perdran coherència ràpidament (T_2 curt) en canvi, l'aigua lliure, present en els ventricles cerebrals, a causa de la mobilitat de les molècules els canvis en el camp magnètic no tenen un gran efecte i, per tant, tindran una gran coherència al precessar (T_2 llarg), el que es tradueix com a un senyal major en les imatges ponderades en T_2 (**Figura I-17**). Està demostrat que la presència d'elements paramagnètics, com ara el ferro, poden alterar el temps de relaxació transversal (207), per tant la seva presència en les plaques amiloides pot ser detectada mitjançant aquest tipus d'imatges (208,209).

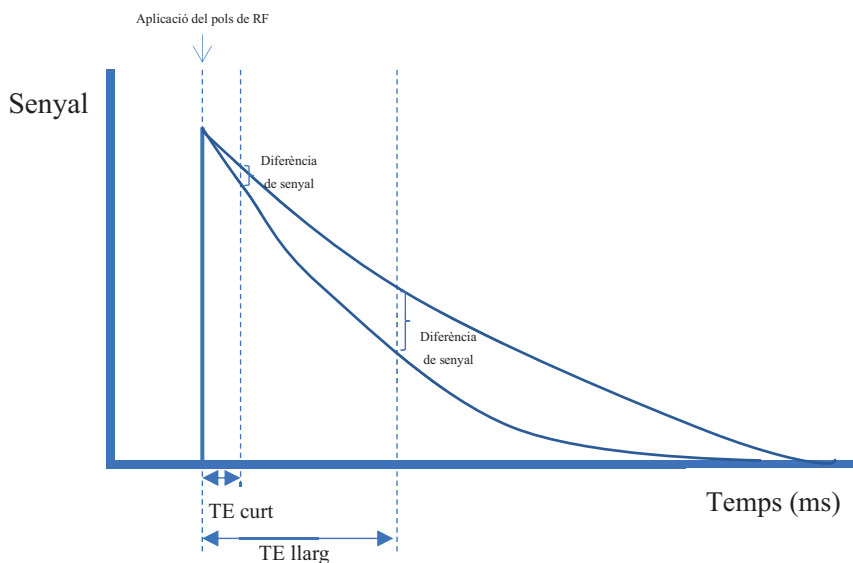


Figura I-17. Relació entre temps d'eco i contrast en T_2 . Quan el temps d'eco (TE) és curt, la diferència entre un teixit amb T_2 llarg i un amb un T_2 curt és quasi inexistent, ja que no han tingut temps de perdre la coherència de fase, i els valors de senyal de la magnetització transversal seran molt similars, minimitzant el contrast. Per altra banda, amb un T_2 llarg els espins del primer teixit no haurà perdut tanta coherència de fase com el teixit amb el T_2 curt i per tant la diferència de senyal serà major, augmentant el contrast. Adaptada de (205).

Imatges ponderades en T_2^*

El principi per a l'adquisició de imatges ponderades en T_2^* són similars als de les imatges ponderades en T_2 (210). En les imatges ponderades en T_2 es realitza un pols de 180° per a refocalitzar i eliminar les inhomogeneïtats del camp magnètic principal després del pols de FR. La relaxació T_2 tan sols reflecteix la pèrdua de senyal de la magnetització transversal del teixit. Per altra banda, la T_2^* no utilitza el pols de reorientació per enfocar els polsos, sinó que l'utilitza per canviar el gradient (211). Una altra característica diferencial és, com s'ha dit abans, que T_2^* fa referència als efectes de caps magnètics addicionals que contribueixen a la pèrdua de coherència de fase. Amb aquest tipus d'imatge és possible la detecció d'hemorràgies cerebrals. Com s'ha dit abans, el ferro pot generar inhomogeneïtats, per tant el ferro de la hemosiderina, un derivat de la hemoglobina, podrà ser fàcilment detectat per mitjà d'aquest tipus d'imatges i ser utilitzat com a marcador de micro-sagnats.

Imatges de difusió

Les imatges de difusió (DWI, de l'anglès *diffusion weighted imaging*) depenen de la mobilitat de les molècules de l'aigua, que normalment tenen un moviment aleatori en l'espai o isotròpic. Aquest moviment no depèn de la direcció en el cas de l'aigua lliure o en zones com els ventricles o el CSF. Tot i això, en la majoria d'estructures cerebrals, el moviment de l'aigua està restringit en certes direccions, és a dir, és anisotròpic. A partir d'aquest fet, es van desenvolupar diferents tècniques basades en el tensor de difusió (DTI, de l'anglès *diffusion tensor imaging*) les quals quantifiquen la velocitat i direcció del moviment de

les molècules d'aigua en un teixit. En el CNS, els tractes axonals i la mielina representen barreres físiques que imposen una direccionalitat en la difusió de l'aigua (anisotropia) i aplicant gradients de camp magnètic es pot mesurar aquest efecte.

Dins un vòxel, la difusió està limitada a certes direccions i pot ser modelada com un el·lipsoide en 3D amb una matriu 3x3. El tensor de difusió (D) pot ser caracteritzat per 3 vectors propis (Σ_1 , Σ_2 i Σ_3) (**Figura I-18**). D'aquest el·lipsoide es poden extreure diversos paràmetres. El volum descriu la difusivitat mitjana, que és la mesura del desplaçament mitjà global de les molècules d'aigua. L'excentricitat descriu l'anisotropia fraccional (FA), que caracteritza la fracció del moviment molecular que pot ser atribuïble a la orientació de fibres axonals. Els valors de FA poden variar entre 0, per una variació isotròpica (el moviment es troba limitat per igual en totes les direccions) i 1, per un moviment amb anisotropia infinita. Un altre paràmetre que es pot extreure és el coeficient de difusió aparent, (ADC, de l'anglès *apparent diffusion coefficient*) que té en compte el fet que les barreres de restricció, com la mielina i altres estructures cel·lulars, poden interferir amb la difusió i, per tant, les velocitats de difusió tan sols són aparents. En aquest cas, un coeficient de difusió més gran es reflecteix com una zona hiperintensa en la imatge (212).

Els paràmetres anteriors es poden utilitzar per a deduir la organització general dels tractes de fibres, ja que la desorganització dels axons provoca una difusió no restringida o isotròpica i, per tant, un valor de FA baix. Un valor d'ADC baix sol indicar una bona organització. Els paràmetres d'anisotropia poden assenyalar la interrupció de la difusió al llarg dels axons.

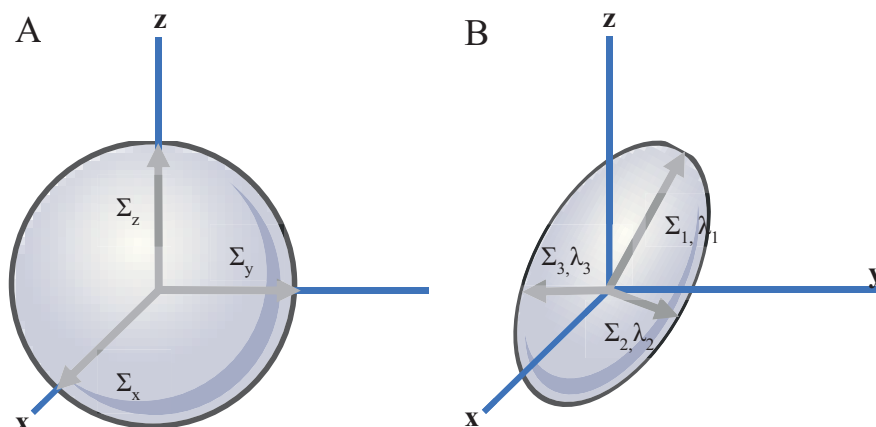


Figura I-18. Representació esquemàtica de la difusió de l'aigua en un vòxel. (A) representació esquemàtica d'un vòxel ple d'aigua on el moviment és isotròpic (moviment no restringit en cap de les direccions). (B) Representació esquemàtica d'un vòxel on el moviment és anisotròpic i es troba restringit en varies direccions de l'espai. La orientació pot ser descrita amb tres vectors propis ($\Sigma_1, \Sigma_2, \Sigma_3$), cada un associat a un valor propi ($\lambda_1, \lambda_2, \lambda_3$). Adaptada de (212).

Una anisotropia reduïda o un augment de l'ADC no permeten discernir entre dany axonal o de la mielina, però es pot avaluar per mitjà d'altres paràmetres que proporciona el DTI. A través de la diagonalització de la matriu és possible fer coincidir les direccions ortogonals amb les principals direccions de difusió, és a dir, al llarg dels quals la difusió és més ràpida i extreure tres valors propis (λ_1, λ_2 i λ_3), cada un associat a un vector propi i associat a cada vòxel. Aquests valors propis es poden utilitzar per caracteritzar la difusivitat direccional descrivint el moviment de l'aigua paral·lela a (difusivitat axial, $\lambda_{||}$) i perpendicular a (difusivitat radial, λ_{\perp}) als tractes axonals (**Figura I-19**) (212).

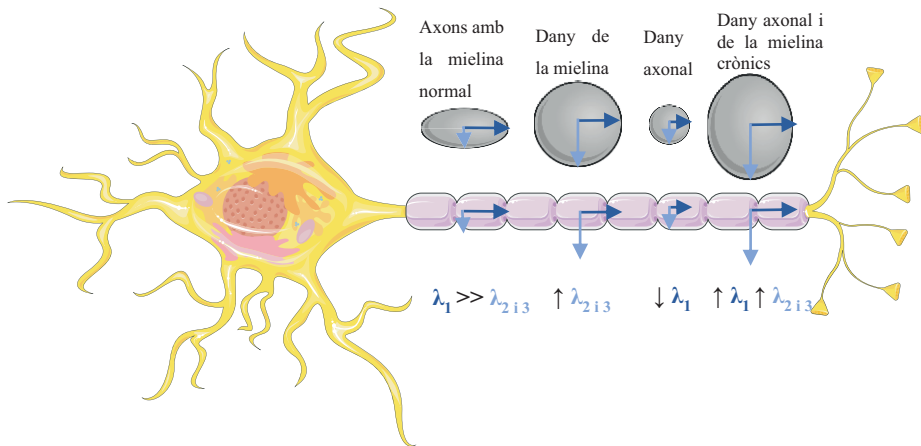


Figura I-19. Model que resumeix els coneixements sobre els canvis en la difusivitat en diferents estats del dany axonal i de la mielina. En un axó sà, la difusió està limitada en la direcció perpendicular a la longitud de l'axó (λ_2, λ_3) i es caracteritza com la difusivitat radial (λ_{\perp}). Normalment la difusivitat és major en paral·lel a la llargada de la fibra (λ_1) i es caracteritza com la difusivitat axial (λ_{\parallel}). Adaptada de (212).

Objectius



Objectius

Aquesta tesi investiga l'aplicació dels fragments variables de cadena senzilla en dos nivells de desenvolupament tecnològic diferent i amb objectius diversos. Per una part, en un primer apartat es mostra el desenvolupament d'una investigació molt bàsica sobre els mecanismes d'una amiloïdosi sistèmica com és l'amiloïdosi de cadena lleugera (AL). Per l'altra part, en el segon i tercer apartat s'ha estudiat el format scFv com a fàrmac per a tractar una amiloïdosi localitzada com és la malaltia d'Alzheimer. És per això que els objectius d'ambdues parts són radicalment diferents. En el primer apartat els objectius a assolir són els següents:

1. Dissenyar scFvs derivats dels dominis V_L de les proteïnes AL-09 (VVA09, patològica) i κI O18/O8 (VVK08, germinal), expressar-los recombinantment i estudiar per mitjà de diverses tècniques biofísiques la seva via de plegament per tal de comprovar si la dimerització forçada pel format scFv promou conformacions aberrants o manté l'estructura nativa.
2. Determinar la via d'agregació del VVA09 i VVK08 per comprovar si la dimerització forçada pel format scFv promou un canvi en la via d'agregació amiloide que presenten els dominis variables de cadena lleugera implicats en l'AL, i contribuir d'aquesta manera a la informació necessària per a entendre la interfície d'agregació com a una possible diana terapèutica.
3. Determinar si la dimerització forçada permet establir un sistema per assajar biblioteques de fàrmacs inhibidors de l'agregació amiloide en un futur.

Per altra banda, en el segon apartat els objectius a assolir són:

4. Determinar l'efecte d'una teràpia anti-A β en la càrrega de la proteïna tau en un model murí d'Alzheimer (3xTg-AD).

Objectius

5. Avaluar la seguretat, en quant a la inflamació, de l'scFv-h3D6 (anti-A β) en ratolins 3xTg-AD d'avançada edat.

Finalment, en el tercer, i darrer apartat, els objectius són els següents:

6. Comparar l'eficàcia i la seguretat de l'scFv-h3D6 respecte al mAb-m3D6 en el model murí d'Alzheimer APP23, per tal de demostrar que la falta de regió Fc dels scFv implica un tractament més segur i, alhora, igual d'eficaç, que amb anticossos complets en malalties neurodegeneratives.

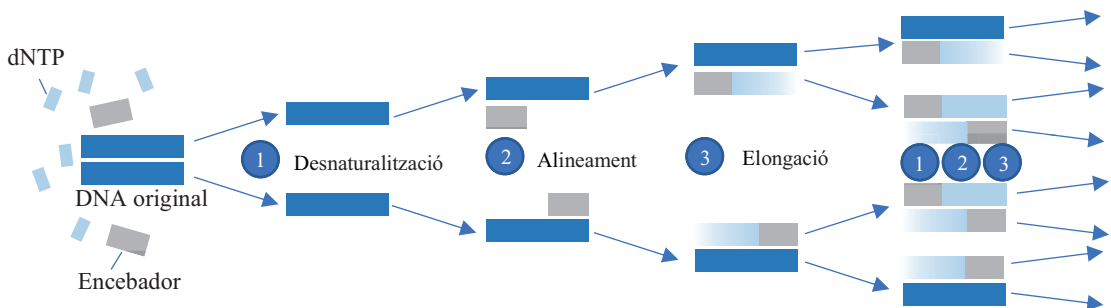
Materials i Mètodes



Tècniques del DNA recombinant

Reacció en cadena de la polimerasa

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) és una tècnica de biologia molecular que permet la multiplicació *in vitro* d'una determinada seqüència de DNA (213). Tot i que permet la mutagènesi dirigida d'una seqüència d'interès, en aquest treball tan sols s'ha emprat per a l'amplificació de DNA amb l'objectiu de subclonar els gens d'interès, mitjançant l'addició de dianes de restricció als extrems. Breument, la PCR consisteix en la separació de la doble cadena de DNA per a que sigui possible la hibridació d'uns encebadors (o *primers*) específics que flanquegen la seqüència d'interès pels extrems 5' i 3'. Aquests encebadors, permeten la unió d'una DNA polimerasa termoestable i en presència de Mg^{2+} i desoxiribonucleòtids trifosfat (dNTPs) l'elongació d'aquests encebadors, els quals tenen a l'extrem 3' un grup hidroxil (-OH) que reacciona amb el dNTP. És un procés cíclic, el qual, mitjançant el canvi de temperatura, permet augmentar el número de còpies d'un fragment de DNA (Figura M-1).

**Figura M-1. Funcionament de la reacció en cadena de la polimerasa (PCR).**

1) Desnaturalització: La mostra s'escalfa a 95°C durant 30 segons per tal de desfer els ponts d'hidrogen que mantenen unides la doble cadena del DNA a amplificar. 2) Alineament: Es redueix la temperatura fins als 50-65°C per tal que els encebadors s'uneixin a la cadena de DNA. 3) Elongació: La temperatura s'augmenta fins a la temperatura òptima de la polimerasa (que depèn de cada polimerasa) per permetre l'addició de dNTPs al *primer*. La quantitat final de DNA es duplica a cada cicle i per tant genera una amplificació exponencial. Adaptada de (214).

Per una reacció de 50 μL es va realitzar la següent mescla:

- 50 ng DNA motlle
- 2.5 μL de cada encebador (10 μM)
- 4 μL dNTPs (2.5 mM)
- 10 μL *Q5 reaction buffer 5X*
- 0.5 μL DNA polimerasa Q5 (2 U/ μL)
- ddH₂O fins 50 μL

Enzims de restricció

Els enzims de restricció són proteïnes que detecten una determinada diana de DNA, generalment uns 6-8 nucleòtids que formen seqüències palindròmiques, i generen un tall de la doble cadena. El tall pot ser rom o cohesiu. Els tallals cohesius permeten dirigir l'orientació del DNA d'interès en un vector determinat quan s'utilitzen dos enzims de restricció diferents.

Per una reacció de 20 μL es va realitzar la següent mescla:

- 0.75 μL *XhoI* (20 U/ μL)
- 0.75 μL *NcoI-HF* (20 U/ μL)
- 0.2 μL BSA, Molecular Biology Grade 100x (10 mg/mL)
- 2 μL *CutSmart Buffer 10x*
- 1 μg DNA
- ddH₂O fins 20 μL

La reacció es va incubar 1h i 30 min a 37°C.

Reacció de lligació

La reacció de lligació, permet la unió de dos fragments de DNA prèviament digerits per enzims de restricció compatibles. La relació molar insert: vector (I:V) ha de ser, aproximadament, 3:1. La concentració d'insert i vector es va mesurar de manera aproximada mitjançant un gel d'agarosa al 2%, 0.5 $\mu\text{g/mL}$ bromur d'etidi i es va revelar amb un sistema Gel Doc XR+ (Biorad, EEUU). La reacció de lligació es va realitzar durant 18h a 16°C.

Per una reacció de 10 μ L es va realitzar la següent mescla:

- X μ L de mescla I:V (3:1)
- 1 μ L *T4 DNA Ligase Reaction Buffer* 10x
- 1 μ L *T4 DNA Ligase* (400 U/ μ L)
- ddH₂O fins a 10 μ L

Purificació de DNA

El DNA plasmídic es va purificar mitjançant el kit *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific, EEUU) seguint les instruccions del fabricant.

La separació dels fragments de DNA, després d'una digestió enzimàtica o una PCR es va realitzar amb una electroforesi en gel d'agarosa a l'1.2%. Després, la purificació del DNA del gel d'agarosa es va portar a terme amb el kit *GeneJET Gel Extraction Kit* (Thermo Fisher Scientific, EEUU) seguint les instruccions del fabricant.

En alguns casos, quan la PCR va ser d'elevada complexitat, es va realitzar un pas de purificació extraordinari mitjançant el kit *GeneEluteTM PCR Clean-Up* (Sigma, EEUU).

Per tal de comprovar que el procés de clonació era correcte, que no hi havia mutacions o modificacions en la pauta de lectura, el DNA plasmídic purificat es va portar a seqüenciar a l'empresa Macrogen (Corea).

Quantificació de DNA i proteïna

La concentració de DNA es va quantificar mitjançant un espectrofotòmetre Nanodrop 2000 UV-Vis (Thermo Fisher Scientific, EEUU), es va escanejar entre 200 nm i 320 nm. La puresa del DNA es va determinar amb els coeficients llistats a continuació (**Taula 1**).

Taula 1. Coeficients determinats espectrofotomètricament per avaluar la puresa del DNA

Coeficient	Valor	Indicador de puresa
260/280	1.8	Pur
	>1.8	Contaminació per RNA
	<1.8	Contaminació per proteïna
260/230	1.8-2.2	Pur
	>1.8	Contaminació per fenol

La concentració de proteïna pot ésser determinada amb el mateix espectrofotòmetre o mitjançant un espectrofotòmetre Varian Cary Eclipse fluorimeter (Agilent Technologies, EEUU). Les proteïnes presenten un màxim d'absorció a 280 nm, degut a la presència de residus aromàtics com ara el triptòfan, la fenilalanina o la tirosina. La concentració de proteïna es va determinar utilitzant el coeficient d'extinció molar (ϵ) a 280 nm i mitjançant la llei de Lambert-Beer. El coeficient d'extinció molar es va calcular utilitzant l'eina informàtica ProtParam de ExPASy.

Expressió de proteïnes

Soques bacterianes

Escherichia coli XL1-Blue és una soca de clonació, és a dir, té com a finalitat aconseguir un gran nombre de còpies del plasmidi amb el qual està transformada. El seu genotip és el següent: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacIq ZΔM15 Tn10* (Tet^r)]. La soca, és deficient en activitat endonucleasa (*endA*) i recombinasa (*recA*), el que suposa un augment de l'estabilitat del vector recombinant. La mutació *hsdR* evita el tall del DNA clonat pel sistema endonucleasa *EcoK*, ja que es tracta d'una soca derivada de K12. Finalment, la presència del transposó *Tn10* confereix a la soca resistència a la tetraciclina.

Escherichia coli Origami2 (DE3), derivada de K12, és una soca d'expressió amb la qual és possible sintetitzar altes quantitats de proteïna recombinant. DE3 indica que la soca té inserit en el seu genoma el gen de la polimerasa del fag T7, l'expressió de la qual es pot induir amb IPTG; Per això, la proteïna d'interès

s'ha de trobar codificada sota la regulació del promotor de T7, com és en el cas dels vectors de la sèrie pET. *E. coli* Origami2 té el següent genotip: $\Delta(ara-leu)7679 \Delta lacX74 \Delta phoA PvuII phoR araD139 ahpC gale galK rpsL F^+[lac^+ lacI^q pro]$ (DE3) *gor522::Tn10 trxB* (Str^r, Tet^r). La deficiència en tioredoxina reductasa (*trxB*) i en glutatió reductasa (*gor*) és extremadament útil per a l'expressió de proteïnes amb enllaços disulfur, com és el cas dels scFv, ja que l'absència d'aquestes dues proteïnes es tradueix en un citoplasma oxidant, favorable per a la formació dels esmentats enllaços. A més, la soca Origami2 és resistent a la tetraciclina (*Tn10*) i a la estreptomycinina (*trxB*) (215,216).

Escherichia coli BL21 (DE3) també és una soca d'expressió, amb el gen del bacteriòfag T7 inserit i induïble amb IPTG, encara que deriva de la soca B. Es considera l'estàndard de les soques d'expressió, degut a que la seva utilització està àmpliament estesa. El seu genotip és el següent: $F^- omp gal dem lon hsdS_B(r_B^- m_B^-) \lambda(DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB^+]_{K-12}(\lambda^S)$. La deficiència en les proteases *ompT* i *lon* provoca que aquesta soca sigui molt adequada per a la producció de proteïnes recombinants (217).

Soques de llevat

Pichia pastoris és un llevat, que com a cèl·lula eucariota, presenta diverses avantatges respecte a les cèl·lules procariotes a l'hora d'expressar proteïnes recombinants. Algunes d'aquestes avantatges són les modificacions postraduccionals o una maquinària de plegament de proteïnes més complexa. Cal destacar que presenta una avantatge respecte a *Saccharomyces cerevisiae* ja que no hiperglicosila les proteïnes. A més, és més senzill treballar amb *P. pastoris* que amb altres cèl·lules eucariotes com les cèl·lules d'insecte o de mamífer.

P. pastoris és un llevat metilotròfic, capaç d'emprar el metanol com a font de carboni. Per a realitzar aquesta tasca, expressa grans quantitats d'alcohol oxidasa (*AOX1* i *AOX2*). S'estima que el 30% de les proteïnes solubles expressades en presència de metanol són alcohol oxidases. El promotor

d'aquest gen és el que s'utilitza per a regular l'expressió de proteïna recombinant.

Vectors d'expressió

El vector pET28a (5369 pb) es troba representat a la **Figura M-2A**. Va permetre la selecció de les cèl·lules transformats mitjançant la resistència a kanamicina (Km^r). A més, el pET28a permet l'addició d'una cua d'histidines (His-Tag; 270-287 pb) a l'extrem N-terminal de la proteïna d'interès. Aquesta seqüència es troba al *multiple cloning site* (MCS; 158-296 pb). Tot i així, en aquest treball el MCS va ser substituït per la seqüència de la proteïna d'interès i la cua d'histidines no es trobava present en el constructe final. Finalment, el pET28a incorpora l'origen de replicació pBR322, per tant, es tracta d'un plasmidi amb baix número de còpies (15-20 còpies/cèl·lula).

El pPICZ α A (3593 pb; **Figura M-2B**) és un vector d'expressió per a llevats i conté els següents elements: promotor i terminador del gen *AOXI*, que permeten elevats nivells d'expressió i la inserció del gen d'interès (o múltiples còpies d'aquest) mitjançant recombinació homòloga; el MCS per a la inserció del gen d'interès al plasmidi; l'origen de replicació pUC, que permet la replicació i el manteniment del plasmidi en *E. coli* en un alt número de còpies (500-700 còpies/cèl·lula); finalment, un gen de *Streptoalloteichus hindustanus* sota el control del promotor de *EM7*, que confereix resistència a zeocina als bacteris i llevats transformats. També cal esmentar que aquest plasmidi conté 3 dianes de restricció úniques, que permeten la linealització del vector, necessària per a la integració del gen d'interès al genoma de *P. pastoris*. A més, destacar que el pPICZ α A no conté cap origen de replicació per a llevats, el que permet que les cèl·lules de llevat seleccionades per la resistència a la zeocina, siguin aquelles que han incorporat al seu genoma, mitjançant recombinació homòloga, el gen de la resistència. Finalment, el pPICZ α A, permet l'addició d'un pèptid senyal a l'extrem C-terminal, el qual promou la translocació de la proteïna recombinant a l'espai extracel·lular. El pèptid senyal és eliminat mitjançant el tall de dues proteases endògenes de *P. pastoris* (Ste13 i Kex2).

- Plaques d'agar, pel creixement de bacteris en un medi sòlid, permet el creixement i posterior selecció de colònies aïllades. Es prepara amb medi LB i 15% agar (w/v) i els antibiòtics pertinents.
- Medi LB ↓↓NaCl. És medi LB amb un 0.5% NaCl (enlloc de 1%). Permet treballar amb menors quantitats de zeocina, ja que el NaCl inactiva l'antibiòtic. Es va utilitzar per al manteniment del plasmidi pPICZαA en soques de *E. coli*.
- Medi YPD (de l'anglès *yeast extract peptone dextrose*) és un medi ric per a la generació de biomassa en llevats. Conté 10 g d'extracte de llevat i 20 g de peptona en 900 mL de ddH₂O. Una vegada autoclavats, s'afegeixen 100 mL de glucosa 20%.
- Medi BMGY (de l'anglès *buffered glycerol-complex medium*) és un medi ric adient per a la generació de biomassa de llevats. El glicerol serveix com a font de carboni per al llevat. Es prepara amb 10 g d'extracte de llevat i 20 g de peptona en 700 mL de ddH₂O. Una vegada autoclavats, s'afegeixen 100 mL de tampó fosfat (K₂HPO₄/KH₂PO₄) 1M, pH 6, 100 mL de YNB 13.4% (de l'anglès *yeast nitrogen base*), 100 mL de glicerol 10% i 2 mL biotina 0.2%.
- Medi BMMY (de l'anglès *buffered methanol-complex medium*) és un medi on no es proporciona font de carboni pel llevat, en el seu lloc, s'hi afegeix metanol, que indueix l'expressió de la proteïna recombinant. A més, el tampó fosfat permet mantenir un pH lleugerament àcid que evita un ambient òptim per a les proteases del medi, molt adient per a la secreció extracel·lular de proteïnes. És idèntic al medi BMGY, però no conté glicerol, sinó una concentració final de metanol del 0.5%.
- Plaques agar YPD i YPDS. Es realitzen amb medi YPD o YPDS (YPD amb 1M sorbitol) i 2% agar. Permeten el creixement de llevats en medi sòlid i la selecció de colònies aïllades de llevats transformants.

La concentració de treball dels diferents antibiòtics va ser: 50 µg/mL kanamicina (en H₂O), 10 µg/µL tetraciclina (en etanol), 100 µg/mL d'ampicilina (en H₂O) i 100 µg/mL zeocina (en H₂O).

Transformació d'Escherichia coli

El protocol de transformació bacteriana és idèntic per a les diferents soques d'*E. coli*. Per obtenir cèl·lules competents es va partir de glicerinars (cultius saturats amb 20% glicerol) que es van plaquejar en estria en plaques d'LB sense els antibiòtics de selecció (kanamicina per al pET28a i zeocina per al pPICZαA) i es van deixar tota la nit a 37°C. Després, es va agafar una colònia aïllada amb una nansa de Kohle estèril i es va inocular en un tub que contenia medi LB i l'antibiòtic corresponent a la resistència intrínseca de la soca. Es va incubar durant tota la nit a 37°C i 250 rpms. El dia següent, les cèl·lules es van diluir (1/100) en medi LB i es van deixar créixer a 37°C i 250 rpms fins que la densitat òptica a 600 nm (DO_{600nm}) va ser d'aproximadament 0.4-0.5 UA. Després, el cultiu es va centrifugar a 2900 g durant 15 minuts i 4°C en una centrífuga Heraeus Megafuge 1.0R (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Una vegada centrifugat, es va descartar el sobrenedant i es va resuspendre el pellet en 25 mL de $CaCl_2$ 100 mM fred i es va deixar reposar en gel durant 15 minuts. Després d'això, es va realitzar un nou pas de centrifuga i el pellet es va resuspendre en 2.5 mL de $CaCl_2$ 100 mM fred i es va deixar mínim 1h en gel. Finalment, les cèl·lules competents es van distribuir en alíquotes de 100 μ L (amb 30 μ L de glicerol 50%) i es van congelar amb nitrogen líquid per a ser guardades a -80°C fins al seu ús.

Per a transformar cèl·lules competents, es van afegir menys de 50 ng de DNA plasmídic en una alíquota i es va barrejar per inversió. Després, les cèl·lules es van incubar durant 30 min en gel i es van transferir a un bany tèrmic a 42°C durant 90 segons. Després del xoc tèrmic, les cèl·lules es van guardar en gel durant 5 minuts. Un cop passats els 5 minuts, es va afegir 1 mL de medi LB a les cèl·lules i es va incubar 1h a 37°C i agitació. Finalment, es va centrifugar el cultiu durant 3 minuts a màximes revolucions. El pellet es va resuspendre en 100 μ L de medi LB, es va sembrar en una placa de LB que contenia kanamicina o zeocina i es va incubar tota la nit a 37°C.

Una vegada crescudes les plaques amb colònies transformants, es va picar una colònia aïllada i es va inocular en medi LB amb els antibiòtics corresponents. Aquests cultius es van incubar tota la nit a 37°C i 250 rpms en un incubador Ecotron (Infros HT, Suïssa). Per a la purificació de DNA, 4.5 mL de cultiu saturat es van centrifugar a màximes revolucions durant 3 minuts en una microcentrífuga Eppendorf 5424 (Thermo Fisher Scientific, EEUU). El plasmidi purificat es va enviar a seqüenciar al servei de Standard-Seq de Macrogen Inc. (Corea). El DNA de les minipreps seleccionades es van congelar i es van guardar a -20°C fins al seu ús.

Transformació de Pichia pastoris

En aquest punt, el nostre gen d'interès ja es trobava clonat en el vector d'expressió de *P. pastoris* i en fase amb el pèptid senyal. Per a transformar *P. pastoris*, es van preparar 5-10 µg de DNA plasmídic linealitzant amb l'enzim de restricció *PmeI* (414 pb), el qual genera extrems roms. La reacció per a linealitzar el DNA és idèntica a l'explicada anteriorment, però en aquest cas es va inactivar l'enzim de restricció incubant la mostra 20 min a 80°C. Una vegada finalitzada la linealització, es va separar una alíquota, s'hi va afegir tampó d'aplicació 6X i es va córrer en un gel a l'1.2% d'agarosa per tal de comprovar que el plasmidi havia estat linealitzat correctament. El DNA restant es va purificar amb el kit *GeneEluteTM PCR Clean-Up* (Sigma, EEUU). Una vegada el DNA va estar preparat, es va poder començar amb el protocol d'electroporació.

Per tal de transformar aquest llevat es poden portar a terme diferents mètodes. Un dels mètodes més interessants quan l'objectiu és la inserció de múltiples còpies de DNA és l'electroporació. Per tal de generar cèl·lules de llevat electrocompetents es va partir d'un cultiu de nit. L'endemà, es van inocular 50 mL de medi YPD amb 0.1 mL de cultiu saturat i es va deixar créixer a 28°C i 250 rpms fins que la DO₆₀₀ es va trobar a prop de 1.3 UA. Seguidament, es van centrifugar els cultius a 500 g durant 5 min i a temperatura ambient, es va resuspendre el pellet amb 9 mL de solució BEDS (bicina-NaOH 10 mM, pH

8.3, etilen glicol 3% (v/v), dimetil sulfòxid (DMSO) 5% (v/v) i sorbitol 1 M) i 1 mL de DTT 1M i es va incubar durant 5 min a 28°C i 250 rpms. A continuació, els cultius es va tornar a centrifugar sota les mateixes condicions que en el pas anterior i es va resuspendre el pellet amb 1 mL de solució BEDS, aquesta vegada sense DTT. Es van prendre 40 µL de cèl·lules resuspeses, es van barrejar amb el DNA linealitzat anteriorment dins una cubeta d'electroporació i es va deixar 5 min en gel. Per a electroporar, es van fixar 1.5 kV, 200 Ω i 25 µF. Immediatament després del pols, es va afegir 1 mL de 1M sorbitol fred i seguidament 1 mL de YPD. Les cèl·lules es van incubar com a mínim durant 2h a 28°C i 250 rpms i, finalment, es van plaquejar en plaques YPDS agar amb els antibiòtics corresponents. És important destacar que les colònies resistents poden trigar entre 3 i 10 dies en créixer (218).

Com s'ha comentat anteriorment, el procés d'electroporació permet la inclusió en el genoma de diverses còpies del gen d'interès. D'aquesta manera, per tal de seleccionar aquelles cèl·lules amb més còpies, i per tant majors nivells d'expressió, es van picar diverses colònies aïllades i es van fer créixer de manera seqüencial en medis amb quantitats creixents d'antibiòtic. El cultiu que va ser capaç de créixer amb la major concentració de zeocina va ser el que es va utilitzar per fer un glicerinat i amb el qual es va expressar la proteïna.

Expressió de proteïnes recombinants en Escherichia coli

A partir d'una placa es va seleccionar una única colònia aïllada i es va inocular en un tub que contenia medi LB amb els antibiòtics pertinents i es va incubar tota la nit a 37°C i 250 rpms. Al dia següent, amb 1 mL de cultiu saturat es va inocular 1L de 2xYT i es va incubar a 37°C i 250 rpms fins que la DO_{600nm} va arribar a 0.6-0.8 UA. La inducció de l'expressió es va realitzar afegint IPTG 0.5 M. Una vegada transcorregut el temps d'inducció, el cultiu es va centrifugar 15 minuts a 2900 g en una centrífuga Avanti J-26XP (Beckman Coulter, EEUU), rotor JA-10. Els pellets es van resuspendre amb 40 mL de tampó de lisis (Na₂HPO₄ 5 mM, pH 6.5, PMSF 1 mM, lisozim 0.25 mg/mL) fred per cada litre de cultiu.

Expressió de proteïnes recombinants en *Pichia pastoris*

A partir d'una colònia aïllada es van inocular 5 mL de YPD amb els antibiòtics pertinents i es va deixar tota la nit a 28°C i 250 rpms. El dia següent, amb 5 mL de cultiu saturat, es va inocular 1L de BMGY, ampicil·lina 100 µg/mL, zeocina 100 µg/mL i es va fer créixer 48h a 28°C i 250 rpms. A les 24h es van afegir 100 mL de glicerol 10% per a substituir la font de glucosa que havia estat consumida. Amb aquest pas es van assolir uns elevats nivells de biomassa, els quals, van permetre augmentar els nivells d'expressió proteica. Passades les 48h, els cultius es van centrifugar a 5500 g durant 15 min i temperatura ambient en condicions estèrils. El pellet es va resuspendre amb 100 mL de medi BMMY (amb metanol 0.5% en lloc de glicerol) i es va incubar durant 72h a 28°C i 250 rpms. Per tal que els nivells de metanol romanguessin, més o menys, constants, cada 24h es van afegir 0.5 mL de metanol pur. Amb això es compensa la disminució de la concentració, deguda al possible consum per part de l'organisme i a l'evaporació.

Purificació de proteïnes

A partir d'aquest pas, la purificació de proteïnes provinents de *E. coli* i *P. pastoris* és diferent pels diferents scFvs. Mentre que el VVK08 s'expressa a la fracció soluble, l'scFv-h3D6 i el VVA09 s'expressen en forma de cossos d'inclusió a la fracció insoluble.

- a. scFv-h3D6 i VVA09: El pellet de cèl·lules resupès en tampó de lisi (40 mL per litre de cultiu) es va sotmetre a 4 cicles de congelació-descongelació i a dues rondes de sonicació de 5 minuts, amb franges de 1 segon i freqüència del 35%. Les cèl·lules homogeneïtzades es van centrifugar 30 min a 40000 g i 4°C. El pellet es va deixar resuspendre tota la nit amb tampó de solubilització (Tris-HCl 100 mM, GSH 10 mM, pH 8.5, Urea 8 M) en un agitador orbital a 4°C. Una vegada solubilitzat el pellet, es va centrifugar per descartar aquelles proteïnes encara insolubles en el tampó de solubilització i la proteïna que va quedar solubilitzada al sobrenedant es va sotmetre a un procés de

replegament, diluïnt 1:10 en tampó de *refolding* (Tris-HCl 100 mM, L-arginina 100 mM, GSSG 0.15 mM, pH 8.5) durant 36h i 4°C (219). Quan el procés de replegament va acabar, la mostra es va concentrar i dialitzar contra Na₂HPO₄ 5 mM, pH 6.5. L'scFv-h3D6 i el VVA09 van ser sotmesos a una cromatografia d'intercanvi catiònic o aniònic, respectivament (Resource S o Resource Q column; GE Healthcare, EEUU) seguida d'una cromatografia d'exclusió molecular (Hiload 26/60 Superdex 75 column; GE Healthcare, EEUU) en PBS, pH 7.4. La puresa de les proteïnes es va avaluar mitjançant SDS-PAGE i espectrometria de masses. Finalment, la proteïna pura es va aliquotar, congelar amb nitrogen líquid i es va guardar a -80°C fins al seu ús.

- b. VVK08: Després de sonicar, sota les mateixes condicions que en el subapartat anterior, el lisat cel·lular es va ultracentrífuga a 100000 g durant 1h i 4°C en una ultracentrífuga Optima L-100XP (Beckman Coulter, EEUU) i el sobrenedant es va incubar amb 5 µL de DNasa (New England Biolabs, EEUU) a temperatura ambient durant 30 minuts. Després, la proteïna es va precipitar per salat mitjançant sulfat d'amoni (65%, w/v) durant tota la nit a 4°C. El dia següent, la mescla es va centrifugar 1h a 40000 g i 4°C, es va resuspendre el pellet i es va dialitzar durant tota la nit contra Tris-HCl 10 mM, pH 7.4 a 4°C. Després de la preparació prèvia, la mostra es va sotmetre a una columna d'intercanvi aniònic (Resource Q column; GE Healthcare, EEUU). Les mostres es van analitzar mitjançant SDS-PAGE i les fraccions d'interès es van ajuntar i carregar en una cromatografia de gel-filtració (Hiload 26/60 Superdex 75 column; GE Healthcare, EEUU) en PBS, pH 7.4. De nou, es va verificar la presència de la proteïna d'interès i aquelles fraccions susceptibles de contenir la proteïna es van ajuntar i dialitzar contra Bis-Tris 10mM, pH 6. Finalment, es va realitzar una cromatografia d'intercanvi aniònic amb tampó Bis-Tris 10 mM, pH 6, la proteïna es va ajuntar, dialitzar a PBS, pH 7.4, i congelar a -80°C fins al seu ús.

