



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

TESI DOCTORAL

**Estudi de la via d'agregació de tres proteïnes  
implicades en diferents malalties  
conformacionals humanes:**

**scFv-h3D6 com agent terapèutic per a la malaltia d'Alzheimer,  
AL-12 com a causa d'Amiloïdosi de cadena lleugera, i PDZ3 com  
a organitzador del proteoma.**

Marta Marin Argany

Setembre 2013





**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR

**Estudi de la via d'agregació de tres proteïnes  
implicades en diferents malalties  
conformacionals humanes:**

**scFv-h3D6 com agent terapèutic per a la malaltia d'Alzheimer,  
AL-12 com a causa d'Amiloïdosi de cadena lleugera, i PDZ3 com  
a organitzador del proteoma.**

Tesi presentada per Marta Marin Argany per optar al grau de Doctora en  
Bioquímica i Biologia Molecular sota la direcció de la Dra. Sandra Villegas  
Hernández.

Unitat de Biociències del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular.  
Universitat Autònoma de Barcelona.

**Marta Marin Argany**

**Dra. Sandra Villegas Hernández**

Bellaterra, Setembre 2013



*A la meva mare i al meu pare*



## AGRAÏMENTS.

Per fi els agraïments!! Fa temps que imagino el que escriuria als agraïments, i em sortien unes frases fantàstiques per a totes les persones que han passat per la meua vida durant aquests anys de tesi. I ara...i ara no sé què posar!! Jaja!! Només se'm passa pel cap "s'ha acabat!! ueeeee!!". Però bé, som-hi! Que, al final, els agraïments és la part més llegida de totes les tesis, així que vull donar les gràcies, que siguin infinites, a tota la gent que m'ha ajudat i que ha cregut en mi per poder començar, seguir, i acabar aquesta època doctoral:

La primera persona, la Sandra. Agrair-te tot i més. Mai oblidaré el dia que em vaig passar pel teu despatx en busca d'alguna recomanació per fer pràctiques al estranger i en vaig sortir, al cap de quasi tres hores, amb una beca de doctorat entre les mans i mig tremolant. Encara no acabo d'entendre què et va fer escollir-me, jo que no aspirava a massa cosa! Però vas creure en mi des del primer moment, i així encara ho fas. Gràcies per la gran paciència que has tingut amb mi, per ensenyar-me tot des de zero, per "deixar-me" arribar a les tantes al laboratori, per fer-me científica. Gràcies per ser tan positiva i els bons consells en les meves èpoques de crisi existencial científica. I mil gràcies per les varies copes de cava, les converses entre pitis, i per haver escollit el millor company de laboratori de món, el Gyo!

Gyo! camarada! Que ya casi somos doctores! Jajaja!! Surrealista, verdad? Y cuando decíamos "por qué no escogimos ser biólogos de campo, así ahora estaríamos filmando documentales por África, en vez de pasarnos el día purificando proteínas que ni se ven! Y siempre terminábamos "será que, en el fondo, nos encanta esto de las columnitas y las diálisis, sino no se entiende...". Gyo, que grande conocerte y trabajar juntos. Sin ti está tesis no sería la misma, y mis años en el labo tampoco. Muchas gracias por estar siempre allí, cerquita, pendiente y ayudando, sin necesidad de muchas palabras. Muchas gracias por crear el caos dentro de mi orden. Eso sí, la próxima vez que nos encontremos no te voy a limpiar ni una probeta, que lo sepas! Ahora si...Vencimos!

I que no falti el Bernat! Bernaaaaat!! que vas arribar i ben formar el trio PFs (Perro-Flautas deien alguns!). Quina bona època que vam passar els tres, i què bé que ens vas ajudar amb els p\*\*\*\* *scrambleds*!! Llàstima que haguessis de marxar, però sempre queda un molt bon amic per anar a fer birres i compartir grans converses!

I la nova generació de PFs, que heu hagut d'aprendre tot el que sabíem a marxar forçades i sempre a punt per donar-nos un cop de mà. Molt bona feina! Aquest *best-seller* també va per vosaltres, Laia, Gisela i Jofre, i us desitjo un bon doctorat a tots tres.

A part del grup, agrair a tota la gent del departament, en especial als kinàsics, per deixar-nos tot el que feia falta quan encara no teníem el labo muntat. Al Mohammed, pels bons consells de savi, sempre a punt per ajudar en tot moment. L'Helena! Per tota la

feinada que fa! i per recordar-nos que hem de fer comandes de tant en tant! I como no...al Salva, per ser com és, tan rondinaire com bona persona, i deixar-me entrar al xiringuito sempre a última hora i amb les presses. I a tota la resta de companys i companyes, que de ben segur que m'heu ajudat amb algun experiment, algun reactiu, algun material, algun consell o alguna conversa distreta entre passadissos i centrífugues...moltes gràcies!

Gràcies a la Marina i a tota la gent de la Clínica Mayo, per donar-me la oportunitat de treballar amb ells. I al Jose i al seu grup de Granada, per les bones i agraïdes col·laboracions que hem fet. Així com al Baldo i al seu grup de Bioinformàtica per ensenyar-me una mica del seu món computacional.

Però què seria de tot plegat sense la família migdia-tincgana-baixem-solete-barbirres-taper-cafè? No res seria! Quants cafès haurem fet? I quins farts de riure? Heu estat la millor teràpia per sobreviure en el món del laboratori. Aquesta tesi va dedicada a vosaltres David, Pol, Font, Albert Serra, el Bigotis...i tots els que heu anat passant pels dinars i converses de taper. En especial però a les meves dues nenes: la Paula i la Ritu. Ole vosaltres!

I ara arriba el torn de La Gran Família de Can Cargol i Can Coloratta: la meva vida paral·lela a la ciència. Sort de tenir-vos cada dia al arribar a casa i per distreure'm amb plans irresistibles. Gràcies per voler entendre què hi faig tantes hores al labo, tot i que sempre ha estat molt més divertit intentar canviar el món, oi que si? Sou genials!

I que no falti tot el grup de BioNenes: la Desi, la Laia, la Jové, la Paula, la Padro, la Mire i la Neus. Nenes, aquesta va per vosaltres i tots els anys que portem juntes!

A la Moni i a la Batet, i tota la penya de l'espardenya d'Horta República Independent!

Y también a ti, Roo, imposible no ponerte entre estas líneas, formas parte de ellas y de mi.

A la Bola, porque sin ti nunca hubiera hecho un doctorado, aunque digas que no, me hiciste crecer i creer en mi, y eso ni con una tesis se agradece.

I per tu, Kons. Mil gràcies per la paciència que has tingut durant l'últim any de doctorat. Pels ànims i la força que m'has donat per acabar amb tot això. Per entendre'm i aguantar-me. Per ser-hi sempre i seguir avançant!

I per acabar, vull dedicar plenament aquesta tesi a la meva mare, al meu pare, i als meus germans, el David i el Ferran. També a la Núria i a la Laia, i que no faltin els petits, el Jan i la Lluna. Com també al record de la Padrina. Per tot el vostre recolzament infinit i per què us estimo molt!



# ÍNDEX.

<b>AGRAÏMENTS.....</b>	<b>vii</b>
<b>ÍNDEX.....</b>	<b>ix</b>
<b>ÍNDEX DE FIGURES I TAULES.....</b>	<b>xvii</b>
<b>ABREVIATURES.....</b>	<b>xxi</b>
Taula d'abreviatures dels aminoàcids proteïnogènics.....	xxv
Taula d'abreviatures dels nucleòtids de DNA/RNA.....	xxv
<b>I. RESUM.....</b>	<b>1</b>
<b>II. INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>5</b>
<b>1. ESTRUCTURA I PLEGAMENT DE PROTEÏNES.....</b>	<b>7</b>
1.1. Antecedents històrics.....	8
1.2. Energètica de plegament.....	9
1.3. Embuts de plegament.....	11
1.3.1. <i>Intermediaris de plegament</i> .....	12
<b>2. Agregació amiloide.....</b>	<b>15</b>
2.1. Mecanisme de formació de fibres amiloides.....	16
2.1.1. <i>Determinants amiloidogènics</i> .....	19
2.2. Estructura de les fibres amiloides.....	19
2.3. Tipus de vies amiloidogèniques.....	20
2.3.1. <i>Via de fibril·lació amiloide</i> .....	21
2.3.2. <i>Via de fibril·lació worm-like</i> .....	22
2.4. Oligòmers solubles.....	23
2.4.1. <i>Toxicitat dels oligòmers solubles</i> .....	24
<b>3. Amiloïdosi o malalties amiloidogèniques.....</b>	<b>27</b>
3.1. Malaltia d'Alzheimer.....	29
3.1.1. <i>Proteïna precursora amiloide, APP</i> .....	30
3.1.2. <i>Hipòtesi de la cascada amiloide</i> .....	32
3.1.3. <i>Immunoteràpia contra l'A<math>\beta</math></i> .....	33
<u>3.1.3.1. <i>Fragments recombinants derivats d'anticossos, scFv</i>.....</u>	<u>35</u>
3.2. Amiloïdosis de Cadena Lleugera.....	37
3.2.1. <i>Variabilitat de seqüència de les LC i amiloidogènesi</i> .....	38
3.2.2. <i>Estabilitat i agregació de les cadenes LC</i> .....	39
3.2.3. <i>Determinants estructurals de les proteïnes LCs amiloidogèniques</i> .....	39
<u>3.2.3.1. <i>Interfície dels dímers V<sub>L</sub>-V<sub>L</sub> i amiloidogènesi</i>.....</u>	<u>41</u>
3.2.4. <i>Futures estratègies terapèutiques</i> .....	43
<b>4. Interactoma i malalties humanes.....</b>	<b>45</b>
4.1. Proteïnes <i>hub</i> i dominis modulars.....	45
4.2. Dominis PDZ.....	47

4.2.1.	<i>Caracterització estructural dels dominis PDZ</i> .....	48
4.3.	La proteïna PSD-95.....	49
4.3.1.	<i>Domini PDZ3 de la proteïna PSD-95</i> .....	50
4.3.1.1.	<u>Hèlix-<math>\alpha</math>3</u> <u>adicional del domini PDZ3</u> .....	51
4.3.1.2.	<u>Loop <math>\beta</math>2-<math>\beta</math>3</u> <u>del domini PDZ3</u> .....	52
4.4.	Malalties relacionades amb els dominis PDZ.....	53
<b>III.</b>	<b>OBJECTIUS</b> .....	<b>57</b>
<b>IV.</b>	<b>MATERIALS I MÈTODES GENERALS</b> .....	<b>61</b>
<b>1.</b>	<b>Aparells Generals</b> .....	<b>65</b>
<b>2.</b>	<b>Tècniques de DNA Recombinant</b> .....	<b>67</b>
2.1.	Reacció en cadena de la polimerasa, PCR.....	67
2.1.1.	<i>Disseny d'encebadors de PCR</i> .....	67
2.1.2.	<i>Mutagènesi Dirigida</i> .....	68
2.1.2.1.	<u>Reacció de mutagènesi</u> .....	68
2.1.2.2.	<u>Digestió amb <i>DpnI</i></u> .....	69
2.1.2.3.	<u>Transformació productes de PCR</u> .....	69
2.2.	Introducció de DNA forani a cèl·lules bacterianes.....	70
2.1.3.	<i>Preparació de cèl·lules competents d'E. coli</i> .....	70
2.1.4.	<i>Transformació de cèl·lules competents d'E. coli</i> .....	70
2.2.	Extracció de DNA plasmídic de cèl·lules d' <i>E. coli</i> .....	71
2.3.	Seqüenciació del DNA.....	71
2.4.	Determinació espectrofotomètrica de la concentració de DNA.....	72
<b>3.</b>	<b>Sistemes d'expressió i purificació</b> .....	<b>73</b>
3.1.	Soques d' <i>Escherichia coli</i> .....	73
3.1.1.	<i>Soques d'E. coli per al clonatge i extracció de DNA plasmídic</i> .....	73
3.1.2.	<i>Soques d'E. coli per a l'expressió heteròloga de proteïnes</i> .....	73
3.2.	Manteniment soques bacterianes.....	74
3.2.1.	<i>Glicerinats 15%</i> .....	74
3.3.	Medis de cultiu.....	75
3.3.1.	<i>Medi líquid</i> .....	75
3.3.1.1.	<u>Medi LB</u> .....	75
3.3.1.2.	<u>Medi 2xYT</u> .....	75
3.3.2.	<i>Medi sòlid</i> .....	75
3.3.3.	<i>Antibiòtics</i> .....	76
3.4.	Vectors d'expressió.....	76
3.5.	Expressió heteròloga de proteïnes.....	78
3.5.1.	<i>Inducció de l'expressió</i> .....	78
3.5.2.	<i>Obtenció del extracte cel·lular</i> .....	79

3.6.	Tècniques de cromatografia líquida.....	79
3.6.1.	<i>Cromatografia d'afinitat</i> .....	79
3.6.1.1.	<u>Cromatografia d'afinitat amb histidines</u> .....	79
3.6.1.2.	<u>Cromatografia atmosfèrica d'afinitat per lipopolisacàrids</u> .....	80
3.6.2.	<i>Cromatografia de bescanvi iònic d'alta resolució</i> .....	80
3.6.3.	<i>Cromatografia d'exclusió molecular</i> .....	82
3.6.3.1.	<u>Cromatografia d'exclusió molecular d'alta resolució</u> .....	82
3.6.3.2.	<u>Cromatografia atmosfèrica d'exclusió molecular per intercanvi de tampó</u> . 83	
3.7.	Mètodes d'intercanvi de tampó o extracció de sals.....	84
3.7.1.	<i>Diàlisi</i> .....	84
3.7.1.1.	<u>Pretractament dels sacs de diàlisi</u> .....	84
3.8.	Concentració del volum de les mostres proteiques.....	85
3.9.	Electroforesi en SDS-PAGE.....	85
3.9.1.	<i>Preparació del gel d'acrilamida</i> .....	86
3.9.2.	<i>Tinció i destinció del gel d'acrilamida</i> .....	87
<b>4.</b>	<b>tècniques espectroscòpiques</b> .....	<b>89</b>
4.1.	Determinació de la concentració de proteïna.....	89
4.2.	Dicroisme Circular.....	89
4.3.	Fluorescència dels residus de triptòfan.....	90
4.3.1.	<i>Desnaturalització química i obtenció de paràmetres termodinàmics</i> .....	91
4.4.	Fluorescència dels fluoròfors Tioflavina T i ANS.....	92
4.5.	Espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier (FTIR).....	93
4.6.	Microscòpia electrònica de transmissió (TEM).....	94
4.6.1.	<i>Tinció negativa de les mostres de TEM</i> .....	94
<b>5.</b>	<b>Cultius Cel·lulars</b> .....	<b>97</b>
5.1.	Línia cel·lular de neuroblastoma humà SH-SY5Y.....	97
5.2.	Subcultiu cel·lular.....	97
5.3.	Reservori de la línia cel·lular.....	98
5.4.	Comptatge de cèl·lules.....	98
5.5.	Experiments de viabilitat cel·lular de SH-SY5Y.....	99
5.5.1.	<i>Assajos de viabilitat per MTT</i> .....	99
<b>6.</b>	<b>Tècniques bioinformàtiques</b> .....	<b>101</b>
6.1.	Modelatge tridimensional de l'scFv-h3D6.....	101
6.2.	ExPASy.....	101
<b>V.</b>	<b>CAPÍTOLS</b> .....	<b>103</b>

<b>CAPÍTOL 1: Un fragment variable de cadena senzilla (scFv-h3D6) anti-A<math>\beta</math> impedeix la formació de fibres amiloides i la citotoxicitat del pèptid A<math>\beta</math> mitjançant la retirada d'oligòmers de la via amiloide.</b>	<b>105</b>
<b>1. RESUM.</b>	<b>107</b>
<b>2. INTRODUCCIÓ.</b>	<b>109</b>
<b>3. MATERIALS I MÈTODES.</b>	<b>113</b>
3.1. Expressió i purificació de l'scFv-h3D6.	113
3.1.1. Expressió heteròloga de l'scFv-h3D6.	113
3.1.2. Llisi Cel·lular.	113
3.1.3. Solubilització de la fracció proteica insoluble.	114
3.1.4. Replegament gota a gota de la fracció proteica solubilitzada.	114
3.1.5. Digestió amb proteasa TEV.	114
3.1.6. Cromatografia d'afinitat amb histidines.	115
3.1.7. Cromatografia de bescanvi catiònic.	116
3.2. Expressió i purificació de la proteasa TEV.	117
3.2.1. Expressió heteròloga de la proteasa TEV.	117
3.2.2. Purificació citoplasmàtica de la proteasa TEV.	118
3.2.3. Cromatografia d'afinitat amb histidines d'alta resolució.	118
3.3. Determinació de l'estructura secundària de l'scFv-h3D6.	118
3.3.1. Espectre de CD al UV-llunyà.	119
3.3.2. Espectre d'infraroig amb transformada de Fourier.	119
3.3.3. Desnaturalització tèrmica.	119
3.4. Preparació del pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub> .	120
3.5. Agregació del pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub> i l'scFv-h3D6.	120
3.6. Assajos de citotoxicitat.	120
3.6.1. Preparació mostres d'scFv-h3D6 per als assajos de citotoxicitat.	121
3.7. Microscòpia electrònica de transmissió (TEM).	122
3.8. Assajos d'agregació per fluorescència. ThT i ANS.	123
<b>4. RESULTATS.</b>	<b>127</b>
4.1. Expressió i purificació de l'scFv-h3D6.	127
4.1.1. Dimerització i formes scrambled de l'scFv-h3D6.	128
4.2. Identificació de l'intermediari d'agregació WL de l'scFv-h3D6.	130
4.3. Prevenió de la toxicitat de l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> per l'scFv-h3D6.	133
4.4. <i>Misfolding</i> del pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub> .	135
4.5. <i>Misfolding</i> de l'scFv-h3D6.	137
4.6. <i>Misfolding</i> del complex A $\beta$ <sub>1-42</sub> -scFv-h3D6.	138
<b>5. DISCUSSIÓ.</b>	<b>141</b>
5.1. Expressió de l'scFv-h3D6 i l'activitat de la xaperona <i>trx</i> .	141
5.2. Perfil de plegament de l'scFv-h3D6 sota pertorbació tèrmica.	141
5.3. Efecte de l'scFv-h3D6 sobre la fibril·lació i citotoxicitat del pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub> .	142

5.4.	Efecte de l'scFv-h3D6 <i>in vivo</i> .....	143
<b>CAPÍTOL 2: Modelatge tridimensional d'un fragment variable de cadena senzilla (scFv-h3D6) específic contra el pèptid A<math>\beta</math><sub>1-42</sub> i redisseny racional de la molècula.....</b>		
<b>1.</b>	<b>RESUM.....</b>	<b>147</b>
<b>2.</b>	<b>INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>149</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALS I MÈTODES.....</b>	<b>153</b>
3.1.	Recerca de proteïna motlle per homologia de seqüència.....	153
3.2.	Modelatge tridimensional del scFv-h3D6.....	153
3.3.	Numeració estàndard de l'scFv-h3D6 i localització de les regions CDR.....	154
3.4.	Caracterització estructural del model d'scFv-h3D6 per DSSP.....	154
3.5.	Predicció de tendència a l'agregació per TANGO.....	154
3.6.	Alineament Múltiple i Residus Conservats.....	155
3.7.	Aminoàcid Scanning-Mutation.....	155
<b>4.</b>	<b>RESULTATS.....</b>	<b>157</b>
4.1.	Proteïna motlle: l'scFv específic contra del virus SARS.....	157
4.2.	Possibilitats de models 3D per a l'scFv-h3D6.....	158
4.3.	Determinació del model de mínima energia.....	159
4.4.	Numeració Kabat de l'scFv-h3D6 i localització de les regions CDR.....	160
4.5.	Caracterització del model tridimensional de l'scFv-h3D6.....	162
4.6.	Exposició dels residus al solvent.....	163
4.7.	Predicció de tendència a l'agregació.....	164
4.8.	Alineament Múltiple.....	165
4.9.	Aminoàcid Scanning-Mutation.....	167
4.10.	Redisseny de l'scFv-h3D6 a partir del model 3D.....	168
4.10.1.	<i>Mutacions en el nucli hidrofòbic.....</i>	<i>168</i>
4.10.1.1.	<u>Resultats experimentals dels mutants dissenyats.....</u>	<u>170</u>
4.10.2.	<i>Re-disseny del extrem C-terminal de l'scFv-h3D6.....</i>	<i>171</i>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSIÓ.....</b>	<b>173</b>
5.1.	Mutacions al nucli hidrofòbic augmenten la tendència a l'agregació de l'scFv-h3D6.....	174
5.2.	L'elongació del extrem C-terminal augmenta l'estabilitat termodinàmica i disminueix la tendència a l'agregació del l'scFv-h3D6.....	175
<b>CAPÍTOL 3: Estudi inicial, mitjançant tècniques espectroscòpiques, de les propietats termodinàmiques d'un domini variable d'Ig implicat en l'Amiloïdosi de cadena lleugera.</b>		
<b>Mutacions restauratives i estabilitat.....</b>		<b>177</b>
<b>1.</b>	<b>RESUM.....</b>	<b>179</b>
<b>2.</b>	<b>INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>181</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALS I MÈTODES.....</b>	<b>185</b>
3.1.	Mutagènesi Dirigida.....	185
3.2.	Expressió heteròloga de l'AL-12 i mutants restauratius.....	186

3.3.	Purificació proteïna periplasmàtica soluble.....	186
3.3.1.	<i>Cromatografia de bescanvi aniònic.....</i>	<i>187</i>
3.3.2.	<i>Cromatografia d'exclusió molecular.....</i>	<i>187</i>
3.4.	Purificació proteïna citoplasmàtica insoluble.....	188
3.4.1.	<i>LLisi Cel·lular.....</i>	<i>188</i>
3.4.2.	<i>Solubilització de la fracció proteica insoluble.....</i>	<i>189</i>
3.4.3.	<i>Replegament per diàlisi de la fracció proteica insoluble.....</i>	<i>189</i>
3.5.	Determinació de l'estructura secundària i terciària de l'AL-12 i mutants.....	189
3.5.1.	<i>Espectre CD al UV-llunyà.....</i>	<i>189</i>
3.5.2.	<i>Espectre de fluorescència del residu de triptòfan.....</i>	<i>190</i>
3.5.3.	<i>Desnaturalització tèrmica per fluorescència i CD.....</i>	<i>190</i>
3.5.4.	<i>Desnaturalització química per fluorescència.....</i>	<i>190</i>
3.5.4.1.	<u><i>Obtenció dels paràmetres termodinàmics.....</i></u>	<u><i>190</i></u>
3.6.	Estudi d'agregació de l'AL12 i mutants per FTIR.....	191
<b>4.</b>	<b>RESULTATS.....</b>	<b>193</b>
4.1.	Estructura secundària de l'AL-12.....	193
4.1.1.	<i>Estructura secundària dels mutants restauratius.....</i>	<i>194</i>
4.2.	Desnaturalització tèrmica de l'AL-12.....	196
4.2.1.	<i>Desnaturalització tèrmica dels mutants restauratius.....</i>	<i>197</i>
4.3.	Estabilitat termodinàmica de l'AL-12.....	199
4.3.1.	<i>Estabilitat termodinàmica dels mutants restauratius.....</i>	<i>201</i>
4.4.	Estudi de l'agregació de l'AL-12 per FTIR.....	201
4.4.1.	<i>Estudi de l'agregació dels mutants restauratius.....</i>	<i>205</i>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSIÓ.....</b>	<b>207</b>
5.1.	Estructura secundària, desplegament i estabilitat del domini AL-12.....	207
5.2.	Via d'agregació del domini AL-12 induïda per temperatura.....	208
5.3.	Efecte de les mutacions restauratives sobre l'agregació i estabilitat del domini AL-12. 209	
5.4.	Expectatives de futur en el estudi de l'agregació de l'AL-12.....	210
<b>CAPÍTOL 4: Estudi per FTIR de la via d'agregació del domini PSD95-PDZ3: Reorganització estructural en fibres-<math>\beta</math> de tipus worm-like i citotoxicitat, i implicació de l'hèlix-<math>\alpha</math>3 en l'estabilitat i agregació del domini PDZ3.....</b>		<b>213</b>
<b>1.</b>	<b>RESUM.....</b>	<b>215</b>
<b>2.</b>	<b>INTRODUCCIÓ.....</b>	<b>217</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIALS I MÈTODES.....</b>	<b>221</b>
3.1.	Expressió i purificació del domini PDZ3 i mutants.....	221
3.2.	Agregació del domini PDZ3 i mutants.....	221
3.3.	Espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier.....	221
3.4.	Microscòpia electrònica de transmissió (TEM).....	222

3.5.	Assajos de citotoxicitat del domini PDZ3.....	222
3.6.	Experiments de DSC, DLS i CD de les diferents variants del domini PDZ3. ....	223
3.7.	Espectroscòpia d'RMN.....	223
<b>4.</b>	<b>RESULTATS.....</b>	<b>225</b>
4.1.	Espectre de FTIR del domini PDZ3 natiu. ....	225
4.1.1.	<i>Espectre de FTIR de l'agregació del domini PDZ3.....</i>	<i>227</i>
4.1.2.	<i>Influència de la força iònica sobre l'agregació del domini PDZ3. ....</i>	<i>228</i>
4.1.3.	<i>Citotoxicitat dels agregats de PDZ3.....</i>	<i>230</i>
4.1.4.	<i>Microscòpia electrònica dels agregats citotòxics de PDZ3.....</i>	<i>231</i>
4.1.5.	<i>Anàlisi per RMN-HSQC dels aspectes moleculars de l'agregació del PDZ3.</i>	<i>232</i>
4.2.	Efecte de la deleció de l'hèlix- $\alpha$ 3 sobre el plegament del domini PDZ3.....	234
4.2.1.	<i>Efecte de la deleció de l'hèlix-<math>\alpha</math>3 sobre l'agregació del domini PDZ3.....</i>	<i>237</i>
4.2.1.1.	<u>Espectre de FTIR del domini <math>\Delta</math>10ct-PDZ3 natiu.....</u>	<u>238</u>
4.2.1.2.	<u>Espectre de FTIR del intermediari d'agregació de l'<math>\Delta</math>10ct-PDZ3.</u>	<u>240</u>
4.3.	Interacció hèlix- $\alpha$ 3 i <i>loop</i> $\beta$ 2- $\beta$ 3 i el seu efecte sobre l'agregació del domini PDZ3.....	241
4.3.1.	<i>Estructura secundària del estat natiu dels mutants de PDZ3.....</i>	<i>241</i>
4.3.2.	<i>Estructura secundària del intermediari d'agregació dels mutants de PDZ3.</i>	<i>244</i>
4.4.	Anàlisi calorimètric (DSC) del mutants del domini PDZ3.....	246
<b>5.</b>	<b>DISCUSSIÓ.....</b>	<b>249</b>
5.1.	La fulla- $\beta$ flexible dóna lloc a l'agregació del PDZ3.....	249
5.2.	Importància de la cadena- $\beta$ 3 en la reorganització de la fulla- $\beta$ flexible.....	250
5.3.	Rol de l'hèlix- $\alpha$ 3 en el plegament i l'agregació del domini PDZ3.....	252
5.4.	Residus implicats en les interaccions entre l'hèlix- $\alpha$ 3 i el domini PDZ3.....	253
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSIONS GENERALS.....</b>	<b>255</b>
<b>VII.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>265</b>
<b>APÈNDIX D'ARTICLES.....</b>		<b>287</b>





## ÍNDIX DE FIGURES I TAULES.

Figura I. 1. Representació de l'estructura de proteïnes.....	7
Figura I. 2 Models de vies de plegament de proteïnes.....	9
Figura I. 3. Diagrama energètic del plegament proteic.....	10
Figura I. 4. Representació d'un embut de plegament de proteïnes.....	11
Figura I. 5. Representació esquemàtica de l'embut de plegament i d'agregació.....	17
Figura I. 6. Representació esquemàtica dels possibles estats conformacionals que pot adoptar una cadena polipeptídica i les principals interconversions entre ells.....	18
Figura I. 7. Model de l'organització estructural de les fibres amiloides.....	20
Figura I. 8. Model d'agregació amiloide dependent de nucleació.....	21
Figura I. 9. Model de competència entre via d'agregació amiloide i via WL.....	22
Figura I. 10. Estructura cristal·lina de l'oligòmer K11V-TR i formació amiloide.....	23
Figura I. 11. Reducció d'activitat cerebral i depòsits fibril·lars en l'AD.....	30
Figura I. 12. Tall proteolític de la proteïna APP i formació del pèptid A $\beta$ .....	31
Figura I. 13. Esquema de la hipòtesis de la cascada amiloide acoblada al cicle de deposició amiloide.....	33
Figura I. 14. Esquema dels dominis d'Ig i variants recombinants.....	35
Figura I. 15. Cinètica d'agregació del pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub> .....	36
Figura I. 16. Amiloïdosi de cadena lleugera (AL).....	37
Figura I. 17. Alineament múltiple de dominis V <sub>L</sub> amiloidogènics i la seva línia germinal $\kappa$ I 018/08.....	40
Figura I. 18. Estructura d'immunoglobulines i dominis V <sub>L</sub> .....	41
Figura I. 19. Diferències en la interfície dimèrica entre el dímer d'AL-09 i de $\kappa$ I 018/08.....	42
Figura I. 20. Promiscuïtat de la interfície dimèrica dels dominis V <sub>L</sub> amiloidogènics.....	43
Figura I. 21. Representació de l'organització del flux d'informació cel·lular.....	46
Figura I. 22. Exemple de proteïnes multidomini que contenen dominis PDZ.....	47
Figura I. 23. Representació del plegament canònic dels dominis PDZ.....	48
Taula I. 2. Classificació de dominis PDZ en funció de la seva especificitat d'unió.....	49
Figura I. 24. Localització post-sinàptica i interaccions moleculars de la proteïna PSD-95.....	50
Figura I. 25. Estructura cristal·lina del domini PDZ3.....	51
Figura I. 26. Representació dels residus del loop $\beta$ 2- $\beta$ 3 del domini PDZ3 implicats en la interacció amb pèptids i l'hèlix- $\alpha$ 3 addicional.....	53
Figura M. 1. Mapa dels vectors d'expressió pET-trx1a i pET-12a.....	77
Figura M. 2. Cromatografia de bescanvi iònic.....	81
Figura M. 3. Cromatografia d'exclusió molecular.....	82
Figura M. 4. Espectre de CD de diferents estructures secundàries de proteïnes.....	90
Figura 1. 1. Representació de les diferents formes <i>scrambled</i> de l'scFv-h3D6.....	128
Figura 1. 2. Identificació de l'scFv-h3D6 natiu i les formes <i>scrambled</i> .....	129

Figura 1. 3 Espectre de CD al UV-llunyà de l'scFv-h3D6 a diferents temperatures.....	130
Figura 1. 4. Deconvolució de l'espectre de FTIR de la regió d'amida I' de l'scFv-h3D6 a diferents temperatures.....	131
Figura 1. 5. Desnaturalització tèrmica de l'scFv-h3D6.....	132
Figura 1. 6. Assaig de viabilitat per MTT de la línia cel·lular de neuroblastoma humà SH-SY5Y. ....	133
Figura 1. 7. Formació de fibres amiloides i WL per part de l'A $\beta$ <sub>1-42</sub> , l'scFv-h3D6 i el complex A $\beta$ <sub>1-42</sub> :scFv-h3D6, en funció de la temperatura i la presència de DMSO.....	136
Figura 1. 8. Assaig d'agregació per fluorescència de Tioflavina T i ANS..	137
Figura 1. 9. Assajos d'agregació induïda per temperatura per fluorescència de Tioflavina T i ANS. ....	138
Figura 1. 10. Diagrama energètic de la via d'agregació del pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub> , de l'scFv-h3D6, i del complex A $\beta$ <sub>1-42</sub> :scFv-h3D6.....	143
Figura 2. 1. Evolució de les estructures proteiques dipositades en el PDB .....	149
Figura 2. 2 Alineament de la seqüència scFv-h3D6 amb la seqüència motlle 2GHTrp:B. ....	157
Figura 2. 3. Models teòrics de l'estructura 3D de l'scFv-h3D6. ....	158
Figura 2. 4. Perfils energètics de cada un dels 5 models. ....	160
Figura 2. 5. Esquema de la seqüència de l'scFv-h3D6 i numeració Kabat. ....	161
Figura 2. 6. Model tridimensional de l'estructura de l'scFv-h3D6.....	162
Figura 2. 7. Superfície d'exposició al solvent.....	164
Figura 2. 8. Predicció de la tendència a l'agregació de l'scFv-h3D6.....	165
Figura 2. 9. Alineament múltiple de l'scFv-h3D6.....	166
Taula 2. 1. Aminoàcid <i>Scanning-Mutation</i> .....	167
Figura 2. 10. Desnaturalització tèrmica i química de l'scFv-h3D6 i les seves variants.....	170
Figura 2. 11. Detall de l'extrem C-terminal del scFv-h3D6.....	172
Figura 3. 1. Estructura cristal·lina de la proteïna AL-12 i solapament amb la proteïna germinal $\kappa$ O18/O8. ....	183
Taula 3. 2. Detall i localització de les interaccions alterades o perdudes degut a les mutacions que conté la proteïna AL-12. ....	184
Figura 3. 2. Estructura secundària i exposició del W35 de l'AL-12 a diferents temperatures.....	193
Figura 3. 3. Estructura secundària dels mutants restauratius d'AL-12.....	195
Figura 3. 4. Espectre de fluorescència del residu Trp35 del mutant Q96Y.....	196
Figura 3. 5. Desnaturalització tèrmica AL-12.....	197
Figura 3. 6. Desnaturalització tèrmica dels mutants restauratius d'AL-12. ....	198
Figura 3. 7. Desnaturalització química per urea de l'AL-12 i els seus mutants restauratius.....	200
Figura 3. 8. Deconvolució de l'espectre de FTIR de la regió amida I' de l'AL-12 a diferents temperatures.....	202
Figura 3. 9. Evolució, en funció de la temperatura, dels principals components del espectre de FTIR a la regió de l'amida I' de l'AL-12 i mutants restauratius.....	205
Figura 4. 1. Descomposició en bandes de l'espectre deconvolucionat de FTIR del domini PDZ3 adquirit en tampó KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 50 mM, pH 7.5.....	225

Figura 4. 2. Espectre de CD del domini PDZ3 en tampó $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, pH 7.5.....	226
Taula 4. 1. Descomposició en bandes de l'espectre deconvolucionat de FTIR del domini PDZ3 adquirit en tampó $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, pH 7.5. ....	227
Figura 4. 3. Evolució de les principals components del espectre de FTIR, sota diferents condicions, durant la incubació a 60 °C. ....	229
Taula 4. 2. Descomposició en bandes de l'espectre deconvolucionat de FTIR del domini PDZ3 adquirit en tampó PBS, pH 7.4.....	229
Taula 4. 3. Descomposició en bandes de l'espectre deconvolucionat de FTIR del domini PDZ3 adquirit en tampó $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, pH 7.5, més 150 mM d'NaCl.....	230
Figura 4. 4. Assaig de viabilitat per MTT de la línia cel·lular de neuroblastoma humà SH-SY5Y. ....	231
Figura 4. 5. Imatges de TEM del domini PDZ3 incubat a 60 °C, en tampó PBS, pH 7.4.....	232
Figura 4. 6. Espectre de correlació $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ HSQC-RMN del domini PDZ3 en tampó $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, pH 7.5, des de 25 a 60 °C. ....	233
Figura 4. 7. Corbes del desplegament tèrmic del domini PDZ i $\Delta 10\text{ct}$ -PDZ3 obtingudes per DSC... 235	
Figura 4. 8. Distribució de poblacions dels diferents estats en el desplegament tèrmic del domini PDZ3 i del domini $\Delta 10\text{ct}$ -PDZ3.....	237
Figura 4. 10. Comparació dels principals components de l'espectre natiu de FTIR dels mutants del domini PDZ3, adquirits en tampó $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, pH 7.5 i a 25 °C.....	241
Taula 4. 5. Descomposició en bandes de l'espectre deconvolucionat de FTIR dels mutants del domini PDZ3 adquirit en tampó $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, pH 7.5, i comparació amb els valors del domini PDZ3.....	243
Figura 4. 11 Evolució, en funció del temps d'incubació a 60°C, dels principals components de l'espectre natiu de FTIR del mutant PDZ3-E401R, adquirits en tampó $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 50 mM, pH 7.5.....	244
Figura 4. 14. Comparació de les corbes del desplegament tèrmic del domini PDZ3 i les seves variants obtingudes per DSC.....	247
Taula 4. 6. Paràmetres termodinàmics del desplegament tèrmic del domini PDZ3 i les seves variants.....	247
Figura 4. 15. Anàlisi per TANGO de les regions propenses a l'agregació del domini PDZ3.....	251
Figura 4. 16. Evolució, en funció del temps d'incubació a 60 °C, de la banda de 1620 $\text{cm}^{-1}$ de FTIR, corresponent als agregats- $\beta$ , del domini PDZ3 i les seves variants.....	254



## ABREVIATURES.

<b>Abs</b>	Absorbància
<b>AD</b>	Malaltia d'Alzheimer
<b>AEX</b>	Cromatografia d'intercanvi aniònic ( <i>Anion Exchange Chromatography</i> )
<b>AFM</b>	Microscòpia de força atòmica
<b>AICD</b>	<i>APP Intracellular C-terminal Domain</i>
<b>AL</b>	Amiloïdosi de cadena lleugera
<b>AMPA</b>	àcid $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropionídic
<b>ANS</b>	Àcid 8-anilin-naftalè-sulfònic
<b>APOE</b>	Apolipoproteïna E
<b>APOJ</b>	Apolipoproteïna J
<b>APP</b>	Proteïna precursora amiloide ( <i>Amyloid Precursor Protein</i> )
<b>A<math>\beta</math><sub>1-42</sub></b>	Pèptid $\beta$ -amiloide (residus 1-42 de l'APP)
<b>A<math>\beta</math><sub>39-42</sub></b>	Pèptid $\beta$ -amiloide (residus 39-42 de l'APP)
<b>BLAST</b>	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
<b>CAA</b>	Angiopatia amiloide cerebral ( <i>Cerebral Amyloid Angiopathy</i> )
<b>CD</b>	Dicroisme circular ( <i>Circular Dichroism</i> )
<b>CDR</b>	Regió complementària d'antigen ( <i>Complementary Determining Region</i> )
<b>CEX</b>	Cromatografia d'intercanvi aniònic ( <i>Cation Exchange Chromatography</i> )
<b>CRIPT</b>	<i>Cysteine-Rich Interactor Protein</i>
<b>cal</b>	Calories
<b>C-terminal</b>	Carboxi-terminal
<b>C<math>\beta</math></b>	Carboni- $\beta$ del enllaç peptídic
<b>C<math>\alpha</math></b>	Carboni- $\alpha$ del enllaç peptídic
<b>D</b>	Estat Desplegat
<b>Da</b>	Daltons
<b>deg</b>	Grau d'el·lipticitat
<b>DNA</b>	Àcid desoxiribonucleic ( <i>Desoxyribonucleic acid</i> )
<b>DLS</b>	<i>Dynamic Light Scattering</i>
<b>DMEM/F-12</b>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham</i>
<b>DMSO</b>	Dimetil sulfòxid
<b>dNTP</b>	Desoxiribonucleòtid trifosfat
<b>DO<sub>600</sub></b>	Densitat òptica a 600 nm
<b>DSC</b>	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
<b>dsDNA</b>	DNA de doble cadena ( <i>double-strand DNA</i> )
<b>DSSP</b>	<i>Definition of Secondary Structure of Proteins</i>
<b>D<sub>2</sub>O</b>	Aigua deuterada
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Àcid etilèdiaminotetraacètic
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
<b><i>et al.</i></b>	I col·laboradors (del llatí <i>et alter</i> )
<b>ExPASy</b>	<i>Expert Protein Analysis System</i>
<b>Fab</b>	Fragment d'unió a l'antigen ( <i>Fragment antigen-binding</i> )
<b>FBS</b>	Sèrum fetal boví ( <i>Fetal Bovine Serum</i> )
<b>Fc</b>	Regió constant ( <i>Fragment crystallizable region</i> )

<b><i>F<sub>n</sub></i></b>	Fluorescència intrínseca a l'estat natiu
<b><i>F<sub>u</sub></i></b>	Fluorescència intrínseca a l'estat desplegat
<b>FPLC</b>	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
<b>FTIR</b>	Espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier
<b>FXS</b>	Síndrome X fràgil ( <i>Fragile X Syndrome</i> )
<b>g</b>	Grams
<b><i>g</i></b>	RCF ( <i>Relative Centrifugal Force</i> )
<b>GK</b>	Domini Guanilat Kinasa
<b>GndCl</b>	Clorur de Guanidini
<b>GSH</b>	Glutatió reduït
<b>GSSG</b>	Glutatió oxidat
<b>h</b>	Hora
<b>HSQC-NMR</b>	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence-Nuclear Magnetic Resonance</i>
<b>HC</b>	Cadena pesada ( <i>Heavy Chain</i> )
<b>HCl</b>	Àcid clorhídric
<b>HFIP</b>	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-isopropanol
<b>I</b>	Intermediaris de plegament meta-estable
<b>Ig</b>	Immunoglobulina
<b>IDP</b>	Proteïna intrínsecament desordenada ( <i>Intrinsically Disordered Protein</i> )
<b>IMAC</b>	<i>Immobilized Metal ion Affinity Chromatography</i>
<b>IPTG</b>	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosid
<b>I<sup>#</sup></b>	Estat de transició
<b>J</b>	<i>Joule</i>
<b><i>K<sub>d</sub></i></b>	Constant d'equilibri de dissociació del complex proteïna-ligand
<b>L</b>	Litres
<b>LB</b>	Medi Luria-Bertani
<b>LC</b>	Cadena lleugera ( <i>Light Chain</i> )
<b>LPS</b>	Lipopolisacàrid
<b>M</b>	Molar
<b>m</b>	metres
<b>mAb</b>	Anticòs monoclonal
<b>MAGUK</b>	<i>Membrane Associated Guanylate Kinase</i>
<b>MAPK</b>	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
<b>MCS</b>	<i>Multiple Cloning Site</i>
<b>MEF-2</b>	Factor de transcripció <i>Myocyte Enhancer Factor-2</i>
<b>min</b>	Minuts
<b>MRE</b>	<i>Mean Residue Ellipticity</i>
<b>MPB</b>	<i>Maltose Binding Protein</i>
<b>MTT</b>	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
<b><i>m<sub>N-U</sub></i></b>	Diferència en l'accessibilitat al solvent entre l'estat natiu i el desplegat
<b>N</b>	Estat Natiu o Plegat
<b>NAA</b>	<i>Non-essential Aminoacids</i>
<b>NMDA</b>	N-metil-D-aspartat
<b>nNOS</b>	Sintasa neuronal d'Òxid Nítric
<b>N-terminal</b>	Amino-terminal
<b>ORI</b>	Origen de replicació

<b>PA</b>	Persulfat amònic
<b>pb</b>	Parell de bases
<b>PCR</b>	Reacció en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PDB</b>	<i>Protein Data Bank</i>
<b>PDF</b>	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
<b>pI</b>	Punt Isoelèctric
<b>PiB-PET</b>	<i>Pittsburgh compound B</i> -Tomografia d'emissió d'electrons
<b>PSD-95</b>	<i>Post Synaptic Density protein-95</i>
<b>PSEN</b>	Presenilina (o $\gamma$ -secretasa)
<b>RL</b>	Fibres <i>rod-like</i>
<b>RMN</b>	Ressonància magnètica nuclear
<b>RNA</b>	Àcid Ribonucleic ( <i>Ribonucleic Acid</i> )
<b>ROS</b>	Espècies reactives d'oxigen ( <i>Reactive Oxygen Species</i> )
<b>rpm</b>	Revolucions per minut
<b>SARS</b>	<i>Severe Acute Respiratori Syndrome</i>
<b>sAPP<math>\alpha</math></b>	Fragment d'APP extracel·lular soluble generat per l' $\alpha$ -secretasa
<b>sAPP<math>\beta</math></b>	Fragment d'APP extracel·lular soluble generat per la $\beta$ -secretasa
<b>scFv</b>	Fragment variable de cadena senzilla ( <i>single-chain variable Fragment</i> )
<b>SDS</b>	Dodecilsulfat sòdic
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesi en gel de poliacrilamida en presència de SDS
<b>SEC</b>	Cromatografia d'exclusió molecular ( <i>Size Exclusion Chromatography</i> )
<b>seg</b>	Segons
<b>SEM</b>	<i>Standard Error of the Mean</i>
<b>SH3</b>	<i>SRC Homology 3 Domain</i>
<b>SNC</b>	Sistema nerviós central
<b>ssDNA</b>	DNA de cadena senzilla ( <i>single-strand DNA</i> )
<b>ssNMR</b>	Ressonància magnètica nuclear en fase sòlida
<b>T</b>	Temperatura
<b>TA</b>	Temperatura ambient
<b>Ta</b>	Temperatura d'hibridació de fragments de DNA ( <i>annealing</i> )
<b>TEM</b>	Microscòpia electrònica de transmissió
<b>TEMED</b>	N, N, N', N'-tetrametilè-diamí
<b>TEV</b>	<i>Tobacco Etch Protein</i>
<b>ThT</b>	Tioflavina T ( <i>Thioflavine T</i> )
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura en la qual el 50 % de la població es troba desplegada
<b>Tm</b>	Temperatura de fusió de fragments de DNA ( <i>melting</i> )
<b>trx</b>	Proteïna de fusió tioredoxina
<b>TTR</b>	Proteïna Transtiretina ( <i>Transthyretin Protein</i> )
<b>U</b>	Estat Desplegat
<b>UE</b>	Unitats d'endotoxina
<b>UPR</b>	<i>Unfolded Protein Response</i>
<b>UV</b>	Ultraviolada
<b>v/v</b>	Relació volum/volum
<b>v/p</b>	Relació volum/pes
<b>VC</b>	Volum de columna
<b>V<sub>H</sub></b>	Domini variable de cadena pesada

<b>V<sub>L</sub></b>	Domini variable de cadena lleugera
<b>WL</b>	Fibres <i>worm-like</i>
<b>WT</b>	<i>Wild-Type</i>
<b>ZO</b>	Proteïna <i>Zònula occludens</i>
<b>Δ</b>	Increment
<b>G</b>	Energia lliure de Gibbs
<b>H</b>	Entalpia
<b>S</b>	Entropia
<b>[D]<sub>50%</sub></b>	Concentració de desnaturalitzant en la qual el 50 % de la proteïna es troba desplegada
<b><sup>1</sup>H</b>	Isòtop radioactiu Hidrogen 1
<b>3D</b>	Tridimensional
<b><sup>15</sup>N</b>	Isòtop radioactiu Nitrogen 15
<b>Å</b>	Armstrongs
<b>ε</b>	Coefficient d'extinció molar
<b>λ</b>	Longitud d'ona
<b>k-</b>	Quilo-
<b>m-</b>	Mil·li-
<b>n-</b>	Nano-
<b>θ</b>	El·lipticitat
<b>μ-</b>	Micro-
<b>°C</b>	Graus Centígrads
<b>%</b>	Tant per cent



### Taula d'abreviatures dels aminoàcids proteïnogènics.

<b>Nom</b>	<b>Codi tres lletres</b>	<b>Codi una lletra</b>
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Àcid Aspàrtic	Asp	D
Cisteïna	Cys	C
Àcid Glutàmic	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptòfan	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

### Taula d'abreviatures dels nucleòtids de DNA/RNA.

<b>Nom de la Base</b>	<b>Codi una</b>
<b>Nitrogenada</b>	<b>lletra</b>
Adenina	A
Citosina	C
Guanina	G
Timina	T
Uracil	U



## **I. RESUM.**



Aquesta Tesi Doctoral es centra en l'estudi molecular de tres proteïnes relacionades amb malalties conformacionals humanes, o Amiloïdosis. Mitjançant tècniques espectroscòpiques, s'han descrit els mecanismes de plegament natiu i d'agregació en fulla- $\beta$  ordenada, dues vies que es troben en competència a través de la presència de diferents estats intermediaris a l'espai conformacional. Els intermediaris d'agregació, precursors de les fibres amiloides, són considerats els principals causants de la citotoxicitat cel·lular en moltes de les malalties amiloidogèniques, per tant, el seu estudi és crucial per aprofundir en l'etiologia d'aquestes patologies humanes, moltes d'elles sense tractament curatiu.

Per una banda, s'ha obtingut un fragment d'anticòs recombinant específic per a  $\beta$ -oligòmers del pèptid  $A\beta_{1-42}$  causant de l'Alzheimer, l'scFv-h3D6. El seu estudi ha estat el primer en descriure el mecanisme pel qual un scFv retira el pèptid  $A\beta_{1-42}$  de la via amiloide i evita la seva toxicitat neuronal, tal i com s'ha demostrat en assajos de viabilitat en cultius cel·lulars. A més, l'obtenció d'un model tridimensional de l'scFv-h3D6, per homologia de seqüències, ha permès fer un redisseny racional de la molècula per tal de millorar-ne la seva estabilitat, augmentar la seva producció, i disminuir la dosi efectiva ja demostrada en ratolins model d'Alzheimer.

Per altra banda, s'ha treballat amb un domini variable ( $V_L$ ) d'immunoglobulina, extret d'una pacient amb Amiloïdosi de cadena lleugera, l'AL-12. Aquest domini amiloidogènic presenta 7 mutacions respecte la seva línia germinal  $\kappa$ l O18/O8. L'obtenció de les propietats termodinàmiques de l'AL-12, així com de quatre mutants restauratius, ha servit per estudiar l'efecte de les mutacions somàtiques sobre l'estabilitat dels dominis  $V_L$ . Així, la restauració de residus puntuals de l'AL-12 cap a la seqüència germinal, implica la desestabilització del domini i un augment de la tendència a l'agregació i, per tant, s'ha demostrat que una única mutació somàtica no seria la causa del potencial amiloidogènic de l'AL-12, sinó que seria la combinació de varis factors desestabilitzants del plegament natiu, donant lloc a canvis conformacionals susceptibles a l'agregació amiloide, i la seva deposició en diferents òrgans i teixits cel·lulars.

I per últim, s'ha estudiat el domini PSD95-PDZ3, una molècula reguladora de la sinapsis neuronal, i relacionada amb malalties com l'Alzheimer o l'Autisme. El domini PDZ3 segueix una via d'agregació amiloide reversible, una particularitat rellevant de la qual se n'han determinat els canvis conformacionals que la promouen. A més, el disseny de 6 variants del PDZ3 han servit per determinar les regions implicades en l'estabilitat i plegament global del domini, així com el seu paper en la regulació alostèrica de l'activitat del domini.

Aquest treball demostra la importància dels estats intermediaris a l'espai conformacional de les proteïnes, la seva relació amb les malalties conformacionals, i l'aplicabilitat del seu coneixement en el desenvolupament de teràpies efectives.



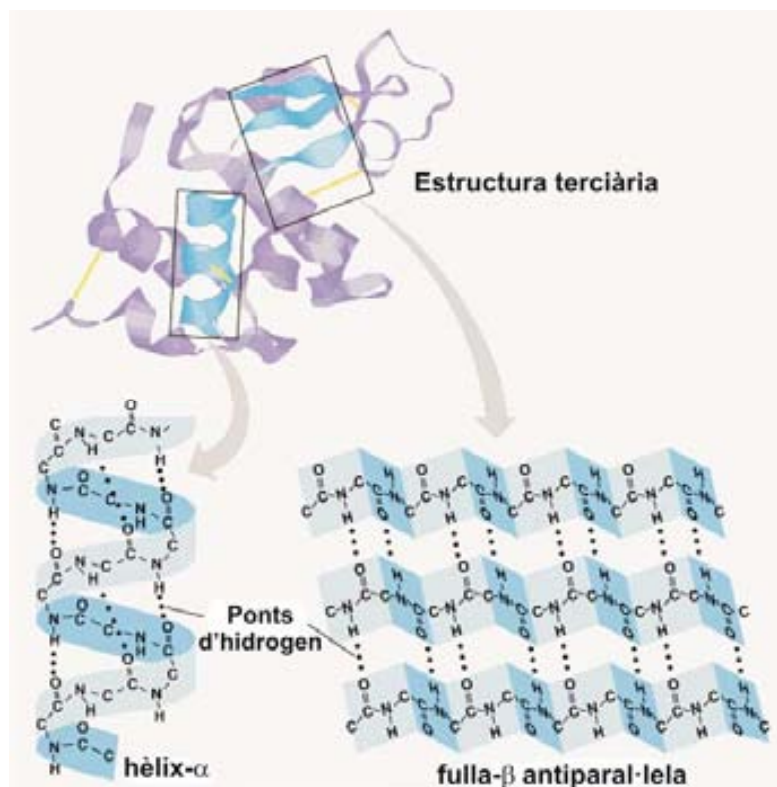
## **II. INTRODUCCIÓ.**





## 1. ESTRUCTURA I PLEGAMENT DE PROTEÏNES.

El plegament de proteïnes és el procés pel qual una cadena polipeptídica, a mesura que és sintetitzada pels ribosomes, adopta la seva conformació tridimensional nativa i funcional. El plegament natiu es troba estabilitzat gràcies a interaccions intramoleculares, tant locals (estructura secundària) com distants (estructura terciària). Principalment s'estableixen interaccions no covalents (electrostàtiques, hidrofòbiques i ponts d'hidrogen) entre les cadenes laterals dels aminoàcids de la seqüència primària, encara que també en donen entre les cadenes laterals i la cadena principal. Les interaccions locals donen lloc a estructures secundàries regulars (hèlix- $\alpha$  i cadenes- $\beta$ ) o irregulars (hèlix- $3_{10}$ , *loops* i girs- $\beta$ ), i parlem de motius estructurals quan es considera una combinació d'estructures secundàries. L'estructura terciària s'assoleix per aproximació en el espai i interacció de residus distants dins la seqüència, de forma que la proteïna s'empaqueta sobre si mateixa, enterrant el nucli hidrofòbic i adquirint una conformació globular, compacta i estable, denominada domini (Figura I. 1).



**Figura I. 1. Representació de l'estructura de proteïnes.** Detall de l'estructura secundària en hèlix- $\alpha$  i fulla- $\beta$ , estabilitzades per ponts d'hidrogen locals. El seu empaquetament a l'espai dona lloc a l'estructura terciària, estabilitzada per interaccions entre diferents motius estructurals (groc) distants dins la molècula.

En el cas de proteïnes multidomini, aquests s'uneixen mitjançant estructures secundàries irregulars, i l'estructura terciària global s'estabilitza per interaccions interdomini que expulsen l'aigua de l'interior de la molècula. S'anomena estructura quaternària a la combinació de diverses cadenes polipeptídiques.

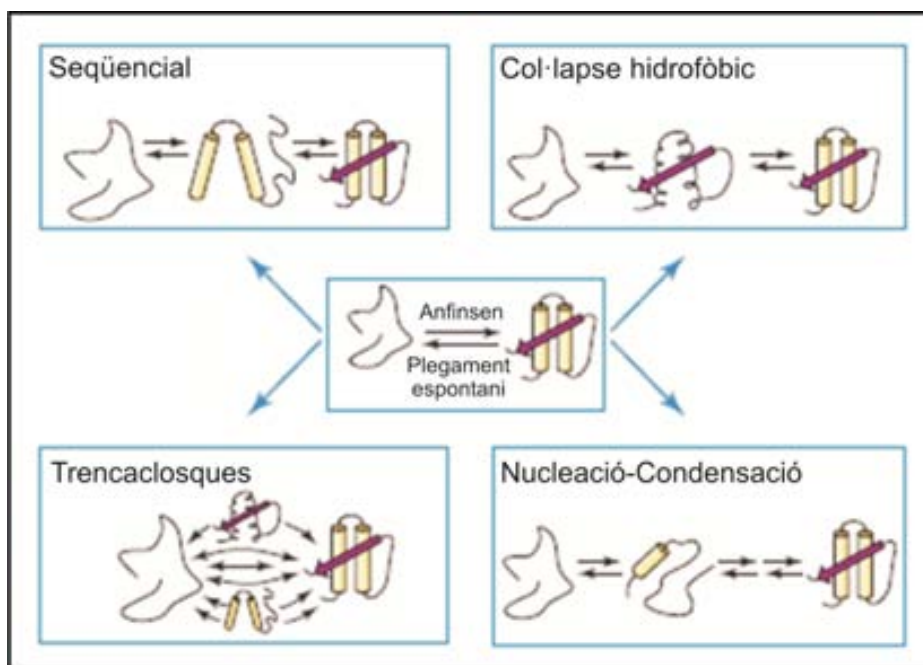
El plegament natiu és dinàmic, és a dir, presenta diversitat d'espècies conformacionals que fluctuen entre elles, adquirint la flexibilitat necessària per adaptar-se al entorn i interaccionar amb d'altres molècules, complint d'aquesta manera les seves funcions. Aquesta estabilitat compromesa del estat natiu ha esdevingut un tema clau en els darrers anys, degut a que és un dels desencadenants de moltes malalties conformacionals.

### 1.1. Antecedents històrics.

Als anys 60, Christian Anfinsen va aconseguir *in vitro* el replegament de la proteïna Ribonucleasa A, un experiment clau que va demostrar que tota la informació necessària per a què una proteïna adquireixi la seva estructura tridimensional nativa, es troba a la seqüència aminoacídica (Anfinsen et al. 1961). Amb aquest experiment, Anfinsen va postular que, en condicions fisiològiques, l'estat natiu d'una proteïna representa el nivell mínim d'energia global del sistema, i que la termodinàmica és el determinant principal en el procés de plegament. Més tard, Cyrus Levinthal va demostrar que el plegament proteic no pot ser aleatori per el temps infinit que es tardaria en assolir l'estat natiu, argumentant que la contribució termodinàmica no pot ser la única durant el procés (Levinthal 1968). Cap als anys 80, es va a formular la teoria de les vies de plegament, segons la qual una proteïna desplegada segueix unes vies de plegament específiques, regida per un nombre limitat de conformacions cinèticament possibles i termodinàmicament favorables (Bryngelson et al. 1995). Llavors, l'objectiu va ser entendre com la proteïna segueix la via "correcta" i evita la resta.

Inicialment es van desenvolupar dos models de vies de plegament que tenien en compte la presència d'intermediaris de plegament i que limitarien la reorganització cap a l'estat natiu (Baldwin 1989) (Figura I. 2, panell superior). El model seqüencial (o *framework*), segons el qual primer es formen els elements locals d'estructura secundària i seguidament, per acoblament d'aquestes estructures al espai, s'adquireix l'estructura terciària final (Kim, Baldwin 1982, Kim, Baldwin 1990). I el model del col·lapse hidrofòbic, que defensa la idea de que la proteïna col·lapsa ràpidament sobre els residus hidrofòbics donant lloc a un intermediari parcialment compacte (*molten-globule*). En contraposició es va proposar el model del trencaclosques (o *jigsaw*), que nega la necessitat d'una via de plegament única i postula que cada molècula de proteïna pot seguir una ruta diferent per arribar a l'estat natiu (Harrison and Durbin, 1985) (Figura I. 2, panell inferior, esquerra).

Tanmateix la necessitat d'intermediaris a les vies de plegament va ser qüestionada als anys 90, quan es demostrà que proteïnes petites segueixen vies de dos estats (Jackson, Fersht 1991, Villegas et al. 1995). El model de nucleació-condensació, unifica els models seqüencial i de col·lapse hidrofòbic postulant que les interaccions a llarga distància i d'altres interaccions hidrofòbiques presents a l'estat natiu es formen a l'estat de transició de la via de plegament, estabilitzant d'aquesta manera les altrament poc estables estructures secundàries (Figura I. 2, panell inferior, dreta) (Itzhaki, Otzen & Fersht 1995, Fersht 1997, Villegas et al. 1998). Aquest model va prendre força quan varis estudis van revelar que, ja a l'estat desplegat, existeixen certes interaccions natives que marquen la via de plegament i guien a la proteïna cap al estat natiu (Mok et al. 1999, Daggett, Fersht 2003).

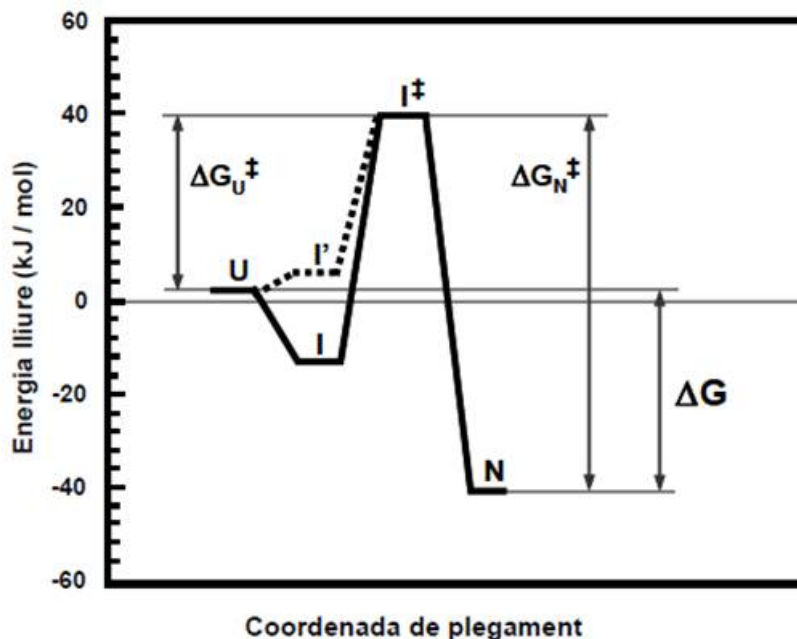


**Figura I. 2 Models de vies de plegament de proteïnes.** A partir dels experiments d'Anfinsen, que van demostrar que les proteïnes pleguen espontània i reversiblement, es van descriure diferents models mitjançant el qual una proteïna adopta el seu plegament natiu. *Figura adaptada de Radford, S.E. (2000).*

### 1.2. Energètica de plegament.

Energèticament, el procés de plegament de proteïnes segueix una reacció on s'ha de traspasar una barrera energètica de major energia que l'estat desplegat (U) i plegat (N) (Figura I. 3). Aquesta alta barrera energètica correspon als anomenats estats de transició (I‡), amb una estructura i termodinàmica característica, però que la seva elevada inestabilitat els fa difícil d'estudiar. L'estat de transició és defineix com l'etapa limitant del

procés de plegament, i determina la cinètica o velocitat del procés, i la formació d'intermediaris de plegament meta-estables (I) (Radford 2000).



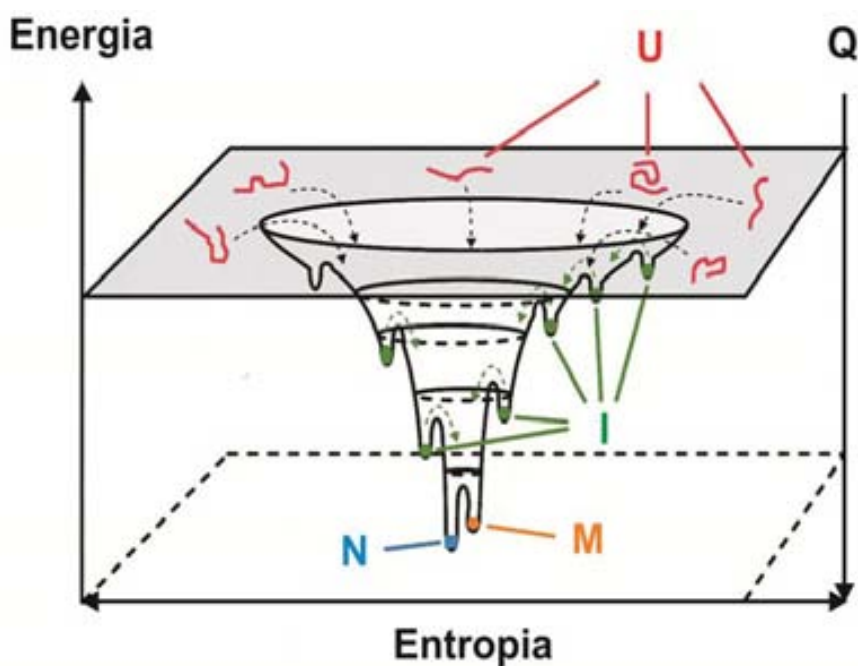
**Figura I. 3. Diagrama energètic del plegament proteic.** U: estat desplegat, I-I': intermediaris de plegament, I‡: estat intermediari, N: estat natiu,  $\Delta G$ : energia lliure de Gibbs,  $\Delta G_{U\ddagger}$ : energia lliure del pas del estat desplegat al estat de transició,  $\Delta G_{N\ddagger}$ : energia lliure del pas del estat de transició al estat natiu *Figura adaptada de Fersht, A.R. (1993).*

L'estabilitat termodinàmica d'una proteïna es defineix per la diferència d'energia lliure, o de Gibbs, entre l'estat plegat i el desplegat ( $\Delta G_{N-U}$ ) i, generalment, es troba entre els valors de 5-15 kcal·mol<sup>-1</sup> (21-63 kJ·mol<sup>-1</sup>) (Creighton 1992, Dobson, Evans & Radford 1994, Fersht 1993, Chan, Bromberg & Dill 1995). Assolir l'estat natiu implica una disminució de l'energia lliure del sistema ( $\Delta G_{N-U} < 0$ ). Entenent que  $\Delta G_{N-U} = \Delta H - T\Delta S$ , llavors l'entalpia i l'entropia de la reacció contribueixen a l'energia global. La contribució entròpica ( $\Delta S$ ) durant el plegament acostuma a ser desfavorable, ja que implica un augment de l'ordre en el sistema. Tot i això, existeix el que s'anomena penalització entròpica, sovint atribuïda a proteïnes intrínsecament desordenades o que perden part de l'estructura nativa per a ser funcionals. També s'ha postulat que algunes proteïnes poden seguir un plegament *down-hill*, sense barreres energètiques, quan els valors d'entropia i d'entalpia es sincronitzen (Eaton 1999, Sadqi, Fushman & Munoz 2006). A part d'aquests casos, el plegament de proteïnes es regeix, principalment, per un canvi favorable d'entalpia ( $\Delta H$ ), associat a l'establiment d'interaccions natives que estableixen l'estat natiu.

### 1.3. Embuts de plegament.

Gràcies a la combinació d'una gran varietat de tècniques experimentals i mètodes teòrics (com per exemple, l'*stopped-flow*, l'RMN, l'intercanvi protó-deuteri, i aproximacions computacionals), s'ha pogut estudiar, a nivell de residu i a una escala de temps de milisegons, el procés de plegament de proteïnes de diferent complexitat. Aquest avanç tecnològic ha permès la caracterització i l'obtenció de valors d'equilibri cinètic i termodinàmic dels diferents estats que poblen una reacció de plegament, inclòs l'estat intermediari (Serrano, Matouschek & Fersht 1992, Brockwell, Smith & Radford 2000).

Actualment s'entén que no existeix una via de plegament lineal, sinó que la proteïna desplegada es troba dins un mapa energètic multidimensional, o embut de plegament (Figura I. 4), en el que la proteïna pot seguir múltiples trajectòries de plegament, podent passar per diferents estats intermediaris, fins a convergir en l'estat natiu de mínima energia (Bryngelson et al. 1995, Wolynes, Onuchic & Thirumalai 1995, Dill, Chan 1997, Radford 2000).



**Figura I. 4. Representació d'un embut de plegament de proteïnes.** U: estat desplegat, I: intermediaris, N: estat natiu, M: proteïna mal plegada o *misfolded*, Q: nombre de contactes natis. *Figura adaptada de Schultz, C.P. (2000).*

A l'estat desplegat, s'estableixen contactes entre residus clau de la seqüència, formant un nucli de plegament que marca la topologia i la via a seguir de la proteïna, fent que el procés resulti ràpid i eficient (Daggett, Fersht 2003, Koehl, Levitt 2002).

S'ha de tenir en compte que, en una proteïna desnaturalitzada, encara poden persistir certes interaccions natives, o no natives, tot i haver perdut la seva estructura terciària. Per tant, cal diferenciar entre un estat totalment desplegat (o estructura en *random-coil*) i desnaturalitzat (Blanco, Serrano & Forman-Kay 1998, Klein-Seetharaman et al. 2002).

El perfil de l'embut de plegament és únic per a cada proteïna, variable depenent de les condicions del entorn, i és determinat per les propietats cinètiques i termodinàmiques de la seqüència polipeptídica. En el procés de plegament, el nivell de mínima energia és ocupat per l'estat natiu, però poden existir espècies intermediàries transitòries que marquen mínims energètics locals (Jahn, Radford 2005).

### **1.3.1. Intermediaris de plegament.**

Els dominis proteics i proteïnes globulars petites (de menys de 100 residus i sense ponts disulfur) solen plegar cooperativament, seguint una transició de dos estats, plegat-desplegat, amb una cinètica ràpida i sense necessitat de passar per cap intermediari de reacció (Villegas et al. 1995). El primer, de molts exemples descrits, va ser la proteïna inhibidora de la quimotripsina 2 (CI2), de 64 residus (Jackson, Fersht 1991). En canvi, les proteïnes de grandària major de 100 residus, acostumen a seguir una transició de tres estats, implicant un intermediari cinètic estable. La raó seria que les proteïnes grans tenen tendència a col·lapsar en el solvent, donant lloc a estats compactes amb certa estructura nativa, la reorganització cap a al plegament natiu passaria per travessar una alta barrera energètica, donant lloc a estats intermediaris parcialment plegats (Jahn, Radford 2005).

El plegament de proteïnes és un procés cooperatiu, de forma que el plegament d'un domini pot desencadenar i estabilitzar el plegament d'un altre de menys estable, en aquest cas, passant per un estat intermediari. En canvi, si els dominis que formen una proteïna tenen una estabilitat similar entre ells, llavors plegaran simultàniament sense necessitat de poblar intermediaris (Tsytlonok, Itzhaki 2013).

Segons la seva naturalesa, els estats intermediaris poden dividir-se en a) intermediaris termodinàmics o metastables, que es troben en equilibri, i per tant s'acumulen i es poden aïllar; i b) intermediaris cinètics, que apareixen degut a un canvi de velocitat durant la transició entre l'estat plegat i el desplegat, i que es poden detectar però no aïllar, ja que no s'acumulen.

El paper dels estats intermediaris encara provoca certa controvèrsia. Per una banda, representen una etapa important de la via de plegament (*on-pathway*), establint contactes nadius crucials per arribar a l'estat plegat; aquests intermediaris es poden considerar transitoris o mínims energètics locals. Però en certes ocasions, l'estat desplegat

estableix interaccions no natives, s'acumula en una trampa cinètica en forma d'intermediari parcialment plegat que difícilment revertirà cap a la via de plegament natiu. Aquests intermediaris es consideren fora de la via de plegament (*off-pathway*) i, en els darrers anys, han estat identificats com a principals precursors de l'agregació proteica. A part dels agregats amorfs, reben especial importància els agregats  $\beta$ -amiloides ja que es troben altament relacionats amb moltes malalties humanes. (Jahn, Radford 2008, Tsytlonok, Itzhaki 2013).





## 2. AGREGACIÓ AMILOIDE.

L'agregació amiloide és el procés pel qual un pèptid o proteïna soluble i funcional, pateix una reestructuració conformacional donant lloc a la seva auto-associació i formació d'agregats fibril·lars insolubles altament ordenats en estructura- $\beta$  creuada. Aquests agregats es troben implicats en un gran nombre de patologies humanes, anomenades malalties amiloidogèniques, conformacionals, o amiloïdosi. Entendre el mecanisme d'agregació de proteïnes és clau per a poder arribar a desenvolupar teràpies efectives per aquestes patologies.

En general, les proteïnes globulars tenen poca tendència a l'agregació però, certes mutacions o canvis en l'entorn proteic poden desestabilitzar l'estat natiu i desplaçar l'equilibri cap a intermediaris susceptibles a l'agregació. A més, les proteïnes grans, i amb un plegament poc cooperatiu, tenen més risc d'agregar (Chiti, Dobson 2009).

Avui en dia és sabut que l'estabilització d'espècies intermediàries no natives és el desencadenant de l'agregació amiloide. Aquestes espècies exposen regions hidrofòbiques, que es trobarien enterrades en el plegament natiu, fent-les accessibles al solvent i per tant propiciant l'establiment de interaccions intermoleculares i l'auto-associació. En el cas de l'enzim lisozim o de la proteïna transtiretina (TTR), mutacions puntuals en la seqüència desestabilitzen l'estat natiu i la seva cooperativitat de plegament. La  $\beta$ 2-microglobulina resulta amiloidogènica degut a canvis locals en l'entorn proteic. La sobreproducció de proteïna amiloidogènica és la causa de determinades amiloïdosis, com la de cadena lleugera (AL). En el cas de l'Alzheimer (AD), una desregulació en el procés proteolític de la proteïna precursora amiloide (APP) desencadena l'acumulació amiloide del pèptid  $A\beta_{1-42}$ . D'altra banda, l'al·lel *APOE4* incrementa el risc de patir AD esporàdic plausiblement perquè s'uneix al pèptid  $A\beta_{1-4}$  amb unes 20 vegades menys afinitat que l'al·lel més freqüent en humans, l'*APOE3*, i, per tant, no el retira amb l'eficàcia necessària (LaDu et al. 1994). No obstant això, encara s'ha d'aprofundir molt en el mecanisme específic de formació amiloide (Blancas-Mejia, Ramirez-Alvarado 2013).

Malgrat la directa relació entre amiloidogènesi i patologia, existeixen un gran nombre d'organismes que converteixen, durant el seu cicle fisiològic, una o més proteïnes endògenes en fibres amiloides funcionals, anomenades proteïnes *amiloid-like*, per diferenciar-les de les patogèniques. Un exemple n'és la proteïna Curlin, de la bactèria *E. coli*, que té com a funció colonitzar superfícies inertes i mitjançar la unió a proteïnes hostes. O bé, la proteïna Chaplins, de la bactèria *S. coelicolor*, que disminueix la tensió superficial de l'aigua i permet el desenvolupament de les hifes aèries. Algunes proteïnes poden existir, dins de sistemes biològics funcionals, tant en forma soluble com d'agregats amiloides, actuant com elements genètics extracromosomals, capaços d'auto propagar-se i

transmetre's, i que són anomenats prions no patogènics, com ara la proteïna Sup35p, del llevat *S. cerevisiae*, i la HET-s, del fong *P. anserina* (Chiti, Dobson 2006).

Aquest fet fa pensar que la formació de fibres amiloides és una propietat inherent i genèrica de les cadenes polipeptídiques, i que es poden formar sota unes condicions específiques altament controlades. A més, gràcies a tècniques computacionals, com ara l'algoritme TANGO, s'han identificat les regions de la seqüència polipeptídica amb tendència a l'agregació (Fernandez-Escamilla et al. 2004). L'evolució, però, ha afavorit el plegament natiu per davant de l'agregació, mitjançant la presència d'altres barres cinètiques de desplegament, xaperones moleculars que ajuden a assolir l'estat natiu, i mecanismes de identificació i degradació d'agregats proteics (Stefani 2012).

### 2.1. Mecanisme de formació de fibres amiloides.

*In vitro*, les fibres amiloides es poden formar en presència d'agents desnaturalitzants (com la urea o el GdnHCl), a pHs àcids, a elevada temperatura, o sota canvis d'aminoàcids, de forma que s'incrementa la població de conformacions parcialment desplegades susceptibles a l'auto-associació.

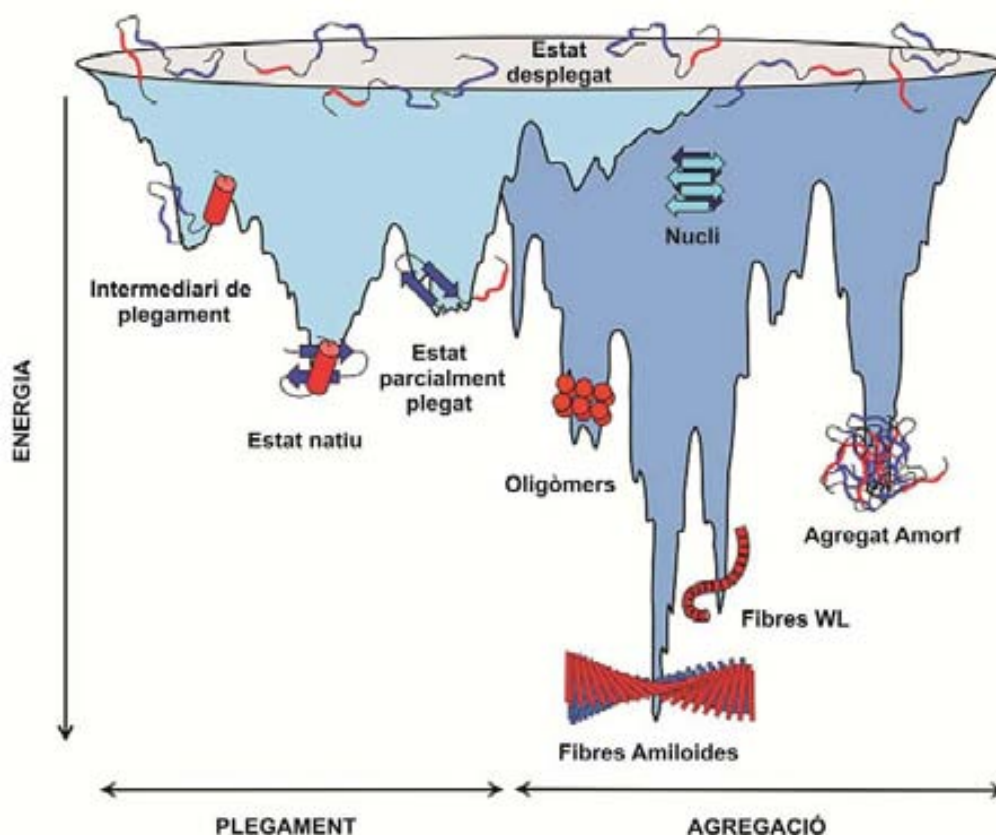
Tot i conèixer els desencadenants *in vitro*, encara està per clarificar quins són els mecanismes *in vivo* que provoquen que una proteïna es desviï de la seva via de plegament nativa i entri a la via d'agregació. Sembla ser que els processos de plegament i agregació es troben en competència, de forma que es solapa un doble embut de plegament (Figura I. 5), on les espècies precursors són capaces de superar la barrera energètica que dona pas al plegament amiloide, una via amb una estabilitat global major que la nativa, i on les fibres representen l'estat de mínima energia de tot el sistema (Bucciantini et al. 2002, Jahn, Radford 2008, Fandrich 2012, Stefani 2012).

De forma general, el procés de fibril·lació segueix un patró jeràrquic on determinades modificacions de l'entorn i estructurals causen la combinació de monòmers parcialment desplegats cap a oligòmers més o menys compactes, i la subseqüent reorganització d'aquests donant lloc a estructures fibril·lars complexes i ordenades en fulla- $\beta$  creuada (Fitzpatrick et al. 2013).

Per FTIR es pot diferenciar la fulla- $\beta$  nativa de l'amiloide, que és generada després d'aquesta reorganització (Zandomenighi et al. 2004).

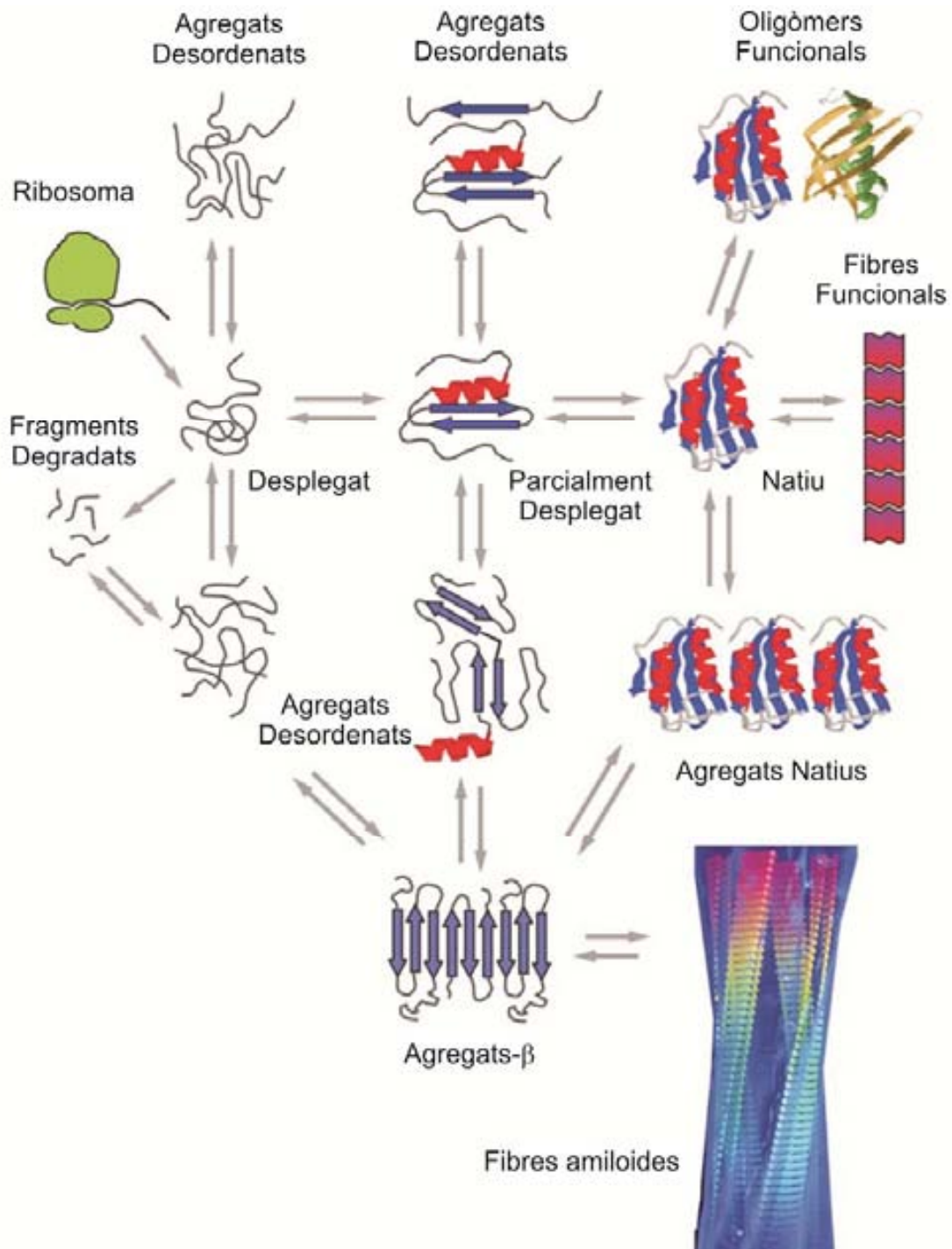
Teòricament, la desestabilització i pèrdua del estat natiu, o bé l'augment de la tendència a l'agregació d'espècies parcialment desplegades, és la justificació més apropiada per al mecanisme d'agregació amiloide, però s'han descrit casos d'associació entre espècies encara natives, i són els oligòmers amb estructura nativa els que pateixen la reorganització conformacional cap a l'estructura rica en fulla- $\beta$  ordenada, com per

exemple el procés d'agregació amiloide de la insulina, o de l'ataxina3 associada a l'atàxia espinocerebel·lar (Chiti, Dobson 2006).



**Figura I. 5. Representació esquemàtica de l'embut de plegament i d'agregació.** La superfície mostra la varietat de conformacions que condueixen cap a l'estat natiu, a través de contactes intramoleculars; o bé cap a la formació de fibres amiloides, a través de contactes intermoleculars. Cada una de les vies és poblada a partir de diferents intermediaris de plegament. El pas d'una via a l'altra encara està per definir. *Figura adaptada de Jhan, T.R. & Radford, S.E. (2005).*

El mecanisme d'agregació esdevé tan complex com la multitud d'estats conformacionals que pot adoptar una cadena polipeptídica desplegada, que es troben en equilibri i que, per tant, són interconvertibles entre ells. Tal i com indica l'esquema de la figura I. 6, dins d'aquesta complexa dinàmica molecular no és d'estranyar que qualsevol error del sistema de regulació (xaperones moleculars, sistemes de degradació i de control de qualitat), canvis en l'entorn cel·lular, o en condicions patològiques, desencadenin l'acumulació i la reestructuració en agregats- $\beta$  d'alguna d'aquestes espècies, ja sigui l'estat plegat, el desplegat total o parcial, els agregats amorfs, o els oligòmers funcionals. Malgrat tot, clarament, les espècies total o parcialment desplegades són més susceptibles a l'agregació que no pas l'estat natiu (Chiti, Dobson 2006).



**Figura I. 6. Representació esquemàtica dels possibles estats conformationals que pot adoptar una cadena polipeptídica i les principals interconversions entre ells.** Totes aquestes interconversions es troben regulades per l'entorn cel·lular, xaperones moleculars, sistemes de degradació i processos de control de qualitat. Molts dels estats conformationals poden ser biològicament funcionals, incloses les proteïnes desplegadas i les fibres. Però, determinats errors en el sistema de regulació propiciarien l'acumulació d'espècies i agregats no funcionals, desencadenants de malalties conformationals. *Figura adaptada de Chiti, F. & Dobson, C.M. (2006).*

### **2.1.1. Determinants amiloidogènics.**

A part de l'estabilitat del plegament proteic i l'acumulació d'intermediaris no nadius, les propietats de la seqüència polipeptídica influeixen notablement sobre la capacitat intrínseca d'una proteïna per formar agregats. A continuació és detallen tres propietats que esdevenen determinants per a l'auto-associació:

- El grau d'hidrofobicitat de les cadenes laterals. La presència d'illots hidrofòbics facilita l'agregació d'espècies total o parcialment desplegadas. Evolutivament, les seqüències proteiques eviten grups de tres o més residus hidrofòbics consecutius.
- La càrrega neta de la seqüència. De forma general, una elevada càrrega neta, ja sigui global o local, dificulta l'agregació degut a la repulsió electrostàtica entre residus.
- I per últim, la tendència a formar estructures en fulla- $\beta$ . L'elevada conservació de residus prolina i glicina, dos residus que trenquen les cadenes- $\beta$ , i la menor freqüència de plegaments nadius en conformació tot- $\beta$ , podrien ser un mecanisme evolutiu per a disminuir la tendència a l'agregació.

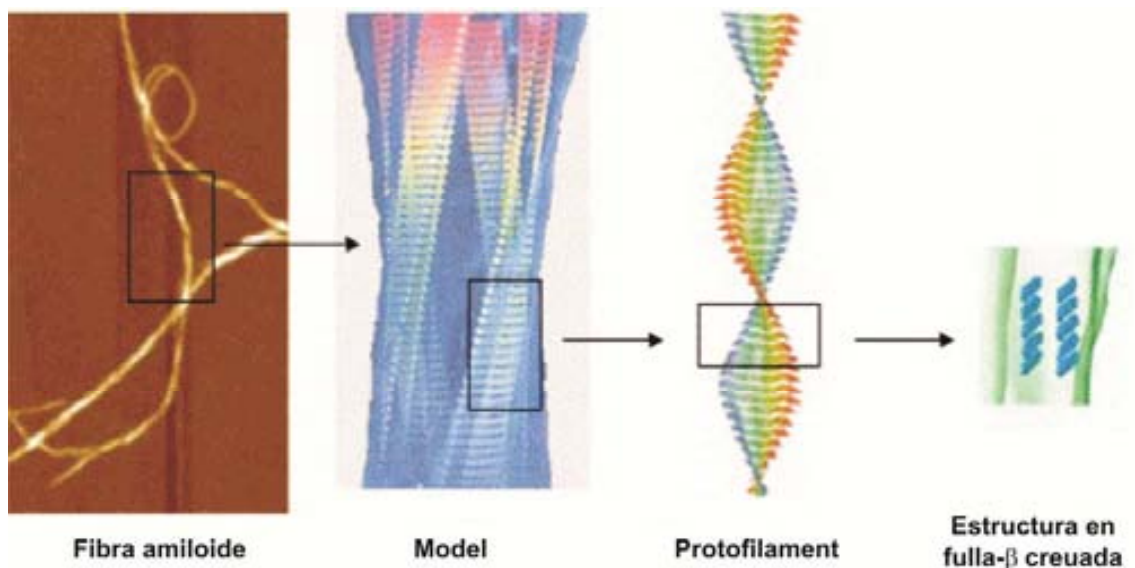
### **2.2. Estructura de les fibres amiloides.**

Le primeres descripcions de fibres amiloides van realitzar-se mitjançant tècniques com TEM, AFM i difracció de raigs-X. Ens els darrers anys, la caracterització de les fibres ha fet un gran salt gràcies a la tècnica de ressonància magnètica nuclear en fase sòlida (ssNMR), i l'obtenció de nano i micro-cristalls de fragments de pèptids amb característiques amiloides.

Les fibres amiloides representen un estat d'organització diferent a l'estat natiu. Tot i que les forces d'interacció (ponts d'hidrogen i interaccions hidrofòbiques, principalment) són les mateixes en totes dues vies, en el mecanisme d'agregació es perden els contactes nadius i s'estableixen contactes intermoleculars, dependents de concentració.

Les fibres amiloides són agregats insolubles i molt estables. Malgrat que els seus precursors són, seqüencial i estructuralment, molt diversos, totes elles adopten una estructura altament ordenada en fulla- $\beta$  creuada, on les cadenes- $\beta$  es disposen perpendiculars al eix de la fibra, deixant enterrat el nucli altament hidrofòbic (Figura I. 7). Presenten un diàmetre d'entre 7 i 13 nm, i estan formades per un conjunt de 2 a 6 protofilaments, de 2-5 nm de diàmetre, associats lateralment i formant una hèlix sobre si mateixos (Serpell et al. 2000). Aquest patró canònic, fa pensar que les propietats físico-químiques de la cadena polipeptídica són un dels principals determinants de l'estructura

fibril·lar. Una altra característica comuna de les fibres amiloides, és que uneixen específicament els fluoròfors Congo Red i Tioflavina T (ThT), tot i que s'ha vist que els seus precursors oligomèrics també són capaços d'establir aquesta interacció (Maezawa et al. 2008).



**Figura I. 7. Model de l'organització estructural de les fibres amiloides.** La imatge obtinguda per microscòpia consisteix en una fibra formada per 4 protofilaments, associats lateralment i formant una hèlix sobre si mateixos. Cada protofilament creix formant un nucli hidrofòbic en fulla- $\beta$  disposada perpendicularment al eix de la fibra. *Figura adaptada de Stefani, M. (2004).*

Les cadenes laterals de la seqüència polipeptídica exerceixen una gran influència sobre l'empaquetament amiloide, provocant certes diferències estructurals entre diferents fibres, com ara, la llargada de les fulles- $\beta$ , la disposició paral·lela o antiparal·lela de les cadenes- $\beta$ , i la seva distància d'empaquetament, així com el nombre de protofilaments que les formen. També trobem diferències en la llargada i conformació de les estructures irregulars que es troben fora del nucli hidrofòbic de la fibra. A més, la presència de ponts disulfur, o de regions de poliglutamina, també poden pertorbar l'estructura canònica de la fibra (Chiti, Dobson 2006).

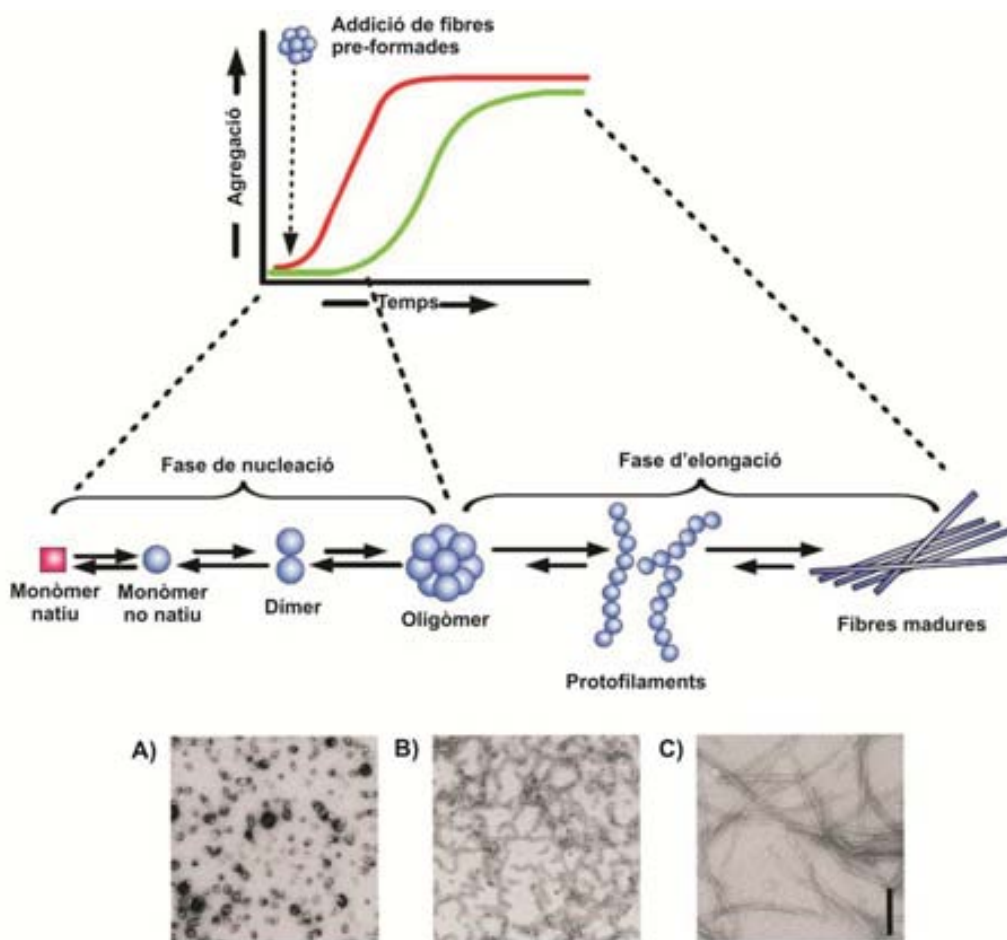
### 2.3. Tipus de vies amiloidogèniques.