- c. scFv-h3D6: *P. pastoris* amb el gen d'interès i el pèptid senyal inserit en el seu genoma, expressa la proteïna recombinant a l'espai extracel·lular. Per tant, el procés de purificació va ser més senzill. Una vegada recuperat el sobrenedant, format per el medi d'inducció i la proteïna d'interès, es va realitzar una precipitació per salat amb 65% (w/v) de sulfat d'amoni. Després, es va incubar 18h a 4°C, es va centrifugar 1h a 40000 g i es va resuspendre el pellet. La mostra es va dialitzar contra Na₂HPO₄ 5 mM, pH 6.5 i es va realitzar una cromatografia d'intercanvi catiònic seguit d'una gel-filtració en PBS, pH 7.4. La proteïna es va concentrar, congelar amb nitrogen líquid i guardar a -80°C fins al seu ús.

Expressió i purificació d'anticossos monoclonals (m3D6)

L'anticòs monoclonal mAb-h3D6 és conegut comercialment com a bapineuzumab. Degut a clàusules impossibles d'assumir per a la Universitat Autònoma de Barcelona que requerien les empreses Pfizer i Janssen (copropietàries del bapineuzumab) es va descartar utilitzar l'anticòs monoclonal humanitzat. Per altra banda, va ser possible comprar a l'ATCC (de l'anglès *American Type Culture Collection*) l'hibridoma de l'anticòs m3D6 (clon RB96 3D6.32.2.4, PTA-5130, ATTC). Aquest anticòs és la versió no humanitzada del bapineuzumab. Un hibridoma és el resultat de la fusió entre una cèl·lula de limfòcit B de ratolí, capaç de produir un anticòs monoclonal, amb una cèl·lula tumoral de mieloma (càncer de limfòcits B). D'aquesta manera, s'aconsegueix la immortalització de la cèl·lula productora d'anticossos i, a la vegada, l'expressió de grans quantitats de l'anticòs en qüestió de manera continuada/sostinguda en el temps.

El manteniment i emmagatzematge de l'hibridoma, així com l'expressió i purificació del mAb-m3D6 va ser realitzat pel Servei de Cultius cel·lulars, producció d'Anticossos i Citometria (SCAC) de la UAB. El protocol exposat a continuació s'ha extret d'un informe facilitat pel responsable de la unitat de producció d'anticossos, el Dr. Antoni Iborra.

El primer pas del procés va consistir en la descongelació i expansió del cultiu cel·lular. Per això, el criovial que contenia l'hibridoma es va submergir durant 1 min a 37°C i s'hi va afegir 10 mL de medi DMEM W/Glutamax (de l'anglès *Dulbecco's Modified Eagle's Medium glutamate supplemented*, Gibco, EEUU) sense sèrum fetal, per tal de reduir la toxicitat del DMSO utilitzat com a crioprotector. Seguidament, es van centrifugar les cèl·lules durant 5 min a 200 g i, després de retirar el sobrenedant, es van resuspendre les cèl·lules en medi DMEM, 10% FCS (de l'anglès *fetal calf sèrum*, Life Technologies, EEUU). Mitjançant una cambra de Neubauer es van quantificar les cèl·lules vives (que no van integrar al seu citosol el colorant blau tripà) i, inicialment, es van cultivar a una concentració de 10^6 cèl·lules/mL. Per tal d'expandir el cultiu, i donat que inicialment hi havia un reduït nombre d'hibridomes viables, es va començar amb una placa de 24 pous i es va escalar el cultiu fins a un flascó T75 (75 cm²), renovant el medi cada 3 dies.

Per tal de millorar la productivitat, el cultiu es va inocular en un bioreactor Cell Line 350 (VWR, EEUU). Aquest bioreactor consta de dues parts separades per una membrana porosa. A la part externa es troba el medi de cultiu sense sèrum fetal que serveix com a font de glutamina, aminoàcids i sals, així com metabòlits derivats de les cèl·lules. Per altra banda, a la part interna, s'hi localitzen els hibridomes en medi DMEM i a on al llarg del procés d'expressió, s'hi acumula l'anticòs secretat. La membrana porosa, permet que l'anticòs quedi concentrat a la part interna del reactor, ja que degut al seu elevat pes molecular, no pot travessar la membrana. Cada 7 dies, va ser necessari canviar el medi extern així com avaluar l'estat de les cèl·lules. Per tal de recuperar l'anticòs monoclonal, es van centrifugar les cèl·lules 5 min a 200 g, es van resuspendre en medi DMEM fresc i es van tornar a inocular en el bioreactor. El sobrenedant es va centrifugar 5 min a 1000 g i es va congelar a -20°C fins a la purificació final dels anticossos.

Per a la purificació dels anticossos es va utilitzar una columna de proteïna A (HiTrap MAb select, GE Healthcare, EEUU) en un sistema BioLogic LP (*low-*

Materials i Mètodes

pressure chromatography System, BioRad, EEUU). El primer pas, després de descongelar la mostra, va ser diluir la mostra en tampó d'unió a la columna (20 mM Na₂HPO₄, pH 7) i es va aplicar la mostra a un flux de 1 mL/min. Una vegada l'anticòs es trobava unit a la columna, es va eluir mitjançant el tampó d'elució (100 mM Glicina, pH 3). Per tal de neutralitzar l'acidesa del tampó d'elució, es van recollir fraccions de 900 µL en tubs que contenien 100 µL de tampó amortidor (1M Tris-HCl, pH 9), aconseguint un pH final proper a 7.2. Finalment, es van ajuntar les fraccions i es van congelar aliquidades a -20°C fins al seu ús.

scFvs expressats

Per tal de poder discutir alguns aspectes dels resultats i entendre algunes de les condicions experimentals, a continuació es detallen les característiques de la seqüència de les proteïnes amb les quals s'ha treballat.

VVK08

MGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYD
ASNLETGVPSRFRSGSGSGTDFFTISSLQPEDIATYYCQQYDNLPTYTFGQGT
KLEIKRTGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCQASQDIS
NYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFRSGSGSGTDFFTISSLQPED
IATYYCQQYDNLPTYTFGQGTKLEIKRT

En verd es marquen els residus de cisteïna que formarien els ponts disulfur i en gris els residus de triptòfan.

Segons el programa ProtParam de l'Expasy el pes molecular del VVK08 és de 25182,7 Da i el punt isoelèctric (pI), 4.80. El coeficient d'extinció molar teòric a 280 nm i assumint que els ponts disulfur es troben formats seria de 32110 M⁻¹·cm⁻¹.

VVA09

MGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTTITCQASQDINNYLIWYQQKPGQAPKLLIYD
ASTLETGVPSRFRSGSGSGTEFTFTISSLQPEDLATYHCQQYDNLPTYTFGQGT

KLEIKRTGGGGSGGGSGGGSDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDIN
NYLIWYQQKPGQAPKLLIYDASTLETGVPSRFSGSGSGTEFTFTISSLPED
LATYHCQQYDNLPHYTFGQGTKLEIKRT

En verd es marquen els residus de cisteïna que formarien els ponts disulfur i en gris els residus de triptòfan.

Segons el programa ProtParam de l'ExPASy el pes molecular del VVA09 és de 25184.76 Da i el pI 4.83. El coeficient d'extinció molar teòric a 280 nm i assumint que els ponts disulfur es troben formats seria de $29130 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

h3D6

MEVQLLESGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVASI
RSGGGRTYYSDNVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRYPDHY
GSSDYWGQGTLLVTVSSGGGGSGGGGSDVVMTQSPLSLPVTPEPASI
SCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPQRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGG
TDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTDFPRTFGQGTKVEIK

En verd es marquen els residus de cisteïna que formarien els ponts disulfur i en gris els residus de triptòfan.

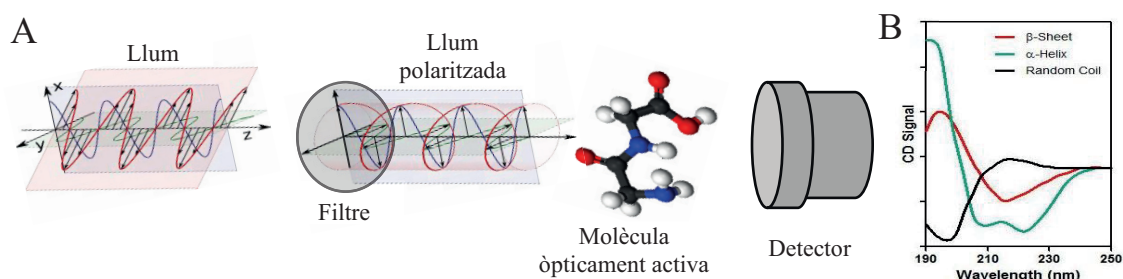
Segons el programa ProtParam de l'ExPASy el pes molecular de l'scFv-h3D6 és de 26273.21 Da i el pI 8.28. El coeficient d'extinció molar teòric a 280 nm i assumint que els ponts disulfur es troben formats seria de $47120 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Tot i així, el coeficient d'extinció molar es va determinar experimentalment i va ser de $39109 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (220).

Caracterització de proteïnes

Dicroisme circular

El dicroisme circular (CD, de l'anglès *circular dichroism*) és una tècnica de baixa resolució que s'utilitza principalment per a la determinació de l'estructura secundària de proteïnes i, alhora, per determinar la seva estabilitat. A més, es pot utilitzar per a estudiar la interacció de proteïnes (221). El dicroisme circular

es defineix com la absorció diferencial de la llum polaritzada cap a la dreta o cap a l'esquerra. Un raig de llum té sempre associat un camp magnètic i un camp elèctric que oscil·len de manera perpendicular en diversos plans de manera aleatòria, però si la llum es troba polaritzada, pel pas a través d'un filtre o d'un prisma, el camp elèctric oscil·la en un mateix pla a mesura que avança. En el dicroisme circular, les ones del camp elèctric que formen la llum roten de manera perpendicular a la direcció del moviment en el sentit de les agulles del rellotge o en el contrari. Quan aquesta llum interacciona amb una molècula òpticament activa, aquesta pot absorbir de manera diferencial la llum polaritzada a la dreta o a l'esquerra (**Figura M-3A**) (214). En el cas de l'estructura secundària de les proteïnes, s'han establert corbes canòniques (**Figura M-3B**), per exemple, les hèlix α presenten mínims a 222 nm i 208 nm així com un màxim a 193 nm (222), les fulles β antiparal·leles, per altra banda, presenten un mínim a 218 nm i un màxim a 195 nm (223) i, finalment, les proteïnes desestructurades, riques en *random coil*, presenten molt poca el·lipticitat a 210 nm i un mínim a 195 nm (224). A més, la presència de residus aromàtics i de ponts disulfur dins de la seqüència aminoàcida pot afectar bastant als espectres de CD per sota dels 260 nm (225).



Les mostres es van diluir a 20 μM en PBS, pH 7.4 i es van col·locar en una cubeta de quars de 0.2 cm. Els espectres es van adquirir escanejant la mostra entre els 260 i els 190 nm en un espectropolarímetre J-815 (JASCO, Japó). Es van recopilar 20 acumulacions i les mesures es van prendre cada 0.1 nm a una velocitat de escaneig de 50 nm/min amb un temps de resposta de 4 segons i amplada de banda de 3.41 nm. Qualsevol contribució del tampó es va sostreure de l'espectre de CD.

La desnaturalització tèrmica es va monitoritzar mitjançant el canvi en la el·lipticitat a 218 nm (mínim de la fulla β) entre els 4°C i els 95°C, a una velocitat de 1°C/min i amb mesures cada 0.1 °C. També es va mesurar la renaturalització des de 95°C fins a 4°C després del seguiment del procés de desnaturalització. Paral·lelament, es van realitzar espectres de CD a temperatures concretes on el estats natiu, intermediari i renaturalitzat estan més poblats (4°C, 47°C, 95°C i finalment a 4°C de nou).

Espectroscòpia de fluorescència

Un compost fluorescent absorbeix llum dins un rang de longitud d'ona característic per a aquest compost, i l'absorció d'aquesta radiació causa que els electrons que el conformen passin a un estat major d'energia, és a dir, que s'excitin. L'electró excitat, al tornar al seu estat basal d'energia emet aquest excés en forma de fotons, en un procés anomenat relaxació, el qual dona lloc al fenomen anomenat fluorescència. El rang de longitud d'ona que provoca aquesta excitació es coneix com espectre d'excitació i el rang de longitud d'ona al qual s'emet la radiació després de la relaxació s'anomena espectre d'emissió (226).

Els residus aromàtics són una eina molt útil per a l'estudi i monitorització de l'estructura terciària de les proteïnes. Tots els dominis V_L contenen un triptòfan a la posició 35 altament conservat. Aquest triptòfan es troba enterrat en el nucli hidrofòbic de les immunoglobulines. La fluorescència intrínseca d'aquest residu es troba apantallada pel pont disulfur, el qual, en la conformació nativa, es troba molt pròxim al residu Trp35. Generalment, el màxim d'emissió del

Trp35, en la conformació nativa, es troba prop dels 240 nm, mentre que en la conformació desplegada, aquest màxim es desplaça cap als 255 nm degut a l'exposició del residu al solvent.

Les mostres, a una concentració de 20 μM en PBS, pH 7.4, es van introduir en una cubeta de quars de 1 cm de pas òptic i es van excitar a una longitud d'ona de 275 nm (finestra de 5 nm) utilitzant un fluorímetre Varian Cary Eclipse (Agilent Technologies, EEUU). Els espectres d'emissió es van recollir des de 300 fins a 400 nm (finestra de 5 nm) i es van realitzar 5 acumulacions, recollint dades cada 0.5 nm a una velocitat de 50 nm/min.

La desnaturalització i la renaturalització tèrmica es van seguir a través del canvi del nivell de fluorescència a 335 nm (màxim d'emissió en l'estat natiu; finestra de 10 nm) respecte a la temperatura (4-95°C). Les mesures es van recollir cada 0.1°C i es va incrementar la temperatura 1°C/min. Els espectres d'emissió de fluorescència es van prendre a 4°C, a 95°C i finalment, després de la renaturalització, a 4°C de nou.

Desnaturalització química

La desnaturalització química es va realitzar amb concentracions creixents d'urea on es va afegir la proteïna problema a una concentració final de 2 μM . Les mostres es van equilibrar durant tota la nit a 4°C abans de mesurar la fluorescència a 4°C per mitjà d'un fluorímetre Varian Cary Eclipse. L'excitació i l'emissió es van realitzar com en l'apartat anterior. El màxim de cada espectre d'emissió es va obtenir a l'ajustar (en anglès *fitting*) cada espectre a una equació polinòmica d'ordre quatre. La concentració d'urea de cada mostra es va mesurar mitjançant un refractòmetre de mà. Els paràmetres de la desnaturalització es van calcular per a cada concentració d'urea ([denat]) utilitzant l'equació següent:

$$f = \frac{(F_N + a \cdot [\text{denat}] + (F_U + b \cdot [\text{denat}]) \exp \frac{m \cdot [\text{denat}] - \Delta G_{H_2O}}{RT}}{1 + \exp \frac{m \cdot [\text{denat}] - \Delta G_{H_2O}}{RT}}$$

Equació 3. Equació dels paràmetres en l'equilibri per a un desplegament en dos estats. On es té en compte la dependència de la fluorescència intrínseca segons la concentració de desnaturalitzant, tant en l'estat natiu com en el desnaturalitzat, pels termes a [urea] i b [urea], respectivament (aproximació lineal). Amb aquest tipus d'anàlisi s'assumeix un model en dos estats.

Reflectància total atenuada

La radiació infraroja emprada, al ser absorbida per una mostra proteica genera la vibració dels enllaços covalents de les proteïnes que diferencia fins a 9 bandes d'amida, on la principal és la banda d'amida I, entre els 1700 i 1600 cm^{-1} . La freqüència de vibració de l'amida I és deguda al grup carbonil (C=O) de cada enllaç peptídic i la intensitat depèn de la conformació de l'esquelet polipeptídic que defineix l'estructura secundària. La reflectància total atenuada (ATR, de l'anglès *attenuated total reflectance*) és una tècnica de baixa resolució que permet determinar l'estructura secundària de les proteïnes, però, a diferència del CD, permet discernir entre fulla β nativa, WL i amiloide, doncs permet la diferenciació entre diferents estats d'empaquetament. Està àmpliament estudiat que les proteïnes amb tendència a l'agregació adopten estructures riques en fulla β i que durant el procés d'agregació el màxim de l'espectre de l'amida I es desplaça cap a menors números d'ona degut a l'increment en el número de ponts d'hidrogen i/o al major nombre de fulles β i/o de la seva longitud (227).

Els espectres d'absorció es van adquirir amb un espectròmetre d'infraroig Varian Cary 660-FTIR (Agilent Technologies, EEUU) equipat amb l'accessori PIKE Technologies ATR. Aquest últim estava equipat amb un cristall de diamant i funcionava amb òptiques de reflexió úniques. Les mostres, a una concentració de 80 μM , es van assecar amb nitrogen gasós i es van mesurar en el rang de 4000-1000 cm^{-1} , amb una resolució de 2 cm^{-1} i fent la mitjana de 250 escaneigs. Amb l'objectiu d'estudiar la via d'agregació de les proteïnes, els espectres es van prendre a proteïnes equilibrades a temperatura ambient i a proteïnes incubades 10 min a 60°C. Els anàlisis subsequents es van realitzar

amb el programa Galactics Industries “GRAMS/32” (Thermoscientific, EEUU). Es va aplicar una correcció de la línia base utilitzant l'espectre del tampó com a blanc i les dades es van deconvular en el rang de l'amida I ($1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$) utilitzant una amplada de banda de 18 i un factor d'apodització (K) de 2.

Microscòpia electrònica de transmissió

La microscòpia electrònica és un tipus de microscòpia que utilitza un feix d'electrons per a crear la imatge. Degut a la mida dels electrons, permet una major magnificació i un poder resolutiu major que la que pot arribar la microscòpia que utilitza llum. La microscòpia electrònica de transmissió (TEM, de l'anglès *transmission electron microscopy*) genera un feix d'electrons d'alt voltatge a partir d'un càtode. El feix d'electrons es dispara contra un material que és semipermeable al pas dels electrons, la variació dels quals es magnifica per una sèrie de lents magnètiques i finalment és enregistrada al xocar contra una pantalla fluorescent, una placa fotogràfica o un sensor sensitiu com una càmera CCD (de l'anglès *charge-coupled device*). Quan es realitza la TEM és necessària la tinció negativa de les mostres. Aquesta tinció és bàsicament un marcatge que envolta la mostra problema i que és menys permeable als electrons que la mostra en sí. Per tant, l'agent emprat per tenyir generarà una major desviació dels electrons, els quals seran filtrats per l'objectiu. Depenent de l'obertura de l'objectiu (a menor obertura la quantitat d'electrons que entren a l'objectiu serà menor) i per tant determinarà el contrast i la resolució de les imatges (228).

En aquest treball la TEM va permetre confirmar la presència de fibres amiloides i WL. Cinc μL de mostra a $100\ \mu\text{M}$ es van dipositar sobre unes reixetes (*400 mesh glow-discharge carbon-coated grid*). L'excés de líquid es va retirar i es van realitzar dos rentats amb $5\ \mu\text{L}$ de ddH₂O. Després, es va realitzar la tinció negativa amb $5\ \mu\text{L}$ d'acetat d'uranil 1% durant 2 minuts, es va retirar l'excés de líquid i es va deixar assecar. Finalment, les reixetes es van dipositar en un microscopi electrònic de transmissió JEM 1400 (Jeol, Japó) a 120 kV. Amb

l'objectiu d'estudiar la naturalesa de les fibres que generen les diferents proteïnes problema, es van prendre micrografies de les proteïnes equilibrades a temperatura ambient, incubades 15 minuts a 60°C i a 95°C i incubades 24 i 96 h a 37°C.

Espectrometria de masses

L'espectrometria de masses és una tècnica analítica molt versàtil en la qual el compost problema s'ionitza i es mesura la relació entre la massa i la càrrega (m/z). En el MALDI (de l'anglès *matrix-assisted laser-desorption-ionization*), els pèptids es converteixen en ions per l'addició o pèrdua d'un o més protons. Per a aquest tipus d'anàlisi, la mostra es prepara o bé barrejant-la amb un compost orgànic (matriu) o bé dipositant-la sobre ell i deixant-la assecar. D'aquesta manera, es cristal·litza aquesta matriu, atrapa la mostra i, mitjançant un làser, s'ionitza. Seguidament, els pèptids protonats es fan accelerar a través d'un potencial i es separen segons la relació m/z . Per exemple en el MALDI-TOF (de l'anglès *time of flight*) els diferents ions són accelerats mitjançant un potencial elèctric i cada un d'ells trigarà un temps determinat en recórrer el tub de vol que permetrà determinar la m/z . Així, l'espectrometria de masses permet, entre d'altres coses, conèixer la massa molecular de la nostra proteïna, així com a identificar una proteïna problema per mitjà del PMF (de l'anglès *protein mass fingerprinting*), on la proteïna d'interès primer de tot es talla de manera específica amb una proteasa i seguidament es realitza el MALDI-TOF, el qual determinarà la massa dels diferents pèptids i permetrà comparar amb una base de dades quins pèptids hauria de generar la seqüència problema. En aquesta tesi, els experiments d'espectrometria de masses van ser realitzats tant pel servei de proteòmica SePBioES, com al laboratori de proteòmica CSIC-UAB.

Estudis in vivo

Animals

El model murí triple transgènic de la malaltia d'Alzheimer (3xTg-AD), que conté els transgens de la *PS1_{M146V}*, la *APP_{Swe}* i la *tau_{P301L}*, va ser inicialment

dissenyat i obtingut a la Universitat de Califòrnia, EEUU (166). Tant la colònia de 3xTg-AD com el corresponent control no transgènic (NTg) amb el mateix fons genètic (B6129SF2) van ser comprats a Jackson Laboratory (Bar Harbour, USA) i criats al Servei d'Estabulari de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB, Espanya). Es va realitzar l'experiment només amb femelles ja que, contràriament als mascles de la mateixa soca, conserven el fenotip descrit originalment (229) i presenten una patologia similar a la de l'AD més exacerbada (230). A més, la incidència d'AD s'ha reportat major en dones que en homes (231). Els ratolins 3xTg-AD presenten deposició progressiva d'A β , amb detecció intraneuronal als 3 mesos d'edat i deposicions extracel·lulars als 6 mesos, essent possible detectar agregats de tau als 12. L'afectació cognitiva es pot arribar a detectar als 4 mesos, juntament amb alteracions en la memòria a llarg termini (166,167). Per aquest model no s'han descrit alteracions físiques i la mitjana d'esperança de vida és de 386.9 ± 161.2 dies (~13 mesos) per als mascles i 517.1 ± 197.1 dies (~17 mesos) per a les femelles (232). Els animals es van mantenir en grups de cinc, amb el mateix genotip i sexe en caixes Makrolon de 35cm x 35cm x 25 cm a una temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, amb una humitat relativa del $55 \pm 5\%$, cicles de llum-fosc de 12h començant a les 08:00h i menjar i aigua *ad libitum*.

Per altra banda, els ratolins APP23 (B6.Cg-Tg(Thy1-APP)3Somm/J) i el corresponent control amb el mateix rerefons genètic (C57BL/6) es van adquirir de Jackson Laboratory (Bar Harbour, USA) i es van estabular al servei d'estabulari de l'Institut de Recerca de Vall d'Hebron en les mateixes condicions que els ratolins estabulats a la UAB.

Disseny experimental i anàlisi estadística

Per a la segona secció de l'apartat de resultats, 10 ratolins femelles 3xTg-AD de 22 mesos d'edat es van distribuir aleatòriament en dos grups experimentals ($n = 5$), triple transgènic no tractat (3xTg-AD PBS) i triple transgènic tractat (3xTg-AD h3D6). Alhora, es va fer un grup experimental de ratolins no transgènics no tractats (NTg), constituït per 5 ratolins del mateix sexe i edat.

No es va incloure un grup de no transgènics tractats (NTg h3D6) principalment per dos motius. Primer de tot perquè estudis previs del grup ja han demostrat que el tractament amb scFv-h3D6 és segur tant per als ratolins NTg com per als 3xTg-AD. I segon, perquè els beneficis observats del tractament per als NTg mai han arribat a la significança i, per tant, no s'esperava que fos diferent en ratolins vells. El tractament es va administrar intraperitonealment (IP) cada 3 dies amb 200 µg d'scFv-h3D6 (~6.6 mg/kg) diluïts en 200 µL de PBS, pH 7.4, o amb 200 µL de PBS, pH 7.4 (anomenats com a no tractats per a major claredat) durant 15 dies. Aquesta pauta d'administració i dosi correspon a un tractament agut respecte a estudis anteriors, on es van administrar dosis a la meitat de concentració i per diferents períodes de temps: una sola dosi a ratolins de 5 mesos d'edat (111,203,233,234), tractament setmanal durant 6 setmanes començant a l'edat de 4.5 mesos (200), i un tractament mensual durant 7 mesos (201).

Per a la tercera secció de l'apartat de resultats, 18 ratolins APP23 de 27 mesos d'edat es van distribuir en 3 grups (n=6) amb el corresponent grup de NTg del mateix sexe i edat (n=6) com a referència per les condicions no patològiques. Sembla ser que no existeixen diferències entre ratolins APP23 mascles i femelles pel que fa a la freqüència i severitat de la CAA. Els ratolins NTg-PBS i APP23-PBS van rebre dues dosis de 200 µL de PBS. El grup APP23-mAb va rebre dos tractaments de 200 µL de mAb-m3D6 en PBS a una concentració de 4.5 mg/mL, el que correspondria a una dosi de 12.4 mg/Kg. El grup APP23-scFv va rebre dos tractaments de 200 µL a una concentració de 1.5 mg/mL d'scFv-h3D6 en PBS, el que correspon a una dosi de 4.1 mg/kg. La relació entre ambdues dosis és de 3 a 1, però representa una relació equimolar en termes de paràtops, doncs es considera la proporció entre la massa molecular de la molècula d'scFv (25 kDa) i els mAbs (150 kDa), així com el fet que els scFv tenen un paràtop i els mAbs dos. Els ratolins es van sotmetre a 3 sessions de MRI, la primera abans del primer tractament, la segona 24h després i la tercera 24h després de la segona administració, la qual es va produir 5 dies després de

la primera administració (aquest interval es va decidir a partir de la farmacocinètica de l'scFv-h3D6 (235)). Els ratolins es van eutanasiar i els cervells es van processar, una meitat per a histologia i l'altre hemisferi es va congelar en N₂ líquid per a posteriorment obtenir els extractes per als tests bioquímics.

Tots els experiments es van portar a terme en acord als requeriments del Comitè d'Ètica en Experimentació Animal i Humana de la UAB (CEEAH 0661) i per la Generalitat de Catalunya.

Les diferències estadístiques entre els grups es van avaluar per mitjà del test no paramètric Kruskal-Wallis. En els anàlisis de comparació dos a dos es va emprar el test de Mann-Whitney. Els valors dels *boxplots* s'expressen en medianes, màxims i mínims. Un p-valor ≤ 0.05 es van considerar estadísticament significants. Un p-valor entre 0.051 i 0.100 es va considerar una tendència (236). El test mida de l'efecte dels grups (*effect size*) es va determinar mitjançant el càlcul dels coeficients de la correlació biserial amb l'ús de la fórmula de Wendt:

$$r = 1 - \left(\frac{2U}{n_1 n_2}\right)$$

Equació 4. Coeficient r de Wendt on U és l'estadístic de Mann-Whitney, i n_1 i n_2 les mides de les mostres que es comparen. El valor r expressa la diferència entre la proporció de parells que donen suport a la hipòtesi, menys la proporció de parells que no.

Per una $n_1 = 5$ i $n_2 = 5$ el valor mínim de r per a considerar una significança, amb un p-valor entre 0.05 i 0.1, és 0.68. Per una $n_1 = 6$ i $n_2 = 6$ el valor mínim de r per a considerar una significança, amb un p-valor entre 0.05 i 0.1, és 0.61 (237). Cal destacar el fet que mantenir amb vida 10 ratolins femella 3xTg-AD fins als 22 mesos d'edat i 18 ratolins APP23 fins als 27 mesos d'edat és tot un repte. Els anàlisis estadístics i els gràfics es van realitzar amb el programa Graphpad Prism v6 (GraphPad Software, EEUU).

Homogeneïtzació de teixits

Una hora després de la darrera administració, els animals van ser anestesiats utilitzant un 1% d'isofluorà en aire (Esteve, Espanya) i van ser eutanasiats per mitjà de decapitació. Aquest període d'una hora va ser establert per mitjà d'experiments farmacocinètics de l'scFv-h3D6 en el model triple transgènic d'AD (235). Els cervells van ser immediatament extrets dels cranis i submergits en PBS fred, després pesats i finalment disseccionats. Un dels hemisferis es va separar ràpidament i es va tractar per a histologia. Primer es va fixar per immersió en 4% paraformaldehid (PFA) en PBS, pH 7.4 durant 48h. Passat aquest període de temps les mostres es van incloure en parafina, per després fer seccions seriadades de 10 µm de gruix en el pla coronal i, finalment, les seccions van ser muntades en portaobjectes Superfrost™ Plus (Thermo Fisher Scientific, EEUU). Les àrees disecionades (còrtex cerebral i hipocamp) de l'hemisferi que no van ser tractades per a histologia es van homogeneïtzar mecànicament amb un homogeneïtzador de teixit (Sigma-Aldrich Química SL, EEUU) utilitzant TBS fred (pH 7.6) suplementat amb un còctel d'inhibidors de proteases i fosfatases (Roche Diagnostics, Suïssa). Després d'una sonicació breu (1 cicle de 35 s, al 35% de freqüència en un sonicador Dynatech Sonic Dismembrator ARTEK 300 (Biologics Inc, EEUU)), les mostres es van centrifugar durant 1h a 100000 g i 4°C. El sobrenedant es va etiquetar com a fracció TBS-soluble. El pellet es va resuspendre amb el mateix tampó TBS fred amb còctel d'inhibidors, però també amb 2% SDS. Es van repetir els passos de sonicació i centrifugació en les mateixes condicions i el sobrenedant es va etiquetar com a fracció SDS-soluble. Finalment, el pellet es va resuspendre amb 70% d'àcid fòrmic i després del cicle de sonicació i centrifugació el sobrenedant es va assecar tota la nit en un concentrador de buit Savant SpeedVac (Thermo Fischer Scientific, EEUU). L'extracte d'àcid fòrmic es va resuspendre amb DMSO i es va etiquetar com a fracció FA-soluble. Totes les fraccions es van guardar immediatament a -80°C fins al seu ús.

Immunohistoquímica (IHC)

Les seccions histològiques es van desparafinar per immersió dues vegades en xilè durant 5 min i rehidratar en dilucions d'alcohol seriades. Concretament, es va començar amb 2 rentats de 3 min en alcohol absolut, 2 rentats de 3 min en 96% alcohol, 1 rentat de 2 min en 70% etanol, i, finalment, 1 rentat de 5 min en ddH₂O. L'activitat de la peroxidasa endògena es va bloquejar per immersió durant 10 minuts en 3% H₂O₂ en metanol pur. La exposició dels antígens es va realitzar per immersió en tampó 0.01 M citrat, pH 6, suplementat amb 0.1% Tween-20 (Sigma, EEUU) a 96°C durant 20 min i després es van refredar les mostres amb PBS-T (PBS, pH 7.4, 0.1% Tween-20) i es van incubar en tampó de bloqueig (PBS-T, 5% *normal goat serum* (NGS, Sigma, EEUU), 5% albúmina sèrica bovina (BSA, Sigma, EEUU)) per evitar les unions no específiques dels anticossos emprats. Després, les mostres es van incubar durant tota la nit a 4°C amb l'anticòs primari corresponent (anticòs monoclonal de ratolí anti-tau humana, HT7, 1:100; i AT8, 1:50, anticòs monoclonal de ratolí anti-tau humana fosforilada (Ser202, Thr205), Thermo Scientific, EEUU). Després de la incubació amb l'anticòs secundari corresponent (*Mouse ExtrAvidin Peroxidase Staining Kit antibody*, Sigma; *anti-rabbit IgG BA-1000* i *streptavidin*, Vector Laboratories, EEUU), les mostres es van revelar utilitzant 3-3' Diaminobenzidina (DAB, Sigma, EEUU). La solució de DAB contenia 100 mg de DAB, 1 tableta de TBS i 120 µL de peròxid d'hidrogen al 3% per 15 mL de ddH₂O. Per a rentar i inactivar el DAB, es va realitzar un rentat de 5 min amb aigua corrent. Finalment, per deshidratar les mostres es va realitzar el procés de desparafinat de manera inversa i es va muntar amb DPX (de l'anglès *Di-N-Butyle Phthalate in Xylene*), es va col·locar el cobreobjectes exercint pressió per eliminar possibles bombolles d'aire i es va deixar assecar.

Les imatges de camp clar es van obtenir per mitjà d'un microscopi Leica DMRB acoblat a una càmera Leica DFC 500 equipada amb una lent Leica PL Fluotar. Les seccions cerebrals corresponen al rang de coordenades de la Figura 43 (interaural 2.34 mm i Bregma -1.46 mm) i de la Figura 48 (interaural 1.74

mm i Bregma -2.06 mm) en el *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (238).

Western blot

Els nivells de tau i tau fosforilada van ser semiquantificats per mitjà de *western blot*. Per això, els gels d'acrilamida es van netejar 10 minuts a temperatura ambient amb tampó de transferència (Tris-HCl 25 mM, glicina 190 mM, metanol 20% (v/v), 0.1% SDS (w/v), pH 8.3). Després es va muntar el sandvitx de transferència i es va deixar transferir durant 2h a 4°C i 300 mA. Una vegada la transferència va finalitzar, les membranes de PVDF es van netejar amb TBS-T i incubar amb tampó de bloqueig (TBS-T, 3% llet desnatada en pols). Després, les membranes es van incubar durant tota la nit a 4°C amb l'anticòs primari corresponent (HT7, 1:100; AT8, 1:50 (Thermo Fisher Scientific, EEUU); i l'anticòs monoclonal de conill anti-gliceraldehid 3-fosfat deshidrogenasa, GAPDH, 1:20000 (Abcam, Regne Unit)). Després dels rentats, les membranes es van incubar 1h a temperatura ambient amb l'anticòs secundari (*goat peroxidase conjugated anti-rabbit*, 1:2000 (Bio-Rad, EEUU); i *goat peroxidase conjugated anti-mouse*, 1:2000 (Sigma, EEUU)). Finalment, el *western blot* es va visualitzar utilitzant una solució luminol/peroxidasa en una proporció 1:1 (*Clarity ECL Western Blot Substrate kit*, Bio-Rad, EEUU). Els anàlisis densitomètrics es van realitzar amb el programa ImageJ (NIH, EEUU) i els nivells d'intensitat de les diferents bandes es van normalitzar per la intensitat del control de càrrega GAPDH.

Enzime-linked immunosorbent assay (ELISA)

Els nivells de TNF α , IL-6, IL-1 β i IL-33 es van quantificar mitjançant ELISA, seguint el protocol recomanat pel fabricant (*Mouse DuoSet TNF α ELISA*; *Mouse DuoSet IL-6 ELISA*, RD Systems; *Mouse DuoSet IL-1 β ELISA*; *Mouse DuoSet IL-33 ELISA* (RD Systems, EEUU). Els resultats es van normalitzar per la quantitat de proteïna total en cada mostra (*Pierce BCA Protein Assay Kit*, Thermo Scientific, EEUU).

Imatges per ressonància magnètica (MRI)

Les adquisicions es van portar a terme en el servei de ressonància magnètica nuclear de la Universitat Autònoma de Barcelona i Centre d'Investigació Biomèdica en Xarxa-Bioenginyeria, Biomaterials i Nanomedicina (CIBER-BBN) (Cerdanyola del Vallès, Espanya), Unitat 25 de NANBIOSIS. Els experiments es van realitzar amb un escàner 7T Bruker BioSpec 70/30USR (Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Alemanya) equipat amb una bobina de volum linear de 72 mm com a transmissor i una bobina de superfície com a receptor.

Els animals van ser anestesiats (isofluorà 2% en 1 L/min d'oxigen) i introduïts en l'imant. Els animals es van mantenir anestesiats durant tota la sessió d'adquisició a través d'un con nasal, i tant la respiració (50-100 bpm) com la temperatura corporal ($37\pm 1^\circ\text{C}$) es van monitoritzar amb un sistema de control (SA Instruments, Stony Brook, Holanda) i la temperatura es va mantenir amb mànegues d'aigua integrades en el llit dels animals. Després de l'adquisició, les dades es van processar amb el programa ParaVision 5.1 (Bruker BioSpin GmbH, Ettlingen, Alemanya). La homogeneïtzació del camp magnètic es va realitzar abans de cada sessió i cada animal.

ARIA-H

Per tal de visualitzar els ARIA-H es van utilitzar imatges ponderades en T_2^* que cobrien tot el cervell. En concret, es van captar 30 seccions contigües de 0.5 mm de gruix (distància entre seccions de 0.1 mm) amb un camp de visió (FOV, de l'anglès *field of view*) = 1.92 cm x 1.92 cm, amb una mida de matriu (MTX) = 256 x 256 (**Figura M-4A**). Les imatges es van obtenir amb seqüències *Fast Low Angle Shot (FLASH)-gradient echo* amb TE/TR = 8 ms/500 ms, angle de rotació = 40° i NA = 8. Les lesions amb un diàmetre mínim de 150 µm es van considerar (número i volum normalitzat) (**Figura M-4B**). La presència de lesions es va controlar atentament per assegurar que cap es comptava dues vegades a través de les seccions consecutives. El volum de les lesions es va determinar emprant el programa ImageJ, mesurant l'àrea de cada lesió,

multiplicant-la per el gruix de la secció (500 μm) i normalitzant-la per la pèrdua de senyal relativa entre el senyal de la lesió i el senyal del teixit circumdant (**Figura M-4B**).