L'estudi d'agregació de la proteïna  $\beta$ 2-microglobulina va ser el primer en identificar i classificar diferents tipus d'agregats- $\beta$  (Kad et al. 2003, Gosal et al. 2005). Inicialment, la intenció era classificar les fibres amiloides en funció de les seves

característiques conformacionals, però certes propietats cinètiques van revelar la existència de dues vies amiloidogèniques diferents, la via amiloide i la via *worm-like* (WL).

**2.3.1. Via de fibril·lació amiloide.**

Aquesta via amiloidogènica representaria l'estructura clàssica dels agregats tipus- $\beta$ . Són fibres rígides, sense ramificacions, i formen un gir sobre si mateixes. En funció del número de protofilaments que les componen i de la distància de gir, aquestes fibres es subdivideixen en diferents tipus (Kad et al. 2003, Gosal et al. 2005).



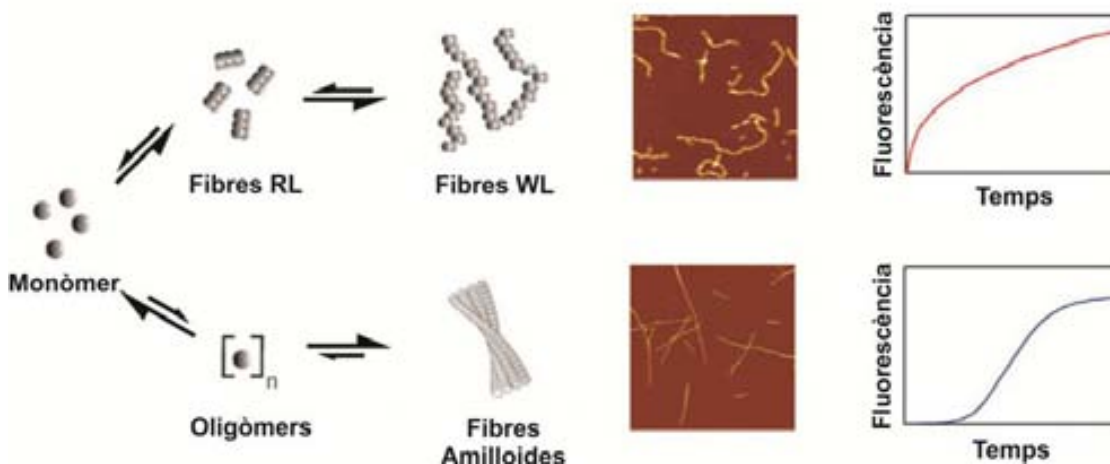
**Figura I. 8. Model d'agregació amiloide dependent de nucleació.** El procés consisteix en dues fases que donen lloc a un creixement sigmoïdal (corba verda): a) la fase de nucleació, termodinàmicament desfavorable i lenta, en la qual els monòmers pateixen un canvi conformacional i s'associen formant un nucli oligomèric, i b) la fase d'elongació, on el nucli creix ràpidament i favorablement per addició de monòmers a la fibra. L'addició de fibres pre-formades escurça el temps de nucleació i induïx la formació d'agregats ràpidament (corba vermella). A sota, imatges de TEM de A) espècies oligomèriques, B) protofilaments, i C) fibres amiloides. La barra correspon 20 nm. *Figura adaptada de (Kumar, Walter 2011).*

Cinèticament, la formació de fibres amiloides segueix un mecanisme dependent de nucleació (Figura I. 8), en el que els monòmers solubles formen un nucli energèticament desfavorable (fase *lag*). A partir d'aquí la fibra creix ràpidament per associació de monòmers i oligòmers al nucli pre-format, sent un creixement exponencial i altament favorable. *In vitro*, l'addició de formes prefibril·lars prèviament formades (o *seeding*), redueix la barrera de nucleació de la fase *lag* de forma que s'accelera la seva formació (Serio et al. 2000). Per TEM i AFM, s'han identificat espècies oligomèriques i protofilaments poblats durant la formació de les fibres (Figura I. 8, A-C).

**2.3.2. Via de fibril·lació worm-like.**

Les fibres WL són més curtes, de menys de 600 nm, flexibles, de 2.5 nm de diàmetre, i exhibeixen una morfologia nodular amb una distància de repetició al voltant dels 30 nm, sovint confoses amb protofilaments.

La característica més important de les fibres WL és que segueixen una cinètica de fibril·lació independent de nucleació, pel que la seva elongació és ràpida i lineal, en la qual hi ha una directe associació dels monòmers per a formar la fibra (Figura I. 9).



**Figura I. 9. Model de competència entre via d'agregació amiloide i via WL.** Les fibres WL es formen seguint un procés independent de nucleació, favorable cinèticament, i passant per un estat inicial identificat com a fibres *Rod-like* (RL). En competència per els mateixos monòmers, es troben les fibres amiloides, dependents de nucleació, i favorables termodinàmicament. Les imatges preses mitjançant microscòpia d'AFM, mostra les característiques diferencials entre tots dos tipus d'agregats-β. *Figura adaptada de Jhan, T.R. & Radford, S.E. (2008).*

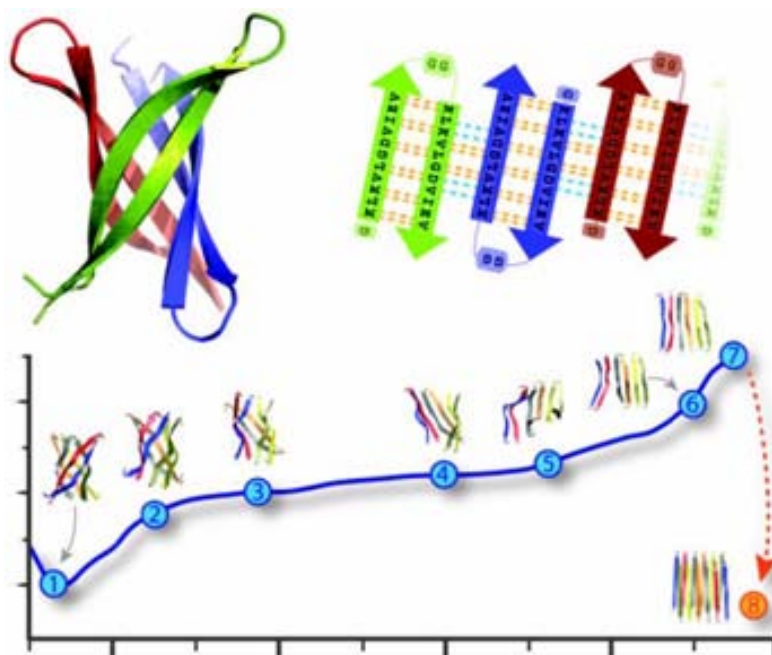
Una altra particularitat de les fibres WL és que, sovint, tenen caràcter reversible, fet que pot anar lligat la conservació de gran part de la fulla-β nativa, a diferència de les fibres amiloides, les quals pateixen una important reorganització de l'estructura



secundària, caient en mínims energètics irreversibles. La manca de nucleació de les fibres WL resulta amb una fibril·lació molt més ràpida que l'amiloide. *In vitro*, la via WL inhibeix la formació amiloide, ja que competeixen per captar estats monomèrics. Tot plegat indica que les fibres WL són espècies estabilitzades cinèticament, mentre que les amiloides ho són termodinàmicament (Kad et al. 2003, Gosal et al. 2005).

**2.4. Oligòmers solubles.**

A diferència de les fibres amiloides, poc és sabut sobre les característiques estructurals dels oligòmers, degut a que són espècies meta-estables, poblades transitòriament durant la via de fibril·lació, i que adopten diverses morfologies. Recentment s'ha aconseguit les primeres cristal·litzacions d'espècies oligomèriques, i per Dinàmica Molecular s'ha simulat la reorganització estructural que pateixen els oligòmers, ajudant a entendre el pas de la via de plegament natiu a la d'agregació amiloide (Figura I. 10). (Ahmed et al. 2010, Laganowsky et al. 2012, Neudecker et al. 2012).



**Figura I. 10. Estructura cristal·lina de l'oligòmer K11V-TR i formació amiloide.** L'estructura cristal·lina del oligòmer cilíndric K11V-TR és formada per tres fulls-beta (blau, verd, vermell), estabilitzades per ponts d'hidrogen, que adopten una conformació en barril-beta cilíndric. La simulació, per Dinàmica Molecular, de la transició estructural cap a la formació amiloide mostra un trencament inicial de la interfície (punts 2 i 3), seguidament el cilindre es desplega per la completa dissociació dels ponts d'hidrogen febles (punts 4 i 5), mentre que les interaccions fortes es mantenen (punt 6). Finalment, les formes esteses en fulla-beta antiparalela

(punt 7) s'associen i cauen en un mínim energètic més baix que l'estat inicial. *Figura adaptada de Laganowsky, A. (2012).*

És necessari un cert grau de desplegament i flexibilitat dels precursors amiloides per a reorganitzar-se en estructures fibril·lars en fulla- $\beta$  creuada, així com una elevada hidrofobicitat i un càrrega neta petita (Uversky, Fink 2004, Fandrich 2012, Stefani 2012). Igual que les fibres, els oligòmers solubles també uneixen els fluoròfors Congo Red i ThT (Maezawa et al. 2008).

Degut al polimorfisme de les espècies oligomèriques, resulta difícil descriure'ls de forma genèrica. Depenent del tipus de cadena polipeptídica, o fins hi tot del protocol de oligomerització utilitzat *in vitro*, s'han detectat diferents tipus d'oligòmers. A nivell d'estructura secundària, existeixen oligòmers rics en estructura- $\beta$  i d'altres d'estructura secundària irregular. Sembla a ser que el polimorfisme dels oligòmers és troba relacionat amb el seu potencial citotòxic, així com amb la tendència a formar fibres amiloides (Fandrich 2012). Seguint les evidències de que existeixen múltiples vies d'agregació en competència entre elles, els oligòmers es poden considerar intermediaris *on-pathway* o *off-pathway* de la via amiloide, donant lloc, per exemple a fibres WL, tal i com s'ha explicat anteriorment (Gosal et al. 2005, Jahn, Radford 2008, Wu et al. 2010).

#### **2.4.1. Toxicitat dels oligòmers solubles.**

Aproximadament 20 anys enrere, s'entenia que les fibres amiloides eren el factor citotòxic principal en les malalties amiloidogèniques. Avui en dia, és acceptat que les espècies oligomèriques són potencialment més tòxiques que les fibres madures, sobretot pel que fa a malalties neurodegeneratives. Fins i tot, les fibres podrien tenir una finalitat protectora dins les cèl·lules, atrapant oligòmers tòxics, tot i que certs autors les descriuen com a font d'espècies citotòxiques mitjançant la seva fragmentació (Bucciantini et al. 2002). En certes amiloïdosis sistèmiques, però, l'acumulació de fibres segueix sent un fort desencadenant de disfunció orgànica (Fandrich 2012).

Els intermediaris oligomèrics exerceixen efectes importants sobre la viabilitat i el metabolisme cel·lular. Els oligòmers interaccionen amb regions d'elevada càrrega negativa de la membrana lipídica i la desestabilitzen, de forma que es modifica la permeabilitat cel·lular, perjudicant les proteïnes de membrana i vies de senyalització (Hou et al. 2005). La composició i rigidesa de la membrana lipídica juga un paper important en la interacció i internalització de les formes oligomèriques, concretament que siguin pobres o riques en colesterol les fa més o menys vulnerables, respectivament (Stefani 2012). La hipòtesi dels canals de membrana proposa que els agregats tòxics formen porus inespecífics a la membrana cel·lular, alterant condicions cel·lulars fonamentals, com ara els nivells de  $\text{Ca}^{2+}$

o l'equilibri redox i, finalment, provocant apoptosi mitjançada per caspases, estrès oxidatiu, i disfunció mitocondrial (Fandrich 2012, Stefani 2012). A nivell neurodegeneratiu, la interacció dels oligòmers sobre les membranes plasmàtiques afecta directament a les xarxes neuronals i a la seva plasticitat, ja que s'alteren canals i receptors de membrana importants per a l'homeòstasi de ions, el flux d'informació i respostes neuronals.

En definitiva, la varietat morfològica de les fibres amiloide i l'existència de varies vies amiloidogèniques demostra la complexitat del procés d'agregació en fulla- $\beta$ . Encara està per clarificar com les característiques moleculars del precursor monomèric i les diferents rutes cinètiques influencien sobre la reacció d'assemblatge *in vivo* i la morfologia final de la fibra, així com la possibilitat d'interconversió entre diferents vies amiloidogèniques. A més, s'ha de tenir en compte el potencial tòxic de cada una d'aquestes varietats amiloides, com es troben representades a les diferents patologies amiloidogèniques, i l'efecte que tenen en cada una d'elles.



### 3. AMILOÏDOSI O MALALTIES AMILOIDOGÈNIQUES.

En humans, les amiloïdosis, o malalties amiloidogèniques, són el conjunt de patologies conformacionals relacionades amb un incorrecte plegament proteic, totes elles associades a l'acumulació de fibres amiloides insolubles a diferents òrgans o teixits cel·lulars, causant la mort cel·lular i la disfunció orgànica. Les malalties amiloidogèniques són un grup molt heterogeni que deriven de fins a 27 proteïnes diferents (Taula 1). Tot i que l'estructura i funció de la forma nativa de cada una d'elles és diferent, totes comparteixen el mateix patró amiloide en fulla- $\beta$  creuada (Blancas-Mejia, Ramirez-Alvarado 2013).

Clínicament, les amiloïdosis poden dividir-se en dos grans grups en funció de si la proteïna precursora és expressada i secretada al mateix o a diferent lloc de la seva deposició amiloide: les amiloïdosis locals i les amiloïdosis sistèmiques.

Les amiloïdosis sistèmiques afecten a diferents òrgans (cor, ronyó, fetge, nervis perifèrics, tracte intestinal, etc.) i són causades per una gran varietat de proteïnes precursoras. Totes elles coincideixen en que la proteïna precursora és expressada i secretada en una regió diferent del lloc de deposició, s'acumulen extracel·lularment i, a part dels efectes relacionats a cada un dels òrgans afectats, comparteixen molts símptomes inespecífics, com ara fatiga, debilitat, la pèrdua de pes i de la gana.

Les amiloïdosis locals són les anomenades malalties neurodegeneratives ja que es localitzen al cervell i causen desordres degeneratius progressius, com per exemple l'AD, el Parkinson o la malaltia de Huntington. A diferència de les sistèmiques, la proteïna patogènica és sintetitzada i dipositada a la mateixa regió, i els agregats amiloides poden ser intra- o extracel·lulars.

Un aspecte important que diferencia l'amiloïdosi sistèmica de la local és que la proteïna amiloidogènica sempre és sintetitzada per cèl·lules especialitzades en síntesi i secreció de grans quantitats de proteïna al plasma sanguini, com per exemple les cèl·lules plasmàtiques en el cas de l'Amiloïdosi de cadena lleugera (AL), o els hepatòcits en el cas de la Polineuropatia amiloide familiar (FAP). Cada tipus de cèl·lula secretora té el seu propi mecanisme per actuar sobre proteïnes mal plegades, l'UPR (*Unfolded Protein Response*), produeixen xaperones i elements del proteosoma. A més, el reticle endoplasmàtic juga un paper crucial en el correcte plegament de les proteïnes sintetitzades per aquestes cèl·lules (van Anken, Braakman 2005). La sobreexpressió de proteïna pot arribar a saturar aquests sistemes de reparació, acumulant precursors amiloidogènics. En les amiloïdosis locals, en canvi, les neurones produeixen proteïnes dependent de les seves necessitats funcionals, pèptids o proteïnes de curta durada, i que no requereixen de mecanismes de control de

plegament. Podria entendre's que l'agregació intracel·lular és un mecanisme compensatori de les neurones per aïllar els pèptids mal plegats i no eliminats.

**Taula I. 1. Exemples de malalties humanes amiloidogèniques o amiloïdosi.** Malgrat que esdevenen a partir de proteïnes precursors, amb característiques físico-químiques i un plegament natiu diferent, totes elles donen lloc a la formació de dipòsits amiloides extra o intracel·lulars. Depenent del lloc de síntesi i el lloc de deposició amiloide de la proteïna precursora, es diferencien en amiloïdosis sistèmiques o locals, aquestes últimes són relacionades amb processos neurodegeneratius. *Taula adaptada de Chiti, F. & Dobson, C.M. (2006).*

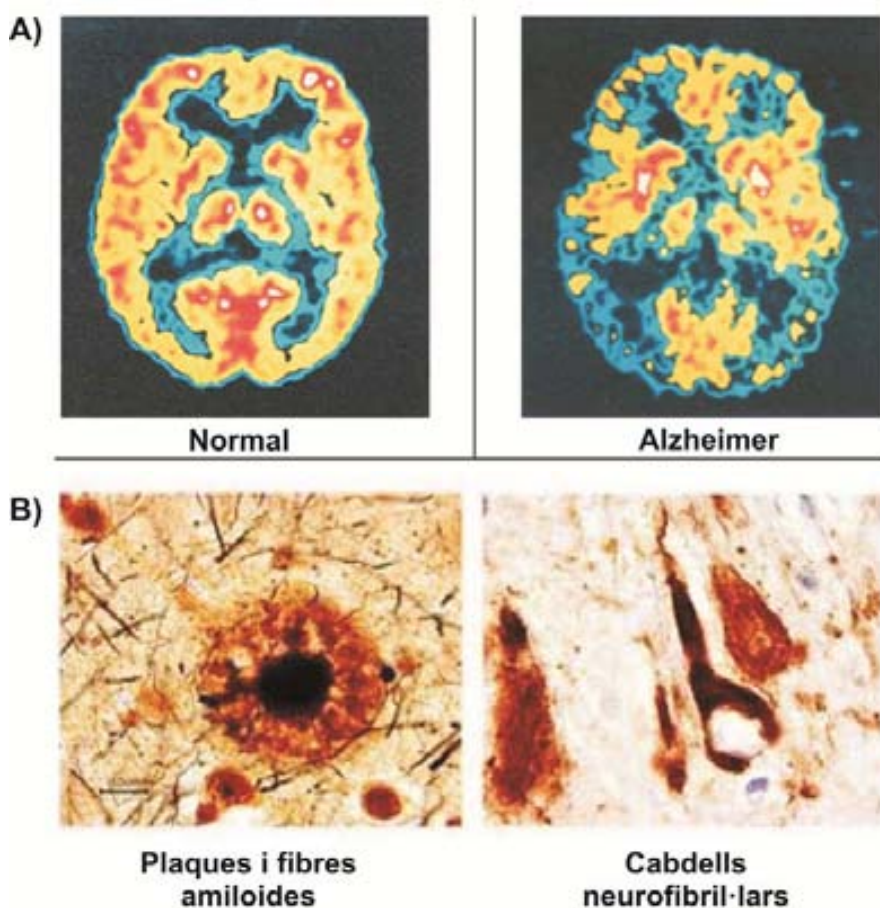
Amiloïdosi	Proteïna precursora	Causa	Òrgans afectats
<b>Amiloïdosis Sistèmiques</b>			
Amiloïdosi de cadena lleugera (AL)	Cadena lleugera d'Ig	Mutació o sobreproducció	Cor, ronyó, fetge
Amiloïdosi de cadena lleugera (AH)	Cadena pesada d'Ig	Associada a Mieloma	Ronyó, fetge Cor, vasos sanguinis, teixits tous
Amiloïdosi senil sistèmica (SSA)	Transtiretina (TTR)	Acumulació	Ronyó, fetge, melsa
Polineuropatia amiloidòtica familiar (FAP)	Transtiretina (TTR)	Mutació hereditària	Articulacions, cor, intestí, pulmó
Amiloïdosi secundària (AA)	Proteïna amiloide A del sèrum	Sobreproducció	Ronyó, fetge, melsa
Amiloïdosi relacionada amb diàlisi (A $\beta_2$ M)	Microglobulina- $\beta_2$	Diàlisi crònica	Ronyó, fetge, melsa
Amiloïdosi del lisozim (ALys)	Lisozim	Mutació Hereditària	Ronyó, cor, fetge
Apo AI amiloïdosi (AApo AI)	Fragment d'Apo AI	Mutació Hereditària	Fetge
Apo AII amiloïdosi (AApo AII)	Fragment d'Apo AII	Mutació Hereditària	Fetge
Apo AIV amiloïdosi (AApo AIV)	Fragment d'Apo AIV	Mutació Hereditària	Fetge
Amiloïdosi del fibrinogen	Cadena- $\alpha$ del fibrinogen	Mutació Hereditària	Fetge
Amiloïdosi de la cistatina	Cistatina- C	Mutació Hereditària	Capil·lars sanguinis
Cataractes	$\gamma$ -Cristal·lina		
<b>Amiloïdosis Locals o Neurodegeneratives</b>			
Malaltia d'AD	Pèptid A $\beta$ (1-40, 1-42)	Errors en processos proteolítics	SNC
Malaltia del Parkinson	$\alpha$ -Sinucleïna		SNC
Malaltia de Huntington	Huntingtina	Mutació Genètica	SNC
Amiloïdosi familiar	Transtiretina (TTR)	Mutació Hereditària	SNC
Atàxia espinocerebel·lar	Ataxina-3	Mutació Genètica	SNC
Síndrome de Creutzfeldt-Jacob	Proteïna priònica (PrP)	Propagació de canvis conformacionals no natus	SNC

Les amiloïdosis són complicades d'estudiar i diagnosticar ja que sovint involucren diferents òrgans, en el cas de les sistèmiques, i alguns símptomes poden passar fàcilment desapercibuts o no diagnòstics fins ja avançada la patologia. En els darrers anys, s'ha avançat molt en l'estudi dels mecanismes moleculars patogènics, de forma que s'ha pogut millorar tant el diagnòstic precoç, com els tractaments terapèutics, obtenint un pronòstic més favorable per als pacients de moltes amiloïdosis. Tot i això, malgrat les noves teràpies emergents i esperançadores, sobretot en el camp de la immunoteràpia, encara cal aprofundir en molts aspectes d'aquestes malalties. Caldria buscar una visió més global que destapi nous mecanismes interconnectats tan a nivell local i molecular, com fisiològic, ambientalment, fins i tot emocional del pacient, per tal d'assolir el nivell de complexitat de l'organisme humà i de l'amiloïdosi, i així aspirar, en un futur, a uns tractaments curatius i amb uns efectes secundaris, si en tenen, que no limitin l'esperança ni la qualitat de vida dels pacients tractats.

### 3.1. Malaltia d'Alzheimer.

La malaltia d'Alzheimer (AD) va ser descrita per primer cop l'any 1906 pel metge alemany Alois Alzheimer i, actualment és la malaltia neurodegenerativa més comuna mundialment, afectant a més de 35 milions de persones a tot el món, i representant el 70 % del casos de demència. Segons l'Informe Mundial sobre l'AD, s'espera que en els propers 40 anys augmentin els casos dràsticament, sobretot en els països en desenvolupament, arribant als 115 milions el 2050 (Wimo, Prince 2010). Amb la excepció dels pocs casos d'AD familiar detectats en individus menors de 60 anys, la prevalença de la malaltia augmenta amb l'edat, afectant al 40% de la població major de 85 anys. Per aquestes raons, actualment l'estudi del AD esdevé una necessitat primordial, juntament amb el càncer.

L'AD consisteix en un desordre neurodegeneratiu i progressiu que es caracteritza per la pèrdua de memòria i capacitats cognitives (Figura I. 11-A). A nivell anatòmic, s'observa una important atròfia cerebral i, fisiològicament, es relaciona amb la presència d'agregats insolubles extracel·lulars (les fibres amiloïdes) i intracel·lulars (els cabdells neurofibril·lars), formats majoritàriament pel pèptid  $A\beta_{1-42}$  i la proteïna Tau hiperfosforil·lada, respectivament (Figura I. 11-B) (Solomon 2006). La patologia de l'AD és complexa i segueix un mecanisme que encara, avui en dia, està per definir. Tot i això, la gran quantitat d'estudis realitzats fins ara fan evident que l'agregació del pèptid- $A\beta$  és el procés desencadenant de deposició amiloide i la progressiva neurodegeneració (Arbel, Solomon 2007).



**Figura I. 11. Reducció d'activitat cerebral i depòsits fibril·lars en l'AD.** A) Imatges adquirides per tomografia d'emissió d'electrons (PiB-PET). La imatge de l'esquerra correspon a un cervell sa, mentre que el de la dreta a un cervell afectat d'AD. Les àrees blaves i negres a la imatge de la dreta indiquen una reducció de l'activitat cerebral degut a la malaltia. B) Imatges obtingudes per microscòpia electrònica de plaques amiloides i cabdells neurofibril·lars presents al cervell de pacients d'AD. *Imatges extretes de coloradodementia.org.*

### 3.1.1. Proteïna precursora amiloide, APP.

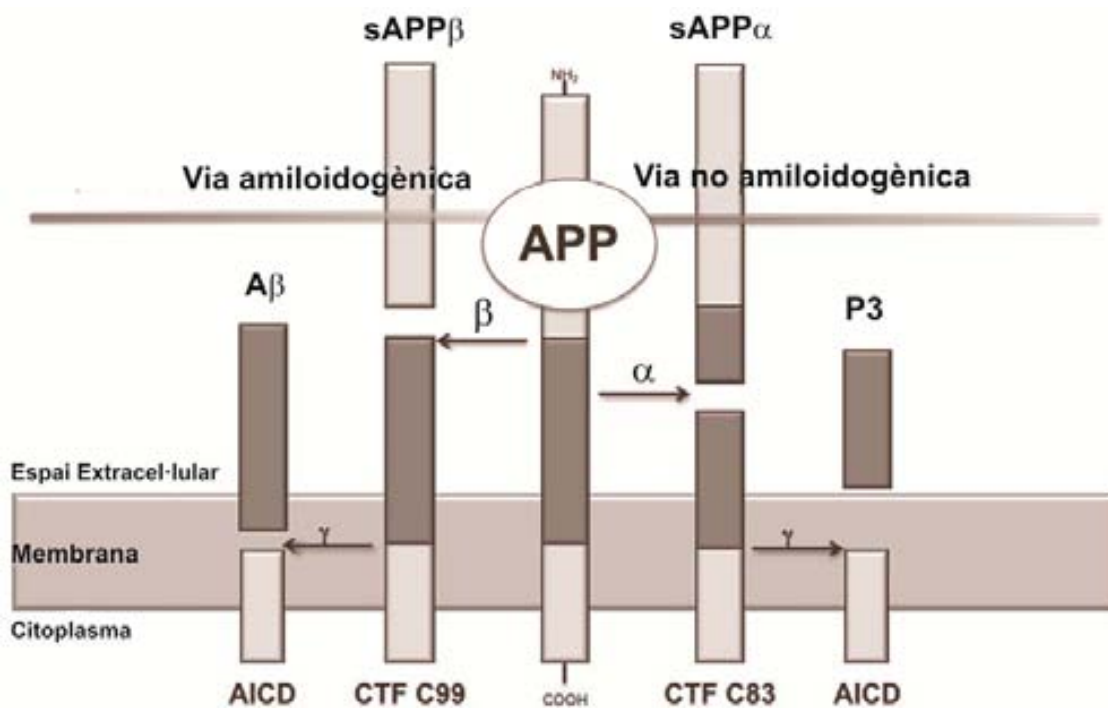
El pèptid A $\beta$  resulta del processament proteolític de la proteïna APP, la proteïna precursora amiloide. L'APP és una glicoproteïna de membrana, de 695-770 residus, dependent del procés de modificació post-transcripcional que pateix abans de la seva síntesi, i actua com a receptor tant en cèl·lules neuronals com no neuronals. El seu extrem C-terminal es troba en el citoplasma, mentre que l'extrem N-terminal es localitza cap l'exterior cel·lular. La seva funció biològica segueix desconeguda, tot i que es creu que pot estar relacionada amb l'adhesió cel·lular, la plasticitat neuronal, així com també la de sensor de concentració de colesterol a les cèl·lules neuronals (Beel et al. 2008).

L'APP es processada específicament pels enzims anomenats secretases. Tal i com mostra la figura I. 12, dependent de l'acció dels tres tipus de secretases ( $\alpha$ ,  $\beta$  i  $\gamma$ ), existeixen dues vies de processament (Haass, Selkoe 2007):



- Via no amiloidogènica. En condicions normals, i la més freqüent, l'α-secretasa allibera el fragment extracel·lular soluble sAPPα. Posteriorment, la γ-secretasa (o PSEN) processa la part encara integrada a la membrana, alliberant el pèptid P3 i el domini AICD (*APP Intracellular C-terminal Domain*) cap al citosol.
- Via amiloidogènica. En condicions patològiques, enlloc de l'α-secretasa, actua la β-secretasa, generant el fragment extracel·lular sAPPβ. Llavors, el tall de la γ-secretasa genera el pèptid Aβ i el domini AICD.

El lloc de tall de la γ-secretasa és variable, i pot donar-se després del aminoàcid 38, 40 i 42, generant pèptids de diferent grandària i hidrofobicitat. Aquest punt de tall és especialment rellevant per a la subseqüent tendència a l'agregació del pèptid Aβ, sent l'1-42 el més amiloidogènic.



**Figura I. 12. Tall proteolític de la proteïna APP i formació del pèptid Aβ.** L'APP és la proteïna precursora del pèptid amiloide. Depenent de l'acció de proteases específiques, la seva proteòlisis donarà lloc a la via amiloidogènica. L'acció de l'α-secretasa evita la formació del pèptid amiloide, alliberant el pèptid P3 i AICD, mentre que quan l'APP és tallada per la β-secretasa, i posteriorment per la γ-secretasa, s'allibera a l'espai extracel·lular el pèptid Aβ. *Figura adaptada de Saraceno, C. (2013).*

Mutacions hereditàries en els gens APP i PSEN, són les responsables de l'AD familiar. És interessant citar que el gen APP es troba al cromosoma 21, fet que explica perquè els individus amb Síndrome de Down manifesten AD de manera precoç.

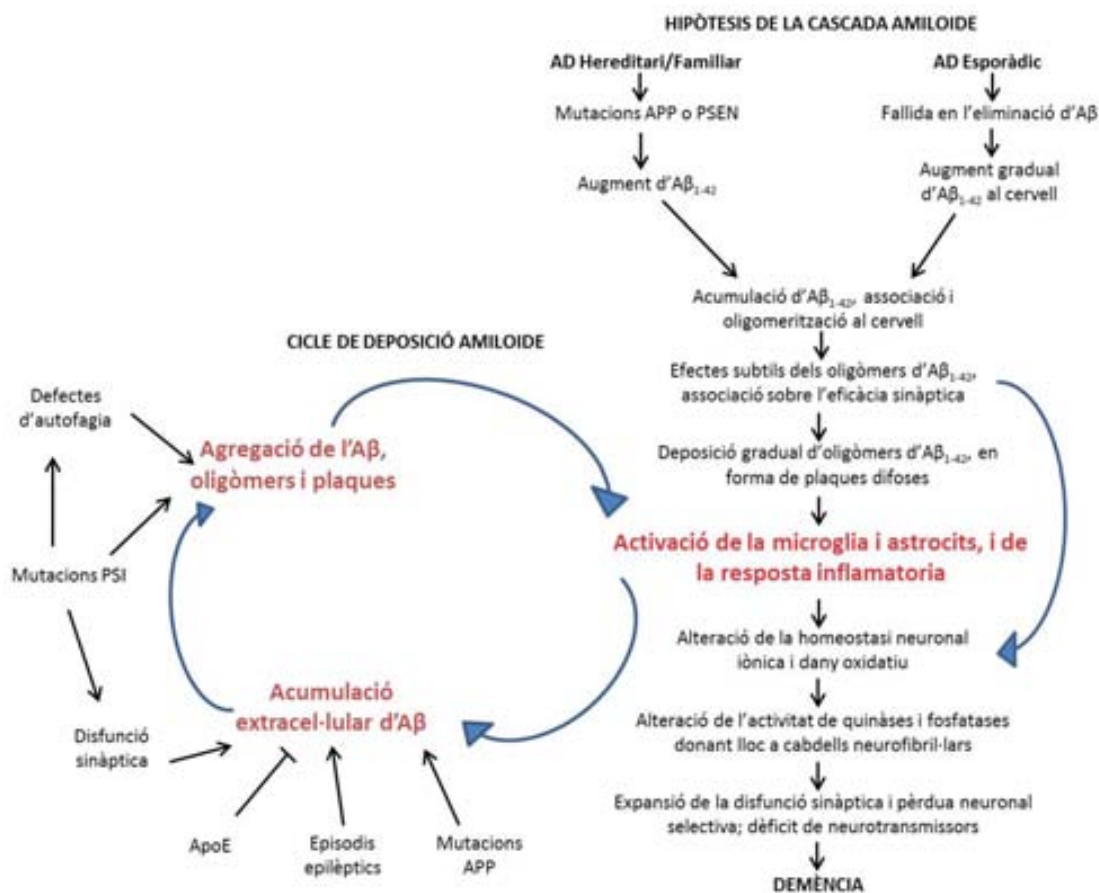
De forma natural, en el líquid cerebrospinal humà i en el plasma d'individus sans, hi són presents anticossos contra el pèptid  $A\beta_{39-42}$ , els nivells dels quals, però, es redueixen significativament en pacients d'AD, suggerint que la patologia pot tenir una base immunodeficient (Solomon 2009).

### **3.1.2. Hipòtesi de la cascada amiloide.**

La hipòtesi més acceptada actualment és la cascada amiloide (Figura I. 13), la qual s'inicia amb una sobreexpressió del pèptid  $A\beta$ , sobretot la forma  $A\beta_{1-42}$ , on la seva incapacitat d'eliminar-lo, donaria lloc a l'auto-associació progressiva en espècies oligomèriques, provocant l'increment de la resposta inflamatòria i del efecte degeneratiu sobre les cèl·lules neuronals, i la deposició final en forma de fibres amiloides i cabdells neurofibril·lars característics de la demència (Solomon 2006, Haass, Selkoe 2007).

Recentment, s'ha definit una nova visió de la etiopatologia de l'AD, la qual integra la cascada amiloide dins del que s'entén per cycle de deposició amiloide (Figura I. 13), ja que per el que podríem dir retroalimentació, l'agregació del pèptid- $A\beta$  estimula la resposta inflamatòria, i aquesta estimula l'agregació del pèptid- $A\beta$ . Aquesta nova visió vincula fortament l'agregació amiloide amb les forces que desencadenen la demència (Herrup 2010, Stefani 2012).

Igual que per la gran majoria de malalties amiloidogèniques, anys enrere s'assumien els agregats insolubles d' $A\beta$  com els causants de la pèrdua de sinapsis i mort cel·lular, ja que creaven una barrera física al voltant de les cèl·lules, bloquejant l'intercanvi de nutrients, i atraient els macròfags (Lorenzo, Yankner 1994). Un del primers indicis que posava en qüestió la toxicitat de les fibres amiloides va ser la localització, al còrtex cerebral, d'espècies monomèriques, dimèriques i trímers d' $A\beta$ , tan solubles com insolubles, i la forta correlació entre les formes solubles i la densitat de plaques amiloides i de cabells neurofibril·lars (McLean et al. 1999). Més tard, es van separar les diferents espècies de pèptid, monòmer i oligòmer (dímer i trímer), i es van injectar a ratolins model d'AD (Lorenzo, Yankner 1994, McLean et al. 1999, Dodart et al. 2002). Es va demostrar que els dèficits cognitius es troben directament relacionats amb la concentració d'espècies oligomèriques solubles del pèptid  $A\beta$ , no amb les monomèriques ni amb les fibril·lars, tal i com s'havia pensat fins el moment (Dodart et al. 2002).



**Figura I. 13. Esquema de la hipòtesis de la cascada amiloide acoblada al cicle de deposició amiloide.** Tan la l'AD familiar com l'espòrdic donen lloc a la sobreproducció del pèptid Aβ, un cop aquesta espècie tòxica comença a agregar, es desencadena la cascada de processos que produeixen els símptomes biològics i neurològics del AD. L'activació de la resposta inflammatòria forma part del cicle de deposició amiloide, i connecta tots dos processos. Tot i que són processos independents, el l'AD es troben connectats i retroalimentats positivament. *Figura adaptada de Herrup, K. (2010).*

### 3.1.3. Immunoteràpia contra l'Aβ.

Fins avui en dia i encara segueix, s'han investigat moltes estratègies de tractament contra l'AD, com ara, la inhibició dels enzims β i γ-secretases, la reducció d'agregat amiloide, l'ús de pèptids trencadors de l'estructura en fulla-β (*β-breakers*), l'alliberació d'Aβ del cervell o la disminució de la inflamació associada als depòsits d'Aβ (Schenk 2002). Però sembla a ser que la immunoteràpia és l'estratègia més esperançadora i la que està guanyant més força en els darrers anys, de tal manera, que varies vacunes amb anticossos monoclonals han arribat fins a fases clíniques avançades.

La primera demostració *in vivo* de que la immunoteràpia anti-Aβ era efectiva es va realitzar en ratolins transgènics PDAPP, el 1999. La immunització activa, administrant el

pèptid A $\beta$ , reduïa dràsticament la deposició en còrtex i hipocamp, les dues regions principals d'acumulació del pèptid (Schenk et al. 1999).

Pel que fa a la immunització passiva, l'administració d'anticossos monoclonals (mAb) específics contra l'A $\beta$ , en absència d'activació de la resposta cel·lular, també reverteix la pèrdua de memòria en ratolins PDAPP. En aquest cas però, l'anticòs uneix específicament el pèptid A $\beta$  soluble, enlloc de l'agregat insoluble. A més, no només uneix A $\beta$  cerebral, sinó que també reconeix A $\beta$  soluble en plasma i, a nivells més baixos, en el líquid cerebrospinal d'animals immunitzats (Mohajeri et al. 2002).

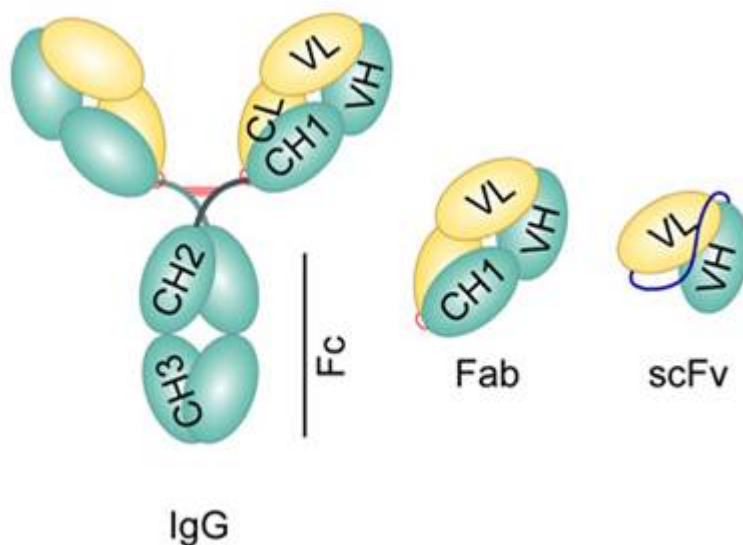
Després dels resultats obtinguts en ratolins model, es va prosseguir a iniciar les fases clíniques en humans. Tot i les bones expectatives, la prova d'immunització activa AN-1792 (*Ellan Pharmaceuticals*) va ser parada l'any 2002 en fase clínica IIa degut als símptomes de meningoencefalitis asèptica en el 6 % dels casos (Nicoll et al. 2003). L'anàlisi *post-mortem*, però, va demostrar la reducció de fibres amiloides al cervell dels pacients (Schenk 2002, Hock et al. 2003). A part de la meningoencefalitis, un altre dels efectes secundaris d'administrar l'mAb sencer, és que agreuja la angiopatia amiloide cerebral (CAA), un trastorn dels vasos sanguinis del SNC caracteritzada pel depòsit de material  $\beta$ -amiloide sobre les parets dels vasos (Pfeifer et al. 2002). A part de que la regió constant (Fc) de l'anticòs podria ser la responsable d'activar la resposta complement donant lloc a la neuroinflamació i microhemorràgia, el coadjuvant utilitzat al assaig no era el més adient.

Després de nombrosos estudis per a prevenir els efectes secundaris no desitjats, les proves clíniques que més han avançat són les de la vacuna ACC-001, que consisteix en un derivat del pèptid A $\beta$ , i les del anticòs AAB-001, o Bapineuzumab, un anticòs mAb murí dirigit contra els residus 1-5 de l'extrem N-terminal del pèptid A $\beta$  (mAb-h3D6), el qual és específic dels oligòmers d'A $\beta$  (Jacobsen 2006, Wisniewski, Konietzko 2008, Nitsch, Hock 2008). Malgrat les grans expectatives, aquest últim tractament ha estat aturat en fase clínica III, degut a resultats inesperats (Thomas 2012). En fase clínica II, els efectes adversos del Bapineuzumab han estat lleus i transitoris, però han causat edema vasogènic (Rinne et al. 2010). Aquest efecte s'ha relacionat amb la dosi de fàrmac, i la majoria dels casos corresponien a portadors del l'al·lel *APOE4*. Desafortunadament, les restriccions de dosi i el reclutament de pacients amb l'al·lel *APOE3* no han estat suficients per a seguir amb la fase III (Thomas 2012). Cal mencionar que aquestes proves han estat realitzades en pacients amb un diagnòstic de la malaltia massa avançat, tal i com reivindica la revista *World AD Report 2011* (Prince, Bryce & Ferri 2011).

### 3.1.3.1. Fragments recombinants derivats d'anticossos, scFv.

Actualment, la immunització passiva amb fragments variables de cadena senzilla (*single-chain variable Fragment*, scFv), és a dir, anticossos mancats de la regió Fc (Figura I. 14), resulta ser una estratègia terapèutica molt esperançadora per a la malaltia d'AD, ja que no activen la micròglia, no produeixen hemorràgia cerebral, ni edema vasogènic, i han mostrat ser tan potents i específics com els mAb dels qual deriven (Fukuchi et al. 2006, Zameer et al. 2008, Robert et al. 2009).

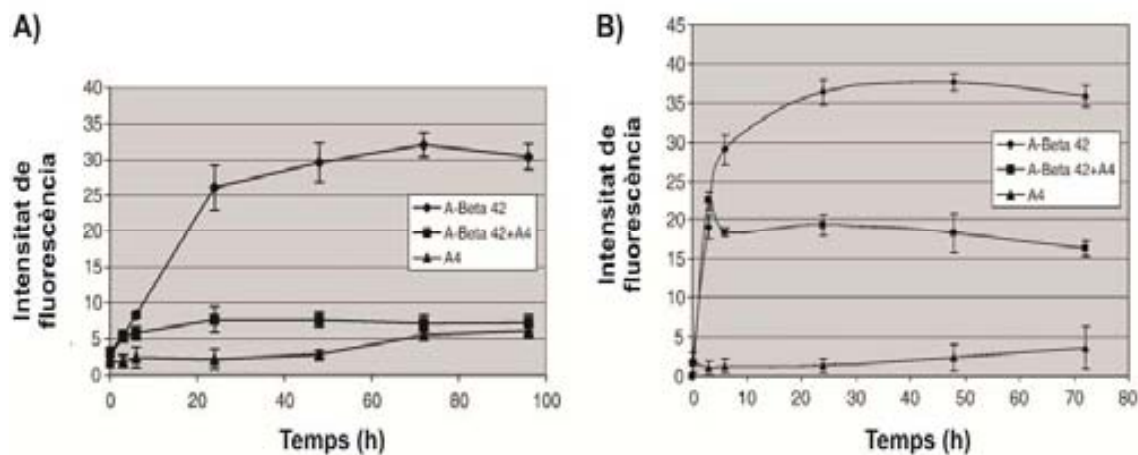
Els fragment d'unió a l'antigen d'Ig (Fab, *antigen-binding Fragment*), també estan agafant força com a possible immunoteràpia contra l'AD (Figura I. 14). En comparació amb els scFv, tenen una menor eficiència d'expressió en *E. coli* degut a que tenen doble de pes molecular i que les dues cadenes polipeptídiques es troben unides per un pont disulfur, fet que dificulta el seu plegament cap a l'estat natiu. A més, tenen tendència a formar homodímers entre les cadenes lleugeres (LC), coneguts coma proteïnes Bence-Jones. Malgrat això, els Fab, presenten una major estabilitat i afinitat que els scFv, que tendeixen a formar agregats i són relativament inestables a llarg termini (Hust et al. 2007).



**Figura I. 14. Esquema dels dominis d'Ig i variants recombinants** S'hi representa un anticòs sencer (IgG), el fragment d'unió a l'antigen (Fab) i el fragment variable de cadena senzilla (scFv). CH, cadena constant i pesada; CL, cadena constant i lleugera; VH, cadena variable i pesada; VL, cadena variable i lleugera. *Imatge extreta de [www.aapsj.org](http://www.aapsj.org).*

L'estratègia dels scFv ha agafat força al demostrar que la part Fc de l'anticòs no és necessària quan la diana antigènica són els oligòmers d'A $\beta$  solubles. A més, mostren major afinitat per als oligòmers d'A $\beta$ <sub>1-42</sub>, i són capaços d' inhibir totalment l'agregació de l'A $\beta$ <sub>1-42</sub>

(Figura I. 15-A). A més, tenen capacitat de desfer, almenys fins la meitat, la càrrega de fibres ja formades (Figura I. 15-B), entenent que l'scFv també seria específic per als agregats inicials encara solubles (Bacsikai et al. 2002, Zameer et al. 2008).



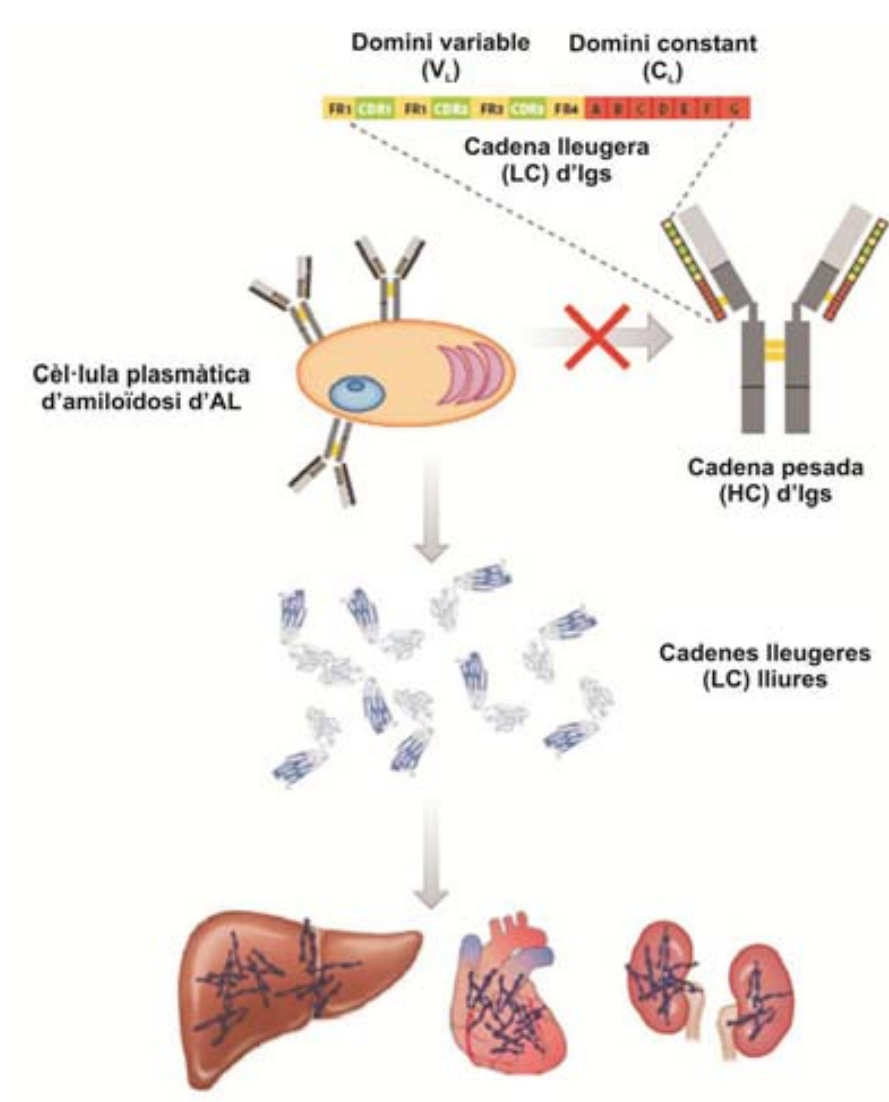
**Figura I. 15. Cinètica d'agregació del pèptid Aβ<sub>1-42</sub>.** La cinètica ha estat mesurada per intensitat de fluorescència del fluoròfor ThT (excitació a 450 nm i emissió a 482 nm), en presència o absència de l'scFv-A4. A) Co-incubació Aβ<sub>1-42</sub>+scFv-A4. B) Efecte de l'scFv en mostra pre-agregada. *Adaptada de Zameer, A. (2008).*

En resum, les principals avantatges dels fragment d'anticossos scFv com a futura estratègia terapèutica contra l'AD són, entre d'altres:

- La manca de la regió Fc evita l'activació de la resposta inflamatòria que es dona amb els anticossos sencers.
- Mantenen una afinitat per al antigen equiparable als anticossos sencers.
- Els gens dels scFv poden ser manipulats de forma racional per a millorar l'especificitat i afinitat per als oligòmers solubles d'Aβ.
- Són molt més petits que els anticossos convencionals i, a banda de mostrar una millor farmacocinètica, poden ser modificats per a facilitar el seu pas per la barrera hematoencefàlica, o bé, ser internalitzats en nanopartícules capaces de superar-la (Gomez, Di Mauro 2012).

### 3.2. Amiloïdosi de Cadena Lleugera.

L'amiloïdosi de cadena lleugera (AL) és una de les amiloïdosis sistèmiques humanes més complexes, on la proteïna precursora és la cadena lleugera (LC) d'immunoglobulines (Ig). L'AL és l'amiloïdosi sistèmica més comuna en el món occidental, amb una incidència de 10 pacients per milió per any. La majoria d'afectats són majors de 45 anys i la mitja es troba a l'edat de 67 anys, amb una mitjana de supervivència d'entre 12-40 mesos després de ser diagnosticada (Blancas-Mejia, Ramirez-Alvarado 2013).



**Figura I. 16. Amiloïdosi de cadena lleugera (AL).** Les cèl·lules plasmàtiques són les encarregades de secretar al plasma tetràmers d'immunoglobulines (Igs) formats per dues cadenes pesades (HC) i dues cadenes lleugeres (LC) idèntiques unides per ponts disulfur. En condicions patològiques, es dona una secreció aberrant de cadenes lleugeres (LC), per part de cèl·lules plasmàtiques, donant lloc a la deposició de dímers de LCs en òrgans vitals. *Figura adaptada de Blancas-Mejía, L.M. & Ramírez-Alvarado, M. (2013).*

L'AL és causada per una anormal proliferació de cèl·lules plasmàtiques monoclonals del moll de l'os, que alliberen una gran quantitat de LCs lliures en circulació, sovint formant dímers de LCs (proteïnes Bence-Jones). A diferència de l'AH (amiloïdosi de cadena pesada), no existeix una evident relació amb processos tumorals com ara el mieloma múltiple. Aquestes cadenes agreguen formant fibres amiloides a l'espai extracel·lular de diferents òrgans, sobretot ronyons, cor, fetge, tracte gastrointestinal i nervis perifèrics, provocant la seva fallida (Figura I. 16). Els tractaments actuals específics contra l'amiloïdosi AL no són curatius (Ramirez-Alvarado 2012). La presència de LCs lliures al sèrum i/o orina és freqüent en individus majors de 50 anys, però tan sols un baix nombre desencadenarà l'AL. La deposició amiloide és conseqüència de les propietats estructurals i biofísiques de la proteïna amiloidogènica i de l'entorn fisiològic del teixit implicat (Ramírez-Alvarado, Kelly & Dobson 2010)

### **3.2.1. Variabilitat de seqüència de les LC i amiloidogènesi.**

La gran variabilitat de seqüència de les LCs s'obté per recombinació aleatòria de fragments de gens germinals d'Ig: els gens IgV, IgJ i IgC, i per hipermutacions somàtiques, conservades i no-conservades, que milloren l'afinitat per l'antigen. En funció de la recombinació d'aquests gens, existeixen dos tipus de LCs:  $\kappa$ LCs i  $\lambda$ LCs. Estudis comparatius, revelen que les seqüències germinals  $\kappa$ I,  $\lambda$ 1,  $\lambda$ II,  $\lambda$ III, i  $\lambda$ VI (especialment les línies  $\kappa$ I O18/O8 i  $\lambda$ VIa) es troben més representades en pacients d'amiloïdosi AL, contenen més mutacions no conservatives i són intrínsecament més propenses a l'agregació que les seqüències d'LCs normals (Comenzo et al. 2001, Abraham et al. 2003). La combinació de gens i mutacions fan que cada pacient d'AL presenti una única seqüència proteica amb diferent tendència a formar fibres amiloides, que es dipositaran en òrgans diferents, variant el rang de severitat de la malaltia, fet que complica el diagnòstic i el posterior tractament. (Ramirez-Alvarado 2012).

S'han realitzat molts estudis amb l'objectiu de trobar patrons de mutació comuns entre el gran nombre de seqüències d'AL, així com característiques estructurals que impliquin més o menys tendència amiloidogènica (Stevens 2000). Tot i ser molt útil, l'anàlisi de seqüència no resulta suficient. Un exemple seria la proteïna Jto, de pacient de mieloma múltiple, que conté una seqüència quasi idèntica a la proteïna Wil, de pacient d'AL. Totes dues deriven de la mateixa línia germinal  $\lambda$ VI, però la primera no causa disfunció orgànica ni agregats amiloides, tal i com ho fa la amiloidogènica Wil (Wall et al. 1999).



Sembla a ser que, enlloc del nombre de mutacions, seria la seva localització respecte la seqüència germinal i com afecten al plegament de la proteïna, el que podria ajudar a entendre els determinants amiloidogènics i fer pronòstic avançat de l'evolució de la malaltia (Poshusta et al. 2009).

### **3.2.2. Estabilitat i agregació de les cadenes LC.**

Per a les proteïnes en general, ha estat demostrat que no hi ha una correlació directa entre la pèrdua d'estabilitat i una major tendència a l'agregació (Cerdeja-Costa et al. 2009). Tot i això, estudis inicials d'estabilitat termodinàmica de LC implicades en AL, apunten cap a una correlació entre mutacions no conservades, desestabilització del estat natiu i augment de la capacitat amiloidogènica (Hurle et al. 1994, Stevens et al. 1995). A més, tots ells coincideixen en que la majoria de LCs segueixen una transició de equilibri plegat-desplegat de dos estats depenent de nucleació i reversible, en la que s'acumula un intermediari cinètic parcialment desplegat, capaç de desviar la via de desplegament cap a l'amiloide (Wall et al. 1999, Qin et al. 2007, Blancas-Mejia et al. 2009).

Aquest intermediari cinètic és considerat el precursor de la via amiloide, ja que és capaç d'adoptar una estructura no nativa rica en fulla- $\beta$ , autoassociar-se i, finalment, formar fibres  $\beta$ -amiloides. (Blancas-Mejia, Ramirez-Alvarado 2013). És interessant citar que Khurana et al. van descriure la presència, depenent de les condicions, de dos tipus d'intermediaris cinètics diferents: l'intermediari natiu ( $I_N$ ) que seria precursor d'agregats amorfs, i l'intermediari desplegat ( $I_U$ ) que promouria la via amiloide. Caldria però, aprofundir més en les cinètiques de formació i d'equilibri conformacional d'aquests dos estats (Khurana et al. 2001).

És sabut que les fibres amiloides no es formen sota condicions que afavoreixen l'estat natiu o el totalment desplegat. Això suggereix que, a condicions fisiològiques, és necessari que es donin canvis conformacionals de l'estat natiu per poder entrar a la via amiloide (Blancas-Mejia et al. 2009). Per tant, es dedueix que certes mutacions somàtiques afecten directament a la conformació nativa de la proteïna, i afavoreixen l'estabilització del estat intermediari, fent que la proteïna adquireixi un alt potencial amiloidogènic.

### **3.2.3. Determinants estructurals de les proteïnes LCs amiloidogèniques.**

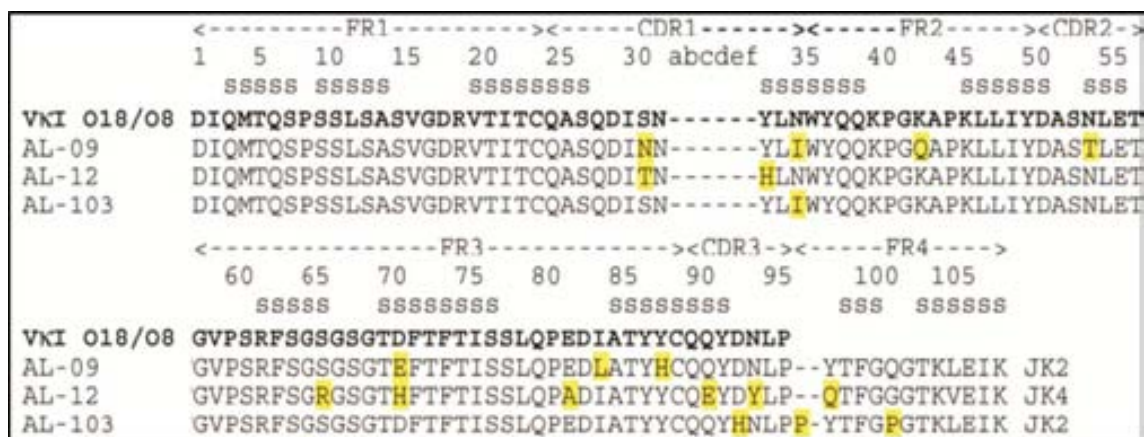
$\kappa$ I O18/O8 i  $\lambda$ 6a són les dues línies germinals més abundants en pacients d'AL. Totes dues tendeixen intrínsecament a formar fibres amiloides i presenten una estabilitat termodinàmica semblant, tot i que la  $\lambda$ 6a segueix una cinètica de fibril·lació més ràpida que la  $\kappa$ I O18/O8 (Blancas-Mejia, Ramirez-Alvarado 2013). Encara calen més estudis per

explicar perquè aquestes dues línies germinals, i les proteïnes AL derivades d'elles, són més amiloidogèniques que les línies germinals d'Ig de pacients sans.

Partint d'aquesta tendència natural, aquestes dues proteïnes han estat comparades exhaustivament amb les seves corresponents proteïnes AL mutades, amb la finalitat d'entendre la contribució d'una única mutació en l'estructura i l'estabilitat termodinàmica de la proteïna i el perquè aquestes es troben més desestabilitzades respecte la germinal.

Les proteïnes amiloidogèniques AL-09, AL-12 i AL-103 (amb 7, 8 i 4 mutacions, respectivament), comparteixen més d'un 90% d'identitat amb la seva proteïna germinal, κI O18/O8, i totes adopten el plegament canònic de les Igs (Figura I. 17). Tot i això, la proteïna germinal és termodinàmicament més estable i segueix una cinètica de fibril·lació més lenta que les amiloidogèniques (Baden et al. 2008b, Sikkin, Ramirez-Alvarado 2008, Randles et al. 2009). De la mateixa manera succeeix amb la línia germinal λVIa i la proteïna Wil, que en deriva d'aquesta i presenta 11 mutacions somàtiques (del Pozo Yauner et al. 2008).

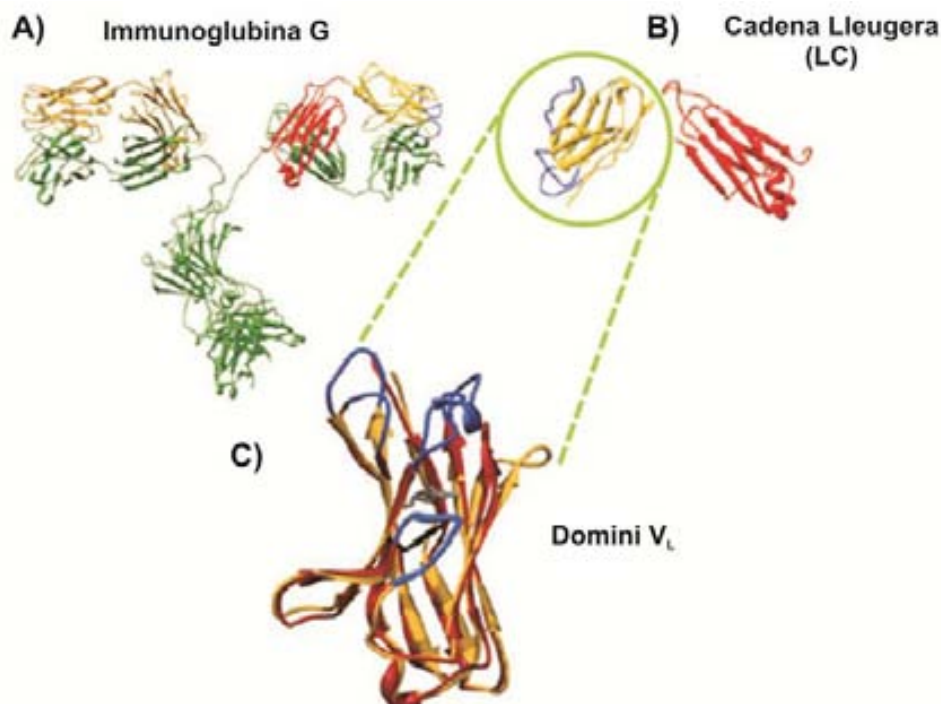
Dins del heterotetràmer d'Igs amb un plegament correcte, el domini V<sub>L</sub> i el domini V<sub>H</sub> es troben units no-covalentment formant una interfície dimèrica amb una estructura terciària i quaternària molt conservada. En el cas d'AL, el 85% del pacients amb AL secreten dímers de LCs lliures en el plasma (proteïnes Bence-Jones), on els dominis V<sub>L</sub>-V<sub>L</sub> s'associen formant la mateixa interfície que els dímers V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub> d'Ig (Novotny, Haber 1985). Per tant, l'estudi d'aquests dominis variables i la seva conformació dimèrica és necessària.



**Figura I. 17. Alineament múltiple de dominis V<sub>L</sub> amiloidogènics i la seva línia germinal κI O18/O8.** L'alineament múltiple respecte la línia germinal κI O18/O8 mostra la diversitat de mutacions somàtiques dins de les seqüències. AL-12 conté 8 mutacions, de les quals 7 no són conservatives, mentre que l'AL-103 conté 4 i totes no conservades, inclosa la inserció de la prolina 95ProIns. L'AL-09 conté 7 mutacions, 3 de les quals no són conservatives. Gran part de les mutacions es localitzen al CDR1 i CDR3, i regions FR. Totes elles segueixen la nomenclatura Kabat (Kabat 1983). S indica fulla-β.

### 3.2.3.1. Interfície dels dímers $V_L$ - $V_L$ i amiloidogènesi.

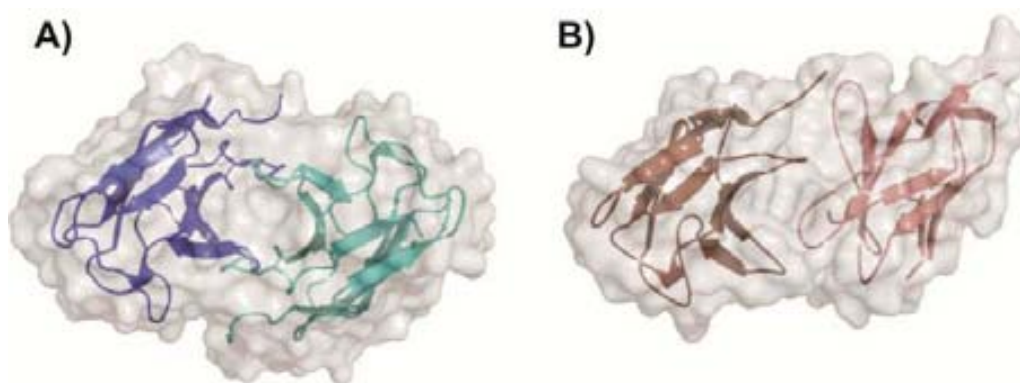
Els dominis  $V_L$  d'Igs adopten un plegament de tipus barril- $\beta$ , format per nou cadenes (A, B, C, C', C'', D, E, F, i G) empaquetades en dues fulles- $\beta$  i unides per un pont disulfur, deixant enterrat el nucli hidrofòbic. Les cadenes B-C, C'-C'' i F-G estan connectades pels *loops* CRD, que es troben exposats a la superfície del domini (Figura I. 18).



**Figura I. 18. Estructura d'immunoglobulines i dominis  $V_L$ .** A) Estructura de raigs-X de l'anticòs  $\kappa$ -IgG [codi PDB 1IGT]. Dues cadenes pesades (verd) i dues cadenes lleugeres (groc) s'associen formant l'heterotetràmer. B) Estructura de la cadena lleugera sencera (LC), tan el domini  $C_L$  (vermell) com el domini  $V_L$  (groc) presenten el plegament característic d'Igs. C) Alineament estructural de les estructures cristal·lines de les línies germinals amiloidogèniques  $\lambda_{VL}$  6ajL2 (groc) i  $\kappa_{VL}$   $\kappa 1$  O18/O8JK2 (vermell) [codi PDB 2W0K i 2Q20, respectivament]. Les regions FR mostren una estructura similar, mentre que les regions CDRs (blau) mostren diferències significants degut a l'elevada variabilitat de seqüència. Totes dues línies contenen el residu Trp35 conservat (barres negres), i es localitza molt proper al pont disulfur típic dels dominis d'Igs (barres grises). *Figura adaptada de Blancas-Mejía, L.M. & Ramírez-Alvarado, M. (2013).*

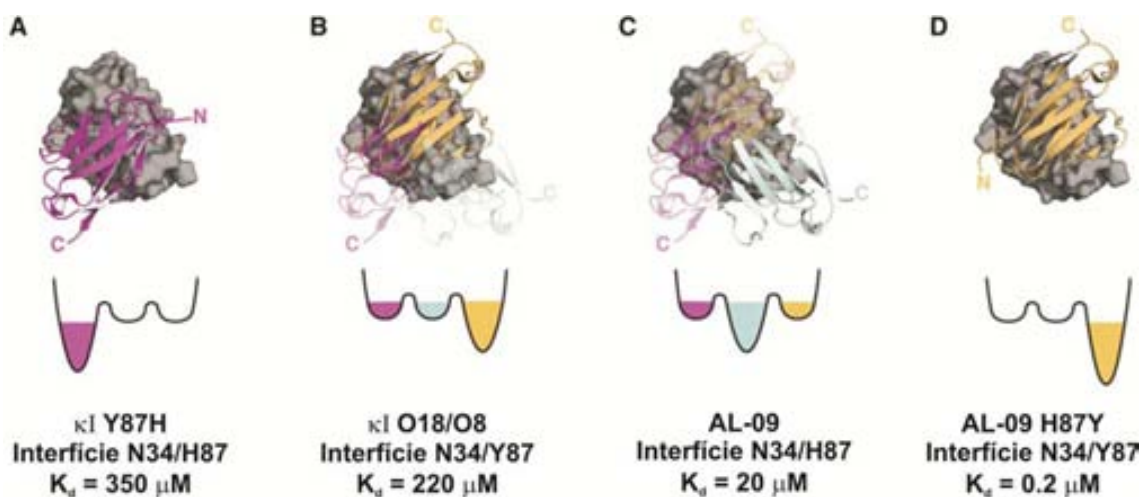
Estudis de modelatge estructural amb seqüències  $V_L$  de pacients d'AL, realitzats per Ramírez-Alvarado i col·laboradors, reporten que la majoria de mutacions es localitzen en la interfície dimèrica (cadena- $\beta$  C, F i G), sobretot mutacions cap residus d'histidina (Poshusta et al. 2009, Peterson et al. 2010).

En aquest sentit, la proteïna germinal  $\kappa$ I 018/08 cristal·litza en forma de dímer canònic mentre que la proteïna amiloidogènica AL-09, amb tres mutacions no conservades dins o properes a la interfície, adopta una estructura de dímer alterat, amb una rotació entre dominis de  $90^\circ$  respecte la germinal (Figura I. 19-A,B) (Baden et al. 2008a). El residu Tyr87 es troba conservat en més del 95% de les seqüències germinals  $\lambda$  i  $\kappa$ . La seva mutació restaurativa, cap al residu conservat de la seqüència germinal en aquesta posició (AL-09 H87Y), mostra que aquest únic canvi estabilitza la proteïna, retarda la formació amiloide i recupera la conformació per a poder adoptar la interacció dimèrica canònica de  $\kappa$ I 018/08.



**Figura I. 19. Diferències en la interfície dimèrica entre el dímer d'AL-09 i de  $\kappa$ I 018/08.** L'estructura cristal·lina del dímer  $V_L$ - $V_L$  de la proteïna germinal  $\kappa$ I 018/08 (a) adopta la interfície dimèrica canònica d'Igs, mentre que la proteïna amiloidogènica AL-09 mostra una interfície dimèrica rotada  $90^\circ$  respecte la germinal. *Figura adaptada de Baden, E.M. (2008).*

Un altre exemple d'alteració de la interfície de dímers  $V_L$ - $V_L$  és la proteïna LEN, implicada en mieloma múltiple. La proteïna LEN, amb dues mutacions puntuals, forma dímers rotats  $180^\circ$  respecte la seva proteïna nativa degut a canvis electrostàtics en la interfície (Pokkuluri et al. 1998). Resultats similars han obtingut Del Pozo Yauner et al. comparant la proteïna germinal  $\lambda$ 6a amb el mutant puntual  $\lambda$ 6a R25G (del Pozo Yauner et al. 2008). Sembla a ser que les cadenes LCs monomèriques interaccionen entre elles adoptant diferents conformacions dimèriques, convertibles entre elles. Per fluctuacions conformacionals adopten la interfície més favorable energèticament, ja sigui la interfície canònica o alterada (Figura I. 20). Els residus situats a la interfície determinen quina d'elles és més favorable, o si varies interfícies poden existir al mateix temps ja que presenten un panorama energètic semblant (Peterson et al. 2010). Per tant, determinades mutacions en la interfície dimèrica estabilitzen dímers no canònics, fet que pot estar relacionat amb potenciar l'amiloïdosi.



**Figura I. 20. Promiscuïtat de la interfície dimèrica dels dominis VL amiloidogènics.** Les mutacions somàtiques als residus 34 i 87 generen quatre possibles conformacions de la interfície dimèrica. A) Malgrat la feble  $K_d$ , la mutació recíproca en el domini κI O18/O8 Y87H pobla tan sols una única conformació rotada  $180^\circ$  respecte la canònica. B) La interfície N34/Y87 de la línia germinal κI O18/O8 permet múltiples conformacions, on la canònica és més favorable que les altres (groc). C) El domini amiloidogènic AL-09 (interfície N34/H87) també presenta diferents conformacions, sent favorable la rotada  $90^\circ$  respecte la canònica. D) La mutació restaurativa de AL-09 H87Y recupera la conformació canònica de la interfície dimèrica. *Figura adaptada de Peterson, F.C. (2010).*

Pel que fa a cinètiques de fibril·lació, no existeix una clara correlació entre la promiscuïtat a un tipus de interfície dimèrica i una major tendència amiloide. Tot fa pensar que les cadenes LCs amiloidogèniques adquireixen una estructura de dímer alterat exposant regions més propenses a l'agregació. Seria necessari estudiar els residus que formen part de nucli hidrofòbic de les fibres d'AL per determinar quins contactes són més amiloidogènics (Peterson et al. 2010).

### 3.2.4. Futures estratègies terapèutiques.

Actualment, els tractaments contra l'AL no són curatius (Blancas-Mejia, Ramirez-Alvarado 2013). Un diagnòstic acurat, determinar quins òrgans es troben afectats, i el risc associat a les diferents modalitats de tractament, és el primer pas per a poder fer un tractament adequat de la malaltia. L'objectiu dels tractaments contra l'amiloïdosi d'AL és aconseguir reduir la concentració de LC lliure en circulació; si no és completament, si el mínim per aturar la progressió de la malaltia i millorar la funcionalitat orgànica (Ramírez-Alvarado, Kelly & Dobson 2010).

Els tractaments que es duen a terme inclouen la quimioteràpia i l'auto-trasplantament de cèl·lules mare, dirigits contra la població de cèl·lules plasmàtiques

malignes del moll de l'os, secretores en excés de les LCs lliures. Tot i que resulten força eficaços, part dels pacients d'AL mostren intolerància i desencadenen disfunció orgànica.

Tot i el tractament actual, la immunoteràpia cada cop està agafant més força com a futura estratègia en les malalties amiloidogèniques en general. Pel que fa a l'AL, ja ha estat desenvolupada i avaluada, en ratolins model de l'AL, l'eficàcia terapèutica del anticòs monoclonal murí mAB-11-1F4, que reconeix específicament les fibres amiloides de LC, disminueix la quantitat total dipositada i millora el funcionament dels òrgans afectats (Solomon, Weiss & Wall 2003, O'Nuallain et al. 2007). Tot i ser un avanç terapèutic, el tractament requereix combinar-se amb la quimioteràpia o l'auto-trasplantament per a poder eliminar les cèl·lules plasmàtiques malignes.

De la mateixa manera que en l'AD i la majoria de les malalties amiloidogèniques, en els darrers anys s'ha demostrat que l'estat monomèric o l'intermediari oligomèric soluble són la principal espècie citotòxica en l'AL, més que les fibres insolubles. Pel que fa a l'AL, les cadenes LC solubles són internalitzades dins de les cèl·lules renals o cardíques, de forma que s'altera l'homeòstasi, l'estat redox de la cèl·lula, i s'incrementa les espècies reactives d'oxigen (ROS) i l'estrès cel·lular. A més, també s'ha observat un dèficit en la contracció i relaxació dels cardiomiòcits (Brenner et al. 2004, Trinkaus-Randall et al. 2005, Sikkink, Ramirez-Alvarado 2010). Recentment s'ha vist que, les proteïnes LCs derivades de pacients d'AL, indueixen apoptosi de les cèl·lules de cardiomiòcits a través de la via p38-MAPK. El tractament per inhibir selectivament aquesta via atenua, significativament, l'estrès oxidatiu, la disfunció cel·lular i l'apoptosi desencadenada per les cadenes LCs (Shi et al. 2010).

Malgrat que els tractaments actuals contra l'AL es basen en la quimioteràpia contra les cèl·lules plasmàtiques secretores de LCs, o bé, en mAb específics de les fibres amiloides, les futures estratègies terapèutiques han d'anar enfocades cap al reconeixement específic de les espècies solubles, segrestant-les per evitar la seva citotoxicitat i evitar la seva associació en fibres amiloides. Malauradament, la ciència actual encara es troba lluny d'un tractament terapèutic curatiu. Per a aconseguir-ho, cal entendre millor la correlació entre fibrogènesis i estabilitat termodinàmica dels dominis  $V_L$ , així com una millor identificació de les espècies citotòxiques i el seu mecanisme de dany cel·lular i tissular. A més, poc es coneix sobre el paper que juga l'entorn cel·lular en la modulació del grau de deposició amiloide i la seva especificitat de teixit.

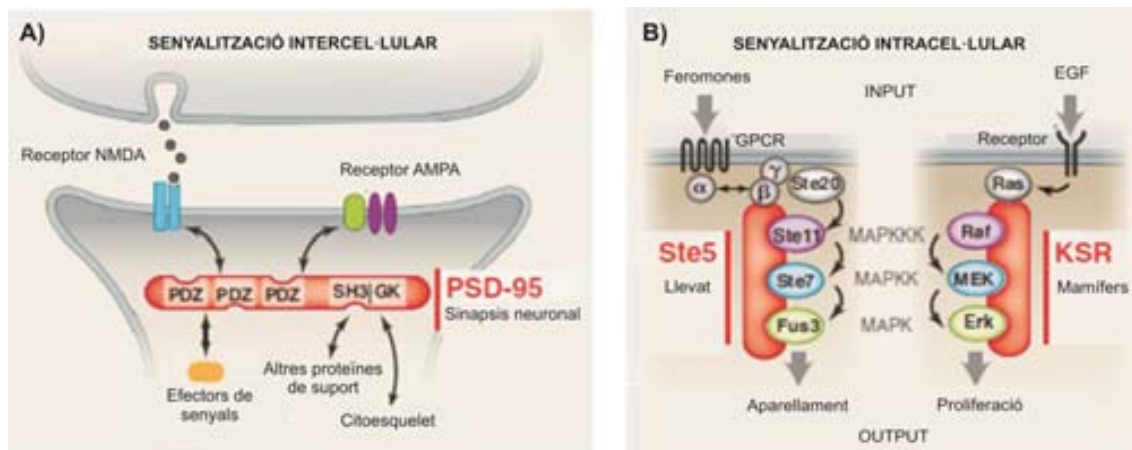
#### 4. INTERACTOMA I MALALTIES HUMANES.

Les patologies humanes en general, entre elles l'amiloïdosi, tenen un origen i segueixen un mecanisme molecular patològic específic que les caracteritza. El seu estudi a nivell local i molecular és indispensable per tal d'esbrinar l'etiopatologia de cada una d'elles. Però, és evident, que dins de la complexitat del organisme humà, molts són els processos que participen a desencadenar el gran ventall de patologies humanes o a fer que aquestes progressin i afectin negativament al conjunt del sistema humà. A part del punt de vista molecular, tal i com s'ha descrit en el cas de l'AD o l'AL, és necessari adquirir una visió més general de com aquestes patologies alteren el perfecte entramat biològic que sosté i regula els processos biològics essencials que es donen dins la cèl·lula, com ara la divisió cel·lular, l'obtenció d'energia o la transducció de senyals. Aquest entramat és conseqüència de múltiples interaccions entre un gran nombre de biomolècules que es troben interconnectades entre si formant xarxes d'interacció o interactomes. Les cèl·lules de mamífers contenen, aproximadament, 1 bilió de molècules proteiques, de les quals un 10% es troben implicades en processos de transducció de senyal. (Good, Zalatan & Lim 2011). Entendre com les proteïnes interaccionen entre elles i realitzen funcions dins la cèl·lula, alhora que són altament regulades i modulades, és essencial per a comprendre el funcionament global de la cèl·lula i, a partir d'aquí, traçar noves vies biològiques i aprofundir en les malalties relacionades, sovint estudiades a nivell molecular, sense tenir en compte la repercussió o l'origen que tenen dins la xarxa cel·lular o interactoma. És emergent la necessitat d'entendre les diferents patologies humanes a nivell de xarxes interconnectades a diferents estrats (proteòmic, genòmic, ambiental...), un punt de vista actualment nomenat com a *diseasome*, en anglès (Figura I. 21). I en aquest sentit, la proteòmica hi juga un paper molt important (Rain et al. 2001, Goh, Choi 2012).

##### 4.1. Proteïnes *hub* i dominis modulars.

La característica principal dels mapes d'interacció proteïna-proteïna és la presència de grans nodes centrals (o *hub proteins*) que actuen com a plataformes d'interacció entre els diferents mòduls en els quals està organitzat el proteoma (Zhang, Xu & Xiao 2013). Les proteïnes *hub* no acostumen a presentar activitat enzimàtica específica, sinó que són elements centrals al voltant dels quals s'organitza tot el proteoma cel·lular, regulant i connectant els processos biològics entre si, tan física com temporalment (Uversky 2013). Esdevenen proteïnes de suport (o *scaffold*) que coordinen l'assemblatge i l'especificitat del flux d'informació intracel·lular (Good, Zalatan & Lim 2011). A més, aquestes proteïnes es troben molt conservades evolutivament (Vallabhajosyula et al.

2009). Un exemple de proteïna de suport seria la proteïna de llevat Ste5 o la de mamífer KSR, essencials en la via de senyalització MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) (Figura I. 22-B), o bé la proteïna post-sinàptica PSD-95 de la família de proteïnes MAGUK (*Membrane Associated Guanylate Kinase*) (Figura I. 22-A).



**Figura I. 21. Representació de l'organització del flux d'informació cel·lular .** A) El domini PDZ de la proteïna post-sinàptica PSD-95 controla els receptors de glutamat NMDA i AMPA de la sinapsis neuronal. B) Les proteïnes suport Ste5, en llevats, i KSR, en mamífer, controlen la via de senyalització MAPK intracel·lular. *Figura adaptada de Good, M.C. (2011).*

Les proteïnes *hub* sovint exhibeixen regions desestructurades o modulables, és a dir, no adopten un plegament tridimensional determinat en el espai, raó per la qual se les pot classificar com a proteïnes o regions intrínsecament desestructurades (IDPs, *Intrinsically Disordered Proteins*), on l'estat natiu és desordenat, amb una gran plasticitat i adaptabilitat estructural, crucials per adaptar-se a la diversitat funcional necessària per a participar i regular diferents vies d'informació biològica. (Huse, Kuriyan 2002, Dunker et al. 2008). Tendeixen a una transició constant ordenat-desordenat com a resultat d'unir-se i separar-se del seu lligand altament específic i amb una constant d'afinitat molt baixa. Així, les IDPs fàcilment poden unir-se a diferents proteïnes canviant la manera d'associar-se amb cada una d'elles (Good, Zalatan & Lim 2011).

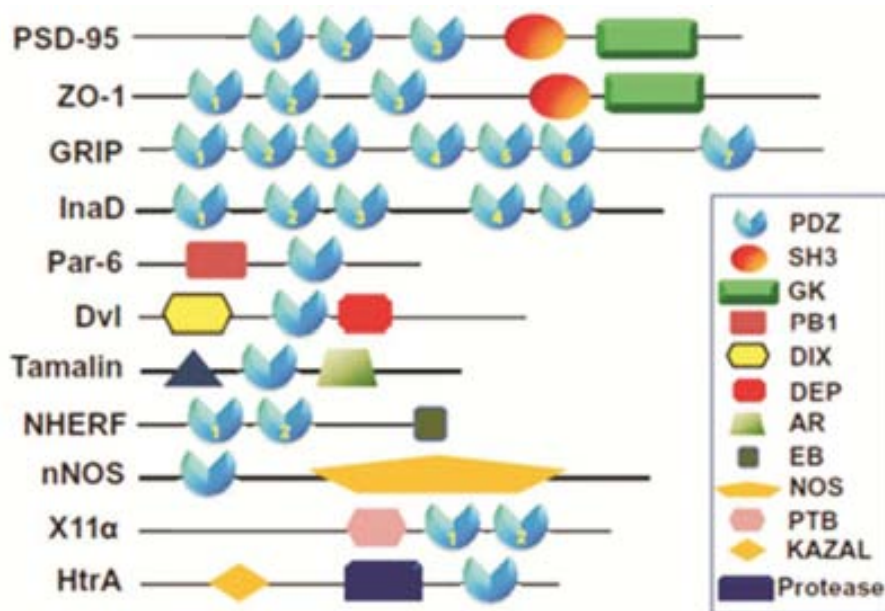


**4.2. Dominis PDZ.**

Les proteïnes *hub* estan organitzades en varis dominis associats, conformacionalment independents, i units entre ells per diferents tipus de connectors (Good, Zalatan & Lim 2011).

Aquests dominis modulars deixen accessible la superfície de unió a les seves dianes específiques i reconeixen una regió o motiu estructural específic que els fa característic.

Els dominis PDZ són un dels mòduls d'interacció proteïna-proteïna més abundant en mamífers (Figura I. 22). En humans, més de 250 tipus de dominis PDZ formen part de 150 proteïnes *hub* diferents, esdevenint elements essencials dins les xarxes d'informació cel·lular (Ivarsson 2012).



**Figura I. 22. Exemple de proteïnes multidomini que contenen dominis PDZ.** Els dominis PDZ són un dels mòduls més abundants en proteïnes *hub* de mamífers, esdevenint elements essencials per a les xarxes de flux d'informació cel·lular.

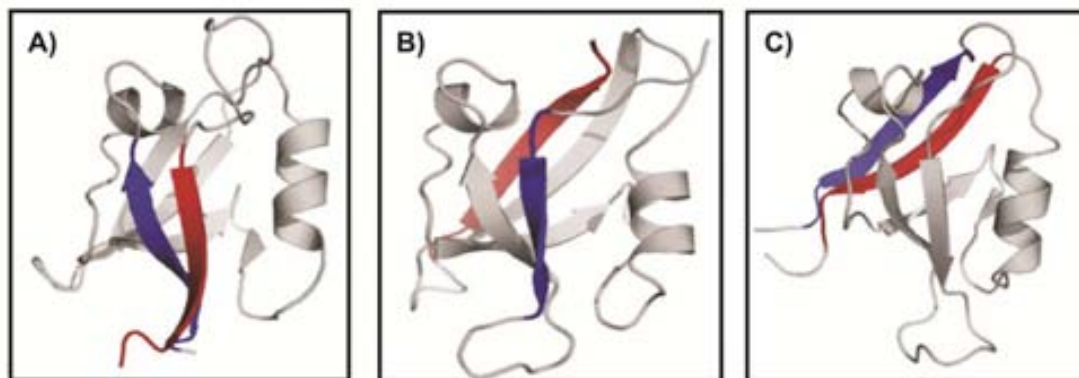
El seu nom prové de les tres primeres proteïnes en les que van ser identificats, farà més de 20 anys: *Post Synaptic Density protein-95* (PSD-95), *Disc Large tumor supressor* (DLG), i *Zonula-Occludens-1* (ZO-1). Totes elles són proteïnes que organitzen processos de transducció de senyal, adhesió i tràfic cel·lular (Zhang2013).

Els dominis PDZ reconeixen els extrems C-terminals d'una gran varietat de proteïnes. Prenen especial importància en el manteniment de la polarització cel·lular i en processos de transducció de senyal a través de la membrana plasmàtica, com ara la

sinapsis (Sierralta, Mendoza 2004). I recentment, s'han descrit certs aspectes conformacionals d'aquests dominis que podrien estar implicats en la regulació de noves funcions. Com per exemple, el segon domini PDZ de la proteïna ZO (*zònula occludens*) regula la l'adhesió cel·lular a través de la seva dimerització (Umeda et al. 2006, Wu et al. 2007), o el tercer domini PDZ de la proteïna PSD-95, que modula l'afinitat i l'especificitat de la butxaca d'unió des de regions distants de la molècula, a través d'interaccions al·lostèriques intra-domini (Lockless, Ranganathan 1999, Jemth, Gianni 2007).

#### 4.2.1. Caracterització estructural dels dominis PDZ.

Els dominis PDZ són proteïnes globulars relativament petites, d'aproximadament 90 residus. L'estructura canònica dels PDZ consisteix en un barril- $\beta$ , format per cinc o sis cadenes ( $\beta 1$ - $\beta 6$ ), rodejat per dues hèlix- $\alpha$ , l' $\alpha 1$  més curta que l' $\alpha 2$  (Figura I. 23). Dins l'estructura, els extrems N i C-terminal es situen molt propers entre ells, facilitant la seva inserció dins la proteïna, i oposats a la conservada butxaca d'unió al lligand, una cavitat situada entre la cadena- $\beta 2$  i l'hèlix- $\alpha 2$  (Lee, Zheng 2010). Tot i compartir el mateix nucli estructural, els dominis PDZ difereixen entre ells per a la variabilitat de les regions estructurades en *loop*, i poden presentar estructures secundàries addicionals (Ivarsson 2012).



**Figura I. 23. Representació del plegament canònic dels dominis PDZ.** A) Domini PTP-BL PDZ2 (codi PDB 1GM1). B) Domini PDZ de la proteasa D1 (codi PDB 1FC7). C) Domini GRASP55 PDZ1 (codi PDB 3RLE). Les cadenes- $\beta$  situades en els extrems N- i C-terminals es troben marcades en blau i vermell, respectivament.

Inicialment, els dominis PDZ han estat classificats segons la naturalesa dels quatre últims aminoàcids C-terminals dels lligands que reconeixen (Songyang et al. 1997, Lee, Zheng 2010). La taula I. 2 resumeix els tres tipus de classes canòniques dels dominis PDZ.

**Taula I. 2. Classificació de dominis PDZ en funció de la seva especificitat d'unió.** Depenent del motiu C-terminal dels lligands específics que reconeixen els dominis PDZ, aquests han estat classificats en classe I, II i III. (X representa qualsevol aminoàcid, i  $\phi$  tan sols residus hidrofòbics).

	<b>Motiu C-terminal</b>	<b>Exemple de domini PDZ</b>
<b>Classe I</b>	[X-(S/T)-X-(V/I) <sub>COOH</sub> ]	PSD95-PDZ3
<b>Classe II</b>	[X- $\phi$ -X- $\phi$ <sub>COOH</sub> ]	GRIPP1-PDZ3
<b>Classe III</b>	[X-(D/E)-X- $\phi$ <sub>COOH</sub> ]	nNOS-PDZ

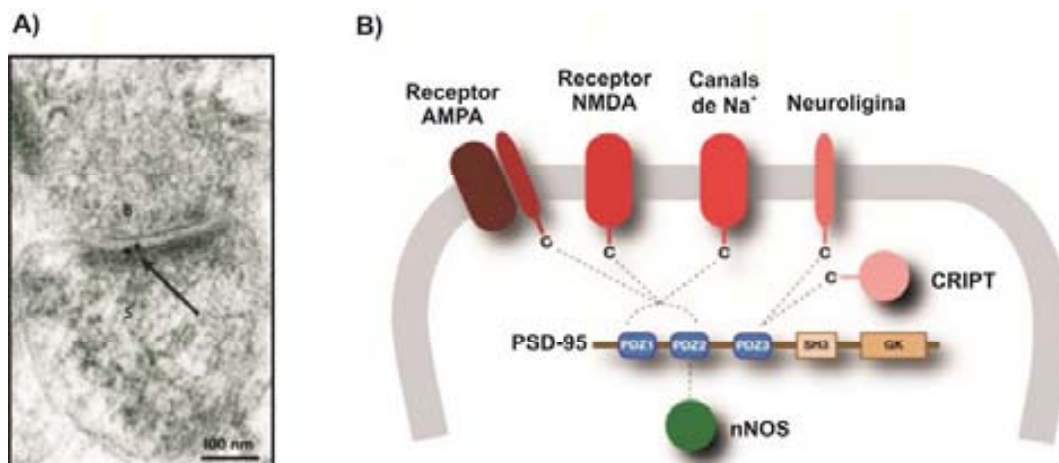
Aquesta classificació, però, no explica la gran heterogeneïtat selectiva dels dominis PDZ per a reconèixer extrems C-terminals. L'existència d'altres mecanismes moleculars necessaris per a modular l'afinitat i l'especificitat d'aquests dominis, com ara la regulació al·lostèrica intra-domini, complementarien aquesta classificació inicial (Petit et al. 2009, Camara-Artigas et al. 2010, Mostarda, Gfeller & Rao 2012).

#### 4.3. La proteïna PSD-95.

La proteïna PSD-95 (*Post Synaptic Density protein-95*), també coneguda amb el nom de SAP90 o Dlg4, és un exemple de sistema multimodular *hub* i forma part de la família de proteïnes MAGUK (*Membrane Associated Guanylate Kinase*). Es localitza a la regió de densitat post-sinàptica de les espines dendrítiques, on hi trobem un complex supramolecular electro-dens, d'aquí el seu nom, format per una gran concentració de receptors de glutamat NMDA i AMPA.

La PSD-95 organitza la transducció de senyals i coordina el tràfic molecular de la sinapsis neuronal (Figura I. 24). La seva funció principal és la d'agrupar i localitzar receptors de membrana NMDA i AMPA, i canals iònics de Na<sup>+</sup> (Elias, Nicoll 2007). També interacciona amb varies proteïnes citoplasmàtiques, com per exemple la Sintasa neuronal d'Òxid Nítric (nNOS) implicada en la excitotoxicitat neuronal, o la proteïna CRIPT (*Cysteine-Rich Interactor Protein*); com també interactua amb proteïnes associades al citoesquelet, com la F-actina (Passafaro et al. 1999, Sheng, Sala 2001).

La proteïna PSD-95 és la proteïna *hub* més abundant de la densitat post-sinàptica i, com totes les de la família MAGUK, està formada per tres dominis PDZ, un domini SH3 (*SRC Homology 3 Domain*) i un domini GK (Guanilat Kinasa). Tots cinc actuen com a dominis moduladors d'interacció proteïna-proteïna. Els dominis SH3 i GK, es troben implicats en la dimerització de la proteïna PSD-95. La unió de lligands al *loop* entre tots dos dominis provoca el seu canvi conformacional i promou la formació d'homodímers de PSD-95 (Nix et al. 2000, McGee et al. 2001, McGee, Bredt 2003).



**Figura I. 24. Localització post-sinàptica i interaccions moleculars de la proteïna PSD-95.** A) La proteïna PSD-95 es localitza a la densitat post-sinàptica de les espines dendrítiques (S). La fletxa senyala la presència de receptors NMDA marcats amb partícules d'or. B) A la terminal post-sinàptica, la proteïna PSD-95 interacciona amb receptors de membrana, canals de sodi, i proteïnes citoplasmàtiques nNOS i CRIP1.