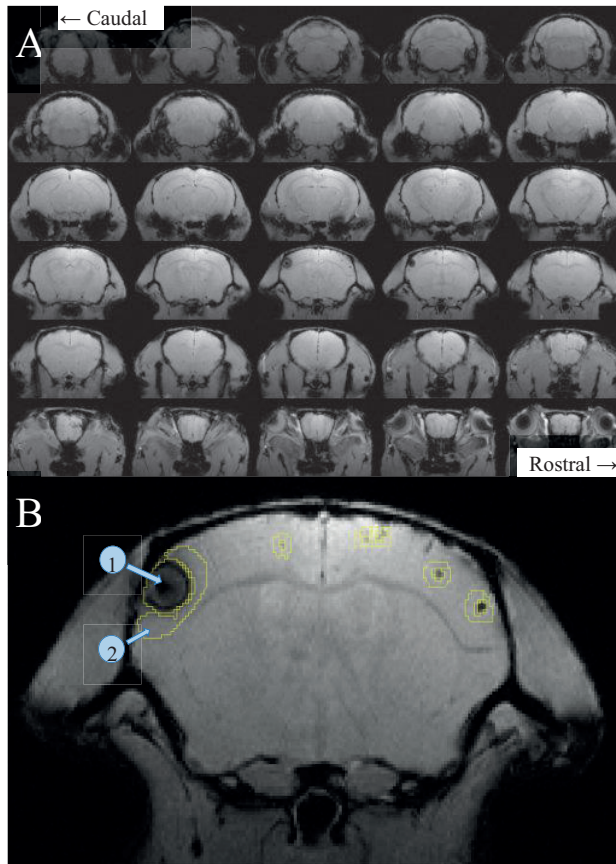


Figura M-4. Imatges ponderades en T_2^* del cervell. (A) Les 30 imatges del cervell preses per al recompte de les lesions ARIA-H. (B) Exemple de la quantificació de l'àrea i la intensitat de senyal de les lesions (1) i del senyal del teixit circumdant (2) per a la normalització del volum de les lesions. Cada píxel representa un requadre de $75 \times 75 \mu\text{m}$ i les lesions de $150 \mu\text{m}$ o més es van considerar.

ARIA-E

Les hiperintensitats detectades mitjançant FLAIR MRI van constituir la primera evidència de la presència d'ARIA-E en assajos clínics en fase 1 del bapineuzumab. Aquestes seqüències són bàsicament imatges ponderades en T_2

amb supressió de l'aigua ventricular. En assajos preclínic, el FLAIR no s'acostuma a emprar, degut als llargs temps d'adquisició necessaris i a la ineficiència en anul·lar completament l'aigua ventricular. En el seu lloc s'utilitzen imatges ponderades en T_2 . La informació es complementa amb la determinació del coeficient de difusió aparent (ADC), indicatiu d'ARIA-E. En aquesta tesi, les dades d'ADC es van extreure de l'adquisició del DTI utilitzant seqüències *diffusion segmented Echo Planar Imaging* amb *respiration gating* per a minimitzar els artefactes de moviment (TE= 28 ms, TR= 2600 ms, FOV= 1.92 cm x 1.92 cm, and MTX= 96 x 96). Es van adquirir 10 seccions contigües de 1 mm i per cada secció es van adquirir 5 imatges no ponderades en difusió ($b = 0 \text{ s/mm}^2$) i ponderades en difusió en 20 direccions de gradient de difusió diferents utilitzant 3 valors de b (200, 600 i 1000 s/mm^2) amb un temps de gradient de difusió de 5 ms i un temps entre gradients de 15 ms. Les imatges ponderades en difusió es van processar amb el programa ParaVision 5.1 per obtenir el tensor de difusió que proporciona els valors d'ADC com a mitjana de les principals difusivitats (λ_1 , λ_2 i λ_3). Finalment, els valors mitjos d'ADC es van obtenir de ROIs (de l'anglès *regions of interest*). Primer de tot aquestes ROIs van ser determinades manualment a partir de les imatges de DTI (**Figura M-5A**) del còrtex, de l'hipocamp i del teixit estriat de seccions corresponents des de la posició +3.14 mm a -4.92 mm, des de -1.28 mm fins -2.75 mm, i des de 1.64 mm fins -2.75 mm del Bregma (*The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (238)), respectivament, i després, traslladades a les imatges d'ADC (**Figura M-5B**) i als mapes de T_2 (**Figura M-5C**).

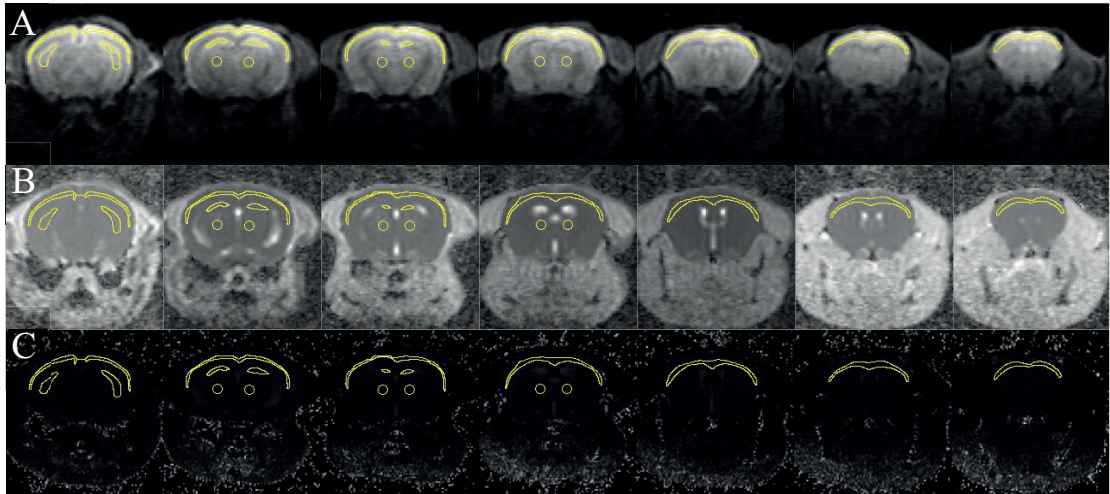


Figura M-5. Determinació de les ROIs per ADC i T₂. Es determinen les ROIs en les (A) imatges de DTI i després es trasllades a (B) les imatges d'ADC i als (C) mapes de T₂.

En aquest cas, per adquirir les imatges ponderades en T₂ que, posteriorment, van permetre obtenir el valor de T₂ dels diferents teixits, es va llençar una seqüència MSME (de l'anglès *Multi-Spin Multi-Echo*) amb la geometria exactament igual que a la seqüència de DTI. La resta de paràmetres utilitzats van ser: TR= 4000 ms; Nombre d'ecos= 18; primer TE= 10 ms; espaiat entre ecos= 10 ms; MTX =128 x 128, amb t_{Exp}= 6 min 24s.

Imatges per tensor de difusió (DTI)

El DTI també permet la detecció d'alteracions en la matèria blanca, específicament, un descens de l'anisotropia fraccional (FA, **Equació 3**) en el cos callós (CC) indica dany neurològic. A més, un descens de la difusivitat axial (λ_{\parallel} , **Equació 4**) es creu que pot estar associat al dany axonal i un augment de la difusivitat axial (λ_{\perp}) està associat al deteriorament de la mielina (212).

$$FA = \sqrt{\frac{(\lambda_1 - \lambda_2)^2 + (\lambda_2 - \lambda_3)^2 + (\lambda_1 - \lambda_3)^2}{2(\lambda_1^2 + \lambda_2^2 + \lambda_3^2)}}$$

Equació 5. Equació de l'anisotropia fraccional (FA). On λ_1 , λ_2 i λ_3 són els valors propis de cada una de les difusivitats principals.

$$\lambda_{||} = \lambda_1; \lambda_{\perp} = \frac{(\lambda_2 - \lambda_3)}{2}$$

Equació 6. Equació de la difusivitat axial ($\lambda_{||}$) i la difusivitat radial (λ_{\perp}). On λ_1 , λ_2 i λ_3 són els valors propis de cada una de les difusivitats principals.

Les ROIs es van seleccionar manualment a partir dels mapes d'anisotropia fraccional així com dels mapes de cada una de les difusivitats principals de les seccions rostral, mitjana i caudal del CC, les quals corresponen a les posicions anatòmiques +1.32 mm, -0.64 mm i -1.64 mm del Bregma (*The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (238)), respectivament.

Mesura del volum cerebral

La mesura del volum cerebral es va fer a partir d'imatges d'alta resolució ponderades en T_2 , adquirides per mitjà de seqüències RARE (de l'anglès *Multislice Rapid Acquisition with Relaxation Enhancement*) amb un factor RARE de 8, un temps d'eco efectiu (TE_{eff}) = 36 ms i un temps de repetició (TR) = 4200 ms. Els paràmetres geomètrics van ser els mateixos que les imatges ponderades en T_2^* i es va emprar el programa ImageJ per a calcular el volum, a partir del número de píxels multiplicat pel volum d'un píxel (volum de píxel = $[(FOV_x \times FOV_y) / (MTX_x \times MTX_y)] \times 0.5$). Les ROIs es van seleccionar manualment i es va mesurar el número de píxels en les seccions entre les posicions anatòmiques corresponents des de +3.14 mm fins a -4.92 mm del Bregma (*The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates* (238)) (**Figura M-6**).

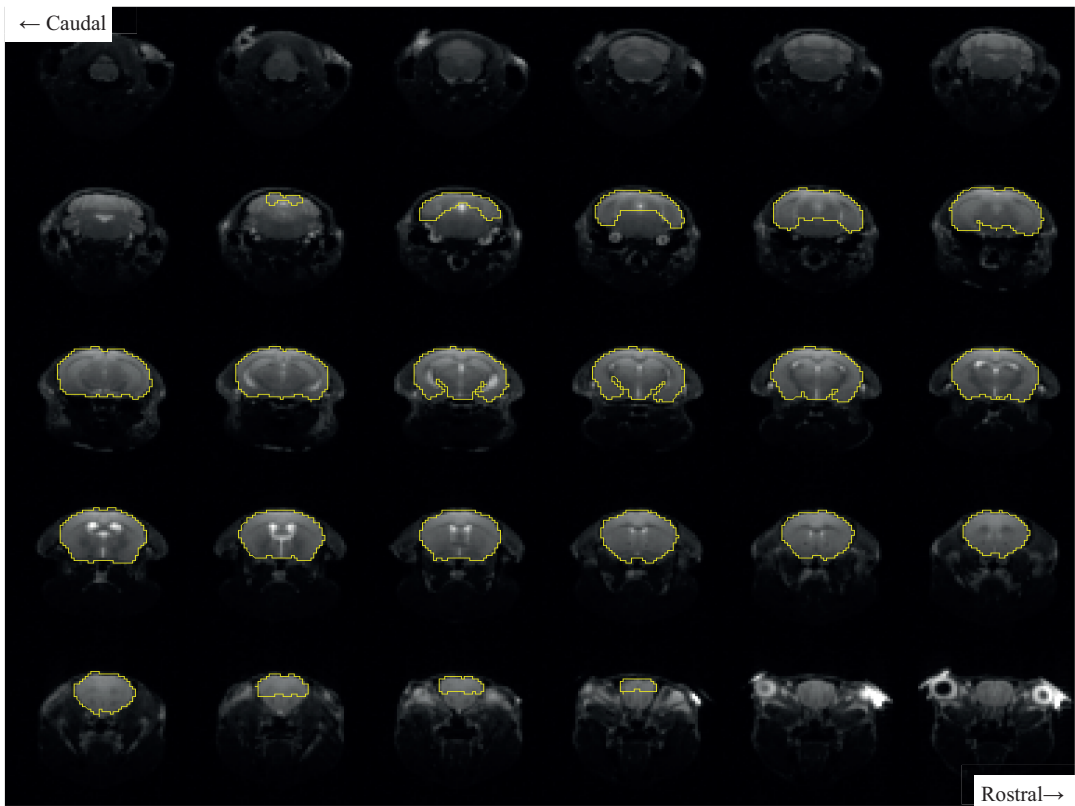
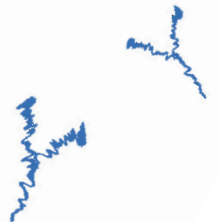


Figura M-6. Regions d'interès utilitzades per mesurar el volum del cervell. Imatges representatives del traçat de cada una de les ROIs analitzades.

Resultats



I- La dimerització forçada del fragment variable d'un anticòs implicat en l'amiloïdosi de cadena lleugera modifica la seva via d'agregació

L'AL és una de les amiloïdosis més complexes, degut a la alta heterogeneïtat de seqüència que presenten les proteïnes amiloides que provoquen aquesta malaltia. Això fa que entre els pacients que la pateixen, cada proteïna posseeixi unes característiques estructurals i biofísiques úniques, que finalment es tradueixen en una capacitat per formar fibres, un aparent tropisme orgànic i un grau de severitat diferents. Degut a que actualment no existeix un tractament curatiu per l'AL, s'han dedicat grans esforços a estudiar possibles vies de tractament. Una d'elles podria implicar l'estabilització de les formes natives, com en el cas de la TTR, on l'objectiu és l'estabilització del tetràmer i així evitar la dissociació i l'agregació (239). Tot i així, en el cas de l'AL, l'estabilització de les formes mono- i dimèriques no és una opció, doncs s'ha demostrat que tant aquestes com les fibres són causants de citotoxicitat (18,52). A més, s'ha descrit que les fibres també promouen l'aparició de fibrosis (substrat arritmogènic en el cor) (240). Per això, establir un model d'agregació en el qual poder assajar potencials fàrmacs o trobar una via alternativa és de vital importància.

El VVK08 forma trímers i el VVA09 dímers i tetràmers

En el procés de purificació del VVK08 i el VVA09 es va realitzar una darrera cromatografia d'exclusió molecular (**Figura R-1.1**) per a augmentar la puresa de les mostres finals i alhora realitzar un canvi de tampó. El resultat van indicar que el VVK08 presenta un sol pic amb un volum d'elució de 130 mL, mentre que el VVA09 presenta dos pics, un a 115 mL i el segon a 150 mL (**Figura R-1.1**). Per tal de determinar la massa molecular dels diferents pics es va realitzar una corba de calibració de la columna HiLoad 16/60 Superdex 75 PrepGrade (**Taula 2**), amb la qual es va mesurar que la massa molecular del VVK08 és d'aproximadament 71 kDa i els dos pics del VVA09 són de 87 kDa i 39 kDa,

Resultats

respectivament. Tenint en compte que tant el VVK08 i el VVA09 són proteïnes de 235 aminoàcids, els seus pesos molecular aproximats són 25 kDa. Per tant, el VVK08 forma trímers i el VVA09 forma dímers i tetràmers. No és d'estranyar que els scFvs formin dímers, però el més interessant és la formació de tetràmers estables i en grans quantitats per part de VVA09 que coexisteixen amb les formes dimèriques.

Taula 2. Calibració de la columna d'exclusió molecular HiLoad 16/60 Superdex 75 PrepGrade

Proteïna	Mw (kDa)	log(Mw)	Volum Elució (mL)
Aldolasa	158	5.199	117.4
BSA	67	4.826	128.6
Ovoalbúmina	44	4.643	145.4
Quimotripsinogen A	25	4.398	175.1
Mioglobulina	17	4.23	189
Blau Dextrà	>2000		109.5
Vitamina B₁₂	1.35		282.6

L'equació de la recta de calibració és $y=62.578x^2 - 667.85x + 1897.2$ i l' $R^2=0.9891$. El blau dextrà indica el volum d'exclusió de la columna i la vitamina B₁₂ el volum de columna.

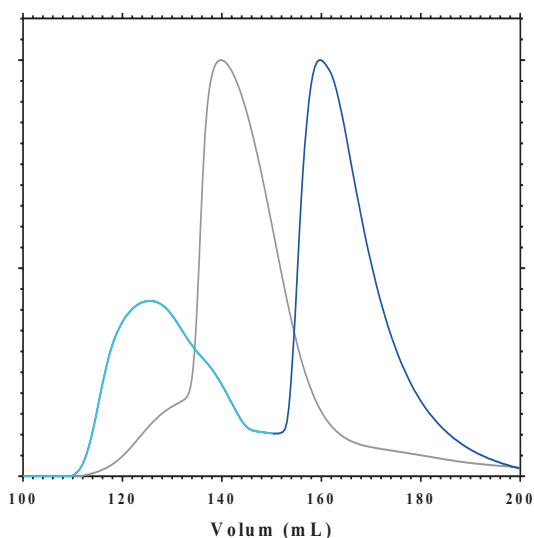


Figura R-1.1. El VVK08 forma trímers i el VVA09 dímers i tetràmers. Cromatograma de la cromatografia d'exclusió molecular del VVK08 (gris) i el VVA09 (blau) on es pot apreciar que el VVK08 té un volum d'elució de 130 mL, corresponent a una massa molecular de 71 kDa i el VVA09 presenta dos pics, el primer a 115 mL, corresponent a 87 kDa, i un segon a 150 mL, corresponent a 39 kDa. Per tant, el VVK08 forma trímers i el VVA09 forma dímers (blau fosc) i tetràmers (blau clar).

El VVK08 i el dímer del VVA09 presenten el plegament V_L canònic

Per tal de determinar si el format scFv alterava d'alguna manera l'estructura secundària original dels dominis V_L, es va caracteritzar l'estructura secundària dels scFvs per mitjà del *far*-UV-CD (de l'anglès *far ultraviolet circular dichroism*). En condicions natives, tant el VVK08 com el dímer del VVA09 mostren l'estructura secundària canònica rica en fulla β dels dominis variables de les cadenes lleugeres de les immunoglobulines. Aquest plegament típic presenta un mínim d'el·liplicitat al voltant dels 218 nm que sol anar acompanyat per un mínim a prop dels 235 nm i un màxim a 227 nm (**Figura R-1.2A**). El mínim localitzat a 235 nm és degut a la contribució a la regió de l'ultraviolat llunyà dels residus aromàtics empaquetats al voltant del Trp35, mentre que el màxim a 227 nm reflecteix l'exposició dels llaços al solvent (33,41,43,44,47,49,50). A banda de que el perfil és molt similar entre els espectres del VVK08 i del dímer del VVA09, el major senyal de l'espectre del VVK08 suggereix una major estabilitat de la línia germinal. Per altra banda, el tetràmer del VVA09 en condicions natives exhibeix un sol mínim a 218 nm molt intens, indicatiu que el seu plegament no és el canònic. A més, el fet que no mostra el mínim a 235 nm indica que el nucli hidrofòbic presenta una estructura diferent al VVK08 i al dímer del VVA09.

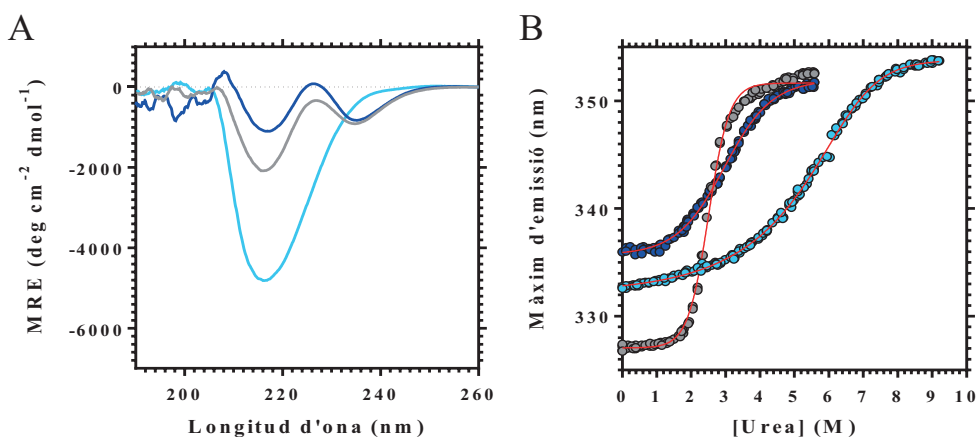


Figura R-1.2. VVK08 i el dímer del VVA09 adopten el plegament canònic dels dominis V_L de les cadenes lleugeres de les immunoglobulines. (A) Espectres de far-UV-CD del VVK08 (gris), el dímer del VVA09 (blau fosc) i el tetràmer del VVA09 (blau clar) a 4°C. Ambdós scFvs presenten el plegament canònic de les immunoglobulines amb dos mínims a 218 i 235 nm i un màxim a 227 nm. El tetràmer del VVA09 mostra una estructura tot β caracteritzada amb un únic mínim a 218 nm. MRE, de l'anglès *mean residue ellipticity*. (B) Les corbes de desnaturalització per urea s'ajusten a un model en dos estats per les tres proteïnes, essent VVK08 (en gris) la més estable i compacta. En el cas del VVA09, les estructures són molt menys compactes i estables, però s'observa que la formació de tetràmers per part del VVA09 (en blau clar) augmenta l'estabilitat respecte el dímer del VVA09 (en blau fosc). En vermell es representa l'ajust de les corbes.

Un cop es va determinar que el VVK08 i el dímer del VVA09 presenten una estructura secundària canònica, es van realitzar cobres d'urea per tal de determinar les vies de desplegament, així com l'estabilitat i grau de compactació de les proteïnes. La **Figura R-1.2B** mostra com les tres proteïnes presentaven vies de desplegament en dos estats que s'ajustaven a una corba sigmoïdal, per tant, no hi ha intermediaris metaestables en la via de plegament de cap de les proteïnes. L'ajustament de la corba de desnaturalització per urea (**Taula 3**) mostra que l'energia de Gibbs (ΔG^0) per al desplegament del VVK08 és de -26.13 ± 0.52 kJ/mol i la cooperativitat (m) és de 10.76 ± 0.21 kJ/mol·M. Aquests valors disten molt del dímer del VVA09, que té una ΔG^0 de -8.41 ± 0.59 kJ/mol i una m de 2.74 ± 0.21 kJ/mol M. Per tant, el VVK08 és molt més estable que el dímer del VVA09 i presenta un millor empaquetament (la diferència en el grau de solvatació de l'estat natiu respecte al desnaturalitzat (m) és major, indicant que l'enterrament del nucli hidrofòbic en una estructura molt compacta), tal com apunten els espectres de CD de l'estat natiu. Finalment, el tetràmer del VVA09, mostra una major ΔG^0 que el seu dímer, -15.41 ± 0.39 kJ/mol, el que suggereix que la proteïna es troba en un pou energètic dins l'embut d'agregació des d'un principi. Al comparar els dominis V_L implicats en l'AL amb els scFvs derivats, podem veure com en el cas de la línia germinal

l'estabilitat no es veu afectada per la dimerització forçada, però sí que es veu afectada la cooperativitat, essent major la del VVK08 que la del domini V_L del qual deriva (**Taula 3**). En el cas del dímer i el tetràmer del VVA09, en ambdós casos la *m* disminueix, però l'estabilitat tan sols disminueix en el cas del dímer del VVA09, de nou, apuntant a que el tetràmer es troba en un pou energètic que el fa altament estable.

Taula 3. Ajust al model de dos estats de les corbes de desnaturalització química del VVK08 i el VVA09 i les proteïnes de les quals deriven.

Proteïna	ΔG (kJ/mol)	<i>m</i> (kJ/mol·M)
VVK08	-26.13±0.52	10.76±0.21
Dímer VVA09	-8.41±0.59	2.74±0.21
Tetràmer VVA09	-15.41±0.39	2.54±0.08
^a κI O18/O8-V _L	-25.52±0.84	6.38±0.10
^a AL-09-V _L	-14.64±1.26	7.70±0.66

^a Valors extrets de (47) i determinats en Tris-HCl 10 mM, pH 7.4.

El VVK08 i el dímer del VVA09 exhibeixen diferents intermediaris durant la desnaturalització tèrmica

El fet que es van observar diferències significatives en l'estabilitat química entre el VVK08 i el dímer del VVA09 va fer pensar si el procés d'hipermutació somàtica en VVA09 hauria afectat l'estabilitat tèrmica. El seguiment de la fluorescència intrínseca del Trp35 durant l'augment de la temperatura mostra que el VVK08 i el dímer del VVA09 presenten transicions tèrmiques diferents. Mentre que el VVK08 i el tetràmer del VVA09 disminueixen la intensitat a mesura que augmenta la temperatura, en el cas del dímer del VVA09 la intensitat augmenta, arribant a un màxim a 47°C i, després, a temperatures majors, cau (**Figura R-1.3A**). Aquesta transició mostra la formació d'un intermediari amb una conformació on el nucli hidrofòbic al voltant del Trp s'ha reorganitzat respecte a l'estat natiu. Aquest intermediari metaestable pobla la via d'agregació del dímer del VVA09 al voltant dels 47°C i a temperatures més altes, s'auto-associa i agrega, fent disminuir la intensitat progressivament. En el cas del VVK08, la transició no és tan clara, a més es dona a temperatures més altes, a uns 52°C. Aquest fet indica que l'intermediari a la via d'agregació del VVK08 està menys poblat que el del dímer del VVA09.

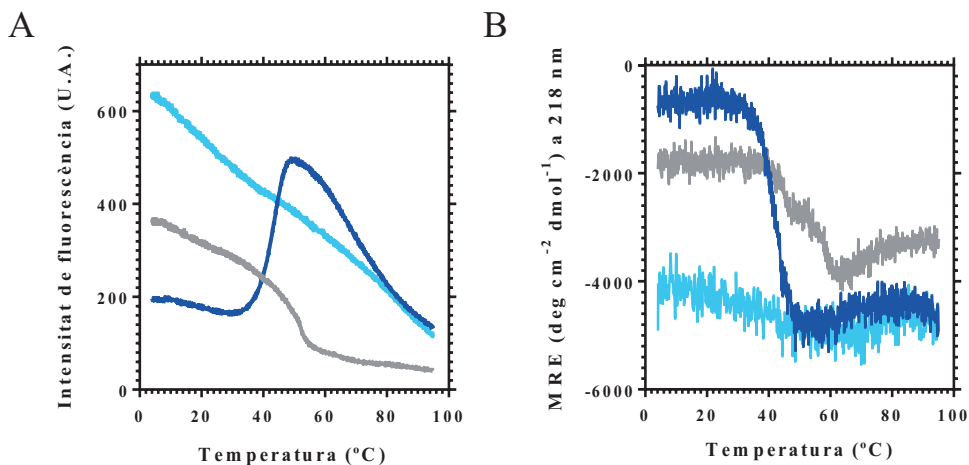


Figura R-1.3. El VVK08 és tèrmicament més estable que el VVA09. (A) Desnaturalització tèrmica seguida per la fluorescència intrínseca del Trp35 de VVK08 (gris), el dímer del VVA09 (blau fosc) i el tetràmer del VVA09 (blau clar). El dímer del VVA09 presenta un intermediari metaestable en la via d'agregació, mentre que el VVK08 mostra un intermediari menys estable i el tetràmer del VVA09 no mostra cap transició conformacional cooperativa. (B) Desnaturalització tèrmica seguida per CD a 218 nm del VVK08 i del VVA09. Les transicions conformacionals en l'estructura terciària també afecten clarament a l'estructura secundària. El VVK08 reorganitza la seva estructura secundària per generar un intermediari amb més el·lipticitat i després perd una part del senyal, fet que indica un procés d'agregació. El dímer del VVA09 mostra una clara transició cap a un intermediari ric en estructura β amb tendència a l'agregació. El tetràmer de VVA09 no varia significativament la seva estructura secundària amb l'augment de temperatura, el que torna a indicar que es troba en un pou energètic. MRE, de l'anglès *mean residue ellipticity*.

Les corbes de desnaturalització tèrmica seguides per CD indiquen que el dímer del VVA09 segueix una transició sigmoïdal molt cooperativa al voltant dels 42°C, des de l'estat natiu a un estat intermediari ric en fulla β , i que el senyal s'estabilitza al voltant dels 47°C. El VVK08 també adquireix més estructura β , però la transició conformacional és més complexa i es dona a major temperatura, al voltant dels 49°C, i el senyal s'estabilitza als 61 °C. Per tant, l'estat intermediari de la via d'agregació del VVK08 és menys estable que el

que pobla la via d'agregació del dímer del VVA09. Finalment, el tetràmer del VVA09 no varia gaire la seva estructura secundària a mesura que augmenta la temperatura, el que torna a indicar que es troba en un pou energètic (**Figura R-1.3B**). També es confirma que tant el VVK08 com el VVA09 agreguen en lloc de desplegar, ja que la intensitat del senyal a 218 nm augmenta a mesura que augmenta la temperatura, per tant hi ha una transició des de l'estat natiu fins a un estat propens a l'agregació enriquit en el contingut de fulla β . Una vegada completada la transició, la intensitat del senyal es manté estable. Arribats a aquest punt, cal destacar que després de les transicions, el tetràmer i el dímer del VVA09 es comporten de manera molt similar, tant a nivell d'estructura terciària com d'estructura secundària. Això podria indicar que en un primer moment el VVA09 es troba formant dímers, el que podria implicar una certa protecció front a l'agregació amiloide, però que a l'augmentar la temperatura, s'afavoriria una transició conformacional que portaria a la formació del tetràmer, més estable i propens a l'agregació.

El VVK08 i el VVA09 tenen intermediaris en l'embut d'agregació diferents

Les dades obtingudes fins a aquest punt semblen indicar que tot i que el format scFv no afecta a l'estructura secundària del VVK08 i el VVA09 sí que canvia la via d'agregació respecte als dominis V_L dels quals deriven, doncs a mesura que augmenta la temperatura les proteïnes no despleguen, sinó que s'enriqueixen en estructura β . A més, els resultats obtinguts també semblen evidenciar que el tetràmer del VVA09 seria un intermediari estable en la via d'agregació del VVA09. Per tal de confirmar-ho, es va realitzar l'estudi de l'estructura secundària i terciària a diferents temperatures, així com es va estudiar la via d'agregació per mitjà d'ATR (de l'anglès *attenuated total reflectance*) i TEM (de l'anglès *transmission electron microscopy*).

Com s'ha esmentat anteriorment, tant el VVK08 com el dímer del VVA09 presenten l'estructura secundària típica de les Ig (**Figura R-1.2A**). Als 47°C, l'espectre de VVK08 no canvia molt, doncs manté l'estructura canònica de les immunoglobulines amb mínims a 218 nm i 235 nm, encara que el senyal dels

llaços, a 227 nm, desapareix. Per altra banda, el dímer del VVA09 ja ha adoptat una conformació rica en fulla β amb un mínim a 216 nm, que juntament amb l'augment del senyal indica una reorganització conformacional cap a un intermediari ric en fulla β . A més, l'espectre s'assembla força a l'espectre del tetràmer, el qual tan sols varia en la intensitat del senyal entre els 4 i els 47°C (Figura R-1.4A, B).

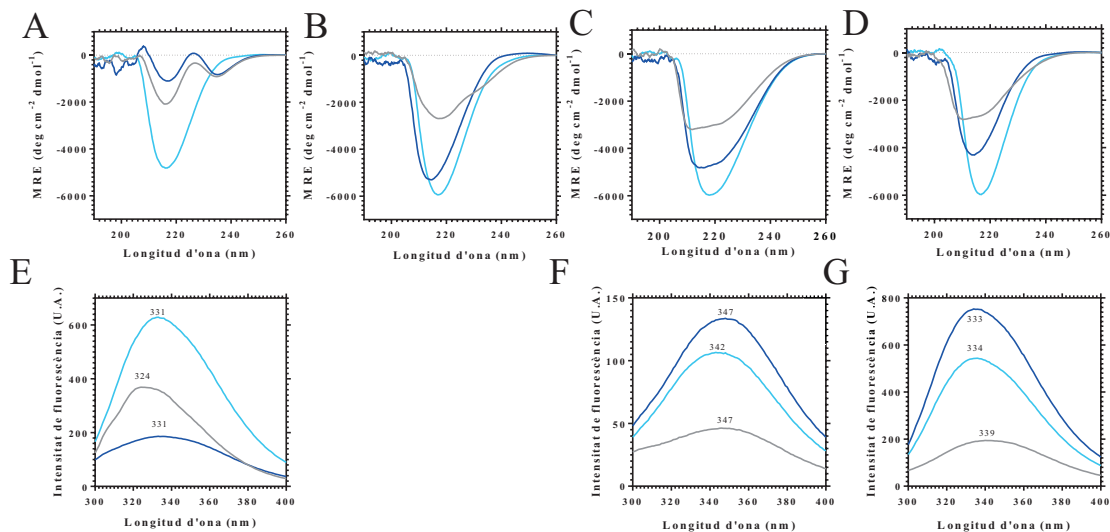


Figura R-1.4. El VVK08 i el VVA09 presenten intermediaris en la via d'agregació diferents. (A-D) Els espectres de *far*-UV-CD del VVK08 (gris), el dímer del VVA09 (blau fosc) i el tetràmer del VVA09 (blau clar) a (A) 4°C (nota: l'espectre a 4°C és el mateix que en la Figura R-1.2A), (B) 47°C, (C) 95°C i (D) 4°C renaturalitzat. VVK08 manté l'estructura parcialment a una temperatura intermèdia i el dímer del VVA09 canvia a una estructura enriquida en fulla β , molt similar al seu tetràmer. A 95°C el VVK08 presenta una estructura enriquida en *random coil* i VVA09 manté l'estructura en fulla β . Pel que fa al tetràmer de VVA09, no varia la seva estructura rica en fulla β durant tot el procés de desnaturalització tèrmica, procés que és irreversible per el VVK08 i el VVA09. MRE, de l'anglès *mean residue ellipticity*. (E-G) Espectres d'emissió de fluorescència del Trp35 del VVK08 (gris), el dímer del VVA09 (blau fosc) i el tetràmer del VVA09 (blau clar) a (E) 4°C, (F) 95°C i (G) 4°C renaturalitzat. En condicions natives, el VVK08 presenta una estructura terciària més compacta que el VVA09. Amb l'augment de la temperatura es produeix un desplaçament del màxim

d'emissió cap al vermell (de 324 a 345 nm). El procés de renaturalització és irreversible per al VVK08, mentre que el VVA09 retorna a un màxim d'emissió de 335 nm. U.A. són unitats arbitràries.

A 95°C, el VVK08 perd el senyal a 235 nm i mostra una estructura β enriquida en *random coil* que podria correspondre a un estat intermediari; mentre que el dímer del VVA09 mostra que l'intermediari detectat als 47°C es reorganitza i augmenta el contingut en la fulla β , tot i que no és tan pura com la del tetràmer. Per altra banda, el tetràmer segueix presentant una estructura tot β (**Figura R-1.4C**). En el cas del tetràmer del VVA09 la temperatura no afecta l'estructura, indicant de nou, un plegament amiloide (la proteïna ja es trobava des d'un inici en un pou de l'embut d'agregació). Al renaturalitzar, el VVK08 no recupera l'espectre natiu, sinó que manté l'estat intermediari, encara que amb una pèrdua de senyal indicativa d'agregació parcial. El dímer del VVA09 mostra una estructura tot β , també amb menys senyal, indicant que es tracta d'un procés irreversible en el que una transició conformacional ha portat a una estructura tot β , molt semblant a l'espectre del seu tetràmer (**Figura R-1.4D**).

Per tal de determinar l'estructura terciària, es va emprar la fluorescència intrínseca del Trp35 com a grup indicador de l'empaquetament terciari seguint la variació de la intensitat i el desplaçament del màxim d'emissió dels espectres. La variació d'intensitat pot ser considerada perquè només hi ha un Trp en els V_L del VVK08 i el VVA09. Tot i que està reportat que en l'estat natiu de la cadena lleugera de l'AL-09 (dominis C_L-V_L) el Trp presenta un màxim d'emissió a 325 nm (241), el dímer del VVA09 i el tetràmer del VVA09 tenen el seu màxim desplaçat cap a longituds d'ona majors, 331 nm els dos, mentre que el VVK08 no varia, doncs el seu màxim es va trobar als 324 nm, en la mateixa longitud d'ona que els dominis C_L-V_L del κ I O18/O8 (241) (**Figura R-1.4E**). El corriment al vermell del dímer i el tetràmer del VVA09 indica un nucli hidrofòbic menys enterrat en el plegament. Per tant, coincidint amb les observacions anteriors, l'estat natiu del VVK08 és més estable que el del VVA09. De manera interessant, el VVK08 exhibeix una major intensitat de

fluorescència respecte al dímer del VVA09, que podria ser deguda a un ambient hidrofòbic diferent al voltant del Trp35 i/o un major efecte de l'apantallament produït pels ponts disulfurs. Per altra banda, és evident que el tetràmer del VVA09 té una estructura terciària diferent al seu dímer, doncs tot i que el màxim es troba molt proper, la seva elevada intensitat de senyal, juntament amb l'observat per CD, apunten que el plegament és diferent entre el dímer i el tetràmer. A 95°C els màxims d'emissió del VVK08, el dímer del VVA09 i del tetràmer es desplacen fins als 347, 347 i 342 nm, respectivament (**Figura R-1.4F**). Donat que la màxima disruptió de l'estructura terciària s'aconsegueix quan el màxim assoleix els 355 nm aproximadament, en aquest cas els Trp de cap de les proteïnes no arriba a estar totalment exposat al solvent. El fet que no hi hagi una disruptió total de l'estructura terciària concorda amb l'aparició d'un estat intermediari ric en estructura β per al dímer del VVA09, i d'una estructura β amb certa component *random coil* per al VVK08, observats als 95°C per CD. Pel que fa al tetràmer del VVA09, durant tot el procés de desnaturalització tèrmica mostra una conformació estable tot β , la intensitat augmenta amb la temperatura, de manera contrària al que fan el VVK08 i el dímer del VVA09, el que torna a indicar que el tetràmer té una estructura diferent. Després de la renaturalització (**Figura R-1.4G**), el màxim del VVK08 es desplaça a 339 nm, el del dímer del VVA09 a 333 nm i el del tetràmer del VVA09 torna als 334 nm, però cap d'ells recupera els valors inicials de intensitat indicant que els processos són irreversibles.

Les transicions conformacionals també es van estudiar per mitjà d'ATR i es va confirmar amb TEM. La deconvolució de la banda amida I dels espectres d'ATR del VVK08 a temperatura ambient apunta a dos components principals (**Taula 4**), el primer component, la banda centrada a 1633 cm^{-1} que correspon a la fulla β nativa i contribueix en un 56% a l'àrea de l'espectre, la segona banda correspon als llaços, centrada als 1659 cm^{-1} i contribueix en un 40% de l'àrea de l'espectre (**Taula 4**), per tant, els espectres d'ATR confirmen els resultats obtinguts de l'estructura nativa per mitjà de CD. Després de la incubació del

VVK08 a 60°C durant 10 min, l'espectre canvia notablement. L'alteració més important és la desaparició del component de fulla β nativa en favor de la presència d'una component de fulla β agregada corresponent a fibres *worm-like* (WL), centrada als 1627 cm^{-1} (197). La contribució de la banda dels WL representa el 38% de l'àrea de l'espectre. A més, el component dels llaços desapareix i apareix la component de *random coil* centrada als 1649 cm^{-1} i que contribueix en un 47% de l'àrea de l'espectre. Aquesta estructura concorda perfectament amb l'observada per CD per a l'estat intermediari de la via de agregació del VVK08.