Pel que fa als dos primers dominis de la proteïna PSD-95, PDZ1 i PDZ2, presenten una estructura i propietats d'unió molt similars, i es troben separats per una seqüència d'aminoàcids molt curta, inferior a 5 residus, rígida i molt conservada entre les diferents espècies. Els dos dominis estableixen contactes entre si, formant un tàndem que promou la dimerització de receptors o canals iònics, necessària per a ser funcionals, o bé com a mètode selectiu de l'especificitat d'unió amb la molècula diana (Long et al. 2003).

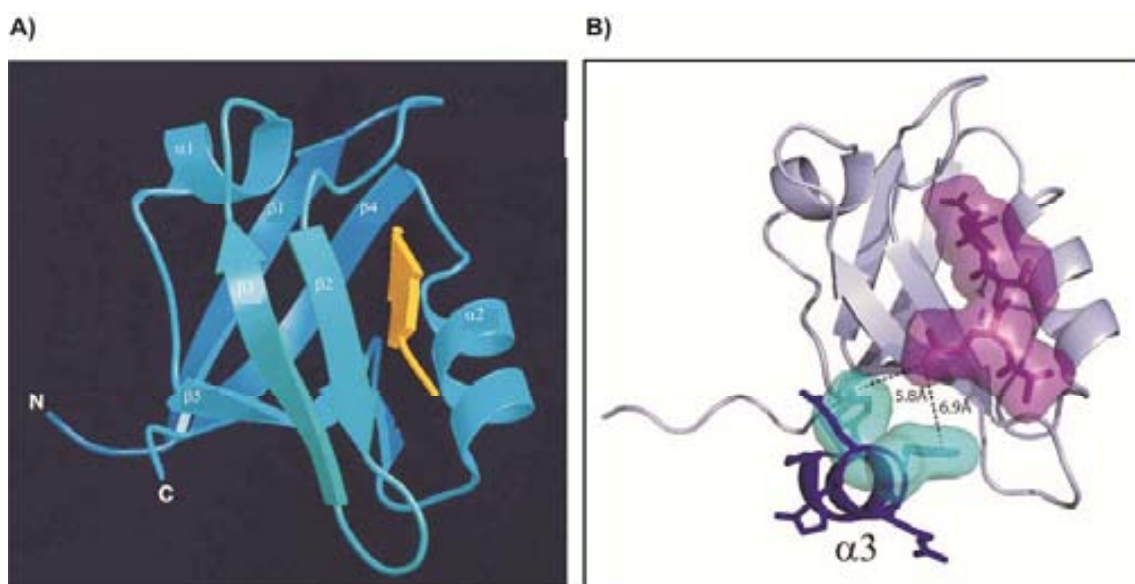
#### 4.3.1. Domini PDZ3 de la proteïna PSD-95.

El tercer domini de la proteïna PSD-95, d'ara en endavant anomenat PDZ3, és una de les tres proteïnes presentades en aquesta Tesi Doctoral. Aquest domini, igual que els altres dos, té la funció d'interaccionar amb diferents molècules diana. Però, el cas del domini PDZ3 és un clar exemple de modulació de l'afinitat i l'especificitat d'unió més enllà de la regió d'unió a lligands, a través de interaccions al·lostèriques intra-domini. La seva plasticitat estructural i les propietats dinàmiques de plegament han fet que el domini PDZ3 hagi estat objecte de nombrosos estudis termodinàmics a la fi d'aprofundir en les característiques conformacionals dels dominis PDZ en general. La seva estructura cristal·lina va ser la primera de tots els dominis PDZ en ser resolta (Doyle et al. 1996).

#### 4.3.1.1. Hèlix- $\alpha$ 3 addicional del domini PDZ3.

A nivell d'estructuració canònica dels dominis PDZ, el PDZ3 (residus 302-402) rep especial atenció ja que conté una hèlix- $\alpha$  addicional ( $\alpha$ 3, residus 394-402) a l'extrem C-terminal, empaquetada contra l'estructura central del domini, concretament contra les cadenes  $\beta$ 2 i  $\beta$ 3 d'una de les dues fulles- $\beta$  que formen el barril- $\beta$  (Figura I. 25-B)

Fins fa poc, els cristalls del PDZ3 eren mancats d'aquesta hèlix- $\alpha$  addicional, degut a que la seqüència proteica contenia un artefacte de clonació a l'extrem C-terminal (residus 403-415), que adoptava una conformació en  $\beta$ -hairpin antiparal·lel (cadena- $\beta$ 5), tal i com s'observa a la figura I. 25-A. Entre d'altres, Cámara-Artigas, A. i col·laboradors, van resoldre l'estructura real del domini PDZ3 (codi PDB 3K82). Al comparar-lo amb els resultat anteriors, van veure que aquesta diferència conformacional modifica la plasticitat i funcionalitat de la proteïna PSD-95, ja que l'hèlix- $\alpha$ 3 està totalment implicada en el plegament i l'afinitat del domini (Petit et al. 2009, Camara-Artigas et al. 2010).



**Figura I. 25. Estructura cristal·lina del domini PDZ3.** A) Primera estructura adquirida (residus 302-415) amb l'artefacte de clonació a l'extrem C-terminal que adopta una estructura en  $\beta$ -hairpin (cadena- $\beta$ 5). *Figura adaptada de Doyle, D.A. (1996).* B) Estructura real del domini PDZ (residus 302-402) amb l'hèlix- $\alpha$ 3 addicional l'extrem C-terminal (blau) i les distàncies més properes al pèptid lligand (5.8 Å la Tyr397 i 6.9 Å la Phe400). *Figura adaptada de Petit, C.M. (2009).* Detall del pèptid lligand a la butxaca d'unió ( $\beta$ 2- $\alpha$ 2) en groc (A) i magenta (B).

Aquesta tercera hèlix- $\alpha$  es localitza distant del centre actiu del domini i no estableix un contacte directe amb el C-terminal del pèptid a unir, els residus de l'hèlix més propers al pèptid, son la Tyr397 i la Phe400, que es situen a 5.8 Å i 6.9 Å del pèptid, massa distància per a establir algun tipus d'interacció (Petit et al. 2009). Recentment, ha estat

demostrat que la fosforilació de la Tyr397 desestabilitza l'hèlix- $\alpha$ 3, desempaquetant-la del domini global. Conseqüentment, l'afinitat per al lligand disminueix fins a quatre vegades (Zhang et al. 2011). Encara més, la deleció dels últims 7 residus de l'hèlix- $\alpha$ 3 redueix fins a 21 vegades l'afinitat per al lligand. La taula I. 3 mostra els paràmetres termodinàmics obtinguts del mutant  $\Delta$ 7ct-PDZ3.

**Taula I. 3. Paràmetres termodinàmics de la interacció del domini PDZ3 i el pèptid lligand CRIPT.** Dades extretes de Petit, C.M (2009).

Proteïna	$K_d$ ( $\mu$ M)	$\Delta H_d$ (kcal/mol)	$-\Delta S_d$ (kcal/mol)
<b>PDZ3<sup>303-402</sup></b>	1.2 (0.1)	-9.70 (0.12)	1.66 (0.06)
<b><math>\Delta</math>7ct-PDZ3</b>	25.7 (3.6)	-10.27 (0.68)	4.00 (0.59)

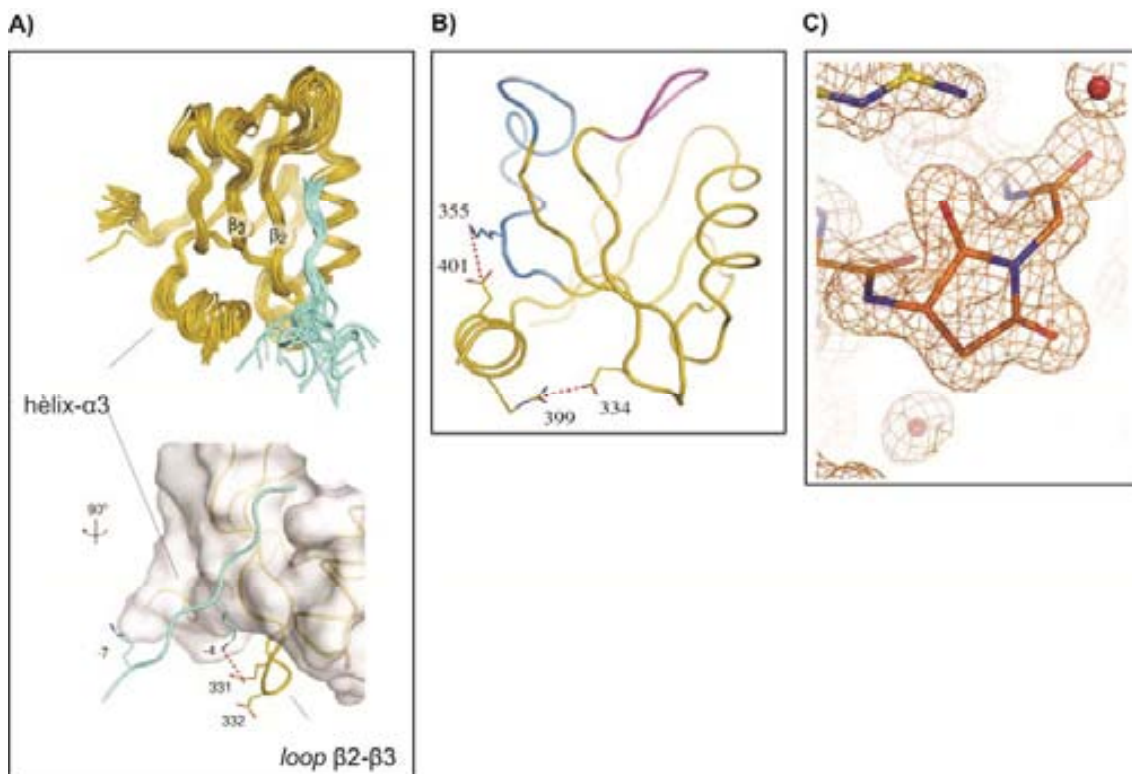
A part del descens de l'afinitat respecte el domini sencer, el fet que els valors d'entalpia ( $\Delta H$ ) siguin pràcticament iguals entre ells, indica que la deleció de l'hèlix té un efecte purament entròpic ( $\Delta S$ ), sense afectar les interaccions i el plegament natiu de la proteïna. I que, per tant, l'afinitat dinàmica del domini PDZ3 està regulada al·lostèricament per l'hèlix- $\alpha$ 3 addicional (Petit et al. 2009).

#### 4.3.1.2. Loop $\beta$ 2- $\beta$ 3 del domini PDZ3.

A part de l'hèlix- $\alpha$ 3, s'han identificat altres regions del domini PDZ3 que també influeixen directament sobre la capacitat d'unió a pèptids.

Per simulació de Dinàmica Molecular, s'ha identificat que part del pèptid lligand interacciona directament amb el *loop* que connecta les cadenes  $\beta$ 2 i  $\beta$ 3, format pels residus Gly329-Gly335 (GGEDGEG). Concretament, dos residus de Lys del pèptid lligand estableixen interacció electrostàtica amb el Glu331 i l'Asp332 (Figura I. 26-A).

Aquests contactes són dinàmics, s'intercanvien entre ells en una escala de nanosegons, raó per la qual ha estat difícil detectar-les (Mostarda, Gfeller & Rao 2012).



**Figura I. 26. Representació dels residus del *loop*  $\beta 2\text{-}\beta 3$  del domini PDZ3 implicats en la interacció amb pèptids i l'hèlix- $\alpha 3$  addicional.** A) Model del domini PDZ3 (groc) on es detalla la butxaca d'unió a pèptids (blau) i la interacció entre els residus Asp332 i Glu331 (*loop*  $\beta 2\text{-}\beta 3$ ) amb la Lys-4 del pèptid. B) Interaccions iòniques de l'hèlix- $\alpha 3$  (Glu401 i Arg399) amb el *loop*  $\alpha 1\text{-}\beta 4$  (Lys355), i amb el *loop*  $\beta 2\text{-}\beta 3$  (Glu334). *Imatges adaptades de Mostarda, S. (2012).* C) Detall de l'anell de succinimidina format per el residu Asp332. *Imatge adaptada de Cámara-Artigas, A. (2010).*

Tot plegat demostra que el *loop*  $\beta 2\text{-}\beta 3$ , molt proper a la butxaca d'unió, juga un paper central en l'afinitat del domini PDZ3 i es troba regulat al·lostèricament per la regió distant i addicional  $\alpha 3$ , i que l'afinitat del domini PDZ3 es troba estabilitzat per una xarxa de contactes dinàmics intra-domini i amb el pèptid, tan al·lostèrics com iònics i que impliquen diferents parts de la molècula.

#### 4.4. Malalties relacionades amb els dominis PDZ.

El fet que existeixi un gran nombre de proteïnes *hub* i que juguen un paper crucial en els processos biològics, no fa inesperat que moltes d'elles es trobin implicades en patologies humanes. La pèrdua del seus rols dóna lloc a una extensa varietat de malalties, com ara càncers, malalties neurodegeneratives (l'AD i Parkinson), malalties cardiovasculars, o diabetis tipus-II (Rezaei-Ghaleh, Blackledge & Zweckstetter 2012). Totes elles relacionades amb proteïnes de reconeixement, regulació i/o senyalització

cel·lular, funcions que, tal i com s'ha descrit anteriorment, solen implicar regions o proteïnes IDPs (Uversky, Fink 2004, Uversky 2013).

La gran quantitat de proteïnes humanes que contenen dominis PDZ, es troben distribuïdes en regions especialitzades de la cèl·lula, principalment en els contactes epitelials intracel·lulars. La estricta localització d'aquestes proteïnes i les seves funcions de regulació de la transducció de senyal i polaritat cel·lular, implica que qualsevol alteració a nivell estructural o d'expressió resulti en el desenvolupament de malalties humanes, sobretot pel que fa una gran varietat de càncers (Facciuto et al. 2012).

En els darrers anys s'han identificat varietats de virus humans que codifiquen proteïnes que interaccionen i pertorben la funció dels dominis PDZ, com a estratègia per a la seva replicació (Focant, Hermans 2013). Un exemple és el cas del virus del papil·loma humà, que expressa la proteïna oncogènica HPV-E6, la qual conté, en el seu extrem C-terminal, el motiu de reconeixement dels dominis PDZ (Pim et al. 2012).

En el cas concret de la proteïna post-sinàptica PSD-95, s'ha vist implicada en malalties humanes, com ara l'Autisme o l'AD.

En el cas de l'Autisme, existeix un dèficit del factor de transcripció MEF-2 (*Myocyte Enhancer Factor-2*), el qual s'encarrega de regular el nombre de sinapsis neuronals mitjançant la ràpida i selectiva eliminació de la proteïna PSD-95, que estabilitza els receptors AMPA, i afavoreix al pas d'informació augmentant el nombre d'espines dendrítiques especialitzades en rebre impulsos sinàptics. Per tant, la seva no degradació selectiva es reflexa en una hiperexcitació neuronal, hipersensibilitat sensorial i, fins i tot, en atacs epilèptics, tots ells símptomes en pacients de Síndrome X fràgil (FXS), la forma hereditària més comuna de retràs mental i autisme (Tsai et al. 2012).

Pel que fa a la malaltia d'AD, recentment s'ha detectat una co-localització de la proteïna PSD-95 amb oligòmers del pèptid-A $\beta$ , l'espècie citotòxica causant de l'AD. A més, la concentració de proteïna PSD-95 al cervell de pacients d'AD és significament menor que en individus sans, degut a que els oligòmers d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> indueixen una disminució dels nivells de PSD-95 al hipocamp i còrtex neuronal, sent una de les causes de la disfunció sinàptica i la discapacitat cognitiva de l'AD (Deshpande et al. 2006, Cascella et al. 2013). Per al contrari, altres autors defensen la hipòtesi de que la sobreexpressió de la proteïna post-sinàptica PSD-95, i no la seva mancança, és un marcador de la malaltia d'AD, que indica una reorganització estructural en els compartiments pre- i post-sinàptics, com a resposta compensatòria a les disfuncions sinàptiques (Preissmann et al. 2012).

També en l'AD, és sabut que l' $\alpha$ -secretasa, la proteasa que talla la proteïna APP de forma no amiloidogènica, interacciona directament amb la proteïna SAP97, paràloga de la PSD-95 (o SAP90) (Muller et al. 1995). Aquesta interacció és necessària per a localitzar la



secretasa a la membrana post-sinàptica i digerir l'APP. Així, interferir el complex  $\alpha$ -secretasa:SAP97, redueix l'activitat de l' $\alpha$ -secretasa i desplaça la proteòlisis de l'APP cap a la via amiloidogènica donant lloc a la formació del pèptid  $A\beta$ . Així, la inhibició d'aquest complex molecular esdevé una nova i interessant estratègia per a treballar amb ratolins model d'AD sense la necessitat de ser transgènics, i mimetitza els primers estadis d'AD esporàdic, ja que després de dues setmanes, els ratolins presenten patrons neurodegeneratiu típics d'AD, un augment dels agregats d' $A\beta$  i de proteïna Tau hiperfosforil·lada, així com una pèrdua selectiva de receptors glutamat de la terminal post-sinàptica (Saraceno et al. 2013).



### **III. OBJECTIUS.**



L'objectiu general d'aquesta tesi doctoral ha estat:

- **L'estudi de la reorganització conformacional del estat natiu i l'agregació en fulla- $\beta$  ordenada de proteïnes implicades en diferents malalties conformacionals humanes.**

El treball es centra en l'estudi de tres tipus de proteïnes humanes diferents:

- un fragment variable d'immunoglobulina de cadena senzilla, l'scFv-h3D6.
- un domini variable d'immunoglobulina, l'AL-12.
- un domini modular de la proteïna *hub* PSD-95, el PDZ3.

, en funció de cada proteïna, la tesi es troba dividida en diferents capítols, els objectius específics dels quals són els següents:

- **scFv-h3D6.**
  - **Capítol 1:**
    - Expressió i purificació de l'scFv-h3D6 natiu, i separació de les seves diferents formes *scrambled*.
    - Estudi de les diferents vies d'agregació del pèptid  $A\beta_{1-42}$  i del scFv-h3D6, així com la del complex  $A\beta_{1-42}$ :scFv-h3D6.
    - Caracterització de la reorganització estructural del scFv-h3D6 cap a l'agregació en fulla- $\beta$  creuada altament ordenada de tipus WL.
    - Estudi del efecte del fragment d'anticòs scFv-h3D6 sobre la via d'agregació amiloide i la toxicitat del pèptid  $A\beta_{1-42}$  en cultius cel·lulars de neuroblastoma humà SH-SY5Y, per avaluar el seu potencial terapèutic a la malaltia d'Alzheimer
  - **Capítol 2:**
    - Obtenció d'un model tridimensional de l'estructura de l'scFv-h3D6 per homologia de seqüències.
    - Avaluació i caracterització de l'estructura secundària i terciària de l'scFv-h3D6.
    - Redisseny racional, a partir del model 3D, de la molècula per tal d'incrementar la seva estabilitat i disminuir la tendència intrínseca a

l'agregació. Això ha de permetre millorar la producció recombinant i disminuir la dosi efectiva ja demostrada en ratolins models d'Alzheimer.

- **AL-12.**

- **Capítol 3:**

- Obtenció dels paràmetres termodinàmics de l'AL-12, domini  $V_L$  obtingut d'una pacient amb Amiloïdosi de cadena lleugera, i dels seus mutants restauratius.
- Comparació dels paràmetres termodinàmics de l'AL-12 i dels seus mutants restauratius amb la proteïna germinal  $\kappa I$  O18/O8 i altres dominis  $V_L$  amiloidogènics.
- Estudi de la via d'agregació del AL-12 i dels seus mutants restauratius.
- Determinar l'efecte de les mutacions no-conservatives en dominis  $V_L$  amiloidogènics mitjançant la caracterització de la bateria de mutants restauratius de l'AL-12.

- **PDZ3.**

- **Capítol 4:**

- Estudi de la via d'agregació del domini PDZ3 i del seu efecte citotòxic sobre cultius cel·lulars de neuroblastoma humà SH-SY5Y.
- Anàlisi molecular del procés de reorganització estructural del domini PDZ3 cap a l'agregació en fulla- $\beta$  creuada altament ordenada.
- Estudi del paper de l'hèlix- $\alpha 3$  addicional, present en el domini PDZ3, en el plegament i l'agregació del domini, mitjançant la caracterització del mutant  $\Delta 10ct$ -PDZ3 mancat d'aquest motiu estructural.
- Estudi dels determinants estructurals implicats en el procés d'agregació del domini PDZ3, mitjançant la caracterització d'una bateria de mutants simples.
- Determinació de la importància de la regió de regulació al·lostèrica del domini PDZ3, l'hèlix- $\alpha 3$  i el loop  $\beta 2$ - $\beta 3$ , sobre el plegament i l'agregació de domini.

#### **IV. MATERIALS I MÈTODES GENERALS.**





*En el següent apartat de Materials i Mètodes Generals s'hi descriuen els fonaments de les diferents tècniques de laboratori emprades en aquesta tesi doctoral, així com els protocols generals. Per altra banda, a l'apartat de Materials i Mètodes de cada capítol s'hi detallen les tècniques i els protocols exactes duts a terme amb les mostres pertinents.*



**1. APARELLS GENERALS.**

- Agitador vòrtex HEIDOLPH Reax Top
- Agitadors magnètics Stuart Stir CB161
- Agitador plaques d'elisa IKA MS3digital
- Autoclau P-SELECTA Autoester-E
- Balança METTLER TOLEDO PJ300
- Balança METTLER TOLEDO AB204-S
- Bany termostàtic P-SELECTA Tectron Bio
- Bany termostàtic P-SELECTA Tectron 3000543
- Bomba peristàtica P-1 GE
- Cabina de flux laminar CRUMA 870FL
- Cabina d'extracció de gasos CRUMA
- Cabina de bioseguretat I TELSTAR BV-30/70
- Centrífuga BECKMAN COULTER J2-HS. Rotor JA-20
- Centrífuga BECKMAN COULTER Allegra 6R. Rotor GH-3.8
- Centrífuga BECKMAN COULTER Avanti J26-XP. Rotor JA25.50/JA-14
- Centrífuga HERAEUS Megafuge 1.0R Thermo-Scientific
- Ultracentrífuga BECKMAN COULTER Optima L-100 XP. Rotor STrp55Ti
- Congelador -20°C, -80°C SANYO
- Cubetes d'electroforesi per a gels d'acrilamida Mini-Protean BIO-RAD
- Cubetes d'electroforesi per a gels d'agarosa ECOGEN
- Espectrofotòmetre UV-Vis Varian Cary100
- Espectròmetre d'Infrarroig Varian 660-IR. Equipat amb mòdul de termostatització Peltier
- Espectrofotòmetre UV-Vis Nanodrop 2000 Thermo Scientific
- Espectropolarímetre J-715, JASCO. Equipat amb mòdul de termostatització Peltier
- Estufa incubadora 37°C de cultius cel·lulars Forma Scientific 3111
- Estufa incubadora 37°C HERAEUS
- Estufa incubadora 100°C P-SELECTA
- Font d'alimentació per a electroforesis BIO-RAD
- Fluorímetre Varian Cary Eclipse. Equipat amb mòdul de termostatització Peltier.
- FPLC AKTA Purifier
- Incubador d'aire amb agitació INFORS-HT Ecotron.
- Incubador d'aire amb agitació INNOVA 43
- Lector plaques d'elisa Victor3 Perkin Elmer
- Liofilitzador Benchtop SLC Virtis

- Lupa binocular OLYMPUS-CK2
- Microcentrífuga EPPENDORF 5424
- Micropipetes 0.2-2, 1-10, 10-100, 100-200, 100-1000, 500-5000 µl GILSON
- Micropipetes multicanal 2-20 µl GILSON
- Micropipetes multicanal 20-200 µl HT Discovery Confort
- Microscopi electrònic de transmissió HITACHI, model H-7000
- pHmetre micropH 2000 CRISON
- Pipeta electrònica Pipetboy INTEGRA
- Sistema de digitalització i quantificació per làser Escàner GS-800, BIO-RAD
- Sistema d'exposició de quimioluminescència Molecular Imager Chemi Doc XRS, BIO-RAD
- Sonicador SONIFIER 450 BRANSON
- Speed-Vac ThermoSAVANT VLP80
- Termociclador TECHNE TC-512
- Termobloc TECHNE Dri-Block DB-2A
- TC10™ Automated Cell Counter BIO-RAD

## 2. TÈCNiques DE DNA RECOMBINANT.

### 2.1. Reacció en cadena de la polimerasa, PCR.

La tècnica de PCR (reacció en cadena de la polimerasa) va ser desenvolupada l'any 1987 per Kary Mullis (Mullis, Faloona 1987) i actualment és una de les tècniques més emprades en la Biologia Molecular. És una tècnica ràpida i senzilla que permet l'amplificació de DNA *in vitro*, amb l'objectiu de realitzar processos de clonatge o mutagènesi dirigida de proteïnes.

La PCR consisteix en la hibridació de seqüències complementaries (encebadors o *primers*) a un fragment específic del DNA motlle, del qual s'han separat prèviament les dues cadenes, i la elongació d'aquestes seqüències mitjançant l'enzim DNA-polimerasa i els components necessaris (dNTPs i el cofactor Mg<sup>2+</sup>, principalment). És un procés cíclic controlat per canvis de temperatura adients per a cada fase. El correcte disseny dels encebadors és crucial per a que la tècnica resulti eficient. La incorporació de polimerases termostables així com aparells termocicladors capaços de realitzar canvis cíclics de temperatura a elevada velocitat han permès optimitzar el procés.

#### 2.1.1. Disseny d'encebadors de PCR.

Amb la finalitat d'obtenir el millor rendiment i minimitzar els productes inespecífics, cal tenir en compte una sèrie de factors respecte el disseny dels encebadors:

- El reemplaçament d'aminoàcids ha d'implicar els mínims canvis de nucleòtids possibles, sempre tenint en compte l'ús de codó d'*E. coli* per a cada aminoàcid (ja que aquesta ha estat la soca usada per al clonatge de DNA i expressió de proteïna al llarg d'aquest treball doctoral).
- La especificitat i eficàcia depèn, en part, de la longitud dels encebadors, que ha de ser d'entre 20-30 nucleòtids.
- La temperatura d'hibridació ( $T_a$ , o d'*annealing*) d'ambdós encebadors han de ser similars, a més d'igual o superior a 50 °C. La  $T_a$  sol considerar-se 5 °C per sota de la temperatura de fusió ( $T_m$ , o de *melting*) dels encebadors; i pot calcular-se segons la fórmula:

$$T_m = 4x(G + C) + 2x(A + T)$$

on G, C, A i T indiquen, respectivament, el nombre de nucleòtids de guanina, citosina, adenina i timina en la regió de solapament.

- Els encebadors han de contenir un 45-60 % en G/C, sobretot a l'extrem 3', intentant evitar quatre o més A/T consecutives. Aquest detall és important per a l'estabilització del híbrid de DNA i la unió de la polimerasa, ja que aquests dos nucleòtids estableixen un triple enllaç d'hidrogen entre ells, mentre que la parella A/T tan sols dos.
- Els encebadors han de complementar a una seqüència única en el DNA motlle, per així evitar inespecificitats.
- Minimitzar les estructures secundaries intramoleculares i les possibles hibridacions entre ambdós encebadors.

### 2.1.2. Mutagènesi Dirigida.

#### 2.1.2.1. Reacció de mutagènesi.

La mutagènesi dirigida és una de les múltiples aplicacions de la PCR, la qual permet introduir canvis específics dins la seqüència de nucleòtids d'un determinat gen, amb la finalitat d'obtenir una proteïna mutant en un o més residus. El procés es realitza directament sobre un DNA plasmídic sencer com a motlle, de forma que s'estalvien els passos de lligació posterior.

Per a realitzar mutagènesi dirigida s'ha fet ús del kit *Quikchange® Multi Site-Directed Mutagenesi* (Agilent). A diferència d'altres mètodes, aquest kit utilitza tan sols un únic encebador que conté el canvi nucleotídic, el qual es traduirà en el canvi d'aminoàcid desitjat, i que hibrida sobre un DNA plasmídic de cadena senzilla (ssDNA).

Seguint les instruccions del Manual *Quikchange®*, s'ha realitzat la següent mescla de reacció de PCR mutagènica:

2.5 µl	de tampó de reacció 10x <i>QuikChange Multi reaction buffer</i>
0.75 µl	de <i>QuikSolution</i>
x µl	de dsDNA motlle (100 ng)
x µl	d'encebador mutagènic (100 ng)
1 µl	de barreja de nucleòtids trifosfats (dNTPs) <i>QuickChange</i>
x µl	d'aigua Milli-Q estèril (fins a un volum final de 25 µl)
1 µl	de polimerasa <i>QuikChange® Multi enzyme blend</i>

A continuació, la reacció s'incuba al termociclador seguint el cicle de PCR següent:

Fase	nº de cicles	Temperatura (°C)	Temps (min)	Descripció
1	1	95	1	Desnaturalització inicial
2	30	95	1	Desnaturalització
		55	1	Hibridació
		65	2/Kb plasmidi	Elongació
3	1	65	5	Extensió final

És necessari, sobretot al realitzar per primera vegada una mutagènesi dirigida, realitzar controls positius de la reacció i de la transformació. El mateix kit de mutagènesi conté DNA motlle i encebadors control per a verificar l'eficiència de la PCR i dels seus components.

#### 2.1.2.2. Digestió amb *DpnI*.

Un cop feta la mutagènesi, és important eliminar les cadenes de DNA parental, ja que aquestes no contenen la mutació i, tot i ser mínima la quantitat respecte el producte de PCR final, podrien donar lloc a colònies transformants no mutades. El DNA parental difereixen de les sintetitzades per PCR en la metilació, ja que les metilases cel·lulars (els enzims encarregats de la metilació) no són presents a la reacció de PCR, de manera que les cadenes sintetitzades *in vitro* (i mutades) no es trobaran metilades. L'enzim endonucleasa *DpnI* reconeix i talla el DNA metilat, evitant falses colònies en la transformació dels productes de PCR a *E. coli*.

Segons les instruccions del manual de *Quikchange*, es realitza la digestió dels productes de PCR indicada:

- Afegir 1µL de l'enzim de restricció *DpnI* a cada reacció d'amplificació.
- Pipetejar suaument la mescla i incubar-la immediatament a 37 °C durant 1 h.

#### 2.1.2.3. Transformació productes de PCR.

El kit *Quikchange® Multi Site-Directed Mutagenesi* conté, també, les cèl·lules ultracompetents XL10-Gold® ja preparades per a rebre el ssDNA producte de PCR. De manera que, *in vivo*, es forma i s'estabilitza la doble cadena de DNA plasmídic (dsDNA), obtenint colònies transformants a punt per ser analitzades o per extraure'n el DNA mutat i prosseguir amb el procés d'expressió i purificació pertinent.

El protocol de transformació és molt semblant al descrit a l'apartat següent (2.2.2), excepte algun petit canvi detallat en el Manual *Quikchange*®.

## **2.2. Introducció de DNA forani a cèl·lules bacterianes.**

Existeixen varis mètodes (conjugació, transducció...) per a introduir un vector amb el gen d'interès dins d'una soca bacteriana, però la més emprada és la transformació, degut a la seva senzillesa i varietat de controls a realitzar. La transformació consisteix crear porus a la paret bacteriana que permetran l'entrada del DNA forani a l'interior de la cèl·lula.

### **2.1.3. Preparació de cèl·lules competents d'*E. coli*.**

Per a la transformació, cal que les cèl·lules siguin competents, és a dir, han d'estar preparades per a poder introduir el DNA extern i s'aconsegueix debilitant la seva paret cel·lular, el mètode més utilitzat és del CaCl<sub>2</sub> (Hanahan 1983) i consisteix en:

1. Picar una colònia en placa de la soca mare i inocular en 5 mL de medi LB estèril.
2. Incubar màxim 15 h en agitació forta (250 rpm) a 37 °C, per promoure un cultiu saturat.
3. Inocular, en un volum final de 50 mL, una dilució 1:100 en medi LB i incubar a les mateixes condicions anteriors fins arribar a una DO<sub>600</sub> ~ 0.4, punt de creixement exponencial.
4. Transferir el cultiu a un tub de propilè estèril i refredat prèviament. Deixar en gel mínim 15 min.
5. Centrifugar el cultiu a 3000 *g* durant 15 min, a 4 °C.
6. Eliminar el sobrenedant per decantació i assecar el precipitat per inversió durant 5 min.
7. Resuspendre el precipitat suaument amb 25 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM, estèril i prèviament refredat. Deixar en gel mínim 15 min.
8. Centrifugar el cultiu repetint els passos 5 i 6.
9. Resuspendre el precipitat suaument amb 2.5 mL de CaCl<sub>2</sub> 100 mM, estèril i prèviament refredat. Deixar en gel mínim 1 h.
10. Aliquotar 100 µl de competents en eppendorfs estèrils on s'hi ha afegit, prèviament, glicerol estèril per a obtenir una concentració final del 15%.
11. Congelar amb N<sub>2</sub>-líquid i guardar alíquotes a -80 °C.

### **2.1.4. Transformació de cèl·lules competents d'*E. coli*.**

En aquest treball de tesi s'ha utilitzat el mètode de xoc tèrmic, basat en canvis bruscs de temperatura per a afavorir l'entrada del vector dins la cèl·lula competent. El protocol a seguir és el següent:



1. Descongelar les alíquotes de competents necessàries (cada alíquota servirà per a una transformació) deixant-les en gel aproximadament 20 min.
2. Afegir a l'alíquota 50 ng de DNA i mesclar per inversió suaument.
3. Incubar en gel durant mínim 30 min.
4. Xoc tèrmic:
  - Transferir l'alíquota 2 min al bany a 42 °C.
  - Transferir ràpidament a gel i mantenir-les durant 5 min.
5. Afegir un 1 mL de medi LB estèril, escalfat prèviament a 37 °C, a cada alíquota i incubar 1 h al bany a 37 °C i amb agitació suau.
6. Plaquejar 100 µl de la solució en placa de LB sòlid amb l'antibiòtic adequat i deixar reposar a temperatura ambient (TA).
7. Incubar la placa a 37 °C durant aproximadament 16 h.

En cas d'esperar un baix rendiment de transformació, és aconsellable concentrar la solució 10 vegades abans de plaquejar-la. Per fer-ho, centrifugar la solució 30 seg a 6000 *g* i extraure la quantitat necessària de sobrenedant per tal de resuspendre les cèl·lules en un volum de 100 µl, i plaquejar.

A més, és recomanable realitzar controls de transformació. Un control negatiu sense afegir DNA a les cèl·lules competents, i un control positiu transformant amb un DNA ja comprovat prèviament.

## **2.2. Extracció de DNA plasmídic de cèl·lules d'*E. coli*.**

Una miniprep és l'extracció de DNA plasmídic de l'interior de cèl·lules bacterianes, en aquest cas d'*E. coli*, partint d'un volum de cultiu petit. Per a fer-ho, es parteix d'un inòcul de 5 mL de medi LB estèril, incubat màxim 15 h en agitació forta (250 rpm) a 37 °C, per promoure la saturació del cultiu. A partir d'aquí, s'ha utilitzat el kit *Real Miniprep Turbo Kit* (REAL Laboratory), basat en el mètode de llisi alcalina (Birnboim, Doly 1979).

## **2.3. Seqüenciació del DNA.**

La seqüenciació de DNA s'ha realitzat amb la finalitat de comprovar les mutacions introduïdes per mutagènesi dirigida, i el clonatge satisfactori de gens codificants dins de diferents vectors d'expressió.

La seqüenciació s'ha dut a terme per el Servei de Genòmica de la UAB o de la Clínica Mayo (USA), tots dos mitjançant el mètode de Sanger (Sanger, Coulson 1975).

#### 2.4. Determinació espectrofotomètrica de la concentració de DNA.

La concentració d'una mostra de DNA es pot mesurar mitjançant l'espectrofotòmetre, utilitzant una cubeta de quars, o bé mitjançant el nanodrop, en el que s'aplica 2 µl de mostra. L'espectre d'absorbància s'enregistra de 200 a 320 nm. Una unitat d'absorbància a 260 nm equival aproximadament a 50 µg/mL de ds-DNA i a 30 µg/mL de ss-DNA. La puresa del DNA es pot valorar amb els coeficients següents:

Coeficient	Valor	Indicador de puresa
260/280	1.8	DNA pur
	< 1.8	Contaminació per proteïnes
	> 1.8	Contaminació per RNA
260/230	1.8 – 2.2	DNA pur
	< 1.8	Contaminació per sals.

### 3. SISTEMES D'EXPRESSION I PURIFICACIÓ.

#### 3.1. Soques d'*Escherichia coli*.

Totes les soques d'*E. coli* utilitzades per a l'expressió heteròloga de les diferents proteïnes treballades durant aquesta tesi doctoral són sistemes del tipus DE3, que contenen el gen de la RNA polimerasa del bacteriòfag T7(DE3) inserit al seu genoma sota el control del promotor de l'operó *lac*, induïble per IPTG. D'aquesta manera, s'evita l'expressió basal del gen d'interès i la inducció és iniciada externament a condicions òptimes.

##### 3.1.1. Soques d'*E. coli* per al clonatge i extracció de DNA plasmídic.

###### - **XL-1blue.**

Genotip: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15 Tn10* (Tet<sup>R</sup>)].

Aquesta soca és deficient en la endonucleasa *endA*, el qual millora molt la qualitat de les minipreps de DNA. També és deficient en el gen de recombinació *recA*, augmentant l'estabilitat dels inserts. La mutació *hsdR* preveu l'acció de la endonucleasa *EcoK* sobre el DNA clonat. Presenta resistència a tetraciclina.

###### - **XL10-Gold.**

Genotip: Tet<sup>R</sup>  $\Delta$ (*mcrA*)183  $\Delta$ (*mcrCB-hsdSMR-mrr*)173 *endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte* [F' *proAB lacI<sup>q</sup>ΔM15 Tn10* (Tet<sup>R</sup>) Amy Cam<sup>R</sup>].

Aquesta soca ha estat dissenyada per a transformar molècules de DNA amb una elevada eficiència, gràcies al fenotip Hte (*High transformation efficiency*). Són ideals per a la construcció de llibreries de DNA plasmídic. Presenten resistència a tetraciclina i cloramfenicol; i, com la XL1-blue, és deficient en *endA* i mutada en *hsdR*, millorant la qualitat de les minipreps i estabilitzant el DNA clonat.

##### 3.1.2. Soques d'*E. coli* per a l'expressió heteròloga de proteïnes.

###### - **Origami2(DE3).**

Genotip:  $\Delta$ (*ara-leu*)7697  $\Delta$ *lacX74 ΔphoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL* F'[*lac<sup>+</sup>lacI<sup>q</sup>pro*] (DE3) *gor522::Tn10 trxB* (Str<sup>R</sup>, Tet<sup>R</sup>).

Aquesta soca derivada de l'*E. coli* K12 presenta mutacions en els gens de la tioredoxina reductasa (*trxB*) i de la glutatió reductasa (*gor*). Ambdós deficiències afavoreixen un ambient oxidatiu en el citoplasma d'*E. coli*, beneficiant el correcte plegament de proteïnes que presenten ponts disulfur. Presenta resistència a la tetraciclina i l'estreptomicina, però a diferència de la soca Origami(DE3) original, és sensible a la kanamicina degut a la mutació *gor*.

- **soluBL21(DE3).**

Genotip: F- *ompT hsdS<sub>β</sub> (r<sub>β</sub>- m<sub>β</sub>- ) gal dcm* (DE3).

Aquesta soca conté deleccions de les proteases *OmpT* i *lon*, reduint el potencial de degradació de proteïnes recombinants dins la cèl·lula. A diferència de l'original BL21(DE3), conté mutacions no caracteritzades que afavoreixen la solubilització de proteïnes que habitualment s'expressen de forma insoluble.

- **C41(DE3).**

Genotip: F- *ompT hsdS<sub>β</sub> (r<sub>β</sub>- m<sub>β</sub>- ) gal dcm* (DE3).

Aquesta soca deriva de la BL21(DE3), també presenta les deleccions a les proteases *lon* i *OmpT*; i, com a mínim, té una mutació no caracteritzada, la qual preveu la mort cel·lular associada a l'expressió de proteïnes recombinants tòxiques.

### 3.2. Manteniment soques bacterianes.

Les soques bacterianes, ja siguin transformades o no, es poden conservar en placa de medi LB sòlid durant un període de 15 dies a 4 °C.

#### 3.2.1. Glicerinats 15%.

Per a conservar-les llargs períodes de temps (més de 2 anys), és necessari guardar les soques en forma de glicerinats al 15 %. Així, en un crio-vial es mesclen 300 µL de glicerol 50% estèril i 700 µL de cultiu saturat. Es barreja suaument i es congela ràpidament en N<sub>2</sub>-líquid per a guardar-ho a -80 °C. A l'hora de necessitar-ne, sense arribar a descongelar la solució, es pica el glicerinat amb una nansa de Kolle estèril i s'inocula en medi LB líquid.

### 3.3. Medis de cultiu.

Per al creixement bacterià s'usa un medi de cultiu, sòlid o en solució, a pH fisiològic i que conté els nutrients necessaris per a la divisió cel·lular.

#### 3.3.1. Medi líquid.

##### 3.3.1.1. Medi LB.

El medi de cultiu més habitual i emprat de forma general en aquesta tesi és l'LB (Luria-Bertani). Per a la preparació d' 1 L d'LB:

10 g	de triptona
5 g	d'extracte de llevat
10g	de NaCl
900 mL	d'aigua Milli-Q

Agitar fins a dissoldre completament, ajustar a pH 7.4 i enrasar fins a 1 L amb aigua Milli-Q. Seguidament s'esterilitza per un cicle d'autoclau i, si cal, es guarda a 4 °C fins a usar-lo.

##### 3.3.1.2. Medi 2xYT

A diferència de l'LB, l'2xYT és més ric en nutrients, resultant en una major densitat cel·lular i períodes de creixement d'*E. coli* més llargs. Per això, l'2xYT és útil per a obtenir majors rendiments d'expressió de proteïnes. La seva recepta per a un 1 L és la següent:

16 g	de triptona
10 g	d'extracte de llevat
5g	de NaCl
900 mL	d'aigua Milli-Q

Agitar fins a dissoldre's, ajustar a pH 7.4 i enrasar fins a 1 L amb aigua Milli-Q. Seguidament s'esterilitza per un cicle d'autoclau i, si cal, es guarda a 4 °C fins a usar-lo.

#### 3.3.2. Medi sòlid.

Per aïllar colònies d'*E. coli* després de ser transformades o crescudes en medi líquid, és adequat l'ús de plaques de petri amb medi de cultiu sòlid d'LB. El procediment és el mateix que el protocol de medi líquid d'LB però s'hi afegeix agar al 15 % (p/v), insoluble a TA. Seguidament, la mescla s'autoclava aconseguint la dissolució de l'agar i

l'esterilització. Al temperar-se, s'afegeixen els antibiòtics pertinents i es plaqueja en condicions estèrils. Un cop el medi s'ha refredat i gelificat, es desen les plaques a 4 °C fins a ser usades. Es recomana no guardar les plaques més enllà dels 20 - 30 dies de la seva preparació.

### 3.3.3. Antibiòtics.

Els antibiòtics són substàncies químiques que inhibeixen el creixement bacterià o directament causen la seva mort, ja que interfereixen sobre processos cel·lulars vitals. Els DNA plasmídics de clonatge i expressió contenen un gen de resistència per a un determinat antibiòtic, de forma que permeten una selecció positiva d'aquelles soques que han introduït o expressen el gen forani.

Els antibiòtics més utilitzats en la biologia molecular es troben detallats a la taula següent, així com el seu mecanisme d'acció:

Antibiòtic	Concentració de treball (µg/ml)	Dissolvent	Mecanisme d'acció
<b>Cloramfenicol (Cm)</b>	170	Etanol 100%	Inhibició del ribosoma per unió a la seva subunitat 50s.
<b>Kanamicina (Kn)</b>	50	Aigua Milli-Q	Inhibició del ribosoma per unió a la seva subunitat 30s.
<b>Tetraciclina (Tet)</b>	50	Etanol 50%	Inhibició del ribosoma per unió a la seva subunitat 30s.
<b>Ampicil·lina (Amp)</b>	50	Aigua Milli-Q	Inhibeix la síntesi de peptidglicà.
<b>Estreptomicina (St)</b>	60	Aigua Milli-Q	Inhibició del ribosoma per unió a la seva subunitat 30s.

### 3.4. Vectors d'expressió.

Els vectors d'expressió usats en aquestes tesi doctoral són DNA plasmídics optimitzats per a una fàcil inserció i expressió de gens específics dins la cèl·lula hoste. Els vectors solen ser de grandària petita (de 3 a 6 kb), i contenir poc més que els gens essencials per al clonatge de DNA: un origen de replicació (ORI), un gen de resistència a antibiòtic (per exemple Tet<sup>R</sup>), la regió d'inserció de DNA exogen (MCS, *Multiple Cloning Site*), i un terminador de la transcripció.

Tots els vectors utilitzats per a l'expressió heteròloga de les diferents proteïnes treballades durant aquesta tesi doctoral són derivats del sistema de vectors pET (origen de replicació pBR322), sent compatibles per a ser expressats en soques DE3 ja que el

sistema pET conté el promotor T7 i l'operó *lac*, específics del gen de la RNA polimerasa T7, inclòs en el genoma de la soca.

**- pETtrx\_1a.**

El vector pETtrx\_1a (Figura M. 1-A) és relativament gran, de 6401 pb, i permet seleccionar els clons transformants gràcies a la seva resistència a l'antibiòtic kanamicina (Kn<sup>R</sup>). Aquest plasmidi permet l'expressió citoplasmàtica de la proteïna recombinant scFv com a fusió a la tioredoxina (*trx*), la qual presenta, a més d'activitat disulfur-isomerasa, activitat xaperona (Jurado, de Lorenzo & Fernandez 2006). A més del mòdul proteic *trx*, conté un cua d'histidines (His<sub>6</sub>) i la diana específica de la proteasa Tev, necessària per obtenir la proteïna scFv final. El gen sintètic codificant per a l'scFv-h3D6, de 750 pb, va ser clonat en *NcoI*-*NotI*, reemplaçant el gen GFP natural del vector i donant lloc al constructe gènic de la proteïna precursora: (His<sub>6</sub>)-*trx*-diana TEV-scFv.

**- pET-12a.**

El vector pET-12a (Figura M. 1-B), de 4674 pb, permet seleccionar els clons transformants gràcies a la seva resistència a l'antibiòtic ampil·lina (Amp<sup>R</sup>). Aquest vector conté el gen *ompT*, que codifica per un mòdul proteic, fusionat a l'extrem N-terminal de l'AL12, i potencia l'exportació cap a l'espai perioplasmàtic, on la proteïna és soluble. A diferència de la proteïna precursora d'scFv-h3D6, aquest constructe no necessita una diana de restricció ja que *ompT* es eliminada per la seva proteasa específica al creuar la membrana citoplasmàtica.

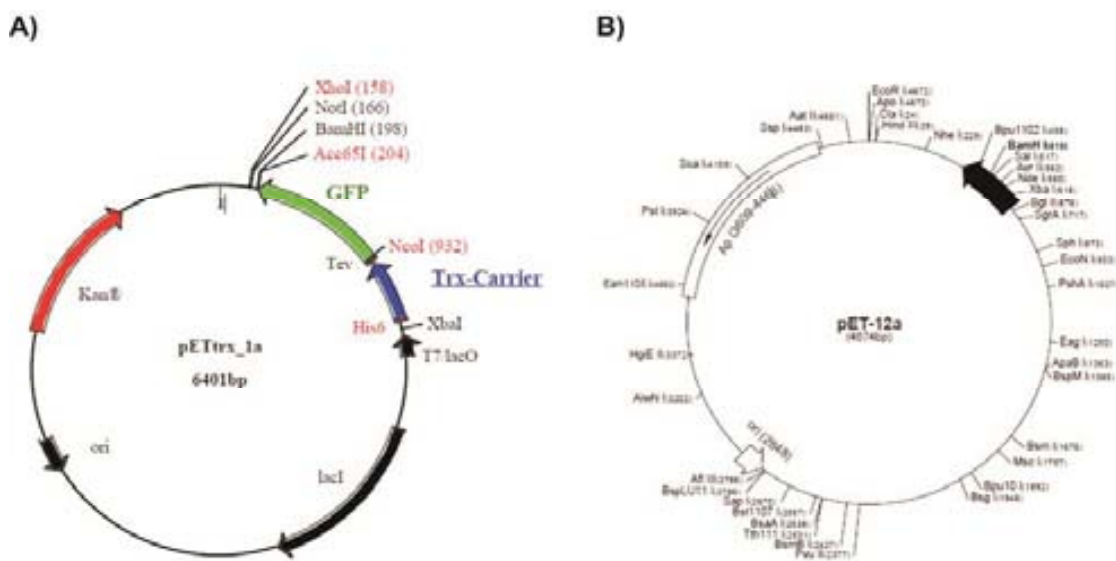


Figura M. 1. Mapa dels vectors d'expressió pET-trx1a i pET-12a.

- **pMHT $\Delta$ 238.**

Aquest vector, derivat del plasmidi pQE30, també amb origen de replicació pRB322, i amb resistència a l'antibiòtic Kn, conté la regió codificant MHT, que sintetitza la proteïna MPB-dianaTEV-(His)<sub>7</sub>-TEV.  $\Delta$ 238 indica que tots els residus del extrem C-terminal de la MPB (*Maltose Binding Protein*), a partir del residu 238, han estat eliminats per tal d'augmentar la quantitat de proteïna soluble. A més, conté la mutació S219V per a limitar la seva auto-inactivació (van den Berg et al. 2006).

### **3.5. Expressió heteròloga de proteïnes.**

Depenent de les propietats de cada tipus de proteïna, el protocol d'expressió heteròloga és diferent. El pas de creixement del cultiu cel·lular i la seva expressió és un dels passos limitants per tal d'obtenir un bon rendiment final en el procés de purificació de proteïnes. A l'h d'expressar una proteïna exògena, s'ha de tenir en compte si la proteïna es dirigeix al citoplasma, periplasma, o a l'exterior de la cèl·lula, i sobretot, si es manté soluble o insoluble. Inclús, certes proteïnes expressades poden arribar a ser tòxiques per a les cèl·lules. Depenent d'aquests factors, i dels constructes emprats, la temperatura i el temps de creixement i inducció del cultiu cel·lular variaran entre proteïnes.

Els protocols d'expressió i purificació de les diferents proteïnes treballades en aquesta tesi doctoral es troben detallades a l'apartat de Materials i Mètodes de cada capítol.

#### **3.5.1. Inducció de l'expressió.**

Malgrat haver provat sistemes d'expressió en medis auto-induïbles, l'expressió de les proteïnes d'aquesta tesi doctoral ha estat induïda mitjançant IPTG (Isopropil  $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosid), un substrat químic capaç d'unir-se al repressor *lac*, permeten l'expressió dels gens que es troben sota control del promotor *lac*. El moment òptim per a la inducció és quan el cultiu d'*E. coli* ha assolit la fase exponencial de creixement, i és determinada espectroscòpicament quan la DO<sub>600</sub> és de 0.6-0.8. És llavors quan s'afegeix l'inductor IPTG a una concentració final generalment de 0.5-1 mM, i es deixa en agitació constant (unes 200 rpm) fins un màxim de 15 h, incubant a la temperatura requerida (20-37 °C).



### **3.5.2. Obtenció del extracte cel·lular.**

Cap de les proteïnes amb les quals s'ha treballat és expressada extracel·lularment, per tant, un cop induïda l'expressió, cal recuperar l'extracte cel·lular del cultiu d'expressió per centrifugació a 5520 *g* durant 30 min a 4 °C, i descartar el sobrenedant per decantació. El pellet de cèl·lules serà resuspès en el tampó adient per a seguir amb el procés de purificació, o bé pot ser congelat amb N<sub>2</sub>-líquid i guardat a -20 °C.

## **3.6. Tècniques de cromatografia líquida.**

Per a la purificació de les diferents proteïnes s'ha emprat una o varies de les tècniques cromatogràfiques descrites a continuació. Cada columna es basa en un mètode de separació diferent, algunes més indicades per a passos inicials de purificació, i altres més indicades per a refinar la puresa de la mostra, o bé, preparar-la per als experiments posteriors. Les cromatografies d'alta resolució estan optimitzades per ser usades en aparells d'FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*). L'acoblament de les columnes a aquests sistemes permet l'automatització del procés, així com la possibilitat de treballar a pressions superiors a l'atmosfèrica, definir protocols específics on controlar els fluxos i els temps de les corregudes, com també indicar els volums de recol·lecció de mostra automàtica. Altres columnes són acoblades a una bomba peristàtica (P-1) per a controlar el flux de la columna, o bé, simplement s'utilitzen a pressió atmosfèrica.

Els protocols, condicions i tampons emprats per a les diferents cromatografies es troben detallats a l'apartat de Materials i Mètodes de cada capítol, en funció del procés de purificació de cada una de les proteïnes treballades en aquesta tesi doctoral.

### **3.6.1. Cromatografia d'afinitat**

#### **3.6.1.1. Cromatografia d'afinitat amb histidines.**

La tècnica d'IMAC (*Immobilized Metal ion Affinity Chromatography*) es basa en l'afinitat de cadenes laterals específiques de residus proteics per interaccionar amb ions metàl·lics immobilitzats a la reïna cromatogràfica. Aquestes columnes són ràpides i senzilles d'usar, i resulten molt útils en els primers passos de purificació, ja que en un sol pas s'eliminen gran part de proteïnes contaminants.

Per a diferents processos de purificació descrits al llarg de la tesi, s'ha emprat les columnes d'IMAC HisTrap™ HP-5 mL amb una reïna de Sepharose que conté ions Níquel immobilitzats (GE Healthcare), que interacciona específicament amb residus d'histidina. Sovint, a les proteïnes recombinants, se'ls hi afegeix una cua d'histidines (His<sub>6</sub>-tag)

normalment a l'extrem N-terminal, per tal d'assegurar una forta interacció amb la columna i, així, facilitar la seva purificació respecte la resta de proteïnes del extracte cel·lular. La capacitat d'unió d'aquestes columnes és de 40 mg d'(His)<sub>6</sub>-tag/mL de reïna. Un cop feta la separació, la cua d'histidines serà eliminada per proteòlisi específica.

La recuperació de les proteïnes unides específicament a la reïna, es duu a terme mitjançant l'aplicació de tampons amb concentracions creixents d'imidazol, l'anell aromàtic present a les cadenes laterals d'histidina i el que competeix per els ions metàl·lics de la reïna.

Aquesta tècnica ha estat emprada per a la purificació del fragment d'anticòs scFv-h3D6 i la proteasa TEV, i el seu protocol exacte es troba detallat a l'apartat de Materials i Mètodes del Capítol 1.

#### 3.6.1.2. Cromatografia atmosfèrica d'afinitat per lipopolisacàrids.

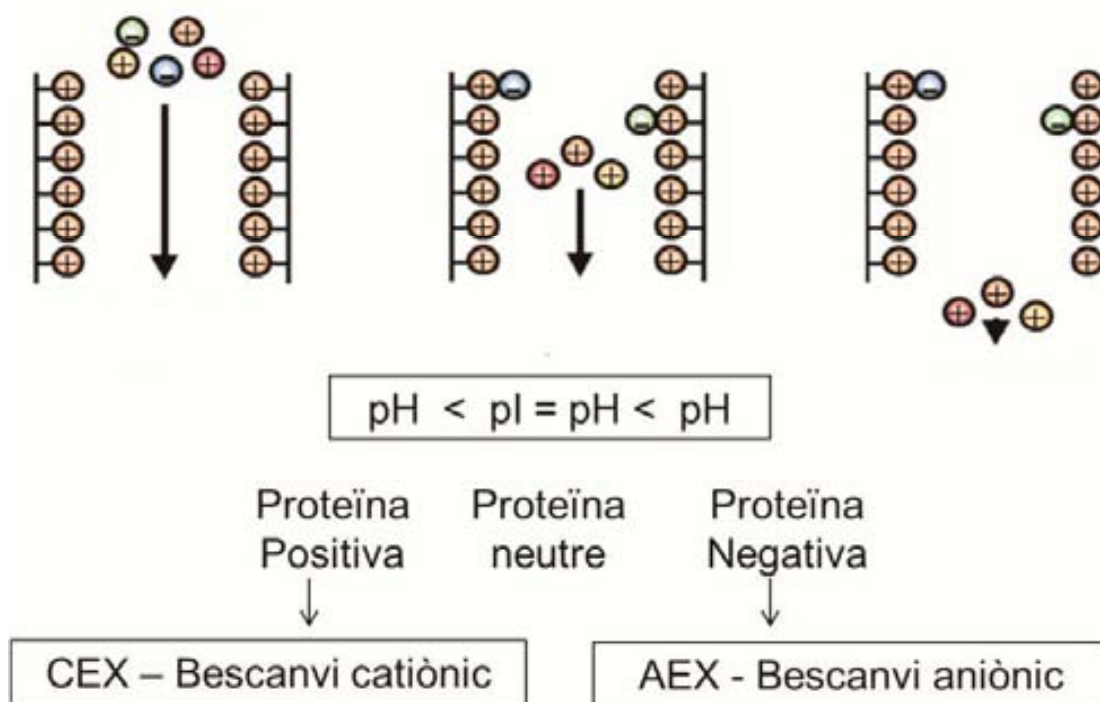
Per a l'extracció de lipopolisacàrids (LPSs) de les mostres proteïques, s'han emprat les columnes d'afinitat d'LPSs *Detoxi-gel endotoxin removing columns* (Thermo Scientific). Aquestes columnes contenen una reïna d'agarosa en la que es troba immobilitzat el lligand polimixina B, el qual uneix la porció de lípid A dels LPSs. La columna és capaç d'unir  $\geq 9995$  UE (unitats d'endotoxina) d'un volum de mostra de 5 mL que conté 10000 UE. La quantitat d'LPS per mL de mostra proteïca depèn del volum de cultiu d'expressió cel·lular inicial, i s'haurà de tenir en compte en el moment de la seva extracció. La columna es regenera amb el detergent sodi desoxicolat al 1%, i és també amb aquest amb el qual es trenca la interacció entre els LPSs i la reïna, extraient-los de la columna, un cop la mostra ja ha passat per la columna sense interaccionar i ha alliberat els LPSs. Un dels inconvenients d'aquesta cromatografia és la dificultat de quantificar els LPSs, per tant, s'ha de seguir un protocol estricte i repetitiu per assegurar que la mostra és troba lliure d'LPSs i sense traces del detergent que s'usa per tal d'equilibrar la columna inicialment.

Aquesta tècnica ha estat emprada per a la purificació del fragment d'anticòs scFv-h3D6, i el seu protocol exacte es troba detallat a l'apartat 3.6.1 de Materials i Mètodes del Capítol 1.

#### **3.6.2. Cromatografia de bescanvi iònic d'alta resolució.**

La cromatografia de bescanvi iònic separa biomolècules en funció de la seva càrrega neta superficial. És una de les tècniques més usades per a la purificació de proteïnes, tan en etapes inicials com finals, ja que té una elevada capacitat d'unió i és molt

resolutiva. Les proteïnes, en funció del contingut en residus àcids o bàsics, presenten una gran varietat de càrrega superficial, i exhibeixen diferents graus d'interacció amb la reïna cromatogràfica, carregada positiva o negativament. Cada aminoàcid ionitzable posseeix un valor de *pKa* diferent, per tant, la càrrega superficial d'una proteïna dependrà totalment del pH del entorn. Segons això, quan el pI d'una proteïna és igual al pH del medi, llavors aquesta no presentarà carrega. Quan el pH es troba per sota del pI, la proteïna presentarà una càrrega global positiva, i viceversa.



**Figura M. 2. Cromatografia de bescanvi iònic.** Exemple il·lustratiu d'una columna de bescanvi aniònic, on la proteïna carregada negativament interacciona amb la reïna de carga positiva. Per gradient de NaCl, aquestes seran eluïdes. Dependent del pH del medi, i del pI de la proteïna, aquesta tindrà una càrrega neta positiva o negativa i, en funció d'aquesta, caldrà emprar un tipus determinat de cromatografia iònica.

Dependent de la càrrega de la proteïna d'interès, utilitzarem un cromatografia de bescanvi catiònic o CEX (*Cation EXchange chromatography*), amb reïna carregada negativament que uneix proteïnes de carga positiva; o bé al contrari, una columna de bescanvi aniònic o AEX (*Anion EXchange chromatography*), amb reïna carregada positivament que uneix proteïnes de carga negativa (Figura M. 2).

L'elució de proteïnes unides s'aconsegueix incrementant la força iònica (o concentració d'NaCl) del tampó, o bé, canviant el seu pH. Al augmentar la força iònica, els ions Na<sup>+</sup> o Cl<sup>-</sup> competeixen per les càrregues superficials de les proteïnes unides, trencant

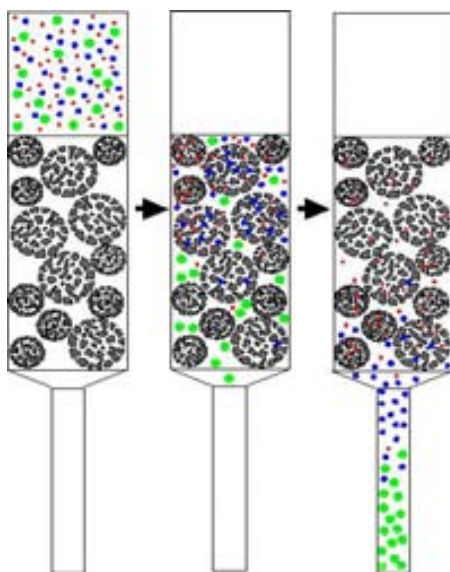
la interacció amb la reïna i eluint-les. Mitjançant diferents formes de gradient de força iònica (lineal, escalat...), les proteïnes seran eluïdes diferencialment, sent les de menor càrrega neta les primeres en sortir de la columna. Una característica important d'aquestes cromatografies és que la mostra s'elueix concentrada respecte els volums inicials.

Aquesta tècnica ha estat emprada per a la purificació del fragment d'anticòs scFv-h3D6 (CEX) i del domini variable AL-12 (AEX), i el seu protocol exacte es troba detallat a l'apartat de Materials i Mètodes del Capítol 1 i 3, respectivament.

### 3.6.3. Cromatografia d'exclusió molecular.

#### 3.6.3.1. Cromatografia d'exclusió molecular d'alta resolució.

La cromatografia d'exclusió molecular (*Size Exclusion Chromatography*, SEC), també nomenada de gel filtració, es basa en la separació de molècules en funció del seu pes molecular. A diferència de les altres cromatografies, les molècules no s'uneixen a la reïna per afinitat ni interacció iònica, sinó que la mostra de proteïna avança dins d'una matriu porosa formada per partícules esfèriques inertes.



**Figura M. 3. Cromatografia d'exclusió molecular.** Exemple il·lustratiu de la fase sòlida amb les partícules poroses a través de les quals les proteïnes avancen, i depenent del seu pes molecular són eluïdes més o menys ràpidament.

Les proteïnes de grandària petita poden passar per dins els porus de les partícules, de forma que el seu pas per la columna és retingut, mentre que les proteïnes grans eviten

els porus i elueixen més ràpidament. Les columnes de SEC difereixen en la grandària o límit d'exclusió dels porus de les partícules, per tant, depenent del pes molecular de la proteïna d'interès, caldrà emprar un determinat tipus de columna (Figura M. 3). La columna es troba equilibrada amb el mateix tampó de la mostra, omplint els espais de la matriu (fase mòbil) i l'interior de les partícules (fase estacionaria). La mostra és eluïda isocràticament, per tant, no és necessari l'ús de diferents tampons durant la separació. La composició del tampó no afecta directament a la resolució de la cromatografia, sempre que tingui una certa força iònica que eviti la interacció inespecífica de les proteïnes amb la reïna. S'obté una resolució òptima quan la mostra ha estat prèviament purificada amb altres tècniques cromatogràfiques, de forma que ja s'han eliminat gran part de les proteïnes de pes similar. Per tant, és recomanable usar la SEC en els últims passos de purificació, ja que amb ella es poden separar monòmers d'agregats i obtenir la proteïna en el mateix tampó de magatzematge. Els únics inconvenients d'aquest tipus de cromatografia són que la mostra s'ha d'aplicar en un volum petit i és eluïda en un volum major.

Aquesta tècnica ha estat emprada per a la purificació del domini variable AL-12, i el seu protocol exacte es troba detallat a l'apartat de Materials i Mètodes del Capítol 3.

### 3.6.3.2. Cromatografia atmosfèrica d'exclusió molecular per intercanvi de tampó.

Per a realitzar canvis de tampó d'una mostra de volum petit, o bé dessalar-la, s'han emprat les columnes d'exclusió molecular PD-10 *Desalting columns* (GE, Healthcare). Aquestes columnes contenen una matriu de Sephadex G-25 Medium, la qual permet separar grups de pes molecular gran (majors de 5 kDa) de substàncies inferiors a 1 kDa (en el nostre cas, el detergent sodi desoxicolat 1% que prové de l'eliminació dels LPSs), mitjançant un canvi de tampó.

La PD10 és una tècnica senzilla, amb un protocol estàndard on tan sols variarà el tampó per el que es vol intercanviar la mostra, i és el següent, expressat en volums de columna (1 VC = 5 mL):

1. Rentar la columna amb 5 VC d'aigua Milli-Q per tal d'eliminar l'etanol emprat per a la seva conservació a 4 °C.
2. Equilibrar la columna amb 5 VC de tampó d'elució.
3. Afegir un volum màxim de 2.5 mL de mostra (si el volum de mostra no és suficient, afegir fins a 2.5 mL amb tampó PBS pH 7.4).

4. Per gravetat, eluir i descartar la fracció de mostra no atrapada a la columna (corresponent al mateix volum de mostra afegit).
5. Per eluir la mostra, afegir 3.5 mL de tampó d'elució i recol·lectar-la en fraccions d' 1 mL.
6. Rentar la columna amb 5 VC d'aigua Milli-Q i conservar la columna a 4 °C en etanol al 25%.

### 3.7. Mètodes d'intercanvi de tampó o extracció de sals.

Sovint és necessari realitzar un canvi de tampó o extraure les sals de la mostra (NaCl, Imidazol...) entre les diferents tècniques del procés de purificació, o bé, per a guardar la mostra proteica pura en el tampó adequat.

Amb aquesta finalitat s'han emprat dos mètodes diferents, depenent del protocol de purificació: la cromatografia atmosfèrica d'exclusió molecular (PD-10), explicada a l'apartat anterior, i la diàlisi.

#### 3.7.1. Diàlisi.

La diàlisi consisteix en aplicar la mostra dins d'un sac de diàlisi o membrana de cel·lulosa, amb porus de grandària inferior al de la mostra proteica, de forma que permet l'intercanvi de tampó mentre la mostra queda dins el sac. La diàlisi es realitza a 4 °C, en agitació suau, i enfront un volum de tampó 500 cops el volum de la mostra, durant mínim 3 h. Per assegurar una bona diàlisi, es recomana fer-ne dues en sèrie ja que el factor és multiplicatiu.

Les proteïnes emprades en aquest treball són majors de 12 kDa, així, els sacs de diàlisi emprats han estat d'una mida d'exclusió de 12-14 kDa (Medicell Membranes Ltd).

Per a dialitzar mostres de volums inferiors a 200 µl, s'han emprat els tubs de diàlisi *MINI Dialysis Units* (G-Biosciences), amb una mida d'exclusió de 8 kDa o 15 kDa, depenent de la proteïna dialitzada.

##### 3.7.1.1. Pretractament dels sacs de diàlisi

Els sacs de diàlisi han de ser preparats abans de ser emprats. Per a fer-ho es segueix el protocol descrit a continuació:

1. Al bunsen, bullir 2-3 m de sac de diàlisi dins d'un erlenmeyer amb 2 L de tampó EDTA 5 mM, pH 8.0.
2. Arribar al punt d'ebullició i mantenir-lo durant uns 5 min, deixar refredar.
3. Decantar el tampó i repetir el procés.
4. Rentar els sacs amb aigua Milli-Q abundant.
5. Guardar els sacs pretractats a 4 °C en 1 L d'aigua Milli-Q, afegir-hi 5 gotes de cloroform.
6. Abans d'usar, rentar els sacs amb aigua Milli-Q i amb el tampó en el qual es farà la diàlisi.

### 3.8. Concentració del volum de les mostres proteiques.

Per a treballar amb volums de mostra més manejables, o bé, per arribar a la concentració de proteïna necessària per a realitzar diferents tècniques, s'han usat els concentradors per a centrífuga *Centrifugal Filters Units Amicon* Ultra-15 mL o Ultra-4 mL (Millipore). Els concentradors són tubs que contenen a l'interior una membrana amb una mida d'exclusió de 10 kDa, on s'aplica la mostra. Per centrifugació, normalment a 2500 rpm i a 4 °C, es concentra la mostra de proteïna. El temps de centrifugació depèn del volum de mostra inicial i de la seva concentració.

### 3.9. Electroforesi en SDS-PAGE.

L'electroforesi en SDS és un dels mètodes més usats en l'anàlisi de proteïnes, i es basa en la separació de proteïnes segons el seu pes molecular, dins d'un camp elèctric. És una electroforesi desnaturalitzant, ja que el detergent SDS, carregat negativament, forma una pel·lícula al voltant de les proteïnes, emmascarant la seva càrrega intrínseca i desplegant-les (Shapiro, Vinuela & Maizel 1967). Com que la quantitat de detergent unit és proporcional a la grandària de la molècula, aquestes avançaran dins del gel en funció de la seva massa molecular, sent les proteïnes més petites les de major mobilitat. L'electroforesi es realitza sobre un suport o gel d'acrilamida, una substància que polimeritza gràcies a l'addició de Persulfat amònic (PA) i TEMED (N, N, N', N'-tetrametilè-diamí), creant una malla porosa, el diàmetre del qual dependrà del percentatge d'acrilamida usat.

El gel d'acrilamida més usat és el discontinu, format per dues fases (o gels) amb percentatges d'acrilamida i pH diferents:

- **Gel separador o inferior:** conté un percentatge d'acrilamida depenent de la mostra a separar i en ell es separaran les molècules segons el seu pes molecular:

% Acrilamida	Rang de separació (kDa)
7	50 - 500
10	20 - 300
12	10 - 200
15	3 - 100

- **Gel concentrador o superior:** conté un tant per cent d'acrilamida estàndard, del 4-5 %, i un pH més àcid que el gel separador. En ell es formen els pous de càrrega de proteïna, permet la concentració de la mostra carregada i proporciona un punt de partida igual per a totes les mostres al aplicar el camp elèctric.

### 3.9.1. Preparació del gel d'acrilamida.

Per a la preparació dels gels s'utilitzen les solucions següents:

- Solució A: 40 % acrilamida/bisacrilamida 37.5/1
- Solució B: Tris/HCl 1.5 M, SDS 0.4 %, pH 8.8
- Solució C: Tris/HCl 0.5 M, SDS 0.4 %, pH 6.8
- PA: Persulfat amònic al 10 % (p/v)
- TEMED

Per a preparar dos gels d'acrilamida al 12, es segueix la recepta següent:

Gel separador	A	B	H <sub>2</sub> O	TEMED	PA
12%	4 mL	2,5 mL	3.5 mL	10 µl	100 µl
Gel concentrador	A	C	H <sub>2</sub> O	TEMED	PA
4%	0.65 mL	1.25 mL	3 mL	5 µl	50 µl

La solució s'aboca dins d'un suport de vidre, de 0.75 mm d'espai buit, i posterior amplada del gel. Primer s'afegeix el gel separador, seguit d'unes gotes d'isopropanol per tal d'eliminar possibles bombolles, evitar el contacte amb l'oxigen atmosfèric, i assegurar que el gel inferior polimeritzi recte. Un cop polimeritzat a TA, es descarta l'isopropanol per decantació i varis rentats amb aigua Milli-Q, i s'afegeix a sobre el gel concentrador amb la pinta com a motlle dels pous de càrrega. Un cop el gel ha polimeritzat a TA, es col·loca dins la cubeta d'electroforesi, la qual s'ha d'omplir de tampó d'electroforesi (TE) adient per a la circulació del corrent elèctric:

- **Tampó d'electroforesi TE 10x, 1L:**

30 g	de Tris/HCl 0.25 M
140 g	de Glicina 2 M
10 g	d'SDS 1 % (p/v)



Abans de carregar les mostres al gel, es preparen amb tampó de càrrega i s'incuben 5 min a 100 °C, per tal de desplegar completament les proteïnes.

- **Tampó de càrrega 4x, 5 ml:**

0.12 g	de Tris/HCl 0.2 M
2.5 g	de Glicerol 50 % (p/v)
0.5 g	d'SDS 10 % (p/v)
0.02 g	de blau de bromofenol 0.4 % (p/v)
300 µl	β-mercaptoetanol 15 % (v/v)

, que conté l'SDS (dodecilsulfat sòdic) per carregar negativament les proteïnes i desplegar-les, β-mercaptoetanol per reduir possibles ponts disulfur, glicerol per a introduir la mostra dins del gel augmentant la densitat, i el colorant blau de bromofenol per a seguir el front d'avançament de l'electroforesi.

Un cop carregades les mostres, s'aplica un amperatge constant de 25 mA/gel, aproximadament durant 1 h, fins que el front arribi al final del gel.

**3.9.2. Tinció i destinció del gel d'acrilamida.**

Quan la separació ja ha finalitzat, es retira el gel de la cubeta i es disposa a ser tenyit. Els gels d'acrilamida es tenyeixen amb el colorant blau de Coomassie, en agitació suau durant aproximadament 15 min, a TA.

- **Tampó de Tinció:**

45 %	de metanol
10 %	d'àcid acètic
45 %	d'aigua destil·lada
0.2 % (p/v)	de Coomassie Brilliant Blue

Per a destenyir el gel, es deixa en agitació en àcid acètic 10 %, o bé, en aigua destil·lada, fins a observar bé les bandes de proteïnes.



## 4. TÈCNiques ESPECTROSCÒPIQUES.

### 4.1. Determinació de la concentració de proteïna.

La concentració de proteïna, igual que la de DNA, es pot mesurar mitjançant l'espectrofotòmetre, utilitzant una cubeta de quars d'1 mL, o bé mitjançant el nanodrop, en el que s'aplica 2 µl de mostra. Les proteïnes absorbeixen llum al ultraviolat gràcies als anells aromàtics dels residus triptòfan, fenilalanina i tirosina, i una certa contribució dels cadenes cistinil, amb un màxim d'absorbància al voltant de 280 nm, en funció del nombre de residus Trp, Tyr i Phe que conté cada proteïna. Coneixent el coeficient d'extinció molar de la proteïna ( $\epsilon$ ) a 280 nm, i aplicant la llei de Lambert-Beer, es pot determinar la concentració en solució de proteïna pura.

$$Abs_{280} = c \cdot l \cdot \epsilon$$

, on  $c$  és la concentració de proteïna, en mols/L; i  $l$  és el pas de llum de la cubeta emprada, en cm.

En funció de la proteïna, els coeficient d'extinció molar usats han estat:

- scFv-h3D6:  $\epsilon_{280}^M = 45330 \text{ u. Abs.} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- scFv-h3D6 experimental:  $\epsilon_{280}^M = 39997 \text{ u. Abs.} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- VL-AL12 i mutants:  $\epsilon_{280}^M = 13610 \text{ u. Abs.} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- Proteasa TEV:  $\epsilon_{280}^M = 13840 \text{ u. Abs.} \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

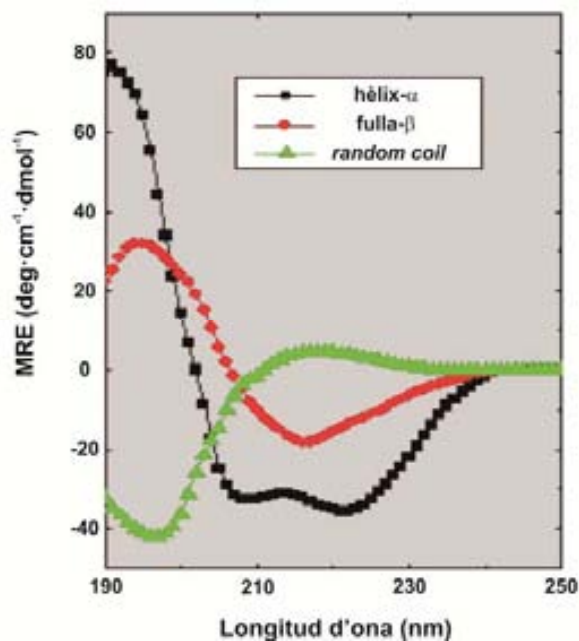
### 4.2. Dicroisme Circular.

El Dicroisme Circular (CD) és una de les tècniques espectroscòpiques emprades per a determinar l'estructura de proteïnes. Freqüentment, s'utilitzen longituds d'ona corresponents al ultraviolat llunyà (de 260 a 190 nm), obtenint l'espectre d'estructura secundària. Però també es pot determinar l'estructura terciària si s'utilitzen longituds d'ona del ultraviolat proper.

La tècnica de CD utilitza un espectrofotopolarímetre, el qual incideix llum polaritzada circularment sobre la mostra proteica. Depenent de la geometria del enllaç peptídic de la mostra, aquesta absorbirà la llum i la dispersarà donant un espectre de plegament determinat (Johnson 1988). A més, el contingut en residus aromàtics i ponts disulfur d'una proteïna, també contribueixen, de forma important, a l'espectre de CD

(Sreerama et al. 1999). La desnaturalització tèrmica per CD llunyà consisteix en obtenir l'evolució d'un punt determinat del espectre en funció de la temperatura de 25 a 90 °C, relacionant-se amb canvis en l'estructura secundària. Un cop la proteïna es troba desplegada, es pot determinar el seu grau de reversibilitat registrant l'espectre de renaturalització a temperatura de 25 °C, o bé tota la corba sencera.

La figura M. 4 mostra l'espectre de CD típic de l'estructura secundària de proteïna en hèlix- $\alpha$ , fulla- $\beta$ , o *random-coil*.



**Figura M. 4. Espectre de CD de diferents estructures secundàries de proteïnes.** Hèlix- $\alpha$  (negre), fulla- $\beta$  (vermell) i *random coil* (verd). *Figura adaptada de www.ap-lab.com.*

La tècnica de CD ha estat emprada per l'estudi de l'estructura secundària del fragment d'anticòs scFv-h3D6 i del domini variable AL-12, les condicions de la mostra i els paràmetres d'adquisició dels diferents espectres es troben detallats a l'apartat de Materials i Mètodes del Capítol 1 i 3, respectivament.

### 4.3. Fluorescència dels residus de triptòfan.

La fluorescència consisteix en l'emissió de radiació electromagnètica per part d'una molècula que passa d'un estat d'energia excitat, produït per l'absorció a una determinada longitud d'ona, al estat fonamental.

La fluorescència intrínseca dels residus aromàtics (Trp, Tyr i Phe) és una de les propietats proteïques més emprades per a monitoritzar, mitjançant un fluorímetre, processos de plegament i desplegament de proteïnes. Concretament, la fluorescència del

residu triptòfan resulta molt sensible a pertorbacions en l'estructura terciària de proteïnes, ja que sovint es troba força enterrat dins el nucli hidrofòbic. El seu anell aromàtic, al ser excitat a una longitud d'ona de 290 nm, emet fluorescència a una longitud d'ona d'entre 335 i 355 nm. De forma general, es considera que el màxim d'emissió del Trp a l'estat natiu és a 240 nm, mentre que a l'estat desplegat és a 255 nm, degut a l'exposició del residu al solvent. La magnitud de desplaçament del màxim depèn de com estava d'enterrat el Trp a l'estat natiu, i de si la proteïna arriba a desplegar completament, o només parcialment. Tot i això, la intensitat de l'emissió de fluorescència depèn de l'entorn local dels residus Trp dins l'estructura proteica, i, per aquesta raó, no es pot predir en quin sentit variarà la fluorescència de cada residu Trp de la proteïna durant el procés de desplegament. Degut a que un residu concret pot augmentar la seva intensitat durant el procés de desplegament, mentre que un altre la pot disminuir, quan en una proteïna hi ha més d'un residu Trp la mesura de la intensitat de fluorescència no pren sentit, i és el desplaçament del màxim cap al vermell el que ens donarà informació útil (Royer 1995).

Així com la desnaturalització per CD ens aporta informació a nivell de canvis en l'estructura secundària, la fluorescència ens permet seguir els canvis que pateix l'estructura terciària durant el procés de desnaturalització o renaturalització.

La tècnica de fluorescència ha estat emprada per l'estudi de l'estructura terciària del fragment d'anticòs scFv-h3D6 i del domini variable AL-12, les condicions de la mostra i els paràmetres d'adquisició dels diferents espectres es troben detallats a l'apartat de Materials i Mètodes del Capítol 1 i 3, respectivament.

#### **4.3.1. Desnaturalització química i obtenció de paràmetres termodinàmics.**

La desnaturalització química, mitjançant urea, és un dels principals mètodes per a estudiar l'estabilitat proteica i el procés de desplegament de proteïnes, i la possibilitat de detectar estats intermedis de la via de plegament. La corba de desnaturalització química pot ser adquirida mitjançant l'espectroscòpia de fluorescència o de CD, enregistrant l'efecte de la urea sobre l'estructura terciària i secundària de la molècula, respectivament.

A partir del ajust de corba de desnaturalització, seguida per fluorescència dels residus Trp, a una equació de dos o tres estats, per exemple, es poden extraure els paràmetres termodinàmics de la proteïna, com ara el valor de  $[D]_{50\%}$  (concentració de desnaturalitzant en la qual el 50 % de la proteïna es troba desplegada), de  $\Delta G_{N-U}$  (energia lliure de plegament), i el valor de  $m_{N-U}$  (diferència en l'accessibilitat al solvent entre l'estat natiu i el desplegat, i directament relacionat amb la cooperativitat de la molècula).

Tot i ser d'ús general, la base molecular per la qual la urea desnatura proteïnes és desconegut. Existeixen dues vessants teòriques, la primera defensa la interacció directa entre la urea i la molècula, on la urea competeix amb les interaccions natives per pont d'hidrogen i salines, afavorint el desplegament i estabilitzant l'estat desnaturat. Per altra banda, la segona teoria proposa que la urea afecta indirectament a la proteïna alterant el seu entorn o solvent, segregant l'aigua de solvatació, i facilitant l'exposició de residus hidrofòbics enterrats (Bennion, Daggett 2003, Das, Mukhopadhyay 2009).

La tècnica de fluorescència ha estat emprada per a registrar la corba de desnaturació química del domini variable AL-12. Les condicions de la mostra i els paràmetres d'adquisició dels diferents espectres, així com els ajustos per a l'obtenció dels diferents paràmetres termodinàmics, es troben detallats a l'apartat de Materials i Mètodes del Capítol 3.

#### **4.4. Fluorescència dels fluoròfors Tioflavina T i ANS.**

A part de la fluorescència intrínseca de les proteïnes, deguda als seus residus aromàtics, és possible estudiar els canvis conformationals de les proteïnes mesurant l'emissió de fluoròfors que interaccionen específicament amb certes regions o estats conformationals de les molècules.

En aquesta tesi s'han emprat els fluoròfors Tioflavina T i ANS.

##### **- Tioflavina-T (ThT).**

La ThT incrementa la seva intensitat de fluorescència al unir-se a agregats amiloides, per això és dels reactius més usats per a estudiar cinètiques de formació amiloide. El fluoròfor és excitat a una longitud d'ona de 450 nm, el seu espectre d'emissió va de 470 a 530 nm, amb un màxim de fluorescència a 482 nm.

##### **- ANS.**

L'ANS (àcid 8-anilin-naftalè-sulfònic) és un compost aromàtic que interacciona amb regions hidrofòbiques exposades al solvent, donant lloc a un augment de la seva fluorescència. La longitud d'ona d'excitació del ANS és a 388 nm, donant un espectre d'emissió de 400 a 600 nm, amb el màxim a 470 nm.

La tècnica de fluorescència per ThT i ANS ha estat emprada per als assajos d'agregació del fragment d'anticòs scFv-h3D6. Les condicions de la mostra i els

paràmetres d'adquisició dels diferents espectres es troben detallats a l'apartat de Materials i Mètodes del Capítol 1.

#### 4.5. Espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier (FTIR).

L'espectroscòpia d'infraroig és un dels mètodes clàssics per a determinar l'estructura de molècules, degut a la seva sensibilitat a la composició química i variacions en l'entorn. L'absorció de radiació infraroja dona lloc a transicions vibracionals dels enllaços covalents de les molècules. Per a l'estudi de proteïnes és treballa a l'infraroig mitjà, concretament a la regió de vibració del enllaç amida I, situada entre els nombres d'ona 1700 i 1600  $\text{cm}^{-1}$ . La freqüència vibracional de l'amida I és deguda, principalment, al grup carbonil (C=O) de cada enllaç peptídic de la proteïna, i la seva força depèn directament de la conformació de l'esquelet polipeptídic, relacionat amb l'estructura secundària.

La tècnica de FTIR és de les poques que permet estudiar l'estructura d'agregats insolubles, com ara la de les fibres amiloides. Degut a que la conformació en fulla- $\beta$  és característica dels diferents tipus d'agregats proteics, monitoritzar els seus canvis durant el procés d'agregació permet descriure el panorama conformacional de la via d'agregació. De forma general, durant el procés d'agregació, la posició del màxim de l'amida I es desplaça cap a nombres d'ona més baixos, degut a l'increment de ponts d'hidrogen, de la longitud de la fulla- $\beta$  estesa, o del número de cadenes- $\beta$  (Zandomenighi et al. 2004). Per aquesta raó, aquesta tècnica és molt apropiada per a diferenciar fulles- $\beta$  amb diferent grau d'empaquetament i seguir processos d'agregació.

Un dels passos limitants del FTIR, és l'assignació dels components de la banda d'amida I' als diferents elements d'estructura secundària de la proteïna, sent molt important per a una correcta interpretació dels resultats obtinguts (Arrondo et al. 1993, Arrondo, Goni 1999).

L'espectroscòpia d'infraroig requereix d'una gran concentració de mostra per tal de que la relació senyal/soroll sigui suficientment elevada i significativa. A més, la banda de vibració de l'enllaç O-H de les molècules d'aigua, localitzada a l'amida II (centrada a 1545  $\text{cm}^{-1}$ ), emmascara la zona d'absorció del enllaç amida I, dificultant l'obtenció de informació sobre les conformacions proteiques. Per aquesta raó, cal intercanviar els àtoms d'hidrogen per deuteri, o aigua deuterada ( $\text{D}_2\text{O}$ ), mitjançant els tubs de diàlisi *MINI Dialysis Units* (G-Biosciences), o bé, liofilitzant les mostres i resuspeses en  $\text{D}_2\text{O}$ . La banda amida I obtinguda a partir de mostres deuterades es denomina amida I'. Les mostres es col·loquen entre dos finestres de  $\text{CaF}_2$ , separades mitjançant un espaiador de 50  $\mu\text{m}$  (Reflex Analytical).

Per a l'obtenció dels espectres s'ha emprat l'espectròmetre Varian Resolutions Pro, registrant l'espectre de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , a una velocitat de 95  $\text{cm}^{-1}/\text{min}$ , una resolució de 2  $\text{cm}^{-1}$ , i fent la mitjana de 1000 acumulacions. L'espectre va ser inicialment corregit contra el soroll de fons (o *background*), i la senyal del tampó i del vapor van ser restades abans de procedir amb el tractament de les dades.

La tècnica de FTIR ha estat emprada per l'estudi de l'estructura i agregació del fragment d'anticòs scFv-h3D6, del domini variable AL-12, i del domini PDZ3. Les condicions de la mostra, els paràmetres d'adquisició dels diferents espectres, així com el tractament de les dades i la deconvolució de la banda d'amida I', es troben detallats a l'apartat de Materials i Mètodes del Capítol 1, 3 i 4, respectivament.

#### **4.6. Microscòpia electrònica de transmissió (TEM).**

La microscòpia electrònica permet magnificar mostres fins a un milió de vegades amb un límit de resolució de 2 nm. Aquesta magnificació s'aconsegueix emprant un feix d'electrons, modulats per una sèrie de lents electromagnètiques, de forma que incideix sobre la mostra que es vol visualitzar. Part dels electrons seran capaços de travessar la mostra, mentre que altres seran dispersats, obtenint la imatge amplificada. Per tal de que els electrons no siguin dispersats per molècules d'aire, tot el sistema ha d'estar totalment al buit.

##### **4.6.1. Tinció negativa de les mostres de TEM.**

Les mostres han estat preparades amb tinció negativa d'acetat d'uranil al 1 % i disposades sobre reixetes de coure recobertes d'una capa de carboni. La tinció negativa recobreix la mostra i dispersa els electrons, obtenint un bon contrast en la imatge.

El protocol seguit per la preparació de mostres, ha estat el següent:

1. Si convé, diluir la mostra (1/10), amb el mateix tampó, per tal de visualitzar correctament les estructures d'interès.
2. Aplicar 5  $\mu\text{l}$  de mostra sobre la capa de carboni de la reixeta, deixar-ho reposar 2 min a TA.
3. Absorbir l'excés de mostra tocant la gota mitjançant paper de filtre.
4. Tenyir la mostra amb 5  $\mu\text{l}$  d'Acetat d'Uranil 1%, deixar reposar 2 min a TA.
5. Absorbir l'excés d'acetat d'uranil tocant la gota amb un paper de filtre.
6. Assecar la mostra 2 min a TA. Les mostres poden ser visualitzades immediatament, o bé, guardades en condicions de buit.



Les mostres han estat visualitzades al microscopi Hitachi H-7000, del servei de microscòpia de la UAB i analitzades amb el software DigitalMicrograph (Gatan).

La tècnica de TEM ha estat emprada per a l'estudi de l'agregació del fragment d'anticòs scFv-h3D6 i del domini PDZ3. La condició i el tractament de les mostres previ a ser dipositades a la reixeta, es troben detallats a l'apartat de Materials i Mètodes del Capítol 1, i 4, respectivament.



## 5. CULTIUS CEL·LULARS.

Treballar amb cultius cel·lulars és una de les opcions més emprades actualment, com a primera aplicació biomèdica. Tot i que, realment, consisteix en un mètode *in vitro*, els cultius cel·lular és la primera aproximació real als experiments *in vivo*, com per exemple, els models ratolins, i els seus resultats són considerats necessaris abans de passar a sistemes *in vivo*.

Les condicions de treball amb cultius cel·lulars han de ser totalment estèrils, per això s'ha treballat dins la sala de cultius de nivell de bioseguretat II, i en cabina de cultius de nivell de bioseguretat I (Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la UAB).

### 5.1. Línia cel·lular de neuroblastoma humà SH-SY5Y.

Per a realitzar els diferents experiments de viabilitat, s'ha usat la línia cel·lular de neuroblastoma humà SH-SY5Y (Cell Line Services, GmbH). Aquesta línia prové d'una pacient amb metàstasi al moll de l'os, i es localitzà al cervell. Les cèl·lules són adherents i creixen formant agregats (o *clústers*), amb múltiples, curtes i fines neurites; sense arribar a formar una monocapa confluent.

Per al seu manteniment i propagació, les cèl·lules han estat incubades a 37 °C, en un 5 % de CO<sub>2</sub>, en flascons de 75 cm<sup>2</sup> de superfície (Sarstedt) i en medi de cultiu DMEM/F-12 (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient Mixture F-12 Ham*); complementat amb un 10 % de FBS (*Fetal Bovine Serum*), un 1 % de NAA (*Non-essential Aminoacids*), i un 1 % d'antibiòtics penicil·lina/estreptomicina (tot ells adquirits a Sigma-Aldrich). El canvi de medi s'ha fet cada 2 dies, realitzant dos rentats amb tampó PBS, pH 7.4, estèril, abans d'afegir medi de cultiu fresc. És important temperar, al bany a 37 °C durant 20-30 min, totes les solucions abans de ser usades.

### 5.2. Subcultiu cel·lular.

El subcultiu cel·lular, o passatge, es realitza quan s'assoleix, aproximadament, el 70 % de confluència al flasc (per a la línia cel·lular SH-SY5Y, uns 4-5 dies). Al ser una línia adherent, cal desenganxar les cèl·lules amb 1 mL de Tripsina-EDTA 1X (Sigma-Aldrich), incubant-les durant 3 min a 37 °C. La tripsinització s'inhibeix afegint 4 mL de medi de cultiu fresc. Per a desfer possibles agregats cel·lulars, es resuspenen les cèl·lules suaument i es passen a un flasc nou, a una dilució d'entre 1/20 i 1/50.

### 5.3. Reservori de la línia cel·lular.

Les línies cel·lulars poden ser conservades durant més de 2 anys congelades i guardades en tancs de N<sub>2</sub>-líquid. És important mantenir un reservori de cèl·lules, ja que les característiques neuronals es van perdent a mesura que augmenta el nombre de passatges. A més, és un recanvi necessari en possibles casos de contaminació.

- **Criopreservació.** Cal partir d'una elevada confluència per assegurar una mínima viabilitat al tornar-les a descongelar. Un cop les cèl·lules han estat desenganxades del flasc i diluïdes amb medi de cultiu, es centrifuguen (5 min, a 1280 *g*), es descarta el medi per aspiració, i es resuspenen amb 1 mL de medi de cultiu fresc complementat amb un 5 % de DMSO. Cada mL de cèl·lules, es disposa en un criotubs de 2 mL, es congelen a -80 °C, i més tard són emmagatzemades al tanc de N<sub>2</sub>-líquid.
- **Descongelació.** Per a recuperar una línia congelada, s'extrau un criotub de cèl·lules guardades, es deixa temperar 2 min a TA i seguidament es descongelen completament al bany a 37°C. El mL de cèl·lules descongelades, es passa automàticament a un flasc nou (recomanable que sigui de 25 cm<sup>2</sup>, per facilitar l'adhesió) diluint-les 1/10 en medi de cultius fresc. Quan les cèl·lules s'hagin adherit (unes 5 h), aspirar el medi i afegir-ne de nou per eliminar totes les restes de DMSO.

### 5.4. Comptatge de cèl·lules.

Sovint és necessari quantificar el nombre de cèl·lules en un volum determinat per a prosseguir amb experiments de cultius, com en el nostre cas de determinació de viabilitat cel·lular. Inicialment s'havia emprat la Cambra de Neubauer, però el comptatge automàtic mitjançant l'aparell TC10™ *Automated Cell Counter* resulta molt útil per ser senzill, fiable i ràpid.

Per a experiments de viabilitat, cal partir d'una elevada confluència cel·lular per assegurar una concentració de mostra suficient. Un cop les cèl·lules han estat tripsinitzades i diluïdes amb medi de cultiu, es centrifuguen (5 min, a 1280 *g*), es descarta el medi per aspiració, i es resuspenen en un volum estimat per assolir la concentració mínima (uns 10 mL). Es mesclen 100 µL de cèl·lules resuspeses amb 100 µL de colorant Trypan-blue, i es disposen 10 µL al porta de lectura automàtica, que té un rang de detecció de 5·10<sup>4</sup> – 1·10<sup>7</sup> cèl·lules/mL. A partir del resultat obtingut, es calcula la dilució de la mostra necessària.

### 5.5. Experiments de viabilitat cel·lular de SH-SY5Y.

Per als experiments de viabilitat s'han emprat plaques d'ELISA de 96 pous (Sarstedt), en els que s'hi ha afegit  $2 \cdot 10^4$  cèl·lules/pou, en 100  $\mu$ L de medi de cultiu. Les plaques s'han deixat incubant 24 h a 37 °C per a la total adhesió de les cèl·lules. Degut a que l'FBS pot interferir en els resultats de viabilitat cel·lular, abans de tractar les cèl·lules, s'ha reemplaçat el medi amb 90  $\mu$ l de medi de cultiu amb només un 2 % d'FBS. De cada una de les condició experimentals, s'han realitzat rèpliques de 6 pous, afegint 10  $\mu$ l mostra/pou (dilució mostra 1/10). Les plaques s'han deixat, de nou, incubant durant 24h a 37 °C per tal d'assegurar l'efecte sobre les cèl·lules. Mitjançant el mètode de l'MTT, s'ha mesurat la viabilitat cel·lular.

#### 5.5.1. Assajos de viabilitat per MTT.

L'assaig per MTT quantifica l'activitat de l'enzim mitocondrial succinat deshidrogenasa, mesurant directament la viabilitat cel·lular. L'MTT és una solució grogosa que, per activitat de l'enzim mitocondrial, és precipitada en forma de formazan insoluble, de color blau fosc.

A cada un dels pous de la placa d'ELISA, s'hi afegeixen 10  $\mu$ l d'MTT, a 5 mg/mL en PBS (0.5 mg/mL al pou) i filtrat amb filtres estèrils de PDVF de 0.22  $\mu$ m . La reacció s'incuba 4 h a 37 °C. Per aspiració, s'elimina el sobrenedant, i els cristalls de formazan són solubilitzats amb 100  $\mu$ l de DMSO, agitant durant 10 min a TA. La intensitat de cada pou és mesurada colorimètricament a 540 nm i a 620 nm, mitjançant el lector de plaques d'ELISA Victor3 (Perkin Elmer). La diferència entre totes dues mesures ha servit per a calcular el tant per cent de viabilitat, fent la mitjana de les 6 rèpliques per placa i de, mínim, 2 experiments independents, indicant l'error SEM (*Standard Error of the Mean*).

Els experiments de viabilitat per MTT han estat emprats per a l'estudi de citotoxicitat del pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub> i l'efecte del fragment d'anticòs scFv-h3D6, així com del domini PDZ3. La condició i el tractament de les mostres previ a ser afegides al cultiu d'SH-SY5Y, es troben detallats a l'apartat de Materials i Mètodes del Capítol 1, i 4, respectivament.



## 6. TÈCNiques BIOINFORMÀTIQUES.

### 6.1. Modelatge tridimensional de l'scFv-h3D6.

El modelatge tridimensional de proteïnes esdevé una molt bona alternativa a la cristal·lització, que sovint resulta difícil d'aconseguir (Bramucci et al. 2012), i a la resolució d'estructures per ressonància magnètica nuclear (RMN), que té la limitació de la grandària de la cadena polipeptídica (màxim uns 200 residus) i és incompatible amb la presència d'agregats (Wuthrich 2001). A partir d'un modelatge proteic s'obté una fiable caracterització de la proteïna, tan a nivell d'estructura secundària i com terciària, encara que els residus que no tenen identitat amb el motlle del model poden quedar en una orientació inadequada. Determinar residus conservats, exposats o enterrats, reconèixer interaccions locals o distants dins la molècula, o localitzar, dins de l'estructura tridimensional de la molècula, les regions amb tendència a l'agregació predites a partir de la seqüència, són dades molt útils per a entendre el comportament de la molècula i millorar-ne l'experimental. A més, la seva possibilitat de rotació en 3D permet localitzar cadenes laterals que poden ser causa de baixa estabilitat i/o solubilitat de la molècula, i facilita el disseny de possibles mutants de la proteïna.

En el nostre cas, s'ha construït un model de l'estructura tridimensional del fragment d'anticòs recombinant scFv-h3D6. Per al seu disseny s'ha fet ús de les tècniques bioinformàtiques descrites a l'apartat de Materials i Mètodes del Capítol 2.

### 6.2. ExPASy.

L'ExPASy és un portal de recursos bioinformàtics (*Swiss Institute of Bioinformatics*, SIB) el qual dóna accés a diverses bases de dades i eines científiques. Alguns exemples són:

- **ProtParam.** Consisteix en una eina que permet obtenir varis paràmetres físics i químics a partir d'una determinada seqüència proteica, com ara el pes molecular, el pI, el coeficient d'extinció molar, etc. S'ha de tenir en compte, però, que aquests són valors teòrics i aproximats que poden servir com a idea general i inicial.
- **Reverse/Translate.** Permet fer anàlisi de seqüència de nucleòtids i d'aminoàcids, sobretot a l'hora de comprovar resultats de seqüenciació de DNA.
- **BLAST.** Emprat per a la recerca d'homologia de seqüències dipositades en el PDB (*Protein Data Bank*).





## **V. CAPÍTOLS.**



**CAPÍTOL 1: Un fragment variable de cadena senzilla (scFv-h3D6) anti-A $\beta$  impedeix la formació de fibres amiloides i la citotoxicitat del pèptid A $\beta$  mitjançant la retirada d'oligòmers de la via amiloide.**

**ARTICLES RELACIONATS:**

**An anti-A $\beta$  (amyloid  $\beta$ ) single-chain variable fragment prevents amyloid fibril formation and cytotoxicity by withdrawing A $\beta$  oligomers from the amyloid pathway**

Marin-Argany, M.\*, Rivera-Hernández, G.\*, Martí-Clua, J. & Villegas, S.

Biochemical Journal 437, 25–34 (doi:10.1042/BJ20101712) 2011

*\*First co-author*

**Early intervention in the 3xTg-AD mice with an amyloid  $\beta$ -antibody fragment ameliorates first hallmarks of Alzheimer disease.**

Giménez-Llort, L., Rivera-Hernández, G., Marin-Argany, M., Sánchez-Quesada, JL. & Villegas, S.

mAb 5:5, 665–677 (doi:10.4161/mabs.25424) 2013



## 1. RESUM.

La immunoteràpia anti-A $\beta$  s'ha revelat com una eina esperançadora en el tractament de la malaltia de l'AD. L'administració de fragments variables de cadena senzilla (*single-chain variable fragment*, scFv) no produeix els efectes adversos observats en l'administració d'anticossos complets. En el següent capítol, es presenta l'expressió recombinant del scFv-h3D6, derivat d'un mAb humanitzat específic per a  $\beta$ -oligòmers, així com la demostració de la seva capacitat per anul·lar la toxicitat induïda per el pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub> a la línia cel·lular de neuroblastoma humà SH-SY5Y. Per a conèixer els canvis conformacionals de l'scFv-h3D6 relacionats amb la prevenció de tal toxicitat, es descriu l'espai conformacional de l'scFv-h3D6 sota pertorbació per temperatura. L'escalfament del estat natiu no condueix a cap grau de desplegament de la proteïna, sinó directament a un estat intermediari reorganitzat que inicia una via d'agregació. Aquesta via d'agregació no és una via amiloide, com la que segueix el pèptid A $\beta$ , sinó més aviat una via en la que apareixen fibres *worm-like* que, notablement, resulten ser no tòxiques. En condicions fisiològiques, aquesta via es troba termodinàmica i cinèticament afavorida quan l'scFv-h3D6 i els oligòmers-A $\beta$ <sub>1-42</sub> formen un complex, el que explica com l'scFv-h3D6 retira el pèptid A $\beta$  de la via amiloide. Aquesta és la primera descripció d'un mecanisme molecular pel qual un scFv evita la toxicitat dels oligòmers formats pel pèptid A $\beta$ .



## 2. INTRODUCCIÓ.

Des del primer indici de neurotoxicitat induïda pel fragment C-terminal, de 105 residus, de la proteïna APP (*Amyloid Precursor Protein*) (Yankner et al. 1989), fins a l'actualitat, moltes són les evidències, i van en augment, de que els oligòmers solubles del pèptid amiloide A $\beta$  són la causa de la pèrdua de sinapsis i del dany neuronal característic de la malaltia de l'AD (AD) (Lansbury, Lashuel 2006). Conseqüentment, s'ha vist que certs problemes cognitius apareixen abans de que els dipòsits amiloides s'hagin format (Dineley et al. 2002). A més a més, la severitat d'aquests dèficits es troben correlacionats amb els nivells d'A $\beta$  soluble, i no amb la presència de plaques amiloides (McLean et al. 1999). Ambdues observacions indiquen que la neurodegeneració és prèvia i no com a resultat de la deposició amiloide. D'acord amb això, existeix la necessitat de trobar noves teràpies que capturin els oligòmers d'A $\beta$  enlloc de les fibres amiloides.

De forma natural, en el líquid cerebrospinal humà i en el plasma d'individus sans, hi són presents anticossos contra el pèptid A $\beta_{39-42}$ , els nivells dels quals, però, es redueixen significativament en pacients d'AD, suggerint que la patologia pot tenir una base immunodeficient (Solomon 2009). Les primeres descripcions respecte el potencial terapèutic dels anticossos anti-pèptid A $\beta$  es basaven en la inhibició de la fibril·lació *in vitro*, i en la prevenció de la neurotoxicitat del pèptid A $\beta_{1-40}$  en cultius cel·lulars (Solomon et al. 1997). La primera demostració de l'efectivitat de la immunoteràpia contra l'A $\beta$ , *in vivo*, es va obtenir en ratolins PDAPP transgènics, els quals sobreexpressen la proteïna humana APP mutada en el residu Val717 per Fenilalanina (V717F) (Schenk et al. 1999). En aquest cas, la immunització activa, amb el pèptid A $\beta_{1-42}$ , redueix dràsticament la càrrega amiloide del còrtex cerebral i del hipocamp. Subseqüentment, l'efectivitat de la immunoteràpia passiva (com per exemple, administrant anticossos dirigits contra l'A $\beta$ ), també va ser testada en els mateixos ratolins (Bard et al. 2000). Un cop es va aconseguir superar les diferents fases clíniques amb models animals, es va prosseguir amb les proves amb humans vacunats activament amb el pèptid A $\beta_{1-42}$  (Schenk 2002). No obstant, la fase clínica, nomenada AN-1792, va ser aturada degut a l'aparició de complicacions de tipus meningoencefàltiques (Nicoll et al. 2003). Tot i que el tractament va ser parat, aquells pacients que van ser inicialment immunitzats van continuar sent monitoritzats, i es va detectar un important retard de la davallada cognitiva, fins i tot un any després de l'última dosi (Hock et al. 2003). A part de la meningoencefalitis, un altre dels efectes secundaris d'administrar l'anticòs sencer, és que agreuja la angiopatia amiloide cerebral (CAA), un trastorn dels vasos sanguinis del SNC caracteritzada pel depòsit de material  $\beta$ -amiloide sobre les parets (Pfeifer et al. 2002).

Després de nombrosos estudis per a prevenir els efectes secundaris no desitjats, les proves clíniques que més han avançat són les de la vacuna ACC-001, que consisteix en un derivat del pèptid A $\beta$ , i les del anticòs AAB-001, o Bapineuzumab, un anticòs monoclonal (mAb) murí dirigit contra els residus 1-5 de l'extrem N-terminal del pèptid A $\beta$  (mAb-h3D6), el qual és específic dels oligòmers d'A $\beta$  (Jacobsen 2006, Wisniewski, Konietzko 2008, Nitsch, Hock 2008). Malgrat les grans expectatives, aquest últim tractament va ser aturat en fase clínica III, degut a resultats contradictoris (Thomas 2012). En fase clínica II, els efectes adversos del Bapineuzumab eren lleus i transitoris, però va causar edema vasogènic (Rinne et al. 2010). Aquest efecte va ser relacionat amb la dosi de fàrmac, i la majoria dels casos eren portadors de l'al·lel *APOE4*. Desafortunadament, les restriccions de dosi i el reclutament de pacients amb l'al·lel *APOE3*, el més freqüent en humans i no relacionat amb l'AD esporàdic, no van ser suficients per a seguir amb la fase III (Thomas 2012). Cal mencionar que aquestes proves van ser realitzades en pacients amb un diagnòstic de la malaltia massa avançat, tal i com reivindica la revista *World AD Report* 2011 (Prince, Bryce & Ferri 2011).

Per aquests raó, la immunització passiva amb fragments variables de cadena senzilla (*single-chain variable Fragment*, scFv), és a dir, anticossos mancats de la regió constant Fc, resulta ser una estratègia terapèutica molt esperançadora per a la malaltia d'AD, ja que no activa la micròglia, no produeix hemorràgia cerebral, ni edema vasogènic, i ha estat demostrat ser tan potent i específica com la realitzada amb els mAb parentals (Fukuchi et al. 2006, Zameer et al. 2008, Robert et al. 2009). No obstant, la quantitat de proteïna scFv recombinant obtinguda després de la seva purificació, és, en general, molt baixa, degut a les seves propietats de plegament i estabilitat (Zheng, Baumann & Reymond 2003). De forma habitual, la producció de les diferents variants d'scFv és realitzada en sistemes de *phage-display* (Fukuchi et al. 2006, Zameer et al. 2008), o bé per expressió periplasmàtica en *E. coli* (Wall, Pluckthun 1999, Robert et al. 2009). Pocs són els casos que aconseguen una expressió soluble d'scFv i, per a fer-ho, l'expressen en forma precursora o, altrament dit, l'scFv unit a una proteïna fusió (o *protein tag*), dins del citoplasma d'Origami (DE3), un tipus de soca d'*E. coli* que afavoreix l'ambient oxidatiu en el citoplasma, beneficiant el correcte plegament de proteïnes que presenten ponts disulfur (Zheng, Baumann & Reymond 2003, Jurado, de Lorenzo & Fernandez 2006).

En el següent capítol s'exposa part treball realitzat durant aquesta tesi doctoral, en el que s'ha fet servir la seqüència del anticòs mAb-h3D6.v2 per a construir un gen sintètic, consistent en un domini variable de cadena pesada (V<sub>H</sub>) i un domini variable de cadena lleugera (V<sub>L</sub>) units per un connector del tipus (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub>, l'scFv-h3D6. L'expressió de la proteïna precursora, (His)<sub>6</sub>-trx-dianaTEV-scFv-h3D6, s'ha realitzat en la soca



Origami2(DE3). La proteïna de fusió, la tioredoxina (*trx*), ha estat eliminada eficientment per la proteasa TEV (*Tobacco Etch Virus*) (Nallamsetty et al. 2004).

L'efectivitat del scFv-h3D6 per a revertir la toxicitat de l'A $\beta$ , ha estat demostrada en la línia cel·lular de neuroblastoma humà SH-SY5Y. Seguidament, s'ha obtingut el perfil conformacional de l'scFv-h3D6 un cop ha estat pertorbat per temperatura, la descripció del qual ens ha permès comprendre millor el mecanisme molecular per el que l'scFv-h3D6 és capaç de capturar oligòmers d'A $\beta_{1-42}$ . El tractament amb temperatura indueix la via d'agregació de l'scFv-h3D6, caracteritzada per un estat intermediari ric en estructura- $\beta$  que agrega en forma de fibres *worm-like* (WL). Aquestes fibres són diferents de les fibres amiloides formades pel pèptid A $\beta$ , especialment a nivell de citotoxicitat i de precursors oligomèrics. A més, la formació de fibres WL, per part de l'scFv-h3D6, és afavorida cinètica i termodinàmicament quan s'uneix específicament als oligòmers d'A $\beta_{1-42}$ , fet que explica com l'scFv-h3D6 retira els oligòmers d'A $\beta_{1-42}$  de la via amiloide i, conseqüentment, com evita la seva citotoxicitat.

En referència a la tesi doctoral en redacció de Rivera-Hernández, G. (Rivera-Hernandez 2013), els bons resultats obtinguts en experiments de cultiu cel·lulars, ha portat al nostre grup de recerca a investigar el potencial preventiu de l'scFv-h3D6 *in vivo*, mitjançant l'administració intraperitoneal de l'scFv-h3D6 en ratolins 3xTg-AD de cinc mesos d'edat, un treball recent del nostre grup de recerca en el que s'han obtingut resultats molt esperançadors (Gimenez-Llort et al. 2013, Esquerda-Canals et al. 2013).



### 3. MATERIALS I MÈTODES.

#### 3.1. Expressió i purificació de l'scFv-h3D6.

La soca d'*E. coli* emprada per a l'expressió intracel·lular de l'anticòs recombinant scFv-h3D6 ha estat l'**Origami2(DE3)**, mitjançant el vector d'expressió **pETtrx-1a** (veure apartats 3.1 i 3.4 de Materials i Mètodes Generals). A partir de l'expressió, s'ha purificat la proteïna de fusió **(His)<sub>6</sub>-trx-dianaTEV-scFv-h3D6** (40.6 kDa) de la fracció citosòlica insoluble i, finalment, s'ha obtingut l'**scFv-h3D6 pur** (26.4 kDa) mitjançant el tall amb la proteasa TEV i cromatografies d'afinitat i de bescanvi iònic. És important mencionar que, una part de la proteïna s'obtingué directament de la fracció soluble, encara que amb un rendiment molt baix. Per aquesta raó s'ha treballat únicament amb la fracció insoluble.

##### 3.1.1. Expressió heteròloga de l'scFv-h3D6.

Per a l'expressió del fragment d'anticòs scFv-h3D6 s'ha seguit el següent protocol:

1. Transformació de les cèl·lules competents Origami2(DE3) amb DNA vector pETtrx\_1a::scFv-h3D6 (veure apartat 2.2 Materials i Mètodes Generals).
2. Picar una colònia en 5 mL de medi LB líquid suplementat amb els antibiòtics Tet (selecció de la soca) i Kn (selecció del vector).
3. Incubar màxim 15 h en agitació forta (250 rpm) a 37 °C, per promoure un cultiu saturat.
4. Pre-inocular, en un volum final de 50 mL de medi LB amb antibiòtics, una dilució 1:10 i incubar a les mateixes condicions anteriors fins arribar a una DO<sub>600</sub> de 0.2-0.4.
5. Inocular, en un volum final d' 1 L de medi LB amb antibiòtics, una dilució 1:100 i incubar a les mateixes condicions anteriors fins arribar a una DO<sub>600</sub> de 0.6-0.8. (Per a obtenir suficient quantitat de proteïna, normalment s'han expressat 4 erlenmeyers de 2 L amb 1 L de LB per erlenmeyer)
6. Disminuir la temperatura del incubador a 20 °C i induir l'expressió amb IPTG 0.5 mM.
7. Incubar 15 h a 20 °C, en agitació constant de 200 rpm.

##### 3.1.2. Llisi Cel·lular.

Un cop s'ha recuperat l'extracte cel·lular (veure apartat 3.5.2 de Materials i Mètodes Generals), s'ha prosseguit amb el protocol de llisi cel·lular següent, per tal de recuperar la fracció citosòlica:

1. Resuspendre el pellet de cèl·lules amb 40 mL de Tampó de llisi (Tris/HCl 160 mM, NaCl 4 M, pH 8.5, prèviament refredat a 4 °C) per L de cultiu expressat, fins a ser totalment homogeni.
2. Sotmetre les cèl·lules a 3 cicles de congelació amb N2-líquid i descongelació a TA

3. Sonicar la solució mitjançant 6 cicles de 45 segons, a potència 9 i una freqüència del 50 %, mantenint la mostra sempre en gel i reposant 3 min entre cicles.
4. Centrifugar a 43700 g durant 40 min a 4 °C, per a separar la fracció total soluble de la insoluble.
5. Descartar el sobrenedant per decantació i mantenir el pellet en gel.

### ***3.1.3. Solubilització de la fracció proteica insoluble.***

Tot i que part de la proteïna expressada es troba en la fracció citosòlica soluble, el rendiment obtingut de purificar aquesta fracció és baix i s'ha optat per a recuperar tan sols la fracció insoluble. Per a fer-ho, es resuspèn el pellet amb 10 mL de Tampó de Solubilització (Urea 8 M en Tris/HCl 100 mM, Glutatió reduït (GSH) 10 mM, pH 8.5, prèviament refredat a 4 °C) per L de cultiu expressat, fins a ser pràcticament homogeni. El pellet s'acaba de resuspendre per agitació orbital a 4 °C durant mínim 2 h. A continuació es centrifuga a 43700 g durant 40 min a 4 °C, per a separar la fracció solubilitzada de la insoluble, es recupera el sobrenedant per decantació, i es filtra la mostra per un filtre PVDF de 0.45 µm.

### ***3.1.4. Replegament gota a gota de la fracció proteica solubilitzada.***

Per al replegament, la fracció solubilitzada en urea, i que es troba desplegada, es dilueix (dilució 1:10) en 90 mL Tampó de Replegament (Tris/HCl 100 mM, L-Arginina 100 mM, Glutatió oxidat (GSSG) 0.15 mM, pH 8.5, prèviament refredat a 4 °C) per L de cultiu expressat. La dilució es realitza a 4 °C, per degoteig lent amb una pipeta Pasteur, i agitació suau del tampó; i així afavorir el replegament de la proteïna en el nou entorn oxidatiu. Un cop replegat durant unes 36 h, a 4 °C i agitació suau, es centrifuga a 43700 g durant 40 min a 4 °C, per a separar la fracció soluble replegada de l'encara insoluble.

### ***3.1.5. Digestió amb proteasa TEV.***

Un cop tenim la fracció replegada i solubilitzada, cal realitzar el tall específic amb la proteasa TEV (Nallamsetty et al. 2004), per tal d'aïllar la proteïna scFv-h3D6 de la seva forma precursora, o de la proteïna fusió (His)<sub>6</sub>-trx. Per a realitzar el tall amb TEV cal dialitzar la mostra a Tampó de Digestió amb TEV (Tris/HCl 20 mM, NaCl 100 mM, EDTA 0.5 mM, pH 8.3). En aquest punt sovint cal centrifugar la mostra a 43700 g durant 40 min a 4 °C, per tal d'eliminar possibles precipitats.

#### Reacció de Tall amb TEV:

- La reacció de tall es fa en presència del par redox GSH/GSSG a una concentració final de 3 mM i 0.3 mM, respectivament.
- La relació proteïna:proteasa és de 1:50.
- Ajustar el pH a 8.3.
- Incubar a 30 °C, durant 4 h en agitació suau.

#### **3.1.6. Cromatografia d'afinitat amb histidines.**

Per tal de separar els productes del tall amb TEV, s'ha utilitzat una columna d'IMAC HisTrap (veure apartat 3.6.1.1 de Materials i Mètodes Generals). De forma que la proteïna precursora no tallada, la proteïna de fusió (**His<sub>6</sub>-trx**) i la mateixa TEV, queden atrapades a la columna per afinitat de la cua d'histidines; mentre que **I<sup>scFv</sup>-h3D6** és eluït i recuperat directament de la columna juntament amb altres proteïnes del cultiu cel·lular. Per tant, caldrà un pas més de purificació (columna de bescanvi catiònic, CEX) per a obtenir el fragment d'anticòs totalment pur.

Els tampons utilitzats per a la cromatografia són els següents:

- Tampó de Càrrega: NiSO<sub>4</sub> 50 mM.
- Tampó d'Unió i de Rentat: Tris/HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 8.3.
- Tampó d'Elució: Tris/HCl 80mM, NaCl 4M, Imidazol 2M, pH 8.3.

El flux de la cromatografia ha estat controlat mitjançant una bomba peristàltica P-1, on manualment es canvia la mostra, o el tampó, i la velocitat d'injecció, que ha de ser d'entre 1 i 2 mL/min. Per tal d'assegurar que tota la fracció de proteïna que conté cua d'histidines s'uneixi a la columna, s'han acoblat dues columnes d'IMAC, obtenint un volum de columna final de 10 mL (1 VC = 5 mL x 2) i una doble capacitat d'unió.

El protocol seguit per a realitzar l'IMAC, expressat en volums de columna (VC), és el següent:

1. Rentar la columna amb 10 VC d'aigua Milli-Q per tal d'eliminar l'etanol emprat per a la seva conservació a 4 °C.
2. Regenerar la columna amb 10 VC de NiSO<sub>4</sub> 50 mM i rentar-ne l'excés amb 5 VC d'aigua Milli-Q.
3. Equilibrar la columna amb 10 VC de tampó d'unió.
4. Filtrar la mostra amb filtres de PVDF de 0.45 µm i injectar-la a un flux constant de 2 mL/min.

5. Recollir la fracció de proteïna no unida a columna i guardar-la a 4 °C. Aquesta fracció conté la proteïna scFv-h3D6 aïllada de la forma precursora, juntament a altres proteïnes contaminants.
6. Rentar la columna amb 5 VC de tampó d'unió, per a recuperar la totalitat de proteïna no unida i guardar-la a 4 °C. Aquesta fracció conté la proteïna scFv-h3D6 aïllada de la forma precursora, juntament a altres proteïnes contaminants.
7. Eluir i descartar la fracció de proteïna unida amb 5 VC de tampó d'elució. Aquesta fracció conté la proteïna fusió His<sub>6</sub>-trx.

### 3.1.7. Cromatografia de bescanvi catiònic.

Per a l'últim pas de purificació de l'scFv-h3D6, s'ha emprat una columna de bescanvi catiònic (CEX) Resource S-6mL (GE Healthcare) (veure apartat 3.6.2 de Materials i Mètodes Generals), mitjançant la qual es separen la fracció d'**scFv-h3D6 nativa** de les formes **scrambled**. Les formes *scrambled* són totes aquelles combinacions en que es poden formar els pont disulfur, tant nadius com no nadius. A la seqüència de l'scFv-h3D6 hi trobem quatre cisteïnes, per tant existeixen fins a nou formes *scrambles* teòriques. La CEX és capaç de separar les diferents espècies *scrambled* que presenta l'scFv-h3D6, obtenint finalment l'scFv-h3D6 100% natiu i pur.

Per a la cromatografia, cal dialitzar la mostra a Tampó d'Unió de CEX (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.3 mM, pH 6.5).

Els tampons utilitzats per a la cromatografia són els següents:

- Tampó d'Unió i de Rentat (A): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.3 mM, pH 6.5.
- Tampó d'Elució (B): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8.3 mM, NaCl 1M, pH 6.0.

El pI teòric de la proteïna és de 8.3, al utilitzar un tampó a pH 6.5, la mostra estarà carregada positivament i interaccionarà amb la reïna negativa. Per a l'elució de proteïna, s'ha utilitat un gradient lineal amb un increment de la força iònica de Δ 10% B/28 CV (o bé, 0.06 % B/mL). La capacitat d'unió de la columna és de 270 mg (BSA, 67 kDa), per tant, el volum de mostra injectat dependrà de la quantitat de proteïna en ella.

El protocol seguit per a realitzar la CEX, expressat en volums de columna (1 VC = 6 mL), és el següent:

1. Rentar la columna amb 10 VC d'aigua Milli-Q per tal d'eliminar l'etanol emprat per a la seva conservació a 4 °C.
2. Equilibrar la columna amb 5 VC de tampó A.
3. Filtrar la mostra per un filtre PVDF de 0.45 μm i injectar-la, via *loop* de 50 mL, a un flux constant de 2 mL/min.

4. Rentar la columna amb 5 VC de tampó A, per a tal d'eliminar completament la fracció de proteïna no unida a columna.
5. Aplicar un gradient d'elució de  $\Delta$  10 % B/28 VC, a un flux constant de 1 mL/min, fins arribar al 100% d'aquest tampó. Recol·lectar fraccions d'1 mL.
6. Rentar la columna a 100% de tampó B durant un 1 VC, a un flux constant de 2 mL/min, per acabar d'eluir tota la fracció de proteïna unida.
7. Re-equilibrar la columna al 100 % de tampó A amb 1 VC, a un flux constant de 2 mL/min.

La proteïna scFv-h3D6 elueix a un 7-9 % de tampó B (aproximadament 80 mM d'NaCl), donant lloc a dos pics força solapats. El primer pic correspon a la fracció d'scFv-h3D6 natiu, i el segon a la fracció *scrambled*; a les fraccions corresponents al solapament de pics hi trobem una mescla d'ambdues poblacions. És molt important separar correctament els dos pics, per assegurar que el *pool* de proteïna scFv-h3D6 es troba 100% plegada nativament. La fracció scFv-h3D6-h3D6 pura es dialitza a tampó PBS pH 7.4, s'aliqota en eppendorfs d'1 mL, i es congela amb N<sub>2</sub>-líquid per a guardar-la a -20 °C.

### 3.2. Expressió i purificació de la proteasa TEV.

La soca d'*E.coli* emprada per a l'expressió intracel·lular de la proteasa TEV ha estat la **C41(DE3)**, mitjançant el vector d'expressió **pMHTΔ238** (veure apartats 3.1 i 3.4 de Materials i Mètodes Generals). De l'expressió, s'ha purificat la proteïna de fusió **MBP-dianaTEV-(His)<sub>7</sub>-TEV** de la fracció citosòlica soluble, la qual s'auto-digerirà donant lloc a la proteïna **(His)<sub>7</sub>-TEV**, purificada mitjançant un pas de cromatografia d'afinitat.

#### 3.2.1. Expressió heteròloga de la proteasa TEV.

Per a l'expressió de la proteasa TEV ha estat s'ha seguit el següent protocol, extret de Blommel, P.G. *et al.* (Blommel, Fox 2007):

1. Transformació de les cèl·lules competents C41 amb DNA vector pMHTΔ238::TEV (veure apartat 2.2 Materials i Mètodes Generals).
2. Picar una colònia en 5 mL de medi LB líquid suplementat amb l'antibiòtic Kn (selecció del vector).
3. Incubar màxim 15 h en agitació forta (250 rpm) a 37 °C, per promoure un cultiu saturat.
4. Inocular, en un volum final d' 1 L de medi LB amb antibiòtics, una dilució 1:100, i incubar a les mateixes condicions anteriors fins arribar a una DO<sub>600</sub> de 0.6-0.8. (Per a obtenir suficient quantitat de proteïna, normalment s'han expressat 4 erlenmeyers de 2 L amb 1 L de LB per erlenmeyer).
5. Disminuir la temperatura del incubador a 25 °C i induir l'expressió amb IPTG 0.5 mM.
6. Incubar un màxim 4 h a 25 °C, en agitació constant de 200 rpm.

### 3.2.2. Purificació citoplasmàtica de la proteasa TEV.

El protocol de llisi cel·lular per a la purificació de la proteasa TEV és el mateix que l'emprat per a llisar les cèl·lules Origami2(DE3)+pETtrx\_1a::scFv (veure apartat 3.1.2), amb l'única diferència que el volum de tampó de llisi usat segueix una relació de 6 mL de tampó per gr d'extracte cel·lular recuperat de l'expressió.

### 3.2.3. Cromatografia d'afinitat amb histidines d'alta resolució.

Un cop s'ha separat i recuperat la fracció citoplasmàtica soluble, es purifica la proteasa **(His)<sub>7</sub>-TEV**, ja auto-digerida i alliberada de la proteïna de fusió MBP, mitjançant 2 columnes d'IMAC-Histrap de 5 mL, acoblades al sistema d'FPLC per a l'automatització (veure apartat 3.6.1.1 de Materials i Mètodes Generals).

Els tampons usats per aquesta cromatografia han estat:

- Tampó d'Unió i de Rentat (A): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 500mM, pH 7.5.
- Tampó d'Elució (B): Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 20 mM, NaCl 350 mM, 500 mM Imidazol, pH 7.5.

Un cop injectada la mostra, s'ha utilitat un gradient d'elució no lineal amb 4 increments escalats d'imidazol, on la proteïna TEV pura eluirà al 100 % de Tampó d'Elució:

- Rentat de columna: 0% B/4 VC
- Elució 1: 15%B/8 VC
- Elució 2: 100%B/10 VC
- Re-equilibrat de columna: 0% B/4 VC

Posteriorment a la purificació, s'han usat les columnes d'exclusió molecular PD-10 *Desalting columns* (veure apartat 3.6.3.2 de Material i Mètodes Generals) per a extraure l'imidazol de la mostra i guardar la proteïna al Tampó de Digestió de TEV (Tris/HCl 20 mM, NaCl 150 mM, Glicerol 10 %, pH 7.3).

### 3.3. Determinació de l'estructura secundària de l'scFv-h3D6.

*Aquests experiments han estat desenvolupats per el meu company de laboratori Rivera-Hernández, G., i es troben detallats a la seva tesi en redacció (Rivera-Hernandez 2013). Els resultats obtinguts ha estat necessari detallar-los en aquest capítol per tal d'entendre completament el treball seguidament exposat.*



Pel que fa als fonaments de les tècniques descrites a continuació (espectroscòpia de CD, de fluorescència i de infraroig) es troben detallats a l'apartat 4 de Materials i Mètodes Generals.

### **3.3.1. Espectre de CD al UV-llunyà.**

Per a obtenir l'espectre de CD d'estructura secundària de l'scFv-h3D6, s'ha utilitzat l'espectrofotopolarímetre Jasco J-715. La concentració experimental de proteïna ha estat de 20  $\mu\text{M}$  (0.54 mg/mL), disposada en una cubeta de quars de 0.2 cm. Per a mesurar l'espectre de 260 a 190 nm, s'han enregistrat 20 acumulacions a una velocitat de 50 nm/min, una resposta de 2 seg, una amplada de banda d'1 nm, i una resolució de 0.1 nm. L'espectre del plegament natiu de l'scFv-h3D6 ha estat determinat a 25 °C. A més, s'ha registrat l'espectre de l'estat desplegat (a 90 °C) i, tornant a la temperatura inicial, s'ha determinat si la desnaturalització tèrmica de la proteïna és reversible completa, parcialment o nul·la.

### **3.3.2. Espectre d'infraroig amb transformada de Fourier.**

Per a l'estudi d'agregació de l'scFv-h3D6 per FTIR, les mostres han estat dialitzades enfront PBS-D<sub>2</sub>O, pH 7.4, a una concentració de 100  $\mu\text{M}$  (2.6 mg/mL). Es van adquirir els espectres a 25, 37 i 60 °C, temperant les mostres durant 5 min. El tractament de dades i la deconvolució de la banda d'amida I' s'ha realitzat segons descrit per Arrondo i col·laboradors (Arrondo, Goni 1999). Resumidament, el nombre i posició de les components de la banda han estat obtinguts per deconvolució sobre corbes Lorentzianes amb una amplada entre 16-20  $\text{cm}^{-1}$  i una apodització de tipus *Bessel* amb una constant (K) entre 1.6-2.5. Els ajustos de les components s'han realitzat sobre corbes Gaussianes i s'han obtingut per dues etapes d'iteració: la primera fixant la posició de les bandes i, la segona, alliberant-les. Les dades finals, s'han expressat en tant per cent d'estructura secundària.

### **3.3.3. Desnaturalització tèrmica.**

La desnaturalització tèrmica s'ha seguit per espectroscòpia de CD al UV-llunyà i per fluorescència dels residus de triptòfan (fluorímetre Varian Cary Eclipse), a una concentració d'scFv-h3D6 de 20 i 2  $\mu\text{M}$ , respectivament, disposades en cubetes de quars de 0.2 i 1 cm, respectivament. Els experiments s'han registrat des de 25 °C a 90 °C, a una velocitat de 1 °C/min, seguint l'el·lipticitat a 218 nm, i la fluorescència del triptòfan a 338 nm (longitud d'ona d'excitació a 290 nm, i una obertura de les finestres d'excitació i d'emissió de 5 nm). A les desnaturalitzacions, per CD i fluorescència, es van registrar els espectres a 25 °C, 90 °C i, tornant a refredar la mostra, a 25 °C.

### 3.4. Preparació del pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub>.

El pèptid sintètic A $\beta$ <sub>1-42</sub>, purificat amb HCl com a contraió (Caslo Laboratories, ApS), es va dissoldre a 200  $\mu$ M en HFIP (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-isopropanol), un pretractament que permet desfer estructures en fulla- $\beta$  i trencar forces hidrofòbiques, donant lloc a preparacions de pèptid monodisperses (Dahlgren et al. 2002). Es van preparar alíquotes de 150  $\mu$ l, l'HFIP va ser eliminat per evaporació al buit mitjançant l'SpeedVac (Savant Instruments), i el film resultant va ser guardat a -80 °C fins a ser utilitzat. Al moment de requerir-lo, el film de pèptid va ser resuspès en 6  $\mu$ l de DMSO (5 mM de pèptid), i diluït, seguidament, fins a 300  $\mu$ l amb tampó PBS pH 7.4 (100  $\mu$ M de pèptid).

Degut al mètode de preparació del pèptid A $\beta$ , les mostres inicials contenien un 2 % (v/v) de DMSO, per tant, totes les mostres utilitzades per a estudiar l'efecte de l'scFv-h3D6 sobre l'agregació i la citotoxicitat del pèptid A $\beta$ , incloses les mostres controls, contenien el mateix tant per cent de DMSO. Cal remarcar que, després de la incubació, les mostres van ser diluïdes 10 vegades per a prosseguir amb els experiments de viabilitat, unió a ThT i ANS, i TEM. Per tant, les mostres finals contenien un 0.2 % de DMSO. A més, vam corroborar que un 2 % DMSO no té efecte sobre l'espectre de CD al UV-llunyà de l'scFv-h3D6.

### 3.5. Agregació del pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub> i l'scFv-h3D6.

La oligomerització, tant del pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub>, de l'scFv-h3D6, com del complex A $\beta$ <sub>1-42</sub>-scFv-h3D6, en tampó PBS pH 7.4 i 2 % de DMSO, va ser induïda per incubació a 37 °C durant diferents períodes de temps, mentre que la fibril·lació va ser induïda escalfant les mostres a 90 °C durant 5 min.

### 3.6. Assajos de citotoxicitat.

Els assajos de citotoxicitat es van realitzar mitjançant la línia cel·lular de neuroblastoma humà SH-SY5Y (veure apartat 5.5 de Materials i Mètodes Generals).

Primerament, es van realitzar assajos de viabilitat per a determinar la concentració òptima de pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub> per a generar màxima toxicitat cel·lular. Es va induir la oligomerització del pèptid a concentracions creixents, de 0 a 200  $\mu$ M, i es va addicionar 10  $\mu$ L a cada pou, de forma que la concentració final de pèptid va ser de 0 a 20  $\mu$ M.

Per a determinar la capacitat del fragment d'anticòs scFv-h3D6 per a inhibir la citotoxicitat del pèptid amiloide A $\beta$ <sub>1-42</sub>, es van coïncubar mostres a concentració constant de pèptid (100  $\mu$ M) amb concentracions creixent del fragment d'anticòs scFv-h3D6 (0, 1, 10, 50 i 100  $\mu$ M), tractades i assajades tal i com s'ha descrit a l'apartat anterior.

Per ambdós casos, es van extraure els valors de toxicitat seguint el protocol d'assaig per MTT (veure apartat 5.5.1 de Materials i Mètodes Generals). Cada condició consistia en 6 rèpliques per experiment, i 4 experiments independents van ser analitzats estadísticament per nivell de significança (test de rangs signats de Wilcoxon, SPSS), després de normalitzar les dades usant la concentració de la condició tampó PBS com a referència. Els resultats representen l'error SEM (*Standard Error of the Mean*).

### **3.6.1. Preparació mostres d'scFv-h3D6 per als assajos de citotoxicitat.**

Els lipopolisacàrids (LPSs) són biomolècules que formen part de la paret cel·lular d'*E. coli* i, durant el procés de purificació de l'scFv-h3D6, són arrossegats juntament amb la proteïna. Els LPSs són les principals endotoxines de les bacteries gram-negatives i poden provocar resposta cel·lular en cultius (s'ha detectat una viabilitat superior al 300% en assajos d'MTT). És per això que, abans de realitzar experiments de viabilitat cel·lular en cultius de neuroblastoma humà SH-SY5Y, cal extraure la fracció lipopolisacàrida de la mostra d'scFv-h3D6 i evitar, així, falsos positius en els resultats obtinguts.

De la mateixa manera, també s'han extret els LPSs de la mostra d'scFv-h3D6 injectada en ratolins triple-transgènics 3xTg-AD, models d'AD. Els resultats dels experiments *in vivo* han estat estudiats per Rivera-Hernández, G. (Gimenez-Llort et al. 2013, Rivera-Hernandez 2013).

Per a l'extracció dels LPSs, s'han emprat les columnes d'afinitat d'LPSs *Detoxi-Gel Endotoxin Removing Columns* (Thermo Scientific) (veure apartat 3.6.1.2 de Materials i Mètodes Generals). La quantitat d'LPS per mL de mostra proteica depèn del volum de cultiu d'expressió cel·lular inicial, i s'haurà de tenir en compte en el moment de la seva extracció. Així, per cada L de cultiu expressat s'apliquen 5 mL de mostra proteica a una columna d'afinitat.

Els tampons utilitzats per a la cromatografia són els següents:

- Tampó de Regeneració i d'Elució d'LPSs units: detergent sodi desoxicolat al 1% en aigua Milli-Q.
- Tampó d'Equilibrat i d'Elució d'scFv-h3D6 no unit: tampó PBS, pH 7.4.

El protocol seguit per a l'eliminació d'LPSs, expressat en volums de columna (1 VC = 1 mL), és el següent:

1. Rentar la columna amb 5 VC d'aigua Milli-Q per tal d'eliminar l'etanol emprat per a la seva conservació a 4 °C.

2. Regenerar la columna amb 5 VC de detergent sodi desoxicolat al 1%.
3. Rentar l'excés de detergent amb 4 VC d'aigua Milli-Q.
4. Equilibrar la columna amb 4 VC de tampó PBS pH 7.4.
5. Afegir a la columna, un volum màxim de 5 mL de mostra (provinent d' 1 L d'expressió cel·lular), a una concentració de 0.5 mg/mL aproximadament.
6. Per gravetat, recol·lectar, en fraccions d'1 mL, la mostra sortint de la columna, ja que la proteïna no és retinguda. Descartar el primer mL d'elució.
7. Per assegurar la completa recuperació de la mostra d'scFv-h3D6 lliure d'LPSs, afegir el mateix volum de tampó PBS pH 7.4 que de mostra afegida; i recol·lectar-la en fraccions d' 1 mL.
8. Rentar la columna amb 2 VC de tampó PBS pH 7.4 per acabar d'eluir tota la mostra d'scFv-h3D6, recol·lectar-la en fraccions d' 1 mL.
9. Per a eluir els LPSs units a columna, rentar la columna amb 5 VC de detergent sodi desoxicolat al 1%.
10. Conservar la columna a 4 °C en etanol al 25 %.

És recomanable realitzar una columna d'exclusió molecular PD-10 cap a tampó PBS pH 7.4, per tal d'eliminar restes de detergent sodi desoxicolat al 1 % arrossegat amb la mostra d'scFv-h3D6 eluïda, que poden afectar l'estructura de la proteïna així com interferir en els mètodes de quantificació o de viabilitat cel·lular (veure apartat 3.6.3.2 de Material i Mètodes Generals).

### **3.7. Microscòpia electrònica de transmissió (TEM).**

Per TEM, s'ha visualitzat la via d'agregació del pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub>, de l'scFv-h3D6, així com del complex A $\beta$ <sub>1-42</sub>-scFv-h3D6, totes elles a una concentració final de 100  $\mu$ M. Per a induir la oligomerització, les mostres han estat incubades a 37 °C, durant 0, 3 i 48 h; per a la formació amiloide, s'han seguit incubant a 90 °C, durant 5 min. A més, també s'ha visualitzat la mostra incubada a 60 °C, durant 10 min, per tal d'obtenir informació sobre l'estat intermediari induït per temperatura.

Les mostres van ser diluïdes 1/10 en tampó PBS, absorbides en reixetes de coure recobertes de carboni, i tenyides negativament amb acetat d'uranil al 1 % (veure apartat 4.6.1 de Materials i Mètodes Generals). Les mostres van ser visualitzades al microscopi Hitachi H-7000, del servei de microscòpia de la UAB, i analitzades amb el software DigitalMicrograph (Gatan).

### 3.8. Assajos d'agregació per fluorescència. ThT i ANS.

Els fluoròfors ThT (Tioflavina-T) i l'ANS (àcid 8-anilo-1-naftalè-sulfònic) van ser emprats per a quantificar l'agregació de les mostres visualitzades per TEM (veure apartat 4.4 de Materials i Mètodes Generals).

Mostres de 10 µl van ser mesclades amb 90 µl de ThT a 27.78 µM (concentració final de 25 µM), o bé, amb 90 µl d'ANS a 56 µM (concentració final de 50 µM), i monitoritzades a 25 °C. La longitud d'ona d'excitació de la ThT va ser 450 nm (espectre d'emissió de 470 a 530 nm), i de l'ANS va ser de 388 nm (espectre d'emissió de 400 a 600 nm). La obertura de les finestres d'excitació i emissió, en tots dos casos, va ser de 10 nm, i es van registrar 10 espectres, obtenint-ne la mitjana. Les intensitats van ser quantificades a 482 nm per la ThT, i a 470 nm per a l'ANS. Cada condició consistia en tres rèpliques per experiment, i sis experiments independents van ser analitzats, obtenint-ne la mitjana, després de normalitzar les dades usant la mesura a temps 0 com a referència.

Durant la desnaturalització tèrmica de les tres mostres a una velocitat de 60 °C/h, es va seguir les cinètiques d'unió a ThT i ANS a un màxim d'emissió de 482 nm i 470 nm, respectivament.



*El grapat de bons resultats obtinguts en aquest capítol de la tesi doctoral han estat assolits gràcies al treball en conjunt amb el meu company de laboratori i futur doctor Geovanny Rivera-Hernández. Una col·laboració mútua, i inicialment necessària per arrencar de zero i tirar endavant la primera línia d'investigació del nostre grup de recerca, Protein Folding & Stability Group, sota direcció de la Dra. Sandra Villegas. Els resultats aquí exposats es troben íntimament lligats, i alguns en formen part, amb la tesi doctoral del meu company Rivera-Hernández, G., i, per tant, aquesta serà referenciada al llarg del capítol.*





## 4. RESULTATS.

### 4.1. Expressió i purificació de l'scFv-h3D6.

Es va dissenyar i sintetitzar (GenScript) el fragment codificant per a l'scFv-h3D6 ( $V_H-(Gly_4Ser)_3-V_L$ ) a partir de la seqüència del anticòs monoclonal humanitzat h3D6.v2. El gen consisteix en un fragment de 750 pb, amb les dianes de tall específiques dels enzims de restricció *NcoI-NotI* als extrems, per al seu clonatge a vectors.

La quantitat de proteïna scFv recombinant obtinguda després de la seva purificació, és, en general, molt baixa, degut a les seves propietats de plegament i estabilitat (Zheng, Baumann & Reymond 2003). Seguint amb la mateixa problemàtica en el nostre grup de recerca, al final del procés de purificació de l'scFv-h3D6, la quantitat de proteïna extreta de la fracció citoplasmàtica soluble era d'aproximadament 1 mg/mL per L de cultiu. Per aquesta raó, i amb la dificultat d'iniciar una línia de recerca, inicialment es va provar una gran varietat de sistemes d'expressió en diferents soques d'*E. coli*, subclonat a diferents vectors d'expressió, i fusionat a diferents proteïnes *tag* (Rivera-Hernandez 2009). Resumidament, el fragment gènic d'scFv-h3D6, va ser clonat dins de varis vectors derivats del sistema pET, els quals contenien cues d'histidines (*His-tag*), pèptids senyals (DsbA, DsbC o PelB), o bé proteïnes fusió [MBP (*maltose-binding protein*), Ztag, GB1 (*protein G B1 domain*), GST (*glutathione transferasa*), *trx* (tioredoxina), o NusA], així com la diana específica per a la proteasa TEV. Pel que fa als tipus de soques d'*E. coli*, es va usar la soca BL21(DE3) per a secretar la proteïna recombinant al periplasma, mentre que la soca Origami2(DE3) va ser emprada per al correcte plegament de la proteïna al citoplasma, ja que afavoreix l'ambient oxidatiu en el citoplasma i facilita el correcte plegament de proteïnes que contenen ponts disulfur, com ara l'scFv-h3D6, que en presenta un a cada domini.

Malgrat la gran varietat de sistema provats, cap d'ells donava lloc a una producció final d'scFv-h3D6 alta. De totes les possibles construccions, es van seleccionar les dues següents, tots dues expressades en Origami2(DE3):

- **(His)<sub>6</sub>-trx-dianaTEV-scFv-h3D6 de 40.6 kDa.**

Inicialment, es va treballar amb aquesta construcció, obtenint un rendiment d'1 mg/mL per L de cultiu de la forma soluble, i aproximadament 4 mg/mL per L de cultiu obtinguts a partir del replegament de la fracció insoluble. Tot i això, es va observar certa proteòlisi inespecífica durant la purificació, segurament degut a un mal empaquetament del domini *trx* i l'scFv-h3D6, i que permetia l'acció d'alguna metal·loproteasa d'*E. coli*, ja que aquesta activitat era inhibida amb EDTA.

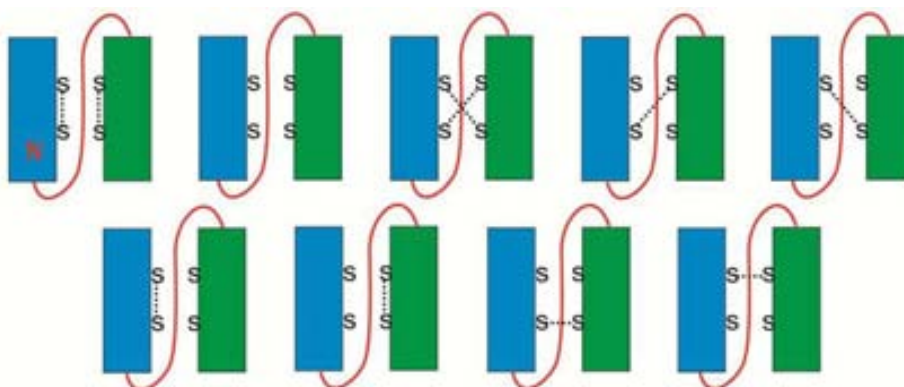
- **(His)6-NusA-dianaTEV-scFv-h3D6 de 83.4 kDa**

Com a alternativa, es va treballar amb el constructe de NusA, amb el qual no es va observar cap proteòlisi inespecífica, i es va obtenir un rendiment més alt a partir de la fracció soluble, 7 mg/mL per L de cultiu, fent innecessari el replegament de la fracció insoluble.

**4.1.1. Dimerització i formes scrambled de l'scFv-h3D6.**

Es sabut que les molècules d'scFv, en general, tendeixen a dimeritzar per intercanvi de dominis (o *swapping*) (Arndt, Muller & Pluckthun 1998). Aquests dímers cauen en trapes cinètiques durant el procés d'expressió de la proteïna recombinant, de forma que, a part de disminuir el rendiment final (al voltant d'un 15 %), va ser necessari un últim pas de purificació per cromatografia d'exclusió molecular (SEC, Superdex-75) per a separar la forma dimèrica de la monomèrica.

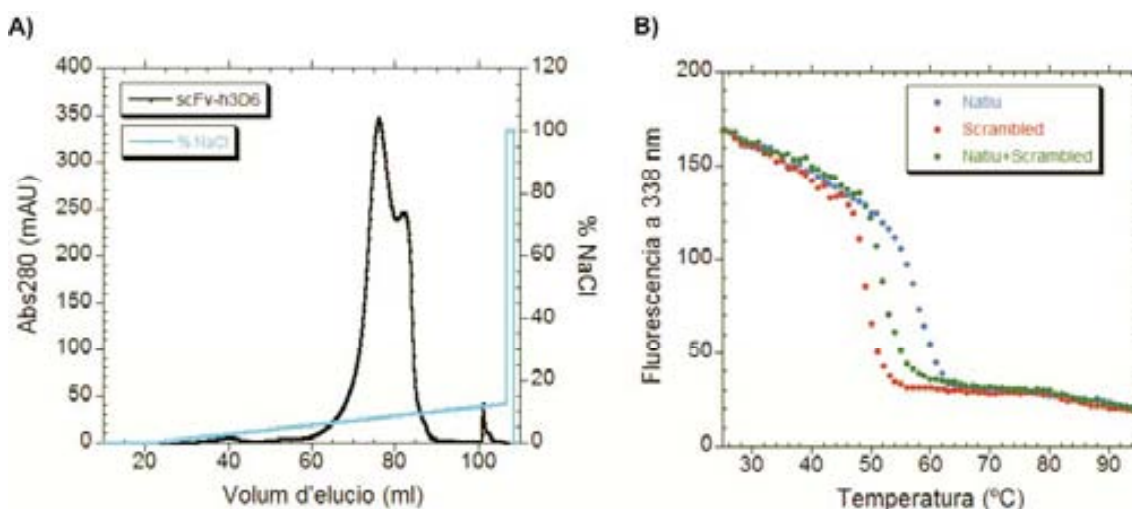
A banda dels dímers d'scFv-h3D6, un dels principals inconvenients que ha hagut d'afrontar el grup de recerca, i que es troba detallat a la tesi doctoral en redacció de Rivera-Hernández, G., i en el treball de màster de Blasco-Moreno, B. (Rivera-Hernandez 2009, Blasco-Moreno 2011, Rivera-Hernandez 2013), és la formació de formes *scrambled* per part de l'scFv-h3D6 aïllat. Les formes *scrambled* són totes aquelles combinacions en què es poden formar els ponts disulfur, tant nadius com no nadius. En el cas de l'scFv-h3D6, trobem quatre cisteïnes susceptibles de formar ponts disulfur, per tant existeixen fins a nou formes *scrambled* teòriques, tal i com es representa a la figura 1. 1.



**Figura 1. 1. Representació de les diferents formes *scrambled* de l'scFv-h3D6.** L'scFv-h3D6, amb quatre residus cisteïna, dos per domini ( $V_H$ , blau i  $V_L$ , verd), pot formar fins a nou formes diferents de ponts disulfur, sent la primera (N) la forma nativa. En vermell es representa el connector entre tots dos dominis.

A partir del model 3D de l'scFv-h3D6, descrit en el Capítol 2 d'aquesta tesi doctoral, es va veure que els ponts disulfur nadius s'estableixen entre una cadena- $\beta$  molt exposada i una altra de molt enterrada, cadascuna situada a una de les fulles- $\beta$  que conformen el barril- $\beta$ , compactant el domini. Les formes *scrambled* modifiquen aquestes interaccions intradomini, alterant dràsticament l'estabilitat global de la molècula, mentre que el plegament globular no es veu quasi afectat. La presència de formes *scrambled* explica les diferents tendències a l'agregació obtingudes amb el mateix scFv-h3D6, depenent del sistema d'expressió i purificació emprat. D'altra banda, aquest fet també explica la important precipitació de la mostra al llarg del procés de purificació.

Tot i que vam ser capaços de separar les formes *scrambled* obtingudes a partir del constructe (His)<sub>6</sub>-NusA-dianaTEV-scFv-h3D6, finalment es va optimitzar el protocol de purificació de l'scFv-h3D6, evitant la proteòlisi inespecífica, i separant les formes dimèriques i *scrambled*, utilitzant el constructe (His)<sub>6</sub>-trx-dianaTEV-scFv-h3D6, tal i com s'ha explicat a l'apartat de Materials i Mètodes 3.1. del Capítol, obtenint un rendiment final de proteïna scFv-h3D6 pura i nativa de 4 mg/mL per L de cultiu, gràcies a la seva purificació per cromatografia de bescanvi catiònic (CEX). La figura 1. 2-A mostra l'elució de l'scFv-h3D6, el qual està format per dos pics solapats, el primer consisteix en l'estat natiu i el segon en les formes *scrambled*. Per desnaturalització tèrmica (figura 1. 2-B) es pot observar la diferència en la tendència a l'agregació entre tots dos; com també de la fracció solapada, que mostra un comportament intermediari.



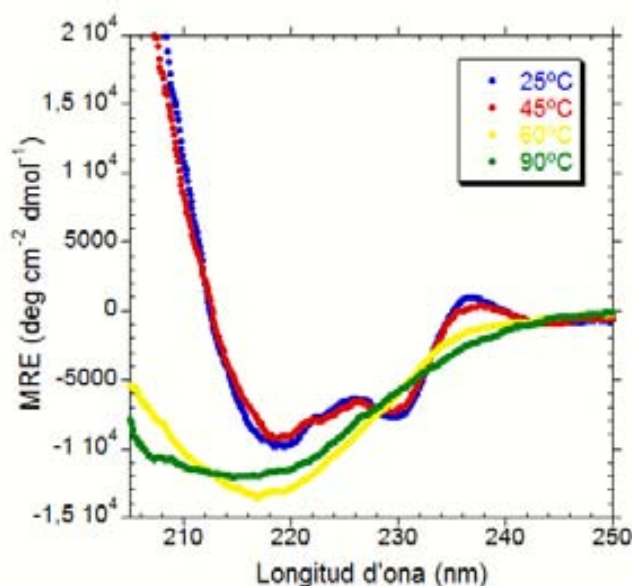
**Figura 1. 2. Identificació de l'scFv-h3D6 natiu i les formes *scrambled*.** A) Separació per cromatografia d'intercanvi catiònic de les forma nativa (primer pic) i les *scrambled* (segon pic), mitjançant un gradient lineal de NaCl. B) Identificació, per fluorescència dels triptòfans, de la fracció nativa (blau) i les formes *scrambled* (vermell). La regió de solapament de pics (verd) té una tendència a la agregació mitja, sent l'estat natiu el que necessita major temperatura per agregar.

Identificar i aïllar les formes *scrambled* ha estat indispensable per a obtenir uns resultats físico-químics raonables i fiables, i per evitar la gran variabilitat experimental obtinguda fins aleshores.

#### 4.2. Identificació de l'intermediari d'agregació WL de l'scFv-h3D6.

A partir dels anàlisi d'estructura secundària i la desnaturalització tèrmica de l'scFv-h3D6, desenvolupats, principalment, pel company de laboratori, i detallat a la seva tesi doctoral en redacció, Rivera-Hernández, G., es va identificar, durant la via d'agregació induïda per temperatura de l'scFv-h3D6, l'existència d'un estat intermediari ric en estructura- $\beta$ , i el qual serà determinant en l'estudi de l'efecte de l'scFv sobre la via d'agregació amiloide del pèptid  $A\beta_{1-42}$ .

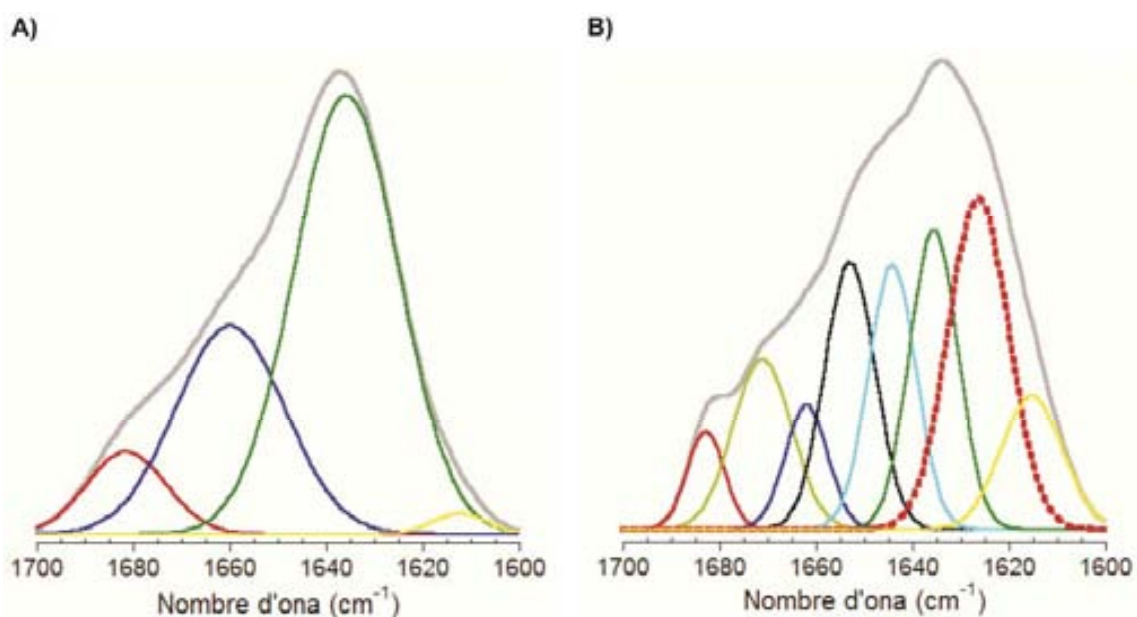
De forma resumida, l'obtenció dels espectres de CD-llunyà i de FTIR van permetre determinar que l'scFv-h3D6 natiu adopta la estructura secundària en fulla- $\beta$  típica d'Ig. A més d'un mínim d'el·lipticitat a 218 nm i un màxim a 200 nm (Figura 1. 3), l'espectre de CD-llunyà mostra un segon mínim a 230 nm i un màxim a 237 nm. Aquestes particularitats del espectre poden correspondre a la contribució de les cadenes laterals dels residus aromàtics i/o cistinil (Byler, Susi 1986, Sreerama et al. 1999, Walther et al. 2010). En el cas de l'scFv-h3D6 però, ha quedat demostrat que són els residus triptòfan conservats dels nuclis hidrofòbics els responsables d'aquestes anomalies (Rivera-Hernandez et al. 2013, Montoliu-Gaia 2013)



**Figura 1. 3** Espectre de CD al UV-llunyà de l'scFv-h3D6 a diferents temperatures. L'espectre a 25 °C mostra dos mínims d'el·lipticitat (218 nm i 230 nm), i dos màxims a 200 nm i a 237 nm. Aquest espectre particular es perd a partir dels 60 °C a favor de la conformació de fulla- $\beta$  canònica (mínim a 215 nm), el qual es manté a 90 °C i després de la renaturalització a 25 °C (dades no mostrades).

A partir dels 60 °C l'espectre de CD natiu es perd a favor de la conformació en fulla- $\beta$  canònica, que és manté als 90 °C i al retornar als 25 °C (dada no mostrada). El fet de que, enlloc d'adoptar el patró de proteïna desplegada (o *random coil*), s'adopti l'estructura canònica en fulla- $\beta$  (mínim a 215 nm), fa pensar en una agregació ordenada i rica en estructura- $\beta$ , característica de l'agregació amiloide.

Degut al particular espectre obtingut per CD, no ha estat possible deconvolucionar-lo per a obtenir el % d'estructura secundària. Per aquesta raó, s'ha realitzat un anàlisi per FTIR a diferents temperatures. La figura 1. 4 mostra la deconvolució de l'espectre d'infraroig a la regió d'amida I'. A 25 °C, apareixen tres bandes principals localitzades a 1681, 1660, i 1636  $\text{cm}^{-1}$ ; i una banda menor a 1612  $\text{cm}^{-1}$  (figura 1. 4-A). Les components de fulla- $\beta$  antiparal·lela d'alta i baixa freqüència, típiques del plegament d'Igs, és corresponen a les bandes de 1681 i 1636  $\text{cm}^{-1}$ , respectivament; i els girs- $\beta$  i *loops* es centren a 1660  $\text{cm}^{-1}$  (Byler, Susi 1986, Walther et al. 2010).

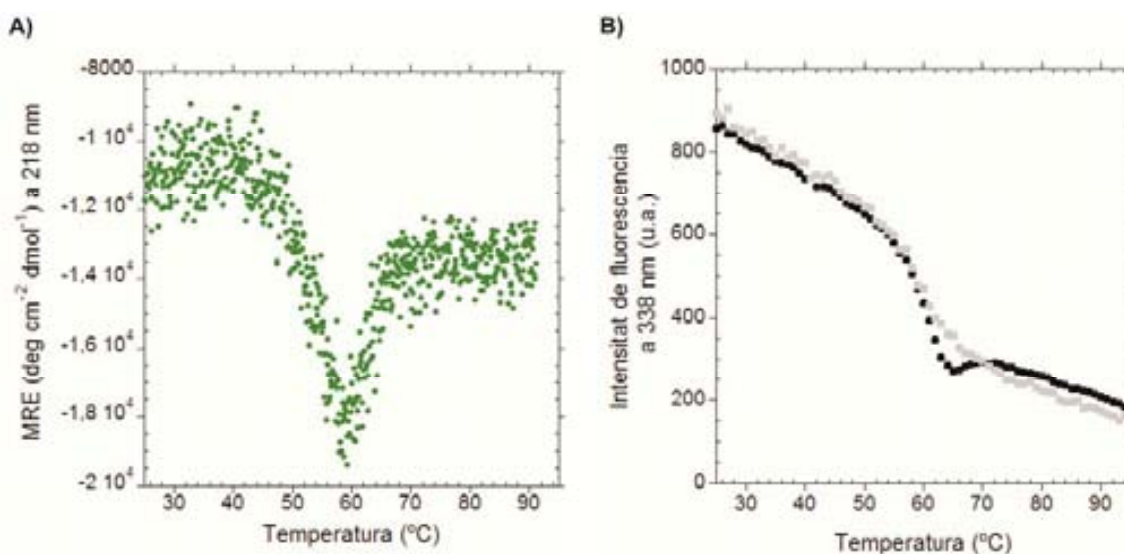


**Figura 1. 4. Deconvolució de l'espectre de FTIR de la regió d'amida I' de l'scFv-h3D6 a diferents temperatures.** A) L'espectre a 25 °C genera quatre bandes principals, mentre que l'espectre a 60 °C (B) genera fins a vuit bandes diferents. La banda vermella discontinua indica la component en agregats- $\beta$  a 1626  $\text{cm}^{-1}$ .

L'espectre de FTIR a 60 °C (Figura 1. 4-B), genera bandes addicionals a les típiques del plegament d'Ig adquirides a 25 °C, que disminueixen el seu tant per cent, sobretot la component en fulla- $\beta$  antiparal·lela nativa (1636  $\text{cm}^{-1}$ ) i els *loops*/girs- $\beta$  (1660  $\text{cm}^{-1}$ ). El canvi més significatiu a 60 °C, és l'aparició de la banda a 1626  $\text{cm}^{-1}$ , la qual ja havia estat

reportada com a correspon a les fibres WL (Jahn, Tennent & Radford 2008). A part, l'increment de la banda a  $1615\text{ cm}^{-1}$ , corresponent a fibres amiloides (Zandomenighi et al. 2004), va fer necessari comprovar per assajos d'agregació (ThT i ANS) i per TEM el tipus d'agregats de l'scFv-h3D6.

La figura 1. 5-A mostra la desnaturalització tèrmica, seguida per CD, i que descriu una transició conformacional de l'scFv-h3D6 als  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ . El mínim a  $218\text{ nm}$ , augmenta a partir dels  $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ , de tal manera que el plegament guanya contingut en fulla- $\beta$ . A  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , però, esdevé una transició en la qual es perd part d'aquesta estructura- $\beta$  adquirida a partir de l'estat natiu, i el senyal s'estabilitza per sobre dels  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ . La modificació conformacional descrita per temperatura, s'associa a una reestructuració de la fulla- $\beta$  nativa, sense passar per un estat desplegat, donant lloc a una agregació parcial i la conseqüent pèrdua del senyal. Aquesta reestructuració dóna lloc a l'aparició, als  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , d'un estat intermediari d'una via d'agregació, el qual serà el precursor dels agregats de l'scFv-h3D6.



**Figura 1. 5. Desnaturalització tèrmica de l'scFv-h3D6.** A) Desnaturalització tèrmica per CD seguint el mínim d'el·lipticitat a  $218\text{ nm}$ . B) Desnaturalització tèrmica seguint el desplaçament del màxim de fluorescència a  $338\text{ nm}$ , a una concentració de  $20\text{ }\mu\text{M}$  (negre) i  $2\text{ }\mu\text{M}$  (gris).

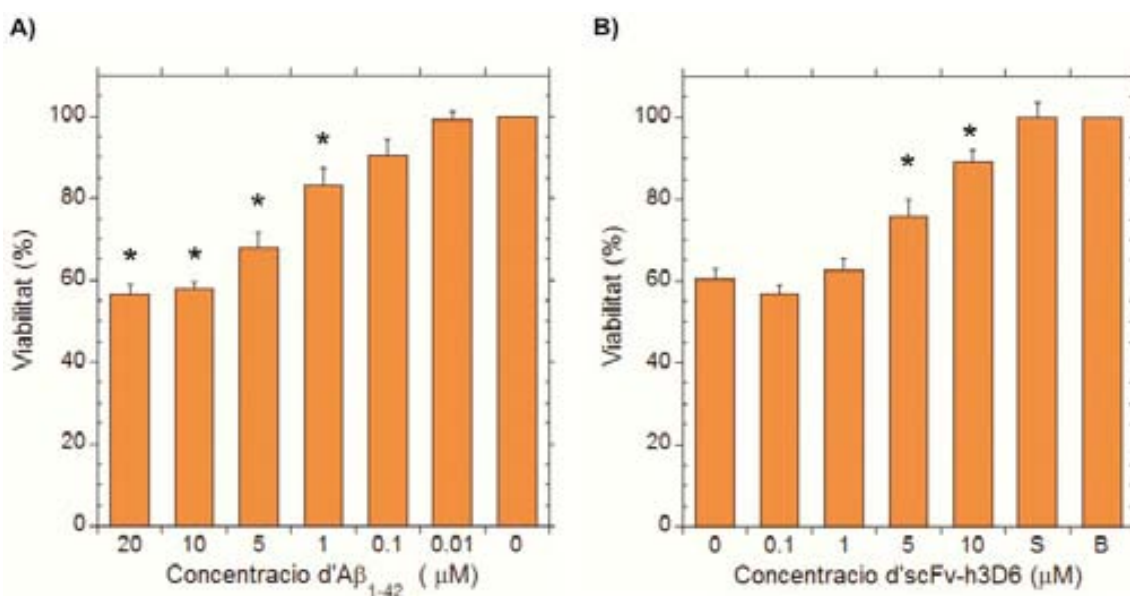
Les fibres amiloides i les WL són formades a partir de diferents vies d'agregació que porten a un estat final diferent: les amiloides són rectes i llargues, i segueixen una cinètica depenent de nucleació, mentre que les fibres WL són corbades i curtes, i es formen seguint una cinètica independent de nucleació (Gosal et al. 2005). La desnaturalització tèrmica (Figura 1. 5-B), seguida per fluorescència, a dues concentracions de proteïna

diferents (2 i 20  $\mu\text{M}$ ), mostra la mateixa transició a 60 °C, i les pendents abans i després d'aquest punt no es veuen alterades per la concentració de proteïna, la qual cosa implica que l'agregació de l'scFv-h3D6 segueix una cinètica no dependent de concentració, o, dit d'una altra manera, de nucleació, i, per tant, les fibres formades per l'scFv-h3D6, són del tipus WL.

Un cop identificat el plegament natiu de l'scFv i la seva via d'agregació iniciada per un intermediari tèrmic, ja es pot assajar i entendre el seu efecte sobre la toxicitat del pèptid  $\text{A}\beta_{1-42}$  a condicions fisiològiques.

#### 4.3. Prevenció de la toxicitat de l' $\text{A}\beta_{1-42}$ per l'scFv-h3D6.

Primerament, es va determinar la concentració òptima de pèptid  $\text{A}\beta_{1-42}$ , en estat oligomèric, per a generar màxima toxicitat en la línia cel·lular de neuroblastoma humà SH-SY5Y, determinat pel mètode d'MTT. La figura 1.6-A mostra que 10 i 20  $\mu\text{M}$  de pèptid  $\text{A}\beta_{1-42}$  són les concentracions més efectives per a reduir la viabilitat del cultiu cel·lular, fins a un 60 %.



**Figura 1. 6. Assaig de viabilitat per MTT de la línia cel·lular de neuroblastoma humà SH-SY5Y.** A) Toxicitat induïda per diferents concentracions de pèptid  $\text{A}\beta_{1-42}$ . \* $P \leq 0.068$  comparat amb el 0  $\mu\text{M}$  d' $\text{A}\beta_{1-42}$ . B) Recuperació de la viabilitat cel·lular en presència de 10  $\mu\text{M}$  de pèptid  $\text{A}\beta_{1-42}$  per addició de diferents concentracions d'scFv-h3D6. S: 10  $\mu\text{M}$  scFv-h3D6 sense pèptid  $\text{A}\beta_{1-42}$ ; B: tampó (sense scFv-h3D6 ni  $\text{A}\beta_{1-42}$ ). \* $P \leq 0.068$  comparat amb el 0  $\mu\text{M}$  d'scFv-h3D6. Les barres d'error signifiquen  $\pm$  S.E.M. La significança ha estat calculada usant el test de rangs signats de Wilcoxon per a quatre experiments independents, i sis replicues de cada condició per experiment.

A mesura que disminueix la concentració de pèptid, la viabilitat cel·lular augmenta quasi proporcionalment, assolint ja el 100 % a concentracions molt baixes (0.01  $\mu\text{M}$ ), on es podria considerar que el pèptid es troba en forma monomèrica no tòxica, malgrat haver induït la oligomerització.

El fet de que la concentració de pèptid a 20  $\mu\text{M}$  no sigui més tòxica que a 10  $\mu\text{M}$ , pot resultar contradictori, però cobra sentit si s'observa des del punt de vista cinètic. A una major concentració, la via d'agregació és troba desplaçada cap a la formació de fibres amiloides, enlloc de poblar espècies oligomèriques citotòxiques, ja que la cinètica de formació de fibres amiloides segueix un procés depenent de nucleació, i per tant, de la concentració inicial de formes monomèriques.

A partir d'aquest primer resultat, s'ha emprat la concentració de pèptid 10  $\mu\text{M}$  amb l'objectiu de revertir la toxicitat del pèptid  $\text{A}\beta_{1-42}$ . Per incubació a 37 °C, durant 3 h, s'ha induït la oligomerització del pèptid  $\text{A}\beta_{1-42}$ , coïncubat amb concentracions creixents d'scFv-h3D6. A més, com a control positiu, i conscients de la tendència a l'agregació del mateix scFv-h3D6, aquest també ha estat sotmès, individualment, a les condicions d'oligomerització, per tal de demostrar que no genera toxicitat.

Tal i com mostra la figura 1. 6-B, l'scFv, a una concentració igual a la del pèptid (10  $\mu\text{M}$ ), no produeix cap efecte citotòxic sobre les cèl·lules, donant lloc a un 100 % de viabilitat respecte el blanc de PBS. La combinació de totes dues molècules, el complex  $\text{A}\beta_{1-42}$ -scFv-h3D6, recupera la viabilitat cel·lular d'una manera depenent de concentració. La relació 2:1, és a dir, 10  $\mu\text{M}$  d' $\text{A}\beta_{1-42}$ /5  $\mu\text{M}$  d'scFv-h3D6, és suficient per a observar un efecte significatiu de l'scFv sobre l' $\text{A}\beta_{1-42}$ . A concentracions equimolars, pràcticament s'anul·la la toxicitat induïda pel pèptid  $\text{A}\beta$  per complet.

Degut al potencial terapèutic del l'scFv-h3D6, és necessari aprofundir en els canvis conformacionals que provoquen la prevenció de la toxicitat de l' $\text{A}\beta_{1-42}$  per part d'aquest fragment d'anticòs. Donat que l' $\text{A}\beta_{1-42}$  segueix la via amiloide, i l'scFv segueix la via de fibres WL, tal i com s'ha descrit anteriorment, resulta indispensable estudiar ambdues vies de *misfolding* per separat, i així poder estudiar i entendre detalladament que esdevé quan es forma el complex  $\text{A}\beta_{1-42}$ -scFv-h3D6.



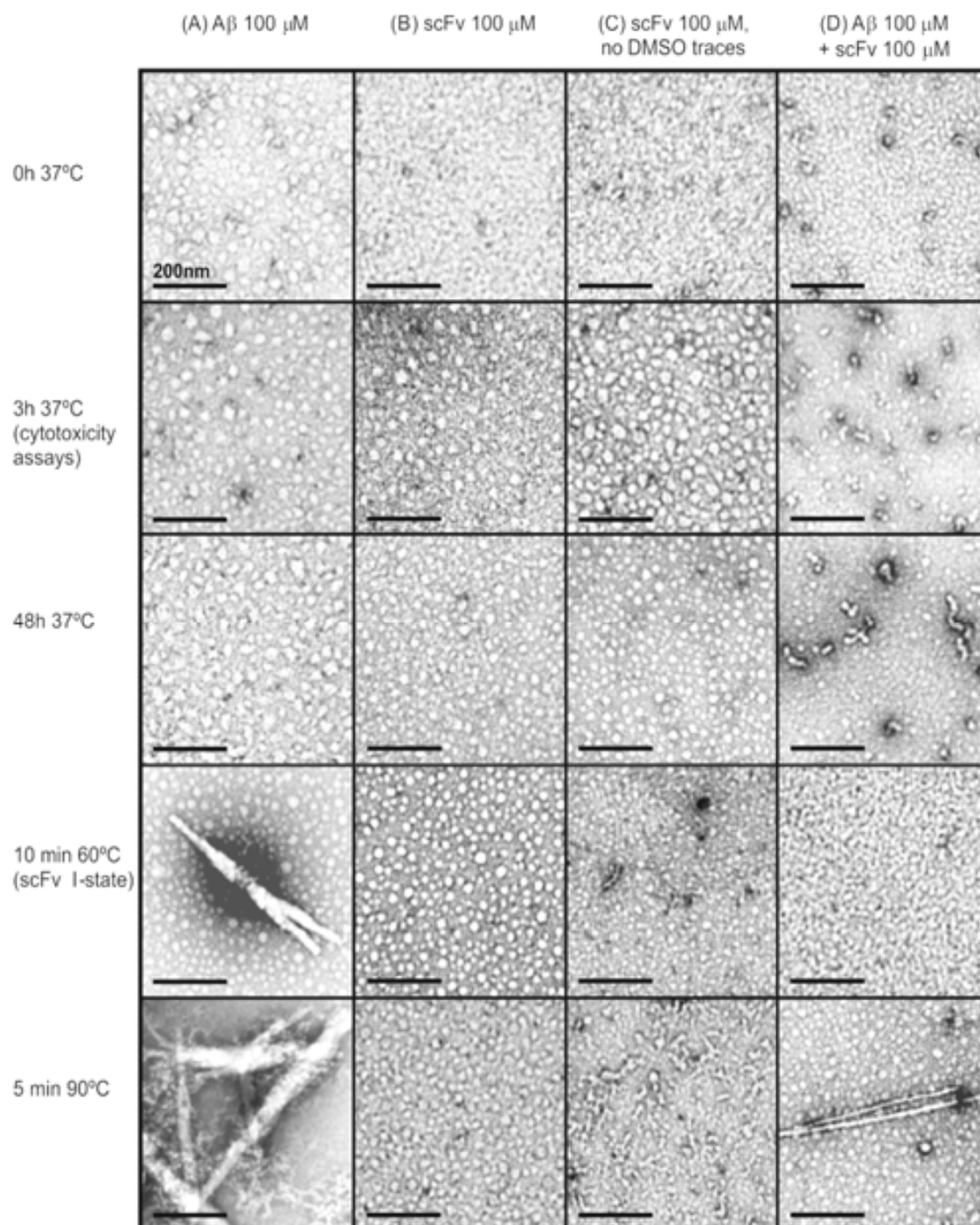
#### 4.4. *Misfolding* del pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub>.

A partir de que va ser establert que l'anticòs monoclonal sencer mAb-h3D6 reconeix específicament els oligòmers d'A $\beta$  (Jacobsen 2006, Wisniewski, Konietzko 2008, Nitsch, Hock 2008), els quals són els precursors de les fibres amiloides i les espècies citotòxiques, vam decidir treballar sota condicions en les quals s'indueix l'estat oligomèric del pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub>. La idea d'arribar a tractar ratolins *in vivo*, ens va acabar de decantar per optimitzar aquestes condicions a les fisiològiques. Finalment, l'agregació del pèptid abans de ser afegit al cultiu cel·lular, o de mesclar-lo amb l'scFv-h3D6, ha estat en tampó PBS, pH 7.4, durant 3 h a 37 °C. Mitjançant TEM, es va demostrar que, en aquestes condicions, realment es formen els oligòmers d'A $\beta$  (Figura 1. 7-A).

Tal i com es veu per les imatges de TEM, els oligòmers d'A $\beta$  són visualitzats des del moment en que el film de pèptid és resuspès en DMSO i tampó PBS (veure apartat 3.4 de Materials i Mètodes del capítol), i es mantenen al llarg de la incubació a 37 °C sense indicis de formació amiloide. Això no vol dir que ens trobem fora de la via amiloide, ja que el tractament de la mostra a elevada temperatura, 60 i 90 °C, indueix la formació de fibres.

Els tractaments a diferents temperatures utilitzats per a les imatges de TEM, també van ser emprats per a quantificació l'agregació del pèptid per fluorescència, a través de la seva unió als fluoròfors ThT i ANS. La ThT és considerat un marcador específic de fibres amiloides (Naiki et al. 1989), mentre que l'ANS és usat, extensament, degut a la seva capacitat d'unir-se a regions hidrofòbiques de proteïnes (Ray, Singh & Balaram 2001).

En les condicions en les que s'ha treballat, el pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub> inicialment ja uneix certa ThT, i augmenta la fluorescència d'aquesta a mesura que s'allarga la incubació a 37 °C (Figura 1. 8-A). A 60 °C, tot i que per TEM ja s'havia detectat la presència de component fibril·lar, la unió a ThT segueix sent la mateixa que a 48 h a 37 °C. És amb el tractament a 90 °C, quan augmenta la fluorescència pràcticament el doble del senyal anterior. Pel que fa a la fluorescència de l'ANS, es detecten nivells d'unió molt baixos, inclús després d'escalfar el pèptid (Figura 1. 8-B). Aquests resultats indiquen que, efectivament, el pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub>, es troba dins la via d'agregació amiloide.

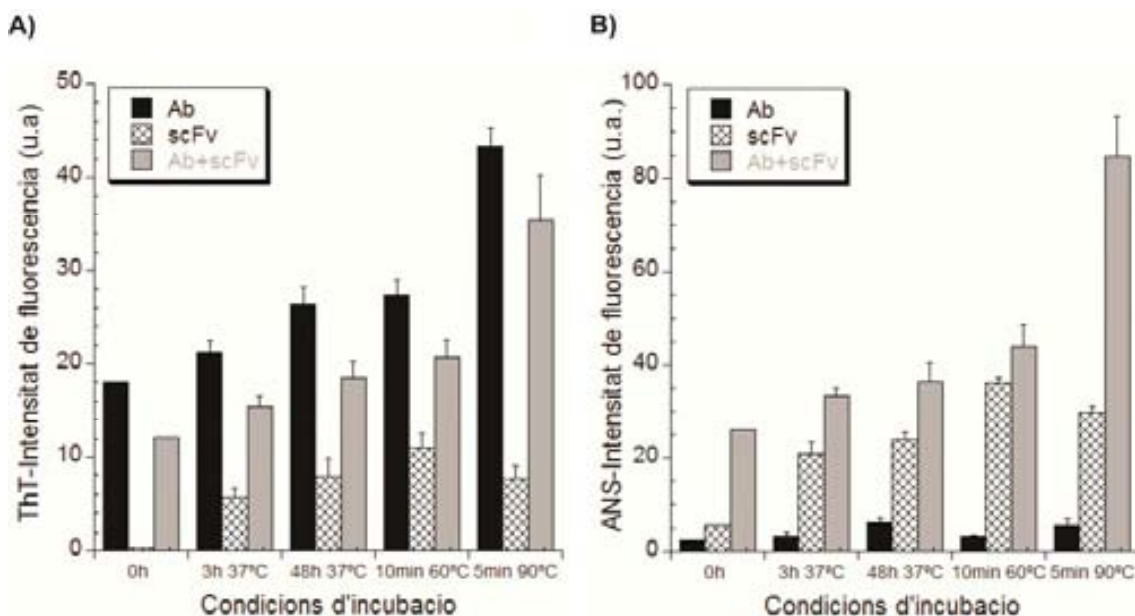


**Figura 1. 7. Formació de fibres amiloides i WL per part de l'A $\beta$ <sub>1-42</sub>, l'scFv-h3D6 i el complex A $\beta$ <sub>1-42</sub>:scFv-h3D6, en funció de la temperatura i la presència de DMSO.** Imatges adquirides per TEM de A) 100  $\mu$ M d'A $\beta$ <sub>1-42</sub>, B) 100  $\mu$ M d'scFv-h3D6, C) 100  $\mu$ M d'scFv-h3D6 en absència de DMSO, D) 100  $\mu$ M d'A $\beta$ <sub>1-42</sub>:scFv-h3D6, a diferents temps i temperatures d'incubació. A) Els oligòmers citotòxics d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> són visualitzats a 37 °C, i escalfant a majors temperatures s'indueix la formació de fibres amiloides. B) L'scFv-h3D6 no forma fibres WL en presència de DMSO. C) L'scFv-h3D6 en absència de DMSO forma petits oligòmers a 37 °C, i a 60 °C (on la població de l'intermediari tèrmic és més màxima) s'inicia la formació fibres WL, que es troben més estructurades a 90 °C. D) El complex A $\beta$ <sub>1-42</sub>:scFv-h3D6 forma directament fibres WL a 37 °C, i a temperatures majors és trenca el complex, donant lloc a protofilaments amiloides i oligòmers. La barra indica 20 nm.

#### 4.5. Misfolding de l'scFv-h3D6.

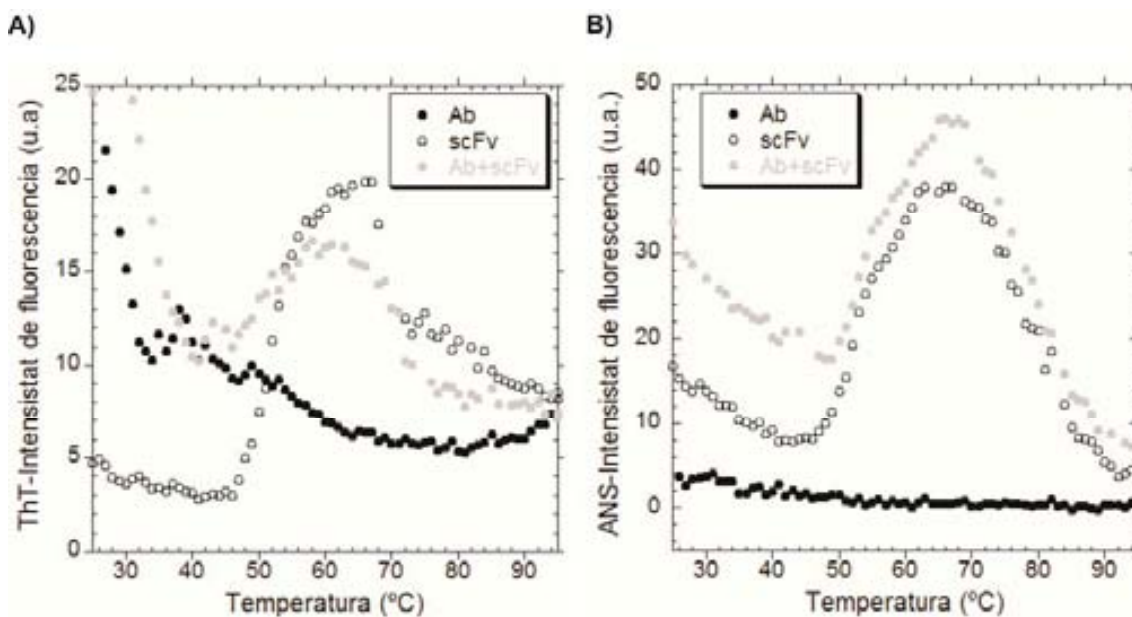
Tal i com s'ha mencionat anteriorment, per tractament tèrmic, l'scFv-h3D6 inicia la via d'agregació caracteritzada per un intermediari ric en estructura- $\beta$ , el qual dóna lloc a agregats en forma de fibres WL. Inesperadament, aquestes fibres WL no són visualitzades per TEM, quan l'scFv-h3D6 és assajat individualment, sinó que apareixen espècies oligomèriques en totes les condicions tractades (Figura 1. 7-B).

És important mencionar que, tots els experiments realitzats per determinar l'efecte de l'scFv-h3D6 sobre la toxicitat i l'agregació del pèptid  $A\beta_{1-42}$ , contenen un 2 % de DMSO durant la incubació (0.2 % DMSO a les mostres finals), amb la finalitat de poder comparar, adequadament, els resultats obtinguts amb el pèptid  $A\beta$ , el qual, inevitablement, conté aquest tant per cent de DMSO (veure apartat 3.4 de Materials i Mètodes del capítol). Per a comprovar fins a quin punt el DMSO pot interferir a la via d'agregació de l'scFv-h3D6, es va decidir visualitzar per TEM el procés en absència de DMSO. Com era d'esperar, quan el DMSO no és present a la mostra d'scFv-h3D6, les fibres WL apareixen un cop la mostra ha estat incubada a 60 °C, i resulten més evident després del tractament a 90 °C (Figura 1. 7-C). Aquest resultat, a més, concorda amb l'anàlisi de FTIR discutit anteriorment, on la banda característica de fibres WL apareix als 60 °C (Figura 1. 4-B).



**Figura 1. 8. Assaig d'agregació per fluorescència de Tioflavina T i ANS.** Estudi de l'agregació del pèptid  $A\beta_{1-42}$ , l'scFv-h3D6, i del complex  $A\beta_{1-42}$ :scFv-h3D6 per unió del fluoròfor Tioflavina T (A) i ANS (B), a diferents temps i temperatures d'incubació. Les barres d'error signifiquen  $\pm$  S.E.M.

Pel que fa a la fluorescència, l'scFv-h3D6 sol, no uneix ThT, i la temperatura indueix un cert augment del senyal, especialment a la temperatura en la qual s'indueix la formació de l'estat intermediari (Figura 1. 8-A). L'ANS, en canvi, emet fluorescència en totes les condicions, també de forma més notòria quan l'intermediari és present (Figura 1. 8-B). El comportament d'ambdues fluorescències és pràcticament igual en absència de DMSO (dades no mostrades), dada que fa pensar que tant la ThT com l'ANS no són capaços de distingir entre oligòmers i fibres WL formades per l'scFv-h3D6.



**Figura 1. 9. Assajos d'agregació induïda per temperatura per fluorescència de Tioflavina T i ANS.** Estudi de l'agregació del pèptid  $A\beta_{1-42}$ , l'scFv-h3D6, i del complex  $A\beta_{1-42}$ :scFv-h3D6 seguint el màxim de fluorescència de la Tioflavina T a 482 nm (A), i el màxim de l'ANS a 470 nm (B), a mesura que augmenta la temperatura.

Amb la intenció de confirmar la importància de l'intermediari, induït per temperatura, dins la via d'agregació de l'scFv-h3D6, s'ha assajat la unió de ThT i ANS en funció de la temperatura, i sense agitació (Figura 1. 9-A, B). Efectivament, a 60 °C, tots dos fluoròfors uneixen l'estat intermediari i, a major temperatura, el senyal es perd degut a la formació d'agregats insolubles.

#### 4.6. Misfolding del complex $A\beta_{1-42}$ -scFv-h3D6.

La coincubació del fragment d'anticòs scFv-h3D6 amb el pèptid  $A\beta_{1-42}$ , en una relació equimolar, preveu la formació d'oligòmers d' $A\beta$  i, al seu lloc, inicia la formació de fibres WL, tal i com s'observa per TEM (Figura 1. 7-D). A les 3 h a 37 °C, les fibres WL ja són formades, per tant, aquesta ha estat la condició usada per als assajos de citotoxicitat, i

on la toxicitat dels oligòmers d'A $\beta$  ha estat revertida (Figura 1. 6-B). Que el complex A $\beta$ <sub>1-42</sub>:scFv-h3D6 segueix la via d'agregació WL, resulta més evident a llargs períodes d'incubació (48 h a 37 °C).