Taula 4. Contribució dels diferents components a l'àrea de l'espectre d'ATR

	VVK08				VVA09			
	25°C		60°C		25°C		60°C	
	Número d'ona (cm^{-1})	%	Número d'ona (cm^{-1})	%	Número d'ona (cm^{-1})	%	Número d'ona (cm^{-1})	%
Fulla β antiparal·lela d'alta freqüència	1685	4	1685	4	1686	5	1688	2
Girs	-	-	1672	11	-	-	1677	10
Llaços	1659	40	-	-	1661	47	1658	42
Random coil	-	-	1649	47	-	-	-	-
Fulla β nativa	1633	56	-	-	1636	43	1635	37
Fulla β WL	-	-	1628	38	-	-	-	-
Fulla β amiloide	-	-	-	-	1615	5	1617	10

De manera similar al VVK08, l'espectre d'ATR del dímer del VVA09 a temperatura ambient (**Taula 4**) té dos components principals, un a 1636 cm^{-1} que contribueix a l'àrea de l'espectre en un 43% i un altre a 1661 cm^{-1} que contribueix en un 42%, corresponents a una fulla β nativa i a llaços, respectivament. En aquest cas, l'espectre deconvulat també confirma l'estructura secundària nativa determinada per CD, però a temperatura ambient el dímer del VVA09 ja presenta una component amiloide que correspon al 5% de l'àrea. En incubar el dímer del VVA09 10 minuts a 60°C es dona una transició conformacional en la qual es mantenen les diferents components, però

el contingut de fulla β amiloide augmenta, arribant a una contribució en l'àrea de l'espectre del 10% (**Taula 4**). Resumint, les dades d'ATR confirmen que les transicions observades es corresponen a un fenomen d'agregació en forma de fibres WL més que en fibres amiloides, les quals es trobarien centrades sobre els 1620-1615 cm^{-1} (227), en el cas del VVK08, però per contra, el dímer de VVA09 no conté la component WL, sinó la component amiloide.

La presència de les fibres es va confirmar per mitjà de TEM (**Figura R-1.5**). Les imatges indiquen que a temperatura ambient el VVK08 i el dímer del VVA09 no formen fibres ni cap tipus d'agregat identificable, però el tetràmer del VVA09 ja presenta agregats, encara que poc organitzats. En el cas del VVK08, les imatges de TEM van confirmar els resultats de l'ATR, però en el cas del dímer del VVA09 no va ser possible visualitzar les fibres amiloides, probablement perquè conformationalment ja eren presents, però cinèticament no eren favorables a aquesta temperatura. D'altra banda, a 60°C, el VVK08 comença a presentar alguns agregats de tipus WL. A més, el dímer del VVA09 mostra majoritàriament agregats que podrien ser WL, però amb baixa organització. En el cas del VVK08, els resultats concorden amb els resultats obtinguts per ATR, però no en el cas del dímer del VVA09. El tetràmer del VVA09 en canvi, mostra agregats amorfes d'una mida relativament gran. A 95°C, tant el VVK08 com el dímer del VVA09 mostren fibres WL, però el tetràmer del VVA09 continua mostrant uns agregats poc organitzats, el que concorda amb la falta de transició conformational per al tetràmer del VVA09. Finalment, per tal d'imitar les condicions en les quals tradicionalment es fan agregar *in vitro* els V_L implicats en l'AL, es van incubar les proteïnes a 37°C durant 24 i 96h. Després de 24h d'incubació, és possible observar fibres WL tant en el cas del VVK08 com del dímer del VVA09, però el tetràmer mostra fibres amiloides. Per altra banda, després de 96h agregant a 37°C la quantitat de fibres WL que forma el VVK08 és molt major, així com en el dímer del VVA09, però en el cas del dímer del VVA09 també apareixen fibres amiloides. En el cas del tetràmer de VVA09, apareixen fibres amiloides i alguns agregats

amorfes. Per tant, la semblança trobada a nivell estructural pel dímer i el tetràmer del VVA09 una vegada induïda l'agregació per temperatura, és deguda a la formació de fibres amiloides.

Per tal de confirmar o desmentir que la transició tèrmica del dímer del VVA09 cap a un intermediari tot β promou la formació de fibres amiloides enlloc de fibres WL es van incubar el VVK08 i el dímer i el tetràmer del VVA09 a les temperatures on els estats intermediaris estan més poblats, 52 i 47°C, respectivament. Després d'això, es van incubar 24 i 96h a 37°C per a afavorir encara més el desenvolupament cinètic del procés. Els resultats indiquen que en el cas del VVK08, al afavorir la formació de l'intermediari es manté la formació de fibres tipus WL, mentre que el dímer i el tetràmer del VVA09 formen fibres amiloides. A més, sembla que la quantitat de fibres és temps dependent, és a dir, la cinètica del procés d'agregació és prou lenta com per a detectar-la, doncs a 96h la concentració de fibres és major que a 24h (**Figura R-1.6**). Aquests resultats confirmen que al promoure la transició cap a l'intermediari, el dímer i el tetràmer del VVA09 agreguen de la mateixa manera, doncs no va ser possible observar la formació de les fibres WL, presents a l'agregar durant 24 i 96h sense induir la formació de l'intermediari.

Com a conclusió, la dimerització forçada pel format scFv evita totalment la formació de fibres amiloides, redirigint l'agregació cap a la formació de fibres WL, per part del VVK08, però no per al VVA09. El VVK08 és més estable i té un plegament molt més cooperatiu que el VVA09. El tetràmer del VVA09 és més estable que el dímer del qual deriva, perquè ja es trobava en un pou energètic.

Resultats

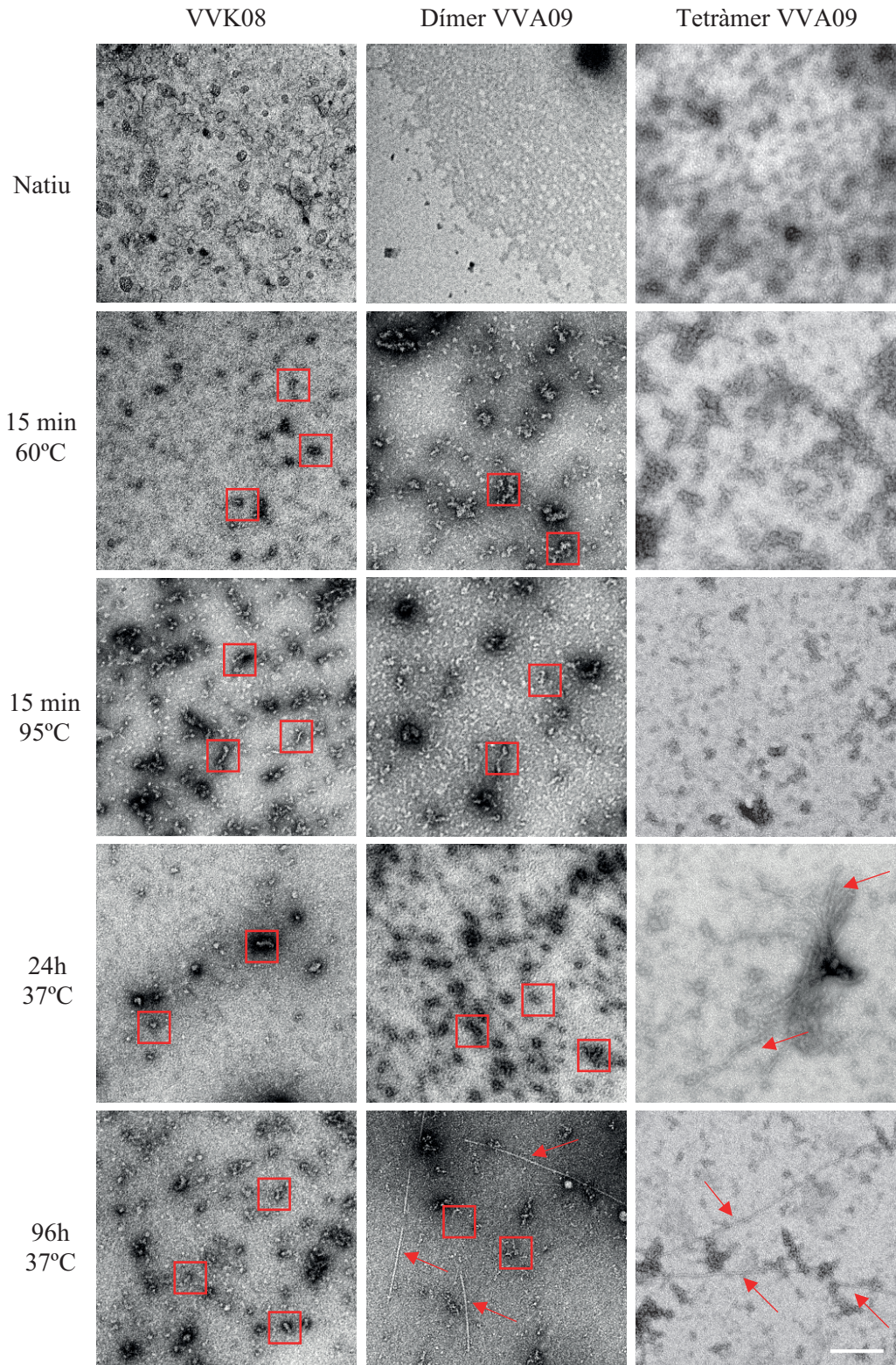


Figura R-1.5. El dímer de VVA09 presenta fibres WL que coexisteixen amb fibres amiloides. Les micrografies de TEM indiquen que el VVK08 tendeix a formar fibres WL mentre que el tetràmer del VVA09 tendeix a la formació de fibres amiloides. El cas del dímer del VVA09, sembla que tendeix a la formació de WL, però que les condicions d'agregació prolongades generen la formació de fibres amiloides. Els requadres indiquen els agregats de tipus WL i les fletxes les fibres amiloides. La barra d'escala correspon a 200 nm.

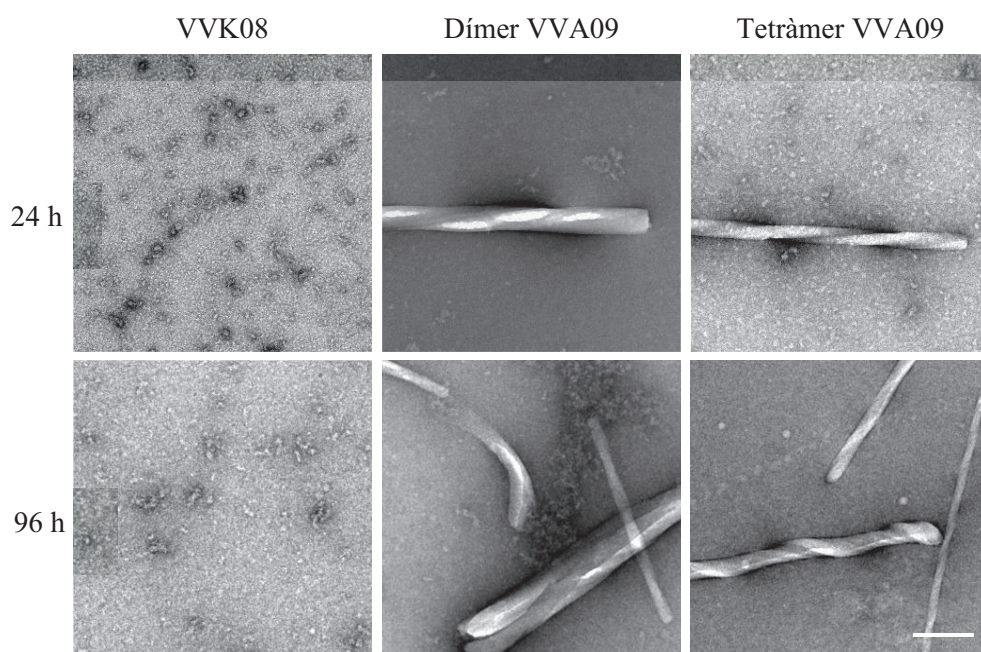


Figura R-1.6. La formació de l'intermediari metaestable per part del dímer del VVA09 afavoreix la formació de fibres amiloides. Les micrografies de TEM indiquen que el VVK08 tendeix a formar fibres WL després de la inducció de l'intermediari, mentre que el dímer del VVA09 passava a formar fibres amiloides enlloc de fibres WL. El tetràmer del VVA09 segueix formant fibres amiloides. La barra d'escala correspon a 200 nm.

II- Tant el pèptid A β com la proteïna tau es veuen afectades per un fragment d'anticòs anti-A β en ratolins 3xTg-AD d'edat avançada

Degut a que l'AD es diagnostica una vegada l'A β ha agregat a l'espai extracel·lular i que la patologia tau esdevé evident, ha pres una rellevància capital estudiar el possible efecte terapèutic de potencials fàrmacs en estadis avançats de la malaltia. A més, un aspecte molt interessant per a recolzar la hipòtesi de la cascada amiloide és si la reducció d'A β , per exemple per un anticòs anti-A β , comporta una disminució de tau. En aquest sentit, diversos estudis d'immunoteràpia contra tau han mostrat la capacitat d'aquests fàrmacs de reduir el nivells de dipòsits amiloides extracel·lulars (242,243), el que dona suport a la hipòtesi que existeix una connexió entre A β i tau. Per això, la recerca d'aproximacions terapèutiques que tinguin com a objectiu els dos marcadors histopatològics és de gran interès. Anteriorment, al grup ja s'havia demostrat que l'scFv-h3D6 redueix els nivells d'A β oligomèric extracel·lular (111) i intracel·lular (203) amb una sola dosi intraperitoneal en ratolins 3xTg-AD de 5 mesos d'edat. Així mateix, es va poder observar aquest efecte en un grup similar de ratolins després d'un tractament de 6 setmanes (200) i després d'administrar l'scFv-h3D6 un cop al mes durant 7 mesos (201,244). Tot i així, l'efecte de l'scFv-h3D6 encara no ha estat avaluat en un grup de ratolins d'avançada edat, en un estadi molt avançat de la malaltia. L'objectiu d'aquest capítol és avaluar l'eficàcia de l'scFv-h3D6, un anti-A β , en ratolins d'edat avançada amb plaques senils evidents i NFTs. Per això, durant dues setmanes, femelles de ratolins 3xTg-AD de 22 mesos d'edat van ser tractades amb scFv-h3D6 o PBS i després es van quantificar els nivells d'A β i tau, juntament amb altres marcadors relacionats amb la neuroinflamació.

L'scFv-h3D6 redueix els nivells de tau total

Degut a que el model 3xTg-AD desenvolupa els dos marcadors bioquímics distintius de l'AD (166), les plaques senils i els NFT, formades per A β i tau,

respectivament, i considerant que el bapineuzumab era capaç de reduir els nivells de tau en el CSF (245), es va avaluar l'efecte del seu derivat, l'scFv-h3D6, sobre la patologia tau.

Prèviament, un company de laboratori (l'Alejandro R. Roda) va determinar per mitjà de immunohistoquímica que en els ratolins femella 3xTg-AD de 22 mesos d'edat el tractament reduïa l'àrea immunoreactiva a 6E10. En concordança, per mitjà d'ELISA va determinar que els nivells d'A β ₁₋₄₀ i d'A β ₁₋₄₂ en diferents extractes hipocampals eren negligibles en els ratolins NTg. Tot i que els nivells d'A β ₁₋₄₀ i d'A β ₁₋₄₂ es van reduir després del tractament amb scFv-h3D6 en totes les fraccions proteiques extretes dels ratolins (TBS-soluble, SDS-soluble i FA-soluble), les diferències no van ser significatives excepte per als nivells d'A β ₁₋₄₀ en la fracció SDS-soluble, on les diferències van ser marginals i el test mida de l'efecte (*effect size*) va indicar que aquesta diferència era real. L'A β ₁₋₄₀ és la forma predominant en el model 3xTg-AD. També destacable el fet que la càrrega amiloide va ser major en les fraccions SDS i FA-soluble que en la fracció TBS-soluble, en concordança amb l'avançat estat de la patologia.

Els ratolins 3xTg-AD, mostren un marcatge molt intens d'HT7 (U =4; p-valor =0.0952; r= 0.68), marcador de tau total, però no els ratolins NTg (**Figura R-2.1A, B**). Amb l'anticòs monoclonal AT8, dirigit contra la Ser202 i la Thr205 fosforilades de tau, el marcatge no és tan intens abans del tractament i l'efecte de l'scFv-h3D6 no és evident (**Figura R-2.1C**). Tot i que els nivells de tau fosforilada es troben augmentats en els ratolins 3xTg-AD en comparació amb els ratolins NTg (U =0; p =0.0079; r =1), no s'observa un efecte de l'scFv-h3D6 sobre els nivells de tau fosforilada (U =10; p-valor =0.8016; r =0.12) (**Figura R-2.1D**). Per tant, es van determinar mitjançant WB els nivells de tau total en la fracció SDS-soluble (**Figura R-2.2A-C**). Els nivells detectats de tau total en els ratolins NTg són gairebé negligibles i majors en els 3xTg-AD no tractats (U =0; p-valor =0.0079; r =1) (**Figura R-2.2A, B**). Després del tractament, els nivells totals de proteïna la tau tendeixen a disminuir i el test mida de l'efecte demostra que aquesta reducció és real (U = 4;p = 0.0952; r = 0.68). De la

mateixa manera que passa amb els marcatges per immunohistoquímica, no s'observen diferències significatives en els nivells de tau fosforilada després del tractament per mitjà de WB ($U = 8$; p -valor = 0.5317; $r = 0.28$) (**Figura R-2.2B, C**). Cal destacar que els nivells de tau total i fosforilada tenen un rang molt elevat i que el tractament amb scFv-h3D6 redueix aquesta dispersió (**Figura R-2.2A-C**), el que significa que el tractament amb l'scFv anti-A β , en general, és capaç de reduir la càrrega de tau.

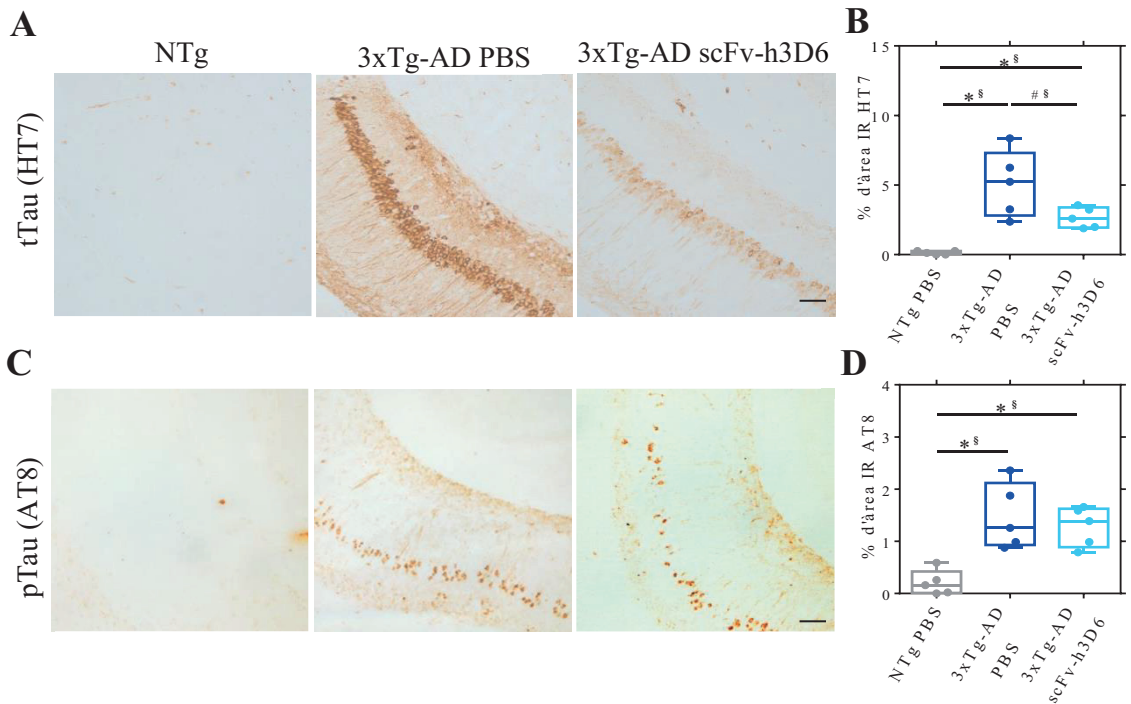


Figura R-2.1. El tractament amb scFv-h3D6 redueix els nivells de tau total a l'hipocamp. (A) Marcatge de tau total (HT7) en ratolins NTg no tractats (esquerra), 3xTg-AD no tractats (centre) i 3xTg-AD tractats amb scFv-h3D6 (dreta). (B) Percentatge d'àrea immunoreactiva a HT7. (C) Marcatge de la fosforilació de la Ser202 i la Thr205 de la proteïna tau (AT8) en ratolins NTg no tractats (esquerra), 3xTg-AD no tractats (centre) i 3xTg-AD tractats amb scFv-h3D6 (dreta). Barra d'escala, 25 μ m. (D) Percentatge d'àrea immunoreactiva a AT8. Les dades s'expressen en mediana i les barres d'error representen el valor màxim i mínim. Les diferències estadístiques van ser determinades amb el test no paramètric Mann-Whitney U-test. * Diferència significativa $p \leq 0.05$; # significança marginal $p \leq 0.1$; § $r \geq 0.68$.

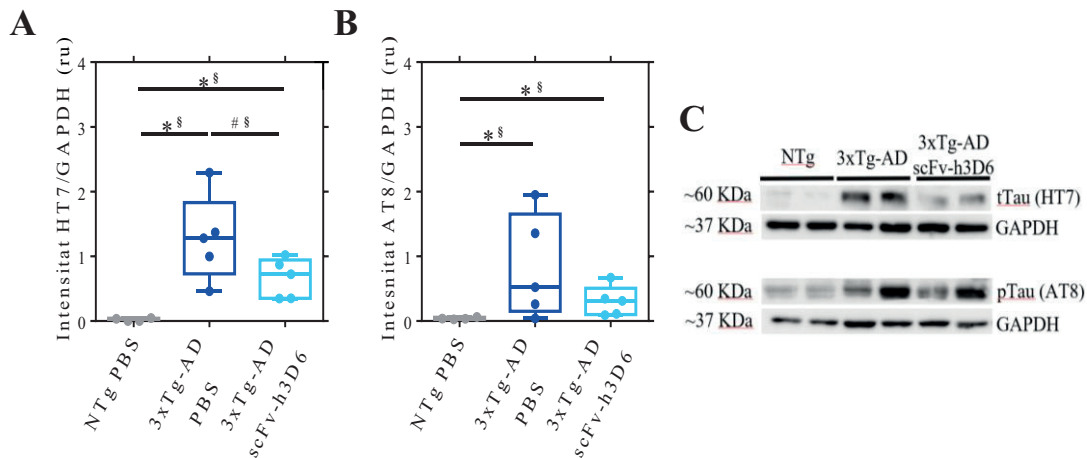


Figura R-2.2. El tractament amb scFv-h3D6 redueix els nivells de tau total a l'hipocamp. (A) Nivells de tau total (HT7) en la fracció SDS-soluble, quantificats mitjançant *western blot* i normalitzats amb els nivells de GAPDH. La intensitat s'expressa com a unitats relatives. (B) Nivells de fosforilació de la Ser202 i la Thr205 de la proteïna tau (AT8) en la fracció SDS-soluble quantificats mitjançant *western blot* i normalitzats amb els nivells de GAPDH. La intensitat s'expressa com a unitats relatives. (C) *Western blot* representatiu de tau total i fosforilada en la fracció SDS-soluble de l'hipocamp de ratolins NTg no tractats, 3xTg-AD no tractats i 3xTg-AD tractats amb scFv-h3D6. Tres replicats per experiment. Les dades s'expressen en mediana i les barres d'error representen el valor màxim i mínim. Les diferències estadístiques van ser determinades amb el test no paramètric Mann-Whitney U-test. * Diferència significativa $p \leq 0.05$; # significança marginal $p \leq 0.1$; § $r \geq 0.68$.

L'scFv-h3D6 millora lleugerament l'estat proinflamatori

Múltiples estudis avalen la implicació del sistema immunitari en la neurodegeneració (246). Existeixen diversos elements involucrats en els processos immunològics, com Trem2 (de l'anglès *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*), que està associada a un augment en el risc de patir AD (247). A més, l'administració d'anticossos sencers promou la reactivitat de la micròglia i l'astroglia i diversos processos inflamatoris generals (248). Considerant la importància del sistema immunològic i la propensió a generar la seva sobre-activació després de la immunoteràpia contra l'A β , es va

estudiar l'efecte del tractament amb scFv-h3D6 sobre la inflamació en ratolins 3xTg-AD de 22 mesos d'edat.

L'Alejandro R. Roda també va mesurar els nivells de GFAP i Iba1, marcadors per a la astroglia i microglia, respectivament, mitjançant WB en la fracció TBS-soluble, i va determinar que els nivells de GFAP es trobaven incrementats en ratolins 3xTg-AD respecte als ratolins NTg, tot i que la diferència va ser, tan sols marginalment significativa. Per altra banda, després del tractament amb scFv-h3D6, els nivells de GFAP van tendir a disminuir fins als nivells dels ratolins NTg. Aquesta diferència també la va observar per immunohistoquímica, on els ratolins 3xTg-AD no tractats van mostrar un marcatge intens que va disminuir després del tractament. Pel que fa als nivells de Iba1, no es van detectar diferències entre els ratolins NTg i els 3xTg-AD ni per immunohistoquímica ni per WB. A més, els nivells de Iba1 detectats mitjançant immunohistoquímica o mitjançant WB no van incrementar després del tractament.

Per analitzar amb més profunditat l'estat inflamatori entre els ratolins 3xTg-AD tractats i no tractats en aquesta tesi es van mesurar els nivells de diferents molècules implicades en la inflamació com són el TNF α , l'IL-33, l'IL-1 β i l'IL-6 en la fracció TBS-soluble (**Figura R-2.3A-D**). Els nivells de TNF α tendeixen a augmentar en els ratolins 3xTg-AD no tractats i el test mida de l'efecte revela que aquesta diferència és real (U =4; p-valor =0.0952; r =0.68), però no en els ratolins 3xTg-AD tractats (**Figura R-2.3A**). A més, els nivells de IL-33 també es troben incrementats en els ratolins 3xTg-AD no tractats (U =1; p-valor =0.0159; r =0.92) respecte als ratolins NTg, però no hi ha diferències entre els ratolins 3xTg-AD tractats i no tractats (**Figura R-2.3B**). Tot i així, els nivells entre els ratolins 3xTg-AD tractats i NTg tendeixen a ser iguals i el test mida de l'efecte va indicar que, de fet, són iguals (U = 4; p-valor = 0.0952; r = 0.68). De manera similar, els nivells de IL-1 β estan elevats en els ratolins 3xTg-AD no tractats (U =0; p-valor =0.0079; r =1) respecte als ratolins NTg no tractats i en el ratolins 3xTg-AD tractats no s'observa cap efecte, tot i que s'ha de

destacar el fet de que hi ha un animal amb un valor molt diferent de la resta del grup que podria emmascarar una potencial diferència (**Figura R-2.3C**). Finalment, no es veuen diferències en els nivells de IL-6 entre els diferents grups (**Figura R-2.3D**).

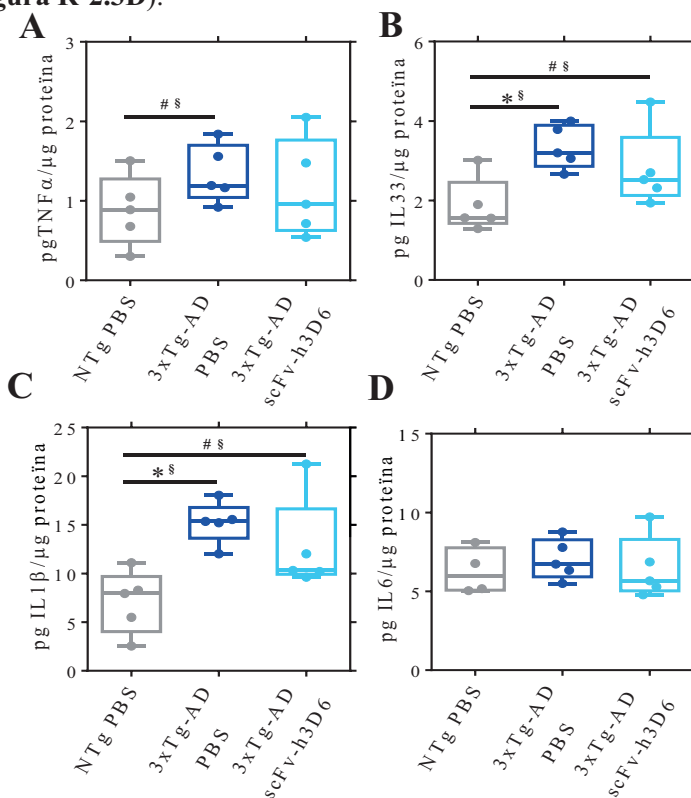


Figura R-2.3. L'scFv-h3D6 no provoca cap resposta neuroinflamatòria detectable en l'hipocamp. Nivells d'interleuquines mesurats per ELISA (en picograms) i normalitzats per la quantitat total de proteïna quantificats mitjançant BCA (en micrograms) en la fracció TBS-soluble. (A) TNF α . (B) IL-33. (C) IL-1 β (D) IL-6. Tres replicats per experiment. Les dades s'expressen en mediana i les barres d'error representen el valor màxim i mínim. Les diferències estadístiques van ser determinades amb el test no paramètric Mann-Whitney U-test. * Diferència significativa $p \leq 0.05$; # significança marginal $p \leq 0.1$; $\$ r \geq 0.68$.

En conclusió, el tractament amb l'scFv-h3D6 va ser capaç de reduir els nivells d'A β i alhora va reduir els nivells de tau total, demostrant una relació entre els dos marcadors bioquímics característics. Alhora, el tractament no empitjora l'estat proinflamatori del model 3xTg-AD d'edat avançada.

III- L'eliminació del domini Fc d'un anticòs monoclonal contra el pèptid A β augmenta la seguretat i manté l'eficàcia en el model murí APP23

Des de la retirada del bapineuzumab dels assajos clínics degut a la aparició d'ARIAs han estat diversos els anticòssos monoclonals que han entrat en fases clíniques. Tot i la capacitat de reduir els nivells d'A β parenquimal, tan sols un assaig clínic ha demostrat ser realment efectiu a l'hora de revertir els efectes de l'AD sobre la cognició, i va ser emprant dosis molt elevades que es van obtenir resultats positius. Per altra banda, amb altres teràpies, tan sols emprant elevades dosis es van obtenir resultats que lluny es troben de ser encoratjadors (184,191,249). Tot i que com s'ha exposat abans, és possible que la pauta d'administració d'aquests fàrmacs que han fallat no sigui la correcta, o que s'administrin en una fase de la malaltia on el component bioquímic ja no és el conductor de la malaltia, en la majoria de casos, les elevades dosis que semblen tenir un mínim d'efecte terapèutic també provoquen l'aparició d'anomalies en la imatge relacionades amb el pèptid amiloide (ARIA) (184,191,249). Sembla ser que l'aparició dels ARIA està associada a la regió Fc dels anticòssos sencers que activaria la resposta immunitària per part de la micròglia, la qual afavoriria un estat proinflamatori que com a conseqüència produiria la ruptura dels vasos cerebrals i l'extravessament del seu contingut. És per això, que en aquest apartat es van utilitzar ratolins APP23 de 27 mesos d'edat, model de CAA, per a avaluar la seguretat i l'efecte terapèutic del fragment d'anticòs scFv-h3D6, el qual no presenta regió Fc, en contraposició a l'anticòs monoclonal del qual deriva, el mAb-m3D6. Per tal de fer el seguiment de l'evolució de l'efecte en el temps amb un tractament agut es van prendre imatges de ressonància magnètica a temps zero i 1h després de cada injecció IP dels fàrmacs. La segona administració es va realitzar 96h després de la primera.

El model APP23 desenvolupa major número de lesions hemorràgiques al còrtex que la soca control del mateix fons genètic

La primera pregunta a respondre va ser si el model APP23 era adient per aquest estudi, ja que el Dr. Güell-Bosch va establir que el model 3xTg-AD no era adequat per a determinar la inducció d'ARIAs, doncs, a diferència del model APP23, no presenta CAA (244). Per tal de fer-ho, es van adquirir imatges ponderades en T_2^* , les quals van permetre la detecció de microhemorràgies. A la **Figura R-3.1A** es pot veure com als 27 mesos d'edat els ratolins NTg (C57BL/6), fons genètic dels ratolins APP23, presenten algunes hemorràgies en diferents regions del cervell, atribuïbles a l'edat. Per altra banda, el model APP23 mostra major nombre de ARIA-H respecte als ratolins NTg (**Figura R-3.1B, C**). Concretament, els ratolins APP23 desenvolupen major nombre de lesions hipointenses en el còrtex ($U=21.5$; $p\text{-valor}=0.0275$) (**Figura R-3.2A**), però no en el teixit estriat ni en l'hipocamp (**Figura R-3.2B, C**). Pel que fa a les ARIA-E, el model APP23 no exhibeix un augment dels valors d'ADC en el còrtex (**Figura R-3.2D**), ni en l'hipocamp (**Figura R-3.2F**), però sí que mostra un augment en el teixit estriat ($U=17$; $p\text{-valor}=0.0405$) (**Figura R-3.2E**). Els valors de T_2 (**Figura R-3.2G-I**) es comporten igual que els valors d'ADC, amb un augment significatiu del valor de T_2 en el teixit estriat ($U=6$; $p\text{-valor}=0.0004$) (**Figura R-3.2H**), el que implicaria que els ratolins APP23 presenten ARIA-E en el teixit estriat, però no en l'hipocamp ni en el còrtex. El test mida de l'efecte no es pot aplicar per resoldre les tendències quan es compara NTg i APP23 degut a que la diferència en la mida dels grups són molt gran (n , NTg =6 i n , APP23 =18).

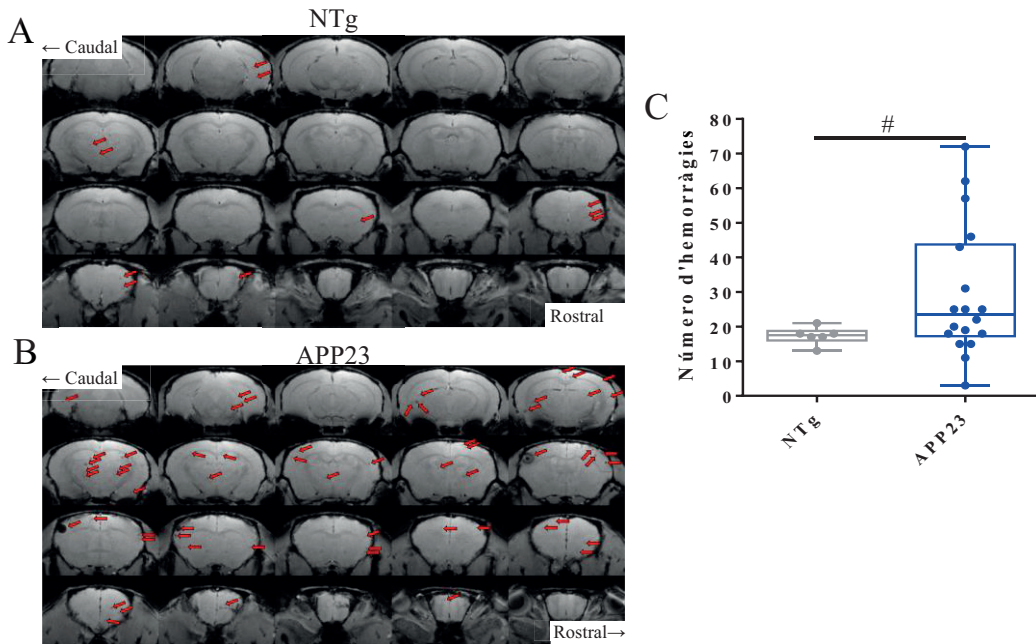


Figura R-3.1. El model APP23 desenvolupa més lesions microhemorràgiques que els ratolins no transgènics. (A-B) Seccions coronals representatives del cervell de ratolins (A) NTg i (B) APP23 al principi de l'experiment. Les lesions s'indiquen amb fletxes vermelles. (C) Número total de lesions cerebrals en els ratolins NTg (gris) i APP23 (blau) abans dels tractaments. Les dades s'expressen en mediana i les barres d'error representen el valor màxim i mínim. Les diferències estadístiques van ser determinades amb el test no paramètric Mann-Whitney U-test. * Diferència significativa $p \leq 0.05$; # significança marginal $p \leq 0.1$; § $r \geq 0.61$.

El model APP23 presenta dany axonal i deteriorament de la mielina en el cos callós frontal

Tot i que l'AD s'ha descrit com una afectació de la matèria gris, estudis de difusivitat direccional han desvelat la implicació de la matèria blanca en l'AD (250–252). A més, l'afectació de la matèria blanca en les regions temporal, parietal i frontal, així com en el cos callós s'han associat a problemes en el llenguatge i les funcions espacio-visuals (253,254). Com s'ha dit, una de les conseqüències de l'AD és el dany axonal i el deteriorament de la mielina, els quals és possible detectar i quantificar mitjançant la quantificació de la

anisotropia fraccional (FA), la difusivitat axial i la difusivitat radial (255). En un estudi en pacients amb AD temprà, els quals ja presentaven afectacions cognitives lleus, es va detectar un augment de la difusivitat radial, associada a danys desmielinitzants, així com un descens en la difusivitat axial, associada amb el dany axonal, en les regions corticals. En grups amb alt risc de patir AD es van obtenir resultats similars, indicant que la integritat estructural dels tractes de la matèria blanca estava compromesa (256,257). Per això, es van prendre mesures de diferents paràmetres de difusivitat en les regions rostral, mitja i caudal del cos callós. Els resultats van demostrar que en el cos callós rostral existeix un descens de la FA ($U = 10$; $p\text{-valor} = 0.0064$), un descens de la difusivitat axial ($U = 18$; $p\text{-valor} = 0.0427$) i un augment de la difusivitat radial ($U = 17$; $p\text{-valor} = 0.0362$), el que implicaria tant dany axonal com de la mielina (**Figura R-3.3A-C**). Per altra banda, en la regió mitjana tan sols es detecta una reducció en la difusivitat axial ($U = 19$; $p\text{-valor} = 0.0529$), però no en la FA ni en la difusivitat radial (**Figura R-3.3D-F**). Finalment, en la regió caudal, tan sols es detecta la reducció de la FA ($U = 14$; $p\text{-valor} = 0.0181$) (**Figura R-3.3G-I**).