Quan el complex assoleix els 60 °C, temperatura en la qual apareix l'intermediari d'agregació del scFv-h3D6 quan aquest és incubat en absència de pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub>, el complex es dissocia, i als 90 °C, apareixen tant protofilaments amiloides com oligòmers. Tenint en compte que les fibres WL són espècies atrapades cinèticament, la temperatura despobra aquest estat, alliberant oligòmers d'A $\beta$  lliures i permetent que el pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub> retorni a la seva via amiloide.

Al contrari del que passa amb l'scFv-h3D6 aïllat, quan es mesclen totes dues molècules, la unió a ThT i ANS augmenta progressivament a mesura que augmenta la temperatura, especialment als 90 °C (Figura 1. 8-A, B). Aquest resultat concorda amb la presència de fibres WL abans d'escalfar, les quals és sabut que uneixen tots dos fluoròfors (Ray, Singh & Balaram 2001, Gosal et al. 2005); i amb la presència d'oligòmers i fibres amiloides, un cop escalfats.

Per tant, sembla a ser que, tot i que la formació de fibres WL és una propietat intrínseca de l'scFv-h3D6, aquelles que resulten del complex A $\beta$ <sub>1-42</sub>-scFv-h3D6 són més estables que les formades per l'scFv-h3D6 sol, perquè apareixen sense necessitat de tractament amb temperatura i, a més, es formen sota la presència de DMSO.



## 5. DISCUSSIÓ.

En aquest Capítol 1, s'ha descrit la producció i la determinació de la via d'agregació de l'scFv dissenyat a partir de la seqüència d'un mAb d'interès terapèutic per a l'AD. La immunització passiva amb scFv esdevé una estratègia terapèutica atractiva degut a que no produeix els efectes secundaris inesperats que provoca l'administració del anticòs sencer i, a l'hora, manté l'efectivitat d'aquest.

### 5.1. Expressió de l'scFv-h3D6 i l'activitat de la xaperona *trx*.

Avui en dia, la producció recombinant de fragments d'scFv esdevé poc efectiva, degut a la dificultat de plegament dels dos dominis amb pont disulfur i a la presència de cinc residus triptòfan. En aquest treball s'han obtingut, finalment, quantitats acceptables d'scFv-h3D6 a partir del replegament de la fracció insoluble obtinguda dins del sistema d'expressió d'*E. coli* Origami2(DE3) i la proteïna de fusió *trx*, posteriorment eliminada per la proteasa específica TEV. La tioredoxina (*trx*), ha estat emprada satisfactòriament per l'expressió i purificació d'altres molècules d'scFv, i la seva capacitat ha estat relacionada amb la seva activitat xaperona, més que amb l'activitat com a disulfur-isomerasa (Jurado, de Lorenzo & Fernandez 2006). Altres sistemes d'expressió, com ara, la proteïna de NusA, han donat alts rendiments de proteïna scFv-h3D6 citoplasmàtica soluble, tal i com s'explica a la tesi en redacció de Rivera-Hernández (Rivera-Hernandez 2009, Rivera-Hernandez 2013), obtenint fins a 7 mg/mL per L de cultiu. Però la presència de les formes *scrambled* difícils de separar de la forma nativa emprant aquest sistema d'expressió, ha fet que el replegament de la fracció insoluble a partir de *trx* sigui la manera d'obtenir l'scFv-h3D6 totalment pur i en el seu estat natiu, necessari per a una alta fiabilitat i reproductivitat dels experiments duts a terme.

### 5.2. Perfil de plegament de l'scFv-h3D6 sota pertorbació tèrmica.

L'scFv-h3D6 mostra la típica estructura secundària del plegament d'Ig, amb un 60 % de component en fulla- $\beta$  antiparal·lela i un 30 % de *loops/girs*- $\beta$  segons la deconvolució dels espectres de FTIR, i mostra un espectre de CD anòmal, també reportat en altres estudis d'scFv o dominis  $V_L$  (Sreerama et al. 1999, Baden et al. 2008a, Jahn, Tennent & Radford 2008).

La desnaturalització tèrmica de l'scFv-h3D6 dóna lloc a agregació, tal i com s'ha pogut veure per CD i fluorescència dels triptòfans. En el punt mig de la transició del espectre de CD, que correspon als 60 °C, es pobla un estat intermediari amb una

conformació similar a l'adquirida per l'estat agregat, a 90 °C. Aquest intermediari és generat per una reorganització directa de l'estat natiu, per tant, no és necessari passar per un estat desplegat per tal de saltar de l'embut de plegament natiu al d'agregació. L'intermediari, ric en estructura- $\beta$ , s'acumula independentment de la concentració, seguint una cinètica no depenent de nucleació. A més, per TEM s'ha comprovat que l'agregació per temperatura de l'scFv-h3D6 esdevé en la formació de fibres WL, enlloc de formar fibres amiloides. És sabut que les fibres WL segueixen una cinètica independent de nucleació i que uneixen tant ThT com ANS (McParland et al. 2000, Gosal et al. 2005). L'espectre de FTIR corrobora la formació de fibres WL, amb l'aparició de la banda a 1626  $\text{cm}^{-1}$ , similar a la de 1622  $\text{cm}^{-1}$  característica de les fibres WL de la proteïna  $\beta$ 2-microglobulina (Jahn, Tennent & Radford 2008).

La tendència a l'agregació per temperatura dels scFv ha estat prèviament reportat per altres estudis (Worn, Pluckthun 1999, Pedroso et al. 2002). Altres proteïnes, amb un plegament similar a l'scFv, també agreguen *in vivo* formant fibres amiloides, com és el cas de les cadenes lleures d'Ig, especialment aquelles que es troben en forma de domini variable aïllat ( $V_L$ ) (Baden et al. 2008a), o bé la ja mencionada  $\beta$ 2-microglobulina (McParland et al. 2000), que per a que formi fibres WL, enlloc d'amiloides, requereix d'unes condicions de pH àcid o d'elevada força iònica (Gosal et al. 2005).

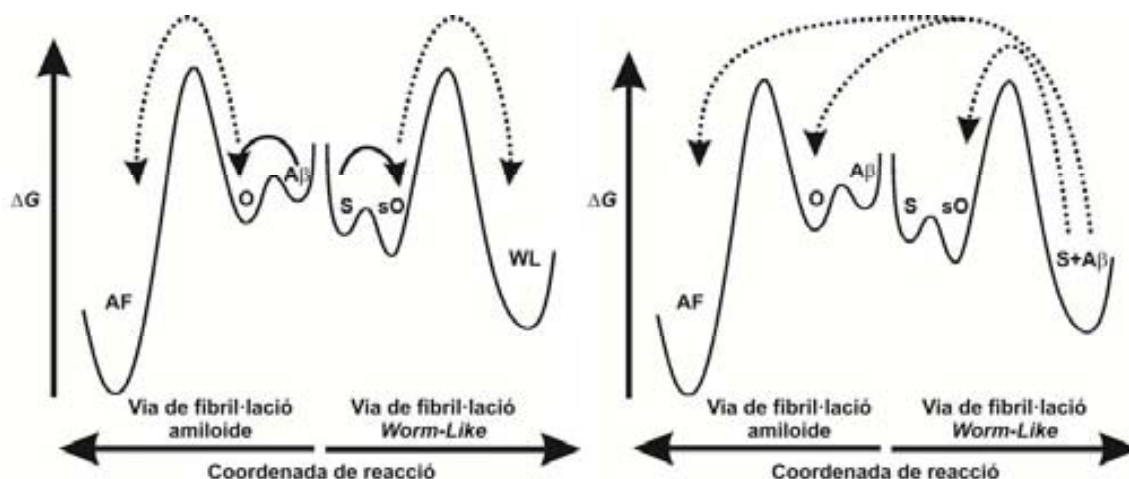
L'aparició del agregats WL formats a condicions fisiològiques ha estat descrita per primera vegada en aquest treball de tesi.

### 5.3. Efecte de l'scFv-h3D6 sobre la fibril·lació i citotoxicitat del pèptid $A\beta_{1-42}$ .

Ja avui en dia, és evident que un tractament terapèutic que redueixi les fibres d' $A\beta$  a costa d'augmentar les espècies no fibril·lars, incloent els  $\beta$ -oligòmers, pot resultar perjudicial (Cheng et al. 2007). L'anticòs monoclonal a partir del qual s'ha derivat l'scFv-h3D6 reconeix específicament els oligòmers d' $A\beta$  (Jacobsen 2006).

Quan el cultiu cel·lular és tractat amb mostres induïdes a l'oligomerització, l'scFv-h3D6 10  $\mu\text{M}$  no produeix cap efecte, el pèptid  $A\beta_{1-42}$  10  $\mu\text{M}$  redueix la viabilitat al 60 %, i la coïncubació de l'scFv-h3D6 amb el pèptid  $A\beta$  anul·la el seu efecte tòxic sobre les cèl·lules d'una manera depenent de concentració. En les condicions emprades en aquest estudi per als assajos de citotoxicitat, els oligòmers d' $A\beta$  són formats, tal i com s'ha comprovat per TEM. El fet de que les fibres WL es formen al mesclar el pèptid  $A\beta$  amb l'scFv-h3D6, sense la necessitat de que l'scFv-h3D6 ja es trobi en la via WL (per prèvia incubació a 60 °C), i en presència de DMSO, implica que les fibres WL són cinètica i termodinàmicament més favorables quan l'scFv-h3D6 atrapa els oligòmers d' $A\beta$ .





**Figura 1. 10. Diagrama energètic de la via d'agregació del pèptid  $A\beta_{1-42}$ , de l'scFv-h3D6, i del complex  $A\beta_{1-42}$ :scFv-h3D6.** A) A 37 °C ( $\rightarrow$ ), el pèptid  $A\beta_{1-42}$  segueix la via amiloide a través de la formació d'oligòmers tòxics (O), i l'scFv-h3D6 (S) segueix la via WL a través de la formació d'oligòmers no tòxics (sO). És necessari un tractament amb temperatura ( $\dashrightarrow$ ) per a convertir els oligòmers d' $A\beta$  en fibres amiloides (AF), i els oligòmers de l'scFv-h3D6 (sO) en fibres WL, en aquest últim cas en absència de DMSO. B) El complex  $A\beta_{1-42}$ :scFv-h3D6 directament forma fibres WL, i la seva disrupció per temperatura ( $\dashrightarrow$ ) genera sO per a l'scFv-h3D6, mentre que el pèptid  $A\beta_{1-42}$  retorna cap a la via amiloide, formant oligòmers (O) i fibres (AF).

Per temperatura elevada, les fibres WL esdevenen despoblades per dissociació del complex i, llavors, apareixen fibres amiloides i oligòmers. Això implica que la temperatura desplaça al pèptid  $A\beta_{1-42}$  cap a fora de la via WL, retornant cap a la via amiloide; mentre que l'scFv-h3D6 segueix a la via WL en forma d'oligòmers (Figura 1. 10). Com ha estat demostrat en aquest treball, la presència de traces de DMSO, inherents al pèptid  $A\beta_{1-42}$ , evita que l'scFv-h3D6 formi fibres WL.

A part dels detalls de la via d'agregació, la conclusió més rellevant d'aquest treball de tesi doctoral és que, en condicions natives, l'scFv-h3D6 inhibeix la formació de fibres amiloides i la citotoxicitat del pèptid  $A\beta_{1-42}$  mitjançant la retirada dels oligòmers d' $A\beta$  de la via amiloide. La descripció del mecanisme pel qual l'scFv-h3D6 actua contra la toxicitat del pèptid  $A\beta$  obre una nova via per a millorar, en un futur, el seu potencial terapèutic.

#### 5.4. Efecte de l'scFv-h3D6 *in vivo*.

Pel que fa al efecte de l'scFv-h3D6 *in vivo*, un cop demostrada l'efectivitat de l'scFv-h3D6 en cultius cel·lulars i la necessitat d'eliminar la fracció d'LPSs de la mostra, el nostre grup de recerca en col·laboració amb la Dra. Giménez-Llort, L. (Gimenez-Llort et al. 2013), va testar el seu potencial terapèutic en ratolins triple-transgènics 3xTg-AD, models d'AD de 5 mesos d'edat, que correspon a estadis inicials de la malaltia. Els resultats obtinguts,

detallats en la tesi doctoral en procés de Rivera-Hernández, G., demostren que el tractament amb l'scFv-h3D6 s'ha de considerar una potent estratègia terapèutica en el futur de l'AD. L'scFv-h3D6 millora la capacitat cognitiva, reverteix els símptomes *BPSD-like* (*Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia*) (Gimenez-Llort et al. 2007), i elimina els oligòmers d'A $\beta$  del còrtex i del bulb olfatori dels ratolins 3xTg-AD, les dues àrees cerebrals més sensibles a acumular  $\beta$ -oligòmers durant els primers estadis de la demència. A més a més, l'scFv-h3D6 restaura els nivells de la xaperona clusterina i de l'ApoE, augmentats en el còrtex dels ratolins 3xTg-AD. Cal remarcar que l'augment dels nivells d'ApoE es troba directament relacionat amb els processos neuroinflamatoris diagnosticats en pacients d'AD tractats amb l'anticòs mAb sencer (Kim et al. 2011). La clusterina (o ApoJ), inhibeix la formació de fibres amiloides, unint-se a ells hidrofòbicament, i forma complexos estables amb els oligòmers d'A $\beta$  (Humphreys et al. 1999). A més, recentment hem demostrat que el nombre de macroneurons del cerebel dels ratolins 3xTg-AD està molt reduït, i que l'scFv-h3D6 protegeix aquestes neurones de la mort (Esquerda-Canals et al. 2013, Esquerda-Canals 2013).

Pel que fa als mutants C-terminal de l'scFv-h3D6, descrits en el Capítol 2 d'aquesta tesi doctoral, i la seva futura administració en ratolins 3xTg-AD, s'espera que l'increment de l'estabilitat i la disminució de la tendència a l'agregació incrementin la vida mitja i, conseqüentment, que l'scFv-h3D6 sigui efectiu a dosis encara més baixes que la del WT.

**CAPÍTOL 2: Modelatge tridimensional d'un fragment variable de cadena senzilla (scFv-h3D6) específic contra el pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub> i redisseny racional de la molècula.**

**ARTICLES RELACIONATS:**

**Elongation of the C-terminal domain of an anti-amyloid A $\beta$  single-chain variable fragment increases its thermodynamic stability and decreases its aggregation tendency**

Rivera-Hernández, G.\*, Marin-Argany, M.\*, Blasco-Moreno, B., Bonet J., Oliva B. & Villegas, S.

mAb 5:5, 678–689 (doi:10.4161/mabs.25382) 2013

*\*First co-author*



## 1. RESUM.

La primera referència escrita sobre l'efectivitat de l'immunoteràpia A $\beta$  en ratolins PDAPP va obrir la possibilitat de tractar la malaltia de AD. Els fragments variables d'anticossos de cadena senzilla (scFv), formats per la unió dels dominis V<sub>H</sub> i V<sub>L</sub> d'Ig, també semblen ser una teràpia efectiva en models animals, amb l'avantatge de no activar la micròglia. A més, comparant-los amb l'anticòs sencer, mostren una millor farmacocinètica i poden ser re-dissenyats racionalment.

Com alternativa inicial a l'obtenció del cristall i per incompatibilitat amb la tècnica de espectroscòpia d'RMN en solució, degut a la grandària de la molècula, s'ha obtingut un model de la estructura tridimensional de l'scFv-h3D6 específic contra el pèptid A $\beta$ , un treball presentat a la memòria del màster en Bioquímica i Biologia Molecular (Marin-Argany 2009). Com a estructura motlle s'ha emprat un scFv humanitzat, d'estructura cristal·litzada i dipositada al Protein Data Bank, i amb la major homologia seqüencial. L'scFv contra el receptor del coronavirus SARS (pdb 2GHTrp:B) mostra un 70% d'identitat seqüencial, i un 94% d'homologia, amb l'scFv-h3D6. Amb MODELLER s'han obtingut les coordenades de 5 possibles models i, amb Prosa, es va escollir el model òptim. La pseudoenergia és mínima en les regions FR i màxima en les CDRs, en concordança amb la flexibilitat necessària per a formar el complex antigen-anticòs.

Amb les coordenades del model, se'n ha derivat informació sobre l'accessibilitat al solvent dels diferents residus, els contactes intramoleculars i un *scanning* de totes les mutacions possibles a les diferents posicions. A més, amb la seqüència primària, s'ha obtingut un perfil de la tendència a l'agregació i un alineament amb altres molècules d'scFv. Tota aquesta informació ens ha permès proposar una sèrie de mutacions, dissenyades per augmentar la solubilitat de la molècula i/o per trencar la tendència a l'agregació, que han de permetre aconseguir un alt rendiment en l'obtenció d'aquest scFv de possible aplicació terapèutica en humans.



## 2. INTRODUCCIÓ.

La cristal·lografia de raigs-X és l'eina més poderosa per a obtenir l'estructura tridimensional de proteïnes. Tot i que ha millorat molt des de que es va obtenir el primer cristall de mioglobina (Phillips, Schoenborn 1981), l'any 1969, l'obtenció de cristalls i la interpretació dels resultats fan difícil aquesta tècnica (Jones, Thirup 1986). D'altra banda, la tècnica de espectroscòpia d'RMN en solució, molt útil tant per a obtenir l'estructura tridimensional de proteïnes com per a mesurar la seva dinàmica conformacional, té les limitacions de la grandària i la pertorbació per part dels agregats (Wuthrich 2001).

En els últims anys, la proteòmica estructural (cristal·lografia de raigs-X i l'espectroscòpia d'RMN a gran escala) han permès avançar notablement en el camp de l'estructura terciària de proteïnes. Actualment, s'han dipositat més de 90.000 estructures en el Protein Data Bank (PDB), la base de dades internacional per a col·lecció d'estructures proteïques obtingudes per difracció de raigs-X i per RMN (Berman et al. 2007) (figura 2. 1). Tot i això, el nombre de proteïnes cristal·litzades és dos vegades inferior al número de seqüències trobades a les bases de dades de Swiss-prot i TrEMBL (Kopp, Schwede 2004). Davant d'aquest dèficit d'informació, els mètodes computacionals per a la predicció d'estructura terciària han permès fer un salt en l'estudi de proteïnes.

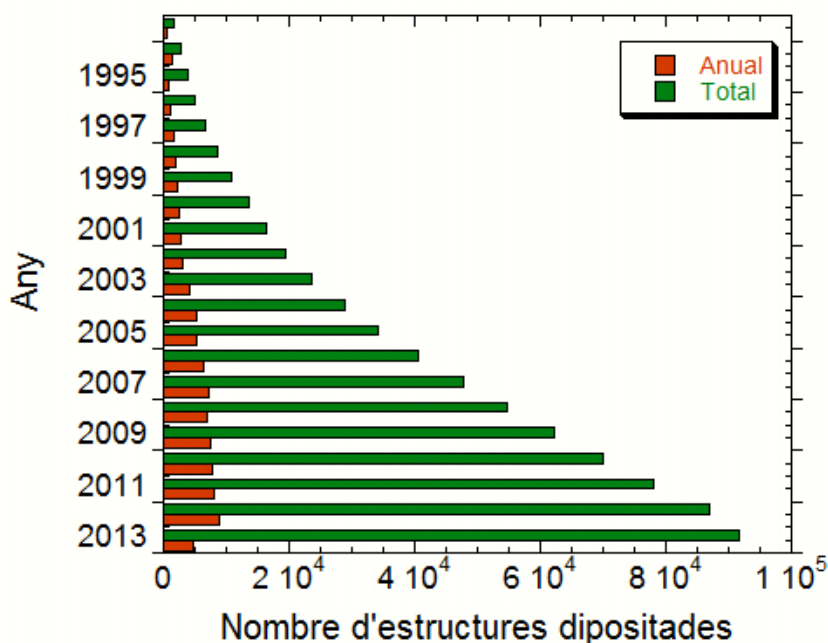


Figura 2. 1. Evolució de les estructures proteïques dipositades en el PDB, i que han estat determinades mitjançant les tècniques de cristal·lografia de raig-X, RMN i microscòpia electrònica (dades extretes de <http://www wwpdb.org>).

La semblança estructural entre proteïnes diferents es troba íntimament relacionada amb la seva funció. Malgrat que existeixen més famílies de proteïnes que tipus de plegaments, cada una d'elles es caracteritza per adoptar un plegament tridimensional adaptat a les funcions que realitzen. Un exemple seria la família d'Igs, els dominis dels quals es pleguen en conformació barril- $\beta$ . També és possible, però menys freqüent, que proteïnes sense cap relació biològica, presentin una conformació tridimensional semblant. El plegament d'una proteïna ve determinat per les propietats de la seqüència d'aminoàcids que la componen i, per tant, proteïnes amb una seqüència semblant tendeixen a una estructura tridimensional similar (Chothia, Lesk 1986). Per comparació de seqüències de diferents proteïnes, es poden identificar combinacions particulars d'aminoàcids que sovint impliquen determinats patrons estructurals Això significa que, a la pràctica, si l'estructura d'una proteïna ha estat determinada experimentalment (per cristal·lografia i difracció de raigs-X), llavors la resta de membres de la mateixa família poden ser modelades a partir d'aquesta.

L'alineament múltiple i la recerca de seqüències homòlogues en el PDB és la base del modelatge tridimensional de proteïnes, amb el qual es comparen multitud de seqüències d'estructura coneguda i s'identifica la de major grau d'identitat, la qual servirà com a motlle de la proteïna problema. Existeixen diferents tipus d'alineament múltiple però el més habitual és el mètode heurístic, com ho són els algorismes BLAST i FASTA (Altschul et al. 1990, Pearson 1990). Aquest mètode es basa en delimitar el rang de recerca de dades mitjançant l'aplicació de filtres de selecció, de forma que s'optimitza la recerca d'homologia dins la immensitat de seqüències depositades en les bases de dades, i que va en augment (Leach 2001).

La predicció d'estructura per homologia de seqüència resulta molt útil com alternativa a l'obtenció del cristall de proteïna, o per proteïnes que no poden ser analitzades per RMN en solució degut a la seva grandària, com és el cas dels fragments variables d'anticossos de cadena senzilla (scFv). La qualitat del modelatge tridimensional és equiparable a la cristal·lografia de raigs-X de baixa resolució o als espectres d'RMN de resolució mitja. Aproximadament, el 70 % de les seqüències conegudes es poden comparar, com a mínim, amb una de les proteïnes d'estructura coneguda depositades al PDB.

Un model comparatiu implica assignar un tipus de plegament a l'objecte d'estudi a partir dels ja dipositats en el PDB. Un cop seleccionades les proteïnes d'estructura 3D coneguda, cal realitzar un alineament múltiple d'aquestes seqüències amb la problema per tal de determinar la millor correspondència entre residus. Amb l'alineament i l'estructura motlle, es construeix un model teòric tridimensional de la proteïna en qüestió fent ús de



mètodes bioinformàtics, com ara el software MODELLER9v2. Finalment, el model ha de ser avaluat, refinat i caracteritzat considerant els criteris estructurals i energètics necessaris (Sanchez et al. 2000, Fenyö 2010).

Existeixen una gran quantitat de programes computacionals i servidors d'internet que automàticament processen modelatge tridimensional. Tot i ser molt útils, els millors resultats s'obtenen emprant mètodes de programació bioinformàtica.

En aquest capítol, i en relació amb el capítol anterior, s'ha modelat l'estructura tridimensional d'un scFv específic contra el pèptid A $\beta$ , l'scFv-h3D6 (Marin-Argany 2009). Els experiments i resultats aquí exposats, han estat realitzats en col·laboració, i durant l'estada d'un mes, amb el grup de recerca de Bioinformàtica Estructural, dirigit per el Dr. Oliva, B., del Centre de Recerca Biomèdic de Barcelona (GRIB-IMIM-PRBB).

Per al modelatge de l'scFv-h3D6, s'ha emprat com a motlle l'scFv específic contra el receptor del coronavirus SARS, d'estructura cristal·litzada i dipositada al Protein Data Bank (codi PDB 2GHTrp:B), amb un 70% d'identitat i un 94% de semblança seqüencial amb el nostre scFv-h3D6. A partir de l'aplicació bioinformàtica MODELLER s'han obtingut les coordenades de 5 possibles models, d'entre els que s'ha seleccionat el model més òptim energèticament.

D'aquesta manera s'ha obtingut un model teòric fiable que ha servit com a caracterització visual de la proteïna, tan a nivell d'estructura secundària i terciària, com de residu, així com per a localitzar regions amb major tendència a l'agregació. Dades molt útils per a entendre el comportament de la molècula i millorar-ne l'experimental. A més, ha permès al nostre grup de recerca fer un disseny racional de mutants del scFv-h3D6, augmentant l'estabilitat de la molècula, i disminuint la seva tendència a l'agregació (Rivera-Hernandez et al. 2013). Finalment, esperem, en un futur immediat, que aquesta millora incrementi la vida mitja de l'scFv-h3D6 i, conseqüentment, aconseguir reduir la dosi efectiva de la molècula obtinguda prèviament en els ratolins 3xTg-AD (Gimenez-Llort et al. 2013). Que tot i ja ser baixa (una única injecció intraperitoneal de 85  $\mu$ g resulta efectiva als 5 dies), disminuir-la per disseny racional del plegament i l'estabilitat de la molècula ha d'ajudar en el pas cap a proves clíniques a d'altres mamífers no murins, desitjablement, a assajos clínics en humans.



### 3. MATERIALS I MÈTODES.

L'obtenció del model tridimensional del l'scFv-h3D6 es va realitzar mitjançant un seguit de tècniques bioinformàtiques descrites a continuació, totes elles emprant el llenguatge de programació Python (Van Rossum 1991), capaç de llegir i reproduir els *scripts* (llistat de comandaments que s'executen amb un ordre determinat i de forma automàtica) dels diferents programes utilitzats en aquest treball.

#### 3.1. Recerca de proteïna motlle per homologia de seqüència.

El model parteix d'una recerca d'homologia de seqüència per a cada un dels dominis  $V_H$  i  $V_L$  per separat, emprant l'aplicació BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul et al. 1990), a partir d'estructures ja resoltes i dipositades al PDB (*Protein Data Bank*). Es van filtrar les regions de baixa complexitat de cada alineament no redundant, per tal de descartar falsos resultats. La seqüència de major valor de coincidència, comuna per als dos dominis, va ser seleccionada d'entre les 24 possibles. L'estructura cristal·lina del fragment d'anticòs scFv-h3D6 específic contra el domini d'unió del receptor de la proteïna SARS (codi PDB: 2GHTrp-B), amb un 70 % d'identitat (94 % de semblança) i un valor d'homologia (*E-score*) de  $2e^{-84}$ , va ser seleccionat com a motlle per a construir el model 3D de l'scFv-h3D6, mitjançant el programa MODELLER 9v2 (Sali, Blundell 1993).

#### 3.2. Modelatge tridimensional del scFv-h3D6.

Inicialment, es van dissenyar cinc possibles conformacions per al scFv-h3D6. L'elevada flexibilitat del connector,  $(Gly_4Ser)_3$ , no permet un patró de difracció definit en el motlle, per tant, les seves coordenades per al model van ser optimitzades per mínims energètics (*LoopRefining*, MODELLER 9v2), obtenint deu possibles estructures del connector, encaixades amb els cinc primers models seleccionats del scFv-h3D6.

Mitjançant el programa ProSa2003 (Wiederstein, Sippl 2007), es va traçar un perfil de mínims energètics de cada model i connector proposats. Es van analitzar finestres consecutives de 25 residus, prenent la mitjana de cada una, per assignar un valor d' $\Delta G$  teòrica (pseudo-energia) a cada un dels residus, de forma que es va escollir el millor model de mínima energia.

Les imatges del model final es van obtenir amb el programa PyMol (DeLano 2002), el qual permet visualitzar models moleculars en 3D.

### 3.3. Numeració estàndard de l'scFv-h3D6 i localització de les regions CDR.

Per a seguir la numeració canònica dels residus d'Ig, i una correcta identificació de les regions CDRs (*Complementary determining regions*), es va emprar l'esquema de numeració Kabat (Wu, Kabat 1970, Kabat 1983, Johnson, Wu 2001). Aquesta classificació aporta un seguit de regles que defineixen cada un dels sis CDRs (tres per cada domini), com ara l'aminoàcid inicial, els residus anteriors i posteriors al CDR, i el nombre de residus que el formen.

### 3.4. Caracterització estructural del model d'scFv-h3D6 per DSSP.

L'algoritme bioinformàtic DSSP (*Definition of Secondary Structure of Proteins*) (Kabsch, Sander 1983) resulta molt útil per assignar l'estructura secundària i altres característiques geomètriques del model a partir de les coordenades atòmiques en format PDB, com ara:

- **Exposició dels residus al solvent.** Per a cada residu de la seqüència s'obté un valor teòric que indica la superfície de l'àrea del residu que es troba exposada al solvent, en Å. De forma que se'n extrau si el residu es troba encarat cap a la superfície de la molècula o bé, forma part del nucli hidrofòbic d'aquesta.
- **Contactes entre residus de distància menor a 5.5 Å.** S'obté, de forma general, els valors mínims per a establir interaccions entre residus, definint així les interaccions secundàries i terciàries intradomini, així com les interaccions interdomini que conformen la interfície. A l'hora d'estudiar contactes específics s'ha realitzat, amb el programa Pymol, un anàlisi manual més concret de les regions d'interès.

### 3.5. Predicció de tendència a l'agregació per TANGO.

TANGO és un algoritme computacional dissenyat per a predir la tendència a l'agregació en fulla- $\beta$  de pèptids i proteïnes desplegadas (Fernandez-Escamilla et al. 2004, Linding et al. 2004). Es basa en els principis fisicoquímics (pH, temperatura, força iònica, concentració de TFE, estabilitat proteica, protecció N-terminal i C-terminal, etc.) de la formació de fulla- $\beta$  estesa, entenent que les regions internes dels agregats es troben completament enterrades. TANGO diferencia entre tendència a fulla- $\beta$  nativa i l'amiloide.

### 3.6. Alineament Múltiple i Residus Conservats.

És necessari establir un alineament múltiple entre l'scFv-h3D6 modelat i altres seqüències scFv humanes o humanitzades d'elevada homologia per tal de determinar aquells aminoàcids conservats evolutivament i que juguen un paper important dins la molècula, ja sigui per a la seva funció, estabilitat o solubilitat, i que per tant no es convenient mutar-los quan coincideixen amb la nostra seqüència.

Amb el programa ClustalTrp2 (Thompson, Higgins & Gibson 1994), s'ha fet un alineament múltiple de les 24 seqüències d'scFv humanitzades obtingudes prèviament amb el programa BLAST. Aquesta informació és molt important a l'hora de dissenyar futurs mutants de l'scFv-h3D6.

### 3.7. Aminoàcid Scanning-Mutation.

Mitjançant l'aplicació ProSa 2003 (Wiederstein, Sippl 2007) s'ha realitzat un anàlisi *AA Scanning-mutation* amb el qual es muta, teòricament, cada un dels residus de la seqüència d'interès per els 20 aminoàcids proteïnogènics. Com a resultat s'obté un valor de mutació (*z-score*) per residu i aminoàcid substituent. Comparant aquest valor amb el del *wild-type* (WT), es classifica cada mutació com a:

- estabilitzadora ( $z_{wt} - z_{mut} > 0$ ),
- desestabilitzadora ( $z_{wt} - z_{mut} < 0$ ),
- o neutre ( $z_{wt} - z_{mut} = 0$ ).

El valor *z-score* deriva de la distribució d'energies de la proteïna problema comparada amb una proteïna patró, sent  $\sigma$  la desviació estàndard.

$$z_{score} = \frac{(E_{prot} - E_{patro})}{\sigma}$$

Per a determinar els *z-score* s'ha tingut en compte la combinació de dos tipus d'energia:

- l'energia superficial, associada al  $C_{\beta}$  de cada residu.
- l'energia de parells, associada a l'energia entre  $C_{\beta}$ - $C_{\beta}$  de dos residus propers.



## 4. RESULTATS

### 4.1. Proteïna motlle: l'scFv específic contra el virus SARS.

El model tridimensional de l'scFv-h3D6 s'ha dissenyat a partir de la seqüència motlle amb codi PDB 2GHTrp:B, corresponent a un scFv dirigit contra el receptor d'un coronavirus causant del Síndrome respiratori agut sever (SARS, *Severe Acute Respiratory Syndrome*), obtinguda per recerca de seqüències homòlogues al domini  $V_L$  i  $V_H$  mitjançant el programa BLAST.

Com es pot veure en la figura 2. 2, les dues seqüències són molt semblant entre elles, comparteixen un 70 % d'identitat i, dels residus no coincidents, el 81 % corresponen a canvis conservatius, és a dir, entre aminoàcids de característiques moleculars semblants i, per tant, no alteren significativament l'estructura donada per la seqüència motlle. Un 2 % (7/246) de l'alineament correspon a *gaps*, degut a un procés de inserció o delecio d'algun dels residu en alguna de les seqüències.

```
>|pdb|2GHW|B|S Chain B, Crystal Structure Of Sars Spike Protein Receptor Binding
Domain In Complex With A Neutralizing Antibody, 80r
|pdb|2GHW|D|S Chain D, Crystal Structure Of Sars Spike Protein Receptor Binding
Domain In Complex With A Neutralizing Antibody, 80r
Length=247

Score = 308 bits (788), Expect = 2e-84, Method: Compositional matrix adjust.
Identities = 173/246 (70%), Positives = 200/246 (81%), Gaps = 7/246 (2%)

Query 4 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVRQAPGKGLEWVASIRSGGGRTYY 63
Sbjct 3 EVQL++SGGG+VQPG SLRLSCAASGF FS+Y M WVRQAPGKGLEWVA I G YY 62

Query 64 SDNVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCVRYDHYSGSSDYWGQGTILVTVS 123
Sbjct 63 ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCARDRSY--YLDYWGQGTILVTVSSG 120

Query 124 gggsgggsgggsgggDVMVTQSPFLSLPVTGEPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQKPG 183
Sbjct 121 GGGSGGGSGGGGSETTLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSV-----RSNLAWYQQRPG 175

Query 184 QSPQRLIYLVSKLDSGVDPDRFSGSGSSTDFTLTKISRVEAEDVGVYYCWQGTHTFPRTFGQG 243
Sbjct 176 QAPRPLIYDASTRATGIPDRFSGSGSSTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPPTFGQG 235

Query 244 TRVEIK 249
TKVE+K
Sbjct 236 TRVEVK 241
```

**Figura 2. 2 Alineament de la seqüència scFv-h3D6 (*query*) amb la seqüència motlle 2GHTrp:B (*subject*).**

L'alineament, per pBLAST, de la seqüència del nostre scFv amb la cadena B del scFv dirigit contra el receptor del coronavirus SARS (codi PDB: 2GHTrp:B), que té un 70% d'identitat. +: canvis conservatius; *gap*: posició en blanc degut a una inserció o delecio d'un residu determinat.

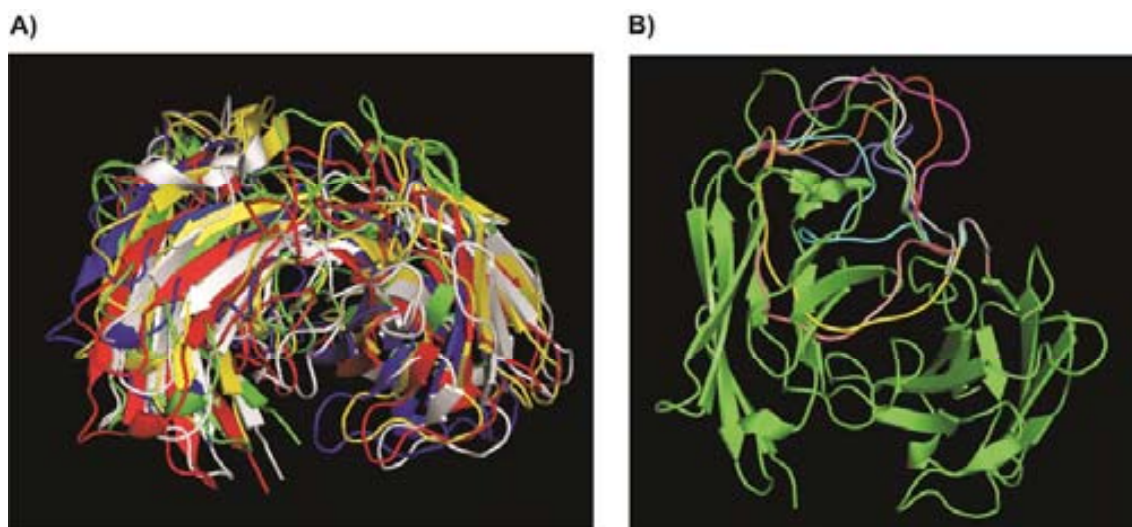
En aquest cas, el connector utilitzat en la seqüència motlle és idèntic al nostre  $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ , el més usat en la bibliografia per al disseny de molècules scFv, però, al no trobar-se ben resolt als mapes de difracció, no es pot usar com a motlle estructural.

#### 4.2. Possibilitats de models 3D per a l'scFv-h3D6.

Les coordenades atòmiques de la seqüència motlle 2GHTrp:B, dipositades en el PDB, van ser introduïdes al programa MODELLER 9v2 juntament amb l'alineament de totes dues seqüències. Així, es van dissenyar 5 models teòrics de l'estructura 3D de l'scFv-h3D6, sempre tendint a construccions energèticament favorables.

Tal i com es pot observar a figura 2. 3-A, els 5 models teòrics obtinguts són, estructuralment, molt semblants entre ells. Tan sols variarà mínimament l'orientació a l'espai de l'estructura secundària, concretament dels angles  $\Phi$  (phi) i  $\Psi$  (psi), corresponents a l'enllaç rotacional NH-C $\alpha$  i C $\alpha$ -CO respectivament (resultats no mostrats).

Al no disposar de les coordenades tridimensionals del connector, va ser necessari refinar l'estructura 3D d'aquesta regió de l'scFv-h3D6 fent ús de l'aplicació *LoopRefining* del programa MODELLER 9v2. Per a cada un dels cinc models, es van obtenir deu conformacions espacials per al connector (figura 2. 3-B).



**Figura 2. 3. Models teòrics de l'estructura 3D de l'scFv-h3D6** A) Amb MODELLER9v2 es van obtenir les 5 construccions més favorables energèticament a partir de les coordenades del motlle 2GHTrp:B. Tot i semblar iguals, es diferencien per petits canvis d'orientació en les estructures secundàries. B) Per a cada un dels 5 models construïts, es van dissenyar, per mínims energètics i dinàmica molecular, 10 models de connector diferents. A partir del perfil energètic es descartaren els menys favorables i es seleccionà el model òptim.

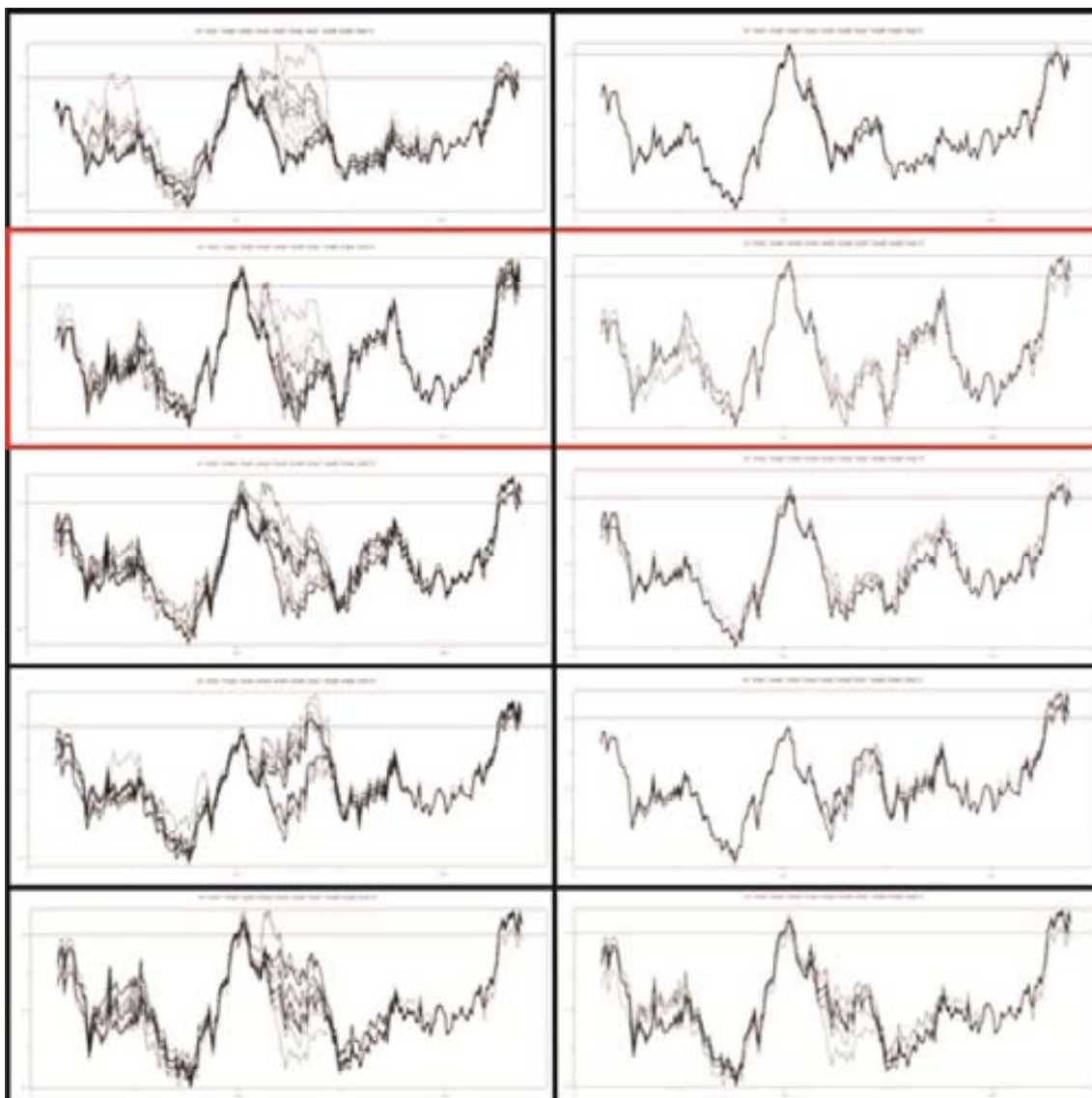


Algunes d'elles, mostren connectors molt desfavorables energèticament, generadors d'instabilitat molecular pel fet d'unir els dos dominis,  $V_H$  i  $V_L$ , per la interfície hidrofòbica, suposant un xoc estèric que dona lloc a la reorientació de residus ja estables. Altres models es troben tallats en algun punt de la seqüència, ja que la conformació global de la proteïna no permet la presència de determinats residus en un punt concret, ja sigui pel seu volum espacial o la seva carrega, o perquè l'angle de gir dels seus enllaços es troba fora de l'espai conformacional permès.

#### 4.3. Determinació del model de mínima energia.

L'obtenció dels perfils energètics, mitjançant el programa ProSa 2003, de cada model amb els deu connectors teòrics va possibilitar la selecció del model més favorable energèticament (Figura 2. 4).

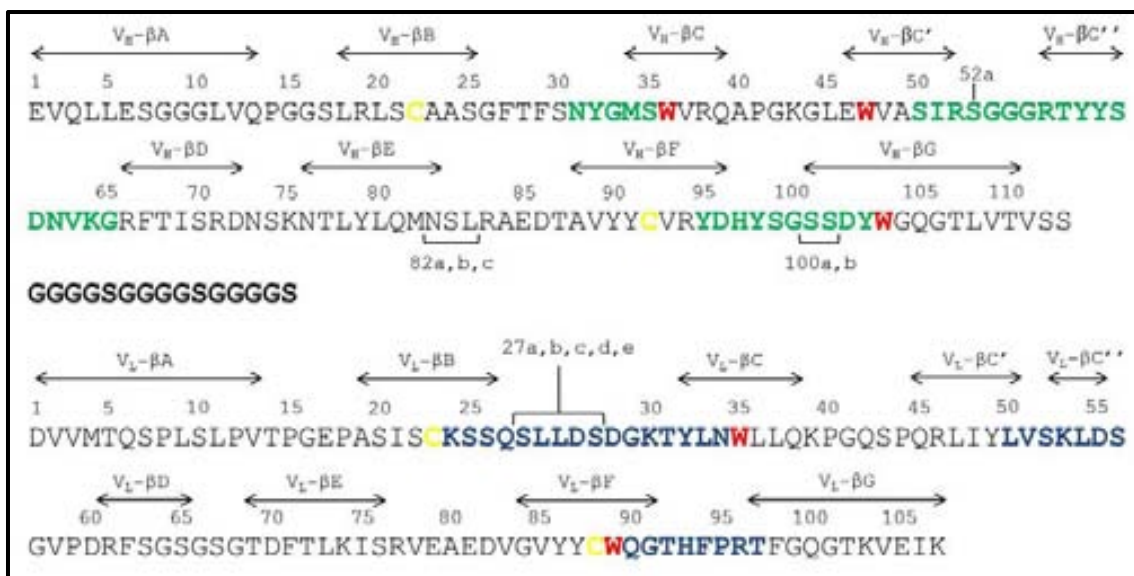
La conformació de cada un dels connectors provoca una reestructuració de la resta de la molècula, modificant, de forma específica, l'estructura tridimensional del model, fent-la més o menys estable. En general, la conformació del domini  $V_H$  es veu més alterada que la del domini  $V_L$ . Com era d'esperar, els pics de màxima energia del perfil es corresponen a les regions CDR de la proteïna que, igual que el connector, són *loops* flexibles. Els seus extrems, però, cauen en pics de mínima energia i formen part de fulles- $\beta$ , mostrant la necessitat dels CDR per aferrar-se a l'estructura global i estable de la proteïna, i així compensar l'entropia necessària per a mantenir els *loops* de CDR exposats. Obtinguts els perfils, es van descartar els connectors amb una  $\Delta G$  teòrica gran fins aconseguir un millor perfil de mínims. Per comparació de pics, es va seleccionar el model amb més tendència a valors globals mínims de  $\Delta G$ .



**Figura 2. 4. Perfils energètics de cada un dels 5 models.** Amb Prosa2003 es van obtenir els perfils de mínims energètics de cada model amb els 10 connectors. De dalt a baix, model 1-5; columna dreta, perfils inicials; columna esquerra, perfils on s'han eliminat els connectors menys favorables energèticament. En vermell, model 2 seleccionat com a òptim, amb el tercer model de connector.

#### 4.4. Numeració Kabat de l'scFv-h3D6 i localització de les regions CDR.

L'esquema de la seqüència de l'scFv-h3D6 es pot veure representat a la figura 2. 5. La primera seqüència representa el domini  $V_H$  i la segona al domini  $V_L$ , separades pel connector flexible  $(Gly_4Ser)_3$ . Els residus Cys es troben marcats en groc, els Trp en vermell, els  $V_H$ -CDR en verd, i els  $V_L$ -CDR en blau. També s'aprecien les 9 cadenes- $\beta$  de cada domini, 5 cadenes- $\beta$  d'una fulla- $\beta$  i 4 cadenes- $\beta$  de l'altre fulla- $\beta$ , que conformen el barril- $\beta$ .



**Figura 2. 5. Esquema de la seqüència de l'scFv-h3D6 i numeració Kabat.** El domini  $V_H$  està format per 119 residus, amb sis insercions respecte la numeració Kabat (a, b, c, d...) i, per tant, finalitza en el residu 113 de la numeració Kabat; i tres residus triptòfan (vermell). El domini  $V_L$  conté 112 residus, amb cinc insercions i, per tant, finalitza en el residu 107 de la numeració Kabat; i dos residus triptòfan. Tots dos formen 9 cadenes- $\beta$  canòniques ( $V_H$ - $\beta A$ , B, C, C', C'', D, E, F i G) i presenten les dues cisteïnes que formaran el pont disulfur de cada domini (groc). Les sis regions CDR ( $V_H$ , verd i  $V_L$ , blau) corresponen, principalment, a regions de *loops* irregulars. En negre el connector flexible (Gly<sub>4</sub>Ser)<sub>3</sub> que uneix tots dos dominis.

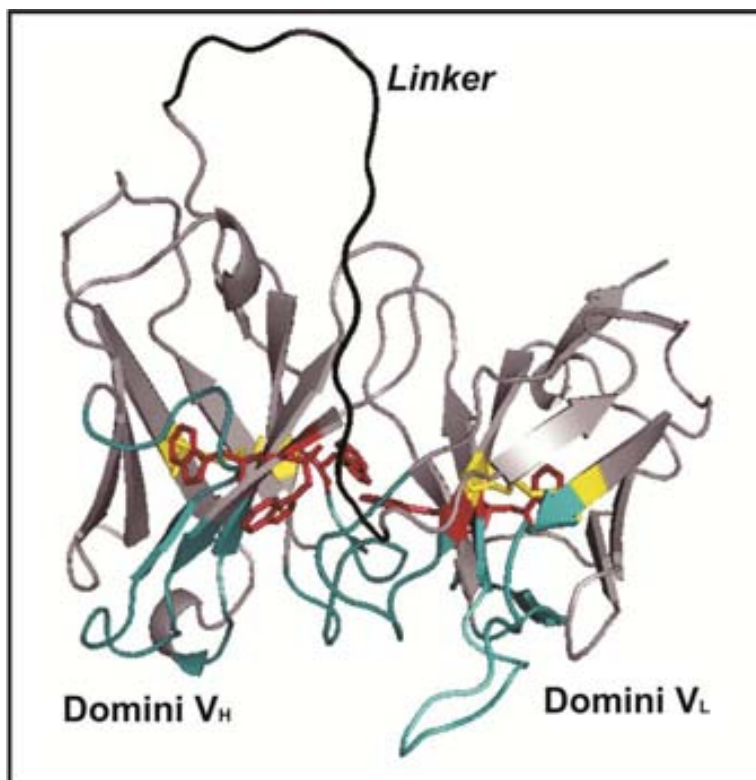
Per a una correcta numeració dels residus de la seqüència de l'scFv-h3D6, es va emprar la numeració estàndard d'immunoglobulines (Igs) definida per Kabat (Wu, Kabat 1970, Kabat 1983, Johnson, Wu 2001), i desenvolupada a partir d'homologia de seqüències d'Igs. Cada una de les cadenes, pesada i lleugera, té una numeració pròpia. La numeració Kabat és molt rígida per a cada aminoàcid conservat, de forma que les possibles insercions de seqüència són introduïdes mitjançant lletres, conservant la numeració estàndard.

A més a més, gràcies a la definició de CDRs per Kabat, es van poder classificar i delimitar les sis regions CDR de l'scFv-h3D6 (tres per a cada domini), així com les regions entre elles (FRs, o *Framework Regions*). Rep especial atenció, el  $V_H$ -CDR3, el més difícil de classificar (Oliva et al. 1998) i el que, a més, potencia les interaccions sinèrgiques (cooperatives, o *avidity*) dels anticossos per a reconèixer i unir l'antigen específic (Manoutcharian et al. 2004). Tot i que, en funció de l'especificitat per l'antigen, cada CDR té una seqüència diferent, determinats paràmetres o patrons són conservats entre les diferents Igs, com ara l'aminoàcid inicial, els residus anteriors i posteriors al CDR, i el nombre de residus que el formen.

Comparant informació, hem vist que tan els  $V_L$ -CDR1,  $V_L$ -CDR2 i  $V_L$ -CDR3 com els  $V_H$ -CDR3 i  $V_H$ -CDR2 presenten les característiques típiques dels CDR. Tan sols el  $V_H$ -CDR1 s'allunya del consens general, per la seva llargària i localització en el domini; si els quatre primers residus de la FR anterior formessin part de la regió, el  $V_H$ -CDR1 ja compliria amb els requisits establerts.

#### 4.5. Caracterització del model tridimensional de l'scFv-h3D6.

Adoptant el plegament canònic dels dominis d'Igs, cada un dels dos dominis variables de l'scFv-h3D6 conté dues fulles- $\beta$  antiparal·leles empaquetades estretament, una contra l'altre, adoptant una conformació compacta en barril- $\beta$  (Figura 2. 6). L'extrem N- i C-terminal de cada domini es troben oposats entre ells i situats als extrems del barril- $\beta$ . Una de les fulles conté 5 cadenes- $\beta$  (A, B, C, C' i C'') i l'altre en conté 4 (D, E, F i G).



**Figura 2. 6. Model tridimensional de l'estructura de l'scFv-h3D6.** L'scFv-h3D6 conté dos dominis variables ( $V_H$  i  $V_L$ ) formats, cada un d'ells, per dues fulles- $\beta$  que adopten una conformació en barril- $\beta$ . Cada domini conté tres regions CDR (verd) i un pont disulfur (groc). L'scFv-h3D6 conté cinc residus triptòfan (vermell), tres al domini  $V_H$  i dos al domini  $V_L$ . El connector (negre), molt exposat al solvent, uneix tots dos dominis.

Els *loops* de CDR es localitzen entre les cadenes B-C, C'-C'' i F-G, i es disposen propers entre ells, encarats cap a la mateixa cara del barril- $\beta$ , i exposats a la superfície globular. El plegament del domini es troba estabilitzat per:

- ponts d'hidrogen entre les cadenes- $\beta$  de cada fulla.
- interaccions hidrofòbiques entre residus de les dues fulles- $\beta$ .
- un pont disulfur entre la cadena B d'una fulla- $\beta$  i la cadena F de l'altre:
  - domini V<sub>H</sub>: Cys22 (B)-Cys92 (F)
  - domini V<sub>L</sub>: Cys23 (B)-Cys88 (F)

L'scFv-h3D6 conté cinc residus de triptòfan molt conservats (figura 2.6, en vermell), tres en domini V<sub>H</sub> i dos en el domini V<sub>L</sub>:

- domini V<sub>H</sub>: Trp36 (C), Trp47 (C') i Trp103 (G)
- domini V<sub>L</sub>: Trp35 (C) i Trp89 (F, i és el primer residu del CDR3)

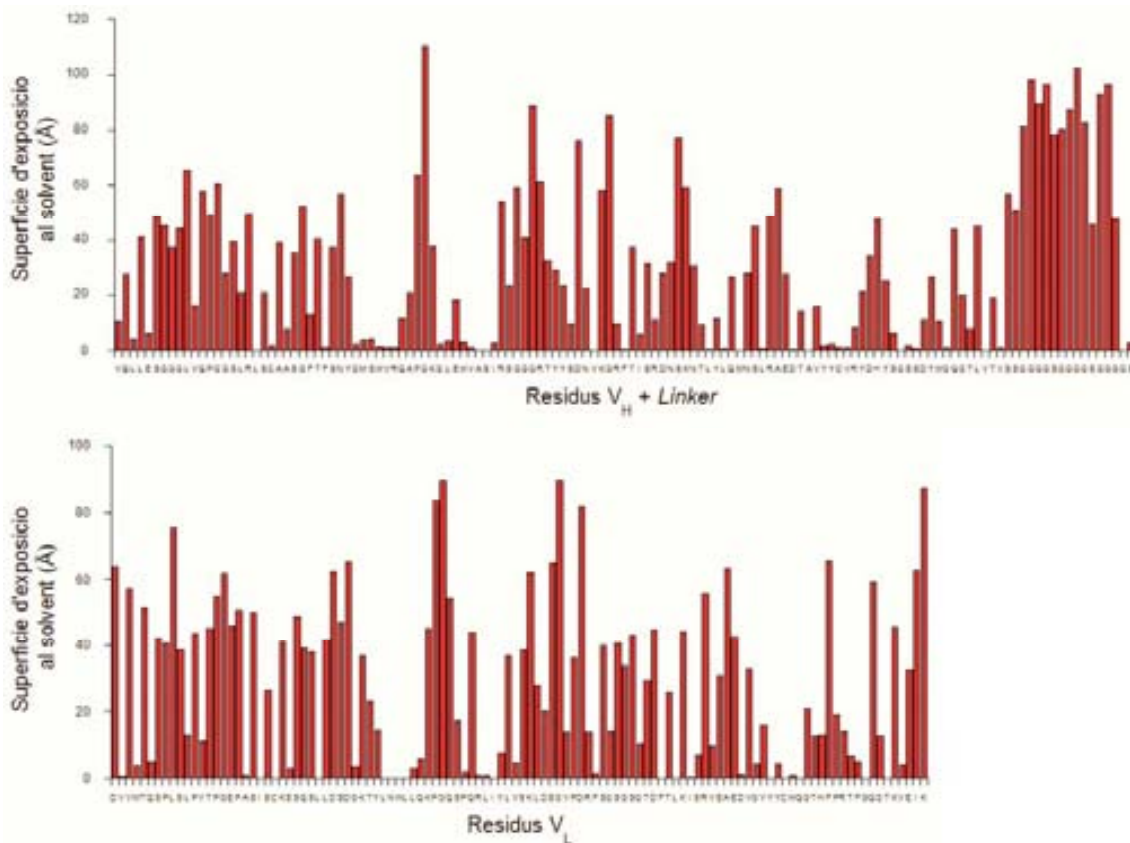
El V<sub>H</sub>-Trp36 i el V<sub>L</sub>-Trp35 es localitzen en el nucli hidrofòbic de cada un dels dominis, mentre que els V<sub>H</sub>-Trp47, V<sub>H</sub>-Trp103, i V<sub>L</sub>-Trp89 formen part de la interfície dels dos dominis. Per a tenir una idea de la importància de les interaccions hidrofòbiques en aquesta interfície, la distància entre V<sub>H</sub>-Trp103-CZ2 i V<sub>L</sub>-Trp89-CH2 és de 3.3 Å, i la d'entre V<sub>H</sub>-Trp47-CD1 i V<sub>L</sub>- Trp89-CZ2 és de 5.7 Å.

#### 4.6. Exposició dels residus al solvent.

Els valors de DSSP, mostrats a la figura 2. 7, donen informació rellevant per al disseny de possibles mutants de l'scFv-h3D6. Aquesta informació representa un dels primers passos per a decidir quin residu, d'una regió determinada, és el més adient per a ser mutat. En un principi, és aconsellable no mutar residus enterrats cap a l'interior proteic.

Estructuralment, el DSSP mostra que les regions plegades en fulla- $\beta$  tenen caràcter amfipàtic, és a dir, alternen residus exposats amb residus enterrats de forma molt marcada. En canvi, els  $\beta$ -turns no segueixen un patró amfipàtic. Inicialment esperàvem que els residus de les regions CDR tinguessin una elevada exposició al solvent, disposició òptima per a unir l'antigen, guanyar estabilitat i disminuir la  $\Delta G$ , que sense la interacció amb l'antigen és elevada.

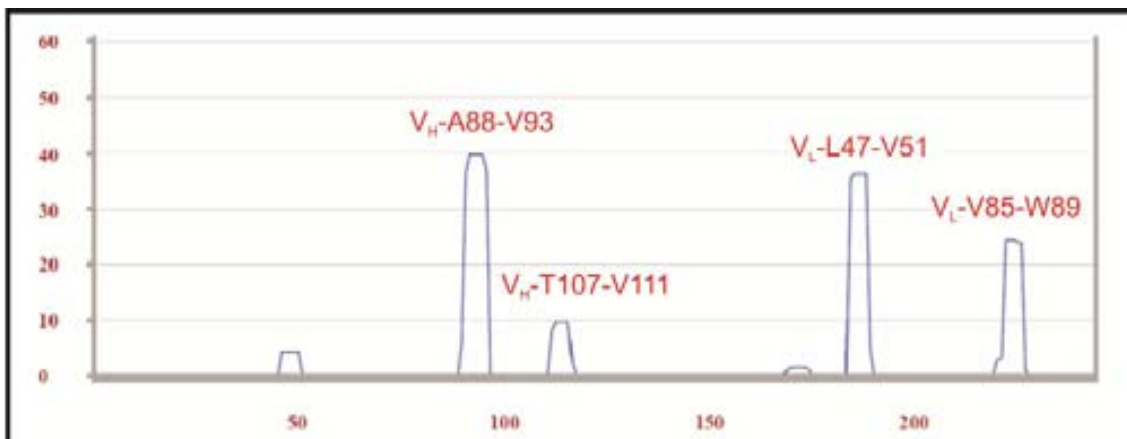
Tot i això, els resultats obtinguts no ratifiquen aquesta hipòtesi, ja que tant es troben orientats cap a la superfície com cap a l'interior. La explicació a aquesta observació és que el *loop* de CDR ha d'adoptar una conformació tridimensional que encaixi específicament amb l'estructura 3D de l'antigen complementari.



**Figura 2. 7. Superfície d'exposició al solvent.** La gràfica, obtinguda per DSSP, mostra la superfície d'exposició al solvent (Å<sup>2</sup>) de cada un dels residus de la seqüència de l'scFv-h3D6. Els residus amb valor inferior a 25 Å<sup>2</sup> es consideren molt enterrats.

#### 4.7. Predicció de tendència a l'agregació.

La figura 2. 8, juntament amb la taula, mostra els resultats obtinguts per l'algoritme TANGO, el qual identifica quatre regions amb forta tendència a l'agregació en fulla-β dins la seqüència de l'scFv-h3D6, i que corresponen a les cadenes-β F i G del domini V<sub>H</sub>, i C' i F del domini V<sub>L</sub>. Els pics amb valors inferiors a 8 s'han considerat falsos positius, i no s'han tingut en compte (Cerdà-Costa et al. 2009).



Residu	TANGO	Residu	TANGO	Residu	TANGO	Residu	TANGO
<b>V<sub>H</sub>-βF</b>		<b>V<sub>H</sub>-βG</b>		<b>V<sub>L</sub>-βC'</b>		<b>V<sub>L</sub>-βF</b>	
<b>A88</b>	36.34	<b>T107</b>	8.08	<b>L47</b>	35.50	<b>V85</b>	24.27
<b>V89</b>	39.80	<b>L108</b>	9.60	<b>I48</b>	36.18	<b>Y86</b>	24.34
<b>Y90</b>	39.80	<b>V109</b>	9.60	<b>Y49</b>	36.18	<b>Y87</b>	24.34
<b>Y91</b>	39.80	<b>T110</b>	9.60	<b>L50</b>	36.18	<b>C88</b>	23.98
<b>C92</b>	39.65	<b>V111</b>	9.60	<b>V51</b>	36.18	<b>W89</b>	23.87
<b>V93</b>	36.89						

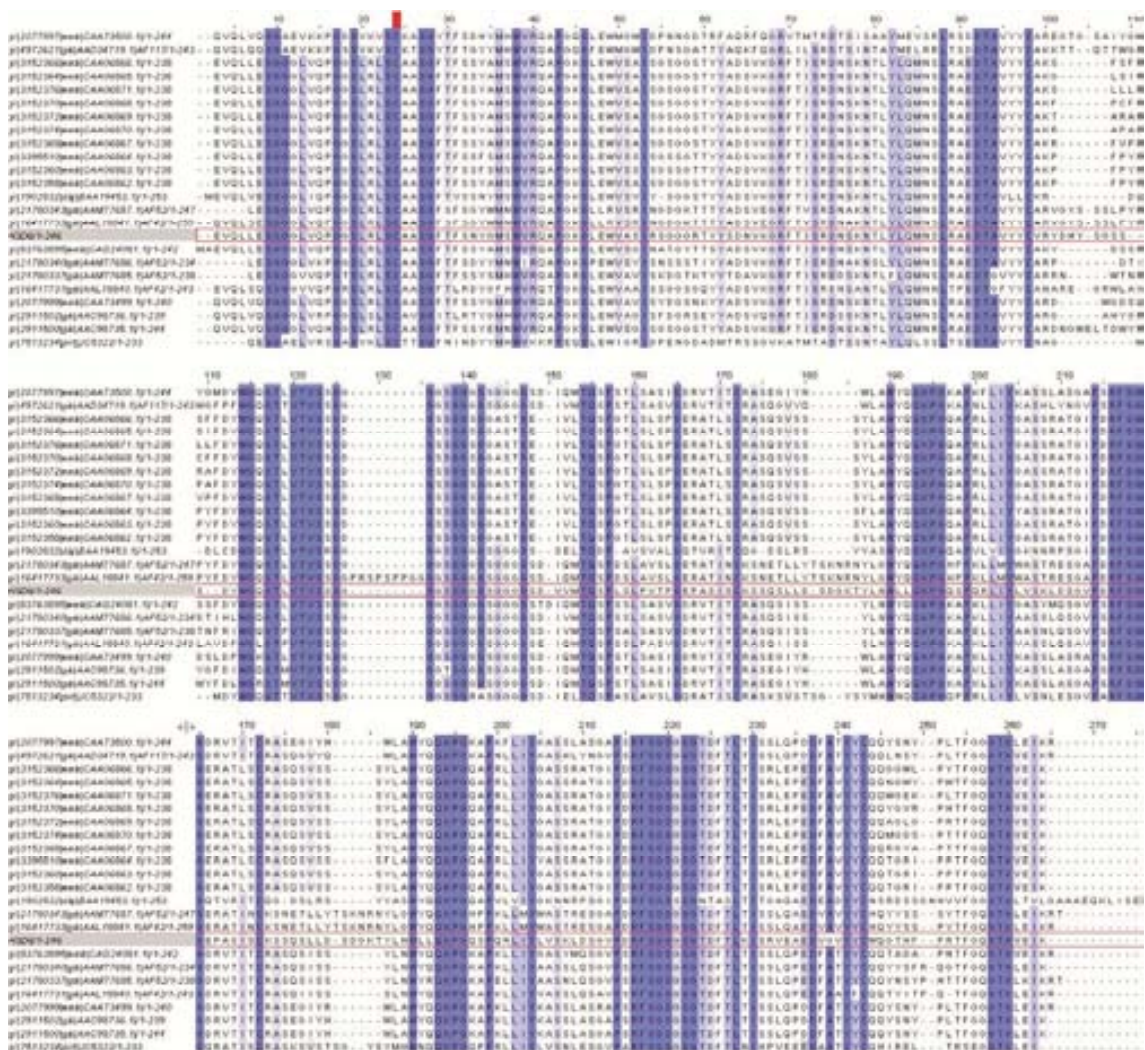
**Figura 2. 8. Predicció de la tendència a l'agregació de l'scFv-h3D6.** Mitjançant l'algorisme TANGO, s'han determinat les regions amb major tendència a l'agregació de l'scFv-h3D6. Els resultats es mostren en forma de gràfica (dalt) o com a taula de valors específics (baix). Es diferencien clarament quatre regions, dues per domini, amb forta tendència en agregar. Els valors inferiors a 8 han estat descartats.

Justament, les dues cadenes de cada domini amb tendència a l'agregació es troben empaquetades entre elles per contactes hidrofòbics, contrarestant el possible efecte de nucleació de cada una de les fulles-β aïllades. L'exposició d'aquestes regions al solvent, pot desencadenar l'agregació de la proteïna i la conseqüent insolubilitat de l'agregat, a part de resultar un punt crític cap a la via amiloide.

#### 4.8. Alineament Múltiple.

L'alineament múltiple és una eina més per a poder determinar residus mutables. Comparant entre seqüències s'han reconegut els aminoàcids més conservats i, en principi, no mutables ja que implicaria canvis en la estabilitat, solubilitat o funció de la molècula.

Amb l'alineament, es determina l'aminoàcid més abundant en una posició a mutar i si es correspon amb el de la seqüència del nostre scFv (Figura 2. 9).



**Figura 2. 9. Alineament múltiple de l'scFv-h3D6.** Alineament de la seqüència de l'scFv-h3D6 amb 23 seqüències scFv. Les diferents tonalitats de blau ressalten la conservació del residu en cada posició, des de més conservada (blau fort), ja sigui el mateix aminoàcid o un altre amb les mateixes propietats físico-químiques, a menys conservada (blanc). La numeració dels residus no segueix la numeració Kabat emprada per al scFv-h3D6.

Les regions CDRs, tot i no ser conservades entre les diferents seqüències degut a que cada scFv és específic d'un antigen determinat, no són mutables. Fer-ho suposaria perdre afinitat amb l'antigen, en el nostre cas els oligòmers formats pel pèptid  $\text{A}\beta_{1-42}$ . Els mutats de CDRs serien possibles un cop obtingut el cristall del complex scFv-h3D6: $\text{A}\beta_{1-42}$ , treball pensat per a fer en un futur tot i resultar difícil degut a l'agregació del complex. Amb ell es caracteritzarien les interaccions reals en el complex i es podrien mutar residus específics per a optimitzar-ne l'afinitat i, així, aconseguir una menor dosi efectiva de l'scFv.



#### 4.9. Aminoàcid Scanning-Mutation.

Emprant l'eina Aminoàcid *Scanning-mutation* (ProSa 2003), es va realitzar una predicció teòrica de l'efecte de les mutacions sobre l'estabilitat de la molècula. Es considera que una posició en el WT no és estable, quan mínim 15 dels 20 aminoàcids possibles no desestabilitzen l'estructura. L'anàlisi dels resultats obtinguts mostra que 11/113 residus del domini V<sub>H</sub> (~ 10 %) i 13/107 del domini V<sub>L</sub> (~ 12 %) millorarien l'estabilitat de la molècula.

**Taula 2. 1. Aminoàcid Scanning-Mutation.** A la taula s'hi representen aquells residus de la seqüència de l'scFv-h3D6 que, teòricament, són inestables ja que mínim 15 dels 20 possibles aminoàcids aporten estabilitat a la molècula. També es mostren aquells canvis que la inestabilitzen i els que resulten neutres. A més, per a cada residu, es mostra la regió a la qual pertanyen dins la molècula (FR o CDR), la superfície d'exposició al solvent obtinguda per DSSP, la tendència a l'agregació predita per TANGO i el grau de conservació del residu d'entre les 24 seqüències diferents comparades a l'alineament múltiple. En gris es remarquen aquelles posicions que serien adients per a mutar.

Residu V <sub>H</sub>	Mutacions estables	Mutacions inestable	Mutacions neutre	Regió	Exposició al solvent (Å)	TANGO	Grau de conservació
E6	19	0	1	FR1	6.3	0	18/24
G10	19	0	1	FR1	44.2	0	21/24
F27	15	4	1	FR1	13.0	0	21/24
R38	16	3	1	FR2	1.1	0	23/24
E46	16	3	1	FR2	17.9	0	22/24
Y59	17	2	1	CDR2	28.8	0	22/24
S60	16	3	1	CDR2	9.3	0	1/24
R71	16	3	1	FR3	11.0	0	23/24
D86	15	4	1	FR3	0.6	0	24/24
D101	16	3	1	CDR3	11.2	0	20/24
G106	17	2	1	FR4	19.8	0.65	24/24
Residu V <sub>L</sub>	Mutacions estables	Mutació inestable	Mutació neutre	Regió	Exposició al solvent (Å)	TANGO	Grau de conservació
P18	18	1	1	FR1	50.7	0	1/24
L27c	15	4	1	CDR1	41.7	0	3/24
K30	16	3	1	CDR1	36.9	0	1/24
R46	16	3	1	FR2	1.1	0	1/24
L50	17	2	1	CDR2	37.0	36.06	2/24
V58	17	2	1	FR3	13.7	0	7/24
K74	17	2	1	FR3	44.1	0	1/24
D82	15	4	1	FR3	1.2	0	24/24
Q90	15	4	1	CDR3	0.0	1.06	22/24
F94	16	3	1	CDR3	65.7	0	2/24
P95	19	0	1	CDR3	19.3	0	18/24
R96	17	2	1	CDR3	14.1	0	2/24
K103	16	3	1	FR4	45.5	0	24/24

Després de mirar la regió (CDR/FR), l'accessibilitat al solvent, la predicció de TANGO, i el grau de conservació a l'alineament múltiple de cadascun d'aquest residus (Taula 2. 1), teòricament millorables, només dos eren adients per a ser realitzats, P18 i K74 del domini  $V_L$ . Tanmateix, amb un anàlisi més profund es va veure que la P18 és necessària perquè forma part d'un gir- $\beta$  ( $V_L$   $\beta A$ - $\beta B$ ), i que la K74, a més de ser un residu que trenca l'agregació (Pawar et al. 2005), estableix contactes salins que estableixen l'estructura secundària a la que pertany ( $V_L$   $\beta E$ ).

A més, considerem que aquest anàlisi és poc fiable, ja que, entre d'altres, no detecta cap de les regions predites per TANGO com tendents a l'agregació, amb l'excepció del residu  $V_L$ -L50, que pertany al CDR2 i per tant no és mutable. La bona correlació entre les prediccions de TANGO i els resultats experimentals s'ha mostrat en diverses ocasions (Cerdeira-Costa et al. 2007).

#### **4.10. Redisseny de l'scFv-h3D6 a partir del model 3D.**

##### ***4.10.1. Mutacions en el nucli hidrofòbic.***

A partir dels resultats obtinguts per TANGO, es va proposar i dissenyar una bateria de mutants simples amb l'objectiu de disminuir la tendència a l'agregació de l'scFv-h3D6 i, així, millorar el rendiment de purificació de la proteïna recombinant. De les quatre regions predites amb alta tendència a l'agregació, es van triar les tres amb valors de predicció superiors a 10:  $V_H$ - $\beta F$ ,  $V_L$ - $\beta C'$ , i  $V_L$ - $\beta F$  (figura 2. 8).

Tot i ser conscients de la gran dificultat que comporta la mutació del nucli hidrofòbic de qualsevol proteïna, vam descartar mutacions a la superfície. És important recordar que la seqüència de l'scFv-h3D6 és humanitzada, ja que la molècula té finalitats terapèutiques, i, per tant, cal anar amb compte a l'hora d'introduir mutacions que podrien provocar, finalment, una resposta immunitària no desitjada.

Per al disseny dels mutants d'agregació s'ha tingut en compte, principalment, els valors de DSSP, l'alineament múltiple i els canvis de residus deguts a la humanització de la seqüència del fragment d'anticòs (també realitzada sobre les regions FR). Al dissenyar els mutants, s'ha tingut molt en compte que s'estan modificant regions que es troben força, inclús totalment enterrades, fet que comporta una gran dificultat per a triar una substitució adequada per aquestes posicions.

Així la proposta de sis mutants per a disminuir la tendència a l'agregació de l'scFv-h3D6 va ser la següent:

- **Regió V<sub>H</sub>-A88-V93 (V<sub>H</sub>-βF): Mutant V89A/V89N**

Aquesta regió conté la Cys92, que no és, en principi, mutable. A més, la Val93 precedeix al V<sub>H</sub>-CDR3 i tampoc és convenient mutar-la. Així que només ens queda la regió A88V89Y90Y91, molt enterrada. El residu menys enterrat és la Val89, amb un DSSP de 15. Si considerem l'alineament en aquesta posició trobem 23Val i 1Phe, entre les 24 seqüències alineades. A més, la seqüència de l'anticòs abans de la humanització era una leucina (Trp02006066171). La fenilalanina, a part de ser massa voluminosa, tendeix més a l'agregació que la leucina (Pawar et al. 2005). És per tot això que esdevé molt difícil de triar una substitució en aquesta posició. L'única opció plausible en aquestes situacions era provar la substitució a alanina, l'aminoàcid que millor s'adapta en multitud de posicions (Weiss et al. 2000). De totes maneres, visualitzant els contactes de la V89 dins del model, també vam considerar la mutació a asparagina, ja que té poca tendència a l'agregació (Pawar et al. 2005).

- **Regió V<sub>L</sub>-L47-V51 (V<sub>L</sub>-βC'): Mutant Y49T/Y49A**

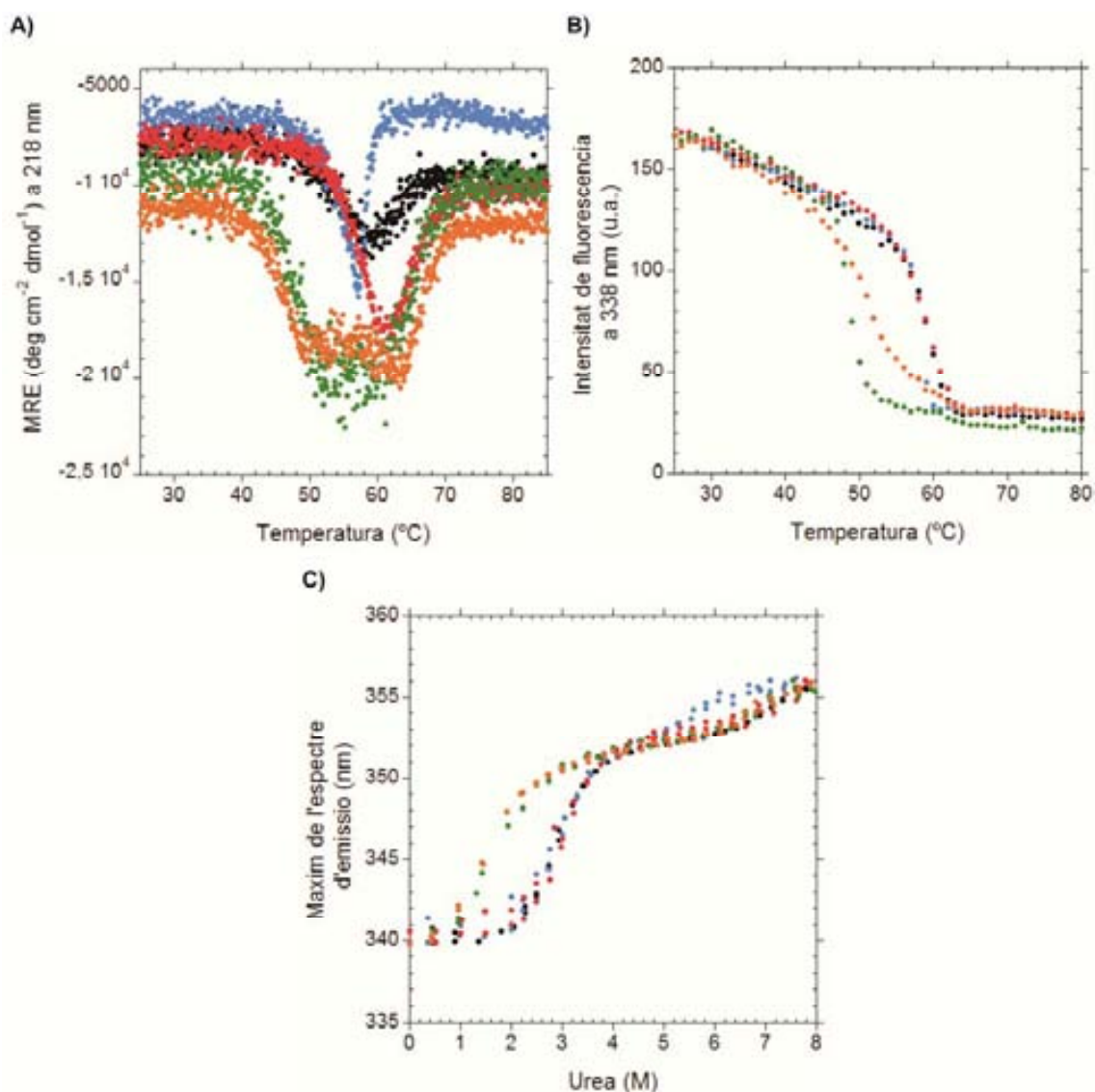
Aquesta regió comprèn el V<sub>L</sub>-FR2 i el V<sub>L</sub>-CDR2, que comença a la posició Lys50. Així que sols ens queda per mutar la regió L47I48Y49, extremadament enterrada. El residu menys enterrat és Tyr49, amb un DSSP de 8. Si considerem l'alineament en aquesta posició trobem sempre una tirosina, i aquesta posició no ha estat humanitzada (Trp02006066171). Degut a que aquesta tirosina és molt important per a la interacció entre els dos dominis del ScFv, considerem que s'ha de mirar de mantenir un residu amb característiques semblants, especialment la presència del hidroxil, raó per la qual vam creure que la treonina era una mutació a provar. La mutació a alanina es va realitzar per defecte.

- **Regió V<sub>L</sub>-V85-Trp89 (V<sub>L</sub>-βF): Mutant V85T/V85A**

Aquesta regió precedeix la Cys88, que no és, en principi, mutable. A més, el Trp89 ja forma part del V<sub>L</sub>-CDR3 i tampoc és pot mutar. Així que sols ens queda per mutar la regió V85Y86Y87, molt enterrada. El residu menys enterrat és Val85, amb un DSSP de 16. Si considerem l'alineament en aquesta posició trobem 13Val, 9Thr, 1Ala i 1Asp, entre les 24 seqüències alineades. A més, la seqüència de l'anticòs abans de la humanització era una leucina (Trp02006066171). En aquest cas vam considerar que la mutació a treonina, que trenca la tendència a l'agregació millor que l'alanina (Pawar et al. 2005), era una bona opció. La mutació a alanina es va realitzar per defecte.

4.10.1.1. Resultats experimentals dels mutants dissenyats.

Al ser conscients del risc que suposa mutar residus completament enterrats dins la proteïna, i alguns d'ells importants per al correcte empaquetament globular, era d'esperar que el rendiment de purificació per alguns dels mutants fos baixa, i així ha estat per als mutants  $V_H$ -V89A i  $V_L$ -V85A, on el canvi de residu ha dificultat el seu replegament de forma que no han pogut ser extrets de la fracció insoluble. Per aquesta raó, aquest dos mutants han estat directament descartats a ser analitzats.



**Figura 2. 10. Desnaturalització tèrmica i química de l'scFv-h3D6 i les seves variants.** A) Desnaturalització tèrmica per CD seguint el mínim d'el·lipticitat a 218 nm. B) Desnaturalització tèrmica seguint el desplaçament del màxim de fluorescència a 338 nm. C) Desnaturalització química, per urea, on el màxim de l'espectre d'emissió dels triptòfans és representat en funció de la concentració d'urea. WT (negre),  $V_H$ -V89N (blau),  $V_L$ -V85T (vermell),  $V_L$ -Y49T (verd),  $V_L$ -Y49A (taronja).

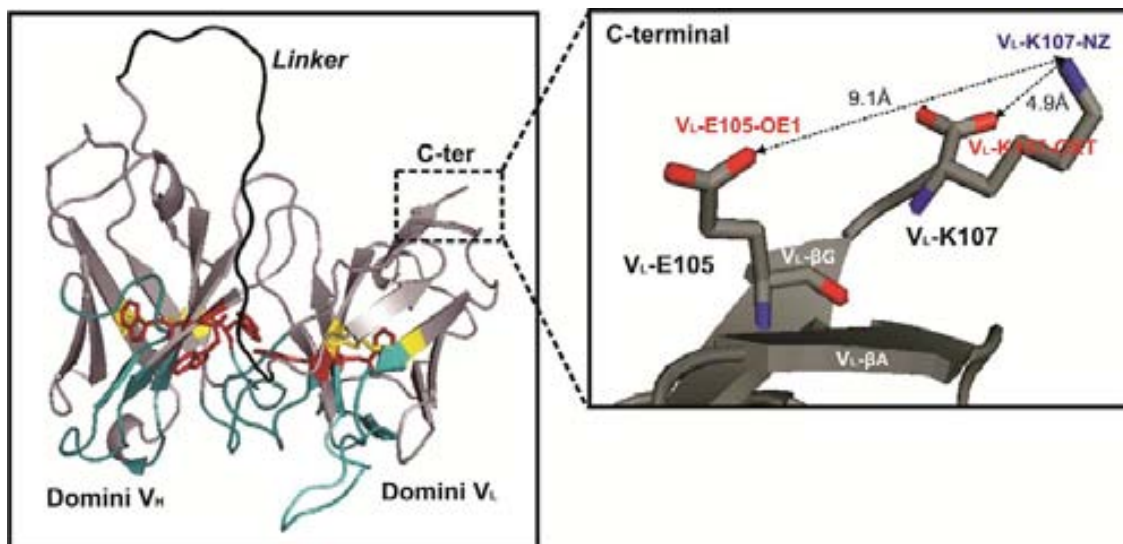
Pel que fa a la resta de mutacions, també ha resultat complicat extraure'n suficient quantitat de proteïna per a la seva posterior caracterització, però tot i així s'ha pogut seguir endavant.

Les corbes de desnaturalització tèrmica, seguides per CD i fluorescència, mostren una millora poc significativa o nul·la de la tendència a l'agregació (Figura 2. 10-A, B). Concretament, els dos mutants del residu conservat  $V_L$ -Y49T/A comencen a agregar uns 5 graus abans que el WT, anul·lant directament la hipòtesi de disminució de la tendència a l'agregació. En canvi, els mutants  $V_H$ -V89N i  $V_L$ -V85T sembla que retardin l'inici del procés d'agregació, ja que el senyal a 218 nm decreix a partir dels 50 °C, cinc graus més tard que el WT, quan s'inicia la reestructuració cap un major contingut en fulla- $\beta$ . Aquesta dada seria considerada positiva si no fos perquè, tot i començar més tard, el mutant  $V_H$ -V89N assoleix l'estat agregat ràpidament, abans inclús que el WT. Segons la corba de CD del mutant  $V_L$ -V85T (Figura 2. 10-A), podria dir-se que s'ha disminuït la tendència a agregació, ja que l'intermediari s'assoleix uns dos °C més tard que el WT, però per fluorescència no s'observen diferències respecte el WT.

Com s'observa a la figura 2. 10-C, les corbes de desnaturalització química amb urea de tots els mutants segueixen la mateixa transició de tres estats que la descrita per el WT, però cap d'ells sembla mostrar una millora de l'estabilitat. Els mutants  $V_H$ -V89N i  $V_L$ -V85T són pràcticament iguals que el WT pel que fa al desplegament dels dos dominis, mentre que els mutants del residu  $V_L$ -Try49 desestabilitzen clarament el domini  $V_L$  i, encara més, sembla que l'estat intermediari, i precursor de la via amiloide, es troba estabilitzat

#### ***4.10.2. Re-disseny del extrem C-terminal de l'scFv-h3D6.***

El model tridimensional ha permès una examinació gràfica de l'estructura, així com determinar les distàncies entre cadenes laterals. S'ha vist que l'extrem C-terminal de la molècula, que correspon al residu  $V_L$ -K107, segueix formant part de la cadena- $\beta$  G (Figura 2.10). Per tant, les cadenes laterals de  $V_L$ -K107 i  $V_L$ -E105 es troben orientades cap a la mateixa cara de la cadena- $\beta$  i haurien d'establir una interacció electrostàtica, però la distància entre elles ( $V_L$ -K107-NZ i  $V_L$ -E105-OE1), de 9.1 Å, és massa gran per a establir-la. La raó d'aquesta excessiva separació és que, la cadena lateral de  $V_L$ -K107 es troba atreta per OXT107-O, la distància entre les quals és de 4.9 Å.



**Figura 2. 11. Detall de l'extrem C-terminal del scFv-h3D6.** A la imatge es marquen les principals interaccions entre els residus VL-E105 i VL-K107, i l'efecte del àtom d'oxigen de la cadena lateral OXT107-O sobre aquesta interacció.

Al examinar l'alineament múltiple entre les 24 seqüències de molècules scFv diferents (Figura 2.9) es va veure que 14 d'elles contenen al extrem C-terminal el residu VL-K107, sis VL-R108 i dues VL-T109.

Amb la intenció d'estabilitzar la cadena- $\beta$  G de la molècula (treball de màster Blasco, B., tesis en redacció de Rivera-Hernández, G.), es va decidir allargar en un o dos residus l'extrem C-terminal, generant les formes mutants VL-el-R108 i VL-el-R108T109, respectivament. A més, per a confirmar la hipòtesis de l'efecte de OXT107-O sobre la falta d'interacció entre VL-K107 i VL-E105, també es va estendre la cadena principal afegint tan sols un residu de Gly, formant el mutant VL-el-R108G. Per a facilitar la lectura, han estat anomenats com a C1 (VL-el-R108G), C2 (VL-el-R108), i C3 (VL-el-R108T109).

## 5. DISCUSSIÓ.

S'ha obtingut un model tridimensional de l'estructura d'un scFv construït a partir de la seqüència de l'anticòs h3D6.v2 (AAB-001, *Elan Pharmaceuticals*), dirigit contra la seqüència N-terminal del pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub> (TrpO2006066171). En la cerca d'estructures homòlogues en el PDB es van trobar més de 1000 seqüències amb una homologia superior al 30% (resultats no mostrats); entre aquestes, l'scFv amb codi PDB 2GHTrp:B mostrà el major grau d'homologia, amb un 70 % de identitat i, tan sols, 2 % de *gaps*. A més de l'alt grau d'identitat, el 30 % restant conté un 81 % de mutacions conservatives, es a dir, es pot considerar que el grau global d'homologia és al voltant del 94 %. Com és d'esperar, el 6 % de mutacions no conservatives es troba en els CDR ja que l'anticòs del qual deriva l'scFv motlle està dirigit contra un antigen diferent (SARS, *Spike protein receptor binding domain*) del pèptid-A $\beta$ . El fet que el modelatge s'hagi realitzat amb un motlle amb un grau global d'homologia tant alt fa que el model resulti molt fiable.

Tot i això, la regió del connector no està resolta en cap dels pDBs homòlegs degut a la seva alta flexibilitat. Aqueta flexibilitat és necessària per a permetre l'empaquetament a l'espai dels dos dominis que conformen la quimera recombinant. Per això, va ser necessari refinar l'estructura 3D d'aquesta regió, fet que implicà una reestructuració de la resta de la molècula. Concretament, la conformació del domini V<sub>H</sub> es veu més modificada que la del domini V<sub>L</sub>. La raó d'aquest fet resulta difícil d'explicar sense conèixer la via de plegament dels altres scFvs de l'alineament múltiple. En principi, molts scFvs presenten una via de plegament de dos estats (desplegat i natiu) perquè el domini V<sub>H</sub>, que és qui contribueix més a l'empaquetament d'ambdós dominis per contenir més residus triptòfan a la interfície, és menys estable que el V<sub>L</sub> (Worn, Pluckthun 1998, Worn, Pluckthun 2001). En el nostre cas però, el domini V<sub>H</sub> és el més estable i s'acumula un intermediari en equilibri, el que fa que la via sigui de tres estats (desplegat, intermediari i natiu) (Rivera-Hernandez et al. 2013, Rivera-Hernandez 2013).

Una vegada seleccionat el model de mínima energia que modifica menys la conformació dels dominis després dels refinaments, s'ha pogut classificar les regions CDR (MacCallum *et al.*, 1996). Encara que el V<sub>H</sub>-CDR3 està descrit com el més variable (Oliva *et al.*, 1998), i per tant hauria de ser el més difícil de classificar, en el nostre cas tan sols el V<sub>H</sub>-CDR1 s'allunya del consens general, per la seva llargària i localització en el domini. Aquest fet apunta cap a una major importància d'aquest CDR en la interacció amb l'antigen.

El model final conté un 51% de fulla- $\beta$ , un 29 % de girs- $\beta$ , i un 20 % de *loops*, en concordança amb el plegament tot- $\beta$  que caracteritza el plegament tipus Ig (Mattu *et al.*, 1998). Cada un dels dominis conté nou cadenes- $\beta$ , disposades en dues fulles- $\beta$  per adoptar

la conformació en barril- $\beta$  canònica d'Igs. Les cadenes  $\beta$ B i  $\beta$ F de cada domini contenen les cisteïnes que conformen els ponts disulfur característics d'aquest tipus de dominis, i són les cadenes  $\beta$ F les més enterrades i les que mostren una major tendència a l'agregació. Els CDRs d'ambdós dominis es troben oposats al connector i exposats al solvent. El connector uneix tots dos dominis sense interaccionar amb la molècula i amb una alta flexibilitat, fet que pot ser una de les causes, encara que no la principal, del baix rendiment en l'obtenció de proteïna recombinant durant la seva expressió i purificació, tal i com està descrit a la bibliografia (Zheng, Baumann & Reymond 2003). La superfície d'interacció entre els dos dominis és molt gran, implicant contactes terciaris entre residus força enterrats, com per exemple els residus  $V_H$ -Trp47,  $V_H$ -Trp103 i  $V_L$ -Trp89, tres dels cinc residus Trp que conté l'scFv-h3D6 i que es troben situats a la interfície hidrofòbica, des d'on estableixen fins a 5, 7 i 8 interaccions terciàries amb residus del domini oposat, respectivament.

Amb les coordenades del model, s'ha derivat informació sobre l'accessibilitat al solvent dels diferents residus, la distància entre residus d'interès, i un rastreig de totes les mutacions possibles a les diferents posicions. A més, amb la seqüència primària, s'ha obtingut un perfil de la tendència a l'agregació i un alineament amb altres fragments d'anticòs. Tota aquesta informació ens ha permès proposar una sèrie de mutacions, dissenyades per augmentar l'estabilitat de la molècula i per trencar la tendència a l'agregació (Rivera-Hernandez 2013).

### **5.1. Mutacions al nucli hidrofòbic augmenten la tendència a l'agregació de l'scFv-h3D6.**

Malauradament, els resultats obtinguts per aquests mutants no han estat els desitjats, i la disminució de la tendència a l'agregació per modificació de residus puntuals no ha estat possible. D'aquesta manera, es confirma la dificultat de mutar residus enterrats dins la molècula, com també la importància de que les proteïnes adoptin el seu plegament natiu, per tal de deixar menys exposades les regions amb més tendència a l'agregació i ser menys vulnerables a l'agregació. D'aquests resultats també se'n extrau la necessitat de dissenyar mutants múltiples, ja que al fer substitucions puntuals, es trenquen interaccions importants per al plegament i empaquetament de la molècula, de forma que la principal parella del residu mutat queda lliure i pot causar certa repulsió al interior de la molècula o establir interaccions no natives amb altres residus de l'entorn, fet que provoca l'alteració de les interaccions natives de la proteïna i, per tant, una major exposició al solvent de les regions amb més tendència a l'agregació.