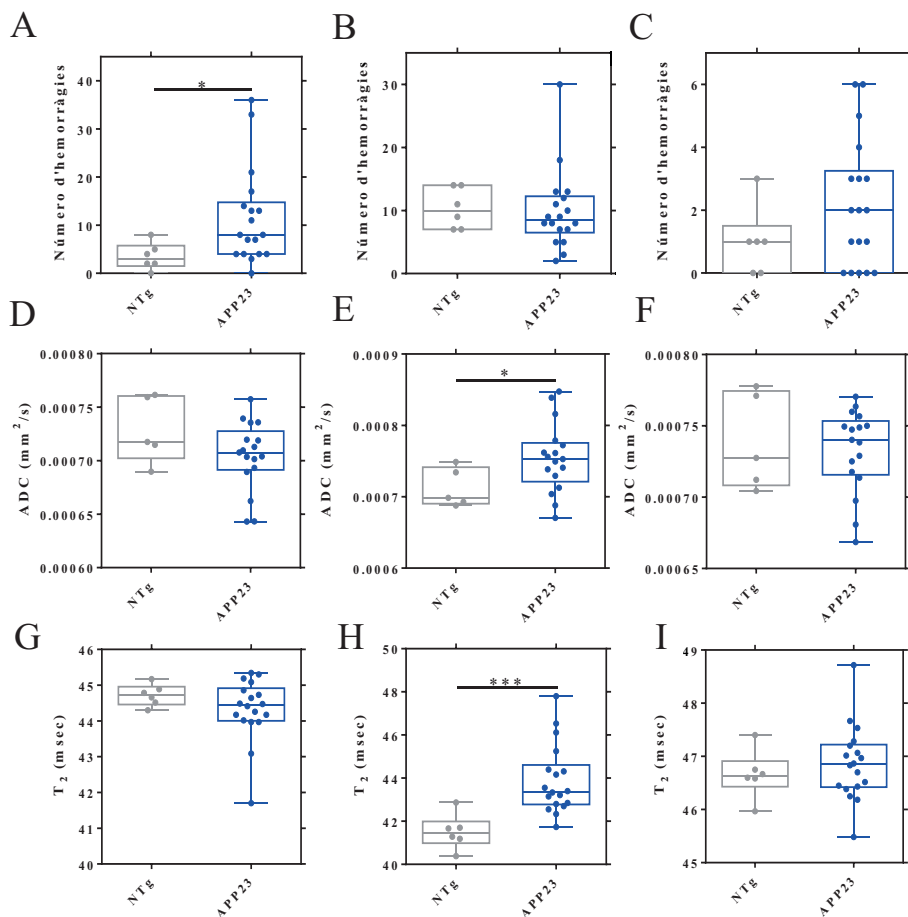


Figura R-3.2. Quantificació del número de microhemorràgies a partir d'imatges ponderades en T_2^* en diferents regions del cervell. (A-C) Número de lesions en ratolins NTg (gris) i APP23 (blau) en el (A) còrtex, en el (B) teixit estriat i en (C) l'hipocamp. (D-F) Valors d'ADC en el (D) còrtex, en el (E) teixit estriat i en (F) l'hipocamp. (G-I) Valors de T_2 en el (G) còrtex, en el (H) teixit estriat i en (I) l'hipocamp. Les dades s'expressen en mediana i les barres d'error representen el valor màxim i mínim. Les diferències estadístiques van ser determinades amb el test no paramètric Mann-Whitney U-test. * Diferència significativa $p \leq 0.05$; # significança marginal $p \leq 0.1$; § $r \geq 0.61$.

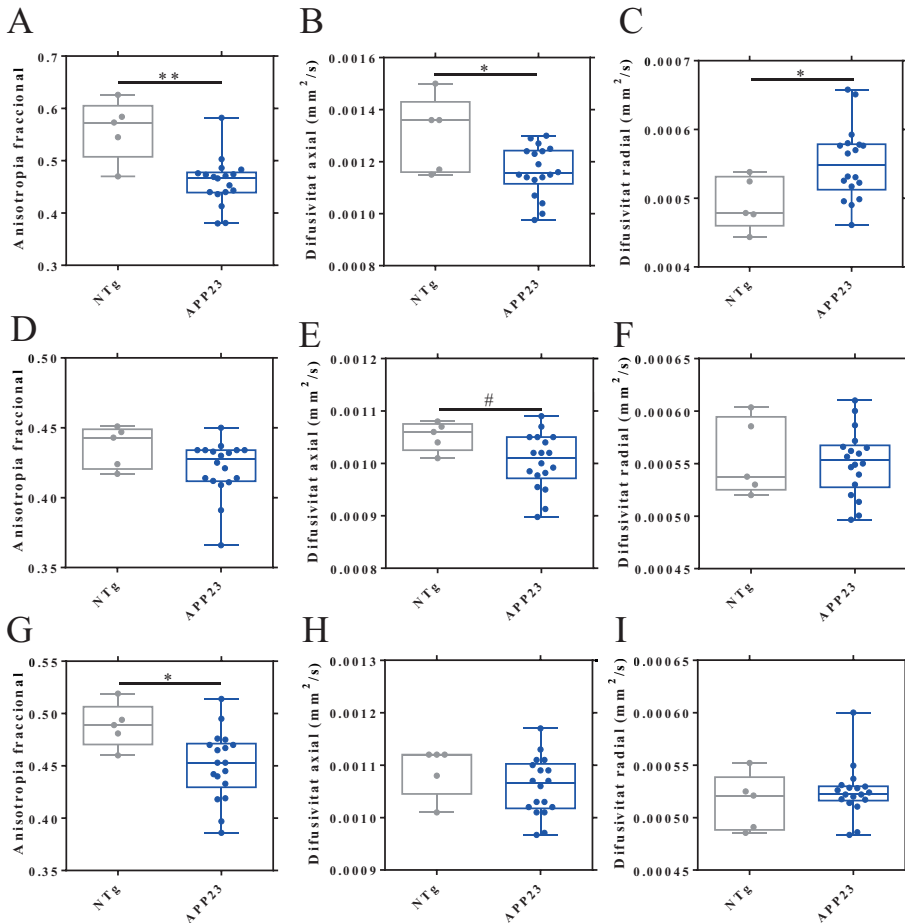


Figura R-3.3. L'APP23 presenta dany axonal i alteracions en la mielina en el cos callós frontal. Comparativa dels valors de difusivitat entre ratolins NTg (gris) i APP23 (blau) en el cos callós (A-C) rostral, (D-F) mitjà i (G-I) caudal. (A) Anisotropia fraccional rostral. (B) Difusivitat axial rostral. (C) Difusivitat radial rostral. (D) Anisotropia fraccional mitjà. (E) Difusivitat axial mitjà. (F) Difusivitat radial mitjà. (G) Anisotropia fraccional caudal. (H) Difusivitat axial caudal. (I) Difusivitat radial caudal. Les dades s'expressen en mediana i les barres d'error representen el valor màxim i mínim. Les diferències estadístiques van ser determinades amb el test no paramètric Mann-Whitney U-test. ** Diferència significativa $p \leq 0.01$; * Diferència significativa $p \leq 0.05$; # significança marginal $p \leq 0.1$; § $r \geq 0.61$.

El volum del cervell no es veu afectat per la immunoteràpia contra l'A β

Un dels principals efectes de l'AD sobre la morfologia del cervell és la seva atròfia, per tant, per tal d'avaluar un possible efecte terapèutic del fàrmac, es va mesurar el volum total del cervell per mitjà d'imatges d'alta resolució ponderades en T₂. Recentment, el grup va demostrar que el tractament longitudinal amb l'scFv-h3D6 en ratolins joves és capaç de frenar l'atròfia de certes regions cerebrals (200,201). A mode de caracterització del model, en aquesta tesi també es va quantificar el volum del cervell abans del tractament de ratolins no transgènics (NTg) i ratolins APP23 i, com es pot veure a la **Figura R-3.4A**, als 27 mesos d'edat l'atròfia dels ratolins APP23 és similar a la dels ratolins control. Per tant, el tractament agut contra el pèptid A β no és capaç de revertir la pèrdua de volum cerebral (**Figura R-3.4B**).

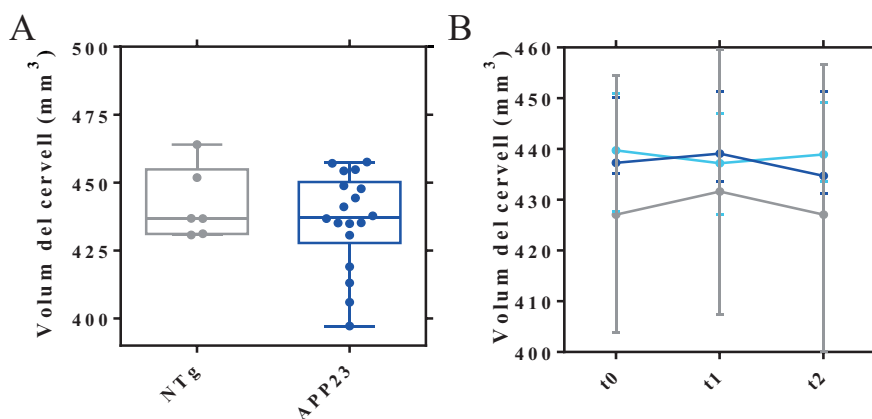


Figura R-3.4. El volum del cervell no es veu afectat per l'administració d'immunoteràpia contra l'A β . **(A)** Volum total del cervell de ratolins NTg (gris) i APP23 (blau). Als 27 mesos d'edat l'atròfia cerebral en els ratolins no transgènics i els ratolins APP23 no presentava diferències significatives. **(B)** Evolució del volum del cervell a través del temps en ratolins APP23-PBS (gris), APP23-scFv-h3D6 (blau fosc) i APP23-mAb-m3D6 (blau clar). Les dades s'expressen en medianes i les barres d'error representen el valor màxim i mínim.

El bapineuzumab va demostrar ser eficaç a l'hora de reduir els nivells d'A β en humans, tot i que no va ser capaç de demostrar una millora cognitiva (258).

Encara que el volum del cervell dels ratolins APP23 no es veu afectat pel tractament, anteriorment ja s'havia determinat la capacitat de l'scFv-h3D6 de reduir els nivells d'A β en ratolins 3xTg-AD, tant en etapes primerenques de la malaltia (200,201,203,233) com en ratolins de 22 mesos d'edat sense promoure una resposta inflamatòria destacable (apartat anterior). Tot i així, era necessari determinar si l'eliminació de la regió Fc tenia algun efecte sobre la capacitat de l'scFv-h3D6 d'unir-se i eliminar l'A β en aquest model, l'APP23. El primer que cal destacar és que els nivells d'A β són majors en les fraccions solubles en SDS i en FA que en la fracció soluble en TBS, el que indica la predominança de les formes agregades en etapes avançades de la malaltia. També es pot observar que els nivells del pèptid A β es veuen reduïts en l'hipocamp després dels tractaments (**Figura R-3.5**). Concretament, tant l'scFv-h3D6 com el mAb-m3D6 promouen un descens significatiu en els nivells d'A β_{1-40} en la fracció TBS (U =0, p-valor =0.0022, r =1 i U =2; p-valor =0.0087, r =0.88, respectivament) com en la soluble en àcid fòrmic (FA) (U =3, p-valor =0.0152, r =0.83 i U = 0, p-valor =0.0022, r =1, respectivament) (**Figura R-3.5A-C**). Els nivells de pèptid A β_{1-42} no es veuen alterats (**Figura R-3.5D-F**), tot i que és lògic pensar que degut a la diferència d'expressió d'ambdues variant de l'A β , la unió més probable dels anti-A β es dona amb l'A β_{1-40} . Per tant, l'eliminació de la regió Fc no alteraria la capacitat d'unir-se a l'A β que té inicialment l'anticòs sencer mAb-m3D6.

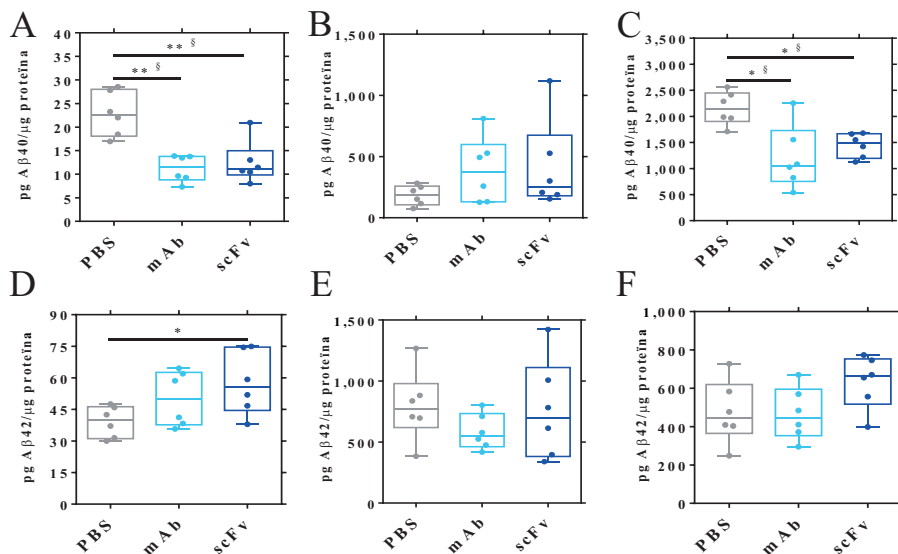


Figura R-3.5. La immunoteràpia contra l'A β redueix els nivells d'A β ₁₋₄₀ insoluble en l'hipocamp. (A-C) Nivells A β ₁₋₄₀ quantificats per ELISA i normalitzats per la concentració de proteïna. Nivell d'A β ₁₋₄₀ en la (A) fracció TBS, en la (B) fracció SDS i en la (C) fracció FA. (D-F) Nivells A β ₁₋₄₂ quantificats per ELISA i normalitzats per la concentració de proteïna. Nivell d'A β ₁₋₄₂ en la (D) fracció TBS, en la (E) fracció SDS i en la (F) fracció FA. Tres replicats per experiment. Les dades s'expressen en medianes i les barres d'error representen el valor màxim i mínim. Les diferències estadístiques van ser determinades amb el test no paramètric Mann-Whitney U-test. * Diferència significativa $p \leq 0.05$; # significança marginal $p \leq 0.1$; § $r \geq 0.61$. Figura cedida per Alejandro R. Roda.

La presència de regió Fc provoca més ARIA-H en el còrtex i el teixit estriat, però no més ARIA-E

Tal i com s'ha vist en els subapartats anteriors, el model APP23 pot ser útil per a determinar la capacitat d'un fàrmac d'induir ARIA-H, doncs per si mateix en presenta. Com s'ha dit anteriorment, un dels principals efectes adversos observats en la immunoteràpia amb anticossos monoclonals sencers és l'aparició d'ARIA-H i ARIA-E (184,191,249). La producció de fragments d'anticossos hauria de representar un avantatge front els mAbs degut a la falta de regió Fc, la falta del qual evitaria l'activació del sistema immunitari del cervell i aquest no induiria l'aparició de microhemorràgies i edema. A la **Taula**

Figura R-3.6. L'scFv-h3D6 no provoca ARIA-H i el mAb-m3D6 sí. (A) Seccions coronal representatives d'un ratolí APP23 tractat amb mAb-m3D6 (superior) al principi de l'experiment (esquerra), després de la primera administració (centre) i després del segon tractament (dreta); i seccions coronals representatives d'un ratolí APP23 tractat amb scFv-h3D6 (inferior) als mateixos temps. Les lesions presents des de l'inici de l'experiment es marquen amb fletxes blaves i les noves amb fletxes vermelles. (B) Número total de noves hemorràgies induïdes en els diferents tractaments. (C-E) Número de noves lesions hemorràgiques després de la primera administració en el (C) còrtex, en el (D) teixit estriat i en el (E) l'hipocamp. (F-H) Número de noves lesions hemorràgiques després de la segona administració en el (F) còrtex, en el (G) teixit estriat i en (H) l'hipocamp. Les dades s'expressen en mediana i les barres d'error representen el valor màxim i mínim. Les diferències estadístiques van ser determinades amb el test no paramètric Mann-Whitney U-test. * Diferència significativa $p \leq 0.05$; # significança marginal $p \leq 0.1$; § $r \geq 0.61$.

Pel que fa al volum de les hemorràgies, es va determinar la variació de volum de les hemorràgies preexistents a l'inici de l'estudi després de la primera i la segona sessió de ressonància (**Figura R-3.7A, B**). Com es pot veure, no hi ha un efecte dels tractaments sobre el volum de les hemorràgies preexistents, doncs els valors són molt similars als volums obtinguts pel tractament amb PBS. A mode de control intern, es va determinar el volum de les lesions que apareixien després de la primera administració (**Figura R-3.7C**) i com s'indica, el volum de les noves hemorràgies és igual per als tres tractaments, indicant que no va existir un biaix a l'hora de considerar el que era una nova hemorràgia i el que no. De la mateixa manera, l'increment de volum de les noves hemorràgies al final de l'experiment no és diferent entre els tractaments (**Figura R-3.7D**).

Taula 5. Resum del número total i de noves hemorràgies en els ratolins APP23.

	Nfg (n=6)			APP23 (n=18)			APP23-PBS (n=6)			APP23-mAb-m3D6 (n=6)			APP23-scFv-h3D6 (n=6)		
	Número de lesions			Número de noves lesions			Número de noves lesions			Número de noves lesions			Número de noves lesions		
	Mitjana	SD		Mitjana	SD		Mitjana	SD		Mitjana	SD		Mitjana	SD	
Total	t0	17.3	± 2.6			± 15.9									
	t1			24.9 #			0.7	± 1.2		4.5 * §	± 2.8		0.8	± 1.0	
	t2						0.7	± 0.8		5.3 # §	± 3.78		1	± 1.1	
Còrtex	t0	3.5	± 2.8		11.5 *	± 10.0									
	t1						0.2	± 0.41		3.2 * §	± 2.79		0	± 0.0	
	t2						0.5	± 0.55		2.8	± 3.37		0.7	± 1.21	
Teixit estriat	t0	10.3	± 3.2		10.2	± 6.5									
	t1						0.3	± 0.82		1.2	± 1.0		0.7	± 0.8	
	t2						0	± 0.0		1.8 #	± 2.5		0	± 0.0	
Hipocamp	t0	1	± 1.1		2.2	± 2.0									
	t1						0	± 0.0		0.2	± 0.4		0	± 0.0	
	t2						0	± 0.0		0.3	± 0.5		0.3	± 0.5	
Altres regions	t0	2.5	± 3.1		1.1	± 1.9									
	t1						0.2	± 0.4		0	± 0.0		0.2	± 0.4	
	t2						0.2	± 0.4		0.3	± 0.5		0	± 0.0	

Per altra banda, tot i que el mAb-m3D6 provoca un augment en el número de lesions hemorràgiques, no s'observa l'aparició d'ARIA-E arrel dels tractament ni pel curs normal de la malaltia ni en el còrtex, ni en el teixit estriat, ni en l'hipocamp (**Figura R-3.8A-F**). El que sí que es pot veure és que en el còrtex el valor del temps de relaxació transversal (T_2) tendeix a augmentar després del tractament amb scFv-h3D6 i el test mida de l'efecte revela que aquest augment és real ($U = 6$; p-valor = 0.0918, $r = 0.67$) (**Figura R-3.8D**). Aquest augment podria ser provocat per una reducció en els nivells d'A β o per la presència d'ARIA-E, el que entraria en contradicció amb els nivells d'A β detectats per ELISA en el còrtex per un company de laboratori (dades no mostrades) i amb els valors d'ADC, que no van mostrar ARIA-E (**Figura R-3.8B**), respectivament. Resultats previs del grup ja van mostrar contradiccions similars a l'estudiar l'aparició d'ARIA-E en el model 3xTg-AD (201,244), que apuntarien a la contribució de múltiples factors en els paràmetres de T_2 i ADC dificultant la seva interpretació.

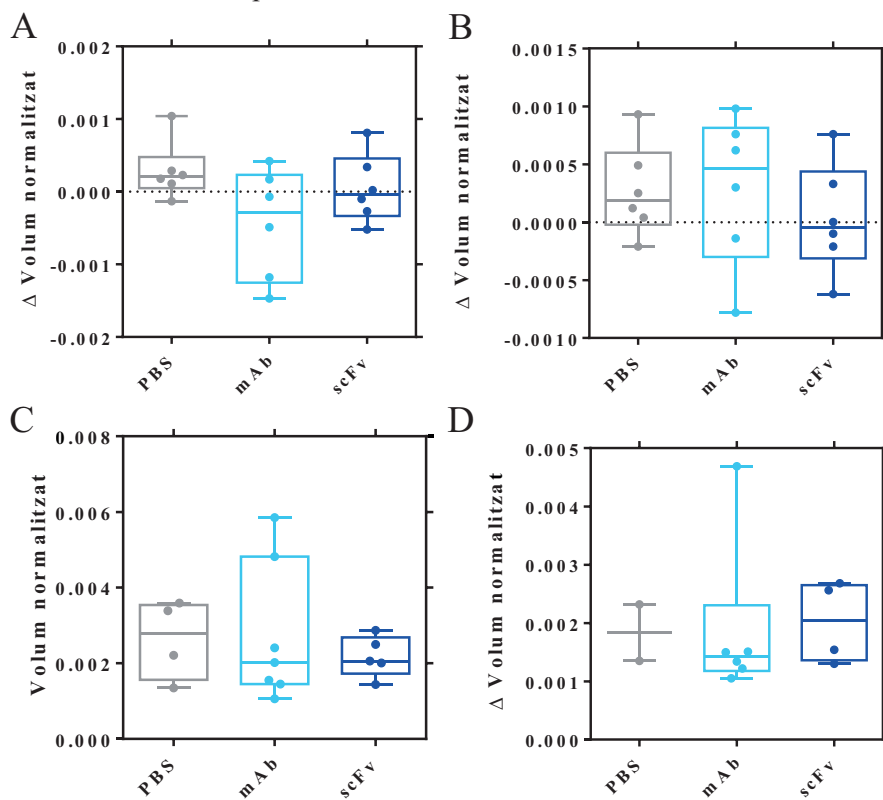


Figura R-3.7. La immunoteràpia contra el pèptid A β no té efecte sobre el volum de les hemorràgies. (A) Increment de volum de les hemorràgies preexistents després de la primera administració de fàrmac. (B) increment de les mateixes lesions preexistents després de la segona administració. (C) Volum inicial de les noves lesions detectades. (D) Increment de volum de les noves lesions després de la segona administració. Les dades s'expressen en mediana i les barres d'error representen el valor màxim i mínim. Les diferències estadístiques van ser determinades amb el test no paramètric Mann-Whitney U-test. * Diferència significativa $p \leq 0.05$; # significança marginal $p \leq 0.1$; § $r \geq 0.61$.

La immunoteràpia contra el pèptid A β no reverteix el dany axonal ni el deteriorament de la mielina

Com s'ha comentat anteriorment, tant l'scFv-h3D6 com el mAb-m3D6 són capaços de reduir la càrrega amiloide en els ratolins APP23 després de dues injeccions, però diversos estudis han demostrat que en etapes avançades de l'AD, la reducció del pèptid A β no és suficient per a revertir el deteriorament cognitiu. A més, està descrita l'afectació de la matèria blanca en l'AD i la correlació amb el declivi cognitiu. Anteriorment s'ha determinat que els ratolins APP23 poden servir com a model de dany axonal i lesions desmielinitzants i que ambdós fenòmens es donen durant la progressió de l'AD. Per tant, és de capital importància determinar si l'scFv-h3D6 i/o el mAb-m3D6 són capaços de revertir aquesta degeneració, per tal d'avaluar la seva capacitat per a revertir o frenar l'AD. En la **Figura R-3.9A-I** podem veure l'efecte dels tractament sobre les principals difusivitats en el cos callós. En el cos callós rostral, l'scFv-h3D6 promou un augment de la difusivitat axial ($U = 2.5$; p -valor = 0.0473; $r = 0.86$) (**Figura R-3.9B**), però no de l'anisotropia fraccional ni de la difusivitat radial (**Figura R-3.9A i C**). En la regió mitjana, el valor de l'anisotropia fraccional tendeix a reduir-se tant amb el tractament amb scFv-h3D6 com amb el de mAb-m3D6 ($U = 4$; p -valor = 0.091; $r = 0.78$ i $U = 2.5$; p -valor = 0.0849; $r = 0.86$, respectivament) (**Figura R-3.9D**). Normalment una reducció en l'anisotropia fraccional implica un moviment menys anisotròpic de l'aigua, és a dir, un moviment menys dirigit, que pot ser degut a la disrupció de

les estructures neuronals, tot i que no és possible assegurar-ho sense la comprovació histològica. En la regió caudal (**Figura R-3.9G-I**) no s'observen diferències entre els tractament i el control tractat amb PBS. Tot i que hi ha una diferència significativa en la difusivitat axial del CC rostral, el balanç global apunta, de nou, a que a una fase avançada de la malaltia, la reducció dels nivells de pèptid amiloide no és suficient per revertir els efectes neurodegeneratius de l'AD.

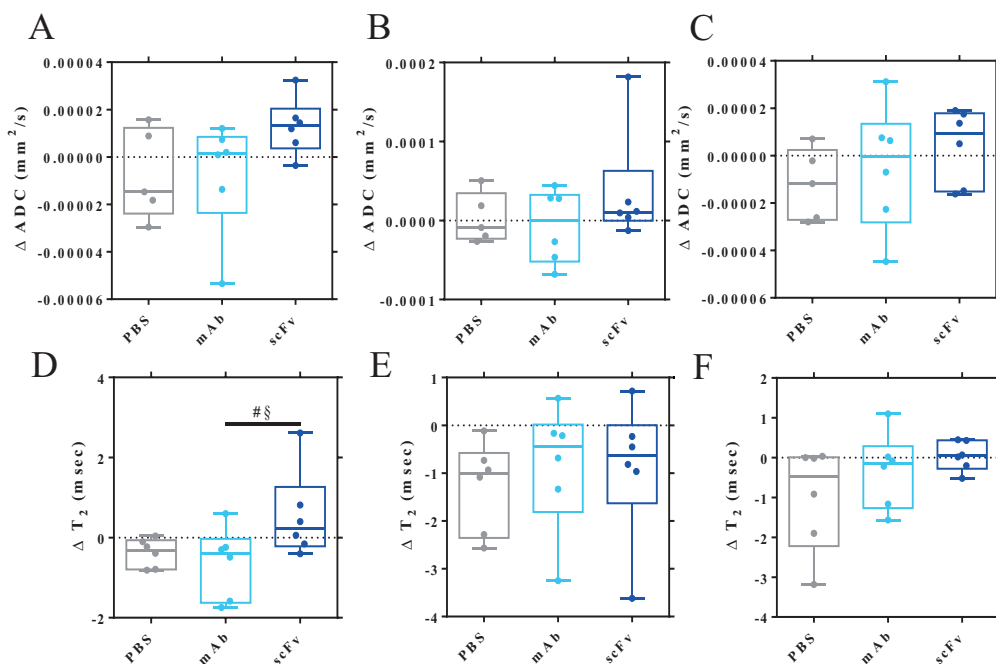


Figura R-3. 8. Els diferents tractaments no promouen l'aparició d'ARIA-E. Efecte del scFv-h3D6 (blau fosc), del mAb-m3D6 (blau clar) en comparació amb el control tractat amb salí (gris) (A-C) sobre els valors d'ADC al final de l'experiment en el (A) còrtex, en el (B) teixit estriat i en (C) l'hipocamp. (D-F) Increment dels valors de T₂ en el (D) còrtex, en el (E) teixit estriat i en (F) l'hipocamp. Els valors s'han obtingut de la resta entre els valors mesurats a temps final i temps inicial Les dades s'expressen en mediana i les barres d'error representen el valor màxim i mínim. Les diferències estadístiques van ser determinades amb el test no paramètric Mann-Whitney U-test. * Diferència significativa $p \leq 0.05$; # significança marginal $p \leq 0.1$; § $r \geq 0.61$.

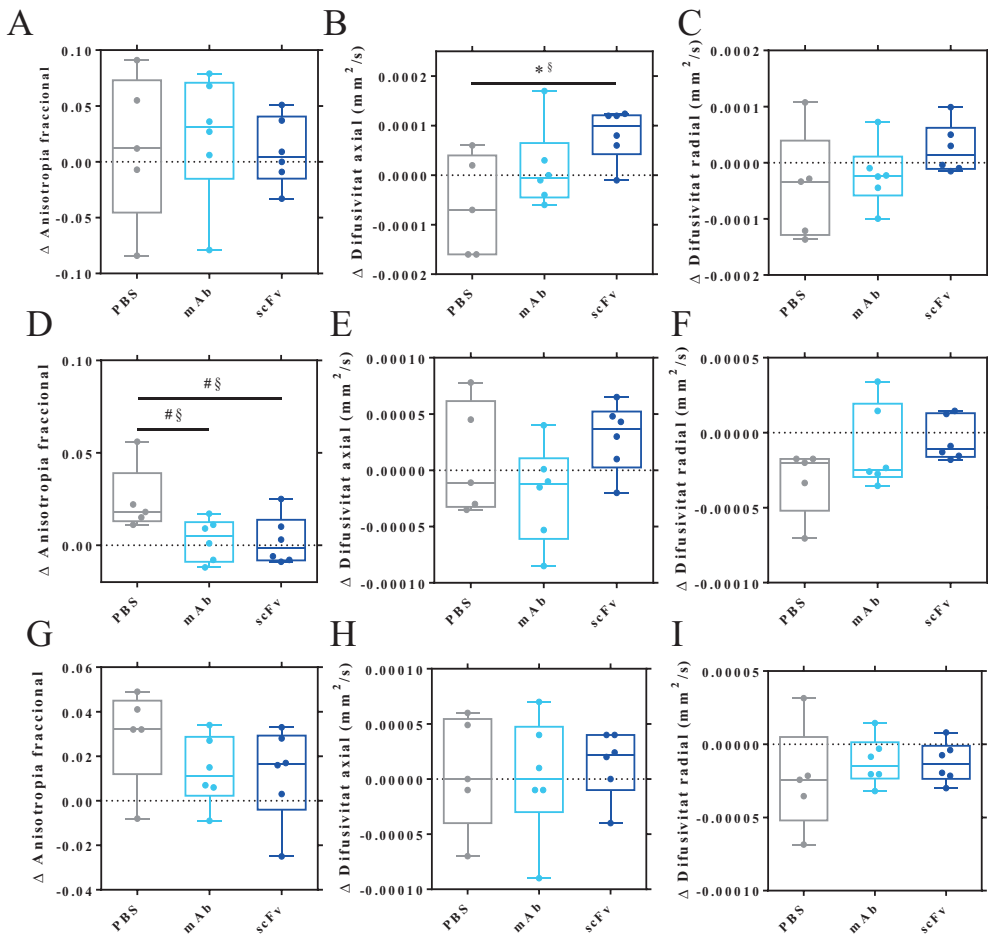


Figura R-3. 9. La immunoteràpia contra l'A β no és capaç de revertir el dany axonal ni la degradació de la mielina en el cos callós. Efecte del scFv-h3D6 (blau fosc), del mAb-m3D6 (blau clar) en comparació amb el control tractat amb salí (gris) al final de l'experiment en els valors de difusivitat en el cos callós (A-C) rostral, (D-F) mitjà i (G-I) caudal. (A) Increment de l'anisotropia fraccional rostral. (B) Increment de la difusivitat axial rostral. (C) Increment de la difusivitat radial rostral. (D) Increment de l'anisotropia fraccional mitjà. (E) Increment de la difusivitat axial mitjà. (F) Increment de la difusivitat radial mitjà. (G) Increment de l'anisotropia fraccional caudal. (H) Increment de la difusivitat axial caudal. (I) Increment de la difusivitat radial caudal. Els valors s'han obtingut de la resta entre els valors mesurats a temps final i temps inicial. Les dades s'expressen en mediana i les barres d'error representen el valor màxim i mínim. Les diferències estadístiques van ser determinades amb el test no paramètric Mann-Whitney U-test. * Diferència significativa $p \leq 0.05$; # significança marginal $p \leq 0.1$; § $r \geq 0.61$.

Com a conclusió el tractament amb l'scFv-h3D6 representa una teràpia igual d'efectiva que el mAb-m3D6, doncs ambdós tractaments tenen la capacitat de reduir els nivells d'A β de manera similar. Tot i això, la falta de regió Fc presenta una avantatge pel que fa a seguretat, doncs l'scFv-h3D6 no indueix l'aparició d'ARIA-H, mentre que el mAb-m3D6 sí.

Discussió



I- La dimerització forçada del fragment variable d'un anticòs implicat en l'amiloïdosi de cadena lleugera modifica la seva via d'agregació

En aquest estudi es va realitzar la caracterització de les vies de desplegament i d'agregació de les proteïnes scFv derivades de la línia germinal κI O18/O8 i la seva contrapartida amiloidogènica, l'AL-09, el VVK08 i el VVA09, respectivament. El primer resultat d'aquest estudi va ser que tant el VVK08 com el VVA09 presenten estructura quaternària. Concretament, el VVK08 forma trímers i el VVA09 forma dímers i tetràmers. L'assemblatge dels scFv fa quasi 20 anys que està descrit i en general no afecta a la funció o l'estructura global (259,260). No és sorprenent que el VVK08 i el VVA09 formin associacions diferents, trimèrica i dimèrica respectivament, doncs les mutacions entre la línia germinal i l'AL-09 en la seva majoria es localitzen a la interfície dimèrica, generant una rotació dels dominis que en el cas dels scFv podria generar contactes intermoleculars diferents i, per tant, que les molècules s'associïn de manera diferent (46,47). A més, el VV09 presenta una forma tetramèrica que és un intermediari estable en la via d'agregació del VVA09, que en estat natiu, forma dímers.

En primer lloc, els dominis variables de les cadenes lleugeres de les immunoglobulines estan formats per una estructura altament conservada, caracteritzada per un sandvitx β format per dues fulles β antiparal·leles connectades per tres llaços desestructurats que comprenen els CDRs. Els espectres de CD no es van deconvular en les diferents components, doncs tant el VVK08 com el dímer del VVA09 presenten el plegament típic de les LC, dels scFv i dels V_L , els quals contenen artefactes a 227 i 235 nm (33,39,41–44,47,49,50,197). Els resultats de l'ATR en estat natiu van confirmar que l'estructura secundària és la canònica. Per tant, tal i com s'esperava el format scFv no altera l'estructura secundària dels dominis V_L originals tot i la presència del connector peptídic, com s'havia descrit anteriorment (197,261).

Per altra banda, el tetràmer de VVA09 no presenta l'estructura típica de les Ig, doncs la seva estructura és tot β i presenta un nucli hidrofòbic diferent al dímer del VVA09.

En estudiar la via de desplegament del VVK08 i el VVA09 es pot observar com el desplegament de les proteïnes s'ajusta a una corba sigmoïdal, és a dir, es tracta d'un desplegament en dos estats. Això era esperable, doncs aquests scFvs es troben formats per dos dominis iguals i, a diferència d'altres scFvs formats per un domini V_H i un domini V_L no presenten un desplegament en tres estats, en el que l'intermediari correspondria a una estructura amb el domini més estable plegat, normalment el domini V_H , i el menys estable, el V_L , desplegat (202). La corba de desplegament del tetràmer apunta en la direcció que aquesta conformació es troba en un pou energètic, degut a la major estabilitat respecte al dímer del VVA09. Per contra, al comparar l'estabilitat dels scFvs amb els dominis V_L dels quals deriven (**Taula 3**) es veu com en el cas del VVK08 l'estabilitat es manté i, alhora es guanya cooperativitat, indicant que el format scFv facilita la compactació de l'estructura terciària respecte al domini V_L del qual deriva. Per contra, els resultats de la fluorescència a 4°C indiquen que el màxim d'emissió del VVK08 respecte als dominis C_L - V_L del κ I O18/O8 no varia, pel que es pot concloure que el Trp està ben enterrat en el nucli hidrofòbic en ambdós casos (241). Pel que fa al dímer del VVA09, tant l'estabilitat com el grau de compactació es troben reduïts respecte a l'AL-09, apuntant en la mateixa direcció que els resultats obtinguts de l'estructura terciària mitjançant la fluorescència. És possible que al forçar la dimerització, i tenint en compte que el dímer natural de l'AL-09 presenta una interfície dimèrica rotada 90°C respecte a la canònica, es produeixin impediments estèrics que alterin el grau de compactació i, alhora, l'estabilitat. Martsev i els seus col·laboradors van determinar que tot i que l'estructura secundària no està dramàticament afectada per la presència del connector peptídic en un scFv anti-ferritina, l'estabilitat de l'estructura terciària i quaternària podien estar alterades (261), com seria en el cas del VVK08 i, especialment, el VVA09.

En estudiar la desnaturalització tèrmica i donat que tant la línia germinal κ I O18/O8 com l'AL-09 han estat àmpliament estudiades, era lògic hipotetitzar que el VVA09 seria menys estable i més amiloidogènic que el VVK08. Com s'esperava, el VVK08 presenta una major estabilitat tèrmica que el dímer del VVA09, amb un valor de T_a que difereix en 7°C. Aquest no és el primer cas en que es comparen les estabilitats tèrmiques de proteïnes implicades en l'AL amb els seus homòlegs no amiloidogènics. En tots els casos, la proteïna amiloidogènica (BIF, SMA i Jto) és menys estable que la línia germinal (GAL, LEN i REC i Wil) (37,40,44). A més, cal mencionar que la formació d'scFvs no afecta a l'estabilitat tèrmica del VVA09, doncs té un valor de T_a similar a altres proteïnes amiloidogèniques implicades en l'AL, les quals oscil·len entre els 38.3°C i els 45.1°C (33,37,39,42,43,47,49,50).

Finalment, la troballa més destacable seria que tant el VVK08 com el VVA09 presenten intermediaris en la via d'agregació. En el cas del dímer del VVA09 aquest intermediari altament estable mostra una conformació tot β que pobla la via òptimament als 47°C, coincidint amb l'estabilització del senyal seguit per CD a 218 nm, per tant, els canvis conformacionals de l'estructura secundària i terciària del VVA09 es produeixen a aquesta temperatura. Les dades d'ATR no mostren un augment de la component fulla β nativa, sinó un augment de la component β amiloide, el que concordaria amb la transició a un intermediari metaestable propens a l'agregació induït per temperatura. En el cas del VVK08 a part de l'augment del senyal de fulla β , l'intermediari també presenta un augment del senyal a 210 nm (*random coil*). Aquest augment de la component *random coil* també s'observa per ATR. En el cas del VVK08, l'aparició de l'intermediari en la via d'agregació no és tan evident, però l'estabilització del senyal seguit per CD a 218 nm s'assoleix 14°C després que en el del dímer del VVA09. És a dir, en ambdós casos el contingut de fulla β incrementa sense un procés previ de desplegament, per tant es produeix una reorganització directa de l'estructura secundària des de l'estat natiu que propiciaria l'agregació. Per tant, a diferència del dominis V_L AL-09 i κ I O18/O8, el dímer del VVA09 i el

VVK08 no despleguen a mesura que augmenta la temperatura (241) sinó que agreguen tal i com s'ha vist per CD, on hi ha un augment del senyal a 218 nm. En consonància amb la formació de fibres, el procés de desnaturalització tèrmica és bàsicament irreversible per a totes les proteïnes estudiades, com es pot veure a la majoria d'espectres desnaturalitzats i renaturalitzats, els quals no recuperen la conformació nativa després de la renaturalització, sinó que mantenen l'estructura secundària dels intermediaris.

Sota unes condicions específiques tant el κI O18/O8 com l'AL-09 formen fibres amiloides (47). Les imatges de TEM demostren que tant el VVK08 com el dímer del VVA09 formen fibres de tipus WL després d'una incubació de 15 minuts a 60°C i a 95°C i després de 24h a 37°C, però després de 96h a 37°C el dímer de VVA09 comença a presentar fibres amiloides mentre que el VVK08 no. Alhora, al promoure la transició conformacional cap als intermediaris, el VVK08 segueix formant fibres WL després de 24 i 96h, però el dímer del VVA09 és capaç de formar fibres amiloides amb tan sols 24h, igual que el seu tetràmer, resultats que reforcen la teoria plantejada, on la reestructuració del dímer cap a tetràmer, promouria un augment de l'amiloidogeneïtat. Tot i així, les vies WL i amiloide són mútuament excloents (9), per tant, existeix la possibilitat que el VVA09 pugui seguir dues vies d'agregació (**Figura D-1**), com és el cas del lisozim (11) on la mateixa seqüència pot seguir una via o una altra depenent de les condicions d'agregació. Els resultats d'aquest estudi demostren que la dimerització forçada promou el desplaçament dels oligòmers d'scFv cap a la via WL en el cas del VVK08, però no en el cas del VVA09, en lloc de la via amiloide seguida pels dominis V_L aïllats i podrien ser de gran utilitat, doncs estudis previs indiquen que les fibres WL disminueixen l'efecte citotòxic del pèptid Aβ (197) i obren la porta al disseny de fàrmacs enfocats a canviar la via d'agregació dels dominis V_L. A més, la possibilitat que el dímer del VVA09 pugui formar fibres amiloides també posa sobre la taula la opció que els scFvs aquí estudiats puguin ser emprats en *screenings* massius per a

l'assaig de potencials fàrmacs enfocats a evitar l'agregació amiloide o a trencar les fibres ja formades.

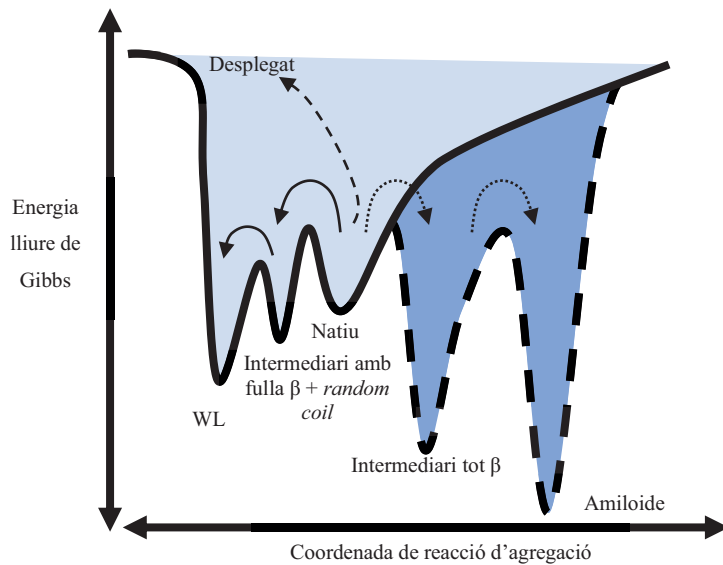


Figura D-1. Esquema de l'embut d'agregació dels scFvs de l'AL. En ambdós casos el desplegament seguiria una via de dos estats (fletxa discontinua), amb un estat plegat i un desplegat on no hi hauria un intermediari. En el cas de la via d'agregació, el VVK08 (blau clar, fletxa sòlida) en l'estat natiu roman estable, a l'aplicar temperatura es produeix un salt energètic i el VVK08 cau en un estat intermediari menys estable i amb una certa component *random coil*, que porta a la formació de fibres *worm-like* (WL), però no a la formació de fibres amiloides. Per altra banda, el VVA09 (blau fosc) des d'un inici es troba en dos estats energètics, en forma nativa com a dímer i en forma d'intermediari tot β en la via amiloide com a tetràmer. En condicions normals, l'estat natiu segueix la via d'agregació de tipus WL (fletxa sòlida), igual que el VVK08, via que està fora de la via d'agregació amiloide, però si s'hi aplica temperatura, el dímer pateix una reorganització cap a tetràmer (intermediari en un pou energètic) que porta a la formació de fibres amiloides (fletxa de punts).

Com a conclusió, la dimerització forçada del domini V_L de la línia germinal κI O18/O8 dóna lloc a l'aparició de la via d'agregació tipus WL, una via d'agregació que anteriorment s'ha demostrat no ser citotòxica en el cas del pèptid Aβ, mentre que en el cas de la seva variant amiloidogènica, el VVA09,

forma fibres amiloides. Tot i que no és segur que en el cas de l'AL aquests WL no siguin citotòxics, s'obre la porta a seguir aquesta línia d'investigació en el camp del tractament de les amiloidosis sistèmiques, dissenyant/testant molècules que estabilitzin les fibres WL i així evitar tant els efectes citotòxics dels oligòmers com els efectes en la fisionomia del cor de les fibres amiloides. Per això, el sistema VVK08 i VVA09 podria ser emprat com a sistema per a l'assaig massiu de molècules que desplaressin la via amiloide cap a la via WL. En definitiva, el principal estudi prospectiu d'aquest treball seria la determinació de l'estructura tridimensional per mitjà de cristal·lografia o ressonància magnètica per tal de poder fer el disseny informàtic de les molècules estabilitzadores. A més, seria necessària la realització d'assajos citotòxics en cardiomiòcits per tal d'estudiar la citotoxicitat de les fibres WL, seguit de l'estudi de les cinètiques d'agregació del VVK08 i el VVA09.

II- Tant el pèptid A β com la proteïna tau es van veure afectades per un fragment d'anticòs anti-A β en ratolins 3xTg-AD d'edat avançada

Els coneixements sobre les proteïnes i les vies implicades en l'AD no deixen de créixer exponencialment any rere any, tot i així traslladar les estratègies terapèutiques dels estudis preclínics al assajos clínics tan sols ha tingut èxit en un assaig clínic (262). No està clar quin és el motiu del reduït nombre de resultats positius en les proves clíniques, però entre els diferents factors que s'han proposat com els causants es troben l'avançat estat de la malaltia quan es comença a tractar o el fet de dirigir les teràpies a reduir l'A β o tau, en lloc d'atacar ambdues proteïnes alhora.

El bapineuzumab, la forma humanitzada de l'anticòs monoclonal de ratolí 3D6, dirigit contra la regió N-terminal de l'A β és capaç d'unir-se tant a les formes fibril·lars com solubles de l'A β (263). Tot i que l'administració del bapineuzumab va ser capaç de reduir els nivells d'A β i tau, l'aparició d'efectes adversos severos i la falta de millores en la cognició va propiciar la discontinuació dels assajos (184). Amb l'objectiu d'evitar els efectes adversos associats a la sobre-activació de la micròglia associada a la Fc de les immunoglobulines, es va dissenyar un scFv sense la regió Fc, anomenat scFv-h3D6 (197). Una sola administració d'scFv-h3D6 en ratolins femella 3xTg-AD de 5 mesos d'edat, en els quals la patologia es troba en fases primerenques, és capaç de reduir els nivells de pèptid amiloide i alhora millorar el deteriorament cognitiu associat a la sobrecàrrega d'A β intraneuronal (111,203). L'scFv-h3D6 també redueix la captació d'A β per part d'astròcits aïllats de teixit cerebral humà, el que seria beneficiós ja que la captació sostinguda podria alterar la seva funció normal (198,199). Tot i així, actualment el diagnòstic es sol produir quan la càrrega amiloide és alta i la simptomatologia és clara (264). Per tant, estudiar l'efecte de l'administració de l'scFv-h3D6 en ratolins d'avançada edat, on la

patologia amiloide i tau es troba en una fase avançada, és de capital rellevància per avaluar el potencial terapèutic d'aquest fragment d'anticòs.

Després d'un període relativament curt de tractament, la quantificació per immunohistoquímica revela que s'aconsegueix una reducció en la càrrega amiloide i, tot i que no s'assoleix una diferència significativa, el valor mitjà del número de plaques es redueix en ratolins 3xTg-AD després del tractament amb l'scFv-h3D6. Tot i així, cal destacar que l'àrea total d'A β es redueix significativament després del tractament, per tant es pot dir que l'scFv-h3D6 elimina els agregats amiloides no només de l'espai intracel·lular (203), sinó que també és capaç d'eliminar els agregats extracel·lulars, el que està en concordança amb la capacitat de l'scFv-h3D6 de reduir els oligòmers (trímers, hexàmers, nonàmers i dodecàmers) d'A β_{1-40} en ratolins 3xTg-AD de 5 mesos d'edat (111). En el treball del grup on s'emmarca aquest estudi sobre els nivells de tau i interleuquines, també s'ha demostrat la reducció dels nivells d'A β_{1-40} i d'A β_{1-42} en les fraccions TBS, SDS i FA i, tot i que no s'observa una diferència significativa, sinó una tendència en la reducció del nivell d'A β_{1-40} en la fracció SDS, el test mida de l'efecte demostra que aquesta disminució és real. A més, la tendència observada en totes les fraccions concorda amb els anàlisis histològics que indiquen que l'scFv-h3D6 és capaç de reduir la càrrega d'A β fins i tot en estadis avançats de la patologia. És possible que els anticossos anti-A β quedin retinguts en les plaques senils (265), evitant la possibilitat d'eliminar els oligòmers, el que podria explicar, només en part, per que la immunoteràpia contra l'A β no és efectiva, ja que si l'anticòs no elimina els oligòmers, queden lliures les espècies més tòxiques. Per tant, dosis majors, un tractament més crònic o un redisseny dels anticossos per a augmentar la unió als oligòmers podrien millorar l'eficàcia del tractament.

És important recordar que és la hiperfosforilació de tau la que correlaciona amb el declivi cognitiu associat amb la progressió de l'AD (56,266), és a dir, la reducció dels nivells de tau és crític per a millorar els símptomes relacionats amb la demència i està àmpliament documentada la interacció entre l'A β i tau

(267). Per una banda l'A β i l'AICD poden promoure la hiperfosforilació de tau (268) i, per l'altra, algunes característiques patogèniques dels models transgènics es reverteixen després de la deleció del gen de tau (269). Considerant que el bapineuzumab és efectiu a l'hora de reduir els nivells de tau en el CSF (245), en aquesta tesi es va investigar si l'scFv-h3D6 era capaç de reduir els nivells de tau total i fosforilada en l'hipocamp. Els resultats indiquen que hi ha una tendència a reduir els nivells de tau (p-valor ≤ 0.1) i el test mida de l'efecte indica que aquesta reducció és real ($r \geq 0.68$). Cal destacar el fet que el tractament és efectiu en només dues setmanes i en un estadi molt avançat de la malaltia, quan la patologia tau està ben establerta. Pot ser per això no és possible reduir els nivells de tau fosforilada en la Ser202 i la Thr205, que necessitaria un tractament més crònic o una intervenció més primerenca. Seran necessaris nous estudis analitzant els epítops de tau fosforilada per posar llum a l'efecte de la immunoteràpia contra l'A β sobre aquesta patologia. En un estudi recent, es van immunitzar ratolins 3xTg-AD amb DNA de l'A β_{1-42} i es va aconseguir reduir els nivells de tau total (270), tot i així, existeixen dues grans diferències, la primera és que ells van tractar els animals durant 20 mesos i que la immunització activa amb DNA és més insegura. Tot i que el mecanisme pel qual la immunoteràpia anti-A β influeix en la eliminació de tau no està completament explicat, ambdues patologies estan relacionades, per tant no és sorprenent que la reducció d'un pugui resultar en la reducció de l'altre (271).

Per tal d'explicar com es redueix la patologia amiloide a través dels anticossos anti-A β s'han proposat diversos mecanismes, un d'ells és la hipòtesi de la pica (*sink hypothesis* en anglès), la qual proposa que els mAbs que circulen pel torrent sanguini s'unirien i reduirien els nivells d'A β en sang i que això provocaria una efluència des del cervell per mantenir un equilibri en la concentració. El fet que els nivells d'A β_{1-40} en sang es vegin reduïts després de l'administració del bapineuzumab dona suport a aquesta hipòtesi (258). Tot i que és possible que l'scFv-h3D6 comparteixi aquesta via, s'ha demostrat que aquest fragment d'anticòs és capaç d'entrar al cervell i es troba tant en l'espai

extracel·lular com l'intracel·lular (235). Una altra avantatge de l'scFv-h3D6 és l'absència de la regió Fc, la qual promou l'activació de la glia i, en conseqüència, es pot evitar un augment de la resposta inflamatòria observada amb l'anticòs sencer (272).

És evident des de fa anys que la resposta inflamatòria i l'AD estan lligats, tot i que el rol del sistema immunològic en l'aparició o la progressió de l'AD no està completament descrit (273). Fa relativament poc, es va descriure que tant la cascada del complement com la micròglia intervenen en la pèrdua sinàptica (274), doncs certes variants de Trem2 incrementen el risc de patir AD (275) i, alhora, s'ha descrit la presència d'astro i micròglia reactiva envoltant plaques d'A β (276). Aquest estat pro-inflamatori a vegades augmenta després del tractament amb alguns mAbs anti-A β com a conseqüència de la sobreactivació de la glia (277,278).

En aquest treball s'estableix l'efecte de l'scFv-h3D6 sobre la concentració d'interleuquines en el cervell de ratolins femella 3xTg-AD de 22 mesos d'edat. El grup va descriure un augment dels nivells de GFAP, però no d'Iba1, el que indica la presència d'astroglíosis, però no de microglíosis en el model. Pel que fa a IL-1 β i TNF- α , ambdues secretades pels astròcits (279), els nivells es troben augmentats en el model 3xTg-AD d'avançada edat així com s'ha observat un augment dels nivells d'IL-33. L'administració de IL-33 en ratolins APP/PS1, model d'AD, millora el declivi cognitiu i la plasticitat sinàptica i redueix els nivells tant d'A β ₁₋₄₀ com d'A β ₁₋₄₂ en el còrtex (280). A més, s'ha descrit com l'eliminació de la IL-33 causa una acumulació de tau i l'aparició de símptomes similars al LOAD (281). Aquests resultats suggereixen que la IL-33 podria ser protectora front a l'AD, i s'ha vist que hi ha un augment de l'expressió de IL-33 en les proximitats de les plaques amiloides i els NFT (282). Per tot l'anterior, és possible que l'increment en els nivells de IL-33 en l'hipocamp del ratolins 3xTg-AD de 22 mesos d'edat pugui ser una resposta natural per a contrarestar la progressió de la malaltia i que després de l'administració repetida de l'scFv-h3D6, els nivells d'interleuquines no es vegin alterats respecte als 3xTg-AD no

tractats. Tot i que els nivells d'interleuquines no varien significativament, els valors d'aquestes són molt similars als nivells presents en els NTg, el que fa pensar que un tractament crònic des de l'inici dels símptomes podria mantenir les interleuquines en nivells no patològics.

L'scFv-h3D6 presenta diverses avantatges en comparació a l'anticòs sencer del qual deriva, com per exemple la major penetració al CNS (203) i la no activació del sistema immunitari (203,233), fins i tot en un estadi tardà de la malaltia, com es descriu en aquest treball. Per això, l'ús de fragments d'anticòs podria suposar una estratègia terapèutica més segura a l'hora de traslladar tractaments a altres malalties neurodegeneratives. Tot i així, el fet que la immunoteràpia contra el pèptid A β tan sols ha demostrat tenir efectes sobre la progressió o els símptomes de l'AD en un dels diversos assajos clínics en fase 3 es podria associar a que en els estadis en que es van testar, el pèptid amiloide no és l'únic implicat en la progressió, per tant, les teràpies combinades contra l'A β i/o contra tau, juntament amb moduladors del sistema immunitari i/o altres alternatives, com pèptids mimètics d'apolipoproteïnes (198–200), podrien constituir un tractament efectiu contra l'AD.

Com a conclusió general es pot dir que l'scFv-h3D6 millora els trets distintius de l'AD en ratolins femella de 22 mesos d'edat sense promoure una resposta inflamatòria detectable. És important remarcar que tot i que altres anticossos han promogut una millora en tests conductuals, no van ser capaços de millorar la càrrega d'A β o tau global en ratolins 3xTg-AD de 22 mesos d'edat (283). Els futurs estudis s'haurien de focalitzar en atacar tant la patologia amiloide com la patologia tau al mateix temps o en combinació amb altres dianes alternatives per tal de millorar l'eficàcia de la immunoteràpia passiva.

III- L'eliminació del domini Fc d'un anticòs monoclonal contra el pèptid A β augmenta la seguretat i manté l'eficàcia en el model murí APP23

Les anomalies en la imatge relacionades amb el pèptid amiloide (ARIA) s'han observat en múltiples assajos clínics d'immunoteràpia passiva, sobretot a les proves d'aquelles anticossos dirigits contra l'extrem N-terminal o contra epítops conformacionals del pèptid amiloide que permeten la unió amb les plaques neurítiques. En els assajos clínics del bapineuzumab, el gantenerumab i l'aducanumab, aquest últim aprovat recentment per la FDA, la incidència d'ARIs va ser dosi dependent i, alhora, depenent de la presència de l'al·lel *APOE* $\epsilon 4$ (184,191,249). Existeixen diverses vies per a l'eliminació del pèptid A β , el transport directe a través de la BBB, la fagocitosi, la degradació enzimàtica i el drenatge perivascular (284). Per altra banda, s'ha hipotetitzat que els anticossos dirigits contra l'A β no només acceleren la deposició vascular, sinó que al unir-se a l'A β vascular accessible, es promou la disrupció de la integritat dels vasos i contribueixen al vessament de fluids proteics (ARIA-E) i d'eritròcits (ARIA-H) (285,286). Tot i així, existeixen diversos estudis que apunten a la inflamació i la resposta immunitària com a causant de la ruptura capil·lar i la consegüent aparició d'ARIs (170,287,288). La hipòtesi plantejada en aquest treball és la següent: el mecanisme responsable de la ruptura vascular és l'activació del sistema immunitari per part de la regió Fc dels anticossos complets, per tant, el re-disseny del anticòs seria una teràpia més segura com a aproximació per al tractament de l'AD i altres malalties neurodegeneratives.

En aquest estudi s'ha confirmat que els ratolins APP23 presenten major número de microhemorràgies per mitjà d'imatges ponderades en T₂*. Aquest resultat no és nou, doncs diversos estudis, en el model APP23 i en altres, ja havien demostrat la relació entre el pèptid amiloide i les microhemorràgies (170,171,285,289), però serveix per confirmar que en una etapa avançada de la

patologia, els ratolins APP23 segueixen essent un model adient per a avaluar la seguretat de la immunoteràpia passiva contra l'A β . Anteriorment també s'havia demostrat que la immunoteràpia passiva induïa l'aparició d'ARIA-H (171,290–292), i els nostres resultats confirmen que l'anticòs sencer mAb-m3D6 promou l'aparició d'ARIA-H, mentre que el fragment derivat d'aquest, i que no presenta la regió Fc, no. Anteriorment, es van realitzar experiments amb un anticòs monoclonal anti-A β desglicosilat (2H6 anti-A β_{33-40} IgG2b) per tal de disminuir l'activitat efectora de la regió Fc. Els resultats demostren una reducció dels nivells de dipòsits amiloides així com una millora en la cognició. Tot i que no es retorna als nivells basals, la desglicosilació redueix de manera significativa la unió entre la Fc i el seu receptor i l'activació de macròfags, incloent la micròglia (293). A més, tot i que es va aconseguir una reducció significativa en el número de microhemorràgies, no es va aconseguir igualar aquests esdeveniments als observats en els controls (285). Aquests resultats indiquen que la unió entre anticòs i receptor de la Fc de la micròglia és el principal conductor de l'aparició d'ARIA-H, i que una eliminació de la Fc, i no una modificació, seria una estratègia més segura.

Tant l'scFv-h3D6 com el mAb-m3D6 redueixen els nivells d'A β_{1-40} en l'hipocamp en les fraccions soluble en TBS i en FA, per tant, l'eliminació de la regió Fc no afecta a la especificitat o la capacitat d'unió/eliminació d'A β , tal i com passa amb els fragments Fab (294). Sembla ser que l'A β_{1-40} , espècie més soluble, difon a través de les vies de drenatge perivasculars per acumular-se a les parets dels vasos, mentre que l'A β_{1-42} , al ser més insoluble, no s'allunyaria tant de la zona de producció i serviria de nuclis per al creixement de les plaques senils en el parènquima cerebral. Tot i així, les evidències suggereixen que l'A β_{1-42} és la primera espècie en depositar-se a les parets dels vasos (295). Per tant, sembla raonable pensar que ambdós anticòssos tenen la capacitat de reduir els nivells de pèptid amiloide vascular, i mentre que el mAb-m3D6 promou el microsagnats, el fragment scFv-h3D6 no.

Pel que fa a l'ARIA-E, sembla que els ratolins APP23 presenten un augment de la difusió i del temps de relaxació transversal (T_2), el que indicaria una major presència de líquid, en el teixit estriat, però no en el còrtex o l'hipocamp. Anteriorment, es va detectar la presència d'ARIA-E en ratolins APP/PS1 d'edat avançada per mitjà d'imatges ponderades en T_2 i amb confirmació histològica, mitjançant la detecció d'albúmina en el parènquima cerebral, en les regions ventrals del lòbul cortical piriforme i al nucli medial de l'amígdala (296). Ningun dels dos tractaments promou una modificació dels valors obtinguts per ADC, però els mapes de T_2 indiquen que l'scFv-h3D6 provoca un ascens d'aquest paràmetre en el còrtex. Com s'ha descrit anteriorment un augment de T_2 pot significar la presència d'ARIA-E, tot i així, al no haver alteracions en l'ADC és poc probable. En un estudi previ del grup, es va intentar respondre a la mateixa qüestió plantejada aquí, però seguint longitudinalment (dels 5 als 12 mesos) el model 3xTg-AD. Els resultats van indicar que els valors de T_2 i ADC en aquest model en concret, eren difícils de prendre com a indicador d'ARIA-E, doncs els resultats no eren clars i no va ser possible determinar el motius de la variació d'ambdós paràmetres (201,244). Els valors d'ADC no van variar significativament entre els dos grups, tal i com estava descrit a la bibliografia, i es va concloure que no hi havia processos inflamatoris importants ni edemes vasogènics abans del tractament. Tot i que els valors de T_2 i ADC tendien a ser més alts després dels tractaments, l'aparició d'edema vasogènic es va descartar en un experiment paral·lel on es van administrar dosis molt altes del mAb-m3D6 (fins al triple de les utilitzades en aquest treball). De fet, el model 3xTg-AD no és un bon model per provocar edema vasogènic, ja que aquesta patologia està relacionada amb la CAA i el 3xTg-AD no la desenvolupa (201,244). A una conclusió diferent es va arribar en un estudi amb ratolins model de la malaltia de Niemann-Pick tipus C i el seu grup control, on el descens en els valors de T_2 en el CC es van atribuir a l'envelliment (297).

A més, els canvis en el temps de relaxació transversal no són consistents entre pacients o entre models murins. En pacients s'han reportat resultats contradictoris pel que fa a T_2 , en alguns estudis els pacients amb AD presenten un descens en l'hipocamp i en altres es diu el contrari (298–300). De la mateixa manera, en ratolins, s'han reportat reduccions significatives de T_2 en l'hipocamp i altres estudis no han vist diferències (301,302), fins i tot en alguns casos s'ha descrit que aquest valor tendeix a ser major en el còrtex i en l'hipocamp (303). Tot i així, en la majoria de casos els resultats no són fiables degut a la falta de la corroboració mitjançant tècniques histològiques on es demostrï la deposició de plaques senils o a que no s'han avaluat els paràmetres a diferents temps. Per contra, en un estudi amb ratolins APP/PS1 es va determinar que a mesura que avança l'edat dels ratolins, els valors de T_2 disminueixen. A més, als 12 mesos d'edat els valors de T_2 eren majors en els ratolins transgènics que en els NTg, però als 20 mesos d'edat les diferències s'havien invertit, i es correlacionaria l'augment dels nivells d'A β per histologia amb el descens dels valors de T_2 amb l'edat (304). Aquest no ha estat l'únic estudi que ha reportat una correlació entre els valors de T_2 o entre la presència de ferro en les plaques i el descens dels valors de T_2 (207,305,306). Per tant, la presència de la hemosiderina en les lesions hemorràgiques també disminuiria aquest valor (292). Finalment, també s'ha descrit que la resposta inflamatòria, la gliosis o la pèrdua neuronal poden afectar al temps de relaxació transversal (303,307). És a dir, la variació de T_2 és un paràmetre difícil d'avaluar, més si no es compta amb la corresponent corroboració histològica o bioquímica. En tot cas, sembla ser que l'ARIA-E és un fenomen transitori que es produiria durant les primeres fases de la teràpia i que el risc disminuiria amb el temps (248).

Per tal d'avaluar l'efecte del fàrmac més enllà de la seguretat i de la reducció dels nivells d'A β , es van mesurar diferents paràmetres com la integritat axonal i de la mielina i l'atròfia cerebral, per mitjà d'imatges ponderades en tensor de difusió i imatges d'alta resolució ponderades en T_2 , respectivament. Les dades

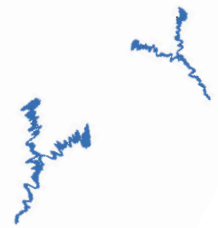
indiquen que a l'edat de 27 mesos, els ratolins APP23 i els seus homòlegs NTg presenten el mateix nivell d'atròfia cerebral, segurament degut a l'atròfia intrínseca de l'edat. En ratolins 3xTg-AD, l'atròfia és evident des dels 5 als 12 mesos d'edat i el tractament amb scFv-h3D6 és capaç de prevenir-la (200,244). Per tant, en una fase tan avançada de la malaltia, ni l'scFv-h3D6 ni el mAb-m3D6 són capaços de reduir l'atròfia cerebral existent. Per altra banda, els ratolins APP23 sí que presenten alteracions en els valors de DTI de la matèria blanca, sobretot a la regió rostral del cos callós, indicant que el model APP23 presenta dany axonal i desmielinització. Aquest tipus de lesions s'han descrit en AD, esclerosi múltiple o isquèmia, entre d'altres (255,308–311) i són un bon indicador de neurodegeneració. Tot i l'exposat anteriorment, els tractaments no tenen un efecte clar sobre aquests paràmetres, doncs tan sols s'observa un increment de la difusivitat axial del cos callós rostral després del tractament amb scFv-h3D6, el que implicaria una millora en l'estructura axonal, però en el cos callós mitjà, ambdós tractaments disminuirien el moviment anisotròpic de l'aigua, el que implicaria un desmantellament més greu de les estructures neuronals en comparació amb el tractament amb PBS. Els resultats són poc esclaridors, sobretot tenint en compte que no es disposa de la corresponent corroboració histològica. En tot cas, l'empitjorament no seria atribuïble a un possible augment de la inflamació, com s'ha discutit anteriorment, doncs està demostrat que la gliosis o la pèrdua d'oligodendròcits no té un efecte sobre aquest marcadors de la matèria blanca (311–313).

Per finalitzar, molts estudis apunten a la retirada de l'A β com a principal artífex de la ruptura vascular, però els resultats d'aquest treball apunten que no és així, doncs l'scFv-h3D6, amb una capacitat similar, si no igual, de reduir els nivells d'A β no promou l'aparició d'ARIA-H, mentre que el mAb-m3D6 sí. A més, la reducció d'A β no és suficient per a prevenir la neurodegeneració en etapes tan avançades, però l'scFv-h3D6 sí que ha demostrat ser efectiu en aquest aspecte en etapes primerenques (314). Per això, els tractaments haurien de començar

abans i seguir una pauta crònica d'administració, doncs el pèptid amiloide actua com a disparador, però no com a únic efector en el progrés de l'AD.

En conclusió, el bapineuzumab indueix l'aparició de microhemorràgies en el model d'AD APP23, mentre que el fragment de cadena lleugera derivat d'ell, i que no presenta la regió Fc, no. Aquesta troballa reforça la hipòtesi de que la regió Fc dels anticossos mostra una funció efectora que condueix a l'aparició d'ARIA i, alhora, reforça la idea que el desenvolupament d'anticossos sense la regió Fc és una estratègia més segura per a la realització d'assajos clínics per l'AD i altres malalties neurodegeneratives.

Conclusions



Conclusions

Les conclusions generals que responen directament als objectius plantejats a l'inici d'aquesta tesi són els següents:

1. La via d'agregació del VVK08 es desplaça des de la via amiloidogènica cap a la via d'agregació de tipus *worm like* (WL), totalment en el cas de VVK08 i parcialment en el cas del VVA09, el qual pot formar WL, però finalitza la seva agregació formant fibres amiloides.
2. L'scFv-h3D6 és capaç de reduir els nivells de tau total sense induir una resposta immunitària greu en ratolins 3xTg-AD d'edat avançada.
3. L'eliminació de la regió Fc dels anticossos monoclonals evita la formació d'ARIA-H sense disminuir el seu efecte terapèutic en ratolins APP23 d'edat avançada.

Les conclusions específiques de cada apartat són els següents:

- I. La dimerització forçada del fragment variable d'un anticòs implicat en l'amiloidosi de cadena lleugera modifica la seva via d'agregació
 1. La presència del connector peptídic promou la formació de trímers en el cas del VVK08 i la formació de dímers i de tetràmers en el cas del VVA09, amb els dímers essent predominants.
 2. El VVK08 i el dímer del VV09 mantenen la estructura secundària, però no exactament la mateixa estructura terciària dels dominis dels quals deriven.
 3. El tetràmer del VVA09 presenta una estructura secundària i terciària molt diferent, un plegament tot β molt compacte.
 4. Tant el VVK08 com el dímer del VVA09 presenten intermediaris en la via d'agregació induïda per temperatura. L'intermediari del VVK08 és poc estable i conté una certa component *random coil*. L'intermediari

del dímer del VVA09 és metaestable i mostra una conformació tot β que promou una reorganització de la proteïna que desemboca en la formació de tetràmers.

5. El VVK08 tendeix a la formació d'agregats de tipus *worm like* (WL), mentre que el VVA09 pot formar WL, però finalment tendeix a formar agregats amiloides.
6. Aquest estudi obre la porta a l'estudi de fàrmacs que promoguin el desplaçament des de la via amiloide a la via WL dels dominis V_L utilitzant VVA09 com a proteïna problema i VVK08 com a control de condicions no patològiques.

II. Tant el pèptid $A\beta$ com la proteïna tau es veuen afectades per un fragment d'anticòs anti- $A\beta$ en ratlins 3xTg-AD d'edat avançada

1. L'scFv-h3D6 redueix els nivells de tau total després d'unir-se i retirar el pèptid $A\beta$, el que demostra la interconnexió entre el pèptid $A\beta$ i tau.
2. El tractament amb scFv-h3D6 no promou una resposta inflamatòria en el cervell.
3. Per tant, el tractament amb scFv-h3D6 és eficaç retirant agregats i segur en termes de inflamació en l'etapa més avançada de la malaltia.

III. L'eliminació del domini Fc d'un anticòs monoclonal contra el pèptid $A\beta$ augmenta la seguretat i manté l'eficàcia en el model murí APP23

1. El model APP23 d'edat avançada és un bon model per avaluar l'aparició d'ARIAs induïdes per un tractament, doncs presenten aquestes alteracions de manera natural.
2. El model APP23 d'edat avançada no és un bon model per a avaluar la capacitat d'un tractament de revertir el dany axonal i la desmielinització, ni per a l'avaluació de l'atròfia cerebral. Seria preferible la utilització d'animals que es trobin en etapes primerenques de la malaltia.

3. L'eliminació de la regió Fc dels anticossos monoclonals anti-A β no redueix la capacitat d'unió de l'scFv-h3D6 al pèptid A β .
4. L'eliminació de la regió Fc evita les lesions hemorràgiques que produeix l'anticòs monoclonal sencer, per tant, es reforça la idea de que és l'efecte efector de la Fc sobre el sistema immunitari el que indueix a l'aparició d'ARIA-H.
5. Ni l'scFv-h3D6 ni el mAb-m3D6 promouen l'aparició d'ARIA-E.
6. Tot i la capacitat de reduir els nivells d'A β , ni l'scFv-h3D6 ni el mAb-m3D6 són capaços de revertir la neurodegeneració, el que indica que la immunoteràpia anti-A β no és adient en fases avançades de la malaltia d'Alzheimer.
7. Per tant, el tractament amb fragments d'anticossos que no continguin la regió Fc és igual d'eficaç, però molt més segura que l'ús d'anticossos complets per a tractar malalties neurodegeneratives.

Publicacions durant la tesi

Durant els anys en que he estat realitzant el doctorat s'han realitzat diversos treballs, alguns dels quals no es veuen reflectits en aquesta tesi, per això a continuació es presenta una llista de publicacions.

1. Montoliu-Gaya, L., Güell-Bosch, J., Esquerda-Canals, G., Roda, A. R., **Serra-Mir, G.**, Lope-Piedrafita, S., Sánchez-Quesada, J. L., & Villegas, S. (2018). Differential effects of apoE and apoJ mimetic peptides on the action of an anti-A β scFv in 3xTg-AD mice. *Biochemical pharmacology*, *155*, 380–392. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2018.07.012>
2. Benitez-Amaro, A., Pallara, C., Nasarre, L., Rivas-Urbina, A., Benitez, S., Vea, A., Bornachea, O., de Gonzalo-Calvo, D., **Serra-Mir, G.**, Villegas, S., Prades, R., Sanchez-Quesada, J. L., Chiva, C., Sabido, E., Tarragó, T., & Llorente-Cortés, V. (2019). Molecular basis for the protective effects of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)-derived peptides against LDL aggregation. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, *1861*(7), 1302–1316. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.05.003>
3. Roda, A. R., Montoliu-Gaya, L., **Serra-Mir, G.**, & Villegas, S. (2020). Both amyloid- β peptide and tau protein are Affected by an anti-amyloid- β antibody fragment in elderly 3xTg-AD mice. *International journal of molecular sciences*, *21*(18), 6630. <https://doi.org/10.3390/ijms21186630>
4. Roda, A. R., **Serra-Mir, G.**, Montoliu-Gaya, L., Tiessler, L., & Villegas, S. (2022) Amyloid-beta peptide and tau protein crosstalk in Alzheimer's disease. *Neural Regen Res*. *17*. *In press*.
5. Roda, A. R.* , **Serra-Mir, G.***, Bonaterra, A., Melón, P., Tiessler, L., Lope-Piedrafita, S., Hernández-Guillamon M., & Villegas, S (2022) ScFv-

h3D6 prevents bapineuzumab-induced hemorrhagic events in the APP23 mouse model of Alzheimer's disease. (en redacció)

6. Roda, A. R.*, Tiessler, L.*, **Serra-Mir, G.***, Villegas, S. (2022) ScFv-IPN002, an anti-tau single-chain variable fragment, shifts tau aggregation pathway to the worm-like fibril pathway. (en redacció)

7. **Serra-Mir, G.**, Misra, P., Ramírez-Alvarado, M., Villegas, S. (2022) Forced dimerization by the scFv format of the variable fragment of an antibody involved in light chain amyloidosis modifies its aggregation pathway. (en redacció)

* Aquests autors han contribuït de manera igual als treballs

Bibliografia



1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Molecular biology of the cell*. 6th ed. 2014. 1464 p.
2. Jahn TR, Radford SE. The Yin and Yang of protein folding. Vol. 272, *FEBS Journal*. 2005. p. 5962–70.
3. Kaufman RJ, Scheuner D, Schröder M, Shen X, Lee K, Liu CY, et al. The unfolded protein response in nutrient sensing and differentiation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2002;3(6):411–21.
4. Dobson CM. Protein folding and misfolding. *Nature*. 2003;426(6968):884–90.
5. Wang L, Maji SK, Sawaya MR, Eisenberg D, Riek R. Bacterial inclusion bodies contain amyloid-like structure. *PLoS Biol*. 2008;
6. Rochet JC, Lansbury PT. Amyloid fibrillogenesis: Themes and variations. Vol. 10, *Current Opinion in Structural Biology*. 2000. p. 60–8.
7. Eisenberg D, Jucker M. The amyloid state of proteins in human diseases. *Cell*. 2012.
8. Adler-Abramovich L, Vaks L, Carny O, Trudler D, Magno A, Caflish A, et al. Phenylalanine assembly into toxic fibrils suggests amyloid etiology in phenylketonuria. *Nat Chem Biol*. 2012;
9. Jahn TR, Radford SE. Folding versus aggregation: Polypeptide conformations on competing pathways. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2008.
10. Eisenberg DS, Sawaya MR. Structural studies of amyloid proteins at the molecular level. *Annu Rev Biochem*. 2017;
11. Cao Y, Adamcik J, Diener M, Kumita JR, Mezzenga R. Different Folding States from the Same Protein Sequence Determine Reversible vs Irreversible Amyloid Fate. *J Am Chem Soc*. 2021;143(30).
12. Chiti F, Dobson CM. Protein misfolding, amyloid formation, and human disease: A summary of progress over the last decade. *Annual Review of Biochemistry*. 2017.
13. Kumar S, Walter J. Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides - A trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease. *Aging (Albany NY)* [Internet]. 2011 Aug 21 [cited 2021 May 13];3(8):803–12. Available from:

www.impactaging.com

14. Blancas-Mejia LM, Ramirez-Alvarado M. Systemic amyloidoses. *Annu Rev Biochem* [Internet]. 2013;82:745–74. Available from: <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L369098972%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-072611-130030%5Cnhttp://elvis.ubvu.vu.nl:9003/vulink?sid=EMBASE&issn=00664154&id=doi:10.1146/annurev-biochem-072611-130030&atitle=>
15. Harper JD, Wong SS, Lieber CM, Lansbury PT. Observation of metastable Abeta amyloid protofibrils by atomic force microscopy. *Chem Biol*. 1997;4(2):119–25.
16. Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, Diehl T, Vasquez S, Vassilev PM, et al. Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci*. 1999;19(20):8876–84.
17. Lesné S, Koh MT, Kotilinek L, Kaye R, Glabe CG, Yang A, et al. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* [Internet]. 2006;440(7082):352–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16541076>
18. Marin-Argany M, Lin Y, Misra P, Williams A, Wall JS, Howell KG, et al. Cell damage in light chain amyloidosis fibril internalization, toxicity and cell-mediated seeding. *J Biol Chem* [Internet]. 2016 Sep 16 [cited 2021 May 13];291(38):19813–25. Available from: <http://www.jbc.org/article/S0021925820359627/fulltext>
19. Jordan TL, Maar K, Redhage KR, Misra P, Blancas-Mejia LM, Dick CJ, et al. Light chain amyloidosis induced inflammatory changes in cardiomyocytes and adipose-derived mesenchymal stromal cells. *Leukemia* [Internet]. 2020 May 1 [cited 2021 May 13];34(5):1383–93. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41375-019-0640-4>
20. Shi J, Guan J, Jiang B, Brenner DA, Del Monte F, Ward JE, et al. Amyloidogenic light chains induce cardiomyocyte contractile dysfunction and apoptosis via a non-canonical p38 α MAPK pathway. *Proc Natl Acad Sci U S*

- A [Internet]. 2010 Mar 2 [cited 2021 May 13];107(9):4188–93. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0912263107
21. Gertz MA. Immunoglobulin light chain amyloidosis: 2020 update on diagnosis, prognosis, and treatment. *Am J Hematol*. 2020 Jul 1;95(7):848–60.
 22. Kumar SK, Gertz MA, Lacy MQ, Dingli D, Hayman SR, Buadi FK, et al. Recent improvements in survival in primary systemic amyloidosis and the importance of an early mortality risk score. *Mayo Clin Proc* [Internet]. 2011;86(1):12–8. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3012628&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 23. Obici L, Perfetti V, Palladini G, Moratti R, Merlini G. Clinical aspects of systemic amyloid diseases. In: *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. 2005. p. 11–22.
 24. Ramirez-Alvarado M, Ward CJ, Huang BQ, Gong X, Hogan MC, Madden BJ, et al. Differences in immunoglobulin light chain species found in urinary exosomes in light chain amyloidosis (AL). *PLoS One*. 2012;7(6).
 25. Weiss BM, Wong SW, Comenzo RL. Beyond the plasma cell: emerging therapies for immunoglobulin light chain amyloidosis. *Blood*. 2016;127(19):2275–80.
 26. Gambetti P, Russo C. Human brain amyloidoses. *Nephrol Dial Transpl*. 1998;13((Suppl 7)):33–40.
 27. Schröder R, Deckert M, Linke RP. Novel isolated cerebral ALlambda amyloid angiopathy with widespread subcortical distribution and leukoencephalopathy due to atypical monoclonal plasma cell proliferation, and terminal systemic gammopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2009;68(3):286–99. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19225408>
 28. Vrana JA, Gamez JD, Madden BJ, Theis JD, Bergen HR, Dogan A. Classification of amyloidosis by laser microdissection and mass spectrometry-based proteomic analysis in clinical biopsy specimens. *Blood*. 2009;114(24):4957–9.
 29. Sethi S, Theis JD, Leung N, Dispenzieri A, Nasr SH, Fidler ME, et al. Mass

- spectrometry-based proteomic diagnosis of renal immunoglobulin heavy chain amyloidosis. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2010;5(12):2180–7.
30. Gertz M a. How to manage primary amyloidosis. *Leukemia* [Internet]. 2012;26(2):191–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/leu.2011.219>
31. Palladini G, Merlini G. What is new in diagnosis and management of light chain amyloidosis? *Blood*. 2016;182(2):159–68.
32. Olsen KE, Sletten K, Westermark P. Fragments of the constant region of immunoglobulin light chains are constituents of AL-amyloid proteins. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;251:642–7.
33. Klimtchuk ES, Gursky O, Patel RS, Laporte KL, Connors LH, Skinner M, et al. The critical role of the constant region in thermal stability and aggregation of amyloidogenic immunoglobulin light chain. *Biochemistry*. 2010;49(45):9848–57.
34. Bork P, Holm L, Sander C. The Immunoglobulin Fold. *J Mol Biol* [Internet]. 1994;242(4):309–20. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283684715828>
35. Feige MJ, Hendershot LM, Buchner J. How antibodies fold. Vol. 35, *Trends in Biochemical Sciences*. 2010. p. 189–98.
36. Hurler MR, Helms LR, Li L, Chan W, Wetzel R. A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(June):5446–50.
37. Wall J, Schell M, Murphy C, Hrcic R, Stevens FJ, Solomon A. Thermodynamic instability of human λ 6 light chains: Correlation with fibrillogenicity. *Biochemistry*. 1999;38(42):14101–8.
38. Baden EM, Randles EG, Aboagye AK, Thompson JR, Ramirez-Alvarado M. Structural insights into the role of mutations in amyloidogenesis. *J Biol Chem*. 2008;283(45):30950–6.
39. Randles EG, Thompson JR, Martin DJ, Ramirez-Alvarado M. Structural Alterations within Native Amyloidogenic Immunoglobulin Light Chains. *J Mol Biol*. 2009;389(1):199–210.