## 5.2. L'elongació del extrem C-terminal augmenta l'estabilitat termodinàmica i disminueix la tendència a l'agregació del l'scFv-h3D6.

El model tridimensional de la molècula d'scFv-h3D6 ha permès observar que l'extrem C-terminal de la molècula, que correspon al residu V<sub>L</sub>-K107, segueix formant part de la cadena-β G. Les cadenes laterals de V<sub>L</sub>-K107 i V<sub>L</sub>-E105 es troben orientades cap a la mateixa cara de la cadena-β però, la proximitat de la cadena lateral del residu OXT107-O afebleix la interacció electrostàtica entre V<sub>L</sub>-K107-NZ i V<sub>L</sub>-E105-OE1. La elongació del extrem C-terminal hauria de separar l'OXT107-O de la cadena lateral de V<sub>L</sub>-K107, i propiciar l'estabilització de l'estructura secundària de la molècula i disminuir la tendència a l'agregació de l'scFv-h3D6.

Mitjançant la desnaturalització química per urea i espectroscòpia de FTIR, s'ha corroborat la hipòtesi de l'elongació del extrem C-terminal. Els experiments corresponents han estat realitzats pels companys de laboratori Rivera-Hernández, G i Blasco-Moreno, B. Els resultats obtinguts es troben detallats en la tesi doctoral en redacció del primer, i en el treball de màster del segon, així com en el recent article publicat a la revista mAb (Blasco-Moreno 2011, Rivera-Hernandez 2013, Rivera-Hernandez et al. 2013). Resumidament, l'elongació de l'extrem C-terminal, a través de les formes mutants C1 (V<sub>L</sub>-el-R108G), C2 (V<sub>L</sub>-el-R108), i C3 (V<sub>L</sub>-el-R108T109), ha permès establir el plegament global de la molècula fins a un 20%, resultat que ha donat lloc a la desestabilització de l'intermediari tèrmic i, consegüentment, s'ha disminuït la tendència a l'agregació de l'scFv-h3D6. A més, s'ha comprovat que aquesta modificació no afecta la formació del complex Aβ<sub>1-42</sub>:scFv-h3D6, que segueix formant fibres WL. Per tant, s'ha optimitzat el plegament de l'scFv-h3D6 sense afectar la seva capacitat protectora enfront els oligòmers d'Aβ<sub>1-42</sub> (Blasco-Moreno 2011, Rivera-Hernandez 2013, Rivera-Hernandez et al. 2013).

En conclusió, no ha estat possible mutar les regions amb major tendència a l'agregació degut a que es troben enterrades als nuclis hidrofòbics d'ambdós dominis, però si s'ha pogut augmentar l'estabilitat i disminuir la tendència a l'agregació mitjançant l'elongació de l'extrem C-terminal, completament exposat al solvent. Aquesta elongació s'ha realitzat amb residus conservats a l'alineament múltiple, de tal manera que no s'esperen problemes de immunogenicitat a l'hora de realitzar assajos *in vivo*.



**CAPÍTOL 3: Estudi inicial, mitjançant tècniques espectroscòpiques, de les propietats termodinàmiques d'un domini variable d'Ig implicat en l'Amiloïdosi de cadena lleugera. Mutacions restauratives i estabilitat.**



## 1. RESUM.

L'amiloidosi de cadena lleugera (AL) és causada per una aberrant secreció de cadenes lleugeres d'Igs (LC) lliures en circulació, que agreguen formant fibres amiloides al espai extracel·lulars d'òrgans vitals. Els dominis variables ( $V_L$ ) de les LCs, estan sotmesos a hipermutacions somàtiques i, en el cas de pacients d'AL, aquestes mutacions provoquen la desestabilització de la molècula. Alguns autors relacionen aquesta pèrdua d'estabilitat amb una major tendència a formar fibres amiloides, causants del dany tissular diagnosticat en l'AL, tot i això encara cal aprofundir més en els mecanismes amiloidogènics pels quals es formen aquests agregats, i en el paper dels intermediaris oligomèrics en la citotoxicitat. En l'AL, el 85 % del pacients presenten dímers de LCs lliures en el plasma (proteïnes Bence-Jones), on els dominis  $V_L$  de dues cadenes LC s'associen entre ells adoptant la interfície canònica dels dímers d' $V_L$ - $V_H$  d'Ig. Estudis previs indiquen una alteració conformacional de la interfície dimèrica formada per cadenes LCs amiloidogèniques, respecte la proteïna germinal; un canvi conformacional que sembla ser el responsable de l'amiloidosi d'AL.

En aquest capítol s'ha estudiat, mitjançant l'ús de tècniques espectroscòpiques (CD, fluorescència, i FTIR), les propietats termodinàmiques del domini  $V_L$  de la proteïna amiloidogènica AL-12, extreta d'una pacient d'AL, així com també del seus mutants restauratius cap la seqüència germinal κI 018/08, amb una menor tendència a formar fibres amiloides. Aquests resultats inicials, han de servir per a determinar la contribució d'una única mutació sobre l'estabilitat del domini  $V_L$ , i clarificar si existeix una correlació directa entre una menor estabilitat i una major tendència a l'agregació amiloide, una relació que encara comporta molta controvèrsia entre els diferents autors.



## 2. INTRODUCCIÓ.

L'amiloidosi de cadena lleugera (AL) és una de les moltes malalties amiloidogèniques conegudes en humans, on la proteïna precursora de la formació de fibres amiloides és una cadena lleugera (LC) d'Ig monoclonal (Ig). Normalment, dues cadenes LC s'associen amb dues cadenes pesades (HC) per a formar l'heterotetràmer d'Igs, que serà secretat al plasma sanguini per actuar com a anticòs monoclonal (mAb). Les cadenes LC també poden ser secretades com a homodímers, conegudes com a proteïnes Bence-Jones. En el cas d'AL, hi ha una secreció aberrant de dímers d'LC, degut a una anormal proliferació de cèl·lules plasmàtiques del moll de l'os, les encarregades de la síntesi de LC. L'excés d'aquestes proteïnes lliures en el plasma esdevé amb la seva agregació en forma de fibres amiloides i deposició a l'espai extracel·lular de molt òrgans vitals; aquesta deposició progressa ràpidament donant lloc a una insuficiència orgànica i mort del pacient.

Degut a que existeixen múltiples seqüències germinals codificants per Igs, i la hipermutabilitat somàtica que aquestes pateixen per tal d'obtenir el gran espectre d'Igs específiques, l'AL és considerada una de les amiloidosi més complexes de controlar. Cada pacient conté una única seqüència proteica, amb diferent grau amiloidogènic i lloc de deposició amiloide. En aquest sentit, es considera que certes mutacions no conservades desestabilitzen el plegament natiu i desencadenen l'AL. Més que el nombre de mutacions conservades o no conservades, seria la seva localització dins la molècula la que tindria un efecte significatiu sobre l'estabilitat proteica (Blancas-Mejia, Ramirez-Alvarado 2013).

Les cadenes LCs contenen dos dominis: un domini variable ( $V_L$ ) i un domini constant ( $V_H$ ). Cada un d'aquests dominis adopta una estructura globular en barril- $\beta$ , típic del plegament d'Igs, format per 9 cadenes- $\beta$  (A, B, C, C', C'', D, E, F, i G), empaquetades antiparal·lelament, excepte les cadenes  $\beta_A$  i  $\beta_G$  que interaccionen de forma paral·lela. Dins del domini  $V_L$ , els *loops* entre les cadenes- $\beta$  B-C, C'-C'', i F-G, formen les regions CDR (*Complementary Determining Regions*), responsables de l'especificitat i unió a l'antigen; mentre que la resta de la proteïna formen les regions FR (*Framework Regions*).

En l'AL, ha estat reportat que la majoria de pacients acumulen fibres amiloides formades principalment per dominis  $V_L$ . Per aquesta raó, gran part dels estudis de cadenes LC tan sols inclouen aquest domini que, per la seva variabilitat, és el que pateix més mutacions somàtiques. A més, el 85% del pacients d'AL presenten dímers de LCs lliures en el plasma (proteïnes Bence-Jones), on els dominis  $V_L$  de dues cadenes LC s'associen entre ells adoptant la interfície canònica dels dímers d' $V_L$ - $V_H$  d'Ig. Sovint, però, aquests dímers d' $V_L$  adopten una alteració conformacional de la interfície dimèrica, respecte la proteïna germinal; un canvi conformacional que estaria molt relacionat amb l'amiloidosi d'AL.

En aquest capítol s'ha treballat amb la proteïna AL-12, un domini variable d'Ig implicat en l'AL. La seva seqüència (codi GenBank AF490912) deriva d'una pacient de 64 anys amb diagnòstic d'AL cardíaca, després de presentar símptomes de ronquera, dificultat per empassar, pèrdua de pes, fatiga, insuficiència cardíaca, i dolor epigàstric. La supervivència després del diagnòstic va ser de 10 anys, i la presència de fibres amiloides al teixit cardíac va ser confirmada en la biòpsia. Els nivells de cadenes LC lliures en el plasma de la pacient no van ser assajats durant el procés patològic, però van ser determinats més tard, a partir del reservori de plasma congelat, obtenint un valor de cadenes  $\kappa$ -LC lliures de 10.1 mg/dL, quan els valors normals es troben al voltant de 0.7 mg/dL. La proteïna AL-12 té un 87 % d'identitat respecte la seva línia germinal  $\kappa$ I O18/O8, una de les més representades en pacients d'AL; i conté 8 mutacions somàtiques (Taula 3. 1), de les quals 7 mutacions no són conservatives .

**Taula 3. 1. Localització de les mutacions somàtiques del domini variable AL-12.** En negreta es ressalten les mutacions restauratives que han estat dissenyades i caracteritzades en aquest capítol.

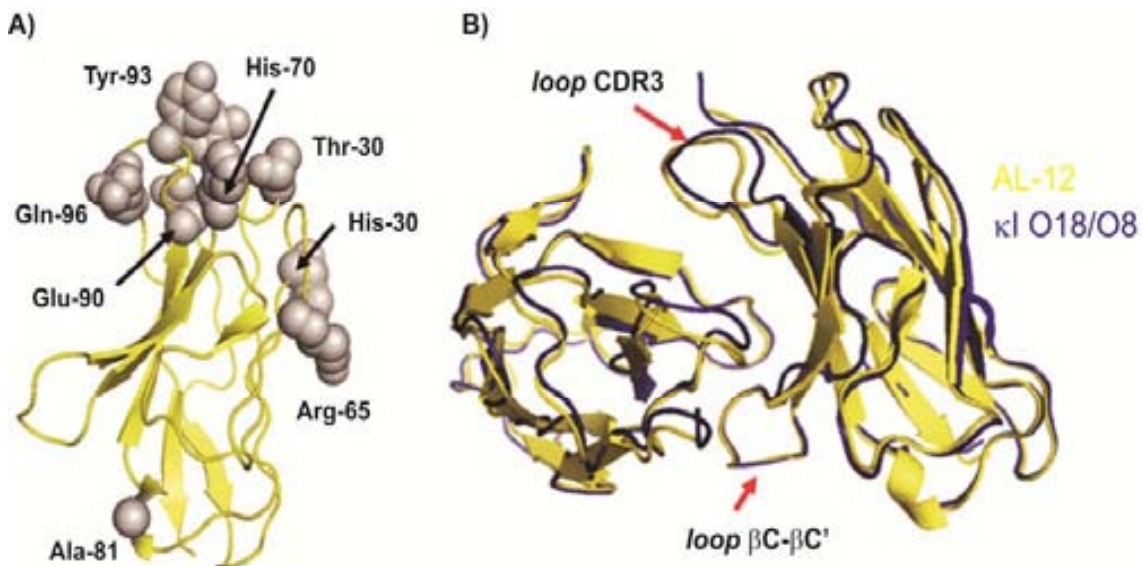
Mutació respecte $\kappa$ I O18/O8	Localització
S30T	CDR1 ( <i>loop</i> $\beta$ B- $\beta$ C)
<b>Y32H</b>	<b>Cadena-<math>\beta</math>C/Interfície dimèrica</b>
<b>S65R</b>	<b>Cadena-<math>\beta</math>D/<math>\beta</math>-Hairpin</b>
<b>D70H</b>	<b>Cadena-<math>\beta</math>E/ <math>\beta</math>-Hairpin</b>
E81A	<i>Loop</i> entre cadenes- $\beta$ E-F
Q90E	Cadena- $\beta$ F/Interfície dimèrica
N93Y	CDR3 ( <i>loop</i> $\beta$ F- $\beta$ G) /Interfície dimèrica
<b>Y96Q</b>	<b>Cadena-<math>\beta</math>G/Interfície dimèrica</b>

Les estructures cristal·logràfiques de l'AL-12 i la  $\kappa$ I O18/O8 han estat obtingudes i dipositades prèviament (codi PDB 3DVF i 2Q20, respectivament) (Randles et al. 2009, Baden et al. 2008b). La figura 3. 1-A mostra l'estructura de l'AL-12 amb les respectives mutacions, i la seva localització dins la molècula es troba detallada a la taula 3. 1.

Tridimensionalment, sis de les vuit mutacions es troben properes entre elles i es localitzen a la mateixa cara del barril- $\beta$  (la mateixa que les regions de CDRs). D'aquestes mutacions, dues formen part de CDRs, i quatre es localitzen dins la interfície dimèrica, formada per les cadenes- $\beta$  C, C', F i G.



Per solapament amb la proteïna germinal  $\kappa$ I 018/08 (Figura 3. 1-B), l'AL-12 adopta el típic plegament dels dominis  $\kappa$ -V<sub>L</sub> d'Igs. Així, sembla que aquestes proteïnes tenen una elevada tolerància a les mutacions, en el sentit de mantenir el plegament canònic.



**Figura 3. 1. Estructura cristal·lina de la proteïna AL-12 i solapament amb la proteïna germinal  $\kappa$ I 018/08.** A) Estructura cristal·lina de l'AL-12. Les 8 mutacions es troben representades en esferes grises i marcades. B) Superposició de l'AL12 (groc) i la proteïna germinal  $\kappa$ I 018/08 (blau) remarcant que l'AL-12 manté la interfície dimèrica canònica, mentre que canvia la disposició dels *loops* CDR3 i  $\beta$ C- $\beta$ C'. *Figura adaptada de Randles, E.G. (2009).*

Tot i l'aparent similitud amb la proteïna germinal, l'AL12 presenta dues regions *loop* subtilment desviades de l'estructura canònica. El *loop* entre les cadenes  $\beta$ C- $\beta$ C', on es localitza la Pro40, i la regió del CDR3, on es localitza la Pro95. A més, les mutacions en l'AL-12 provoquen, directa o indirectament, la pèrdua de certes interaccions intra-domini, concretament entre les cadenes- $\beta$  A-B-E, i una orientació diferent de cadenes laterals localitzades a les cadenes- $\beta$  C-F (Taula 3. 2). Un canvi conformacional que afecta a l'estabilitat del domini.

**Taula 3. 2. Detall i localització de les interaccions alterades o perdudes degut a les mutacions que conté la proteïna AL-12.**

<b>Interacció perduda</b>	<b>Tipus i Localització</b>
T5-Q24	Pont d'hidrogen. Cadenes- $\beta$ A-B
V19-I75	Pont d'hidrogen. Cadenes- $\beta$ B-E
I21-T72	Pont d'hidrogen. Cadenes- $\beta$ B-E
Q24-D70H	Electrostàtica. Cadenes- $\beta$ B-E

Prèviament als resultats exposats en aquest capítol, es va estudiar la correlació entre l'estabilitat de l'AL-12 i la formació de fibres amiloides (Sikking, Ramirez-Alvarado 2008). En aquest estudi es conclou que la força iònica no afecta a l'estructura secundària del domini, però augmenta significativament la seva estabilitat termodinàmica i accelera la cinètica de formació amiloide, escurçant la fase de nucleació. Això demostra, un cop més, que l'estabilitat i la tendència a l'agregació no sempre es troben directament correlacionats (Cerdeja-Costa et al. 2009).

Els experiments i resultats exposats en aquest capítol de la Tesi Doctoral, han estat realitzats en col·laboració i durant l'estada de tres mesos al Laboratori de *Protein Misfolding*, dirigit per la Dra. Ramírez-Alvarado, M., de la Clínica Mayo (Rochester, US). A partir dels experiments realitzats prèviament per Sikking, L.A., i Randles, E.G., s'ha continuat l'estudi el domini  $V_L$  amiloidogènic AL-12. Mitjançant tècniques espectroscòpiques, com ara CD i fluorescència, s'ha fet una comparació termodinàmica entre el domini  $V_L$  AL-12 i els quatre mutants restauratius H32Y, R65S, H70D i Q96Y. Per FTIR, s'ha seguit la via d'agregació del domini AL-12 i les seves variants, per tal de extraure'n els principals canvis conformacionals que pateix la proteïna nativa. Aquests resultats inicials han de servir per a determinar la contribució d'una única mutació sobre l'estabilitat del domini  $V_L$ , i clarificar si existeix una correlació directe entre una menor estabilitat i una major tendència a l'agregació amiloide.

### 3. MATERIALS I MÈTODES.

#### 3.1. Mutagènesi Dirigida.

Els mutants restauratius de l'AL-12 (H32Y, R65S, H70D i Q96Y) han estat generats emprant el kit de mutagènesi dirigida *Quikchange® Multi Site-Directed Mutagenesi Kit* (Agilent). El gen de la proteïna AL-12, de 324 pb, ha estat prèviament clonat dins del vector pET-12a (Sikkink, Ramirez-Alvarado 2008). A diferència d'altres mètodes, aquest kit utilitza tan sols un únic encebador que conté el canvi nucleotídic, el qual es traduirà en el canvi d'aminoàcid desitjat, i que hibrida sobre un DNA plasmídic de cadena senzilla (ss-DNA).

Els encebadors dissenyat i emprat per a cada un dels mutants són següents:

- **Mutant H32Y:**
  - **Parental** 5'GGACATTACCAACCATTTTAAACTGGTATCAGCAAAAACC 3'
  - **H32Y-d** 5'GGACATTACCAACT**T**ATTTAAACTGGTATCAGCAAAAACC 3'
- **Mutant R65S:**
  - **Parental** 5'GGTTCAGTGGG**C**GTGGATCTGGGACACATTTTCAC 3'
  - **R65S-d** 5'GGTTCAGTGGG**A**GTGGATCTGGGACACATTTTCAC 3'
- **Mutant H70D:**
  - **Parental** 5'GGATCTGGGACAC**A**TTTCACTTTCACCATCAGCAGC 3'
  - **H70D-d** 5'GGATCTGGGAC**A**GATTTCACTTTCACCATCAGCAGC 3'
- **Mutant Q96Y:**
  - **Parental** 5' GGACATTACCAACCATTTTAAACTGGTATCAGCAAAAACC 3'
  - **Q96Y-d** 5' GGACATTACCAACT**T**ATTTAAACTGGTATCAGCAAAAACC 3'

Tal i com es detalla a l'apartat 2.1 de Materials i Mètodes Generals, la reacció i el cicle de PCR, la digestió amb l'endonucleasa *DpnI*, i la transformació a les cèl·lules competents XL-Gold, s'ha realitzat tal i com indica el protocol del kit de mutagènesi. Les seqüències de DNA mutant han estat comprovades pel Servei de Seqüenciació de DNA de la Clínica Mayo (USA).

### 3.2. Expressió heteròloga de l'AL-12 i mutants restauratius.

La soca d'*E.coli* emprada per a l'expressió intracel·lular del domini variable AL-12 i els seus mutants restauratius H32Y, R65S, H70D i Q96Y, ha estat la **BL21sol(DE3)**, mitjançant el vector d'expressió **pET-12a** veure apartats 3.1 i 3.4 de Materials i Mètodes Generals).

Per a l'expressió del domini variable AL-12 i els seus mutants restauratius s'ha seguit el següent protocol:

1. Transformació de les cèl·lules competents soluBL21(DE3) amb DNA vector pET-12a::AL12, seguint el protocol explicat a l'apartat 2.2. de Materials i Mètodes.
2. Picar una colònia en 80 mL de medi 2xYT líquid suplementat amb l'antibiòtic Amp (selecció del vector).
3. Incubar màxim 15 h en agitació forta (250 rpm) a 37 °C, per promoure un cultiu saturat.
4. Inocular, en un volum final d' 0.5 L, 30 mL de cultiu saturat en medi 2xYT amb Amp, i incubar a les mateixes condicions anteriors fins arribar a una DO<sub>600</sub> de 0.6-0.8. (Per a obtenir suficient quantitat de proteïna, normalment s'han expressat 2 erlenmeyers de 2 L amb 0.5 L de LB per erlenmeyer).
5. Disminuir la temperatura del incubador a 30 °C i induir l'expressió amb 0.8 mM d'IPTG per L de cultiu. El temps d'inducció és de màxim 15 h a 30 °C, en agitació constant de 200 rpm.

### 3.3. Purificació proteïna periplasmàtica soluble.

De l'expressió, s'ha purificat la proteïna **AL-12 i els mutants R65S, H70D i Q96Y** (12.6 kDa) de la fracció periplasmàtica soluble mitjançant cromatografies de bescanvi iònic i d'exclusió molecular.

Un cop s'ha recuperat l'extracte cel·lular (veure apartat 3.5.2 de Materials i Mètodes Generals), s'ha prosseguit amb el protocol de rentat i recuperació de la fracció periplasmàtica, el qual no requereix llisar les cèl·lules ja que les proteïnes del periplasma s'alliberen per xoc osmòtic, mantenint la membrana cel·lular pràcticament intacte.

1. Resuspendre el pellet de cèl·lules amb 200 mL de Tampó de Resuspensió (Tris/HCl 10 mM, pH 8.7, prèviament refredat a 4 °C) per L de cultiu expressat, fins a ser totalment homogeni.
2. Centrifugar a 43700 g durant 40 min a 4 °C, per a separar la fracció cel·lular de la periplasmàtica soluble.
3. Recuperar el sobrenedant per decantació i descartar el pellet de cèl·lules.
4. Concentrar la mostra fins a uns 150 mL.
5. Dialitzar la mostra a Tampó d'Unió de AEX. (Tris/HCl 10 mM, pH 8.7).

### **3.3.1. Cromatografia de bescanvi aniònic.**

Per al primer pas de purificació del domini variable AL12 i els seus mutants, s'ha emprat una columna de bescanvi aniònic (AEX) Resource Q-6mL (GE Healthcare) (veure apartat 3.6.2 de Materials i Mètodes Generals) Els tampons utilitzats per a la cromatografia són els següents:

- Tampó d'Unió i de Rentat (A): Tris/HCl 10 mM, pH 8.7.
- Tampó d'Elució (B): Tris/HCl 10 mM, NaCl 1M, pH 8.7.

El pI de la proteïna és de 6.7, al utilitzar un tampó a pH 8.7, la mostra estarà carregada negativament i interaccionarà amb la reïna positiva. Per a l'elució de proteïna, s'ha utilitat un gradient lineal amb un increment de la força iònica de  $\Delta$  35% B/12 VC (o be,  $\Delta$  0.5% B/mL). La capacitat d'unió de la columna és de 480 mg (Lisozim, 14.5 kDa), per tant, el volum de mostra injectat dependrà de la quantitat de proteïna en ella.

El protocol seguit per a realitzar l'AEX és el següent:

1. Rentar la columna amb 10 VC d'aigua Milli-Q per tal d'eliminar l'etanol emprat per a la seva conservació a 4 °C.
2. Equilibrar la columna amb 5 VC de tampó A.
3. Filtrar la mostra un filtre PVDF de 0.45  $\mu$ m i injectar-la, via loop de 50 mL, a un flux constant de 2 mL/min.
4. Rentar la columna amb 5 VC de tampó A, per a tal d'eliminar completament la fracció de proteïna no unida a columna.
5. Aplicar un gradient d'elució de  $\Delta$  35% B/12 VC, a un flux constant de 1 mL/min, fins arribar al 100% d'aquest tampó. Recol·lectar fraccions d'1 mL.
6. Rentar la columna a 100% de tampó B durant un 1 VC, a un flux constant de 2 mL/min, per acabar d'eluir tota la fracció de proteïna unida.
7. Reequilibrar la columna passant del 0% al 100 % de tampó A amb 2 VC, a un flux constant de 2 mL/min.
8. Dialitzar la mostra a tampó de SEC (tampó PBS, pH 7.4).

### **3.3.2. Cromatografia d'exclusió molecular.**

En l'últim pas de purificació de l'AL-12 i els seus mutants, s'ha emprat la columna d'alta resolució HiLoad 26/60 Superdex 75 (GE Healthcare), amb un rang de fraccionament de  $3 \cdot 10^3$ - $7 \cdot 10^4$  Da (veure apartat 3.6.3.1 de Materials i Mètodes Generals). Per a la SEC, cal que totes les proteïnes parteixin del mateix punt inicial, per evitar un desfasament de la mostra al iniciar la cromatografia, la capacitat màxima de mostra a

carregar és de 10mL, volum relatiu al diàmetre de la columna. El tampó usat per a la cromatografia ha estat el tampó PBS, pH 7.4.

El protocol usat per la SEC, expressat en volums de columna (1 VC = 360 mL), és el següent:

1. Rentar la columna amb mínim 1 VC d'aigua Milli-Q per tal d'eliminar l'etanol emprat per a la seva conservació a 4 °C.
2. Equilibrar la columna amb mínim 1 VC de tampó PBS, pH 7.4.
3. Filtrar la mostra un filtre PVDF de 0.45 µm i injectar-la, via *loop* de 10 mL, a un flux constant de 2 mL/min.
4. Eluir la mostra amb mínim 1 VC de tampó PBS, pH 7.4, i recol·lectar-la en fraccions de 2 mL.
5. Rentar la columna amb mínim 1 VC d'aigua Milli-Q i conservar la columna a 4 °C en etanol al 25%.
6. Dialitzar la mostra a tampó final (Tris/HCl 10 mM, pH 7.4).
7. Concentrar la mostra fins a un mínim de 0.24 mg/mL, necessària per als experiment posteriors.
8. Aliquotar en eppendorfs d'1 mL, congelar amb N<sub>2</sub>-líquid i guardar a -20 °C.

### 3.4. Purificació proteïna citoplasmàtica insoluble.

A diferència de les altres proteïnes, la major part de la **proteïna mutant H32Y** es troba a la fracció citosòlica insoluble, la qual s'ha purificat emprant les mateixes cromatografies descrites anteriorment, després d'haver estat solubilitzada.

#### 3.4.1. Llisi Cel·lular.

Per tal de recuperar la fracció citosòlica, s'ha seguit el següent protocol de lisis cel·lular:

1. Resuspendre el pellet de cèl·lules amb Tampó de Llisi (Tris/HCl 10 mM, pH 8.7, prèviament refredat a 4 °C), a una relació de 6 mL de tampó per gram de pellet, fins a ser totalment homogeni.
2. Sotmetre les cèl·lules a 3 cicles de congelació amb N<sub>2</sub>-líquid i descongelació a 37 °C.
3. Sonicar la solució mitjançant 6 cicles de 45 seg, a potència 9 i una freqüència del 50 %, mantenint la mostra sempre en gel i reposant 3 min entre cicles.
4. Centrifugar a 43700 g durant 40 min a 4 °C, per a separar la fracció total soluble de la insoluble.
5. Descartar el sobrenedant per decantació i mantenir el pellet en gel.

### **3.4.2. Solubilització de la fracció proteica insoluble**

Tot i que part de la proteïna expressada es troba en la fracció citosòlica soluble, el rendiment obtingut de purificar aquesta fracció és baix. Per tant, s'ha optat per a recuperar tan sols la fracció insoluble. Per a fer-ho, es resuspèn el pellet amb 10 mL de Tampó de Solubilització (Urea 6 M en Tris/HCl 10 mM, pH 8.7, prèviament refredat a 4 °C) per L de cultiu expressat, fins a ser pràcticament homogeni. El pellet s'acaba de resuspendre per agitació orbital a 4 °C durant mínim 2 h. A continuació es centrifuga a 43700 g durant 40 min a 4 °C, per a separar la fracció solubilitzada de la insoluble, es recupera el sobrenedant per decantació.

### **3.4.3. Replegament per diàlisi de la fracció proteica insoluble.**

A diferència del replegament gota a gota fet en altres purificacions (com per exemple de l'scFv-h3D6), en aquest cas el replegament de la proteïna és realitzat directament per diàlisi cap al tampó Tris/HCl 10 mM, pH 8.7, a 4 °C. Un cop replegada, la proteïna és purificada seguint el mateix protocol descrit anteriorment, mitjançant la cromatografia AEX i de SEC.

## **3.5. Determinació de l'estructura secundària i terciària de l'AL-12 i mutants.**

Pel que fa als fonaments de les tècniques descrites a continuació (espectroscòpia de CD, de fluorescència i de infraroig), es troben detallats a l'apartat 4 de Materials i Mètodes Generals.

### **3.5.1. Espectre CD al UV-llunyà.**

Per a obtenir l'espectre de CD d'estructura secundària de l'AL12 i el seus mutants s'ha utilitzat l'espectrofotopolarímetre Jasco J-715, tal i com es va fer per l'scFv-h3D6 (veure Capítol 1). La concentració experimental de proteïna ha estat de 20 µM (0.24 mg/mL), disposada en una cubeta de quars de 0.2 cm. Per a mesurar l'espectre de 260 a 190 nm, s'han enregistrat 20 acumulacions a una velocitat de 50 nm/min, una resposta de 2 seg, una amplada de banda d'1 nm, i una resolució de 0.1 nm. L'espectre del plegament natiu de l'scFv ha estat determinat a 25 °C; mentre que per l'AL12 i mutants, ha estat a 4 °C. A més, s'ha registrat l'espectre de l'estat desplegat (a 90 °C) i de retorn a la temperatura inicial, per tal de determinar si la desnaturalització tèrmica de la proteïna és reversible o no.

### **3.5.2. Espectre de fluorescència del residu de triptòfan.**

Per a obtenir l'espectre de fluorescència de l'AL12 i el seus mutants s'ha utilitzat el fluorímetre Varian Cary Eclipse, tal i com es va fer per l'scFv-h3D6 (Capítol 1). La concentració experimental de proteïna ha estat de 20  $\mu\text{M}$  (0.24 mg/mL), disposada en una cubeta de quars d'1 mL. La longitud d'ona d'excitació ha estat de 290 nm, enregistrant l'espectre d'emissió de 310 a 410 nm, prenent 5 acumulacions a una velocitat de 600 nm/min, amb una obertura d'emissió i d'excitació de 5 nm, i una resolució de 1 nm. A diferència de l'espectre del plegament natiu de l'scFv-heD6, que va ser adquirit a 25 °C; per l'AL12 i mutants l'adquisició ha estat a 4 °C. També s'ha registrat l'espectre de l'estat desplegat (a 90 °C) i, tornant a la temperatura inicial, s'ha determinat si la desnaturalització tèrmica de la proteïna és reversible o no. El màxim de fluorescència de l'estat natiu s'ha utilitzat posteriorment per les desnaturalitzacions tèrmiques i químiques.

### **3.5.3. Desnaturalització tèrmica per fluorescència i CD.**

La desnaturalització tèrmica s'ha seguit per espectroscòpia de CD al UV-llunyà i per fluorescència dels residus de triptòfan (fluorímetre Varian Cary Eclipse), a una concentració d'AL-12 de 20  $\mu\text{M}$ , disposada en una cubeta de quars d'1 mL. Els experiments s'han registrat des de 4 °C a 90 °C, a una velocitat de 1 °C/min, seguint la el·lipticitat a 218 nm, i la fluorescència del triptòfan a 338 nm (longitud d'ona d'excitació a 290 nm, i una obertura de les finestres d'excitació i d'emissió de 5 nm). Durant la desnaturalització, per CD i fluorescència, es van enregistrar els espectres a 25 °C, 90 °C i, tornant a refredar la mostra a 25 °C.

### **3.5.4. Desnaturalització química per fluorescència.**

Per a la desnaturalització química d'AL12 i els seus mutants, s'han preparat concentracions creixents d'urea en tampó Tris/HCl 10mM, pH 7.4 (de 0 a 6 M, cada 0.15 M). A cada un dels punts s'hi ha afegit 100  $\mu\text{l}$  de proteïna a 22  $\mu\text{M}$ , obtenint una concentració final de 2  $\mu\text{M}$  en un volum de 1.1 mL. Un cop les mescles han estat equilibrades a 4°C durant unes 15 h, s'ha enregistrarat l'espectre d'emissió de fluorescència, de 310 a 410 nm, de cada una de les mostres. Els paràmetres de lectura han estat els mateixos que els descrits a l'apartat 3.6, augmentant la resolució a 0.3 nm.

#### **3.5.4.1. Obtenció dels paràmetres termodinàmics.**

Per a determinar el màxim d'emissió a cada concentració d'urea, s'ha fet un ajust polinòmic de tres paràmetres utilitzant el programa OriginLab. Els màxims obtinguts s'han



representat en funció de la concentració d'urea a cada mostra; la concentració final d'urea ha estat verificada mitjançant un refractòmetre manual. Els paràmetres d'equilibri de desnaturalització s'han calculat, per a cada concentració d'urea, segons l'equació de dos estats següent:

$$f = F_n + F_u \cdot k / (1 + k)$$

$$\text{on, } F_n = a + (b \cdot x); F_u = c + (d \cdot x); k = e^{(\Delta G / RT)}; \Delta G = G - m \cdot x$$

i on la dependència de la fluorescència intrínseca a l'estat natiu ( $F_n$ ) i al desplegat ( $F_u$ ), sobre l'augment de la concentració de desnaturalitzant ( $x$ ), és tinguda en compte en termes de  $b \cdot x$  i  $d \cdot x$ , respectivament (aproximació lineal). D'aquesta manera, s'han obtingut els valors de  $[D]_{50\%}$  (concentració de desnaturalitzant en la qual el 50 % de la proteïna es troba desplegada), de  $\Delta G_{N-U}$  (energia lliure de plegament), i el valor de  $m_{N-U}$  (diferència en l'accessibilitat al solvent entre l'estat natiu i el desplegat).

### 3.6. Estudi d'agregació de l'AL12 i mutants per FTIR.

Per a l'estudi d'agregació de domini AL12 i els seus mutants, les mostres han estat dialitzades enfront Tris/HCl 10 mM-D<sub>2</sub>O, pD 7.4, a una concentració de 200  $\mu$ M (2.4 mg/mL). S'han obtingut els espectres d'infraroig a 4, 40, 50, 55 i 60 °C, temperatures extrems a partir de les corbes de desnaturalització tèrmica. Per a l'obtenció dels espectres s'ha emprat l'espectròmetre Varian Resolutions Pro, registrant l'espectre de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , a una velocitat de 95  $\text{cm}^{-1}/\text{min}$ , una resolució de 2  $\text{cm}^{-1}$ , i fent la mitjana de 1000 acumulacions. L'espectre va ser corregit contra el soroll de fons (o *background*), i restant el senyal del tampó i del vapor.

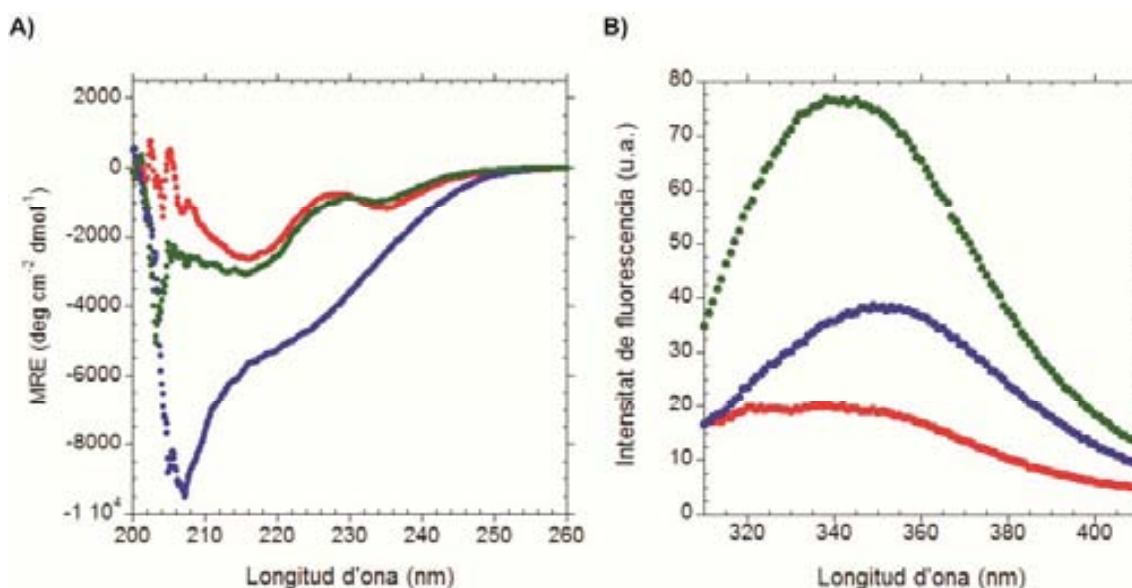
El tractament de dades i la deconvolució de la banda d'amida I' s'ha realitzat usant el software GRAMS (Thermoscientific). La deconvolució, sobre una corba Lorentziana, s'ha obtingut usant una amplada de banda de 17 i un factor K de 2.2, en apodització de tipus *Bessel*. Els ajustos de les bandes sobre l'espectre deconvolucionat s'han realitzat sobre una corba Gaussiana. Les dades finals, s'han expressat en tant per cent d'estructura secundària.



## 4. RESULTATS.

### 4.1. Estructura secundària de l'AL-12.

L'espectre de CD al UV-llunyà del domini AL-12 natiu, a 4 °C, mostra un mínim a 216 nm i un màxim a 200 nm, que correspon a l'estructura secundària en fulla- $\beta$  típica del plegament d'Igs (Figura 3. 2-A). A més, conté un segon mínim, a 235 nm, degut a la contribució a l'espectre dels residus aromàtics de la proteïna (Sreerama, Venyaminov & Woody 1999). A 90 °C es perd el mínim a 235 nm, mentre que el senyal del mínim a 216 nm augmenta, adoptant l'espectre típic de fulla- $\beta$  canònica. Que a l'espectre també aparegui el mínim a 208 nm, fa entendre que part de l'estructura es troba en *random-coil*, tal i com ha estat descrit per a altres dominis  $V_L$  (McLaughlin et al. 2006). Aquest resultat indica que es manté certa estructura secundària a l'estat desnaturalitzat. L'espectre de renaturalització obtingut al retornar a 4 °C, indica que el desplegament parcial de l'estructura secundària per temperatura de l'AL-12 és reversible pràcticament al 100 %, tal com s'ha reportat prèviament per a la proteïna germinal  $\kappa I$  O18/O8 i altres dominis  $V_L$  amiloidogènics (Baden et al. 2008b).



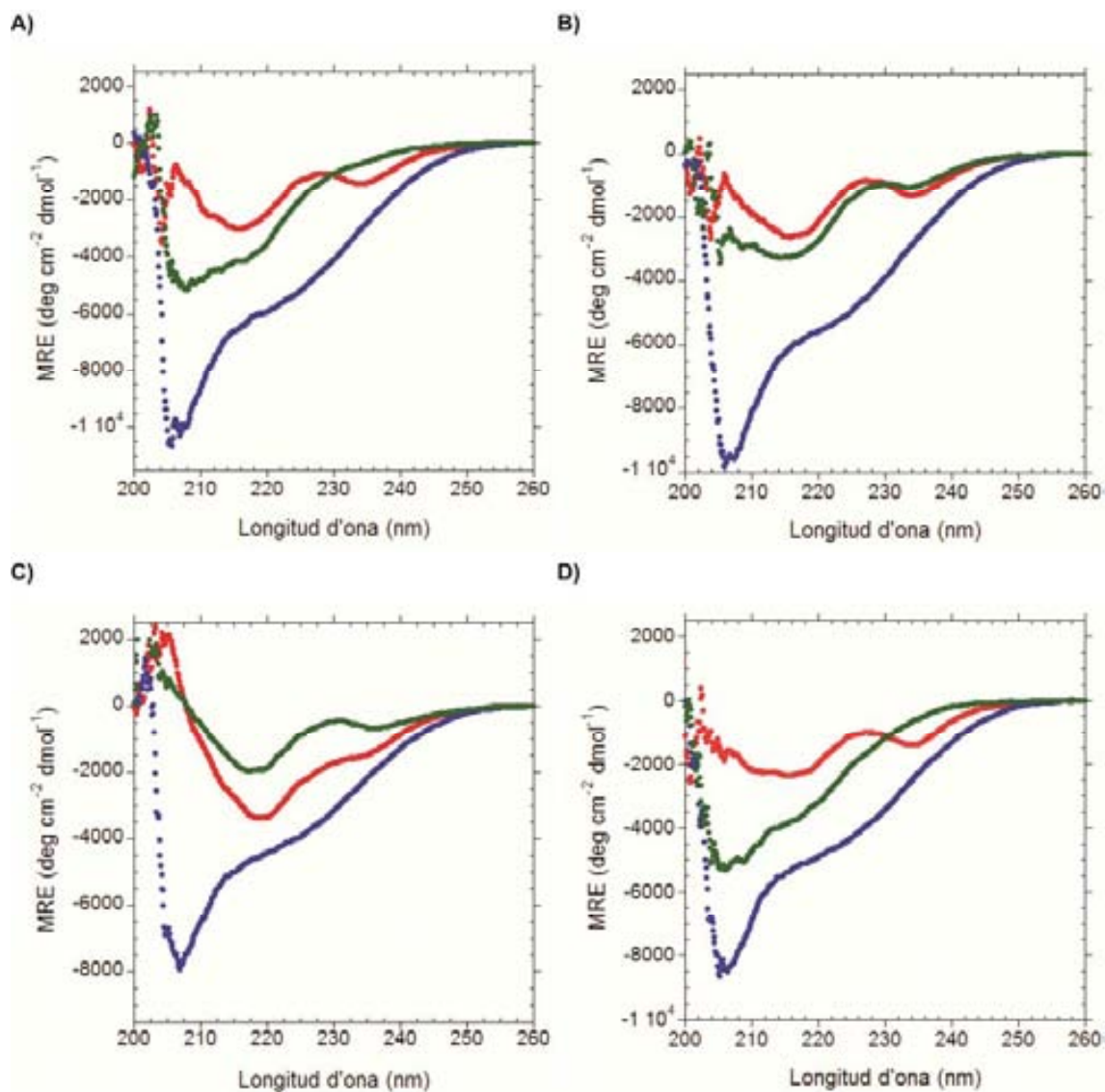
**Figura 3. 2. Estructura secundària i exposició del W35 de l'AL-12 a diferents temperatures.** A) Espectre de CD al UV-llunyà. L'espectre a 4 °C (vermell) mostra dos mínims d'el·lipticitat (216 nm i 237 nm), i un màxim a 200 nm. Als 90 °C (blau) es perd el mínim a 237 nm i apareix un mínim a 208 nm, indicant part d'estructura en fulla- $\beta$  canònica i part en *random-coil*. L'espectre de renaturalització (verd) indica que el desplegament parcial de l'estructura secundària és reversible. B) Espectre de fluorescència del residu W35. A 4 °C (vermell) el màxim d'emissió del triptòfan natiu es localitza a 340 nm, mentre que a 90 °C (blau) es desplaça cap a 355 nm, indicant que el W35 es troba completament exposat al solvent i, per tant, que l'estructura terciària nativa s'ha perdut. L'espectre de renaturalització (verd) indica que el desplegament del domini és irreversible.

Per fluorescència de l'únic residu de triptòfan de la seqüència de l'AL-12 ( $\beta$ C-Trp35), s'han registrats els canvis a nivell d'estructura terciària sota pertorbació tèrmica. El fet que tan sols hi hagi un triptòfan, permet tenir en compte tant els canvis d'intensitat de fluorescència com el desplaçament del màxim d'emissió. El màxim d'emissió de fluorescència de l'estat natiu (4 °C) es localitza 340 nm (Figura 3.2-B) i, a 90 °C, aquest es desplaça cap al vermell, fins situar-se a 355 nm, indicant una completa exposició al solvent del residu Trp35 (Vivian, Callis 2001). Pel que fa a la renaturalització del domini al retornar a 4 °C, el senyal recupera el màxim d'emissió a 340 nm però la intensitat és molt més alta, més inclús que la de l'estat desnaturalitzat a 90 °C. Per tant, mentre que l'estructura secundària sembla reversible, l'estructura terciària de l'AL-12 no retorna a l'estat natiu.

#### **4.1.1. Estructura secundària dels mutants restauratius.**

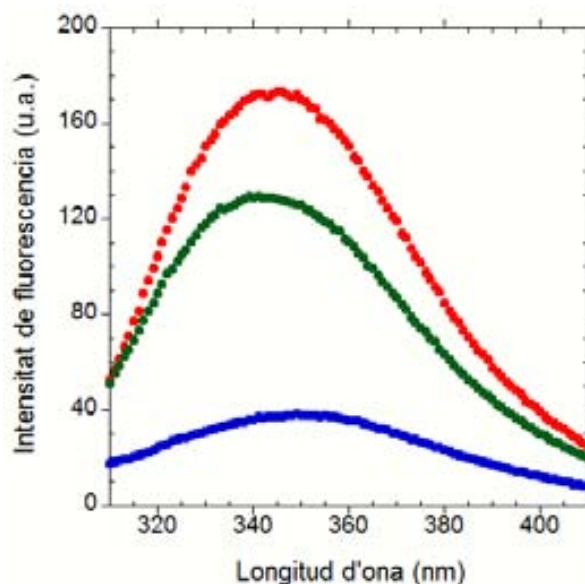
De la mateixa manera que l'AL-12, s'ha analitzat per CD i fluorescència, l'estructura secundària i terciària dels mutants restauratius H32Y, R65S, H70D i Q96Y.

Els mutants H32Y, R65S i H70D mostren un espectre de CD molt semblant a l'AL-12, tant a 4 °C com a 90 °C. Concretament, el mutant R65S guanya en estructura secundària (mínim a 216 nm), mentre que el mutant H70D manté la mateixa senyal que l'AL-12 (Figura 3. 3-A, B). Pel que fa al mutant H32Y, sembla que perd senyal de fulla- $\beta$  nativa (mínim a 216 nm), però encara manté el plegament d'Igs (Figura 3. 3-D). En canvi, el mutant Q96Y perd el mínim a 237 nm indicant que a la conformació nativa el Trp35 està col·locat de manera diferent a la resta de mutants, a més de que es desplaça el mínim de 216 nm cap a 218 nm (Figura 3. 3-C). Pel que fa a la reversibilitat a nivell d'estructura secundària, el mutant H70D recupera pràcticament el plegament natiu, mentre que el Q96Y ho fa però amb menor intensitat de senyal, i els mutants R65S i H32Y són irreversibles, mantenint l'espectre de l'estat desnaturalitzat amb un senyal inferior.



**Figura 3. 3. Estructura secundària dels mutants restauratius d'AL-12. Tots quatre mutants mantenen l'estructura secundària típica d'Igs.** A) Mutant R65S. B) Mutant H70D. C) Mutant Q96Y. D) Mutant H32Y. Vermell: estat natiu a 4 °C, blau: estat desnaturalitzat a 90 °C, verd: estat renaturalitzat al retornar a 4 °C.

L'emissió de fluorescència dels mutants H32Y, H70D i R65S es comporta de la mateixa manera que a l'AL-12 (dades no mostrades), amb el desplaçament del màxim d'emissió de 340 a 355 nm, degut a l'exposició al solvent del residu triptòfan, i l'augment de la intensitat. Tal i com s'ha observat per CD, l'estat natiu del mutant Q96Y descriu un espectre de fluorescència diferent al WT i la resta de variants. A 4 °C ja presenta una elevada intensitat de senyal, major inclús que l'espectre renaturalitzat, i el màxim d'emissió és troba desplaçat cap al vermell, dada explica la posició alterada i més exposada del residu Trp35 del mutant Q96Y respecte al de l'AL-12 i la resta de mutants (Figura 3. 4). Cap dels mutants tampoc recupera l'estructura terciària nativa al replegar a 4 °C.

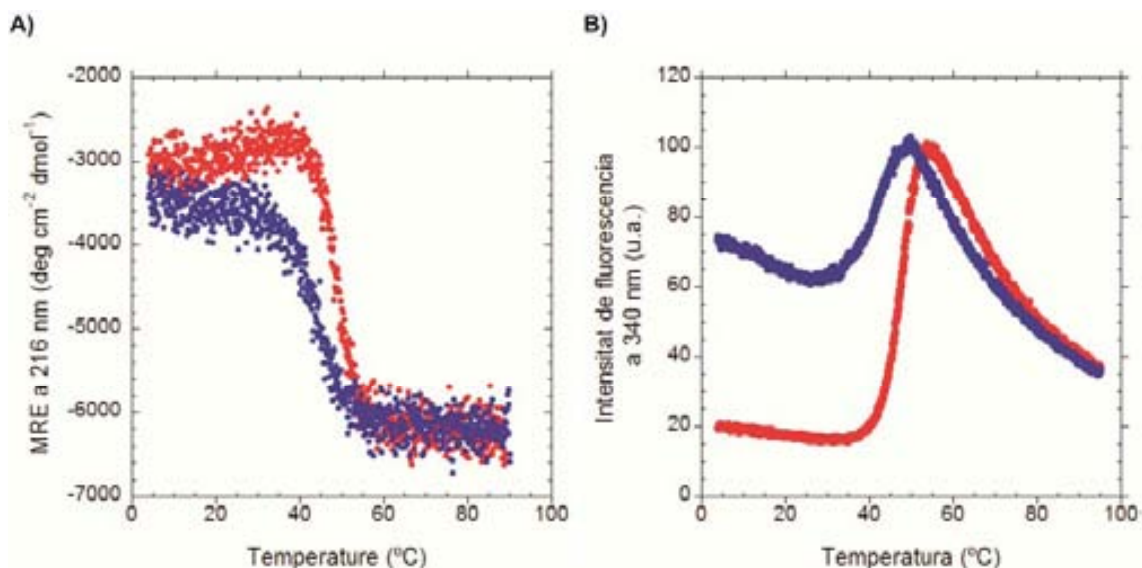


**Figura 3. 4. Espectre de fluorescència del residu Trp35 del mutant Q96Y.** A 4 °C (vermell) el màxim d'emissió del triptòfan es troba desplaçat cap al vermell respecte el màxim típic del estat natiu, a 340nm, i la intensitat de fluorescència és major que l'AL-12 i la resta de mutants, indicant que el residu Trp35 inicialment ja té un cert grau d'exposició. A 90 °C (blau) el màxim s'acaba de desplaçar fins els 355 nm, indicant que el Trp35 es troba completament exposat al solvent i, per tant, que l'estructura terciària nativa s'ha perdut. L'espectre de renaturalització (verd) indica que el desplegament del domini és irreversible, i per seua la menor intensitat, diferent a l'estat natiu.

#### 4.2. Desnaturalització tèrmica de l'AL-12.

Per tal d'aprofundir en la transició conformacional induïda per temperatura de l'AL-12, s'ha monitoritzat la desnaturalització tèrmica per CD i fluorescència. L'el·lipticitat en el mínim a 216 nm comença a decreixer a partir dels 40 °C, on el plegament guanya contingut en fulla- $\beta$  (figura 3. 5-A), i el senyal s'estabilitza en arribar als 55 °C. Tal i com s'ha comentat més amunt, l'estat desnaturalitzat és reversible. La transició tèrmica obtinguda indica un procés d'agregació en fulla- $\beta$  de la proteïna AL-12, dada que concorda amb la corba de desnaturalització seguida per fluorescència (Figura 3. 5-B). El màxim d'emissió a 340 nm, augmenta el seu senyal a partir dels 40 °C, la mateixa que per CD, arribant al màxim d'emissió als 55 °C, i partir d'aquí el senyal decreix, sense arribar a la mateixa que l'estat natiu.

L'increment de la fluorescència per temperatura, indica una transició conformacional a nivell d'estructura terciària, on sembla que el plegament globular de la molècula perd part del seu empaquetament natiu per assolir un estat intermediari, a 55 °C, que serà precursor de l'agregació en fulla- $\beta$  ordenada o amiloide.



**Figura 3. 5. Desnaturalització tèrmica AL-12.** A) Per CD s'ha seguit el canvi d'el·lipticitat del mínim a 216 nm (vermell), el qual, a partir de 40 °C comença una transició conformacional guanyant en estructura- $\beta$ , el senyal s'estabilitza als 60 °C. La senyal de renaturalització (blau) mostra la reversibilitat de l'estructura secundària. B) Per fluorescència del residu Trp35, s'ha seguit l'evolució del màxim a 340 nm (vermell), el qual passa per una transició conformacional als 55 °C. L'estructura terciària no recupera el senyal del estat natiu al renaturalitzar (blau).

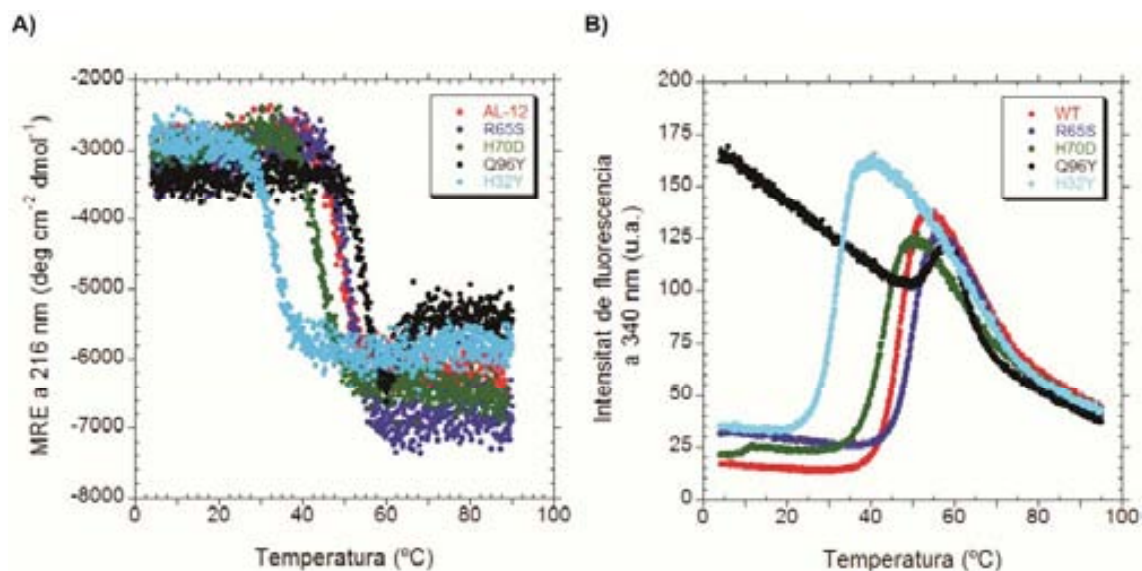
#### 4.2.1. Desnaturalització tèrmica dels mutants restauratius.

Al comparar el comportament de l'AL-12 amb els seus mutants restauratius, veiem que tots ells guanyen senyal d'el·lipticitat a 216 nm al augmentar la temperatura, seguint el mateix patró d'agregació, enlloc de desplegament, que l'AL-12 (Figura 3. 6-A).

Els mutants R65S i Q96Y, inicien la transició conformacional més tard que l'AL-12, als 45 i 47 °C, respectivament. Pel que fa als mutants H70D i H32Y, inicien la reestructuració de la fulla- $\beta$  nativa a partir dels 38 i 25 °C, indicant que ambdues mutacions han desestabilitzat el plegament natiu, sobretot pel que fa a l'H32Y, que varia fins a 15 °C respecte el WT, i que el seu espectre de CD a 4 °C ja donava menys senyal inicial (Figura 3. 3-D).

La particularitat del plegament natiu del mutant Q96Y fa difícil la seva comparació directe amb el WT, ja que inicialment presenta una estructura secundària i terciària alterada (Figura 3. 3-C i 3. 4). De la mateixa manera, la desnaturalització tèrmica també mostra aquesta alteració, on la intensitat del màxim a 340 nm és molt major que a la resta de proteïnes, fet que corrobora un cert desempaquetament inicial de l'estructura globular; com també la major exposició al solvent del W35 en el espectre natiu a 4 °C (Figura 3. 4). A més, la transició que descriu per desnaturalització tèrmica mostra un punt d'inflexió als 60 °C, i que ve seguit per una pèrdua de senyal de la nova estructura- $\beta$  adquirida, que

s'estabilitza a partir dels 70 °C. Això podria explicar-se com que el mutant Q96Y parteix d'un estat de plegament diferent a la resta, que directament comença a agregar sense patir una obertura de la molècula, però a continuació també reorganitza per donar lloc a l'agregat final, passant per un estat intermediari als 60 °C.



**Figura 3. 6. Desnaturalització tèrmica dels mutants restauratius d'AL-12.** A) Desnaturalització tèrmica seguida per CD, seguint els canvis d'el·lipticitat del mínim a 216 nm. B) Desnaturalització tèrmica seguida per el canvi de intensitat de fluorescència a 340 nm.

Pel que fa a la transició seguida per fluorescència, tots els mutants despleguen abans d'agregar, excepte el cas especial del mutant Q96Y (Figura 3. 6-B), passant per un estat intermediari precursor de l'agregació. En consonància amb el CD, el mutant R65S assoleix l'estat intermediari més tard que el WT (58 °C pel mutant i 55 °C per l'AL-12), per tant tindria menys tendència a l'agregació; mentre que l'H70D i el H32Y formen l'intermediari més aviat, a 50 i 40 °C, respectivament, corroborant la desestabilització del seu plegament. L'H32Y, a part d'agregar molt més ràpid que la resta de mutants, mostra una transició molt poc cooperativa, tal com indica l'amplada del senyal de la transició conformacional per fluorescència.



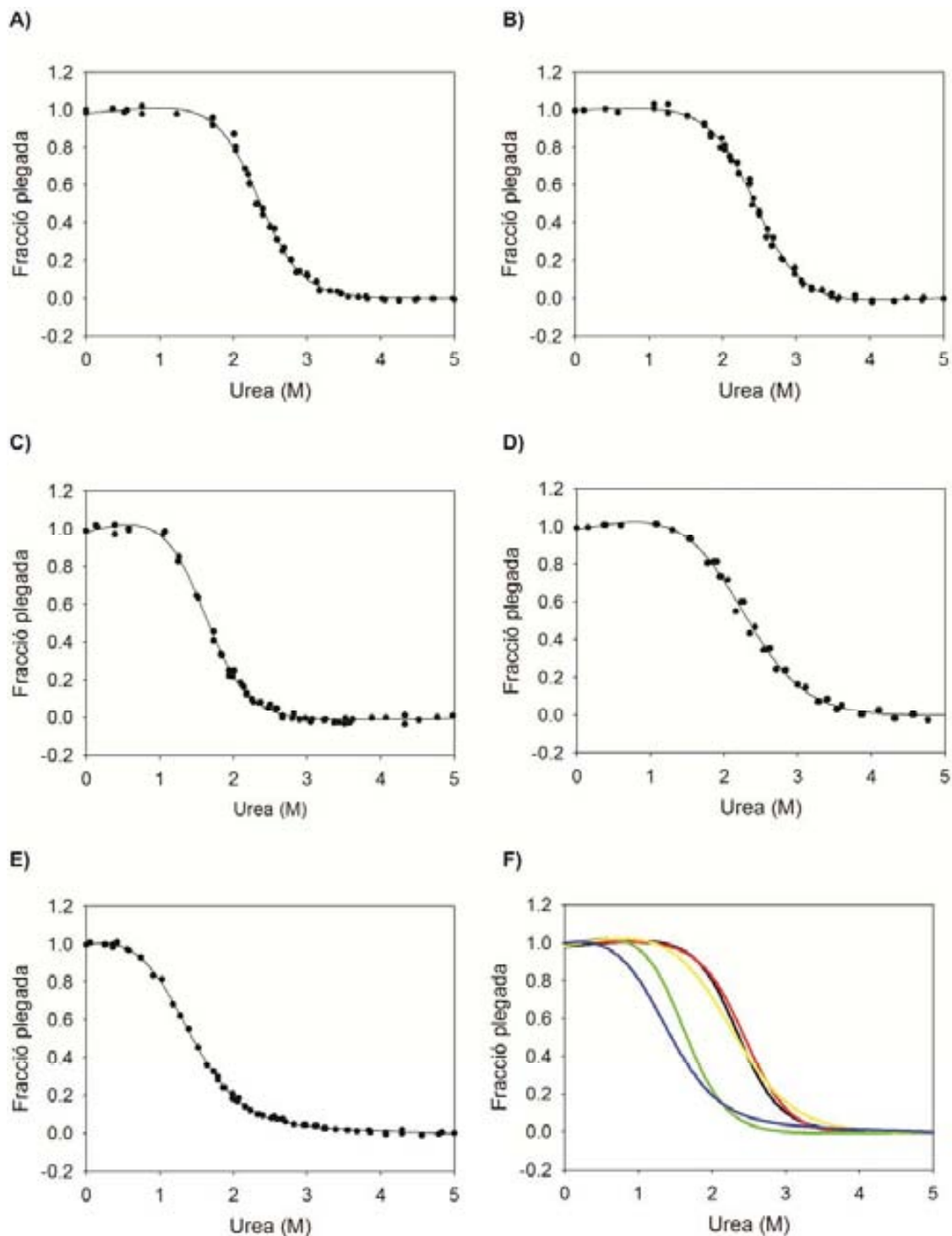
### 4.3. Estabilitat termodinàmica de l'AL-12.

Així com la desnaturalització tèrmica dels diferents dominis variables de l'AL12 mostra un procés d'agregació passant per un estat intermediari, la desnaturalització química, mitjançant urea, dóna lloc a una corba de desplegament del estat natiu seguint un procés de dos estats, sense poblar cap intermediari a la via de plegament (Figura 3. 7-A), i que és reversible per a tots els mutants (dada no mostrada). A 3 M d'urea l'AL-12 assoleix un estat de *plateau* als 355 nm, associat al desplegament de la proteïna on el Trp35 es troba totalment exposat al solvent, i que indica que la estructura terciària del domini és perd completament en aquesta concentració d'urea. La desnaturalització química, ha permès determinar els paràmetres termodinàmics del procés de plegament de l'AL-12 a partir de la corba de desplaçament del màxim d'emissió a diferents concentracions d'urea. L'ajust de la corba d'urea sobre l'equació de dos estats es troba representat a la taula 3. 3. L'energia lliure de plegament en aigua ( $\Delta G_{N-U}$ ) del domini AL-12 és de  $-18.50 \pm 0.84$  KJ·mol<sup>-1</sup>. El valor de  $m_{N-U}$ , el qual reflexa la diferència d'accessibilitat al solvent entre l'estat natiu i el desplegat, és de  $7.95 \pm 0.33$  KJ·mol<sup>-1</sup>·M<sup>-1</sup>. La concentració d'urea en la qual el 50 % del domini es troba desplegat,  $[D]_{50\%}$ , és de 2.33 M.

Ha estat descrit prèviament, que la proteïna germinal κI O18/O8, menys amiloidogènica que la AL-12, té un valor de  $\Delta G_{N-U}$  de  $-25.60 \pm 0.23$  KJ·mol<sup>-1</sup>, i una  $[D]_{50\%}$  de 3.98 M (el valor de  $m_{N-U}$  no ha estat detallat) (Baden et al. 2008b). Per tant, l'AL-12 mostra una desestabilització significativa del seu estat natiu, possiblement degut a les 7 mutacions no-conservatives que conté la seqüència germinal, i que algunes d'elles podrien estar relacionades amb la major capacitat amiloidogènica de la proteïna, tot i que no alteren la interfície dimèrica del dímer V<sub>L</sub>.

**Taula 3. 3. Ajust, sobre un model d'equilibri de dos estats, de la corba de desnaturalització química de l'AL-12 i els seus mutants restauratius.** N = estat natiu, U = estat desplegat. \*Dades prèviament reportades per Baden, E.M. (2008).

Proteïna	$\Delta G_{N-U}$ (KJ·mol <sup>-1</sup> )	$m_{N-U}$ (KJ·mol <sup>-1</sup> ·M <sup>-1</sup> )	$[D]_{50\%}$ (M)
AL-12	$-18.50 \pm 0.84$	$7.95 \pm 0.33$	2.33
R65S	$-17.99 \pm 0.91$	$7.37 \pm 0.35$	2.44
H70D	$-12.37 \pm 0.70$	$7.83 \pm 0.34$	1.58
Q96Y	$-11.69 \pm 0.85$	$5.33 \pm 0.33$	2.19
H32Y	$-7.86 \pm 0.36$	$6.19 \pm 0.16$	1.27
κI O18/O8*	$-25.60 \pm 0.23$	-	$3.98 \pm 0.07$



**Figura 3. 7. Desnaturalització química per urea de l'AL-12 i els seus mutants restauratius.** El màxim de fluorescència del residu Trp35 (340nm) és representat en funció de la concentració d'urea, i tenint en compte la fracció de proteïna plegada. L'ajust sobre un model de dos estats es troba representat per una línia a cada gràfica. A) AL-12, B) R65S, C) H70D, D) Q96Y, E) H32Y, F) Comparació dels diferents ajustos obtinguts per AL-12 (negre), R65S (vermell), H70D (verd), Q96Y (groc) i H32Y (blau).

#### **4.3.1. Estabilitat termodinàmica dels mutants restauratius.**

Pel que fa a l'estabilitat del diferents mutants restauratius, el resultat més notable és la restauració del residu arginina cap a serina R65S (Figura 3. 7-B, F/Taula 3. 3). Amb aquesta mutació simple, l'AL-12 augmenta una mica el valor de  $[D]_{50\%}$  (0.11 M); tot i que el valor de  $\Delta G_{N-U}$  és poc més baix que l'AL-12 (0.5 KJ·mol<sup>-1</sup>).

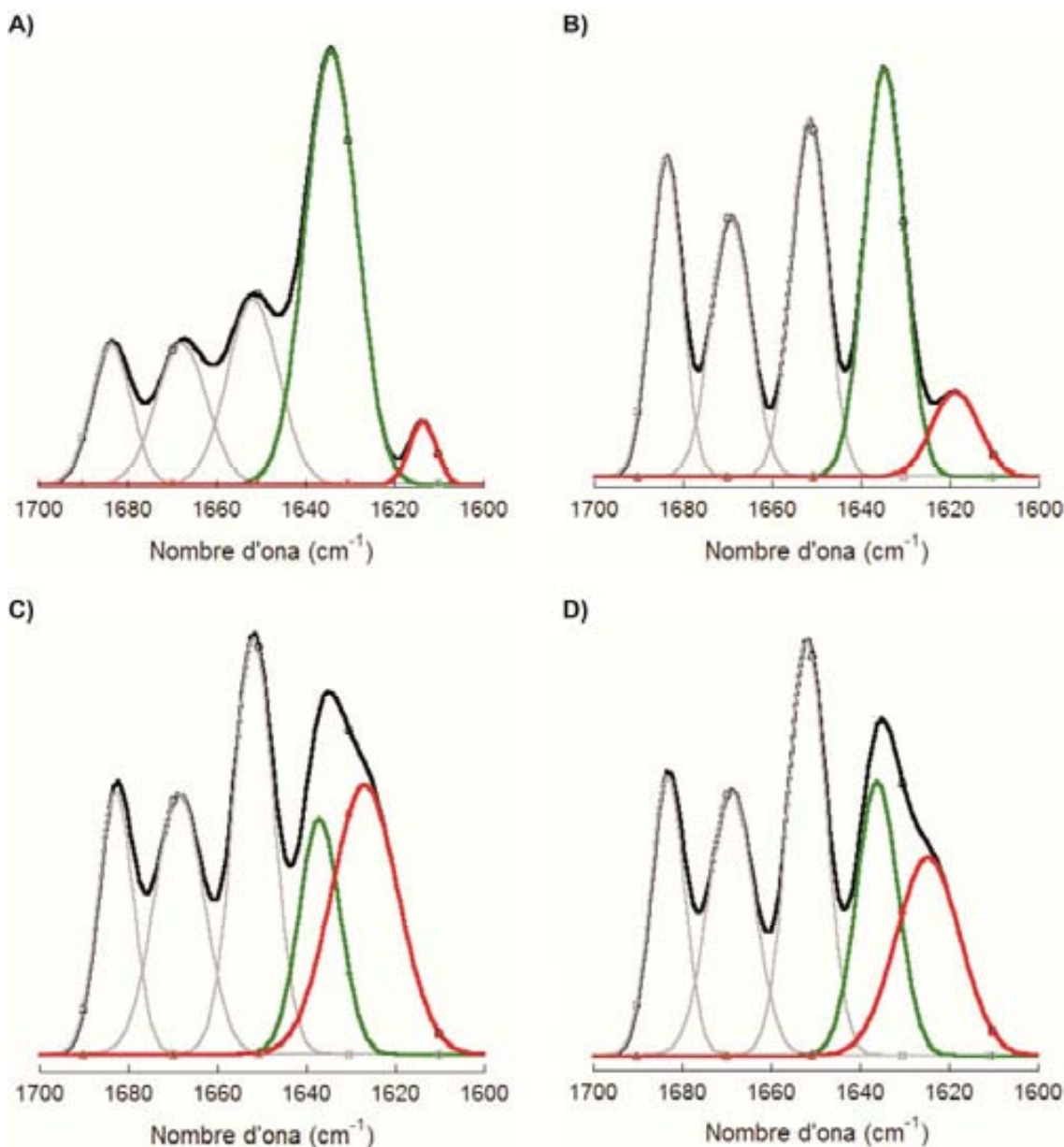
Tal i com ja s'ha vist per desnaturalització tèrmica (Figura 3. 6), els dos mutants de residu histidina ( $\beta$ C-H32 i  $\beta$ D-H70) desestabilitzen la molècula. L'H32Y (Figura 3. 7-E, F/Taula 3. 3) desestabilitza totalment la molècula ( $\Delta G_{N-U} = -7.86 \pm 0.36$  KJ·mol<sup>-1</sup>), fet que indica que aquest residu juga un paper important en el plegament i compactació del domini. Com també afecta a la solubilitat de la molècula, ja que és l'únic mutant que s'ha purificat de la fracció citosòlica insoluble. L'H70D (Figura 3. 7-C, F/Taula 3. 3), en menor mesura, també disminueix el valor de  $\Delta G_{N-U}$  (-12.37  $\pm$  0.70 KJ·mol<sup>-1</sup>). En consonància, ambdós mutants són els que presenten uns valors de  $[D]_{50\%}$  més baixos (1.58 i 1.27 M, respectivament).

Pel que fa al mutant Q96Y (Figura 3. 7-D, F/Taula 3. 3), i el seu comportament particular, obté un valor de  $\Delta G_{N-U}$  de -11.69  $\pm$  0.85 KJ·mol<sup>-1</sup>; que el seu valor de  $m_{N-U}$  sigui el més baix de tots els mutants, 5.33  $\pm$  0.33 KJ·mol<sup>-1</sup>·M<sup>-1</sup>, indica que ja l'estat natiu no adopta un plegament compacte, deixant exposades al solvent certes regions que haurien de trobar-se enterrades. Aquest fet explica la corba de desnaturalització tèrmica seguida per fluorescència, on directament comença a agregar sense necessitat de desplegar la molècula.

#### **4.4. Estudi de l'agregació de l'AL-12 per FTIR.**

La tècnica de FTIR és la més adequada per estudiar els canvis conformationals que pateix l'estructura secundària en fulla- $\beta$  durant el procés d'agregació, ja que la deconvolució del espectre de la banda d'amida I' diferencia entre diferents tipus d'estructura- $\beta$ , ja sigui nativa, amiloide, o del tipus WL (Zandomeneghi et al. 2004).

Per al domini AL-12, s'ha enregistrat l'espectre de FTIR a diferents temperatures., La deconvolució de l'espectre de FTIR a la regió de l'amida I' es troba representada a la figura 3. 8-A-C, i detallada a la taula 3. 4. La deconvolució de l'amida I' a 4 °C, genera quatre bandes principals, centrades a 1684, 1668, 1652, i 1634 cm<sup>-1</sup> (Figura 3. 8-A/Taula 3. 4).



**Figura 3. 8. Deconvolució de l'espectre de FTIR de la regió amida I' de l'AL-12 a diferents temperatures.** A) 4 °C, B) 40 °C, C) 55 °C, i D) 60 °C. La banda verda indica la component a 1634  $\text{cm}^{-1}$ , que correspon a la fulla- $\beta$  nativa antiparal·lela de baixa freqüència. En vermell, la banda propera als 1620  $\text{cm}^{-1}$ , associada als agregats- $\beta$  (WL/Amiloide).

Les dues components en fulla- $\beta$  antiparal·lela nativa, la d'alta i baixa freqüència, es corresponen amb les bandes a 1684 i 1634  $\text{cm}^{-1}$  respectivament, sent la segona la major banda del espectre natiu (48 %), en consonància amb el plegament barril- $\beta$  dels dominis d'Igs i amb les dades obtingudes prèviament per cristal·lografia de raigs-X (codi PDB 3DVF) (Randles et al. 2009). La component en *loops/girs*- $\beta$  es localitza a la banda de 1668  $\text{cm}^{-1}$  (Byler, Susi 1986, Walther et al. 2010). Inesperadament, la banda corresponent a la

fracció en hèlix- $\alpha$ , situada a 1652  $\text{cm}^{-1}$ , representa el 21 % del espectre de FTIR, quan el domini AL-12 tan sols conté un 2 % d'hèlix- $\alpha$  segons les dades del cristall.

Al escalfar la mostra durant 3 min a 40 °C (Figura 3. 8-B/Taula 3. 4), la temperatura on s'inicia la transició conformacional, disminueix la fracció de fulla- $\beta$  nativa (1634  $\text{cm}^{-1}$ ) a favor de l'increment de les bandes a 1684, 1668 i 1652  $\text{cm}^{-1}$ , corresponents a fulla- $\beta$  nativa antiparal·lela, *loop/girs*- $\beta$ , i hèlix- $\alpha$ . I apareix la banda d'agregats- $\beta$  (8 %), que es fa difícil de diferenciar entre amiloide i WL ja que les bandes es troben al límit de tots dos components (1619-1620  $\text{cm}^{-1}$ ). Als 55 °C, on es pobla l'intermediari tèrmic, segueix disminuint la banda de fulla- $\beta$  nativa, de 1634  $\text{cm}^{-1}$ , fins al 15 %, i creix la banda d'agregats- $\beta$  fins al 27 % del total del espectre, i que correspon als agregats- $\beta$  de tipus WL (1627  $\text{cm}^{-1}$ ). La banda d'hèlix- $\alpha$  passa a ser un 25 % del espectre i és manté (Figura 3. 8-C/Taula 3. 4). Als 60 °C, la banda WL s'estabilitza sent el 21 % del total del espectre, i es recupera part de la fracció de fulla- $\beta$  que puja fins el 19 % (Figura 3. 8-D/Taula 3. 4).

**Taula 3. 4. Deconvolució de l'espectre de FTIR de la regió amida I' de l'AL-12 i mutants restauratius a diferents temperatures.**

<b>4 °C</b>	<b>AL-12</b>		<b>R65S</b>		<b>H70D</b>		<b>Q96Y</b>		<b>H32Y</b>	
<b>Estructura secundària</b>	<b>Centre (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Àrea (%)</b>	<b>Centre (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Àrea (%)</b>	<b>Centre (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Àrea (%)</b>	<b>Centre (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Àrea (%)</b>	<b>Centre (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Àrea (%)</b>
Fulla-β antiparal·lela d'alta freqüència	1684	12	1684	12	1684	20	1685	19	1684	18
Loops/girs-β	1668	15	1668	18	1669	19	1669	18	1669	19
Hèlix-α	1652	21	1652	18	1652	23	1652	25	1652	24
Fulla-β antiparal·lela de baixa freqüència	1634	48	1635	43	1635	28	1636	24	1636	28
WL	-	-	-	-	-	-	-	-	1621	12
Amiloide	1614	4	1614	10	1619	9	1619	14	-	-
<b>40 °C</b>	<b>AL-12</b>		<b>R65S</b>		<b>H70D</b>		<b>Q96Y</b>		<b>H32Y</b>	
<b>Estructura secundària</b>	<b>Centre (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Àrea (%)</b>	<b>Centre (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Àrea (%)</b>	<b>Centre (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Àrea (%)</b>	<b>Centre (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Àrea (%)</b>	<b>Centre (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Àrea (%)</b>
Fulla-β antiparal·lela d'alta freqüència	1684	19	1684	16	1684	21	1684	19	1684	14
Loops/girs-β	1669	19	1669	18	1670	20	1669	19	1669	20
Hèlix-α	1652	24	1652	23	1652	25	1652	27	1652	27
Fulla-β antiparal·lela de baixa freqüència	1635	30	1635	31	1635	25	1636	26	1636	20
WL	-	-	-	-	-	-	-	-	1623	19
Amiloide	1619	8	1618	12	1619	9	1619	9	-	-
<b>55 °C</b>	<b>AL-12</b>		<b>R65S</b>		<b>H70D</b>		<b>Q96Y</b>		<b>H32Y</b>	
<b>Estructura secundària</b>	<b>Centre (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Àrea (%)</b>	<b>Centre (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Àrea (%)</b>	<b>Centre (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Àrea (%)</b>	<b>Centre (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Àrea (%)</b>	<b>Centre (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Àrea (%)</b>
Fulla-β antiparal·lela d'alta freqüència	1683	14	1684	17	1684	21	1684	21	1684	22
Loops/girs-β	1669	19	1669	20	1669	20	1670	20	1670	20
Hèlix-α	1652	25	1652	26	1652	27	1652	26	1652	26
Fulla-β antiparal·lela de baixa freqüència	1637	15	1636	18	1636	19	1636	21	1636	16
WL	1627	27	1623	19	1621	13	1621	12	1620	14
<b>60 °C</b>	<b>AL-12</b>		<b>R65S</b>		<b>H70D</b>		<b>Q96Y</b>		<b>H32Y</b>	
<b>Estructura secundària</b>	<b>Centre (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Àrea (%)</b>	<b>Centre (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Àrea (%)</b>	<b>Centre (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Àrea (%)</b>	<b>Centre (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Àrea (%)</b>	<b>Centre (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>Àrea (%)</b>
Fulla-β antiparal·lela d'alta freqüència	1683	15	1684	19	1684	20	1684	20	1684	23
Loops/girs-β	1669	20	1669	20	1669	21	1669	20	1670	20
Hèlix-α	1652	26	1652	26	1652	27	1652	27	1652	26
Fulla-β antiparal·lela de baixa freqüència	1636	19	1636	18	1636	19	1636	18	1636	16
WL	1625	21	1622	16	1621	13	1622	15	1620	14

#### 4.4.1. Estudi de l'agregació dels mutants restauratius.

Pel que fa als mutants de l'AL-12, la deconvolució de l'espectre de FTIR a la regió de l'amida I', dóna lloc a les mateixes quatre bandes principals que per l'AL-12, a 1684, 1668, 1652, i 1634  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 3. 9-A-D/Taula 3. 4). Sent la fracció de fulla- $\beta$  nativa antiparalela de baixa freqüència la majoritària en tots els casos.

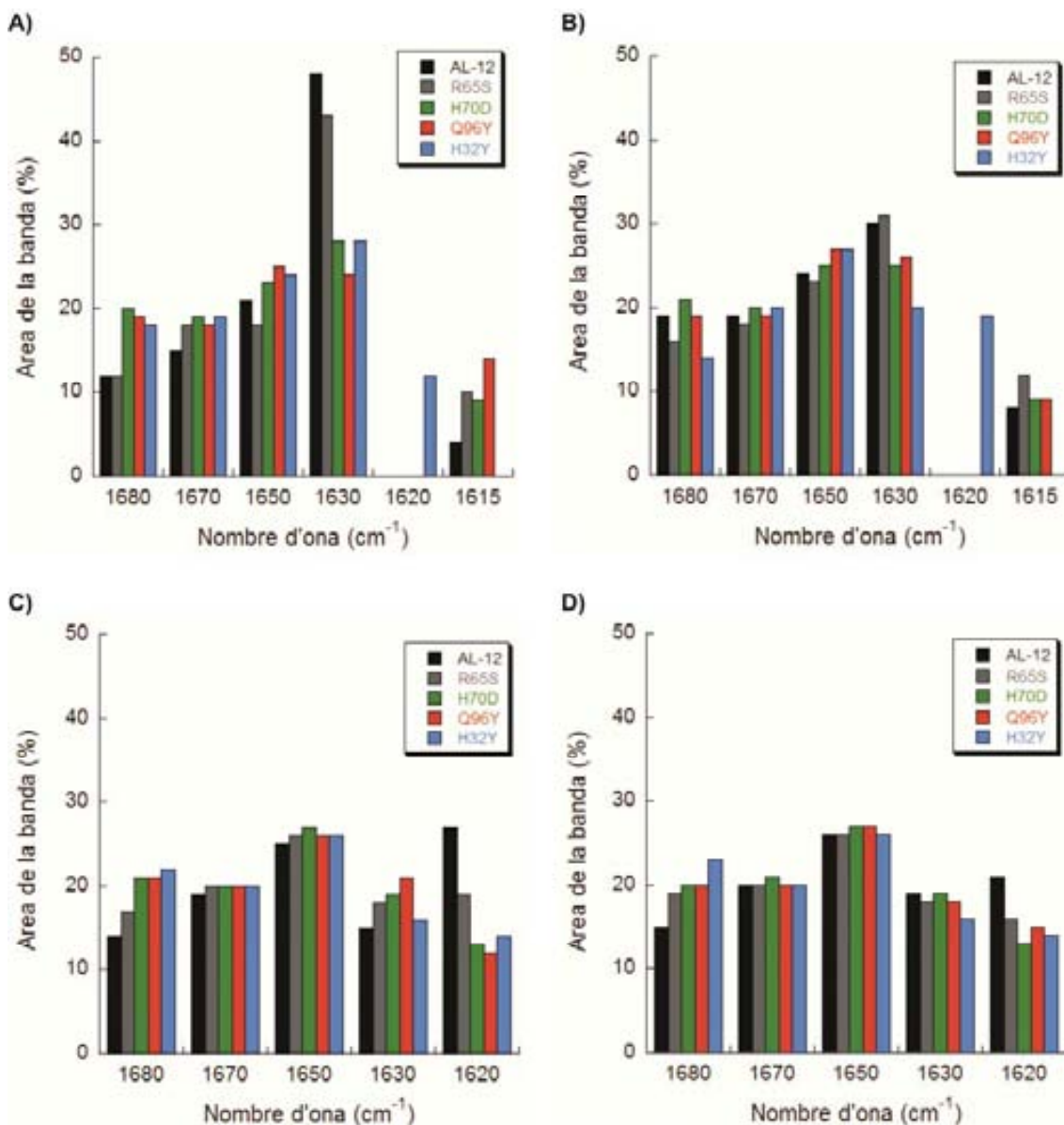


Figura 3. 9. Evolució, en funció de la temperatura, dels principals components del espectre de FTIR a la regió de l'amida I' de l'AL-12 i mutants restauratius. A) 4 °C, B) 40 °C, C) 55 °C, i D) 60 °C.

Tal i com s'ha vist en el espectre de CD (Figura 3. 3), a 4 °C, els mutants H70D, H32Y i Q96Y tenen menys % de fulla- $\beta$  inicial que l'AL-12, amb un 28 % per als dos primers, i un 24 % per al Q96Y (Figura 3. 9-A/Taula 3. 4). Mentre que l'R65S manté quasi la mateixa proporció que el WT (43 % respecte el 48 % del WT). La disminució de la banda en aquest mutant es veu compensada per un increment de la banda d'agregats- $\beta$  a 1619-1620  $\text{cm}^{-1}$ . Un cop s'inicia l'increment de temperatura, el mutant R65S és el que es comporta de manera més similar al WT. Als 40 °C (Figura 3. 9-B/Taula 3. 4), disminueix la component de fulla- $\beta$  nativa, a 1634  $\text{cm}^{-1}$ , a expenses de l'increment de les bandes a 1684, 1668 i 1652  $\text{cm}^{-1}$ , corresponents a fulla- $\beta$  nativa antiparal·lela, *loop/girs*- $\beta$ , i hèlix- $\alpha$ . La banda d'agregats- $\beta$  apareix en major percentatge (un 5 % més) que en el WT. A 40 °C, els mutants H70D i Q96Y no varien massa respecte els 4 °C, indicant que inicialment ja es trobaven parcialment agregats. Pel que fa a l'H32Y, a 40 °C ja ha assolit la transició conformacional que porta a l'agregació, tal i com s'ha vist per la desnaturalització tèrmica seguida per fluorescència (Figura 3. 6), i a aquesta temperatura la banda de WL final, a 1627  $\text{cm}^{-1}$ , ja es troba ben definida, a expenses de la disminució de fulla- $\beta$  nativa (1687 i 1634  $\text{cm}^{-1}$ ), mentre que el WT no ho fa fins els 55 °C (Figura 3. 9-C/Taula 3. 4). En canvi, els mutants R65S, H70D i Q96Y, augmenten progressivament la fracció d'agregats- $\beta$  amb la temperatura, fins que als 55 °C ja que es defineix com agregats del tipus WL. Finalment, als 60 °C, tots els mutants presenten una lleugera disminució de la banda de WL, a favor de la de 1687  $\text{cm}^{-1}$ , la fulla- $\beta$  d'alta freqüència (Figura 3. 9-D/Taula 3. 4).



## 5. DISCUSSIÓ.

L'AL pertany a la gran família d'amiloïdosis humanes sistèmiques. La seva complexitat molecular ve donada per l'elevada variabilitat de seqüència que presenten les cadenes LCs d'Igs. En condicions patogèniques, les cèl·lules plasmàtiques del moll de l'os secreten grans quantitats de LCs lliures en el plasma, esdevenint les precursors de la deposició amiloide en diferents teixits orgànics. Estudis comparatius de seqüència de LCs de pacients d'AL han aportat que les mutacions somàtiques no conservades són les que es troben més representades en seqüències amiloidogèniques, i sovint es troben localitzades en el domini variable ( $V_L$ ) de la cadena. El 85 % dels pacients d'AL presenten dímers de LCs en el corrent sanguini, on els dominis  $V_L$  de cada cadena LC s'associen entre ells adoptant la interfície canònica dels dímers d' $V_L$ - $V_H$  d'Ig funcionals. A més, les fibres amiloides es troben formades principalment per dominis  $V_L$  (Blancas-Mejia, Ramirez-Alvarado 2013). L'alteració de la interfície dimèrica en dominis  $V_L$  amiloidogènics, sembla tenir una forta correlació amb la deposició amiloide i el grau de severitat de la malaltia, tal i com s'ha demostrat per al domini  $V_L$  AL-09, un dels més amiloidogènics descrits fins ara, on la seva interfície dimèrica es troba rotada 90 °C respecte la germinal κI 018/08 (Baden et al. 2008a).

A diferència de l'AL-09, la proteïna AL-12, que conté set mutacions somàtiques respecte la germinal, manté la interfície canònica d'Igs, tot i això té un major potencial amiloidogènic i segueix una cinètica de formació de fibres amiloides més ràpida (Randles et al. 2009, Sikkink, Ramirez-Alvarado 2008). Per tant, les mutacions somàtiques poden tenir efectes estructurals importants o bé més subtils però, d'alguna manera o altre, tenen un efecte a la capacitat amiloidogènica de la proteïna.

### 5.1. Estructura secundària, desplegament i estabilitat del domini AL-12.

La proteïna amiloidogènica AL-12 presenta un plegament natiu típic d'Igs, amb el mínim d'el·lipticitat a 216 nm i el màxim a 200 nm. A més, presenta un segon mínim a 235 nm que s'atribueix a la contribució al espectre de CD dels residus aromàtics de la proteïna, especialment del residu conservat Trp35. Pel que fa a l'espectre de FTIR de l'estat natiu de l'AL-12, la component en fulla- $\beta$  antiparal·lela nativa de baixa freqüència (1634  $\text{cm}^{-1}$ ) representa la major banda del espectre natiu (48 %), en consonància amb el plegament barril- $\beta$  dels dominis d'Igs i amb les dades obtingudes prèviament per cristal·lografia de raigs-X (codi PDB 3DVF) (Randles et al. 2009). S'esperava que la segona banda més representativa del espectre de FTIR fos la component en *loop* i girs- $\beta$ , degut al plegament tot- $\beta$  del domini. En aquest sentit, la component en *loops*/girs- $\beta$ , localitzada a la banda de

1668  $\text{cm}^{-1}$ , representa el 15 % del total del espectre. Inesperadament, la banda corresponent a la fracció en hèlix- $\alpha$ , situada a 1652  $\text{cm}^{-1}$ , representa el 21 % del espectre de FTIR, quan el domini AL-12 tan sols conté un 2 % d'hèlix- $\alpha$  segons les dades del cristall. A més, la renaturalització tèrmica, seguida per CD i fluorescència del residu Trp35, indica que el domini és reversible a nivell d'estructura secundària mentre que la terciària no recupera l'estat natiu.

La desnaturalització química, mitjançant urea, del domini AL-12 dóna lloc al desplegament total del domini seguint un procés de dos estats, sense poblar cap intermediari de reacció. Els paràmetres termodinàmics de la proteïna mitjançant un model de dos estats, plegat i desplegat, indiquen que l'estabilitat del domini AL-12 amiloidogènic, amb un valor de  $\Delta G_{N-U}$  de  $-18.50 \pm 0.84 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ , és inferior a la de la seva proteïna germinal  $\kappa\text{I O18/O8}$  ( $-25.60 \pm 0.23 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ). A nivell de severitat de la malaltia, l'AL-12 té un potencial patològic entremig de la germinal  $\kappa\text{I O18/O8}$  i el domini AL-09, el més amiloidogènic reportat fins ara, i que té un valor de  $\Delta G_{N-U}$  de  $-14.6 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Baden et al. 2008b).

## 5.2. Via d'agregació del domini AL-12 induïda per temperatura.

En lloc del desplegament de la molècula, la desnaturalització tèrmica del domini AL-12, a 90 °C, dóna lloc a l'agregació de la proteïna, tal i com s'ha vist per CD i fluorescència del triptòfan. El guany inicial en estructura secundària implica una reorganització directa de la fulla- $\beta$  nativa, i la corba de desnaturalització seguida per fluorescència indica que el W35 s'exposa al solvent per a després enterrar-se de nou. Això concorda amb la transició conformacional a partir dels 40 °C, i l'aparició d'un estat intermediari als 55 °C, que serà el precursor de l'agregació de tipus- $\beta$ .

L'espectre de FTIR indica que a partir dels 40 °C s'inicia la reorganització conformacional, de forma que l'estat intermediari ja presenta una conformació similar a la de l'estat agregat final, el qual ha perdut gran part de la component en fulla- $\beta$  antiparal·lela nativa (19 % respecte el 48 % inicial), a 1634  $\text{cm}^{-1}$ , a favor de l'augment de la banda associada als agregats- $\beta$  de tipus WL (21 % respecte el 0 % inicial, a 1625  $\text{cm}^{-1}$ ).

A diferència de l'AL-12, la desnaturalització tèrmica d'altres dominis  $V_L$  amiloidogènics descrits prèviament, com ara l'AL-09, ha estat descrita com a una corba de desplegament en la qual s'assoleix l'estat totalment desplegat, seguint un procés de dos estats plegat-desplegat i completament reversible. Segons aquests resultats, és possible extraure els valors de  $T_m$  (temperatura en la qual el 50 % de la població es troba desplegada) i  $\Delta H_{N-U}$  a partir de l'equació de Van't Hoff, com alternativa als experiments de calorimetria (John, Weeks 2000). Degut a que les corbes de desnaturalització tèrmica de

l'AL-12 no corresponen a un procés de desplegament de dos estats, sinó d'agregació en fulla- $\beta$  ordenada, i que no acaba de ser reversible al 100%, no s'han pogut extraure els valors de  $T_m$  i  $\Delta H_{N-U}$  de l'AL-12.

### 5.3. Efecte de les mutacions restauratives sobre l'agregació i estabilitat del domini AL-12.

Les quatre mutacions restauratives de l'AL-12 caracteritzades en aquest treball (H32Y, R65S, H70D, i Q96Y) formen part de cadenes- $\beta$  de l'estructura globular. La seva caracterització, a nivell d'estructura secundària, mostra que totes elles tendeixen al plegament natiu típic d'Igs, però perden gran part de la reversibilitat observada en l'AL-12, possiblement per estabilització del intermediari d'agregació, i desviament de la via de plegament cap a la via de formació d'agregats- $\beta$  més estables. Les dues mutacions situades a la interfície dimèrica ( $\beta$ C-H32Y i  $\beta$ G-Q96Y) adopten una estructura secundària nativa relativament alterada. Concretament, la mutació H32Y perd senyal de fulla- $\beta$  nativa (mínim a 216 nm) respecte l'AL-12, mentre que la mutació Q96Y perd el senyal corresponent als residus aromàtics (mínim a 237 nm). Per tant, la restauració, en totes dues posicions, cap al residu altament conservat Tyr35 afecta el plegament natiu de la proteïna AL-12.

Pel que fa als paràmetres termodinàmics obtinguts a partir de la desnaturalització química, aquests indiquen que cap de les mutacions puntuals recuperen l'estabilitat termodinàmica de la proteïna germinal  $\kappa$ I O18/O8. Si no al contrari, totes elles han estat desestabilitzadores respecte l'AL-12.