40. Davis DP, Gallo G, Vogen SM, Dul JL, Sciarretta KL, Kumar a, et al. Both the environment and somatic mutations govern the aggregation pathway of pathogenic immunoglobulin light chain. *J Mol Biol* [Internet]. 2001;313(5):1021–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11700059>
41. McLaughlin RW, De Stigter JK, Sikkink LA, Baden EM, Ramirez-Alvarado M. The effects of sodium sulfate, glycosaminoglycans, and Congo red on the structure, stability, and amyloid formation of an immunoglobulin light-chain protein. *Protein Sci* [Internet]. 2006 Jul [cited 2016 Jun 12];15(7):1710–22. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2242560&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
42. Sikkink LA, Ramirez-Alvarado M. Salts enhance both protein stability and amyloid formation of an immunoglobulin light chain. *Biophys Chem*. 2008;135(1–3):25–31.
43. Blancas-Mejía LM, Hammernik J, Marin-Argany M, Ramirez-Alvarado M. Differential effects on light chain amyloid formation depend on mutations and type of glycosaminoglycans. *J Biol Chem*. 2015;290(8):4953–65.
44. Qin Z, Hu D, Zhu M, Fink AL. Structural characterization of the partially folded intermediates of an immunoglobulin light chain leading to amyloid fibrillation and amorphous aggregation. *Biochemistry*. 2007;46(11):3521–31.
45. Novotný J, Haber E. Structural invariants of antigen binding: comparison of immunoglobulin VL-VH and VL-VL domain dimers. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1985;82(14):4592–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=390431&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
46. Peterson FC, Baden EM, Owen BAL, Volkman BF, Ramirez-Alvarado M. A single mutation promotes amyloidogenicity through a highly promiscuous dimer interface. *Structure*. 2010;18(5):563–70.
47. Baden EM, Owen BAL, Peterson FC, Volkman BF, Ramirez-Alvarado M, Thompson JR. Altered dimer interface decreases stability in an amyloidogenic

- protein. *J Biol Chem*. 2008;283(23):15853–60.
48. del Pozo Yauner L, Ortiz E, Sánchez R, Sánchez-López R, Güereca L, Murphy CL, et al. Influence of the germline sequence on the thermodynamic stability and fibrillogenicity of human lambda 6 light chains. *Proteins* [Internet]. 2008 Aug [cited 2016 Jun 13];72(2):684–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18260098>
49. Poshusta TL, Katoh N, Gertz MA, Dispenzieri A, Ramirez-Alvarado M. Thermal stability threshold for amyloid formation in light chain amyloidosis. *Int J Mol Sci*. 2013;14(11):22604–17.
50. Marin-Argany M, Güell-Bosch J, Blancas-Mejía LM, Villegas S, Ramirez-Alvarado M. Mutations can cause light chains to be too stable or too unstable to form amyloid fibrils. *Protein Sci* [Internet]. 2015;24(11):1829–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26300552> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4622216>
51. Marin-Argany M. 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 proteo. [Bellaterra]: Universitat Autònoma de Barcelona; 2013.
52. Sikkink L a, Ramirez-Alvarado M. Cytotoxicity of amyloidogenic immunoglobulin light chains in cell culture. *Cell Death Dis* [Internet]. 2010;1(11):e98. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2010.75>
53. Patterson C. World Alzheimer Report 2018 - The state of the art of dementia research: New frontiers. Alzheimer's Disease International (ADI): London, UK. 2018.
54. Karran E, Mercken M, Strooper B De. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: An appraisal for the development of therapeutics. *Nature Reviews Drug Discovery*. 2011.
55. Vishal S, Sourabh A, Harkirat S. Alois Alzheimer (1864-1915) and the Alzheimer syndrome. *J Med Biogr*. 2011;

56. Brion JP, Passareiro H, Nunez J, Flament-Durand J. MISE EN EVIDENCE IMMUNOLOGIQUE DE LA PROTEINE TAU AU NIVEAU DES LESIONS DE DEGENERESCENCE NEUROFIBRILLAIRE DE LA MALADIE D'ALZHEIMER. *Arch Biol (Liege)*. 1985;
57. Masters CL, Simms G, Weinman NA, Multhaup G, McDonald BL, Beyreuther K. Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1985;
58. Glenner GG, Wong CW. Alzheimer's disease: Initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1984;
59. Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, et al. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*. 1987;
60. Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* (80-). 1991;
61. Hendriks L, van Duijn CM, Cras P, Cruts M, Van Hul W, van Harskamp F, et al. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the β -amyloid precursor protein gene. *Nat Genet*. 1992;
62. Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, et al. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*. 1991;
63. Macleod R, Hillert EK, Cameron RT, Baillie GS. The role and therapeutic targeting of α -, β -and γ -secretase in Alzheimer's disease. *Future Science OA*. 2015.
64. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992.
65. Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide [Internet]. Vol. 8, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 2007 [cited 2021 Apr 14]. p. 101–12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17245412/>

66. Verheijen J, Sleegers K. Understanding Alzheimer Disease at the Interface between Genetics and Transcriptomics. *Trends in Genetics*. 2018.
67. Cacace R, Sleegers K, Van Broeckhoven C. Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimer's and Dementia*. 2016.
68. Rice HC, Malmazet D De, Schreurs A, Frere S, Molle I Van, Volkov AN, et al. Secreted amyloid- β precursor protein functions as a GABA. *Science* (80-). 2019;
69. Müller UC, Deller T, Korte M. Not just amyloid: Physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nature Reviews Neuroscience*. 2017.
70. Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, et al. Mutation of the β -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases β -protein production. *Nature*. 1992;
71. Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, et al. A pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of β -amyloid. *Nat Genet* [Internet]. 1992 [cited 2021 Apr 7];1(5):345–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1302033/>
72. Citron M, Vigo-Pelfrey C, Teplow DB, Miller C, Schenk D, Johnston J, et al. Excessive production of amyloid β -protein by peripheral cells of symptomatic and presymptomatic patients carrying the Swedish familial Alzheimer disease mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;
73. Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson P V., Bjornsson S, et al. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*. 2012;
74. Grabowski TJ, Cho HS, Vonsattel JPG, William Rebeck G, Greenberg SM. Novel amyloid precursor protein mutation in an Iowa family with dementia and severe cerebral amyloid angiopathy. *Ann Neurol*. 2001;
75. De Jonghe C, Zehr C, Yager D, Prada CM, Younkin S, Hendriks L, et al. Flemish and Dutch mutations in amyloid β precursor protein have different effects on amyloid β secretion. *Neurobiol Dis*. 1998;
76. Guell-Bosch J, Esquerda-Canals G, Montoliu-Gaya L, Villegas S. Prospective

- Therapies for Alzheimer Disease: Biomarkers, Clinical Trials and Preclinical Research. In: *Frontiers in Clinical Drug Research - CNS and Neurological Disorders*. BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS; 2016. p. 114–91.
77. Peron R, Vatanabe IP, Manzine PR, Camins A, Cominetti MR. Alpha-secretase ADAM10 regulation: Insights into Alzheimer's disease treatment [Internet]. Vol. 11, *Pharmaceuticals*. MDPI AG; 2018 [cited 2021 May 28]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29382156/>
78. Montoliu-Gaya L, Villegas S. Protein structures in Alzheimer's disease: The basis for rationale therapeutic design. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2015.
79. Nunan J, Small DH. Regulation of APP cleavage by α -, β - and γ -secretases [Internet]. Vol. 483, *FEBS Letters*. Elsevier; 2000 [cited 2021 May 28]. p. 6–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11033346/>
80. Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, et al. β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* (80-) [Internet]. 1999 Oct 22 [cited 2021 May 28];286(5440):735–41. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10531052/>
81. Haniu M, Denis P, Young Y, Mendiaz EA, Fuller J, Hui JO, et al. Characterization of Alzheimer's β -secretase protein BACE: A pepsin family member with unusual properties. *J Biol Chem*. 2000 Jul 14;275(28):21099–106.
82. Zhao J, Fu Y, Yasvoina M, Shao P, Hitt B, O'Connor T, et al. β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 levels become elevated in neurons around amyloid plaques: Implications for Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci* [Internet]. 2007 Apr 4 [cited 2021 May 28];27(14):3639–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17409228/>
83. Kandalepas PC, Sadleir KR, Eimer WA, Zhao J, Nicholson DA, Vassar R. The Alzheimer's β -secretase BACE1 localizes to normal presynaptic terminals and to dystrophic presynaptic terminals surrounding amyloid plaques. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2013 Sep 3 [cited 2021 May 28];126(3):329–52.

- Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00401-013-1152-3>
84. Sadleir KR, Kandalepas PC, Buggia-Prévot V, Nicholson DA, Thinakaran G, Vassar R. Presynaptic dystrophic neurites surrounding amyloid plaques are sites of microtubule disruption, BACE1 elevation, and increased A β generation in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2016 Aug 1 [cited 2021 May 28];132(2):235–56. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00401-016-1558-9>
 85. Hampel H, Vassar R, De Strooper B, Hardy J, Willem M, Singh N, et al. The β -Secretase BACE1 in Alzheimer's Disease. Vol. 89, *Biological Psychiatry*. Elsevier USA; 2020. p. 745–56.
 86. Hitt BD, Jaramillo TC, Chetkovich DM, Vassar R. BACE1 $^{-/-}$ mice exhibit seizure activity that does not correlate with sodium channel level or axonal localization. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2010 Aug 23 [cited 2021 Jun 1];5(1):1–14. Available from: <http://www.molecularneurodegeneration.com/content/5/1/31>
 87. Willem M, Garratt AN, Novak B, Citron M, Kaufmann S, Rittger A, et al. Control of peripheral nerve myelination by the β -secretase BACE1. *Science* (80-) [Internet]. 2006 Oct 27 [cited 2021 Jun 1];314(5799):664–6. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/314/5799/664>
 88. Laird FM, Cai H, Savonenko A V., Farah MH, He K, Melnikova T, et al. BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid- β amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci* [Internet]. 2005 Dec 14 [cited 2021 Jun 1];25(50):11693–709. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16354928/>
 89. Rajapaksha TW, Eimer WA, Bozza TC, Vassar R. The Alzheimer's -secretase enzyme BACE1 is required for accurate axon guidance of olfactory sensory neurons and normal glomerulus formation in the olfactory bulb. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2011 Dec 28 [cited 2021 Jun 1];6(1):1–9. Available from: <http://www.molecularneurodegeneration.com/content/6/1/88>
 90. Peters F, Salihoglu H, Rodrigues E, Herzog E, Blume T, Filser S, et al. BACE1 inhibition more effectively suppresses initiation than progression of β -amyloid

- pathology. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2021 Jun 1];135(5):695–710. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1804-9>
91. Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell* [Internet]. 2019 [cited 2021 May 27];179(2):312–39. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.09.001>
 92. Voytyuk I, De Strooper B, Chávez-Gutiérrez L. Modulation of γ - and β -Secretases as Early Prevention Against Alzheimer’s Disease. Vol. 83, *Biological Psychiatry*. Elsevier USA; 2018. p. 320–7.
 93. Xia W. γ -Secretase and its modulators: Twenty years and beyond. Vol. 701, *Neuroscience Letters*. Elsevier Ireland Ltd; 2019. p. 162–9.
 94. Zhang X, Li Y, Xu H, Zhang YW. The γ -secretase complex: From structure to function [Internet]. Vol. 8, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Media S.A.; 2014 [cited 2021 Jun 1]. p. 427. Available from: www.frontiersin.org
 95. Esquerda-Canals G, Montoliu-Gaya L, Güell-Bosch J, Villegas S. Mouse Models of Alzheimer’s Disease. Vol. 57, *Journal of Alzheimer’s Disease*. IOS Press; 2017. p. 1171–83.
 96. Kelleher RJ, Shen J. Presenilin-1 mutations and Alzheimer’s disease [Internet]. Vol. 114, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences; 2017 [cited 2021 Jun 1]. p. 629–31. Available from: [/pmc/articles/PMC5278466/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/278466/)
 97. Okochi M, Tagami S, Yanagida K, Takami M, Kodama TS, Mori K, et al. γ -Secretase Modulators and Presenilin 1 Mutants Act Differently on Presenilin/ γ -Secretase Function to Cleave A β 42 and A β 43. *Cell Rep*. 2013 Jan 31;3(1):42–51.
 98. Liu L, Ding L, Rovere M, Wolfe MS, Selkoe DJ. A cellular complex of BACE1 and γ -secretase sequentially generates A β from its full-length precursor. *J Cell Biol* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2021 May 6];218(2):644–63. Available from: <https://doi.org/10.1083/jcb.201806205>
 99. Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, et al. APP Processing and Synaptic Function. *Neuron*. 2003 Mar 27;37(6):925–37.

100. Wei W, Nguyen LN, Kessels HW, Hagiwara H, Sisodia S, Malinow R. Amyloid beta from axons and dendrites reduces local spine number and plasticity. *Nat Neurosci* [Internet]. 2010 Feb 18 [cited 2021 May 6];13(2):190–6. Available from: <https://www.nature.com/articles/nn.2476>
101. Cirrito JR, Kang JE, Lee J, Stewart FR, Verges DK, Silverio LM, et al. Endocytosis Is Required for Synaptic Activity-Dependent Release of Amyloid- β In Vivo. *Neuron*. 2008 Apr 10;58(1):42–51.
102. Cirrito JR, Yamada KA, Finn MB, Sloviter RS, Bales KR, May PC, et al. Synaptic activity regulates interstitial fluid amyloid- β levels in vivo. *Neuron*. 2005 Dec 22;48(6):913–22.
103. Verges DK, Restivo JL, Goebel WD, Holtzman DM, Cirrito JR. Opposing synaptic regulation of amyloid- β metabolism by NMDA receptors in vivo. *J Neurosci* [Internet]. 2011 Aug 3 [cited 2021 May 6];31(31):11328–37. Available from: <https://www.jneurosci.org/content/31/31/11328>
104. Sosna J, Philipp S, Albay RI, Reyes-Ruiz JM, Baglietto-Vargas D, LaFerla FM, et al. Early long-term administration of the CSF1R inhibitor PLX3397 ablates microglia and reduces accumulation of intraneuronal amyloid, neuritic plaque deposition and pre-fibrillar oligomers in 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2021 May 6];13(1):1–11. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s13024-018-0244-x>
105. Walker LC, Jucker M. Neurodegenerative Diseases: Expanding the Prion Concept. *Annu Rev Neurosci* [Internet]. 2015 Jul 8 [cited 2021 May 6];38:87–103. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-neuro-071714-033828>
106. Bezprozvanny I. Amyloid goes global [Internet]. Vol. 2, Science Signaling. American Association for the Advancement of Science; 2009 [cited 2021 May 26]. p. pe16–pe16. Available from: <https://stke.sciencemag.org/content/2/63/pe16>
107. Benilova I, Karran E, De Strooper B. The toxic A β oligomer and Alzheimer's

- disease: An emperor in need of clothes [Internet]. Vol. 15, Nature Neuroscience. Nature Publishing Group; 2012 [cited 2021 May 26]. p. 349–57. Available from: <https://www.nature.com/articles/nn.3028>
108. Ball KA, Phillips AH, Nerenberg PS, Fawzi NL, Wemmer DE, Head-Gordon T. Homogeneous and heterogeneous tertiary structure ensembles of amyloid- β peptides. *Biochemistry* [Internet]. 2011 Sep 6 [cited 2021 May 26];50(35):7612–28. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21797254/>
109. Qiang W, Yau WM, Lu JX, Collinge J, Tycko R. Structural variation in amyloid- β fibrils from Alzheimer's disease clinical subtypes. *Nature* [Internet]. 2017 Jan 12 [cited 2021 May 26];541(7636):217–21. Available from: </pmc/articles/PMC5233555/>
110. Lu JX, Qiang W, Yau WM, Schwieters CD, Meredith SC, Tycko R. Molecular structure of β -amyloid fibrils in alzheimer's disease brain tissue. *Cell* [Internet]. 2013 Sep 12 [cited 2021 May 26];154(6):1257. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24034249/>
111. Giménez-Llort L, Rivera-Hernández G, Marin-Argany M, Sánchez-Quesada JL, Villegas S. Early intervention in the 3xTg-AD mice with an amyloid β -antibody fragment ameliorates first hallmarks of alzheimer disease. *MAbs* [Internet]. 2013 [cited 2021 Apr 14];5(5):665–864. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23884018/>
112. Roda AR, Montoliu-Gaya L, Serra-Mir G, Villegas S. Both amyloid- β peptide and tau protein are affected by an anti-amyloid- β antibody fragment in elderly 3xtg-ad mice. *Int J Mol Sci*. 2020 Sep 2;21(18):1–22.
113. Gremer L, Schölzel D, Schenk C, Reinartz E, Labahn J, Ravelli RBG, et al. Fibril structure of amyloid- β (1–42) by cryo-electron microscopy. *Science* (80-) [Internet]. 2017 Oct 6 [cited 2021 May 26];358(6359):116–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28882996/>
114. Guo T, Noble W, Hanger DP. Roles of tau protein in health and disease [Internet]. Vol. 133, *Acta Neuropathologica*. Springer Verlag; 2017 [cited 2021 May 6]. p. 665–704. Available from: www.alz.co.uk/research/world-report-

2016

115. Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, Kirschner MW. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1975 May 1 [cited 2021 May 10];72(5):1858–62. Available from: <https://www.pnas.org/content/72/5/1858>
116. Dixit R, Ross JL, Goldman YE, Holzbaur ELF. Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau. *Science* (80-) [Internet]. 2008 Feb 22 [cited 2021 May 10];319(5866):1086–9. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/319/5866/1086>
117. Kent SA, Spires-Jones TL, Durrant CS. The physiological roles of tau and A β : implications for Alzheimer's disease pathology and therapeutics. *Acta Neuropathologica*. 2020.
118. Marcelli S, Corbo M, Iannuzzi F, Negri L, Blandini F, Nistico R, et al. The Involvement of Post-Translational Modifications in Alzheimer's Disease. *Curr Alzheimer Res*. 2018 May 9;15(4):313–35.
119. Biernat J, Gustke N, Drewes G, Mandelkow E, Mandelkow E. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: Distinction between PHF-like immunoreactivity and microtubule binding. *Neuron*. 1993 Jul 1;11(1):153–63.
120. Mandelkow E, Von Bergen M, Biernat J, Mandelkow EM. Structural principles of tau and the paired helical filaments of Alzheimer's disease. In: *Brain Pathology* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2007 [cited 2021 May 10]. p. 83–90. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1750-3639.2007.00053.x>
121. Hoover BR, Reed MN, Su J, Penrod RD, Kotilinek LA, Grant MK, et al. Tau Mislocalization to Dendritic Spines Mediates Synaptic Dysfunction Independently of Neurodegeneration. *Neuron*. 2010 Dec 22;68(6):1067–81.
122. Min SW, Cho SH, Zhou Y, Schroeder S, Haroutunian V, Seeley WW, et al. Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy. *Neuron*. 2010 Sep 23;67(6):953–66.
123. Cook C, Carlomagno Y, Gendron TF, Dunmore J, Scheffel K, Stetler C, et al.

- Acetylation of the KXGS motifs in tau is a critical determinant in modulation of tau aggregation and clearance. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2021 May 10];23(1):104–16. Available from: <https://academic.oup.com/hmg/article/23/1/104/722960>
124. Sohn PD, Tracy TE, Son HI, Zhou Y, Leite REP, Miller BL, et al. Acetylated tau destabilizes the cytoskeleton in the axon initial segment and is mislocalized to the somatodendritic compartment. *Mol Neurodegener* [Internet]. 2016 Jun 29 [cited 2021 May 10];11(1):1–13. Available from: <https://link.springer.com/articles/10.1186/s13024-016-0109-0>
125. Falcon B, Zhang W, Schweighauser M, Murzin AG, Vidal R, Garringer HJ, et al. Tau filaments from multiple cases of sporadic and inherited Alzheimer's disease adopt a common fold. *Acta Neuropathol* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2021 May 27];136(5):699–708. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30276465/>
126. Scheres SH, Zhang W, Falcon B, Goedert M. Cryo-EM structures of tau filaments. Vol. 64, *Current Opinion in Structural Biology*. Elsevier Ltd; 2020. p. 17–25.
127. Yamada K, Cirrito JR, Stewart FR, Jiang H, Finn MB, Holmes BB, et al. In vivo microdialysis reveals age-dependent decrease of brain interstitial fluid tau levels in P301S human tau transgenic mice. *J Neurosci* [Internet]. 2011 Sep 14 [cited 2021 May 27];31(37):13110–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21917794/>
128. Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, Medalla M, Luebke J, Haydar T, et al. Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci* [Internet]. 2015 Nov 1 [cited 2021 May 27];18(11):1584–93. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26436904/>
129. Kfoury N, Holmes BB, Jiang H, Holtzman DM, Diamond MI. Trans-cellular propagation of Tau aggregation by fibrillar species. *J Biol Chem* [Internet]. 2012 Jun 1 [cited 2021 May 27];287(23):19440–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22461630/>
130. Falcon B, Cavallini A, Angers R, Glover S, Murray TK, Barnham L, et al.

- Conformation determines the seeding potencies of native and recombinant Tau aggregates. *J Biol Chem* [Internet]. 2015 Jan 9 [cited 2021 May 27];290(2):1049–65. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25406315/>
131. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathologica*. 1991.
132. Schöll M, Lockhart SN, Schonhaut DR, O’Neil JP, Janabi M, Ossenkoppele R, et al. PET Imaging of Tau Deposition in the Aging Human Brain. *Neuron* [Internet]. 2016 Mar 2 [cited 2021 May 27];89(5):971–82. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26938442/>
133. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer’s disease in late onset families. *Science* (80-) [Internet]. 1993 Aug 13 [cited 2021 May 11];261(5123):921–3. Available from: <https://science.sciencemag.org/content/261/5123/921>
134. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, et al. Apolipoprotein E: High-avidity binding to β -amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1993 Mar 1 [cited 2021 May 10];90(5):1977–81. Available from: <https://www.pnas.org/content/90/5/1977>
135. Roda AR, Montoliu-Gaya L, Villegas S. The Role of Apolipoprotein e Isoforms in Alzheimer’s Disease [Internet]. Vol. 68, *Journal of Alzheimer’s Disease*. IOS Press; 2019 [cited 2021 May 11]. p. 459–71. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30775980/>
136. Roses AD. Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer’s disease [Internet]. Vol. 47, *Annual Review of Medicine*. Annual Reviews 4139 El Camino Way, P.O. Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA ; 1996 [cited 2021 May 11]. p. 387–400. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.med.47.1.387>
137. Bussy A, Snider BJ, Coble D, Xiong C, Fagan AM, Cruchaga C, et al. Effect of apolipoprotein E4 on clinical, neuroimaging, and biomarker measures in

- noncarrier participants in the Dominantly Inherited Alzheimer Network. *Neurobiol Aging*. 2019 Mar 1;75:42–50.
138. Grimmer T, Tholen S, Yousefi BH, Alexopoulos P, Frschler A, Frstl H, et al. Progression of cerebral amyloid load is associated with the apolipoprotein e ϵ 4 genotype in Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry*. 2010 Nov 15;68(10):879–84.
139. Mishra S, Blazey TM, Holtzman DM, Cruchaga C, Su Y, Morris JC, et al. Longitudinal brain imaging in preclinical Alzheimer disease: Impact of APOE ϵ 4 genotype. *Brain* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2021 May 11];141(6):1828–39. Available from: <https://academic.oup.com/brain/article/141/6/1828/4974818>
140. Morris JC, Roe CM, Xiong C, Fagan AM, Goate AM, Holtzman DM, et al. APOE predicts amyloid-beta but not tau Alzheimer pathology in cognitively normal aging. *Ann Neurol* [Internet]. 2010 Jan 1 [cited 2021 May 11];67(1):122–31. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ana.21843>
141. Risacher SL, Kim S, Nho K, Foroud T, Shen L, Petersen RC, et al. APOE effect on Alzheimer's disease biomarkers in older adults with significant memory concern. *Alzheimer's Dement*. 2015 Dec 1;11(12):1417–29.
142. Brecht WJ, Harris FM, Chang S, Tesseur I, Yu GQ, Xu Q, et al. Neuron-Specific Apolipoprotein E4 Proteolysis Is Associated with Increased Tau Phosphorylation in Brains of Transgenic Mice. *J Neurosci* [Internet]. 2004 Mar 10 [cited 2021 May 11];24(10):2527–34. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15014128/>
143. Shi Y, Yamada K, Liddel SA, Smith ST, Zhao L, Luo W, et al. ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Nature* [Internet]. 2017 Sep 28 [cited 2021 Sep 1];549(7673):523–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28959956/>
144. Castellano JM, Kim J, Stewart FR, Jiang H, DeMattos RB, Patterson BW, et al. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci Transl Med* [Internet]. 2011 Jun 29 [cited 2021 May

- 11];3(89):89ra57-89ra57. Available from:
<https://stm.sciencemag.org/content/3/89/89ra57>
145. Verghese PB, Castellano JM, Garai K, Wang Y, Jiang H, Shah A, et al. ApoE influences amyloid- β ($A\beta$) clearance despite minimal apoE/ $A\beta$ association in physiological conditions. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2013 May 7 [cited 2021 May 21];110(19):E1807–16. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1220484110
146. Basak JM, Verghese PB, Yoon H, Kim J, Holtzman DM. Low-density lipoprotein receptor represents an apolipoprotein E-independent pathway of $A\beta$ uptake and degradation by astrocytes. *J Biol Chem*. 2012 Apr 20;287(17):13959–71.
147. Heckmann BL, Teubner BJW, Tummers B, Boada-Romero E, Harris L, Yang M, et al. LC3-Associated Endocytosis Facilitates β -Amyloid Clearance and Mitigates Neurodegeneration in Murine Alzheimer’s Disease. *Cell*. 2019 Jul 25;178(3):536-551.e14.
148. Castellano JM, Deane R, Gottesdiener AJ, Verghese PB, Stewart FR, West T, et al. Low-density lipoprotein receptor overexpression enhances the rate of brain-to-blood $A\beta$ clearance in a mouse model of β -amyloidosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012 Sep 18 [cited 2021 May 25];109(38):15502–7. Available from: <https://www.pnas.org/content/109/38/15502>
149. Zlokovic B V. Cerebrovascular effects of apolipoprotein E: Implications for Alzheimer disease. *JAMA Neurol* [Internet]. 2013 Apr 1 [cited 2021 May 25];70(4):440–4. Available from: <https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/fullarticle/1569375>
150. Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med* [Internet]. 2012 Aug 15 [cited 2021 May 25];4(147):147ra111-147ra111. Available from: <https://stm.sciencemag.org/content/4/147/147ra111>
151. Da Mesquita S, Louveau A, Vaccari A, Smirnov I, Cornelison RC, Kingsmore KM, et al. Functional aspects of meningeal lymphatics in ageing and

- Alzheimer's disease. *Nature* [Internet]. 2018 Aug 9 [cited 2021 May 25];560(7717):185–91. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0368-8>
152. Shi Y, Holtzman DM. Interplay between innate immunity and Alzheimer disease: APOE and TREM2 in the spotlight [Internet]. Vol. 18, *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group; 2018 [cited 2021 May 25]. p. 759–72. Available from: <https://doi.org/10.1038/>
153. Strittmatter WJ, Saunders AM, Goedert M, Weisgraber KH, Dong LM, Jakes R, et al. Isoform-specific interactions of apolipoprotein E with microtubule-associated protein tau: Implications for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1994 Nov 8 [cited 2021 May 25];91(23):11183–6. Available from: <https://www.pnas.org/content/91/23/11183>
154. Gale SC, Gao L, Mikacenic C, Coyle SM, Rafaels N, Murray Dudenkov T, et al. APOε4 is associated with enhanced in vivo innate immune responses in human subjects. *J Allergy Clin Immunol* [Internet]. 2014 [cited 2021 May 26];134(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24655576/>
155. Ulrich JD, Ulland TK, Mahan TE, Nyström S, Peter Nilsson K, Song WM, et al. ApoE facilitates the microglial response to amyloid plaque pathology. *J Exp Med* [Internet]. 2018 Apr 1 [cited 2021 May 26];215(4):1047–58. Available from: <https://doi.org/10.1084/jem.20171265>
156. Jiang Q, Lee CYD, Mandrekar S, Wilkinson B, Cramer P, Zelcer N, et al. ApoE Promotes the Proteolytic Degradation of Aβ. *Neuron*. 2008 Jun 12;58(5):681–93.
157. Ulland TK, Colonna M. TREM2 — a key player in microglial biology and Alzheimer disease [Internet]. Vol. 14, *Nature Reviews Neurology*. Nature Publishing Group; 2018 [cited 2021 May 27]. p. 667–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30266932/>
158. Gratuze M, Leyns CEG, Holtzman DM. New insights into the role of TREM2 in Alzheimer's disease [Internet]. Vol. 13, *Molecular Neurodegeneration*. BioMed Central Ltd.; 2018 [cited 2021 Jun 1]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30572908/>

Bibliografia

159. Parhizkar S, Arzberger T, Brendel M, Kleinberger G, Deussing M, Focke C, et al. Loss of TREM2 function increases amyloid seeding but reduces plaque-associated ApoE. *Nat Neurosci* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2021 May 27];22(2):191–204. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0296-9>
160. Sierksma A, Lu A, Mancuso R, Fattorelli N, Thrupp N, Salta E, et al. Novel Alzheimer risk genes determine the microglia response to amyloid- β but not to TAU pathology. *EMBO Mol Med*. 2020 Mar 6;12(3).
161. Tsai AP, Bor-Chian P, 1# L, 2# D, Moutinho M, Casali BT, et al. INPP5D expression is associated with risk for Alzheimer’s disease and induced by 1 plaque-associated microglia 2 Stark. *bioRxiv* [Internet]. 2020 Aug 31 [cited 2021 May 27];2020.08.31.276444. Available from: <https://doi.org/10.1101/2020.08.31.276444>
162. Paris D, Ait-Ghezala G, Bachmeier C, Laco G, Beaulieu-Abdelahad D, Lin Y, et al. The spleen tyrosine kinase (Syk) regulates Alzheimer amyloid- β production and Tau hyperphosphorylation. *J Biol Chem* [Internet]. 2014 Dec 5 [cited 2021 May 27];289(49):33927–44. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25331948/>
163. De Strooper B, Karran E. The Cellular Phase of Alzheimer’s Disease. *Cell*. 2016.
164. Small SA, Duff K. Linking A β and Tau in Late-Onset Alzheimer’s Disease: A Dual Pathway Hypothesis [Internet]. Vol. 60, *Neuron*. Neuron; 2008 [cited 2021 May 26]. p. 534–42. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19038212/>
165. Sierksma A, Escott-Price V, De Strooper B. Translating genetic risk of Alzheimer’s disease into mechanistic insight and drug targets [Internet]. Vol. 370, *Science*. American Association for the Advancement of Science; 2020 [cited 2021 Jun 4]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33004512/>
166. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, et al. Triple-transgenic model of Alzheimer’s Disease with plaques and tangles:

- Intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron* [Internet]. 2003 Jul 31 [cited 2021 Apr 14];39(3):409–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12895417/>
167. Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM. Intraneuronal A β causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* [Internet]. 2005 Mar 3 [cited 2021 Apr 21];45(5):675–88. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15748844/>
168. Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Wiederhold K-H, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology [Internet]. Vol. 94. 1997 [cited 2021 Jun 4]. Available from: www.pnas.org.
169. Snellman A, López-Picón FR, Rokka J, Salmons M, Forloni G, Scheinin M, et al. Longitudinal amyloid imaging in mouse brain with ¹¹C-PIB: Comparison of APP23, Tg2576, and APP^{swe}-PS1^{dE9} mouse models of Alzheimer disease. *J Nucl Med* [Internet]. 2013 Aug 1 [cited 2021 Jun 4];54(8):1434–41. Available from: <https://jnm.snmjournals.org/content/54/8/1434>
170. Beckmann N, Gérard C, Abramowski D, Cannet C, Staufenbiel M. Noninvasive magnetic resonance imaging detection of cerebral amyloid angiopathy-related microvascular alterations using superparamagnetic iron oxide particles in APP transgenic mouse models of Alzheimer's disease: Application to passive A β immunotherapy. *J Neurosci* [Internet]. 2011 Jan 19 [cited 2021 Jun 4];31(3):1023–31. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21248127/>
171. Beckmann N, Doelemeyer A, Zurbrugg S, Bigot K, Theil D, Frieauff W, et al. Longitudinal noninvasive magnetic resonance imaging of brain microhemorrhages in BACE inhibitor-treated APP transgenic mice. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2021 Jun 4];45:50–60. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27459925/>
172. Bartus RT, Dean RL, Beer B, Lippa AS. The cholinergic hypothesis of geriatric memory dysfunction [Internet]. Vol. 217, *Science*. Science; 1982 [cited 2021 Jun 1]. p. 408–17. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7046051/>

173. Birks J. Cholinesterase inhibitors for Alzheimer's disease [Internet]. Cochrane Database of Systematic Reviews. John Wiley and Sons Ltd; 2006 [cited 2021 Jun 1]. Available from: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD005593/full>
174. Greenamyre JT, Maragos WF, Albin RL, Penney JB, Young AB. Glutamate transmission and toxicity in alzheimer's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* [Internet]. 1988 [cited 2021 Jun 1];12(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2900537/>
175. Livingston G, Sommerlad A, Orgeta V, Costafreda SG, Huntley J, Ames D, et al. Dementia prevention, intervention, and care. Vol. 390, *The Lancet*. Lancet Publishing Group; 2017. p. 2673–734.
176. McShane R, Westby MJ, Roberts E, Minakaran N, Schneider L, Farrimond LE, et al. Memantine for dementia [Internet]. Vol. 2019, Cochrane Database of Systematic Reviews. John Wiley and Sons Ltd; 2019 [cited 2021 Jun 3]. p. 1–446. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30891742/>
177. Kishi T, Matsunaga S, Oya K, Nomura I, Ikuta T, Iwata N. Memantine for Alzheimer's Disease: An Updated Systematic Review and Meta-analysis [Internet]. Vol. 60, *Journal of Alzheimer's Disease*. IOS Press; 2017 [cited 2021 Jun 3]. p. 401–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28922160/>
178. Karran E, Hardy J. A critique of the drug discovery and phase 3 clinical programs targeting the amyloid hypothesis for Alzheimer disease [Internet]. Vol. 76, *Annals of Neurology*. John Wiley and Sons Inc.; 2014 [cited 2021 Jun 3]. p. 185–205. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/ana.24188>
179. Schenk D, Barbour R, Dunn W, Gordon G, Grajeda H, Guldo T, et al. Immunization with amyloid- β attenuates Alzheimer disease-like pathology in the PDAPP mouse. *Nature* [Internet]. 1999 Jul 8 [cited 2021 Oct 29];400(6740):173–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10408445/>
180. Orgogozo JM, Gilman S, Dartigues JF, Laurent B, Puel M, Kirby LC, et al.