Pel que fa a l'agregació, els dos mutants restauratius de residus d'histidina (H32Y i H70D) inicien la transició conformacional cap l'agregat- $\beta$  abans que l'AL-12. En canvi, en els mutant R65S i Q96Y l'estat intermediari apareix cap als 55 °C, pràcticament igual que a l'AL-12. Al analitzar aquestes transicions per FTIR, tots els mutants presenten inicialment menys component en fulla- $\beta$  nativa, a expenses de la presència inicial d'agregats de tipus- $\beta$ , per aquesta raó, la transició conformacional s'observa pitjor que en el cas de l'AL-12. En tots els casos però, a 60 °C, la banda de 1620  $\text{cm}^{-1}$ , és inferior a la de l'AL-12, a favor d'un augment de la banda de 1683  $\text{cm}^{-1}$ , que es correspon a la fulla- $\beta$  antiparal·lela d'alta freqüència.

Per tant, sembla a ser que en el cas de l'AL-12, la desestabilització del domini va relacionada amb una major tendència a l'agregació, tal i com s'observa a les corbes de desnaturalització tèrmica, seguides per CD i fluorescència de triptòfan. Actualment al laboratori, s'està treballant amb cinètiques de formació de fibres amiloides, assajades mitjançant l'emissió de fluorescència del fluoròfor ThT i en funció del pH, per tal de

corroborar o descartar aquesta possible relació, així com per estudiar l'efecte del pH en el procés de fibril·lació. Per altra banda, també s'està realitzant la preparació de mostres per microscòpia. Mitjançant TEM, s'espera completar els resultats del procés d'agregació obtinguts per FTIR gràcies a l'obtenció d'imatges dels agregats a diferents temperatures. També per TEM, es vol estudiar l'efecte del pH sobre la via d'agregació i la morfologia dels agregats- $\beta$  de l'AL12 i dels seus mutants restauratius.

#### 5.4. Expectatives de futur en el estudi de l'agregació de l'AL-12.

Recopilant les dades obtingudes, podem afirmar que la restauració de residus cap a la línia germinal, no implica, excepte en algun cas excepcional, com és el mutant H87Y de la AL-09 (Baden et al. 2008b), el retorn de les propietats conformacionals i termodinàmiques germinals al domini amiloidogènic. Per tant, és improbable que una única mutació sigui la causa de que un domini  $V_L$  esdevingui amiloidogènic i causi malaltia.

Cal més informació experimental per a poder descriure més detalladament l'efecte de les mutacions somàtiques de l'AL-12 en el context del seu potencial amiloidogènic. Per aquesta raó, actualment s'està treballant en les cinètiques de formació de fibres amiloides, mitjançant fluorescència de ThT i en funció del pH, així com l'obtenció d'imatges de TEM, de l'AL-12 i dels seus mutants restauratius. Aquests propers resultats han de servir per a tancar l'estudi inicial del domini variable AL-12, implicat en l'AL.

Per altra banda, resulta indispensable, de cara a un futur, obtenir les estructures cristal·logràfiques dels diferents mutants restauratius, per entendre millor quin efecte tenen aquests canvis a l'estructura i, també, a la interfície dimèrica que formen entre ells, i entendre d'aquesta manera el rol dels dímers  $V_L$  en l'AL.

Qin *et al.* afirmen que els dímers  $V_L$ - $V_L$  de la proteïna amiloidogènica SMA, estableixen l'estat natiu, disminuint la quantitat d'intermediari desplegat i, per tant, tenen un efecte protector inhibint la formació de fibres amiloides (Qin et al. 2007). En el cas de la proteïna amiloidogènica TTR, implicada en la malaltia d'amiloidosi familiar, mutacions puntuals en la seva seqüència poden causar la dissociació del tetràmer natiu donant lloc a un monòmer molt inestable i precursor amiloide (Shnyrov et al. 2000). Aquest cas ens porta a relacionar la pèrdua de l'estructura tetramèrica d'Ig, degut a un excés de LCs lliures secretades en pacients d'AL, amb la desestabilització del domini i la seva deposició amiloide. Per tant, tot apunta cap una combinació de factors desestabilitzants, iniciant per la pèrdua del tetràmer natural d'Ig i les mutacions somàtiques no conservades, que poden implicar des de petits canvis d'interacció intra i interdomini, fins a provocar grans canvis conformacionals. Depenent del grau de desestabilització, la proteïna adquirirà un

potencial amiloide diferent, possiblement correlacionat amb una major cinètica de fibril·lació.

Que els dominis  $V_L$  formin dímers pot entendre's com un efecte protector evitant la lliure acumulació del intermediari amiloidogènic. Tanmateix, certes mutacions localitzades en residus de la interfície donen lloc a dímers no canònics, amb una estructura globular diferent depenent del canvi d'interaccions global que provoquen a la molècula. Per tant, a nivell de potencial amiloidogènic tan es pot considerar un fort precursor fibril·lar el monòmer inestable soluble com la seva forma dimeritzada alterada; i més que la desestabilització del estat natiu, seria l'augment de la tendència a l'agregació o, dit d'una altra manera, l'increment d'estabilitat de les espècies intermediàries precursors de l'agregació el detonant de l'amiloïdosi.



## **CAPÍTOL 4: Estudi per FTIR de la via d'agregació del domini PSD95-PDZ3: Reorganització estructural en fibres- $\beta$ de tipus *worm-like* i citotoxicitat, i implicació de l'hèlix- $\alpha$ 3 en l'estabilitat i agregació del domini PDZ3.**

### **ARTICLES RELACIONATS:**

**The interconversion between a flexible  $\beta$ -sheet and a fibril  $\beta$ -arrangement constitutes the main conformational event during misfolding of PSD95-PDZ3 domain**

Marín-Argany, M.\*, Candel, MA.\*, Murciano-Calles, J., Martinez, JC. & Villegas, S.

Biophysical Journal 103, 738-47 (doi:10.1016/j.bpj.2012.07.029) 2012

*\*First co-author*

**A thermodynamic study of the third PDZ domain of MAGUK neuronal protein PSD-95 reveals a complex three-state folding behavior**

Murciano-Calles, J., Martinez, JC., Marín-Argany, M., Villegas, S. & Cobos, ES.

Biophysical Chemistry, *Submitted on September, 2013*

**The impact of extra-domain structures and post-translational modifications in the folding/misfolding behaviour of the third PDZ domain of MAGUK neuronal protein PSD-95**

Marín-Argany, M.\*, Murciano-Calles, J.\*, Cobos, ES., Villegas, S. & Martinez, JC.

*\*First co-author*

*Article en redacció*





## 1. RESUM.

La via de *misfolding*, induïda per temperatura, del domini PDZ3, el tercer domini de la proteïna neuronal PSD95, és poblada per un intermediari trimèric ric en estructura- $\beta$  que dona lloc a la formació reversible d'estructures fibril·lars altament ordenades. Mitjançant la tècnica de FTIR, s'ha determinat que la via de *misfolding* és deguda a la interconversió d'una fulla- $\beta$  flexible del domini cap a un intermediari que porta a la formació de fibres *worm-like* (WL), sense passar per una fase de nucleació. L'aparició de la banda de FTIR corresponent a les fibres WL va acompanyada, a més de la pèrdua de la fulla- $\beta$  flexible, d'una lleu disminució de la component de *loops* de l'estat natiu, mentre que la resta d'elements d'estructura secundària de la molècula es mantenen pràcticament inalterats. Per microscòpia electrònica de transmissió, s'ha confirmat la presència de fibres WL a partir dels 60 °C, temperatura on la població del intermediari trimèric és màxima. Assajos de toxicitat emprant la línia cel·lular de neuroblastoma humà SH-SY5Y mostren que aquesta citotoxicitat augmenta a mesura que el procés d'agregació avança. L'anàlisi d'RMN per desplaçament químic en funció de la temperatura ha revelat que la reorganització de la fulla- $\beta$  al voltant de la cadena- $\beta$ 3 promou el canvi conformacional que dona lloc a l'agregació del domini PDZ3.

Amb l'objectiu de definir els determinants conformacionals implicats en la regulació de la funció del domini PDZ3, s'ha realitzat una caracterització termodinàmica del procés de plegament i d'agregació del domini PDZ3, així com de la variant mancada de la tercera hèlix- $\alpha$ , l' $\Delta$ 10ct-PDZ3, i d'una sèrie de mutants específics de la interacció d'aquesta hèlix- $\alpha$  amb el domini PDZ3, els mutants E401R, D332G/P i E334L/Q. Els experiments de FTIR i DSC, demostren la forta implicació de l'hèlix- $\alpha$ 3 en el plegament global del domini, la seva estabilitat i tendència a l'agregació.



## 2. INTRODUCCIÓ.

Tal i com s'ha descrit a la introducció general, els dominis PDZ són un dels principals mòduls de les proteïnes multidomini *hub*, constituint l'element estructural més abundant en mamífers. Reconeixen els extrems C-terminal de diferents pèptids lligands amb una elevada especificitat, de forma que actuen com a suport estructural de moltes proteïnes funcionals (Ivarsson 2012). La proteïna PSD-95 és un exemple de sistema multimodular *hub* i forma part de la família de proteïnes MAGUK (*Membrane Associated Guanylate Kinase*). Es troba localitzada a la regió de densitat post-sinàptica, i organitza la transducció de senyals i coordina el tràfic molecular de la sinapsis neuronal. Aquesta proteïna està organitzada en tres dominis PDZ, un domini SH3, i un domini GK, els quals estan connectats per *loops* flexibles que juguen un rol molt important en la plasticitat i funcionalitat de la proteïna global (Zhang et al. 2013).

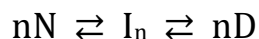
En aquest capítol s'exposa l'estudi sobre el domini PDZ3 de la proteïna PSD-95, un treball realitzat durant la tesi doctoral, i que s'ha dut a terme en col·laboració amb el grup de recerca del Dr. José C. Martínez, del Departament de Química Física de la Universitat de Granada. Els resultats aquí presentats parteixen d'estudis prèviament realitzats per aquest grup i que poden ser consultats extensament a la Tesi Doctoral del Dr. Murciano-Calles, J. Aquesta, així com les publicacions del grup, seran citades al llarg del capítol per tal de posar en context el resultat a exposar.

El domini PDZ3 de la PSD-95 rep especial importància degut a que conté una hèlix- $\alpha$  addicional al extrem C-terminal, que connecta amb el següent domini SH3 de la PSD-95, i que no és present a la resta de dominis PDZ. A nivell funcional, aquesta extensió regula al·lostèricament l'afinitat del domini per unir-se als lligands (Petit et al. 2009, Camara-Artigas et al. 2010, Zhang et al. 2011, Mostarda, Gfeller & Rao 2012).

Des del punt de vista termodinàmic, els primers estudis d'equilibri de plegament que es van realitzar sobre els dominis PDZ mitjançant tècniques espectroscòpiques, mostraven una única transició conformacional de dos estats, plegat i desplegat. Un model que no acabava d'encaixar amb l'elevada plasticitat i funcionalitat d'aquests dominis. Més recentment, els estudis de calorimetria duts a terme per el Dr. Murciano-Calles, J., i que precedeixen els resultats seguidament exposats, posen en evidència aquest model simple i proposen un nou plegament de tres estats del domini PDZ3, en el qual es pobla un estat intermediari trimèric ric en estructura- $\beta$ , que es troba fora de la via de plegament del domini (*off-pathway*) i dóna lloc a la formació de fibres reversibles. Un model que es troba en consonància amb l'elevada plasticitat dels dominis PDZ (Murciano-Calles et al. 2010, Murciano-Calles et al. 2011). Resulta molt interessant el fet de que el domini PDZ3 és un dels pocs casos descrits on es segueix una via de plegament no natiu (d'ara endavant

anomenada de *misfolding*) que dona lloc a agregats reversibles. A més, l'anàlisi de l'equilibri d'altres dominis PDZ donarà pistes sobre si aquest comportament de tres estats és general dins la família de dominis PDZ.

La tècnica de DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) és coneguda per ser l'òptima per a detectar qualsevol conformació en el equilibri que es pugui poblar durant el desplegament. Segons la corba de desplegament tèrmic del domini PDZ3, a pH neutre i sota incubació a 60-70 °C, apareixen dues transicions endotèrmiques que indiquen l'existència de 3 estats conformacionals diferents: l'estat natiu, N; l'estat desnaturalitzat, D, i un estat intermediari, I. A més, les dues endotermes es distancien entre si a mesura que augmenta la concentració de proteïna, suggerint un cert grau d'associació (oligomerització) del estat intermediari. D'aquesta manera es va establir que el desplegament del domini PDZ3-PSD95 segueix l'esquema següent:



Per DLS (*Dynamic Light Scattering*), es va caracteritzar l'equilibri d'associació-dissociació del estat intermediari. Inicialment, a 20°C, l'estat monomèric (de 11 kDa i un radi de 1.8 nm) representa el 100% de la població d'espècies conformacionals. Mentre que després d'incubar a 60°C, desapareix l'estat monomèric a favor d'estructures oligomèriques de 33 kDa i 2.6 nm. Aquesta dada apunta que els monòmers s'associen amb una estequiometria de  $n = 3$ , formant un estat intermediari trimèric, el qual augmenta de grandària a mesura que s'allarga el temps d'incubació (fins a 12 nm, corresponen a uns 100 monòmers).

Energèticament, el procés de formació de fibres a partir del intermediari trimèric del PDZ3 és un exemple inusual per les raons descrites seguidament:

- L'associació dels oligòmers no implica cap altre canvi conformacional de l'estat intermediari, perquè la segona transició de la corba de DSC ja és la de dissociació del intermediari.
- La fibril·lació, visualitzada per TEM i seguida per fluorescència de l'ANS i la ThT, segueix un comportament no cooperatiu, no dependent de nucleació.
- L'energia lliure de Gibbs de l'estat natiu a 25°C ( $\Delta G_{N-D} = -40$  kJ/mol) és major que la d'associació de l'estat intermediari a 60°C ( $\Delta G_{D-I_n} = -25$  kJ/mol). Raó per la qual les fibres amiloides formades són reversibles.

- I per últim, la poca variació del valor d'entalpia entre l'intermediari i l'estat desnaturalitzat (entalpia de dissociació) ( $\Delta H_{b-in} = -130$  kJ/mol) indiquen que la formació de fibres segueix un mecanisme bàsicament entròpic.

A condicions àcides, el domini PDZ desplega seguint un procés de dos estats. Aquest comportament s'atribueix a la protonació dels residus glutàmic i aspàrtic ( $pK_a$  3-4) situats a l'hèlix- $\alpha 3$  (Glu401) i al *loop*  $\beta 2$  i  $\beta 3$  (Glu334 i Asp332). A pH neutre, existeix una repulsió electrostàtica entre aquests residus carregats negativament, i que suposa l'apertura de la hèlix- $\alpha 3$  de la resta del domini, l'exposició al solvent de regions amb més tendència a l'agregació i, així, la formació d'oligòmers trimèrics. En canvi, a pHs àcids, la protonació evita aquesta repulsió i l'intermediari restaria com a monòmer inestable en solució, fent que el procés d'agregació sigui més lent, depenent de nucleació, i donant lloc a fibres més estables i irreversibles (Murciano-Calles et al. 2011).

El conjunt de les característiques d'equilibri conformacional del domini PDZ3 fan d'ell un model d'estudi de la formació d'oligòmers i fibres amiloides, i la seva possible relació amb determinades patologies humanes. A nivell de funcionalitat fisiològica, es pot concloure que l'entorn intracel·lular modula l'electrostàtica del domini PDZ3 i, com a conseqüència, controla la seva afinitat espai-temporal per a unir lligands, a través de canvis conformacionals en la hèlix- $\alpha 3$ .

Amb l'objectiu d'aprofundir en els detalls moleculars de la via d'agregació del domini PDZ3, en aquest capítol s'exposen els resultats obtinguts mitjançant les tècniques de FTIR, TEM, experiments de citotoxicitat, i d'RMN. S'ha determinat que una de les dues fulles- $\beta$  del domini, concretament la més flexible, és la precursora de la reestructuració de l'estat natiu cap a la formació de l'intermediari que porta a la formació de fibres- $\beta$  del tipus *worm-like* (WL), mentre que la resta d'estructures secundàries resten pràcticament inalterades. Gràcies a l'anàlisi d'RMN, en funció de la temperatura, realitzat per la Dra. Candel, A.M., s'ha reportat tal interconversió a nivell de residu. En particular, s'ha identificat la cadena- $\beta 3$  com la principal responsable del canvi conformacional que pateix la proteïna i que l'arrossega cap a la via d'agregació. L'adquisició d'aquest tipus de fibres WL i el seu caràcter citotòxic ha estat confirmat per TEM i assajos de citotoxicitat, respectivament.

Degut a l'absència d'informació sobre l'energètica i l'origen estructural d'aquest canvi conformacional, hem analitzat per DSC, FTIR, i altres tècniques espectroscòpiques, el comportament de plegament/agregació del domini PDZ3 en absència de la tercera hèlix- $\alpha$  addicional (residus 302-492 de la PSD-95), anomenat a partir d'ara  $\Delta 10ct$ -PDZ3, on els

deu residus del extrem C-terminal que formen l'hèlix- $\alpha$ 3 han estat deletats. A priori, la variant  $\Delta$ 10ct-PDZ3, adopta el típic plegament dels dominis PDZ, però realment és menys estable que el PDZ3 original. I, mentre que el PDZ3 sencer segueix un procés de desplegament de tres estats, ha estat necessari definir un nou model de quatre estats per a descriure correctament la via de desplegament de l' $\Delta$ 10ct-PDZ3.

A part de la variant  $\Delta$ 10ct-PDZ3, s'ha realitzat un anàlisi mutacional sobre els residus implicats en les interaccions entre el domini i l'hèlix- $\alpha$ 3. S'ha vist que la interacció entre la Lys355 i el Glu401 resulta determinant en els canvis observats durant l'agregació del domini, més que la interacció Glu334 i Arg399 descrita anteriorment (Camara-Artigas et al. 2010). Aquesta última és crucial pel que fa a la regulació de l'afinitat per als pèptids, però no tan si parlem a nivell de reestructuració conformacional. Finalment, s'ha analitzat la rellevància de la circularització, en forma d'anell de succinimidina, del residu Asp332 a través de les mutacions D332G i D332P, aquest últim emularia l'efecte de l'aspàrtic circularitzat.

### 3. MATERIALS I MÈTODES.

#### 3.1. Expressió i purificació del domini PDZ3 i mutants.

Les mostres de PDZ3 i les seves variants ( $\Delta$ 10ct-PDZ3, E401R, D332G, D332P, E334L i E334Q) han estat purificades per el Dr. Murciano-Calles, J., seguint el protocol descrit a (Camara-Artigas et al. 2010, Murciano-Calles et al. 2010). Resumidament, les seqüències del domini PDZ3 i els seus mutants (residus 302-402 de la PSD-95), i la del  $\Delta$ 10ct-PDZ3 (residus 302-492) van ser subclonades dins el vector pBAT4 (EMBL *Core Purification Facility*, Heidelberg, Germany) i expressades en la soca d'*E. coli* BL21(DE3) (Novagen, Madison, WI). Les cèl·lules van ser llisades i ultracentrifugades per tal d'obtenir la fracció soluble. Després, la proteïna va ser purificada per precipitació en sulfat d'amoni al 75 %, seguit d'una cromatografia d'exclusió molecular Superdex-75 (GE-Healthcare, Fairfield, CT) en tampó Tris/HCl 50 mM, KCl 400 mM, pH 7.5. El rendiment de purificació obtingut va ser, d'aproximadament, 15 mg de proteïna PDZ3 i els seus mutants simples, i de 8 mg de proteïna  $\Delta$ 10ct-PDZ3, per L de cultiu d'LB expressat.

Les mostres experimentals van ser dialitzades contra el tampó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.5 i el tampó PBS, pH 7.4, a 4 °C.

El coeficient d'extinció molar ( $\epsilon_{278}$ ) emprat per a la quantificació de les mostres va ser de 2985 u.Abs. $\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ , per al domini PDZ3 i mutants, i de 1425 u.Abs.  $\text{cm}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ , per a la variant  $\Delta$ 10ct-PDZ3. La massa molecular, confirmada per MALDI-TOF (*Centro de Instrumentación Científica (CIC) de la Universidad de Granada*), va ser de 11004 Da i 9898 Da, respectivament.

#### 3.2. Agregació del domini PDZ3 i mutants.

Abans d'induir la fibril·lació del domini PSD95-PDZ3 per incubació a 60 °C, les mostres, a una concentració de 8 mg/mL i en tampó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.5, tampó PBS, pH 7.4, o en tampó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, 150 mM d'NaCl, pH 7.5, van ser liofilitzades i resuspeses en 200  $\mu\text{l}$  de  $\text{D}_2\text{O}$ , i centrifugades a 10.000 g durant 5 min.

Els diferents mutants van ser tractats de la mateixa manera però tan sols es va preparar la mostra en tampó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.5.

Per a la fibril·lació, les mostres van ser incubades a 60 °C, durant 0, 4, 8 i 16 dies.

#### 3.3. Espectroscòpia d'infraroig amb transformada de Fourier.

Pel que fa als fonaments de la tècnica d'infraroig descrita a continuació, es troben detallats a l'apartat 4.5 de Materials i Mètodes Generals.

Mitjançant l'espectròmetre Varian Resolutions Pro, es van obtenir els espectres d'infraroig de les diferents mostres prèviament fibril·lades. Primer, la mostra inicial (temps 0 dies), a 25 i 60°C, i posteriorment les de diferents temps d'incubació a 60 °C, sempre deixant temperar la mostra 5 min abans de la lectura. Els espectres es van registrar de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , a una velocitat de 95  $\text{cm}^{-1}/\text{min}$ , una resolució de 2  $\text{cm}^{-1}$ , i fent la mitjana de 1000 acumulacions. L'espectre va ser corregit contra el soroll de fons (*background*), i restant la senyal del tampó i del vapor.

El tractament de dades i la deconvolució de la banda d'amida I' s'ha realitzat usant el software GRAMS (Thermoscientific). La deconvolució, sobre una corba Lorentziana, s'ha obtingut usant una amplada de banda de 17 i un factor K de 2.2, en apodització de tipus *Bessel*. Els ajustos de les bandes sobre l'espectre deconvolucionat s'han realitzat sobre una corba Gaussiana. Les dades finals, s'han expressat en tant per cent d'estructura secundària.

### **3.4. Microscòpia electrònica de transmissió (TEM).**

Les mateixes mostres del domini PDZ3 induïdes a fibril·lació i analitzades per FTIR, van ser visualitzades per el microscopi electrònic de transmissió Hitachi H-7000, del servei de microscòpia de la UAB, i analitzades amb el software DigitalMicrograph (Gatan).

Per a fer-ho, les mostres van ser absorbides en reixetes de coure recobertes de carboni, i tenyides negativament amb acetat d'uranil al 1 % (veure apartat 4.6.1 de Materials i Mètodes Generals).

### **3.5. Assajos de citotoxicitat del domini PDZ3.**

Els assajos de citotoxicitat dels agregats de PDZ3 es van realitzar mitjançant la línia cel·lular de neuroblastoma humà SH-SY5Y (veure apartat 5.5 de Materials i Mètodes Generals).

Prèviament, es va induir la fibril·lació del domini, tal i com s'ha explicat a l'apartat 3.2, però aquest cop a una concentració de 44 mg/mL en tampó PBS, pH 7.4. Un cop agregades, es va afegir 10  $\mu\text{l}$  de mostra per pou de cultius, obtenint una concentració final de 4.4 mg/mL per pou de 100  $\mu\text{l}$ , i es va deixar incubant durant 24 h a 37 °C.

Seguidament es va mesurar el % de viabilitat del cultiu cel·lular mitjançant el mètode d'MTT (veure apartat 5.5.1 de Materials i Mètodes Generals). Cada condició consistia en 6 rèpliques per experiment, i 2 experiments independents van ser analitzats estadísticament per nivell de significança (test de rangs signats de Wilcoxon, SPSS), després de normalitzar les dades usant la concentració de la condició tampó PBS com a referència. Els resultats representen l'error SEM (*Standard Error of the Mean*).



### 3.6. Experiments de DSC, DLS i CD de les diferents variants del domini PDZ3.

Els experiments de calorimetria (DSC, *Differential Scanning Calorimetry*), DLS (*Dinamyc Light Scattering*) i CD (*Circular Dichroism*) han estat realitzats pel Dr. Murciano-Calles, J. de la Universitat de Granada.

Resumidament, les mostres a estat analitzades en tampó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.5 i a 4 °C. Els experiments de DSC han estat registrats a una velocitat de 1.5 K/min, i a concentracions de 0.4 a 7.2 mg/mL, mitjançant el calorímetre VP-DSC (Microcal INC.), tal i com s'ha descrit prèviament (Viguera et al. 1994). Els experiments de DLS i CD també s'han realitzat segons s'ha descrit anteriorment (Cobos et al. 2004, Cobos et al. 2009). El pes molecular de les espècies ha estat calculat a partir del respectiu radi hidrodinàmic, emprant el model de "proteïna globular" inclòs en el software de l'instrument de DLS (DynaPro, DYNAMICS V6, Wyatt Technology Corporation).

### 3.7. Espectroscòpia d'RMN.

Els experiments d'espectroscòpia de ressonància magnètica nuclear (RMN) han estat realitzats per la Dra. Candel, A.M., de la Universitat de Granada.

Resumidament, la proteïna marcada amb  $^{15}\text{N}$  va ser purificada d'un cultiu cel·lular crescut en medi mínim M9 amb  $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$  com a única font de nitrogen, d'acord amb el mètode descrit anteriorment (Marley, Lu & Bracken 2001).

Les mostres per als experiments d'RMN van ser preparades a 8 mg/mL en 90 %  $\text{H}_2\text{O}$ /10 %  $\text{D}_2\text{O}$  i en tampó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.5.

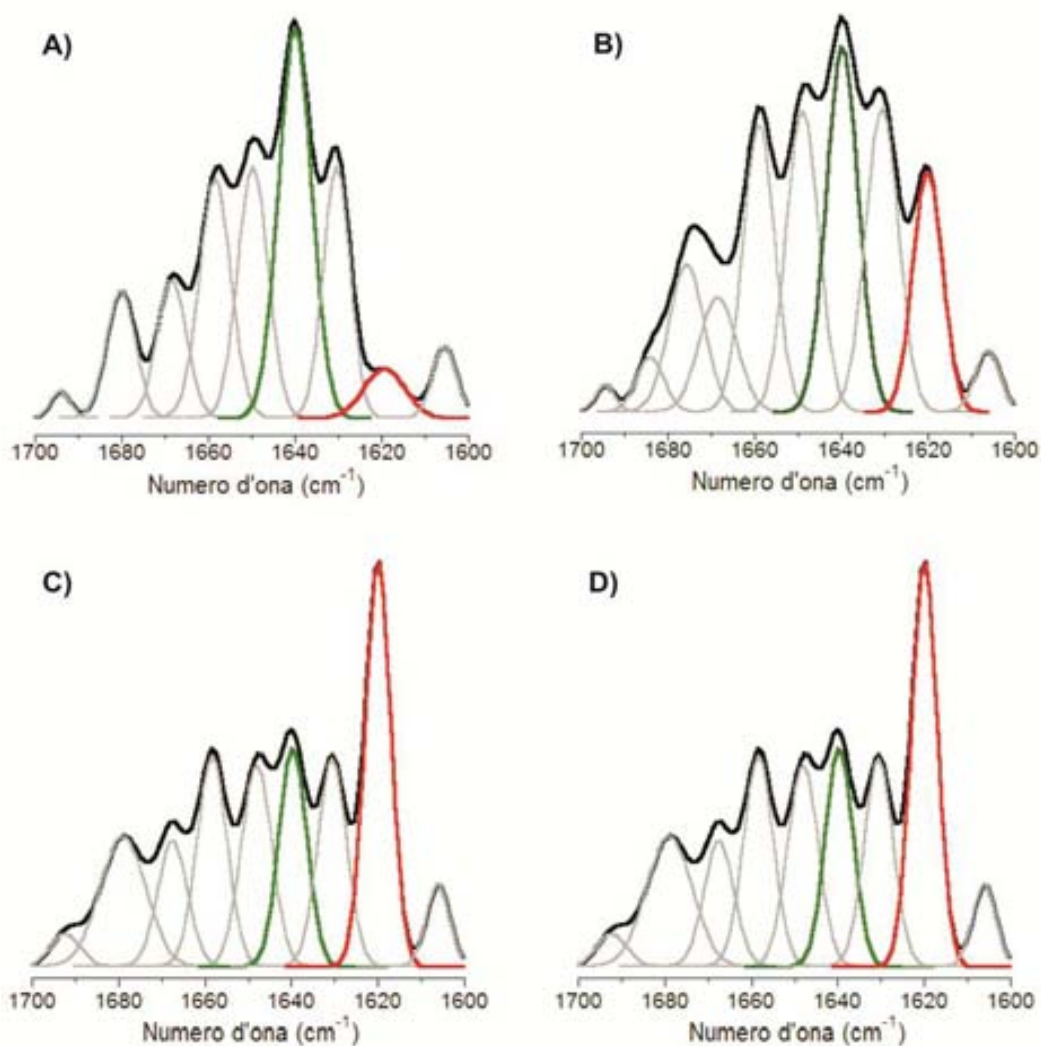
L'espectre de correlació  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  va ser registrat des de 25 a 60 °C, a intervals de 2.5 °C, mitjançant l'espectròmetre Varian NMR Direct-Drive System 600 MHz (freqüència de  $^1\text{H}$  de 600.25 MHz) equipat amb *cryoprobe*. Les dades d'RMN van ser processades usant NMRpipe i analitzades usant SPARKY. L'assignació del domini PDZ3 va ser obtingut emprant els mètodes estàndards. Les intensitats dels pics a l'espectre 2D van ser determinades usant la rutina de *peak-piking* en SPARKY.



## 4. RESULTATS.

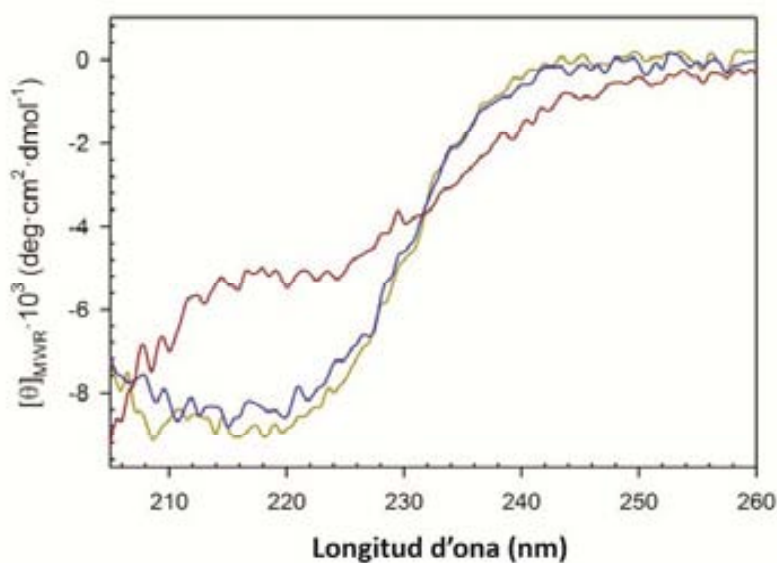
### 4.1. Espectre de FTIR del domini PDZ3 natiu.

La deconvolució de l'espectre de la banda d'amida I' del domini PDZ3 a 25 °C, en tampó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.5, genera sis bandes principals centrades a 1680, 1669, 1659, 1650, 1640, i 1631  $\text{cm}^{-1}$ , i tres bandes minoritàries centrades a 1692, 1620, i 1606  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 4. 1-A/Taula 4. 1).



**Figura 4. 1. Descomposició en bandes de l'espectre deconvolucionat de FTIR del domini PDZ3 adquirit en tampó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.5. A) 25 °C, B) després de 5 min a 60 °C, C) després de 4 dies a 60 °C, i D) després de 8 dies a 60 °C. La banda de 1640  $\text{cm}^{-1}$  és representada en verd, i la banda de 1620  $\text{cm}^{-1}$  és representada en vermell. La resta de bandes són representades en gris.**

La banda més representativa, amb un 28 % de l'àrea total del espectre, és localitzada a  $1640\text{ cm}^{-1}$ , i de primeres podria ser assignada com a component en *random-coil* (Byler, Susi 1986). Tot i això, aquest valor es troba al límit entre el rang atribuït a la contribució en *random-coil* ( $1645\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ ) i l'atribuït a la component en fulla- $\beta$  antiparal·lela nativa de baixa freqüència ( $1630\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$ ) (Byler, Susi 1986, Zandomeneghi et al. 2004). L'espectre de CD del domini PDZ3, obtingut prèviament (Murciano-Calles et al. 2010), mostra un perfil canònic de fulla- $\beta$ , amb el mínim a  $218\text{ nm}$  (Figura 4. 2), per tant, que la major banda de l'espectre de FTIR sigui una component en fulla- $\beta$  antiparal·lela nativa de baixa freqüència pren més sentit.



**Figura 4. 2. Espectre de CD del domini PDZ3 en tampó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.5.** En verd es representa l'espectre de la proteïna nativa a  $2\text{ }^\circ\text{C}$  y en vermell l'espectre a  $98\text{ }^\circ\text{C}$ . Per a comprovar la reversibilitat, la mostra es va replegar de nou baixant la temperatura fins a  $2\text{ }^\circ\text{C}$  i es va registrar l'espectre després de 5 min d'incubació. *Figura adaptada de Murciano-Calles, J. (tesis doctoral, 2011).*

A part, es genera una altra banda, a  $1631\text{ cm}^{-1}$ , que es troba en el rang assignat per a la component en fulla- $\beta$  antiparal·lela nativa de baixa freqüència, però tan sols contribueix en un 14 % del espectre (Taula 4. 1), en contra del 34 % obtingut a partir de l'estructura cristal·logràfica del PDZ3, resolta prèviament (Camara-Artigas et al. 2010). Per tant, la nostra hipòtesi inicial va ser que la banda a  $1640\text{ cm}^{-1}$  corresponia a una fracció molt flexible de la fulla- $\beta$ , i que fàcilment es desorganitza en solució; fet que concorda amb la flexibilitat conformacional que requereix el domini PDZ3 per tal d'assolir l'elevada capacitat d'unió que té cap als pèptids lligands (Saro et al. 2007). Per altra banda, la component en fulla- $\beta$  antiparal·lela nativa d'alta freqüència, es localitza a  $1681\text{ cm}^{-1}$ , i tan sols contribueix en un 8 % de l'àrea de l'espectre.

La component en girs- $\beta$  es troba a 1669 i 1659  $\text{cm}^{-1}$  (Byler, Susi 1986), en aquesta última banda també hi contribueixen els *loops* (Heredia, De Las Rivas 2003), i representa el 16 % de l'àrea total. La component en hèlix- $\alpha$ , centrada a 1650  $\text{cm}^{-1}$ , contribueix només en un 16 % de l'espectre, menys del 24 % donat per les dades cristal·logràfiques (veure apartat 5.2 de Discussió) (Taula 4. 1) (Camara-Artigas et al. 2010).

**Taula 4. 1. Descomposició en bandes de l'espectre deconvolucionat de FTIR del domini PDZ3 adquirit en tampó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.5.**

Estructura secundària	25 °C		60 °C, 0 dies		60 °C, 4 dies		60 °C, 8 dies		60 °C, 16 dies	
	Centre ( $\text{cm}^{-1}$ )	Àrea (%)	Centre ( $\text{cm}^{-1}$ )	Àrea (%)	Centre ( $\text{cm}^{-1}$ )	Àrea (%)	Centre ( $\text{cm}^{-1}$ )	Àrea (%)	Centre ( $\text{cm}^{-1}$ )	Àrea (%)
Girs- $\beta$	1694	1	1695	1	1692	2	1692	2	1694	1
Fulla- $\beta$ antiparal·lela d'alta freqüència	1680	8	1684	2	1679	12	1679	12	1680	10
	-		1676	9	-	-	-	-	-	-
Girs- $\beta$	1669	9	1669	7	1668	8	1668	8	1668	11
<b>Loops / Girs-<math>\beta</math></b>	<b>1659</b>	<b>16</b>	<b>1659</b>	<b>15</b>	<b>1658</b>	<b>13</b>	<b>1658</b>	<b>13</b>	<b>1659</b>	<b>12</b>
Hèlix- $\alpha$	1650	16	1649	16	1648	13	1648	13	1649	16
<b>Fulla-<math>\beta</math> flexible / Random coil</b>	<b>1640</b>	<b>28</b>	<b>1640</b>	<b>19</b>	<b>1640</b>	<b>13</b>	<b>1640</b>	<b>13</b>	<b>1640</b>	<b>11</b>
Fulla- $\beta$ antiparal·lela de baixa freqüència	1631	14	1631	16	1631	13	1631	13	1630	18
<b>WL /Amiloide</b>	<b>1620</b>	<b>4</b>	<b>1620</b>	<b>12</b>	<b>1620</b>	<b>22</b>	<b>1620</b>	<b>22</b>	<b>1621</b>	<b>19</b>
Cadenes laterals	1606	4	1606	3	1606	4	1606	4	1607	3

Pel que fa a les bandes minoritàries, la banda a 1620  $\text{cm}^{-1}$  correspon als agregats- $\beta$  (Zandomeneghi et al. 2004), i la de 1606  $\text{cm}^{-1}$  a les cadenes laterals (Arrondo et al. 1993); la banda a 1692  $\text{cm}^{-1}$  és pot considerar negligible (Taula 4. 1). A l'estat natiu, la banda assignada als agregats- $\beta$ , a 1620  $\text{cm}^{-1}$ , tan sols representa el 4 % del espectre, però ja reflexa la tendència del domini PDZ3 a l'agregació, tot i ser trobar-se a temperatura ambient. Aquesta banda es troba entre les dues components d'agregats fibril·lars ordenats, les fibres WL (de 1630 a 1620  $\text{cm}^{-1}$ ) i les fibres amiloides (de 1620 a 1615  $\text{cm}^{-1}$ ).

#### **4.1.1. Espectre de FTIR de l'agregació del domini PDZ3.**

L'espectre a 60 °C s'ha adquirit després d'incubar les mostres des de minuts fins a varis dies, ja que s'havia vist que a aquesta temperatura es forma l'intermediari trimèric precursor de fibres amiloides reversibles (Murciano-Calles et al. 2010). Un cop dins la cel·la de FTIR, les mostres van ser equilibrades durant 5 min a 60 °C abans d'adquirir l'espectre.

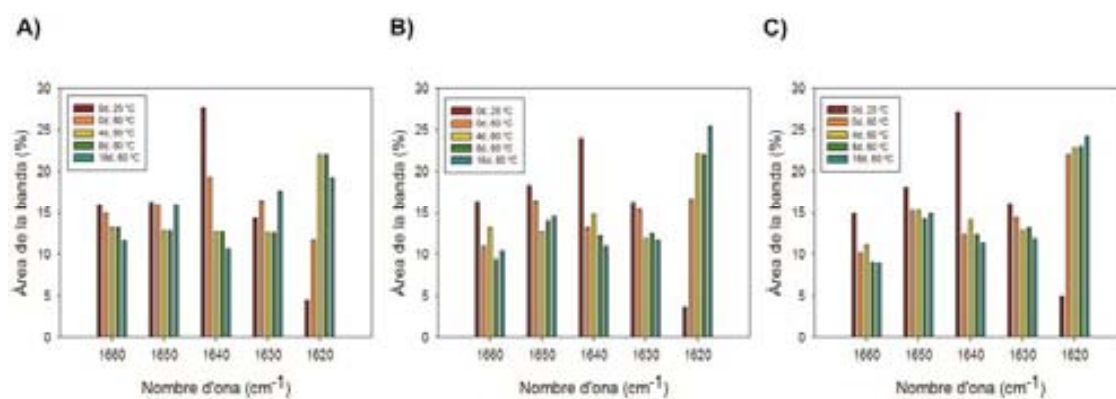
El principal canvi en l'espectre després de la primera incubació a 5 min (Figura 4. 1-B/Taula 4. 1), és una apreciable disminució de la banda a  $1640\text{ cm}^{-1}$ , corresponent a la fulla- $\beta$  flexible, a favor de l'increment de banda a  $1620\text{ cm}^{-1}$ , la dels agregats WL o amiloide. Aquesta reorganització conformacional entre fulles- $\beta$  fa que augmenti el grau d'empaquetament entre cadenes- $\beta$ , i per tant el nombre d'ona baixa, tal i com ha estat descrit en altres processos de fibril·lació (Zandomenighi et al. 2004, Cerda-Costa et al. 2009). Pel que fa a la banda atribuïda a la fulla- $\beta$  antiparal·lela nativa de baixa freqüència, a  $1631\text{ cm}^{-1}$ , i la de l'hèlix- $\alpha$ , a  $1650\text{ cm}^{-1}$ , resten quasi inalterades. Degut a les seva complexitat i les discrepàncies d'assignació entre autors, resulta difícil d'interpretar els canvis a la regió de  $1700\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ , així com la divisió en dos de la banda de  $1680\text{ cm}^{-1}$  (Olinger et al. 1986, Arrondo et al. 1993).

Quan la mostra és incubada durant 4 dies a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 4. 1-C/Taula 4. 1), la reorganització conformacional entre fulles- $\beta$  continua, decreixent la fracció flexible de fulla- $\beta$  nativa fins al 13 % (des del 28 % a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), i augmentant la banda WL/amiloide fins al 22 % (des del 4 % a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). A més, sembla que la banda de girs- $\beta$ /loops, a  $1650\text{ cm}^{-1}$ , també tendeix a disminuir.

Finalment, després d'incubar la mostra durant 8 i 16 dies a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Figura 4. 1-D/Taula 4. 1), l'espectre de FTIR es manté pràcticament igual que als 4 dies d'incubació. Això implica que la reorganització que genera l'estat intermediari trimèric s'assoleix als 4 dies d'incubació.

#### **4.1.2. Influència de la força iònica sobre l'agregació del domini PDZ3.**

Per tal de comprovar l'efecte de la força iònica sobre la via d'agregació del domini PDZ, s'ha comparat els resultats de FTIR obtinguts en tampó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.5, amb els espectres en tampó PBS, pH 7.4. Tal i com s'observa a la figura 4. 3-A, B, l'agregació del domini es comporta de manera similar en totes dues condicions, però el canvi conformacional cap a fibres WL/amiloides en tampó PBS, s'assoleix als 5 primers minuts d'incubació a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , indicant que la força iònica accelera el procés de reorganització de les fulles- $\beta$ , però no canvia el tipus de via d'agregació.



**Taula 4. 3. Descomposició en bandes de l'espectre deconvolucionat de FTIR del domini PDZ3 adquirit en tampó KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7.5, més 150 mM d'NaCl.**

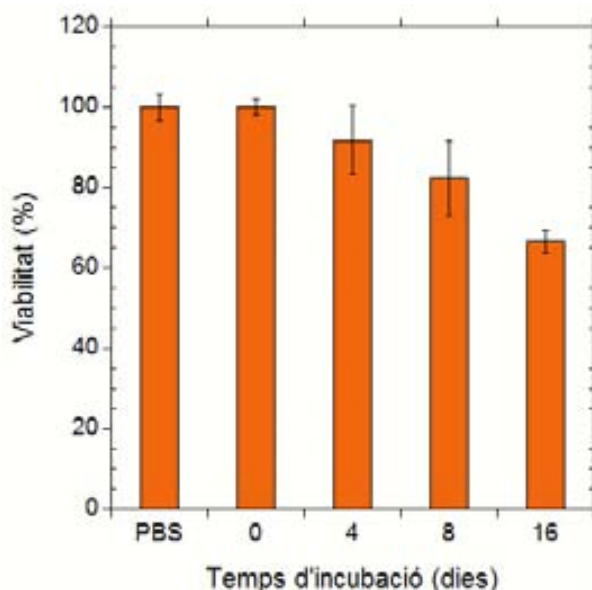
Estructura secundària	25 °C		60 °C, 0 dies		60 °C, 4 dies		60 °C, 8 dies		60 °C, 16 dies	
	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)
Girs-β	1694	2	1694	2	1694	1	1693	3	1694	1
Fulla-β antiparal·lela d'alta freqüència	1680	7	1683	6	1683	6	1684	7	1685	5
			1676	2	1677	5	1676	5	1677	6
Girs-β	1669	8	1669	14	1669	11	1670	12	1669	12
<b>Loops / Girs-β</b>	<b>1659</b>	<b>15</b>	<b>1658</b>	<b>10</b>	<b>1658</b>	<b>11</b>	<b>1658</b>	<b>9</b>	<b>1658</b>	<b>9</b>
Hèlix-α	1650	18	1648	15	1649	15	1649	14	1649	15
<b>Fulla-β flexible / Random coil</b>	<b>1640</b>	<b>27</b>	<b>1640</b>	<b>12</b>	<b>1640</b>	<b>14</b>	<b>1640</b>	<b>12</b>	<b>1640</b>	<b>11</b>
Fulla-β antiparal·lela de baixa freqüència	1630	16	1631	14	1631	13	1631	13	1631	12
<b>WL /Amiloide</b>	<b>1620</b>	<b>5</b>	<b>1620</b>	<b>22</b>	<b>1620</b>	<b>21</b>	<b>1620</b>	<b>23</b>	<b>1620</b>	<b>24</b>
Cadenes laterals	1606	2	1606	3	1605	3	1606	2	1606	5

Les taules 4. 2 i 4. 3 mostren els canvis que pateix el domini PDZ3 incubat a 60 °C en presència de sal. Resumidament, la component en de fulla-β flexible decreix dràsticament, a costa d'incrementar la banda de WL/amiloide i disminuir, també, la fracció de girs-β/loops. La part més estructurada de la molècula, la fulla-β antiparal·lela nativa i l'hèlix-α, també disminueix lleugerament, tot i que es considera poc representatiu.

#### **4.1.3. Citotoxicitat dels agregats de PDZ3.**

Per als assajos de citotoxicitat, mostres del domini PDZ3, a 44 mg/mL, van ser incubades a 60 °C durant diferents períodes de temps (0, 4, 8 i 16 dies), per tal d'induir l'agregació (veure apartat 3.5 de Materials i Mètodes del capítol). La concentració final a cultius, de 4.4 mg/mL, és la meitat de l'emprada per als espectres de FTIR, ja que a majors concentracions la mostra es troba massa agregada per a realitzar assajos de viabilitat obtenint resultats reals i reproduïbles. S'ha de tenir en compte, a més, que la via d'agregació del domini es pot veure revertida pel canvi de temperatura a cultius, passant de 60 a 37 °C, on es manté durant 24 hores. Per tant, a part de comprovar per TEM aquesta possible reversibilitat dels agregats, no és pot fer una comparació directe entre els resultats de FTIR i citotoxicitat, degut a la diferencia de concentració i de temperatura dels experiments.





**Figura 4. 4. Assaig de viabilitat per MTT de la línia cel·lular de neuroblastoma humà SH-SY5Y.** Les cèl·lules van ser tractades durant 24 h amb tampó PBS, pH 7.4, i amb PDZ3 incubat a 60 °C durant diferents dies (0, 4, 8 i 16). La concentració de la mostra durant la incubació i en el cultiu cel·lular va ser de 44 i 4.4 mg/mL, respectivament.

Els assajos de toxicitat en la línia cel·lular de neuroblastoma humà SH-SY5Y, mostren que la citotoxicitat augmenta a mesura que la via d'agregació es troba més avançada (Figura 4. 4). Aquest resultat indiquen que l'agregació hauria de ser, tan sols, parcialment reversible i que aquesta reversibilitat decreix a mesura que la reacció és troba més desplaçada cap a la formació d'agregats madurs.

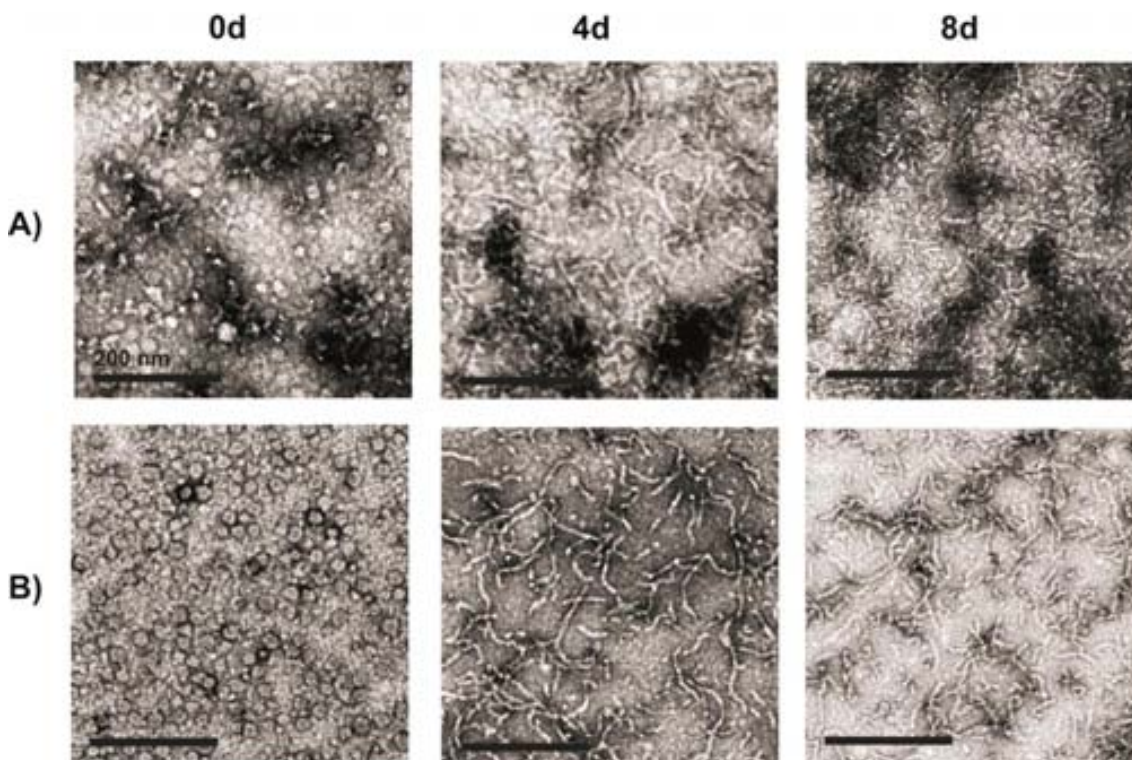
#### **4.1.4. Microscòpia electrònica dels agregats citotòxics de PDZ3.**

Per tal de determinar el tipus de via d'agregació (WL/amiloide) que segueixen els agregats citotòxics del domini PDZ3, assignada a la banda de FTIR 1620  $\text{cm}^{-1}$ , s'han obtingut imatges de TEM de les mostres emprades per als espectres de FTIR, a concentració 8 mg/mL, i en tampó PBS, pH 7.4 (veure apartat 3.4 de Materials i Mètodes del capítol). A més s'ha comprovat el grau de reversibilitat dels agregats en funció de la temperatura, i verificar així, si al disminuir la temperatura a 37 °C durant 24 h, condició necessària per als assajos de citotoxicitat, els agregats es mantenen i, per tant, si són els responsables de la disminució de la viabilitat cel·lular.

Tal i com s'observa a la figura 4. 5-A, als estadis inicials de l'agregació hi trobem petites estructures globulars, sense presència d'agregats fibril·lars. Segons els resultats de citotoxicitat, aquesta conformació no seria tòxica en cultius. Després de la incubació per varis dies a 60 °C, apareixen fibres del tipus WL, que es caracteritzen per ser corbades, no massa llargues i amb un diàmetre de 8-9 nm. Aquestes fibres WL és mantenen durant els

4, 8 i 16 dies d'incubació. Segons FTIR, aquestes fibres es formen ràpidament als 5 min a 60 °C, i es mantenen durant la resta de dies d'incubació.

Pel que fa a la reversibilitat, les imatges de la figura 4. 5-B, mostren que el canvi de temperatura a 37 °C, no afecta al grau d'agregació, i per tant, la citotoxicitat en cultius cel·lulars es pot atribuir, tal i com s'esperava, als agregats del tipus WL del domini PDZ3. A més, podem corroborar que l'agregació del domini PDZ3 és parcialment reversible.

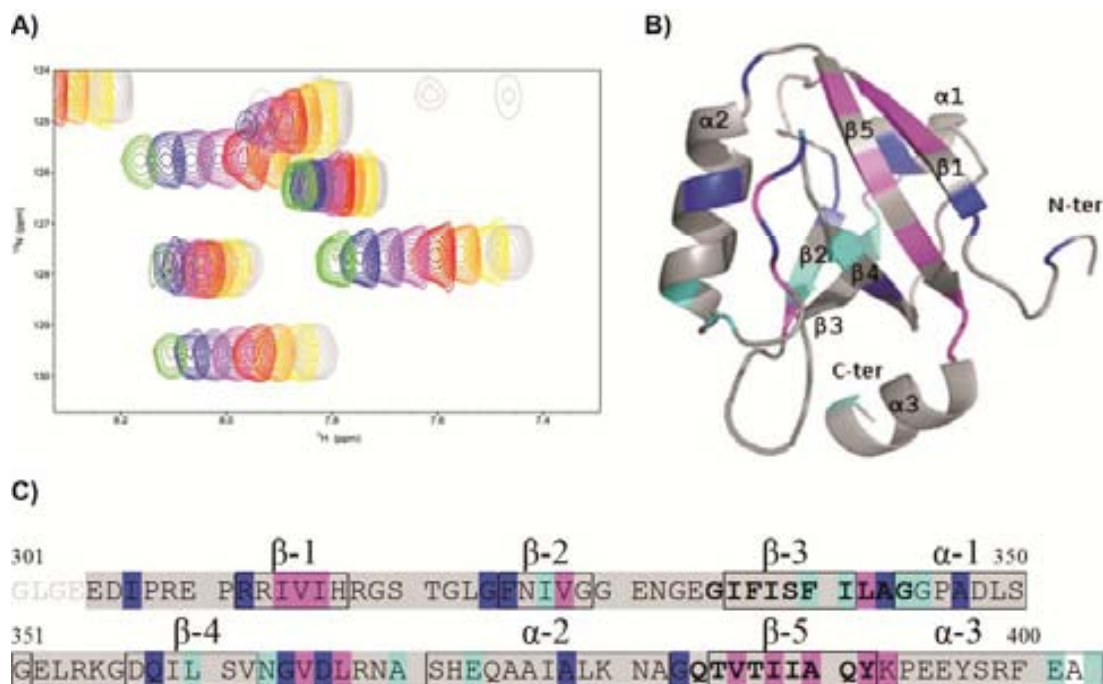


**Figura 4. 5. Imatges de TEM del domini PDZ3 incubat a 60 °C, en tampó PBS, pH 7.4.** A) Incubació a 60 °C durant 0, 4 i 8 dies. B) Incubació a 60 °C durant 0, 4 i 8 dies, més 24 h a 37 °C, que mostra que les condicions de cultiu cel·lular no reverteixen els agregats WL del domini PDZ3. En totes dues condicions, a temps 0 dies s'observen estructures globulars. Als 4 dies d'incubació, apareixen fibres del tipus WL, que es fan més evidents als 8 dies d'incubació (les imatges adquirides als 16 dies d'incubació són molt similars als 8 dies a 60°C).

#### ***4.1.5. Anàlisi per RMN-HSQC dels aspectes moleculars de l'agregació del PDZ3.***

Per tal d'aprofundir en el mecanisme molecular d'agregació del domini PDZ3, i corroborar el pas per un intermediari trimèric que donaria lloc a la via WL, tal i com ha estat descrit anteriorment pel Dr. Murciano-Calles (Murciano-Calles et al. 2010), s'ha analitzat, per espectroscòpia d'RMN, les regions responsables del canvi conformacional observat per FTIR. Aquests experiments i l'anàlisi de resultats han estat desenvolupats per la Dra. Candel, A. M., de la Universitat de Granada.

L'espectre de correlació  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-NMR (*Heteronuclear Single Quantum Coherence-Nuclear Magnetic Resonance*) correlaciona els desplaçaments químics (o *chemical shifts*) dins dels grups NH de la cadena polipeptídica. L'espectre bidimensional del domini PDZ3 en tampó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.5, va ser registrat des de 25 a 60 °C (Figura 4. 6-A).



**Figura 4. 6. Espectre de correlació  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  HSQC-RMN del domini PDZ3 en tampó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.5, des de 25 a 60 °C.** A) Efecte de la temperatura sobre les intensitats dels pics obtingut per comparació dels espectres de correlació  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$  adquirits a intervals de temperatura de 2.5 °C. Per simplificar-ho, la figura mostra espectres adquirits cada 5 °C. Tots els pics es mouen cap a freqüències majors (o cap a l'esquerra, *downfield*) en l'espectre de protó a mesura que augmenta la temperatura. B) Representació de l'estructura del domini PDZ3 (codi PDB 3K82). En colors, es mostra el grau de pertorbació de HSQC. Magenta: residus que mantenen els seus pics en posició i intensitat similar. Cian: residus que, tot i canviar les intensitats/volums, mantenen la seva posició als 60 °C. Blau: residus que modifiquen la seva posició inicial ja que el pic desapareix o canvia de localització als 60 °C. C) Estructura secundària i pertorbació de HSQC a nivell de residu, usant el mateix codi de color que a la figura B. Les regions amb tendència a l'agregació (per TANGO) són marcades en negra.

L'anàlisi d'aquest espectre aporta informació de les intensitats/volums dels pics de cada residu en funció de la temperatura, i ha permès classificar-los en funció de si mantenen o no la disposició conformacional de l'estat natiu després d'incubar a 60 °C.

D'aquesta manera s'han identificat tres tipus de residus dins l'estructura globular del domini PDZ3 (Figura 4. 6-B, C): els que mantenen la conformació de l'estat natiu ja que les intensitats/volums dels seus pics no decreixen significativament; els residus que, tot i atenuar les intensitats/volums, mantenen la seva posició nativa; i els residus que modifiquen la seva posició inicial, ja sigui perquè el pic desapareix o canvia de localització als 60 °C.

Aquesta classificació dins l'estructura globular del domini (Figura 4. 6-B, C), mostra que els residus localitzats a les cadenes  $\beta 1$  i  $\beta 5$ , les quals s'organitzen en un  *$\beta$ -hairpin* antiparal·lel, són aquells que mantenen la seva disposició. En contra, la fulla- $\beta$  formada per les cadenes  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  i  $\beta 4$ , sembla pateix un cert grau de desorganització o readaptació, juntament amb els residus de l'hèlix- $\alpha 1$ , la qual també es troba parcialment inclosa com a regió amb tendència a l'agregació, tal i com s'ha predit per l'algoritme TANGO.

La permanència de la senyal de correlació de la  $\beta 1$  i la  $\beta 5$  concorda perfectament amb els resultats de FTIR, on part de la component en fulla- $\beta$  nativa és manté als 60 °C. Per altra banda, la feblesa o desaparició de la senyal de la  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  i  $\beta 4$  estaria relacionat amb la fracció de fulla- $\beta$  nativa i flexible, responsable de l'aparició de la banda d'agregats WL.

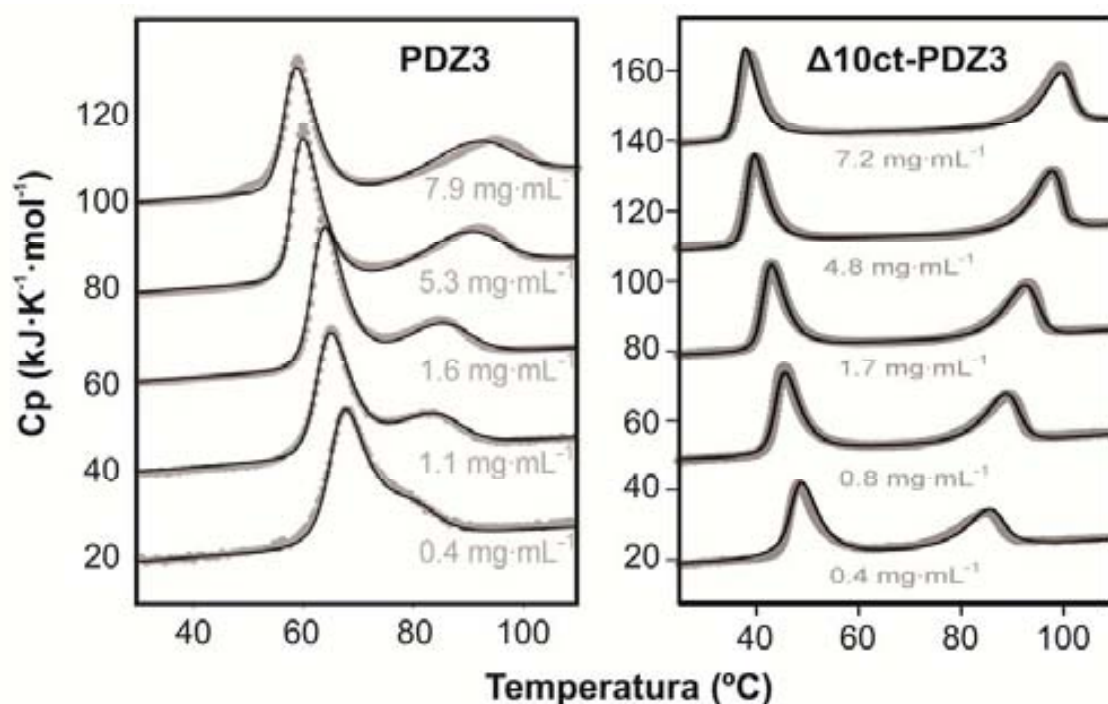
#### **4.2. Efecte de la deleció de l'hèlix- $\alpha 3$ sobre el plegament del domini PDZ3.**

La importància de l'hèlix- $\alpha 3$  ha estat corroborada amb el paper regulador sobre les propietats d'unió del domini PDZ3 (Petit et al. 2009). Aquest domini presenta una regulació al·lostèrica a través de l'hèlix addicional, que no interacciona directament amb el lligand. Al estudiar les propietats d'unió del domini sense l' $\alpha 3$ , es va observar que l'afinitat varia notablement, depenent del pèptid lligand, fins a 20 vegades menys. Aquesta variació de l'afinitat no sembla que estigui acompanyada d'un canvi conformacional, sinó a fenòmens dinàmics de caràcter entròpic.

Vista l'evident importància d'aquesta hèlix- $\alpha 3$ , es va decidir estudiar les conseqüències de la seva eliminació en el procés de plegament. Per això es va clonar i purificar la construcció del tercer domini PDZ de la proteïna PSD-95, amb deleció dels últims 10 residus del extrem C-terminal, la variant  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$ . Els experiments de clonatge, expressió, i l'estudi del plegament del domini  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$ , han estat realitzats per el Dr. Murciano-Calles, J., de la Universitat de Granada, i es troben detallats a la seva Tesi Doctoral, i al article en col·laboració en espera d'acceptació i publicació (Murciano-Calles 2011, Murciano-Calles et al. 2013).

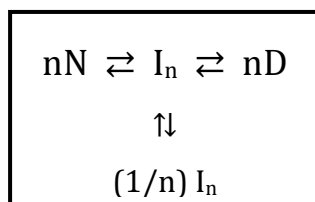
Un cop comprovat que l'afinitat del domini PDZ3 per al lligand KKETAV és major ( $K_d = 1 \mu\text{M}$ ) que la del domini  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$  ( $K_d = 3.6 \mu\text{M}$ ) (Murciano-Calles 2011), es va estudiar, mitjançant DSC, l'efecte de l'eliminació de l'hèlix- $\alpha 3$  en el plegament del domini.

La figura 4. 7 mostra les traces calorimètriques obtingudes prèviament amb el domini PDZ3 (Murciano-Calles et al. 2010) i les del  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$  (Murciano-Calles 2011, Murciano-Calles et al. 2013). Les dues transicions endotèrmiques indiquen la presència de tres estats macroscòpics en equilibri, reversibles, i independents a la velocitat de canvi de temperatura (dada no mostrada). Al augmentar la concentració de proteïna, les dues endoterms es separen, indicant un fenomen d'associació del estat intermediari. La primera endoterma (que correspon al equilibri  $N \rightleftharpoons I_n$ ) reflexa el procés d'associació del estat intermediari durant el desplegament, i és resultat de dos processos oposats: a) la contribució positiva del procés de desplegament de l'estat natiu, i b) el procés exotèrmic de l'associació del intermediari. La segona endoterma (corresponent al equilibri  $I_n \rightleftharpoons D$ ) indica, únicament, la pèrdua de l'estat d'associació (o dissociació) donant lloc al estat desplegat. Qualitativament, les dues construccions difereixen en que les transicions de  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$  són més agudes. Però, la diferencia més important és el grau de reversibilitat de  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$  (un 10 %), força inferior al del domini PDZ3 sencer (un 60 %).



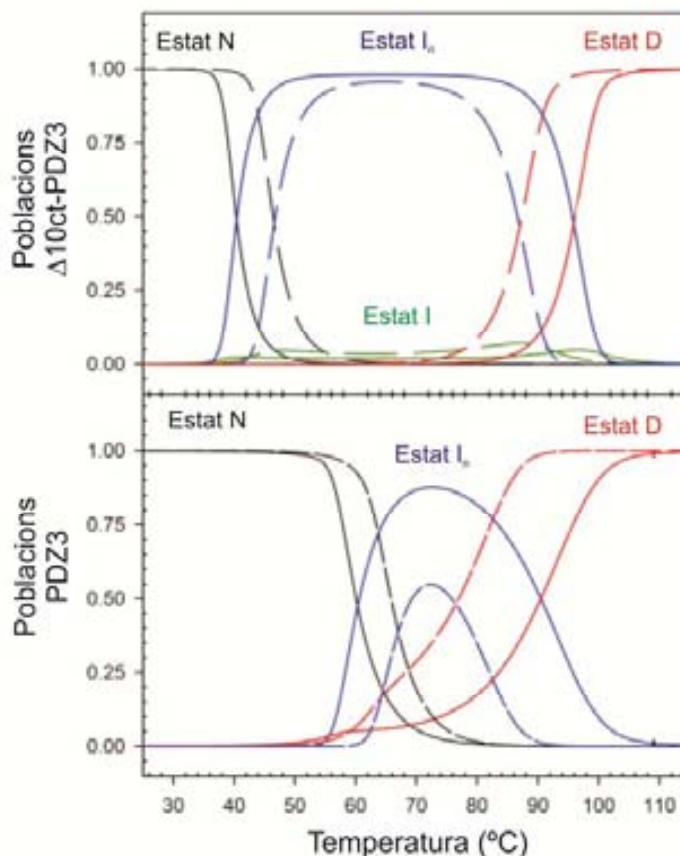
**Figura 4. 7. Corbes del desplegament tèrmic del domini PDZ i  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$  obtingudes per DSC.** A diferent concentració de proteïna, i en tampó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.5, s'han obtingut els valors experimentals (cercles grisos). L'anàlisi global s'ha realitzat a partir del model de tres estats (PDZ) o de quatre estats ( $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$ ) i és representat amb una línia negra. *Imatges extretes de Murciano-Calles 2011.*

Malgrat que el perfil de DSC *versus* la concentració és molt semblant entre tots dos constructes, el model 3 tres estats ( $nN \rightleftharpoons I_n \rightleftharpoons nD$ ) emprat per a l'anàlisi de DSC del domini PDZ3 no s'ajusta a la traça calorimètrica de l' $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$ , per tant ha calgut definir un nou model de quatre estats per a descriure la desnaturalització tèrmica de l' $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$ , i que és el següent:



Per tant, el desplegament del domini  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$  conté tres processos en equilibri, 1) el pas del estat natiu al intermediari ( $N \rightleftharpoons I$ ), al que segueix, 2) el desplegament complet del domini ( $I \rightleftharpoons D$ ), i per altra banda, i *off-pathway*, 3) l'equilibri d'associació del intermediari ( $I \rightleftharpoons (1/3) I_3$ ). Així, seguint aquest model, existeix un intermediari monomèric en equilibri previ al procés d'associació, el qual s'associarà donant lloc a un oligòmer trimèric, la mateixa estequiometria final que per al domini PDZ3 sencer.

A partir dels paràmetres termodinàmics obtinguts del model de quatre estats, s'ha fet un anàlisi de poblacions dels diferents estats en equilibri (Murciano-Calles 2011). A la figura 4.8 es pot observar que l'intermediari trimèric es pobla pràcticament al 100 % en el interval de temperatura d'entre 50 i 85 °C, i que a concentracions baixes també es forma de manera majoritària (fins a un 90 %). Això reflexa una diferència important amb el domini PDZ3 sencer, que a baixa concentració l'intermediari tan sols arriba a ser el 50 %, i dins d'un rang de temperatura menor, de 65 a 85 °C. Pel que fa l'estat monomèric, tot i ser indispensable, no supera el 10 % de població a cap temperatura, conclouent que l'estat oligomèric és més estable que el monomèric.



**Figura 4. 8. Distribució de poblacions dels diferents estats en el desplegament tèrmic del domini PDZ3 i del domini  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$ .** Per a cada domini es mostra la distribució de poblacions, obtingudes a partir de les traces de DSC, a concentració de  $85 \mu\text{M}$  (línia continua) i  $480 \mu\text{M}$  (línia discontinua). *Imatges extretes de Murciano-Calles 2011.*

Per tant, gràcies a l'excel·lent ajust a un model de quatre estats de les dades calorimètriques, realitzat per el Dr. Murciano-Calles, i els espectres de FTIR deconvolucionats que es presenten a continuació, es pot concloure que al delectar la tercera hèlix- $\alpha$  del domini PDZ3, s'estabilitza l'intermediari, ja que apareix a concentracions menors i es pobla en major proporció respecte l'estat natiu i desplegat.

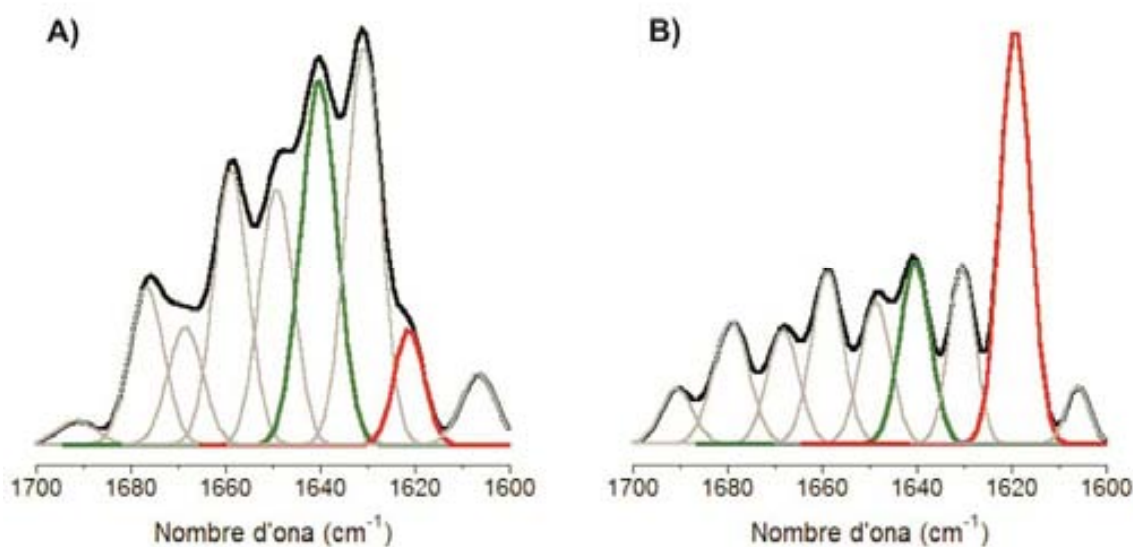
#### **4.2.1. Efecte de la delectió de l'hèlix- $\alpha 3$ sobre l'agregació del domini PDZ3.**

Un cop caracteritzat el mecanisme de plegament del domini  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$ , s'ha determinat l'efecte de la delectió de l'hèlix- $\alpha 3$  addicional sobre la via d'agregació del domini PDZ3. Per a fer-ho, s'han adquirit els espectres de FTIR del domini  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$  natiu i a diferents temps d'incubació a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 4.2.1.1. Espectre de FTIR del domini $\Delta 10$ ct-PDZ3 natiu.

L'espectre de FTIR natiu (25 °C), de l' $\Delta 10$ ct-PDZ3, genera sis bandes principals centrades al voltant dels 1680, 1670, 1660, 1650, 1640, i 1630  $\text{cm}^{-1}$ ; així com tres bandes minoritàries als 1690, 1620, i 1605  $\text{cm}^{-1}$  (Figura 4. 9-A). Aquestes bandes són les mateixes que les obtingudes en el domini PDZ3, per tant, podem confirmar que l' $\Delta 10$ ct-PDZ3 manté el típic plegament dels dominis PDZ.

Tot i això, existeixen certs canvis respecte el PDZ3. Sorprenentment, la deleció del l'hèlix- $\alpha 3$  tan sols implica una disminució del 2 % de la banda d'hèlix- $\alpha$ , a 1650  $\text{cm}^{-1}$ , constituint un 14 % de l'àrea total de l'espectre (Figura 4. 9-A/Taula 4. 4). A part que el FTIR és una tècnica de baixa resolució, una possible explicació seria que aquesta hèlix es troba empaquetada contra la fulla- $\beta$  flexible (cadena  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  i  $\beta 4$ ), que a al seu torn es troba empaquetada contra l'hèlix- $\alpha 1$ . La deleció de l' $\alpha 3$  resultaria en una millor acomodació de la fulla- $\beta$  flexible i l'estabilització de l'hèlix- $\alpha 1$ , compensant la pèrdua de component- $\alpha$ .



**Figura 4. 9. Descomposició en bandes de l'espectre deconvolucionat de FTIR del domini  $\Delta 10$ ct-PDZ3 adquirit en tampó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.5. A) 25 °C, B) després de 5 min a 60 °C. La banda de 1640  $\text{cm}^{-1}$  és representada en verd, i la banda de 1620  $\text{cm}^{-1}$  és representada en vermell. La resta de bandes són representades en gris.**

Per altra banda, tot i haver estat descrit que la deleció de l' $\alpha 3$  incrementa la flexibilitat del *loop*  $\beta 1$ - $\beta 3$  (Mostarda, Gfeller & Rao 2012), per FTIR no es pot detectar aquesta diferència. De fet, la component en fulla- $\beta$  flexible, centrada a 1640  $\text{cm}^{-1}$ , disminueix en l' $\Delta 10$ ct-PDZ3 respecte el PDZ3 sencer (del 28 al 21 %).



**Taula 4. 4. Descomposició en bandes de l'espectre deconvolucionat de FTIR del domini  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$  adquirit en tampó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.5, i comparació amb els valors del domini PDZ3.**

PDZ3	25 °C		60 °C, 0 dies		60 °C, 4 dies		60 °C, 8 dies		60 °C, 16 dies	
Estructura secundària	Centre ( $\text{cm}^{-1}$ )	Àrea (%)	Centre ( $\text{cm}^{-1}$ )	Àrea (%)	Centre ( $\text{cm}^{-1}$ )	Àrea (%)	Centre ( $\text{cm}^{-1}$ )	Àrea (%)	Centre ( $\text{cm}^{-1}$ )	Àrea (%)
Girs- $\beta$	1694	1	1694	1	1695	2	1695	2	1695	2
Fulla- $\beta$ antiparal·lela d'alta freqüència	1683	2	1684	4	1684	5	1684	8	1685	4
	1679	6	1676	2	1676	7	1677	4	1677	9
Girs- $\beta$	1669	9	1670	17	1668	9	1668	13	1667	9
<b>Loops / Girs-<math>\beta</math></b>	<b>1659</b>	<b>16</b>	<b>1658</b>	<b>11</b>	<b>1659</b>	<b>13</b>	<b>1658</b>	<b>9</b>	<b>1658</b>	<b>10</b>
Hèlix- $\alpha$	1649	18	1648	16	1649	13	1648	14	1648	14
<b>Fulla-<math>\beta</math> flexible / Random coil</b>	<b>1640</b>	<b>24</b>	<b>1640</b>	<b>13</b>	<b>1640</b>	<b>15</b>	<b>1640</b>	<b>12</b>	<b>1640</b>	<b>11</b>
Fulla- $\beta$ antiparal·lela de baixa freqüència	1630	16	1631	15	1631	12	1631	13	1631	12
<b>WL /Amiloide</b>	<b>1621</b>	<b>4</b>	<b>1620</b>	<b>17</b>	<b>1619</b>	<b>22</b>	<b>1619</b>	<b>22</b>	<b>1620</b>	<b>25</b>
Cadenes laterals	1605	2	1606	2	1606	2	1606	3	1605	4
$\Delta 10\text{ct-PDZ3}$	25 °C		60 °C, 0 dies		60 °C, 4 dies		60 °C, 8 dies		60 °C, 16 dies	
Estructura secundària	Centre ( $\text{cm}^{-1}$ )	Àrea (%)	Centre ( $\text{cm}^{-1}$ )	Àrea (%)	Centre ( $\text{cm}^{-1}$ )	Àrea (%)	Centre ( $\text{cm}^{-1}$ )	Àrea (%)	Centre ( $\text{cm}^{-1}$ )	Àrea (%)
Girs- $\beta$	1692	2	1691	4	1694	2	1695	3	1694	4
Fulla- $\beta$ antiparal·lela d'alta freqüència	1677	9			1683	12	1684	13	1684	16
	1669	7	1679	10	1670	17	1676	7	1670	24
Girs- $\beta$	<b>1659</b>	<b>15</b>	1668	8	<b>1659</b>	<b>10</b>	1667	15	<b>1659</b>	<b>8</b>
<b>Loops / Girs-<math>\beta</math></b>	1649	14	<b>1659</b>	<b>13</b>	1650	10	<b>1659</b>	<b>7</b>	1650	11
Hèlix- $\alpha$	<b>1641</b>	<b>21</b>	1649	10	<b>1640</b>	<b>14</b>	1651	13	<b>1641</b>	<b>11</b>
<b>Fulla-<math>\beta</math> flexible / Random coil</b>	1631	22	<b>1641</b>	<b>13</b>	1631	8	<b>1641</b>	<b>11</b>	1631	8
Fulla- $\beta$ antiparal·lela de baixa freqüència	<b>1621</b>	<b>6</b>	1631	11	<b>1618</b>	<b>25</b>	1631	12	<b>1621</b>	<b>17</b>
<b>WL /Amiloide</b>	1607	4	<b>1619</b>	<b>29</b>	1606	3	<b>1618</b>	<b>16</b>	1605	2
Cadenes laterals	1692	2	1606	3	1694	2	1606	3	1694	4

Al contrari passa amb la fulla- $\beta$  estable (atribuïda a les cadenes  $\beta 1$  i  $\beta 5$ ), localitzada a la banda de  $1630 \text{ cm}^{-1}$ , que incrementa clarament en la variant  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$  (22% per l' $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$  versus el 14% en el PDZ3) (Figura 4. 9-A/Taula 4. 4). Per tant, l'increment de la banda de  $1630 \text{ cm}^{-1}$  és deguda a l'estabilització, i per tant, disminució de la component en fulla- $\beta$  flexible, a  $1640 \text{ cm}^{-1}$ . Aquesta estabilització general de les fulles- $\beta$  podria ser la raó de que, malgrat la baixada de reversibilitat del desplegament de l' $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$  (aproximadament del 10 %), l'estabilitat del domini  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$  no decreixi dramàticament respecte el PDZ3 sencer ( $\Delta G_{\text{N-D}} \text{PDZ3} = -39 \pm 6 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ,  $\Delta G_{\text{N-D}} \Delta 10\text{ct-PDZ3} = -28 \pm 10 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ ).

En el cas de l' $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$ , l'estat natiu conté un tant per cent de fulla- $\beta$  WL/Amiloide, atribuïda a la banda de  $1620 \text{ cm}^{-1}$ , lleugerament superior que el domini

PDZ3 (Taula 4. 4), una característica que podria indicar una major tendència inicial del domini  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$  per entrar a la via amiloide. Sigui com sigui, aquest valor no és massa acurat, i la informació sobre el procés d'agregació a 60 °C hauria de clarificar aquesta consideració inicial.

#### 4.2.1.2. Espectre de FTIR del intermediari d'agregació de l' $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$ .

Els canvis conformacionals de la variant  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$  un cop incubada a 60 °C, han estat estudiats després de ser equilibrada durant 5 min, i després de ser incubada durant 4, 8, i 16 dies.

Després de 5 min a 60 °C, l' $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$  mostra un increment de la regió que correspon als *loops/girs- $\beta$* , i aquest increment és progressivament major durant la incubació (Figura 4. 9-B/Taula 4. 4); per exemple, a 25 °C aquesta banda representa el 33 % de l'àrea total del espectre, mentre que als 16 dies el valor ja arribar a ser del 52 % (Taula 4. 4). Pel que fa a la component en hèlix- $\alpha$ , disminueix un 4 % després de la primera incubació però s'incrementa després dels 8 dies sense recuperar el 14 % inicial. Aquest patró de canvi conformacional de les hèlix- $\alpha$  també es dona en el domini PDZ3 però a partir dels 4 dies d'incubació, i recuperant totalment el tant per cent als 16 dies (Taula 4. 4).

Pel que fa al percentatge de component- $\beta$ , després d'incubar durant 5 min, canvia de forma dràstica. Totes dues fulles- $\beta$  natives, la flexible i l'estable, es perden a favor de la component en agregats- $\beta$ , la banda de 1620  $\text{cm}^{-1}$ , que creix del 6 al 29 %. En el domini PDZ3 sencer, la fulla- $\beta$  estable es manté més o menys constant al llarg de tots els temps d'incubació, i la component- $\beta$  flexible també decreix, però, de nou, ho fa a partir dels quatre dies.

Tot i l'important augment de la banda a 1620  $\text{cm}^{-1}$  als 5 min d'incubació, assolint el 29 % de l'àrea total, a partir d'aquí disminueix progressivament a favor de l'increment en *loops* i *girs- $\beta$* , tal i com s'ha mencionat anteriorment. Després de 16 dies d'incubació, la banda d'agregats- $\beta$  representa el 17 % de l'espectre.

Aquesta ràpida reorganització fa pensar que, l'estat intermediari monomèric ja es troba en conformació de fulla- $\beta$  compacta (banda a 1620  $\text{cm}^{-1}$ ), fent possible les interaccions intermoleculares que donen lloc a la seva associació i oligomerització.

### 4.3. Interacció hèlix- $\alpha$ 3 i *loop* $\beta$ 2- $\beta$ 3 i el seu efecte sobre l'agregació del domini PDZ3.

A part de la variant  $\Delta$ 10ct-PDZ3, s'ha realitzat un anàlisi mutacional sobre els residus implicats en les interaccions entre el domini i l'hèlix- $\alpha$ 3, concretament les interaccions entre la Lys355 ( $\beta$ 4) i el Glu401 ( $\alpha$ 3), mutació E401R, i l'establerta entre el Glu334 (*loop*  $\beta$ 2- $\beta$ 3) i l'Arg399 ( $\alpha$ 3), mutació E334L/Q. També s'ha indagat sobre la rellevància de la circularització, en forma d'anell de succinimida, del residu Asp332 a través de les mutacions D332G/P, aquest últim emularia l'efecte de l'aspàrtic circularitzat.

#### 4.3.1. Estructura secundària del estat natiu dels mutants de PDZ3.

A 25 °C les estructures secundàries irregulars, *loops* i girs- $\beta$ , que es situen la regió de 1690-1660  $\text{cm}^{-1}$ , creixen clarament en els mutants localitzats al *loop*  $\beta$ 2- $\beta$ 3 (D332 i E334), però no per aquells on s'han mutat residus de l'hèlix- $\alpha$ 3 (E401R i  $\Delta$ 10ct-PDZ3) (Figura 4. 10/Taula 4. 5). Això implica un cert grau de descompactació de l'estat natiu degut a l'alteració de la regió del *loop*  $\beta$ 1- $\beta$ 2. Pel que fa a la banda de fulla- $\beta$  flexible (1640  $\text{cm}^{-1}$ ), disminueix en tots els mutants, mentre que la estable (1630  $\text{cm}^{-1}$ ), incrementa lleugerament, tot i no ser un canvi tan obvi com en el cas de l' $\Delta$ 10ct-PDZ3. Per altra banda, la component en agregats- $\beta$  dels diferents mutants és molt similar a la del PDZ3 (un 3-4 % de l'àrea en tots els casos).

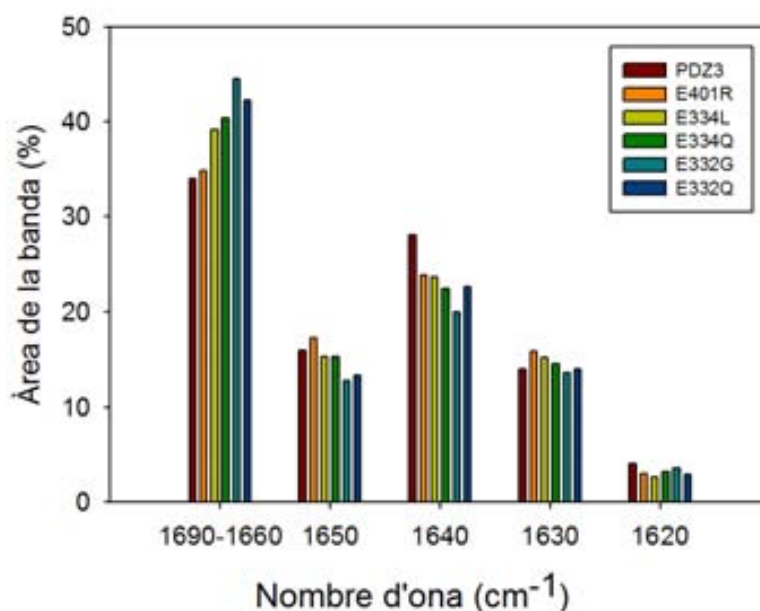


Figura 4. 10. Comparació dels principals components de l'espectre natiu de FTIR dels mutants del domini PDZ3, adquirits en tampó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.5 i a 25 °C.

- **Mutació E401R (hèlix- $\alpha$ 3).**

El residu Glu401 és localitzat a l'extrem C-terminal de l'hèlix- $\alpha$ 3; el fet de mutar-lo per un residu d'arginina implica la introducció de càrrega positiva, que permet la interacció d'aquest amb l'últim grup carboxil de l'hèlix, disminuint el dipol elèctric del motiu estructural i, com a conseqüència, aquest és estabilitzat. Per altra banda, aquesta mutació trenca la interacció entre el Glu334 (de l' $\alpha$ 3) i la Lys355 (de la cadena- $\beta$ 4), que desestabilitzaria la hèlix- $\alpha$ . Els dos efectes oposats resulten en una nul·la alteració de la component en hèlix- $\alpha$ , centrada a  $1650\text{ cm}^{-1}$  (Figura 4. 10/Taula 4. 5). En canvi, respecte a la fracció en fulla- $\beta$ , la mutació causa la seva estabilització, incrementant la banda de  $1630\text{ cm}^{-1}$  a expenses de la de  $1640\text{ cm}^{-1}$ , de forma similar al cas de l' $\Delta$ 10ct-PDZ3.

- **Mutació E334L/Q (loop  $\beta$ 2- $\beta$ 3).**

Les mutacions en el residu Glu334 causen un major contingut en estructures secundàries irregulars ( $1690\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ ; 39 % i 40 % per E334L i E334Q, respectivament, respecte el 34 % per PDZ3), a expenses de la fracció en fulla- $\beta$  flexible, que disminueix més d'un 20 % (Figura 4. 10/Taula 4. 5). Aquest augment s'explica perquè el Glu334 estableix unió amb l'Arg399 (hèlix- $\alpha$ 3), i mutar-lo implica la pèrdua de la interacció i conseqüent desestabilització del *loop*  $\beta$ 2- $\beta$ 3 (Camara-Artigas et al. 2010). Les fraccions d'hèlix- $\alpha$  i d'agregats- $\beta$  es mantenen pràcticament inalterades respecte el PDZ3.

- **Mutació D332G/P (loop  $\beta$ 2- $\beta$ 3).**

Les mutacions al residu Asp332, situada al *loop*  $\beta$ 2- $\beta$ 3, causen el major increment en estructura secundària irregular d'entre tots els constructes de PDZ3, sent un 45 % i 42 % per D332G i D332P, respectivament, respecte el 34 % del PDZ3 (Figura 4. 10/Taula 4. 5). Especialment, augmenta la flexibilitat del *loop* quan s'introdueix un residu de glicina. L'anell de succinimida format per aquest residu en el PDZ3, que sembla que disminueixi aquesta flexibilitat (Camara-Artigas et al. 2010), no pot formar-se espontàniament en aquests dos mutants, però l'efecte és mimetitzat pel residu de prolina.

Mutar l'Asp332 implica una lleugera reducció de la fracció en hèlix- $\alpha$  (13 % respecte el 16 % per PDZ3), per una possible desestabilització de l' $\alpha$ 3.

La banda de fulla- $\beta$  flexible decreix per a tots dos mutants, un 20 % i un 23 % per D332G i D332P, respectivament, respecte el 28 % per PDZ3. Tot i això, la  $\beta$ -estable es manté inalterada, sent l'estructura irregular ( $1690\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ ) la que es veu incrementada (Figura 4. 10/Taula 4. 5).

**Taula 4. 5. Descomposició en bandes de l'espectre deconvolucionat de FTIR dels mutants del domini PDZ3 adquirit en tampó KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7.5, i comparació amb els valors del domini PDZ3.**

	PDZ3		E401R		D332G		D332P		E334L		E334Q	
<b>25 °C, 0 dies</b>	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)
Girs-β	1694	1	1692	3	1691	9	1691	7	1691	5	1691	6
Fulla-β anti. d'alta freqüència	1680	8	1680	8	1679	10	1679	10	1679	9	1679	9
Girs-β	1669	9	1669	8	1668	9	1668	9	1668	9	1668	9
<b>Loops/Girs-β</b>	<b>1659</b>	<b>16</b>	<b>1659</b>	<b>16</b>	<b>1659</b>	<b>16</b>	<b>1659</b>	<b>17</b>	<b>1659</b>	<b>17</b>	<b>1659</b>	<b>17</b>
Hèlix-α	1650	16	1649	17	1649	13	1649	13	1649	15	1649	15
<b>Fulla-β flexible/ Random coil</b>	<b>1640</b>	<b>28</b>	<b>1640</b>	<b>24</b>	<b>1641</b>	<b>20</b>	<b>1641</b>	<b>23</b>	<b>1641</b>	<b>24</b>	<b>1640</b>	<b>22</b>
Fulla-β anti. de baixa freqüència	1630	14	1631	16	1630	14	1630	14	1630	15	1630	15
<b>WL/Amiloide</b>	<b>1620</b>	<b>4</b>	<b>1621</b>	<b>3</b>	<b>1621</b>	<b>4</b>	<b>1621</b>	<b>3</b>	<b>1621</b>	<b>3</b>	<b>1621</b>	<b>3</b>
Cadenes laterals	1606	4	1605	5	1605	5	1605	4	1605	4	1605	4
<b>60 °C, 5 min</b>	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)
Girs-β	1695	1	1691	4	1691	8	1691	8	1691	6	1691	7
Fulla-β anti. d'alta freqüència	1684	2										
	1676	9	1679	10	1678	11	1678	11	1679	10	1678	10
Girs-β	1669	7	1669	8	1668	9	1668	9	1668	9	1668	9
<b>Loops/Girs-β</b>	<b>1659</b>	<b>15</b>	<b>1659</b>	<b>13</b>	<b>1659</b>	<b>14</b>	<b>1659</b>	<b>14</b>	<b>1659</b>	<b>13</b>	<b>1659</b>	<b>14</b>
Hèlix-α	1649	16	1649	10	1648	10	1648	10	1649	10	1649	11
<b>Fulla-β flexible/ Random coil</b>	<b>1640</b>	<b>19</b>	<b>1641</b>	<b>14</b>	<b>1641</b>	<b>14</b>	<b>1641</b>	<b>14</b>	<b>1641</b>	<b>14</b>	<b>1641</b>	<b>15</b>
Fulla-β anti. de baixa freqüència	1631	16	1631	11	1630	11	1630	12	1630	11	1630	12
<b>WL/Amiloide</b>	<b>1620</b>	<b>12</b>	<b>1619</b>	<b>26</b>	<b>1620</b>	<b>19</b>	<b>1620</b>	<b>17</b>	<b>1619</b>	<b>23</b>	<b>1620</b>	<b>19</b>
Cadenes laterals	1606	3	1606	4	1608	4	1609	4	1608	4	1608	2
<b>60 °C, 4 dies</b>	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)
Girs-β	1692	2	1694	1	1695	1	1695	1	1695	1	1695	1
Fulla-β anti. d'alta freqüència	1679	12	1681	11	1683	6	1683	7	1682	11	1683	5
Girs-β	1668	8	1668	12	1672	12	1669	15	1668	12	1671	13
<b>Loops/Girs-β</b>	<b>1658</b>	<b>13</b>	<b>1658</b>	<b>10</b>	<b>1658</b>	<b>18</b>	<b>1659</b>	<b>8</b>	<b>1659</b>	<b>10</b>	<b>1659</b>	<b>12</b>
Hèlix-α	1648	13	1649	12	1647	9	1649	14	1649	13	1648	16
<b>Fulla-β flexible/ Random coil</b>	<b>1640</b>	<b>13</b>	<b>1640</b>	<b>12</b>	<b>1640</b>	<b>10</b>	<b>1640</b>	<b>10</b>	<b>1640</b>	<b>13</b>	<b>1640</b>	<b>6</b>
Fulla-β anti. de baixa freqüència	1631	13	1631	10	1631	11	1631	11	1630	11	1632	15
<b>WL/Amiloide</b>	<b>1620</b>	<b>22</b>	<b>1619</b>	<b>28</b>	<b>1619</b>	<b>30</b>	<b>1619</b>	<b>30</b>	<b>1619</b>	<b>25</b>	<b>1619</b>	<b>27</b>
Cadenes laterals	1606	4	1606	4	1606	4	1606	4	1606	4	1606	3
<b>60 °C, 8 dies</b>	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)
Girs-β	1692	2	1694	3	1694	2	1694	2	1695	1	1694	2
Fulla-β anti. d'alta freqüència			1683	12	1683	10	1683	11	1682	13	1683	10
	1679	12										
Girs-β	1668	8	1670	19	1669	19	1670	20	1670	9	1669	16
<b>Loops/Girs-β</b>	<b>1658</b>	<b>13</b>	<b>1659</b>	<b>10</b>	<b>1659</b>	<b>9</b>	<b>1659</b>	<b>9</b>	<b>1659</b>	<b>15</b>	<b>1659</b>	<b>10</b>
Hèlix-α	1648	13	1650	8	1650	9	1650	8	1649	8	1650	10
<b>Fulla-β flexible/ Random coil</b>	<b>1640</b>	<b>13</b>	<b>1641</b>	<b>15</b>	<b>1641</b>	<b>14</b>	<b>1641</b>	<b>15</b>	<b>1641</b>	<b>15</b>	<b>1641</b>	<b>14</b>
Fulla-β anti. de baixa freqüència	1631	13	1631	7	1631	8	1631	7	1631	9	1631	9
<b>WL/Amiloide</b>	<b>1620</b>	<b>22</b>	<b>1619</b>	<b>23</b>	<b>1619</b>	<b>25</b>	<b>1619</b>	<b>24</b>	<b>1619</b>	<b>25</b>	<b>1619</b>	<b>25</b>
Cadenes laterals	1606	4	1606	4	1606	4	1606	4	1606	4	1606	5

	PDZ3		E401R		D332G		D332P		E334L		E334Q	
<b>60 °C, 16 dies</b>	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)	Centre (cm <sup>-1</sup> )	Àrea (%)
Girs-β	1694	1	1694	3	1694	2	1694	2	1695	1	1695	1
Fulla-β anti. d'alta freqüència	1680	10	1683	14	1683	13	1683	11	1682	10	1681	10
Girs-β	1668	11	1669	23	1669	20	1669	20	1670	9	1670	7
<b>Loops/Girs-β</b>	<b>1659</b>	<b>12</b>	<b>1658</b>	<b>8</b>	<b>1658</b>	<b>9</b>	<b>1658</b>	<b>9</b>	<b>1659</b>	<b>15</b>	<b>1659</b>	<b>18</b>
Hèlix-α	1649	16	1649	10	1650	9	1650	9	1648	13	1648	14
<b>Fulla-β flexible/ Random coil</b>	<b>1640</b>	<b>11</b>	<b>1640</b>	<b>14</b>	<b>1641</b>	<b>15</b>	<b>1640</b>	<b>15</b>	<b>1640</b>	<b>10</b>	<b>1640</b>	<b>8</b>
Fulla-β anti. de baixa freqüència	1630	18	1630	7	1631	6	1631	7	1631	14	1631	16
<b>WL/Amiloide</b>	<b>1621</b>	<b>19</b>	<b>1619</b>	<b>18</b>	<b>1619</b>	<b>22</b>	<b>1619</b>	<b>23</b>	<b>1619</b>	<b>25</b>	<b>1620</b>	<b>24</b>
Cadenes laterals	1607	3	1607	4	1606	4	1606	4	1606	3	1606	3

#### 4.3.2. Estructura secundària del intermediari d'agregació dels mutants de PDZ3.

Els canvis conformacionals dels diferents mutants del domini PDZ3, un cop incubats a 60 °C, han estat estudiats després de ser equilibrats durant 5 min, i després de ser incubats durant 4, 8, i 16 dies.