- Subacute meningoencephalitis in a subset of patients with AD after A β 42 immunization. *Neurology* [Internet]. 2003 Jul 8 [cited 2021 Oct 29];61(1):46–54. Available from: <https://n.neurology.org/content/61/1/46>
181. Vellas B, Black R, Thal L, Fox N, Daniels M, McLennan G, et al. Long-Term Follow-Up of Patients Immunized with AN1792: Reduced Functional Decline in Antibody Responders. *Curr Alzheimer Res* [Internet]. 2009 Mar 6 [cited 2021 Oct 29];6(2):144–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19355849/>
182. Roda AR, Serra-Mir G, Montoliu-Gaya L, Tiessler L, Villegas S. Amyloid-beta peptide and tau protein crosstalk in Alzheimer’s disease. *Neural Regen Res*. 2022;17.
183. Bard F, Cannon C, Barbour R, Burke RL, Games D, Grajeda H, et al. Peripherally administered antibodies against amyloid β -peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease. *Nat Med* [Internet]. 2000 Aug [cited 2021 Jun 3];6(8):916–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10932230/>
184. Salloway S, Sperling R, Fox NC, Blennow K, Klunk W, Raskind M, et al. Two Phase 3 Trials of Bapineuzumab in Mild-to-Moderate Alzheimer’s Disease. *N Engl J Med* [Internet]. 2014 Jan 23 [cited 2021 Jun 3];370(4):322–33. Available from: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1304839>
185. La Porte SL, Bollini SS, Lanz TA, Abdiche YN, Rusnak AS, Ho WH, et al. Structural basis of C-terminal β -amyloid peptide binding by the antibody ponezumab for the treatment of Alzheimer’s disease. *J Mol Biol*. 2012 Aug 24;421(4–5):525–36.
186. Landen JW, Andreasen N, Cronenberger CL, Schwartz PF, Börjesson-Hanson A, Östlund H, et al. Ponezumab in mild-to-moderate Alzheimer’s disease: Randomized phase II PET-PIB study. In: *Alzheimer’s and Dementia: Translational Research and Clinical Interventions*. Elsevier Inc; 2017. p. 393–401.
187. Landen JW, Cohen S, Billing CB, Cronenberger C, Styren S, Burstein AH, et al. Multiple-dose ponezumab for mild-to-moderate Alzheimer’s disease: Safety

- and efficacy. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv* [Internet]. 2017 Sep 1 [cited 2021 Jun 3];3(3):339–47. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29067341/>
188. DeMattos RB, Bales KR, Cummins DJ, Dodart JC, Paul SM, Holtzman DM. Peripheral anti-A β antibody alters CNS and plasma A β clearance and decreases brain A β burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2001 Jul 17 [cited 2021 Jun 3];98(15):8850–5. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.151261398
189. Bohrmann B, Baumann K, Benz J, Gerber F, Huber W, Knoflach F, et al. Gantenerumab: A novel human anti-A β antibody demonstrates sustained cerebral amyloid- β binding and elicits cell-mediated removal of human amyloid- β . *J Alzheimer's Dis*. 2012 Jan 1;28(1):49–69.
190. Adolfsson O, Pihlgren M, Toni N, Varisco Y, Buccarello AL, Antonello K, et al. An effector-reduced anti- β -amyloid (A β) antibody with unique A β binding properties promotes neuroprotection and glial engulfment of A β . *J Neurosci* [Internet]. 2012 Jul 11 [cited 2021 Jun 3];32(28):9677–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22787053/>
191. Sevigny J, Chiao P, Bussière T, Weinreb PH, Williams L, Maier M, et al. The antibody aducanumab reduces A β plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. 2016;
192. Arnold C. Post-hoc analysis could give new life to the Alzheimer's drug aducanumab. *Nat Med*. 2020 Nov 2;
193. Mullard A. FDA approval for Biogen's aducanumab sparks Alzheimer disease firestorm. *Nat Rev Drug Discov*. 2021 Jul 1;20(7):496.
194. First Cognitive Signal that Tau Immunotherapy Works? | ALZFORUM [Internet]. [cited 2021 Dec 17]. Available from: <https://www.alzforum.org/news/research-news/first-cognitive-signal-tau-immunotherapy-works>
195. Qureshi IA, Tirucherai G, Ahlijanian MK, Kolaitis G, Bechtold C, Grundman M. A randomized, single ascending dose study of intravenous BIIB092 in healthy participants. *Alzheimer's Dement Transl Res Clin Interv* [Internet].

- 2018 Jan 1 [cited 2021 Jun 3];4:746–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30581980/>
196. More Tau Antibodies Bid Adieu; Semorinemab Keeps Foot in Door | ALZFORUM [Internet]. [cited 2021 Dec 17]. Available from: <https://www.alzforum.org/news/conference-coverage/more-tau-antibodies-bid-adieu-semorinemab-keeps-foot-door>
197. Marín-Argany M, Rivera-Hernández G, Martí J, Villegas S. An anti-A β (amyloid β) single-chain variable fragment prevents amyloid fibril formation and cytotoxicity by withdrawing A β oligomers from the amyloid pathway. *Biochem J* [Internet]. 2011 Jul 1 [cited 2021 Jun 3];437(1):25–34. Available from: [/biochemj/article/437/1/25/45480/An-anti-A-amyloid-single-chain-variable-fragment](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21444440/)
198. Montoliu-Gaya L, Mulder SD, Veerhuis R, Villegas S. Effects of an A β -antibody fragment on A β aggregation and astrocytic uptake are modulated by apolipoprotein E and J mimetic peptides. *PLoS One* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2021 Jun 9];12(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29155887/>
199. Montoliu-Gaya L, Mulder SD, Herrebout MAC, Baayen JC, Villegas S, Veerhuis R. A β -oligomer uptake and the resulting inflammatory response in adult human astrocytes are precluded by an anti-A β single chain variable fragment in combination with an apoE mimetic peptide. *Mol Cell Neurosci* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2021 Jul 27];89:49–59. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29625180/>
200. Montoliu-Gaya L, Güell-Bosch J, Esquerda-Canals G, Roda AR, Serra-Mir G, Lope-Piedrafita S, et al. Differential effects of apoE and apoJ mimetic peptides on the action of an anti-A β scFv in 3xTg-AD mice. *Biochem Pharmacol* [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2021 Apr 14];155:380–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30026023/>
201. Güell-Bosch J, Lope-Piedrafita S, Esquerda-Canals G, Montoliu-Gaya L, Villegas S. Progression of Alzheimer’s disease and effect of scFv-h3D6 immunotherapy in the 3xTg-AD mouse model: An in vivo longitudinal study using Magnetic Resonance Imaging and Spectroscopy. *NMR Biomed*

- [Internet]. 2020 May 1 [cited 2021 Apr 14];33(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32067292/>
202. Rivera-Hernández G, Marin-Argany M, Blasco-Moreno B, Bonet J, Oliva B, Villegas S. Elongation of the C-terminal domain of an anti-amyloid β single-chain variable fragment increases its thermodynamic stability and decreases its aggregation tendency. *MAbs* [Internet]. 2013 Sep [cited 2021 Apr 14];5(5):678–89. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23924802/>
203. Esquerda-Canals G, Roda AR, Martí-Clúa J, Montoliu-Gaya L, Rivera-Hernández G, Villegas S. Treatment with scFv-h3D6 Prevented Neuronal Loss and Improved Spatial Memory in Young 3xTg-AD Mice by Reducing the Intracellular Amyloid- β Burden. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2019 [cited 2021 Apr 14];70(4):1069–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31306135/>
204. Jiménez Xarrié E. Caracterización de la proliferación celular en las zonas subventriculares y de la evolución del infarto mediante espectroscopía de resonancia magnética en un modelo preclínico de isquemia cerebral. [Bellaterra]: Universitat Autònoma de Barcelona; 2013.
205. Weishaupt D, Köchli VD, Marincek B. *How Does MRI Work?* 2nd ed. *How Does MRI Work?* Springer Berlin Heidelberg; 2008.
206. Yousaf T, Dervenoulas G, Politis M. *Advances in MRI Methodology*. In: *International Review of Neurobiology*. Academic Press Inc.; 2018. p. 31–76.
207. Dusek P, Dezortova M, Wuerfel J. Imaging of Iron. *Int Rev Neurobiol*. 2013 Jan 1;110:195–239.
208. Telling ND, Everett J, Collingwood JF, Dobson J, van der Laan G, Gallagher JJ, et al. Iron Biochemistry is Correlated with Amyloid Plaque Morphology in an Established Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Cell Chem Biol* [Internet]. 2017 Oct 19 [cited 2021 Jul 28];24(10):1205-1215.e3. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28890316/>
209. Collingwood JF, Mikhaylova A, Davidson M, Batich C, Streit WJ, Terry J, et al. In situ characterization and mapping of iron compounds in Alzheimer's disease tissue. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2005 [cited 2021 Jul 28];7(4):267–

72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16131727/>
210. Mamisch TC, Hughes T, Mosher TJ, Mueller C, Trattnig S, Boesch C, et al. T2 star relaxation times for assessment of articular cartilage at 3 T: A feasibility study. *Skeletal Radiol* [Internet]. 2012 [cited 2021 May 12];41(3):287–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21499976/>
211. Tang MY, Chen TW, Zhang XM, Huang XH. GRE T2 *-Weighted MRI: Principles and Clinical Applications. *BioMed Res Int* [Internet]. 2014 [cited 2021 May 12];2014. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/312142>
212. Yan Aung W, Mar S, Benzinger TL. Diffusion tensor MRI as a biomarker in axonal and myelin damage. *Imaging Med*. 2013;5(5):427–40.
213. Mullis KB, Faloona FA. Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction. *Methods Enzymol*. 1987;
214. Montoliu-Gaya L. IMMUNOTHERAPY FOR ALZHEIMER'S DISEASE: from antibody engineering to combined therapy with apolipoproteins. [Bellaterra]: Universitat Autònoma de Barcelona; 2017.
215. Bessette PH, Aslund F, Beckwith J, Georgiou G. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the Escherichia coli cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(24):13703–8.
216. de Marco A. Strategies for successful recombinant expression of disulfide bond-dependent proteins in Escherichia coli. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2009;8:26. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2689190&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
217. Studier FW, Moffatt BA. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol*. 1986;
218. J L-C, WW W, S X, W G, LT L, J V, et al. Condensed protocol for competent cell preparation and transformation of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biotechniques* [Internet]. 2005 [cited 2021 Nov 4];38(1):44–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15679083/>
219. Umetsu M, Tsumoto K, Masaki H, Ashish K, Goda S, Adschiri T, et al. How

- additives influence the refolding of immunoglobulin-folded proteins in a stepwise dialysis system. *J Biol Chem.* 2003;278(14):8979–87.
220. Rivera Hernández G. Obtención de un fragmento de anticuerpo específico contra oligómeros de A β como agente inmunoterapéutico de la enfermedad de Alzheimer: demostración de su eficacia en el modelo murino 3xTg-AD y mejora de su estabilidad termodinámica. [Bellaterra]: Universitat Autònoma de Barcelona; 2013.
221. Greenfield NJ. Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc* [Internet]. 2007 Jan [cited 2021 Jun 30];1(6):2876–90. Available from: [/pmc/articles/PMC2728378/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16257222/)
222. Holzwarth G, Doty P. The Ultraviolet Circular Dichroism of Polypeptides. *J Am Chem Soc* [Internet]. 1965 [cited 2021 Jun 30];87(2):218–28. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
223. Greenfield N, Fasman GD. Computed Circular Dichroism Spectra for the Evaluation of Protein Conformation. *Biochemistry* [Internet]. 1969 Jan 1 [cited 2021 Jun 30];8(10):4108–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5346390/>
224. Venyaminov SY, Baikalov IA, Shen ZM, Wu CSC, Yang JT. Circular dichroic analysis of denatured proteins: Inclusion of denatured proteins in the reference set. *Anal Biochem.* 1993 Oct 1;214(1):17–24.
225. Sreerama N, Manning MC, Powers ME, Zhang JX, Goldenberg DP, Woody RW. Tyrosine, phenylalanine, and disulfide contributions to the circular dichroism of proteins: Circular dichroism spectra of wild-type and mutant bovine pancreatic trypsin inhibitor. *Biochemistry* [Internet]. 1999 Aug 17 [cited 2021 Jun 30];38(33):10814–22. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
226. Royer CA. Fluorescence spectroscopy. [Internet]. Vol. 40, *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). Humana Press; 1995 [cited 2021 Jun 30]. p. 65–89. Available from: <https://link.springer.com/protocol/10.1385/0-89603-301-5:65>
227. Zandomenighi G, Krebs MRH, McCammon MG, Fändrich M. FTIR reveals

- structural differences between native β -sheet proteins and amyloid fibrils. *Protein Sci* [Internet]. 2009 Jan 1 [cited 2021 Jun 30];13(12):3314–21. Available from: <http://www.proteinscience.org/cgi/doi/10.1110/ps.041024904>.
228. Goodhew PJ, Humphreys J, Beanland R. *Electron microscopy and analysis* [Internet]. 3th ed. CRC Press; 2000 [cited 2021 Jun 30]. 254 p. Available from: https://www.academia.edu/694221/Electron_microscopy_and_analysis
229. Belfiore R, Rodin A, Ferreira E, Velazquez R, Branca C, Caccamo A, et al. Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice. *Aging Cell* [Internet]. 2019 Feb 1 [cited 2021 Jul 8];18(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30488653/>
230. Carroll JC, Rosario ER, Kreimer S, Villamagna A, Gentzschlein E, Stanczyk FZ, et al. Sex differences in β -amyloid accumulation in 3xTg-AD mice: Role of neonatal sex steroid hormone exposure. *Brain Res* [Internet]. 2010 [cited 2021 Apr 21];1366:233–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20934413/>
231. Beam CR, Kaneshiro C, Jang JY, Reynolds CA, Pedersen NL, Gatz M. Differences between Women and Men in Incidence Rates of Dementia and Alzheimer's Disease. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2018 [cited 2021 Apr 14];64(4):1077–83. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30010124/>
232. Kane AE, Shin S, Wong AA, Fertan E, Faustova NS, Howlett SE, et al. Sex differences in healthspan predict lifespan in the 3xTg-AD Mouse model of Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2018 Jun 12 [cited 2021 Apr 21];10(JUN). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29946252/>
233. Montoliu-Gaya L, Esquerda-Canals G, Bronsoms S, Villegas S. Production of an anti-A β antibody fragment in *Pichia pastoris* and in vitro and in vivo validation of its therapeutic effect. *PLoS One* [Internet]. 2017 Aug 1 [cited 2021 Apr 14];12(8):e0181480. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28771492/>

234. Esquerda-Canals G, Martí J, Rivera-Hernández G, Giménez-Llort L, Villegas S. Loss of deep cerebellar nuclei neurons in the 3xTg-AD mice and protection by an anti-amyloid β antibody fragment. *MAbs* [Internet]. 2013 Sep [cited 2021 Apr 21];5(5):660–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23884149/>
235. Esquerda-Canals G, Martí-Clúa J, Villegas S. Pharmacokinetic parameters and mechanism of action of an efficient anti-A β single chain antibody fragment. *PLoS One* [Internet]. 2019 May 1 [cited 2021 Apr 14];14(5). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31150495/>
236. Amrhein V, Greenland S, McShane B. Scientists rise up against statistical significance [Internet]. Vol. 567, *Nature*. Nature Publishing Group; 2019 [cited 2021 Apr 22]. p. 305–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30894741/>
237. Wendt HW. Dealing with a common problem in Social science: A simplified rank-biserial coefficient of correlation based on the U statistic. *Eur J Soc Psychol* [Internet]. 1972 Oct 1 [cited 2021 Apr 22];2(4):463–5. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ejsp.2420020412>
238. Franklin KB., Paxinos G. Paxinos and Franklin's the Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates, Compact - 5th Edition [Internet]. Elsevier. 2019 [cited 2021 Apr 21]. Available from: https://www.elsevier.com/books/paxinos-and-franklins-the-mouse-brain-in-stereotaxic-coordinates-compact/franklin/978-0-12-816159-3?utm_source=google_ads&utm_medium=paid_search&utm_campaign=nlds-a-en&gclid=CjwKCAjwmv-DBhAMEiwA7xYrdzjlEuMo84hGs4xrHF292iko-bjrzzl0bKkGdby_jLY-sQ0HpDHACHoCrdMQAvD_BwE&gclsrc=aw.ds
239. Sant'Anna R, Gallego P, Robinson LZ, Pereira-Henriques A, Ferreira N, Pinheiro F, et al. Repositioning tolcapone as a potent inhibitor of transthyretin amyloidogenesis and associated cellular toxicity. *Nat Commun* [Internet]. 2016 Feb 23 [cited 2021 Sep 22];7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26902880/>
240. Almasri H, Almeer A, Awouda S, Hamid O, Sardar S, Anwer Z, et al. Cardiac

- amyloidosis presenting with pre-excitation syndrome, heart failure, and severe factor x deficiency as part of systemic amyloid light-chain (AL) amyloidosis – a fatal combination. *Am J Case Rep* [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 22];22(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34413281/>
241. Blancas-Mejía LM, Horn TJ, Marin-Argany M, Auton M, Tischer A, Ramirez-Alvarado M. Thermodynamic and fibril formation studies of full length immunoglobulin light chain AL-09 and its germline protein using scan rate dependent thermal unfolding. *Biophys Chem*. 2015 Dec 1;207:13–20.
242. Dai C ling, Tung YC, Liu F, Gong CX, Iqbal K. Tau passive immunization inhibits not only tau but also A β pathology. *Alzheimer's Res Ther* [Internet]. 2017 Jan 10 [cited 2021 Apr 14];9(1):1–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28073379/>
243. Benhamron S, Rozenstein-Tsalkovich L, Nitzan K, Abramsky O, Rosenmann H. Phos-tau peptide immunization of amyloid-tg-mice reduced non-mutant phos-tau pathology, improved cognition and reduced amyloid plaques. *Exp Neurol* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2021 Apr 14];303:48–58. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29432723/>
244. Güell-Bosch J. Diagnòstic i monitorització de la malaltia d'Alzheimer mitjançant tècniques de ressonància magnètica in vivo en el model 3xTg-AD: Avaluació de l'eficàcia del tractament longitudinal amb dos fragments d'anticòs contra el pèptid A β . [Bellaterra]: Universitat Autònoma de Barcelona; 2017.
245. Blennow K, Zetterberg H, Rinne JO, Salloway S, Wei J, Black R, et al. Effect of immunotherapy with bapineuzumab on cerebrospinal fluid biomarker levels in patients with mild to moderate alzheimer disease. *Arch Neurol* [Internet]. 2012 Aug [cited 2021 Apr 15];69(8):1002–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22473769/>
246. Czirr E, Wyss-Coray T. The immunology of neurodegeneration [Internet]. Vol. 122, *Journal of Clinical Investigation*. J Clin Invest; 2012 [cited 2021 Apr 14]. p. 1156–63. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22466657/>
247. Guerreiro R, Wojtas A, Bras J, Carrasquillo M, Rogaeva E, Majounie E, et al.

- TREM2 Variants in Alzheimer's Disease . *N Engl J Med* [Internet]. 2013 Jan 10 [cited 2021 Apr 14];368(2):117–27. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23150934/>
248. Sperling R, Salloway S, Brooks DJ, Tampieri D, Barakos J, Fox NC, et al. Amyloid-related imaging abnormalities in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: A retrospective analysis. *Lancet Neurol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2021 Apr 14];11(3):241–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22305802/>
249. Ostrowitzki S, Lasser RA, Dorflinger E, Scheltens P, Barkhof F, Nikolcheva T, et al. A phase III randomized trial of gantenerumab in prodromal Alzheimer's disease. *Alzheimer's Res Ther* 2017 91 [Internet]. 2017 Dec 8 [cited 2021 Jul 12];9(1):1–15. Available from: <https://alzres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13195-017-0318-y>
250. Hampel H, Teipel SJ, Alexander GE, Pogarell O, Rapoport SI, Möller HJ. In vivo imaging of region and cell type specific neocortical neurodegeneration in Alzheimer's disease: Perspectives of MRI derived corpus callosum measurement for mapping disease progression and effects of therapy. Evidence from studies with MRI, EEG and PET. *J Neural Transm* [Internet]. 2002 [cited 2021 Jun 15];109(5–6):837–55. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s007020200069>
251. Soldan A, Pettigrew C, Zhu Y, Wang MC, Moghekar A, Gottesman RF, et al. White matter hyperintensities and CSF Alzheimer disease biomarkers in preclinical Alzheimer disease. *Neurology* [Internet]. 2020 Mar 3 [cited 2021 Jun 15];94(9):e950–60. Available from: <https://n.neurology.org/content/94/9/e950>
252. Huang H, Fan X, Weiner M, Martin-Cook K, Xiao G, Davis J, et al. Distinctive disruption patterns of white matter tracts in Alzheimer's disease with full diffusion tensor characterization. *Neurobiol Aging*. 2012 Sep;33(9):2029–45.
253. Duning T, Warnecke T, Mohammadi S, Lohmann H, Schiffbauer H, Kugel H, et al. Pattern and progression of white-matter changes in a case of posterior cortical atrophy using diffusion tensor imaging. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2021 Jun 15];80(4):432–6. Available from:

- <https://jnnp.bmj.com/content/80/4/432>
254. Agosta F, Scola E, Canu E, Marcone A, Magnani G, Sarro L, et al. White matter damage in frontotemporal lobar degeneration spectrum. *Cereb Cortex* [Internet]. 2012 Dec 1 [cited 2021 Jun 15];22(12):2705–14. Available from: <http://www.xinapse.com/Manual/index.html>
255. Xie M, Tobin JE, Budde MD, Chen CI, Trinkaus K, Cross AH, et al. Rostrocaudal analysis of corpus callosum demyelination and axon damage across disease stages refines diffusion tensor imaging correlations with pathological features. *J Neuropathol Exp Neurol* [Internet]. 2010 Jul 1 [cited 2021 Jun 15];69(7):704–16. Available from: www.jneuropath.com
256. Smith CD, Chebrolu H, Andersen AH, Powell DA, Lovell MA, Xiong S, et al. White matter diffusion alterations in normal women at risk of Alzheimer's disease. 2008 [cited 2021 Jun 15]; Available from: <http://www.elsevier.com>
257. Gold BT, Powell DA, Andersen AH, Smith CD. Alterations in multiple measures of white matter integrity in normal women at high risk for Alzheimer's disease. 2010;
258. Panza F, Frisardi V, Imbimbo BP, D'Onofrio G, Pietrarossa G, Seripa D, et al. Bapineuzumab: anti- β -amyloid monoclonal antibodies for the treatment of Alzheimer's disease. *Immunotherapy* [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2021 Jul 6];2(6):767–82. Available from: <https://europepmc.org/article/MED/21091109>
259. Kortt AA, Dolezal O, Power BE, Hudson PJ. Dimeric and trimeric antibodies: High avidity scFvs for cancer targeting. *Biomol Eng*. 2001;18(3):95–108.
260. Lee YC, Boehm MK, Chester KA, Begent RHJ, Perkins SJ. Reversible dimer formation and stability of the anti-tumour single-chain Fv antibody MFE-23 by neutron scattering, analytical ultracentrifugation, and NMR and FT-IR spectroscopy. *J Mol Biol*. 2002;320(1):107–27.
261. Martsev SP, Kravchuk ZI, Chumanevich AA, Vlasov AP, Dubnovitsky AP, Beshpalov IA, et al. Antiferritin single-chain antibody: A functional protein with incomplete folding? *FEBS Lett*. 1998;441(3):458–62.
262. Drummond E, Wisniewski T. Alzheimer's disease: experimental models and reality [Internet]. Vol. 133, *Acta Neuropathologica*. Springer Verlag; 2017

- [cited 2021 Apr 14]. p. 155–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28025715/>
263. Kerchner GA, Boxer AL. Bapineuzumab [Internet]. Vol. 10, Expert Opinion on Biological Therapy. Expert Opin Biol Ther; 2010 [cited 2021 Jun 9]. p. 1121–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20497044/>
264. Prince M, Comas-Herrera A, Knapp M, Guerchet M, Karagiannidou M. World Alzheimer Report 2016 Improving healthcare for people living with dementia coverage, Quality and costs now and in the future [Internet]. London, UK; 2006 [cited 2021 Apr 14]. Available from: www.daviddesigns.co.uk
265. Syvänen S, Hultqvist G, Gustavsson T, Gumucio A, Laudon H, Söderberg L, et al. Efficient clearance of A β protofibrils in A β PP-transgenic mice treated with a brain-penetrating bifunctional antibody. *Alzheimer's Res Ther* [Internet]. 2018 May 24 [cited 2021 Apr 14];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29793530/>
266. Guerrero-Muñoz MJ, Gerson J, Castillo-Carranza DL. Tau Oligomers: The Toxic Player at Synapses in Alzheimer's Disease. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2015 Dec 2 [cited 2021 Jul 6];9(DEC):1–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26696824/>
267. Sarnataro D. Attempt to Untangle the Prion-Like Misfolding Mechanism for Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Oct 9 [cited 2021 Jul 6];19(10). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30304819/>
268. Ghosal K, Vogt DL, Liang M, Shen Y, Lamb BT, Pimplikar SW. Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009 [cited 2021 Jul 6];106(43):18367–72. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19837693/>
269. Ghosal K, Fan Q, Dawson HN, Pimplikar SW. Tau Protein Mediates APP Intracellular Domain (AICD)-Induced Alzheimer's-Like Pathological Features in Mice. *PLoS One* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2021 Jul 6];11(7). Available from: [/pmc/articles/PMC4961442/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26961442/)
270. Rosenberg RN, Fu M, Lambracht-Washington D. Active full-length DNA A β

- 42 immunization in 3xTg-AD mice reduces not only amyloid deposition but also tau pathology. *Alzheimers Res Ther* [Internet]. 2018 Nov 20 [cited 2021 Jul 6];10(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30454039/>
271. Congdon EE, Sigurdsson EM. Tau-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 2018 147 [Internet]. 2018 Jun 12 [cited 2021 Jul 6];14(7):399–415. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41582-018-0013-z>
272. Robert R, Wark KL. Engineered antibody approaches for Alzheimer’s disease immunotherapy. *Arch Biochem Biophys* [Internet]. 2012 Oct 15 [cited 2021 Jul 6];526(2):132–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22475448/>
273. Gadani SP, Walsh JT, Lukens JR, Kipnis J. Dealing with Danger in the CNS: The Response of the Immune System to Injury. *Neuron* [Internet]. 2015 Jul 1 [cited 2021 Jul 6];87(1):47–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26139369/>
274. Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim B, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* [Internet]. 2016 May 6 [cited 2021 Jul 6];352(6286):712–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27033548/>
275. Colonna M, Wang Y. TREM2 variants: new keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis. *Nat Rev Neurosci* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2021 Jul 6];17(4):201–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26911435/>
276. Ziegler-Waldkirch S, Meyer-Luehmann M. The Role of Glial Cells and Synapse Loss in Mouse Models of Alzheimer’s Disease. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2018 Dec 11 [cited 2021 Jul 7];12. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30618627/>
277. Heneka MT, Sastre M, Dumitrescu-Ozimek L, Dewachter I, Walter J, Klockgether T, et al. Focal glial activation coincides with increased BACE1 activation and precedes amyloid plaque deposition in APP[V717I] transgenic mice. *J Neuroinflammation* [Internet]. 2005 Oct 7 [cited 2021 Jul 7];2. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16212664/>
278. Yin Z, Raj D, Saiepour N, Van Dam D, Brouwer N, Holtman IR, et al. Immune

- hyperreactivity of A β plaque-associated microglia in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2017 Jul 1 [cited 2021 Jul 7];55:115–22. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28434692/>
279. Chung IY, Benveniste EN. Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. *J Immunol* [Internet]. 1990 [cited 2021 Jul 7];144(8):2999–3007. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2109008>
280. Fu AK, Hung K-W, Yuen MY, Zhou X, Mak DS, Chan IC, et al. IL-33 ameliorates Alzheimer's disease-like pathology and cognitive decline. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2016 May 10 [cited 2021 Jul 7];113(19):E2705–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27091974/>
281. Carlock C, Wu J, Shim J, Moreno-Gonzalez I, Pitcher MR, Hicks J, et al. Interleukin33 deficiency causes tau abnormality and neurodegeneration with Alzheimer-like symptoms in aged mice. *Transl Psychiatry* [Internet]. 2017 Jul 4 [cited 2021 Jul 7];7(7). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28675392/>
282. Xiong Z, Thangavel R, Kempuraj D, Yang E, Zaheer S, Zaheer A. Alzheimer's disease: Evidence for the expression of interleukin-33 and its receptor ST2 in the brain. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2014 [cited 2021 Jul 7];40(2):297–308. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24413615/>
283. Herline K, Prelli F, Mehta P, MacMurray C, Goñi F, Wisniewski T. Immunotherapy to improve cognition and reduce pathological species in an Alzheimer's disease mouse model. *Alzheimers Res Ther* [Internet]. 2018 Jun 18 [cited 2021 Jul 7];10(1):54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29914551/>
284. Tarasoff-Conway JM, Carare RO, Osorio RS, Glodzik L, Butler T, Fieremans E, et al. Clearance systems in the brain - Implications for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol*. 2015 Aug 8;11(8):457–70.
285. Wilcock D, Colton C. Immunotherapy, Vascular Pathology, and Microhemorrhages in Transgenic Mice. *CNS Neurol Disord - Drug Targets*

- [Internet]. 2009 Mar 6 [cited 2021 Jul 12];8(1):50–64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19275636/>
286. Greenberg SM, Bacskai BJ, Hernandez-Guillamon M, Pruzin J, Sperling R, Veluw SJ van. Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease — one peptide, two pathways. *Nat Rev Neurol* 2019 161 [Internet]. 2019 Dec 11 [cited 2021 Jul 12];16(1):30–42. Available from: <https://www.nature.com/articles/s41582-019-0281-2>
287. Nicoll JAR, Wilkinson D, Holmes C, Steart P, Markham H, Weller RO. Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid- β peptide: a case report. *Nat Med • Vol* [Internet]. 2003 [cited 2021 Jul 12];9(4). Available from: <http://www.nature.com/naturemedicine>
288. Du Y, Liu C, Ma C, Xu X, Zhou X, Zhou H, et al. Cerebral amyloid angiopathy-related inflammation: A case report presenting with a rare variant in SORL1 gene. *BMC Neurol* [Internet]. 2019 May 15 [cited 2021 Jul 28];19(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31092209/>
289. Reuter B, Venus A, Heiler P, Schad L, Ebert A, Hennerici MG, et al. Development of cerebral microbleeds in the APP23-transgenic mouse model of cerebral amyloid angiopathy—a 9.4 tesla MRI study. *Front Aging Neurosci* [Internet]. 2016 Jul 8 [cited 2021 Jul 27];8(JUN). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27458375/>
290. Pfeifer M, Boncristiano S, Bondolfi L, Stalder A, Deller T, Staufenbiel M, et al. Cerebral hemorrhage after passive anti-A β immunotherapy [Internet]. Vol. 298, *Science*. Science; 2002 [cited 2021 Jul 27]. p. 1379. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12434053/>
291. Blockx I, Einstein S, Guns PJ, Van Audekerke J, Guglielmetti C, Zago W, et al. Monitoring Blood-Brain Barrier Integrity Following Amyloid- β Immunotherapy Using Gadolinium-Enhanced MRI in a PDAPP Mouse Model. *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2016 Sep 6 [cited 2021 Jul 27];54(2):723–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27567811/>
292. Zago W, Schroeter S, Guido T, Khan K, Seubert P, Yednock T, et al. Vascular alterations in PDAPP mice after anti-A β immunotherapy: Implications for

- amyloid-related imaging abnormalities. *Alzheimer's Dement* [Internet]. 2013 Oct [cited 2021 Jul 27];9(5 SUPPL.). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23583235/>
293. Carty NC, Wilcock DM, Rosenthal A, Grimm J, Pons J, Ronan V, et al. Intracranial administration of deglycosylated C-terminal-specific anti-A β antibody efficiently clears amyloid plaques without activating microglia in amyloid-depositing transgenic mice. 2006 [cited 2021 Aug 3]; Available from: <http://www.jneuroinflammation.com/content/3/1/11>
294. Bacskai BJ, Kajdasz ST, McLellan ME, Games D, Seubert P, Schenk D, et al. Non-Fc-Mediated Mechanisms Are Involved in Clearance of Amyloid-In Vivo by Immunotherapy. 2002;
295. McGowan E, Pickford F, Kim J, Onstead L, Eriksen J, Yu C, et al. A β 42 is essential for parenchymal and vascular amyloid deposition in mice. *Neuron* [Internet]. 2005 Jul 21 [cited 2021 Jul 27];47(2):191–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16039562/>
296. Goodman J, Freeman G, Angus W, Brown T, Chou PC, Bales K. IC-P-003: Spontaneous amyloid-related imaging abnormalities of the microhemorrhage and effusive/edematous types in aged APP+ presenilin 1 mice. In: *Alzheimer's & Dementia*. No longer published by Elsevier; 2012. p. P11–2.
297. Totenhagen JW, Lope-Piedrafita S, Borbon IA, Yoshimaru ES, Erickson RP, Trouard TP. In vivo assessment of neurodegeneration in niemann-pick type C mice by quantitative T2 mapping and diffusion tensor imaging. *J Magn Reson Imaging*. 2012 Mar;35(3):528–36.
298. Campeau NG, Petersen RC, Felmlee JP, O'Brien PC, Jack CR. Hippocampal transverse relaxation times in patients with Alzheimer disease. *Radiology* [Internet]. 1997 [cited 2021 Jul 27];205(1):197–201. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9314985/>
299. Kirsch SJ, Jacobs RW, Butcher LL, Beatty J. Prolongation of magnetic resonance T2 time in hippocampus of human patients marks the presence and severity of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* [Internet]. 1992 Jan 6 [cited 2021 Jul 27];134(2):187–90. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1589144/>
300. Laakso MP, Partanen K, Soininen H, Lehtovirta M, Hallikainen M, Hänninen T, et al. MR T2 relaxometry in Alzheimer's disease and age-associated memory impairment. *Neurobiol Aging* [Internet]. 1996 Jul [cited 2021 Jul 27];17(4):535–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8832627/>
 301. Falangola MF, Dyakin V V., Lee SP, Bogart A, Babb JS, Duff K, et al. Quantitative MRI reveals aging-associated T2 changes in mouse models of Alzheimer's disease. *NMR Biomed* [Internet]. 2007 May [cited 2021 Jul 27];20(3):343–51. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17451178/>
 302. Helpert JA, Lee SP, Falangola MF, Dyakin V V., Bogart A, Ardekani B, et al. MRI Assessment of Neuropathology in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Magn Reson Med* [Internet]. 2004 [cited 2021 Jul 27];51(4):794–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15065253/>
 303. Esteras N, Alquézar C, Bartolomé F, Antequera D, Barrios L, Carro E, et al. Systematic evaluation of magnetic resonance imaging and spectroscopy techniques for imaging a transgenic model of alzheimer's disease (A β PP/PS1). *J Alzheimer's Dis* [Internet]. 2012 [cited 2021 Jul 27];30(2):337–53. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22406445/>
 304. Li L, Wang XY, Gao FB, Wang L, Xia R, Li ZX, et al. Magnetic resonance T2 relaxation time at 7 Tesla associated with amyloid β pathology and age in a double-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2021 Jul 27];610:92–7. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26520465/>
 305. El Tannir El Tayara N, Delatour B, Le Cudennec C, Guégan M, Volk A, Dhenain M. Age-related evolution of amyloid burden, iron load, and MR relaxation times in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2006 Apr [cited 2021 Jul 27];22(1):199–208. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16337798/>
 306. Falangola MF, Lee SP, Nixon RA, Duff K, Helpert JA. Histological co-localization of iron in A β plaques of PS/APP transgenic mice. *Neurochem Res*

- [Internet]. 2005 Feb [cited 2021 Jul 27];30(2):201–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15895823/>
307. Matsuoka Y, Picciano M, Maleste B, LaFrancois J, Zehr C, Daeschner JAM, et al. Inflammatory responses to amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer’s disease. *Am J Pathol* [Internet]. 2001 [cited 2021 Jul 27];158(4):1345–54. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11290552/>
308. Wilkins A, Scolding N. Protecting axons in multiple sclerosis [Internet]. Vol. 14, *Multiple Sclerosis. Mult Scler*; 2008 [cited 2021 Jul 28]. p. 1013–25. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18632772/>
309. Brück W. Inflammatory demyelination is not central to the pathogenesis of multiple sclerosis. In: *Journal of Neurology* [Internet]. *J Neurol*; 2005 [cited 2021 Jul 28]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16254696/>
310. Amlien IK, Fjell AM. Diffusion tensor imaging of white matter degeneration in Alzheimer’s disease and mild cognitive impairment [Internet]. Vol. 276, *Neuroscience. Neuroscience*; 2014 [cited 2021 Jul 28]. p. 206–15. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24583036/>
311. Van Veluw SJ, Reijmer YD, Van Der Kouwe AJ, Charidimou A, Riley GA, Leemans A, et al. Histopathology of diffusion imaging abnormalities in cerebral amyloid angiopathy. *Neurology* [Internet]. 2019 Feb 26 [cited 2021 Jul 12];92(9):E933–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30700595/>
312. Simpson JE, Fernando MS, Clark L, Ince PG, Matthews F, Forster G, et al. White matter lesions in an unselected cohort of the elderly: Astrocytic, microglial and oligodendrocyte precursor cell responses. *Neuropathol Appl Neurobiol* [Internet]. 2007 Aug [cited 2021 Jul 27];33(4):410–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17442062/>
313. Gouw AA, Seewann A, Van Der Flier WM, Barkhof F, Rozemuller AM, Scheltens P, et al. Heterogeneity of small vessel disease: A systematic review of MRI and histopathology correlations [Internet]. Vol. 82, *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry. J Neurol Neurosurg Psychiatry*; 2011

- [cited 2021 Jul 27]. p. 126–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20935330/>
314. Roda AR, Villegas S, Esquerda-Canals G, Martí-Clúa J. Cognitive impairment in the 3xtg-ad mouse model of alzheimer's disease is affected by a β -immunotherapy and cognitive stimulation. *Pharmaceutics* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Jul 28];12(10):1–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33023109/>