##### - Mutació E401R (hèlix-α3).

A la mutació E401R, la regió corresponent a *loops/girs-β* (1690-1660 cm<sup>-1</sup>) es manté invariable fins als 8 dies d'incubació, quan es dona un clar increment de la component, i que és major als 16 dies (Figura 4. 11/Taula 4. 5).

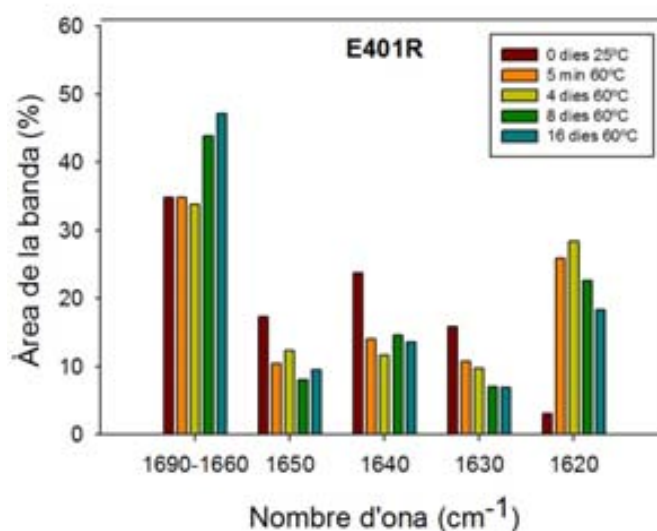


Figura 4. 11 Evolució, en funció del temps d'incubació a 60°C, dels principals components de l'espectre natiu de FTIR del mutant PDZ3-E401R, adquirits en tampó KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM, pH 7.5.

La banda de les hèlix-α (1650 cm<sup>-1</sup>) i de fulles-β (tan flexible com estable, 1640 i 1630 cm<sup>-1</sup>), disminueixen progressivament durant la incubació, a favor de la banda

d'agregats- $\beta$ . Aquesta banda, però, disminueix lleugerament a períodes d'incubació llargs (8 i 16 dies), que és quan augmenten les estructures irregulars ja comentades.

En aquest mutant, que a priori estabilitza la hèlix- $\alpha$ 3, sorprenentment la disminueix després dels 5 min a 60 °C (Figura 4. 11/Taula 4. 5). S'ha de tenir en compte que la mutació evita la interacció entre el Glu401 i la Lys355 (a la  $\beta$ 4), pel que es dedueix que l'energia d'aquesta interacció és major que l'energia que es guanya en disminuir el dipol elèctric de l'hèlix- $\alpha$ . Sigui com sigui, segueix el mateix comportament que la variant  $\Delta$ 10ct-PDZ3, tal i com s'ha explicat en apartats anteriors.

#### - Mutació E334L/Q (*loop* $\beta$ 2- $\beta$ 3).

Els dos mutants de la posició Glu334, els E334L/Q (Figura 4. 12/Taula 4. 5), segueixen un comportament similar. La regió de *loops/girs*- $\beta$  decreixen progressivament durant la incubació, mentre que la banda d'hèlix- $\alpha$  fluctua al voltant del valor obtingut a 25 °C. Les bandes de fulla- $\beta$  flexible i estable, a 1640 i 1630  $\text{cm}^{-1}$ , respectivament, disminueixen durant la incubació, en concordança amb l'increment de la banda de agregats- $\beta$ , a 1620  $\text{cm}^{-1}$ . Tot i això, als 16 d'incubació, la fulla- $\beta$  estable tendeix a recuperar-se cap als valors inicials, especialment en el cas del mutant E334Q.

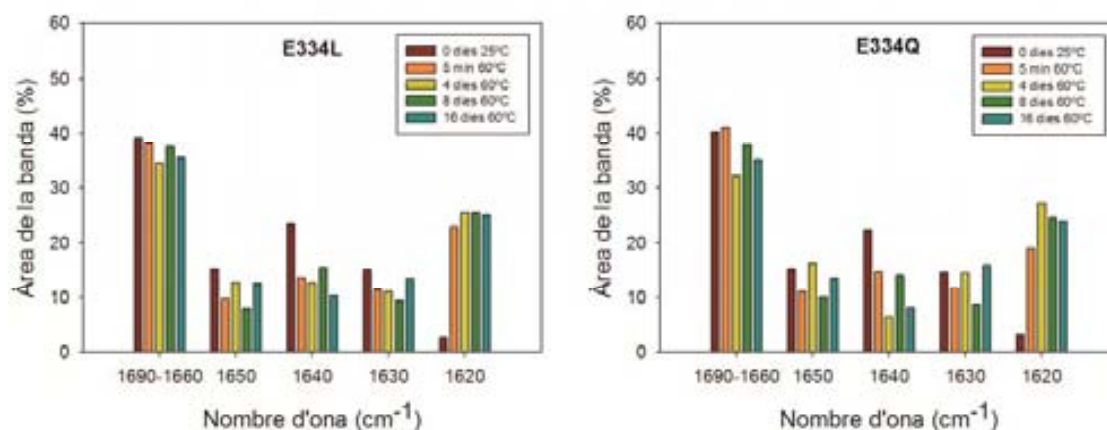


Figura 4. 12. Evolució, en funció del temps d'incubació a 60°C, dels principals components de l'espectre natiu de FTIR dels mutant PDZ3-E334L/Q, adquirits en tampó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.5.

#### - Mutació D332G/P (*loop* $\beta$ 2- $\beta$ 3).

Pel que fa al mutant D332G, és comporta de manera semblant als del residu Glu334. La regió dels *loops/girs-β* decreix progressivament durant la incubació, mentre que la banda d'hèlix- $\alpha$  fluctua al voltant del valor obtingut a 25 °C. Les bandes de fulla- $\beta$  flexible i estable, a 1640 i 1630  $\text{cm}^{-1}$ , respectivament, disminueixen progressivament durant la incubació. La banda dels agregats- $\beta$ , a 1620  $\text{cm}^{-1}$ , incrementa significativament als 5 min a 60 °C. El mutant D332P també segueix aquesta tendència, malgrat que la regió de *loops/girs-β* tan sols varia als quatre dies d'incubació; que es mantinguin les estructures irregulars pot ser degut a les restriccions conformacionals del residu de prolina. Cap dels dos mutants, a diferència dels del Glu334, recuperen part de l'estructura en fulla- $\beta$ , ni la estable ni la flexible (Figura 4. 13/Taula 4. 5).

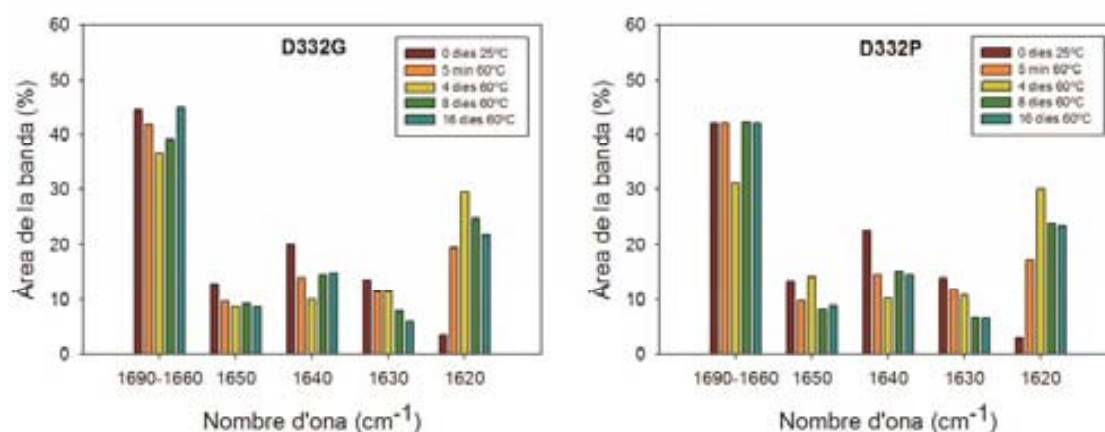


Figura 4. 13. Evolució, en funció del temps d'incubació a 60 °C, dels principals components de l'espectre natiu de FTIR dels mutants PDZ3-D334G/P, adquirits en tampó  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, pH 7.5.

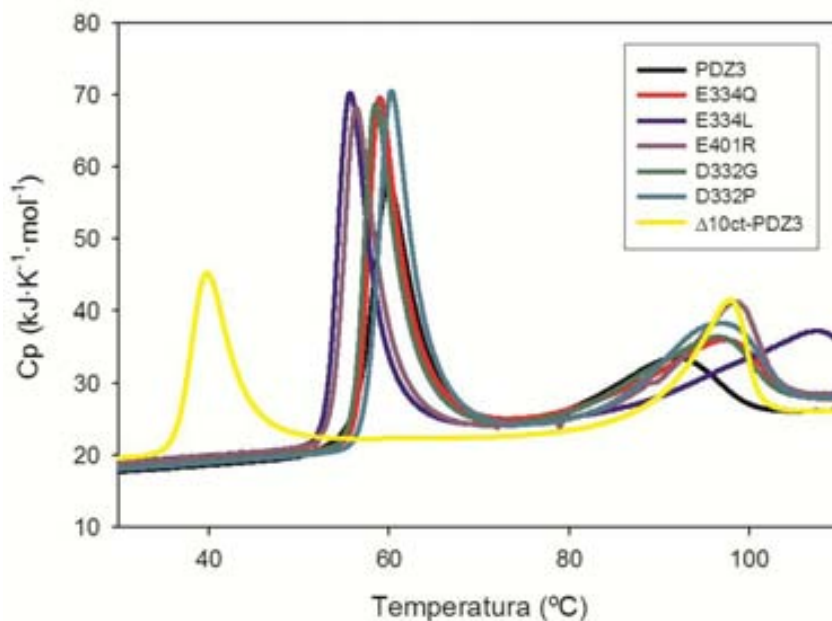
#### 4.4. Anàlisi calorimètric (DSC) del mutants del domini PDZ3.

Tal i com s'ha fet amb el domini PDZ3 sencer i el  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$ , per a cada un dels mutants s'han realitzat experiments de DSC. Aquests experiments i l'anàlisi de resultats han estat desenvolupats pel Dr. Murciano-Calles, J., de la Universitat de Granada (Murciano-Calles 2011).

Comparant el perfil de DSC dels diferents mutants (Figura 4. 14), tots ells mostren una major similitud amb el perfil del domini PDZ3 ja publicat (Murciano-Calles et al. 2010), que no amb la variant  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$ . Conseqüentment, les traces calorimètriques dels mutants han estat ajustats al model de tres estats ( $nN \rightleftharpoons I_n \rightleftharpoons nD$ ) emprat per al PDZ3 sencer, enlloc del model de quatre estats de l' $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$ . Amb excepció del mutant E401R, l'ajust ha estat assolit amb una bona convergència, obtenint així els paràmetres



termodinàmics de l'equilibri d'associació, de l'estat natiu, i del desplegat, de la mateixa manera que pel domini PDZ3 (Murciano-Calles et al. 2010).



**Figura 4. 14.** Comparació de les corbes del desplegament tèrmic del domini PDZ3 i les seves variants obtingudes per DSC. *Imatges extretes de Murciano-Calles 2011.*

En el cas del mutant E401R, no es va obtenir cap convergència raonable mitjançant el model de tres estats, per tant, es va optar per ajustar-lo sobre el nou model de quatre estats descrit per a la variant  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$ .

El conjunt de paràmetres termodinàmics obtinguts de les diferents variants del domini PDZ3, a partir de les dades de DSC i en funció de si segueixen un model de tres o quatre estats, es troben recollits a la taula següent:

**Taula 4. 6.** Paràmetres termodinàmics del desplegament tèrmic del domini PDZ3 i les seves variants. Les dades han estat obtingudes a partir de l'anàlisi de DSC amb el model de tres o quatre estats, depenent de la variant. *Dades obtingudes per Murciano-Calles, J..*

Model de tres estats						
	$T_{U-N}$ (°C)	$\Delta H_{U-N}(T_{U-N})$ kJ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta G_{U-N}(298)$ kJ·mol <sup>-1</sup>	$T_{In-U}$ (°C)	$\Delta H_{In-U}(T_{In-U})$ kJ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta G_{In-U}(343)$ kJ·mol <sup>-1</sup>
PDZ3	70.4 ± 0.5	335 ± 20	39 ± 6	79.2 ± 1.2	-130 ± 20	-25 ± 5
D332G	70.1 ± 1.5	360 ± 40	33 ± 8	88.6 ± 2.0	-145 ± 40	-24 ± 7
D332P	71.6 ± 2.0	360 ± 25	33 ± 7	89.9 ± 2.0	-160 ± 30	-25 ± 5
E334L	67.4 ± 1.3	300 ± 10 (1-3)	25 ± 4	96.0 ± 1.5	-145 ± 20	-24 ± 3
E334Q	70.1 ± 1.5	370 ± 25	32 ± 6	89.0 ± 1.5	-145 ± 20	-41 ± 10

Model de quatre estats										
	$T_{I-N}$ (°C)	$\Delta H_{I-N}$ ( $T_{I-N}$ ) kJ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta G_{I-N}$ (298) kJ·mol <sup>-1</sup>	$T_{U-I}$ (°C)	$\Delta H_{U-I}$ ( $T_{U-I}$ ) kJ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta G_{U-I}$ (298) kJ·mol <sup>-1</sup>	$T_{In-I}$ (°C)	$\Delta H_{In-I}$ ( $T_{In-I}$ ) kJ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta G_{In-I}$ (343) kJ·mol <sup>-1</sup>	$\Delta G_{U-N}$ (298) kJ·mol <sup>-1</sup>
<b><math>\Delta 10\text{ct-PDZ3}</math></b>	51.6 ± 3	250 ± 20	28 ± 8	78.5 ± 3	215 ± 10	17 ± 6	124.6 ± 4	-135 ± 15	-27 ± 5	28 ± 10
<b>E401R</b>	64.4 ± 3.5	315 ± 30	57 ± 10	87.5 ± 7	300 ± 25	35 ± 12	127.7 ± 4	-115 ± 20	-24 ± 6	81 ± 20

Al comparar els valors de  $\Delta G$ , sembla ser que els mutants a les posicions E332 i D334 presenten estabilitats similars al domini PDZ3 però tenen una major tendència a l'agregació, tal i com s'ha observat per FTIR. Pel que fa a la mutació E401R, clarament presenta una estabilitat molt superior al PDZ3 i resta de variants, però no sembla que tingui una major tendència a l'agregació, segons s'extrau del anàlisi per FTIR.

## 5. DISCUSSIÓ.

### 5.1. La fulla- $\beta$ flexible dóna lloc a l'agregació del PDZ3.

La banda d'amida I' de l'espectre de FTIR, es localitza entre els 1700 i 1600  $\text{cm}^{-1}$  i, bàsicament, sorgeix de la vibració del enllaç C=O de l'esquelet peptídic. L'assignació de les diferents estructures secundàries dins la regió d'amida I' resulta complicada degut a l'elevada sensibilitat de la radiació infraroja davant de factors estructurals i ambientals (Arrondo et al. 2003). L'assignació més compromesa és la dels girs- $\beta$ , on diferents bandes es localitzen dins la regió d'entre 1700 i 1660  $\text{cm}^{-1}$ . Els pics centrats a 1670 i 1660  $\text{cm}^{-1}$  són, generalment, assignats a elements d'estructura secundària irregulars, com ara els girs- $\beta$  (Byler, Susi 1986), tot i que els *loops* estables també contribueixen a la banda de 1660  $\text{cm}^{-1}$  (Heredia, De Las Rivas 2003). Per més dificultat, la banda propera als 1680  $\text{cm}^{-1}$  és assignada a la component en fulla- $\beta$  antiparal·lela d'alta freqüència, la qual no és detecta en estructures en fulla- $\beta$  paral·lela ((Chirgadze, Nevskaya 1976, Goormaghtigh, Cabiaux & Ruyschaert 1994, Zandomenighi et al. 2004). A més, també dins aquesta regió de 1700-1660  $\text{cm}^{-1}$ , la banda de 1690  $\text{cm}^{-1}$ , quasi negligible, ha estat atribuïda a la fulla- $\beta$  paral·lela (Chirgadze, Nevskaya 1976), tot i que alguns autors la identifiquen com a girs- $\beta$  (Olinger et al. 1986).

Pel que fa a la regió de 1655-1630  $\text{cm}^{-1}$ , el pic al voltant de 1650  $\text{cm}^{-1}$  és indicatiu de contingut en hèlix- $\alpha$ , mentre que els pics a 1645-1640  $\text{cm}^{-1}$  i 1640-1630  $\text{cm}^{-1}$ , corresponent a *random coil* i fulla- $\beta$ , respectivament (Arrondo, Goni 1999).

Com a regla general, un increment en interaccions d'hidrogen resulta en un desplaçament cap números d'ona més baixos, el qual explicaria perquè els agregats de tipus WL contenen pics de fulla- $\beta$  centrades a 1630-1620  $\text{cm}^{-1}$ , i els agregats amiloides a 1620-1615  $\text{cm}^{-1}$  (Zandomenighi et al. 2004). L'espectre de l'estat intermediari del domini PDZ3, a 60 °C, mostra un augment del 18 % de la banda de 1620  $\text{cm}^{-1}$ , al límit entre la regió WL i l'amiloide (Figura 4. 1/Taula 4. 1). Aquests dos tipus d'agregats- $\beta$  segueixen vies d'agregació diferents, les fibres amiloides segueixen una cinètica depenent de nucleació (sigmoïdal, cooperativa), mentre que les fibres WL no en són dependents, sinó que creixen exponencialment i de forma no cooperativa (Gosal et al. 2005). Prèviament, s'ha reportat que el domini PDZ3 uneix el fluoròfors ThT i ANS durant la cinètica d'agregació, i que ho fa de manera exponencial (Murciano-Calles et al. 2010). Conseqüentment, el procés no requereix d'un nucli prèviament format, estable i ja organitzat en estructura- $\beta$  ordenada. Per acabar de discernir si la component de FTIR en fulla- $\beta$  a 1620  $\text{cm}^{-1}$  correspon a fibres WL o amiloides, s'han obtingut imatges per TEM (Figura 4. 4). La presència de fibres

corbades i relativament curtes definitivament confirma que els agregats del domini PDZ3 són fibres WL.

Desafortunadament, la concentració de proteïna i la temperatura emprada per als assajos de citotoxicitat han de ser diferents dels usats per a l'estudi d'agregació per FTIR. Tenint en compte que el procés d'agregació del domini PDZ3 ha estat descrit com a reversible (Murciano-Calles et al. 2010), és important anar en compte a l'hora d'interpretar els resultats de cultius cel·lulars (Figura 4. 5). A les condicions assajades, la via d'agregació pot haver-se desplaçat cap a estadis inicials de l'agregació, com per exemple l'oligòmer trimèric, quan el domini agregat a 60 °C és diluït 10 vegades als cultius i incubat durant 24 h a 37 °C. Tot i això, és important determinar si els precursors de l'agregació WL del domini PDZ3 són citotòxics o no, pel fet de que altres estats oligomèrics han estat descrits com a espècies citotòxiques en determinades proteïnes amb tendència a l'agregació (Chiti, Dobson 2006), com també no tòxiques per a altres (Marin-Argany et al. 2011). A més, la citotoxicitat dels agregats de PDZ3 incrementa a mesura que augmenta el temps d'incubació a 60 °C previ als cultius. Per tant, sembla que la via d'agregació del domini és, tan sols, parcialment reversible, i que aquesta reversibilitat decreix a mesura que avança el procés d'agregació cap a estadis finals. De fet, s'ha demostrat prèviament, que els agregats formats durant més de 16 dies, es mantenen en solució tot i disminuir la temperatura als 25 °C (Murciano-Calles et al. 2010).

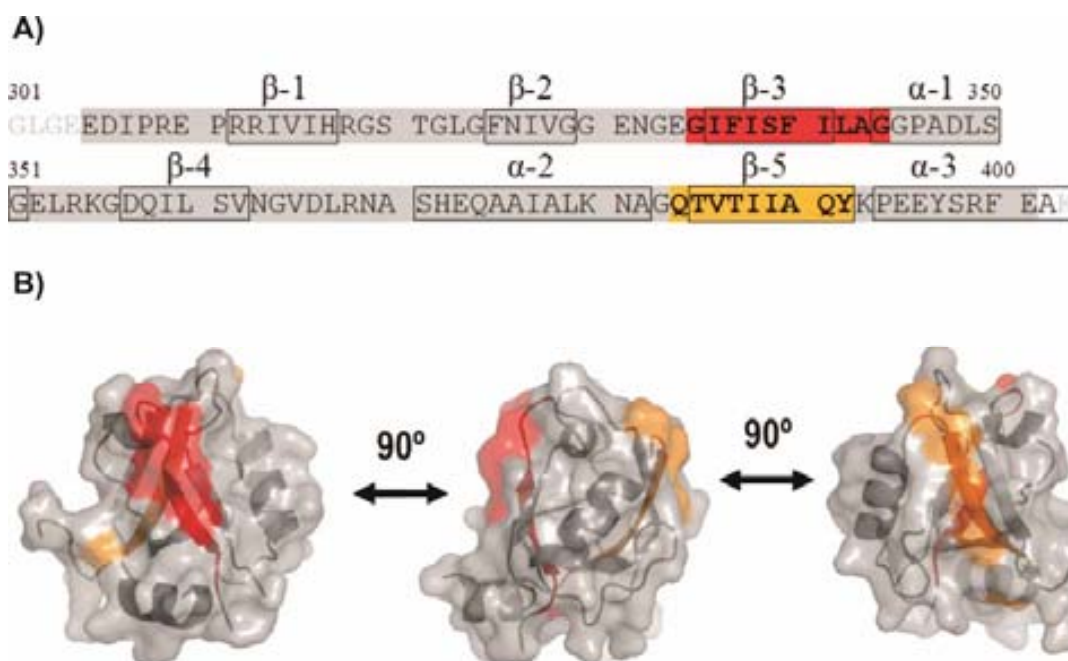
## 5.2. Importància de la cadena- $\beta$ 3 en la reorganització de la fulla- $\beta$ flexible.

Els experiments de FTIR a 25 °C (Figura 4. 1/Taula 4. 1) revelen un contingut en hèlix- $\alpha$  inferior a aquell determinat a partir de les dades cristal·logràfiques (codi PDB 3K82) (Camara-Artigas et al. 2010). L'explicació més plausible a aquesta diferència seria que l'hèlix- $\alpha$ 1, empaquetada contra la fulla- $\beta$  flexible, pateix una desorganització en solució. Així, la disminució de la fracció d'hèlix- $\alpha$  després de la incubació a 60 °C seria deguda a la pèrdua de l'hèlix- $\alpha$ 1, mentre que l' $\alpha$ 2 i l' $\alpha$ 3 es mantindrien intactes en l'estat intermediari. Aquest fet també s'explica amb l'espectre de correlació de  $^1\text{H}$ - $^{15}\text{N}$ , el qual mostra que part dels residus que es mantenen intactes en funció de la temperatura, estableixen contactes directes amb l'hèlix- $\alpha$ 2 (Figura 4. 6).

Tal i com s'ha descrit més amunt, la banda d'infraroig de 1660  $\text{cm}^{-1}$  correspon a la fracció de girs- $\beta$  i *loops*, i decreix al incubar a 60 °C (Figura 4. 1). El domini PDZ3 conté 4 regions *loop* majors de 4 residus, el *loop*  $\beta$ 1- $\beta$ 2, el  $\beta$ 2- $\beta$ 3, l' $\alpha$ 1- $\beta$ 4, i el *loop*  $\beta$ 4- $\alpha$ 2. Els *loops*  $\beta$ 2- $\beta$ 3 i  $\alpha$ 1- $\beta$ 4 podrien ser els responsables de la disminució de la banda de FTIR a 1660  $\text{cm}^{-1}$ , ja que es troben localitzats dins la regió de la molècula que és flexible i que es desorganitza durant l'agregació, d'acord amb els experiments de HSQC-RMN (Figura 4. 6).

El *loop*  $\beta$ 1- $\beta$ 2 es troba proper a la fulla- $\beta$  formada per les cadenes estables  $\beta$ 1 i  $\beta$ 5, però com que la cadena- $\beta$ 2 pateix cert grau de desorganització, es fa difícil discernir si aquest *loop* també participa a disminuir la banda de  $1660\text{ cm}^{-1}$  o no. A part, el *loop*  $\beta$ 4- $\alpha$ 2 es troba empaquetat contra l' $\alpha$ 2, i conté aquells residus que es mantenen conformacionalment, a part dels de les cadenes  $\beta$ 1 i  $\beta$ 5, i que interaccionen amb l' $\alpha$ 2, per tant, és evident que aquest *loop* manté la seva conformació nativa.

Pel que fa a l'algoritme TANGO, emprat per a determinar les regions amb tendència a l'agregació (Fernandez-Escamilla et al. 2004), el domini PDZ3 mostra una tendència pràcticament nul·la en tot el domini amb excepció dels residus 335-344 (que formen part del motiu estructural  $\beta$ 3- $\alpha$ 1), i dels residus 384-392 (localitzats a la cadena  $\beta$ 5) (Figura 4. 14-A).



**Figura 4. 15. Anàlisi per TANGO de les regions propenses a l'agregació del domini PDZ3.** A) Estructura secundària i regions amb tendència a l'agregació. La regió dels residus 335-344 ( $\beta$ 3- $\alpha$ 1) és marcada en vermell, mentre que la regió dels residus 384-392 ( $\beta$ 5) és marcada en taronja. B) Representació del model tridimensional de l'estructura del domini PDZ3 (codi PDB 3K82), on es mostren les dues interfícies amb tendència a l'agregació. Adopten una estructura en fulla- $\beta$  i es localitzen en cares oposades de l'estructura globular. Es representen tres punts de vista diferents de la molècula, rotats  $90^\circ$ .

La disposició tridimensional d'aquests residus dins l'estructura resolta a partir de la difracció de raigs-X (Camara-Artigas et al. 2010), mostren dues superfícies principals localitzades en cares oposades a l'estructura globular (Figura 4. 14-B), facilitant que cada monòmer interactuï amb altres dos addicionals, formant el trímer oligomèric precursor de l'agregació (Murciano-Calles et al. 2010). Justament, la regió  $\beta$ 3 i  $\alpha$ 1, que és la que presenta

més tendència a agregar, forma part de la fulla- $\beta$  flexible que es reorganitza durant la fibril·lació, tal i com s'ha resolt anteriorment. Però pel que fa a la regió de la cadena superficial  $\beta 5$ , tot i ser predita per TANGO, manté la conformació nativa durant l'agregació. Aquesta contradicció s'explica pel fet de que agregació no implica directament formació amiloide (Rousseau, Schymkowitz & Serrano 2006), i TANGO reconeix patrons amb tendència a l'agregació amorfa, no amiloide ni fibril·lar. En canvi, l'algoritme PASTA (Trovato et al. 2006), que prediu estructures involucrades en la formació d'agregats ordenats en fulla- $\beta$  creuada, tan sols reconeix la regió de fulla- $\beta$  flexible com a precursora de l'agregació, d'acord amb els nostres resultats obtinguts.

Un altre dada que corrobora que la fulla- $\beta$  flexible es la que pateix una reorganització estructural que dona lloc al intermediari ric en estructura- $\beta$ , és que la presència del pèptid lligand KKETAV, el de major afinitat pel domini PDZ3 ( $K_d = 1 \mu\text{M}$ ), afecta l'estabilitat del estat natiu, però no la del intermediari d'agregació (Murciano-Calles et al. 2010). Fet que s'explica perquè la butxaca d'unió a lligands, que es localitza a la cavitat entre la cadena- $\beta 2$  i l'hèlix- $\alpha 2$ , es veu pertorbada durant la via d'agregació. A més, el *loop*  $\beta 2$ - $\beta 3$  juga un paper important en la unió de pèptids (Mostarda, Gfeller & Rao 2012), i també es veu alterat degut a la desorganització de les cadenes  $\beta 2$  i  $\beta 3$ .

### 5.3. Rol de l'hèlix- $\alpha 3$ en el plegament i l'agregació del domini PDZ3.

Una comprensiva interpretació dels resultats obtinguts d'estudiar la via de plegament i d'agregació de la variant  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$ , emprant com a referència el domini PDZ3 sencer, on s'inclou l'hèlix- $\alpha 3$  al extrem C-terminal, ens permet confirmar que aquesta hèlix és un element regulador del plegament del domini PDZ3.

La deleció de l'hèlix- $\alpha 3$  no evita la reorganització que genera l'estat intermediari, prèviament detectat en el PDZ3 (Murciano-Calles et al. 2010). Però, tot i que l'anàlisi calorimètric (DSC) mostra una estequiometria trimèrica en els estadis inicials de l'associació, tal i com ho fa el PDZ3, en el cas de l' $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$  aquesta associació trimèrica no s'ha pogut detectar ni per cromatografia d'exclusió molecular, ni per DLS, on es detecten partícules de grandària superior (Murciano-Calles 2011). Aquesta característica podria ser conseqüència de la no reversibilitat dels agregats de l' $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$ , mentre que la presència de l' $\alpha 3$  genera un cert grau de reversibilitat dels estats oligomèrics (Murciano-Calles et al. 2010). Així, la ràpida inter-associació de les partícules trimèriques del  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$  podria ser la raó de la seva irreversibilitat.

En tot cas, totes les evidències que indiquen que la supressió de l'hèlix- $\alpha 3$  estabilitza l'intermediari a l'equilibri, han estat confirmades per la major tendència a

formar agregats fibril·lars per part de l' $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$ , en comparació amb el PDZ3 sencer (Taula 4. 4). La hèlix- $\alpha 3$  interactua amb residus de la regió  $\beta 2\text{-}\beta 3$  (Camara-Artigas et al. 2010), la qual ha estat predita per TANGO i Pasta com a propensa a l'agregació en fulla- $\beta$  ordenada (Figura 4. 15). Per tant, l'absència de l' $\alpha 3$  incrementa l'exposició al solvent d'aquesta regió, el qual facilita el desplegament i l'auto-associació dels dominis. L'estabilitat de les espècies intermediàries, però, es veu disminuïda a valors de pH per sota de 3.0, fet que dóna importància a les regions involucrades en la formació d'oligòmers (Murciano-Calles et al. 2011). En aquest sentit, la protonació dels residus Glu/Asp semblen ser els responsables d'aquesta desestabilització.

Els espectres de FTIR es troben en plena consonància amb la ràpida agregació del domini  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$ , i també mostren que és degut a les components en fulla- $\beta$  nativa del domini, tant la flexible com l'estable, les quals es perden a favor de la component en agregats- $\beta$  (Taula 4. 4). Fet que es confirma amb els resultats de l'algoritme TANGO, el qual revela que els residus 335-344 (regió  $\beta 3$ ) i 384-392 (regió  $\beta 5$ ) són els més propensos a agregar. En el cas del PDZ3 sencer, la hèlix- $\alpha 3$  protegeix, en certa manera, la tendència a l'agregació del domini, mantenint la integritat de la fulla- $\beta$  nativa formada per les cadenes  $\beta 1$  i  $\beta 5$ . En el cas de  $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$ , la cadena  $\beta 5$  passa a ser l'extrem C-terminal de la molècula, empitjorant l'empaquetament global del domini, i llavors, les cadenes  $\beta 1$  i  $\beta 5$  també esdevenen precursoras de l'agregació.

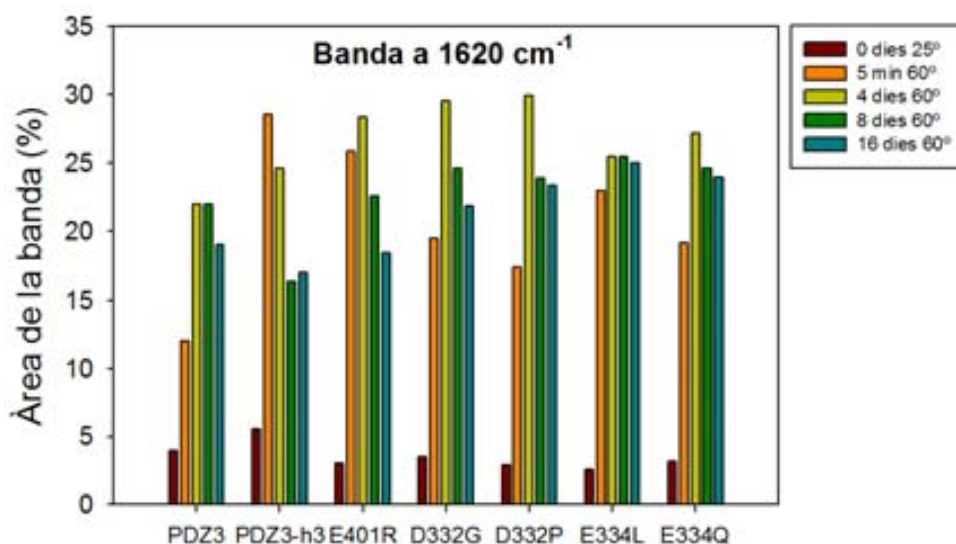
#### 5.4. Residus implicats en les interaccions entre l'hèlix- $\alpha 3$ i el domini PDZ3.

A part del paper regulador de l'hèlix- $\alpha$  addicional sobre el plegament del domini, també és un element regulador al·lostèric d'unió a pèptids lligands, tal i com ha estat descrit prèviament (Camara-Artigas et al. 2010, Mostarda, Gfeller & Rao 2012). Aquesta regulació a distància és possible gràcies al fort empaquetament de l'hèlix- $\alpha 3$  amb la regió  $\beta 2\text{-}\beta 3$ , molt propera a la butxaca d'unió a pèptids i que interacciona amb ells directament. Les interaccions entre l'Arg399 ( $\alpha 3$ ) i el Glu334 (*loop*  $\beta 2\text{-}\beta 3$ ), i el Glu401 ( $\alpha 3$ ) i la Lys355 ( $\beta 4$ ), empaqueten l'hèlix- $\alpha 3$  contra el domini, i és la primera interacció la que està directament implicada en la regulació de l'afinitat. A més, l'anell de succinimida format pel residu Asp332 (*loop*  $\beta 2\text{-}\beta 3$ ), juga un paper important sobre la flexibilitat d'aquest *loop*, i indirectament sobre l'empaquetament de les dues regions.

La mutació del residu Glu334 (E334L/Q) trenca la interacció amb l'Arg399, i, tal i com s'ha vist per FTIR, es veuen incrementades les components en estructura secundària irregular ( $1690\text{-}1660\text{ cm}^{-1}$ ) a expenses de la desestabilització de la fulla- $\beta$  flexible ( $1640\text{ cm}^{-1}$ ) (Figura 4. 10/Taula 4. 5). De la mateixa manera passa amb les mutacions D332G/P,

que eviten la formació de l'anell de succinimida. Per altra banda, al mutar el residu Glu401 (E401R) les fulles- $\beta$  no es veuen alterades. Això remarca la importància de la interacció entre l'hèlix- $\alpha 3$  i les cadenes  $\beta 2$  i  $\beta 3$ , tant a nivell d'afinitat com d'estabilització global de la molècula, disminuint la tendència a l'agregació. Per tant, trencar les interaccions entre aquestes dues regions del domini donaria lloc a una desestabilització de la regió del PDZ3 amb tendència a l'agregació, les cadenes  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  i  $\beta 4$ .

Pel que fa a la formació de l'estat intermediari a partir de monòmers mutants, el canvi principal en tots els mutants respecte el PDZ3, és el promiscu i significant increment de la banda a  $1620\text{ cm}^{-1}$  just després dels 5 min a  $60\text{ }^\circ\text{C}$  (Figura 4. 16/Taula 4. 5), corresponent als agregats- $\beta$  ordenats, principalment en el cas de l'E401R, quasi semblant a l' $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$  (un 26 % i 29 %, respectivament, *versus* el 12 % del PDZ3).



**Figura 4. 16.** Evolució, en funció del temps d'incubació a  $60\text{ }^\circ\text{C}$ , de la banda de  $1620\text{ cm}^{-1}$  de FTIR, corresponent als agregats- $\beta$ , del domini PDZ3 i les seves variants.

En concordança, aquest increment es troba relacionat amb la reorganització conformacional que pateix la fulla- $\beta$  nativa del domini durant la via d'agregació. En general, els mutants localitzats a l'hèlix- $\alpha 3$  (l' $\Delta 10\text{ct-PDZ3}$  i el E401R) són més propensos a l'agregació, tot i que als 16 dies d'incubació el tant per cent de la banda a  $1620\text{ cm}^{-1}$  és la mateixa que al domini PDZ3, un 18 % (Taula 4. 5). Els mutants, D332G/P i E334L/Q, tots quatre situats dins la regió del domini amb tendència a l'agregació, mostren una major tendència que el PDZ3 just després de la incubació inicial, i la mantenen al llarg de temps representant el 25 % de l'àrea, aproximadament. En definitiva, dels resultats de FTIR se'n extreu que tots els mutants donen lloc a proteïnes amb més tendència a l'agregació que el domini PDZ3.



## **VI. CONCLUSIONS GENERALS.**



**Aquest treball demostra la importància dels estats intermediaris a l'espai conformacional de les proteïnes, la seva relació amb les malalties conformacionals i l'aplicabilitat del seu coneixement en el desenvolupament de teràpies efectives.**

- **Capítol 1:**

- S'ha optimitzat l'obtenció d'un fragment d'anticòs recombinant específic contra oligòmers d'A $\beta$ <sub>1-42</sub>, l'scFv-h3D6, a partir del replegament de la fracció insoluble obtinguda dins del sistema d'expressió d'*E. coli* Origami2(DE3) i la proteïna de fusió *trx*, posteriorment eliminada per la proteasa específica TEV.
- L'scFv-h3D6 conté 4 residus cisteïna, dos per domini, els quals poden formar fins a 8 combinacions de ponts disulfur diferents, a banda de la nativa. Les formes *scrambled* modifiquen interaccions intra-domini, alteren dràsticament l'estabilitat global de la molècula, i augmenten la tendència a l'agregació de l'scFv-h3D6.
- Per cromatografia de bescanvi catiònic, s'ha pogut separar la forma nativa de les *scrambled*.
- Les estructures secundària i terciària de l'scFv-h3D6, estudiades per CD, fluorescència de triptòfan i FTIR, segons el cas, mostra el típic plegament tot- $\beta$  d'Ig, i on els residus triptòfan conservats dels nuclis hidrofòbics contribueixen en ell donant lloc als espectres particulars dels scFv.
- Sota pertorbació tèrmica, l'scFv-h3D6 entra a la via d'agregació en fulla- $\beta$  ordenada, independent de concentració i irreversible, la qual està poblada per un intermediari ric en estructura- $\beta$ .
- Per FTIR i TEM, s'ha comprovat que l'agregació per temperatura de l'scFv-h3D6 esdevé en la formació de fibres WL, mentre que el pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub> causant de l'Alzheimer dona lloc a fibres amiloides.
- Els assajos per MTT, mostren que els oligòmers del pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub>, induïts per temperatura, redueixen la viabilitat del cultiu cel·lular de neuroblastoma humà SH-SY5Y fins a un 60 %.
- La coïncubació de l'scFv-h3D6 amb el pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub> anul·la el seu efecte tòxic sobre les cèl·lules SH-SY5Y d'una manera dependent de concentració.
- En condicions natives, l'scFv-h3D6 inhibeix la formació de fibres amiloides i la citotoxicitat del pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub> mitjançant la retirada dels oligòmers d'A $\beta$ <sub>1-42</sub> de la via amiloide cap a la via WL.

- Les fibres WL formades pel complex  $A\beta_{1-42}$ :scFv-h3D6 són cinètica i termodinàmicament més favorables que les del l'scFv-h3D6 sol, ja que apareixen sense necessitat de tractament amb temperatura, i en presència de DMSO.
- La descripció del mecanisme pel qual l'scFv-h3D6 actua contra la toxicitat del pèptid  $A\beta_{1-42}$  obre una nova via per a millorar, en un futur, el seu potencial terapèutic.

**- Capítol 2:**

- S'ha obtingut un model tridimensional del fragment d'anticòs scFv-h3D6 específic contra el pèptid A $\beta$ <sub>1-42</sub>. El pdb motlle utilitzat, l'scFv 2GHW, té un grau global d'homologia al voltant del 94 % amb la nostra seqüència, característica que fa que el model sigui molt fiable.
- El 6 % de les mutacions no conservatives es troben en els CDR, les regions de reconeixement del antigen.
- La manca de resolució estructural del connector, degut a la seva elevada flexibilitat, ha fet necessari refinar la seva estructura 3D. Aquest fet implica una reestructuració de la resta de la molècula, principalment del domini VH, el menys estable en la majoria de les seqüències de l'alineament, però no en l'scFv-h3D6.
- Pel que fa a la classificació dels CDRs, tan sols el V<sub>H</sub>-CDR1 s'allunya del consens general, per la seva llargària i localització en el domini, i guanya importància en la funció d'interacció amb l'antigen.
- El model final conté un 51% de fulla- $\beta$ , un 29 % de girs- $\beta$ , i un 20 % de *loops*. Cada domini adopta un plegament de tipus barril- $\beta$  amb un pont disulfur, en concordança amb el plegament de tipus immunoglobulina.
- Els CDRs d'ambdós dominis es localitzen a la mateixa cara de l'estructura globular, oposats al connector, i exposats al solvent; una disposició òptima per a unir l'antigen i assolir la màxima estabilitat de la molècula.
- L'obtenció dels valors de l'exposició del residus al solvent, la predicció de regions amb tendència a l'agregació, i l'alineament múltiple de seqüències, ha permès extreure la informació necessària per a un redisseny racional de la molècula, i així millorar-ne l'estabilitat i disminuir la tendència a l'agregació.
- S'han identificat 4 regions de l'scFv-h3D6 amb forta tendència a l'agregació, totes elles molt enterrades al nucli hidrofòbic de la molècula, de les quals s'han dissenyat 6 mutants puntuals per a disminuir la tendència a l'agregació del scFv-h3D6.
- Les mutacions al nucli hidrofòbic augmenten la tendència a l'agregació de l'scFv-h3D6, confirmant la dificultat de mutar residus enterrats dins la molècula.
- L'extrem C-terminal de la molècula, el residu VL-K107, segueix formant part de la cadena- $\beta$  G i estableix interaccions que desestabilitzen la cadena, de forma que s'han dissenyat 3 mutants per tal d'elongar aquest extrem i augmentar-ne l'estabilitat.

- L'elongació de l'extrem C-terminal, mutants V<sub>L</sub>-el-R108G V<sub>L</sub>-el-R108 i V<sub>L</sub>-el-R108T109, augmenta l'estabilitat termodinàmica i disminueix la tendència a l'agregació de l'scFv-h3D6.
- L'obtenció d'un model tridimensional de l'scFv-h3D6, per homologia de seqüències, ha permès fer un redisseny racional de la molècula per tal de millorar-ne la seva estabilitat, disminuir la tendència a l'agregació, augmentar la seva producció, i disminuir la dosi efectiva ja demostrada en ratolins model d'Alzheimer.

**- Capítol 3:**

- L'AL-12, un domini variable d'Ig procedent d'una pacient amb Amiloïdosi de cadena lleugera, així com 4 mutants restauratius, han estat obtinguts i purificats de la fracció periplasmàtica d'*E. coli*, excepte el mutant H32Y que ha estat purificat de la fracció insoluble, degut a la seva major tendència a l'agregació.
- El domini AL-12 adopta un plegament en barril- $\beta$  típic d'immunoglobulina, on el residu Trp35 altament conservat contribueix en el espectre de CD amb un mínim d'el·lipticitat addicional.
- El plegament natiu de l'AL-12 és reversible a nivell d'estructura secundària mentre que la terciària no recupera l'estat natiu.
- La desnaturalització tèrmica, seguida per CD i fluorescència del residu Trp35, dona lloc a l'agregació de la proteïna, la qual pateix una transició conformacional on es forma un estat intermediari precursor de l'agregació de tipus- $\beta$ . Per FTIR s'observa que aquest intermediari ja presenta una conformació similar a la de l'estat agregat final.
- La desnaturalització química, mitjançant urea, dona lloc al desplegament total del domini seguint un procés de dos estats, sense poblar cap intermediari de reacció.
- Les mutacions restauratives, cap a la línia germinal i menys amiloidogènica  $\kappa$ I 018/08, perden gran part de la reversibilitat observada en l'AL-12, estableixen l'intermediari d'agregació, i desvien la via de plegament cap a la via de formació d'agregats- $\beta$  més estables.
- Cap de les mutacions puntuals recupera l'estabilitat termodinàmica de la proteïna germinal  $\kappa$ I 018/08, si no al contrari, totes elles han estat desestabilitzadores respecte l'AL-12.
- La desestabilització del domini AL-12 va relacionada amb una major tendència a l'agregació, tal i com s'observa a les corbes de desnaturalització tèrmica, seguides per CD i fluorescència de triptòfan.
- La restauració de residus puntuals de l'AL-12 cap a la línia germinal  $\kappa$ I 018/08, no implica el retorn de les propietats conformacionals i termodinàmiques germinals al domini amiloidogènic i, per tant, és improbable que una única mutació sigui la causa de que un domini  $V_L$  esdevingui amiloidogènic i causant de la malaltia.





**- Capítol 4:**

- La corba de desnaturalització tèrmica del domini PSD95-PDZ3 segueix una reacció de dos estats on es pobla un estat intermediari trimèric ric en estructura- $\beta$ , que es troba fora de la via de plegament del domini i que dóna lloc a la formació de fibres reversibles i no dependents de concentració.
- Per TEM i FTIR, s'ha demostrat que els agregats- $\beta$  del domini PDZ3 són de tipus WL; i les micrografies mostren que la seva reversibilitat decreix a mesura que la reacció és troba més desplaçada cap a la formació d'agregats madurs.
- La influència de la força iònica sobre el procés d'agregació del domini PDZ accelera la reorganització de les fulles- $\beta$ , però no canvia el tipus de via d'agregació.
- Els assajos de toxicitat en la línia cel·lular de neuroblastoma humà SH-SY5Y, mostren que els agregats WL del domini PDZ3 són citotòxics, i que aquesta augmenta a mesura que la via d'agregació es troba més avançada.
- Les dues regions amb tendència a l'agregació, les cadenes  $\beta 3$  i  $\beta 5$ , es troben a la superfície i en cares oposades de l'estructura globular, facilitant la formació de l'oligòmer trimèric precursor de l'agregació.
- Per FTIR, s'ha determinat que una de les dues fulles- $\beta$  del domini, concretament la més flexible, és la precursora de la reestructuració de l'estat natiu cap a la formació de l'intermediari que porta a la formació de fibres- $\beta$  ordenades, mentre que la resta d'estructures secundàries resten pràcticament inalterades.
- Per RMN, s'ha identificat la cadena  $\beta 3$  com la principal responsable del canvi conformacional que pateix la proteïna i que l'arrossega cap a la via d'agregació. D'aquesta manera, la fulla  $\beta$  formada per les cadenes  $\beta 2$ ,  $\beta 3$  i  $\beta 4$  és molt flexible, mentre que la formada per les cadenes  $\beta 1$  i  $\beta 5$  és més estable.
- El fet que la butxaca d'unió a lligands, que es localitza a la cavitat entre la cadena- $\beta 2$  i l'hèlix- $\alpha 2$ , es vegi pertorbada durant la via d'agregació explica perquè l'estat intermediari no és funcional.
- La deleció de l'hèlix- $\alpha 3$ , reguladora al·lostèrica de l'afinitat del domini, afecta el procés de plegament del domini PDZ3, de forma que apareix un intermediari monomèric a l'equilibri previ a la seva associació, seguint un procés de quatre estats.
- L'absència de l'hèlix- $\alpha 3$  estabilitza l'estat l'intermediari a l'equilibri i incrementa l'exposició al solvent de les dues regions amb tendència a l'agregació. Això facilita el desplegament i l'auto-associació dels dominis, i, per tant, augmenta la tendència a formar agregats fibril·lars per part del domini.

- La pèrdua d'interacció entre l'hèlix- $\alpha$ 3 i el *loop*  $\beta$ 2 i  $\beta$ 3, important per a la regulació de l'afinitat i l'empaquetament del domini, dóna lloc a una desestabilització de la regió del PDZ3 amb tendència a l'agregació. Per tant, els mutants d'aquesta interacció generen proteïnes amb més tendència a l'agregació que el domini PDZ3.
- El mutant E401R, situat a la hèlix- $\alpha$ 3, segueix un procés de plegament de quatre estats, igual que la variant  $\Delta$ 10ct-PDZ3, sense l'hèlix- $\alpha$ 3. En canvi, els mutants de la regió del *loop*  $\beta$ 2- $\beta$ 3 mantenen el mecanisme de tres estats del domini PDZ3.
- L'eliminació de la hèlix- $\alpha$ 3, o bé dels seus contactes amb la resta del domini, regula negativament la capacitat d'unió de les proteïnes lligand.
- L'anàlisi de l'equilibri i l'agregació del domini PDZ3 aportarà pistes sobre si el plegament de tres estats i l'agregació de tipus WL parcialment reversible és un comportament general dins la gran família de dominis PDZ.

## **VII. BIBLIOGRAFIA.**



- Abraham, R.S., Geyer, S.M., Price-Troska, T.L., Allmer, C., Kyle, R.A., Gertz, M.A. & Fonseca, R. 2003, "Immunoglobulin light chain variable (V) region genes influence clinical presentation and outcome in light chain-associated amyloidosis (AL)", *Blood*, vol. 101, no. 10, pp. 3801-3808.
- Ahmed, M., Davis, J., Aucoin, D., Sato, T., Ahuja, S., Aimoto, S., Elliott, J.I., Van Nostrand, W.E. & Smith, S.O. 2010, "Structural conversion of neurotoxic amyloid-beta(1-42) oligomers to fibrils", *Nature structural & molecular biology*, vol. 17, no. 5, pp. 561-567.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. & Lipman, D.J. 1990, "Basic local alignment search tool", *Journal of Molecular Biology*, vol. 215, no. 3, pp. 403-410.
- Anfinsen, C.B., Harber, E., Sela, M. & White, F.H., Jr 1961, "The kinetics of formation of native ribonuclease during oxidation of the reduced polypeptide chain", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 47, pp. 1309-1314.
- Arbel, M. & Solomon, B. 2007, "Immunotherapy for Alzheimer's disease: attacking amyloid-beta from the inside", *Trends in immunology*, vol. 28, no. 12, pp. 511-513.
- Arndt, K.M., Muller, K.M. & Pluckthun, A. 1998, "Factors influencing the dimer to monomer transition of an antibody single-chain Fv fragment", *Biochemistry*, vol. 37, no. 37, pp. 12918-12926.
- Arrondo, J.L., Echabe, I., Iloro, I., Hernando, M.A., de la Cruz, F. & Goni, F.M. 2003, "A bacterial TrwC relaxase domain contains a thermally stable alpha-helical core", *Journal of Bacteriology*, vol. 185, no. 14, pp. 4226-4232.
- Arrondo, J.L. & Goni, F.M. 1999, "Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy", *Progress in biophysics and molecular biology*, vol. 72, no. 4, pp. 367-405.
- Arrondo, J.L., Muga, A., Castresana, J. & Goni, F.M. 1993, "Quantitative studies of the structure of proteins in solution by Fourier-transform infrared spectroscopy", *Progress in biophysics and molecular biology*, vol. 59, no. 1, pp. 23-56.
- Bacskai, B.J., Kajdasz, S.T., McLellan, M.E., Games, D., Seubert, P., Schenk, D. & Hyman, B.T. 2002, "Non-Fc-mediated mechanisms are involved in clearance of amyloid-beta in vivo by immunotherapy", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 22, no. 18, pp. 7873-7878.
- Baden, E.M., Owen, B.A., Peterson, F.C., Volkman, B.F., Ramirez-Alvarado, M. & Thompson, J.R. 2008a, "Altered dimer interface decreases stability in an amyloidogenic protein", *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 23, pp. 15853-15860.
- Baden, E.M., Randles, E.G., Aboagye, A.K., Thompson, J.R. & Ramirez-Alvarado, M. 2008b, "Structural insights into the role of mutations in amyloidogenesis", *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 45, pp. 30950-30956.
- Baldwin, R.L. 1989, "How does protein folding get started?", *Trends in biochemical sciences*, vol. 14, no. 7, pp. 291-294.

- Bard, F., Cannon, C., Barbour, R., Burke, R.L., Games, D., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Lieberburg, I., Motter, R., Nguyen, M., Soriano, F., Vasquez, N., Weiss, K., Welch, B., Seubert, P., Schenk, D. & Yednock, T. 2000, "Peripherally administered antibodies against amyloid beta-peptide enter the central nervous system and reduce pathology in a mouse model of Alzheimer disease", *Nature medicine*, vol. 6, no. 8, pp. 916-919.
- Beel, A.J., Mobley, C.K., Kim, H.J., Tian, F., Hadziselimovic, A., Jap, B., Prestegard, J.H. & Sanders, C.R. 2008, "Structural studies of the transmembrane C-terminal domain of the amyloid precursor protein (APP): does APP function as a cholesterol sensor?", *Biochemistry*, vol. 47, no. 36, pp. 9428-9446.
- Bennion, B.J. & Daggett, V. 2003, "The molecular basis for the chemical denaturation of proteins by urea", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 9, pp. 5142-5147.
- Berman, H., Henrick, K., Nakamura, H. & Markley, J.L. 2007, "The worldwide Protein Data Bank (wwPDB): ensuring a single, uniform archive of PDB data", *Nucleic acids research*, vol. 35, no. Database issue, pp. D301-3.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. 1979, "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA", *Nucleic acids research*, vol. 7, no. 6, pp. 1513-1523.
- Blancas-Mejia, L.M. & Ramirez-Alvarado, M. 2013, "Systemic Amyloidoses", *Annual Review of Biochemistry*, .
- Blancas-Mejia, L.M., Tellez, L.A., del Pozo-Yauner, L., Becerril, B., Sanchez-Ruiz, J.M. & Fernandez-Velasco, D.A. 2009, "Thermodynamic and kinetic characterization of a germ line human lambda6 light-chain protein: the relation between unfolding and fibrillogenesis", *Journal of Molecular Biology*, vol. 386, no. 4, pp. 1153-1166.
- Blanco, F.J., Serrano, L. & Forman-Kay, J.D. 1998, "High populations of non-native structures in the denatured state are compatible with the formation of the native folded state", *Journal of Molecular Biology*, vol. 284, no. 4, pp. 1153-1164.
- Blasco-Moreno, B. 2011, *Estabilització de l'extrem C-terminal d'un fragment variable de cadena senzilla (scFv) específic per al pèptid Aβ*, Treball de Màster, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Blommel, P.G. & Fox, B.G. 2007, "A combined approach to improving large-scale production of tobacco etch virus protease", *Protein expression and purification*, vol. 55, no. 1, pp. 53-68.
- Bramucci, E., Paiardini, A., Bossa, F. & Pascarella, S. 2012, "PyMod: sequence similarity searches, multiple sequence-structure alignments, and homology modeling within PyMOL", *BMC bioinformatics*, vol. 13 Suppl 4, pp. S2-2105-13-S4-S2.
- Brenner, D.A., Jain, M., Pimentel, D.R., Wang, B., Connors, L.H., Skinner, M., Apstein, C.S. & Liao, R. 2004, "Human amyloidogenic light chains directly impair cardiomyocyte function through an increase in cellular oxidant stress", *Circulation research*, vol. 94, no. 8, pp. 1008-1010.

- Brockwell, D.J., Smith, D.A. & Radford, S.E. 2000, "Protein folding mechanisms: new methods and emerging ideas", *Current opinion in structural biology*, vol. 10, no. 1, pp. 16-25.
- Bryngelson, J.D., Onuchic, J.N., Socci, N.D. & Wolynes, P.G. 1995, "Funnels, pathways, and the energy landscape of protein folding: a synthesis", *Proteins*, vol. 21, no. 3, pp. 167-195.
- Bucciantini, M., Giannoni, E., Chiti, F., Baroni, F., Formigli, L., Zurdo, J., Taddei, N., Ramponi, G., Dobson, C.M. & Stefani, M. 2002, "Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases", *Nature*, vol. 416, no. 6880, pp. 507-511.
- Byler, D.M. & Susi, H. 1986, "Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra", *Biopolymers*, vol. 25, no. 3, pp. 469-487.
- Camara-Artigas, A., Murciano-Calles, J., Gavira, J.A., Cobos, E.S. & Martinez, J.C. 2010, "Novel conformational aspects of the third PDZ domain of the neuronal post-synaptic density-95 protein revealed from two 1.4Å X-ray structures", *Journal of structural biology*, vol. 170, no. 3, pp. 565-569.
- Cascella, R., Conti, S., Tatini, F., Evangelisti, E., Scartabelli, T., Casamenti, F., Wilson, M.R., Chiti, F. & Cecchi, C. 2013, "Extracellular chaperones prevent Aβ<sub>42</sub>-induced toxicity in rat brains", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1832, no. 8, pp. 1217-1226.
- Cerda-Costa, N., De la Arada, I., Aviles, F.X., Arrondo, J.L. & Villegas, S. 2009, "Influence of aggregation propensity and stability on amyloid fibril formation as studied by Fourier transform infrared spectroscopy and two-dimensional COS analysis", *Biochemistry*, vol. 48, no. 44, pp. 10582-10590.
- Cerda-Costa, N., Esteras-Chopo, A., Aviles, F.X., Serrano, L. & Villegas, V. 2007, "Early kinetics of amyloid fibril formation reveals conformational reorganisation of initial aggregates", *Journal of Molecular Biology*, vol. 366, no. 4, pp. 1351-1363.
- Chan, H.S., Bromberg, S. & Dill, K.A. 1995, "Models of cooperativity in protein folding", *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, vol. 348, no. 1323, pp. 61-70.
- Cheng, I.H., Scarce-Levie, K., Legleiter, J., Palop, J.J., Gerstein, H., Bien-Ly, N., Puolivali, J., Lesne, S., Ashe, K.H., Muchowski, P.J. & Mucke, L. 2007, "Accelerating amyloid-beta fibrillization reduces oligomer levels and functional deficits in Alzheimer disease mouse models", *The Journal of biological chemistry*, vol. 282, no. 33, pp. 23818-23828.
- Chirgadze, Y.N. & Nevskaya, N.A. 1976, "Infrared spectra and resonance interaction of amide-I vibration of the antiparallel-chain pleated sheet", *Biopolymers*, vol. 15, no. 4, pp. 607-625.
- Chiti, F. & Dobson, C.M. 2009, "Amyloid formation by globular proteins under native conditions", *Nature chemical biology*, vol. 5, no. 1, pp. 15-22.
- Chiti, F. & Dobson, C.M. 2006, "Protein misfolding, functional amyloid, and human disease", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 75, pp. 333-366.

- Chothia, C. & Lesk, A.M. 1986, "The relation between the divergence of sequence and structure in proteins", *The EMBO journal*, vol. 5, no. 4, pp. 823-826.
- Cobos, E.S., Iglesias-Bexiga, M., Ruiz-Sanz, J., Mateo, P.L., Luque, I. & Martinez, J.C. 2009, "Thermodynamic characterization of the folding equilibrium of the human Nedd4-WW4 domain: at the frontiers of cooperative folding", *Biochemistry*, vol. 48, no. 36, pp. 8712-8720.
- Cobos, E.S., Pisabarro, M.T., Vega, M.C., Lacroix, E., Serrano, L., Ruiz-Sanz, J. & Martinez, J.C. 2004, "A miniprotein scaffold used to assemble the polyproline II binding epitope recognized by SH3 domains", *Journal of Molecular Biology*, vol. 342, no. 1, pp. 355-365.
- Comenzo, R.L., Zhang, Y., Martinez, C., Osman, K. & Herrera, G.A. 2001, "The tropism of organ involvement in primary systemic amyloidosis: contributions of Ig V(L) germ line gene use and clonal plasma cell burden", *Blood*, vol. 98, no. 3, pp. 714-720.
- Creighton, T.E. 1992, *Protein Folding*, W.H. Freeman & Co., New York.
- Daggett, V. & Fersht, A.R. 2003, "Is there a unifying mechanism for protein folding?", *Trends in biochemical sciences*, vol. 28, no. 1, pp. 18-25.
- Dahlgren, K.N., Manelli, A.M., Stine, W.B., Jr, Baker, L.K., Krafft, G.A. & LaDu, M.J. 2002, "Oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptides differentially affect neuronal viability", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 35, pp. 32046-32053.
- Das, A. & Mukhopadhyay, C. 2009, "Urea-mediated protein denaturation: a consensus view", *The journal of physical chemistry.B*, vol. 113, no. 38, pp. 12816-12824.
- del Pozo Yauner, L., Ortiz, E., Sanchez, R., Sanchez-Lopez, R., Guereca, L., Murphy, C.L., Allen, A., Wall, J.S., Fernandez-Velasco, D.A., Solomon, A. & Becerril, B. 2008, "Influence of the germline sequence on the thermodynamic stability and fibrillogenicity of human lambda 6 light chains", *Proteins*, vol. 72, no. 2, pp. 684-692.
- DeLano, W.L. 2002, *The PyMOL Molecular Graphics System*, DeLano Scientific, San Carlos, CA.
- Deshpande, A., Mina, E., Glabe, C. & Busciglio, J. 2006, "Different conformations of amyloid beta induce neurotoxicity by distinct mechanisms in human cortical neurons", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 26, no. 22, pp. 6011-6018.
- Dill, K.A. & Chan, H.S. 1997, "From Levinthal to pathways to funnels", *Nature structural biology*, vol. 4, no. 1, pp. 10-19.
- Dineley, K.T., Xia, X., Bui, D., Sweatt, J.D. & Zheng, H. 2002, "Accelerated plaque accumulation, associative learning deficits, and up-regulation of alpha 7 nicotinic receptor protein in transgenic mice co-expressing mutant human presenilin 1 and amyloid precursor proteins", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 25, pp. 22768-22780.



- Dobson, C.M., Evans, P.A. & Radford, S.E. 1994, "Understanding how proteins fold: the lysozyme story so far", *Trends in biochemical sciences*, vol. 19, no. 1, pp. 31-37.
- Dodart, J.C., Bales, K.R., Gannon, K.S., Greene, S.J., DeMattos, R.B., Mathis, C., DeLong, C.A., Wu, S., Wu, X., Holtzman, D.M. & Paul, S.M. 2002, "Immunization reverses memory deficits without reducing brain Abeta burden in Alzheimer's disease model", *Nature neuroscience*, vol. 5, no. 5, pp. 452-457.
- Doyle, D.A., Lee, A., Lewis, J., Kim, E., Sheng, M. & MacKinnon, R. 1996, "Crystal structures of a complexed and peptide-free membrane protein-binding domain: molecular basis of peptide recognition by PDZ", *Cell*, vol. 85, no. 7, pp. 1067-1076.
- Dunker, A.K., Silman, I., Uversky, V.N. & Sussman, J.L. 2008, "Function and structure of inherently disordered proteins", *Current opinion in structural biology*, vol. 18, no. 6, pp. 756-764.
- Eaton, W.A. 1999, "Searching for "downhill scenarios" in protein folding", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 96, no. 11, pp. 5897-5899.
- Elias, G.M. & Nicoll, R.A. 2007, "Synaptic trafficking of glutamate receptors by MAGUK scaffolding proteins", *Trends in cell biology*, vol. 17, no. 7, pp. 343-352.
- Esquerda-Canals, G. 2013, *Neuronal vulnerability in the 3xTg-AD mouse and its protection by the anti-amyloid  $\beta$  antibody fragment scFv-h3D6*, Treball de Màster, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Esquerda-Canals, G., Marti, J., Rivera-Hernandez, G., Gimenez-Llort, L. & Villegas, S. 2013, "Loss of deep cerebellar nuclei neurons in the 3xTg-AD mice and protection by an anti-amyloid beta antibody fragment", *mAbs*, vol. 5, no. 5, pp. 660-664.
- Facciuto, F., Cavatorta, A.L., Valdano, M.B., Marziali, F. & Gardiol, D. 2012, "Differential expression of PDZ domain-containing proteins in human diseases - challenging topics and novel issues", *The FEBS journal*, vol. 279, no. 19, pp. 3538-3548.
- Fandrich, M. 2012, "Oligomeric intermediates in amyloid formation: structure determination and mechanisms of toxicity", *Journal of Molecular Biology*, vol. 421, no. 4-5, pp. 427-440.
- Fenyö, D. 2010, *Computational Biology*, Springer Protocols, US.
- Fernandez-Escamilla, A.M., Rousseau, F., Schymkowitz, J. & Serrano, L. 2004, "Prediction of sequence-dependent and mutational effects on the aggregation of peptides and proteins", *Nature biotechnology*, vol. 22, no. 10, pp. 1302-1306.
- Fersht, A.R. 1997, "Nucleation mechanisms in protein folding", *Current opinion in structural biology*, vol. 7, no. 1, pp. 3-9.
- Fersht, A.R. 1993, "The sixth Datta Lecture. Protein folding and stability: the pathway of folding of barnase", *FEBS letters*, vol. 325, no. 1-2, pp. 5-16.
- Fitzpatrick, A.W., Debelouchina, G.T., Bayro, M.J., Clare, D.K., Caporini, M.A., Bajaj, V.S., Jaronec, C.P., Wang, L., Ladizhansky, V., Muller, S.A., MacPhee, C.E., Waudby, C.A.,

- Mott, H.R., De Simone, A., Knowles, T.P., Saibil, H.R., Vendruscolo, M., Orlova, E.V., Griffin, R.G. & Dobson, C.M. 2013, "Atomic structure and hierarchical assembly of a cross-beta amyloid fibril", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 110, no. 14, pp. 5468-5473.
- Focant, M.C. & Hermans, E. 2013, "Protein interacting with C kinase and neurological disorders", *Synapse (New York, N.Y.)*, .
- Fukuchi, K., Accavitti-Loper, M.A., Kim, H.D., Tahara, K., Cao, Y., Lewis, T.L., Caughey, R.C., Kim, H. & Lalonde, R. 2006, "Amelioration of amyloid load by anti-Abeta single-chain antibody in Alzheimer mouse model", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 344, no. 1, pp. 79-86.
- Gimenez-Llort, L., Blazquez, G., Canete, T., Johansson, B., Oddo, S., Tobena, A., LaFerla, F.M. & Fernandez-Teruel, A. 2007, "Modeling behavioral and neuronal symptoms of Alzheimer's disease in mice: a role for intraneuronal amyloid", *Neuroscience and biobehavioral reviews*, vol. 31, no. 1, pp. 125-147.
- Gimenez-Llort, L., Rivera-Hernandez, G., Marin-Argany, M., Sanchez-Quesada, J.L. & Villegas, S. 2013, "Early intervention in the 3xTg-AD mice with an amyloid beta-antibody fragment ameliorates first hallmarks of Alzheimer disease", *mAbs*, vol. 5, no. 5, pp. 665-677.
- Goh, K.I. & Choi, I.G. 2012, "Exploring the human diseasome: the human disease network", *Briefings in functional genomics*, vol. 11, no. 6, pp. 533-542.
- Gomez, S.B. & Di Mauro, P.P. 2012, *Polymeric nanoparticles for drug delivery* />, WO/2012/153286 edn, PCT/IB2012/052320, ES.
- Good, M.C., Zalatan, J.G. & Lim, W.A. 2011, "Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 332, no. 6030, pp. 680-686.
- Goormaghtigh, E., Cabiaux, V. & Ruyschaert, J.M. 1994, "Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds", *Sub-cellular biochemistry*, vol. 23, pp. 329-362.
- Gosal, W.S., Morten, I.J., Hewitt, E.W., Smith, D.A., Thomson, N.H. & Radford, S.E. 2005, "Competing pathways determine fibril morphology in the self-assembly of beta2-microglobulin into amyloid", *Journal of Molecular Biology*, vol. 351, no. 4, pp. 850-864.
- Haass, C. & Selkoe, D.J. 2007, "Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide", *Nature reviews.Molecular cell biology*, vol. 8, no. 2, pp. 101-112.
- Hanahan, D. 1983, "Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids", *Journal of Molecular Biology*, vol. 166, no. 4, pp. 557-580.
- Heredia, P. & De Las Rivas, J. 2003, "Calcium-dependent conformational change and thermal stability of the isolated PsbO protein detected by FTIR spectroscopy", *Biochemistry*, vol. 42, no. 40, pp. 11831-11838.

- Herrup, K. 2010, "Reimagining Alzheimer's disease--an age-based hypothesis", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 30, no. 50, pp. 16755-16762.
- Hock, C., Konietzko, U., Streffer, J.R., Tracy, J., Signorell, A., Muller-Tillmanns, B., Lemke, U., Henke, K., Moritz, E., Garcia, E., Wollmer, M.A., Umbricht, D., de Quervain, D.J., Hofmann, M., Maddalena, A., Papassotiropoulos, A. & Nitsch, R.M. 2003, "Antibodies against beta-amyloid slow cognitive decline in Alzheimer's disease", *Neuron*, vol. 38, no. 4, pp. 547-554.
- Hou, X., Richardson, S.J., Aguilar, M.I. & Small, D.H. 2005, "Binding of amyloidogenic transthyretin to the plasma membrane alters membrane fluidity and induces neurotoxicity", *Biochemistry*, vol. 44, no. 34, pp. 11618-11627.
- Humphreys, D.T., Carver, J.A., Easterbrook-Smith, S.B. & Wilson, M.R. 1999, "Clusterin has chaperone-like activity similar to that of small heat shock proteins", *The Journal of biological chemistry*, vol. 274, no. 11, pp. 6875-6881.
- Hurle, M.R., Helms, L.R., Li, L., Chan, W. & Wetzel, R. 1994, "A role for destabilizing amino acid replacements in light-chain amyloidosis", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 12, pp. 5446-5450.
- Huse, M. & Kuriyan, J. 2002, "The conformational plasticity of protein kinases", *Cell*, vol. 109, no. 3, pp. 275-282.
- Hust, M., Jostock, T., Menzel, C., Voedisch, B., Mohr, A., Brenneis, M., Kirsch, M.I., Meier, D. & Dubel, S. 2007, "Single chain Fab (scFab) fragment", *BMC biotechnology*, vol. 7, pp. 14.
- Itzhaki, L.S., Otzen, D.E. & Fersht, A.R. 1995, "The structure of the transition state for folding of chymotrypsin inhibitor 2 analysed by protein engineering methods: evidence for a nucleation-condensation mechanism for protein folding", *Journal of Molecular Biology*, vol. 254, no. 2, pp. 260-288.
- Ivarsson, Y. 2012, "Plasticity of PDZ domains in ligand recognition and signaling", *FEBS letters*, vol. 586, no. 17, pp. 2638-2647.
- Jackson, S.E. & Fersht, A.R. 1991, "Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 1. Evidence for a two-state transition", *Biochemistry*, vol. 30, no. 43, pp. 10428-10435.
- Jacobsen, J.S. 2006, *Antibodies specific for epitopes within amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ), for use in improving cognition.*, WO/2006/066171 edn, PCT/US2005/045860, US.
- Jahn, T.R. & Radford, S.E. 2008, "Folding versus aggregation: polypeptide conformations on competing pathways", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 469, no. 1, pp. 100-117.
- Jahn, T.R. & Radford, S.E. 2005, "The Yin and Yang of protein folding", *The FEBS journal*, vol. 272, no. 23, pp. 5962-5970.
- Jahn, T.R., Tennent, G.A. & Radford, S.E. 2008, "A common beta-sheet architecture underlies in vitro and in vivo beta2-microglobulin amyloid fibrils", *The Journal of biological chemistry*, vol. 283, no. 25, pp. 17279-17286.

- Jemth, P. & Gianni, S. 2007, "PDZ domains: folding and binding", *Biochemistry*, vol. 46, no. 30, pp. 8701-8708.
- John, D.M. & Weeks, K.M. 2000, "van't Hoff enthalpies without baselines", *Protein science : a publication of the Protein Society*, vol. 9, no. 7, pp. 1416-1419.
- Johnson, G. & Wu, T.T. 2001, "Kabat Database and its applications: future directions", *Nucleic acids research*, vol. 29, no. 1, pp. 205-206.
- Johnson, W.C., Jr 1988, "Secondary structure of proteins through circular dichroism spectroscopy", *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, vol. 17, pp. 145-166.
- Jones, T.A. & Thirup, S. 1986, "Using known substructures in protein model building and crystallography", *The EMBO journal*, vol. 5, no. 4, pp. 819-822.
- Jurado, P., de Lorenzo, V. & Fernandez, L.A. 2006, "Thioredoxin fusions increase folding of single chain Fv antibodies in the cytoplasm of Escherichia coli: evidence that chaperone activity is the prime effect of thioredoxin", *Journal of Molecular Biology*, vol. 357, no. 1, pp. 49-61.
- Kabat, E.A. 1983, *Sequences of proteins of immunological interest*, U.S.
- Kabsch, W. & Sander, C. 1983, "Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features", *Biopolymers*, vol. 22, no. 12, pp. 2577-2637.
- Kad, N.M., Myers, S.L., Smith, D.P., Smith, D.A., Radford, S.E. & Thomson, N.H. 2003, "Hierarchical assembly of beta2-microglobulin amyloid in vitro revealed by atomic force microscopy", *Journal of Molecular Biology*, vol. 330, no. 4, pp. 785-797.
- Khurana, R., Gillespie, J.R., Talapatra, A., Minert, L.J., Ionescu-Zanetti, C., Millett, I. & Fink, A.L. 2001, "Partially folded intermediates as critical precursors of light chain amyloid fibrils and amorphous aggregates", *Biochemistry*, vol. 40, no. 12, pp. 3525-3535.
- Kim, J., Jiang, H., Park, S., Eltorai, A.E., Stewart, F.R., Yoon, H., Basak, J.M., Finn, M.B. & Holtzman, D.M. 2011, "Haploinsufficiency of human APOE reduces amyloid deposition in a mouse model of amyloid-beta amyloidosis", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 31, no. 49, pp. 18007-18012.
- Kim, P.S. & Baldwin, R.L. 1990, "Intermediates in the folding reactions of small proteins", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 59, pp. 631-660.
- Kim, P.S. & Baldwin, R.L. 1982, "Specific intermediates in the folding reactions of small proteins and the mechanism of protein folding", *Annual Review of Biochemistry*, vol. 51, pp. 459-489.
- Klein-Seetharaman, J., Oikawa, M., Grimshaw, S.B., Wirmer, J., Duchardt, E., Ueda, T., Imoto, T., Smith, L.J., Dobson, C.M. & Schwalbe, H. 2002, "Long-range interactions within a nonnative protein", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 295, no. 5560, pp. 1719-1722.

- Koehl, P. & Levitt, M. 2002, "Protein topology and stability define the space of allowed sequences", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 3, pp. 1280-1285.
- Kopp, J. & Schwede, T. 2004, "The SWISS-MODEL Repository of annotated three-dimensional protein structure homology models", *Nucleic acids research*, vol. 32, no. Database issue, pp. D230-4.
- Kumar, S. & Walter, J. 2011, "Phosphorylation of amyloid beta (Abeta) peptides - a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease", *Aging*, vol. 3, no. 8, pp. 803-812.
- LaDu, M.J., Falduto, M.T., Manelli, A.M., Reardon, C.A., Getz, G.S. & Frail, D.E. 1994, "Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid", *The Journal of biological chemistry*, vol. 269, no. 38, pp. 23403-23406.
- Laganowsky, A., Liu, C., Sawaya, M.R., Whitelegge, J.P., Park, J., Zhao, M., Pensalfini, A., Soriaga, A.B., Landau, M., Teng, P.K., Cascio, D., Glabe, C. & Eisenberg, D. 2012, "Atomic view of a toxic amyloid small oligomer", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 335, no. 6073, pp. 1228-1231.
- Lansbury, P.T. & Lashuel, H.A. 2006, "A century-old debate on protein aggregation and neurodegeneration enters the clinic", *Nature*, vol. 443, no. 7113, pp. 774-779.
- Leach, A.R. 2001, *Molecular modelling. Principles and applications*. 2nd Edition edn, .
- Lee, H.J. & Zheng, J.J. 2010, "PDZ domains and their binding partners: structure, specificity, and modification", *Cell communication and signaling : CCS*, vol. 8, pp. 8-811X-8-8.
- Levinthal, C. 1968, "Are there pathways for protein folding?", *Journal de Chimie Physique*, vol. 65, no. 1, pp. 44-45.
- Linding, R., Schymkowitz, J., Rousseau, F., Diella, F. & Serrano, L. 2004, "A comparative study of the relationship between protein structure and beta-aggregation in globular and intrinsically disordered proteins", *Journal of Molecular Biology*, vol. 342, no. 1, pp. 345-353.
- Lockless, S.W. & Ranganathan, R. 1999, "Evolutionarily conserved pathways of energetic connectivity in protein families", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 286, no. 5438, pp. 295-299.
- Long, J.F., Tochio, H., Wang, P., Fan, J.S., Sala, C., Niethammer, M., Sheng, M. & Zhang, M. 2003, "Supramodular structure and synergistic target binding of the N-terminal tandem PDZ domains of PSD-95", *Journal of Molecular Biology*, vol. 327, no. 1, pp. 203-214.
- Lorenzo, A. & Yankner, B.A. 1994, "Beta-amyloid neurotoxicity requires fibril formation and is inhibited by congo red", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 91, no. 25, pp. 12243-12247.
- Maezawa, I., Hong, H.S., Liu, R., Wu, C.Y., Cheng, R.H., Kung, M.P., Kung, H.F., Lam, K.S., Oddo, S., Laferla, F.M. & Jin, L.W. 2008, "Congo red and thioflavin-T analogs detect Abeta oligomers", *Journal of neurochemistry*, vol. 104, no. 2, pp. 457-468.

- Manoutcharian, K., Acero, G., Munguia, M.E., Becerril, B., Massieu, L., Govezensky, T., Ortiz, E., Marks, J.D., Cao, C., Ugen, K. & Gevorkian, G. 2004, "Human single chain Fv antibodies and a complementarity determining region-derived peptide binding to amyloid-beta 1-42", *Neurobiology of disease*, vol. 17, no. 1, pp. 114-121.
- Marin-Argany, M. 2009, *Modelatge tridimensional d'un fragment variable de cadena senzilla (scFv) específic contra el pèptid Abeta*, Treball de Màster, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Marin-Argany, M., Rivera-Hernandez, G., Marti, J. & Villegas, S. 2011, "An anti-Abeta (amyloid beta) single-chain variable fragment prevents amyloid fibril formation and cytotoxicity by withdrawing Abeta oligomers from the amyloid pathway", *The Biochemical journal*, vol. 437, no. 1, pp. 25-34.
- Marley, J., Lu, M. & Bracken, C. 2001, "A method for efficient isotopic labeling of recombinant proteins", *Journal of Biomolecular NMR*, vol. 20, no. 1, pp. 71-75.
- McGee, A.W. & Brecht, D.S. 2003, "Assembly and plasticity of the glutamatergic postsynaptic specialization", *Current opinion in neurobiology*, vol. 13, no. 1, pp. 111-118.
- McGee, A.W., Dakoji, S.R., Olsen, O., Brecht, D.S., Lim, W.A. & Prehoda, K.E. 2001, "Structure of the SH3-guanylate kinase module from PSD-95 suggests a mechanism for regulated assembly of MAGUK scaffolding proteins", *Molecular cell*, vol. 8, no. 6, pp. 1291-1301.
- McLaughlin, R.W., De Stigter, J.K., Sikkink, L.A., Baden, E.M. & Ramirez-Alvarado, M. 2006, "The effects of sodium sulfate, glycosaminoglycans, and Congo red on the structure, stability, and amyloid formation of an immunoglobulin light-chain protein", *Protein science : a publication of the Protein Society*, vol. 15, no. 7, pp. 1710-1722.
- McLean, C.A., Cherny, R.A., Fraser, F.W., Fuller, S.J., Smith, M.J., Beyreuther, K., Bush, A.I. & Masters, C.L. 1999, "Soluble pool of Abeta amyloid as a determinant of severity of neurodegeneration in Alzheimer's disease", *Annals of Neurology*, vol. 46, no. 6, pp. 860-866.
- McParland, V.J., Kad, N.M., Kalverda, A.P., Brown, A., Kirwin-Jones, P., Hunter, M.G., Sunde, M. & Radford, S.E. 2000, "Partially unfolded states of beta(2)-microglobulin and amyloid formation in vitro", *Biochemistry*, vol. 39, no. 30, pp. 8735-8746.
- Mohajeri, M.H., Saini, K., Schultz, J.G., Wollmer, M.A., Hock, C. & Nitsch, R.M. 2002, "Passive immunization against beta-amyloid peptide protects central nervous system (CNS) neurons from increased vulnerability associated with an Alzheimer's disease-causing mutation", *The Journal of biological chemistry*, vol. 277, no. 36, pp. 33012-33017.
- Mok, Y.K., Kay, C.M., Kay, L.E. & Forman-Kay, J. 1999, "NOE data demonstrating a compact unfolded state for an SH3 domain under non-denaturing conditions", *Journal of Molecular Biology*, vol. 289, no. 3, pp. 619-638.
- Montoliu-Gaia, L. 2013, *Anàlisi de les conseqüències termodinàmiques i conformacionals d'eliminar el pont disulfur del domini VL d'un fragment d'anticòs anti-A $\beta$  (scFv-h3D6)*, Treball de Màster, Universitat Autònoma de Barcelona.

- Mostarda, S., Gfeller, D. & Rao, F. 2012, "Beyond the binding site: the role of the beta(2)-beta(3) loop and extra-domain structures in PDZ domains", *PLoS computational biology*, vol. 8, no. 3, pp. e1002429.
- Muller, B.M., Kistner, U., Veh, R.W., Cases-Langhoff, C., Becker, B., Gundelfinger, E.D. & Garner, C.C. 1995, "Molecular characterization and spatial distribution of SAP97, a novel presynaptic protein homologous to SAP90 and the Drosophila discs-large tumor suppressor protein", *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, vol. 15, no. 3 Pt 2, pp. 2354-2366.
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. 1987, "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction", *Methods in enzymology*, vol. 155, pp. 335-350.
- Murciano-Calles, J. 2011, *Caracterización termodinámico-estructural de la estabilidad de dominios PDZ y análisis de su especificidad de unión mediante librerías de expresión en fagos*, Tesis Doctoral, Universidad de Granada.
- Murciano-Calles, J., Cobos, E.S., Mateo, P.L., Camara-Artigas, A. & Martinez, J.C. 2011, "A comparative analysis of the folding and misfolding pathways of the third PDZ domain of PSD95 investigated under different pH conditions", *Biophysical chemistry*, vol. 158, no. 2-3, pp. 104-110.
- Murciano-Calles, J., Cobos, E.S., Mateo, P.L., Camara-Artigas, A. & Martinez, J.C. 2010, "An oligomeric equilibrium intermediate as the precursory nucleus of globular and fibrillar supramacromolecular assemblies in a PDZ domain", *Biophysical journal*, vol. 99, no. 1, pp. 263-272.
- Murciano-Calles, J., Martinez, J.C., Marin-Argany, M., Villegas, S. & Cobos, E.S. 2013, "A thermodynamic study of the third PDZ domain of MAGUK neuronal protein PSD-95 reveals a complex three-state folding behavior", *Biophysical Chemistry*, Submitted.
- Naiki, H., Higuchi, K., Hosokawa, M. & Takeda, T. 1989, "Fluorometric determination of amyloid fibrils in vitro using the fluorescent dye, thioflavin T1", *Analytical Biochemistry*, vol. 177, no. 2, pp. 244-249.
- Nallamsetty, S., Kapust, R.B., Tozser, J., Cherry, S., Tropea, J.E., Copeland, T.D. & Waugh, D.S. 2004, "Efficient site-specific processing of fusion proteins by tobacco vein mottling virus protease in vivo and in vitro", *Protein expression and purification*, vol. 38, no. 1, pp. 108-115.
- Neudecker, P., Robustelli, P., Cavalli, A., Walsh, P., Lundstrom, P., Zarrine-Afsar, A., Sharpe, S., Vendruscolo, M. & Kay, L.E. 2012, "Structure of an intermediate state in protein folding and aggregation", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 336, no. 6079, pp. 362-366.
- Nicoll, J.A., Wilkinson, D., Holmes, C., Steart, P., Markham, H. & Weller, R.O. 2003, "Neuropathology of human Alzheimer disease after immunization with amyloid-beta peptide: a case report", *Nature medicine*, vol. 9, no. 4, pp. 448-452.
- Nitsch, R.M. & Hock, C. 2008, "Targeting beta-amyloid pathology in Alzheimer's disease with Abeta immunotherapy", *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, vol. 5, no. 3, pp. 415-420.

- Nix, S.L., Chishti, A.H., Anderson, J.M. & Walther, Z. 2000, "hCASK and hDlg associate in epithelia, and their src homology 3 and guanylate kinase domains participate in both intramolecular and intermolecular interactions", *The Journal of biological chemistry*, vol. 275, no. 52, pp. 41192-41200.
- Novotny, J. & Haber, E. 1985, "Structural invariants of antigen binding: comparison of immunoglobulin VL-VH and VL-VL domain dimers", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 82, no. 14, pp. 4592-4596.
- Olinger, J.M., Hill, D.M., Jakobsen, R.J. & Brody, R.S. 1986, "Fourier transform infrared studies of ribonuclease in H<sub>2</sub>O and 2H<sub>2</sub>O solutions", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 869, no. 1, pp. 89-98.
- Oliva, B., Bates, P.A., Querol, E., Aviles, F.X. & Sternberg, M.J. 1998, "Automated classification of antibody complementarity determining region 3 of the heavy chain (H3) loops into canonical forms and its application to protein structure prediction", *Journal of Molecular Biology*, vol. 279, no. 5, pp. 1193-1210.
- O'Nuallain, B., Allen, A., Kennel, S.J., Weiss, D.T., Solomon, A. & Wall, J.S. 2007, "Localization of a conformational epitope common to non-native and fibrillar immunoglobulin light chains", *Biochemistry*, vol. 46, no. 5, pp. 1240-1247.
- Passafaro, M., Sala, C., Niethammer, M. & Sheng, M. 1999, "Microtubule binding by CRIPT and its potential role in the synaptic clustering of PSD-95", *Nature neuroscience*, vol. 2, no. 12, pp. 1063-1069.
- Pawar, A.P., Dubay, K.F., Zurdo, J., Chiti, F., Vendruscolo, M. & Dobson, C.M. 2005, "Prediction of "aggregation-prone" and "aggregation-susceptible" regions in proteins associated with neurodegenerative diseases", *Journal of Molecular Biology*, vol. 350, no. 2, pp. 379-392.
- Pearson, W.R. 1990, "Rapid and sensitive sequence comparison with FASTP and FASTA", *Methods in enzymology*, vol. 183, pp. 63-98.
- Pedroso, I., Irun, M.P., Machicado, C. & Sancho, J. 2002, "Four-state equilibrium unfolding of an scFv antibody fragment", *Biochemistry*, vol. 41, no. 31, pp. 9873-9884.
- Peterson, F.C., Baden, E.M., Owen, B.A., Volkman, B.F. & Ramirez-Alvarado, M. 2010, "A single mutation promotes amyloidogenicity through a highly promiscuous dimer interface", *Structure (London, England : 1993)*, vol. 18, no. 5, pp. 563-570.
- Petit, C.M., Zhang, J., Sapienza, P.J., Fuentes, E.J. & Lee, A.L. 2009, "Hidden dynamic allostery in a PDZ domain", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 106, no. 43, pp. 18249-18254.
- Pfeifer, M., Boncristiano, S., Bondolfi, L., Stalder, A., Deller, T., Staufenbiel, M., Mathews, P.M. & Jucker, M. 2002, "Cerebral hemorrhage after passive anti-Aβ immunotherapy", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 298, no. 5597, pp. 1379.
- Phillips, S.E. & Schoenborn, B.P. 1981, "Neutron diffraction reveals oxygen-histidine hydrogen bond in oxymyoglobin", *Nature*, vol. 292, no. 5818, pp. 81-82.



- Pim, D., Bergant, M., Boon, S.S., Ganti, K., Kranjec, C., Massimi, P., Subbaiah, V.K., Thomas, M., Tomaic, V. & Banks, L. 2012, "Human papillomaviruses and the specificity of PDZ domain targeting", *The FEBS journal*, vol. 279, no. 19, pp. 3530-3537.
- Pokkuluri, P.R., Huang, D.B., Raffin, R., Cai, X., Johnson, G., Stevens, P.W., Stevens, F.J. & Schiffer, M. 1998, "A domain flip as a result of a single amino-acid substitution", *Structure (London, England : 1993)*, vol. 6, no. 8, pp. 1067-1073.
- Poshusta, T.L., Sikkink, L.A., Leung, N., Clark, R.J., Dispenzieri, A. & Ramirez-Alvarado, M. 2009, "Mutations in specific structural regions of immunoglobulin light chains are associated with free light chain levels in patients with AL amyloidosis", *PloS one*, vol. 4, no. 4, pp. e5169.
- Preissmann, D., Leuba, G., Savary, C., Vernay, A., Kraftsik, R., Riederer, I.M., Schenk, F., Riederer, B.M. & Savioz, A. 2012, "Increased postsynaptic density protein-95 expression in the frontal cortex of aged cognitively impaired rats", *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, vol. 237, no. 11, pp. 1331-1340.
- Prince, M., Bryce, R. & Ferri, C. 2011, "The benefits of early diagnosis and intervention.", , ed. World Alzheimer Report, Alzheimer's Disease International (ADI), .
- Qin, Z., Hu, D., Zhu, M. & Fink, A.L. 2007, "Structural characterization of the partially folded intermediates of an immunoglobulin light chain leading to amyloid fibrillation and amorphous aggregation", *Biochemistry*, vol. 46, no. 11, pp. 3521-3531.
- Radford, S.E. 2000, "Protein folding: progress made and promises ahead", *Trends in biochemical sciences*, vol. 25, no. 12, pp. 611-618.
- Rain, J.C., Selig, L., De Reuse, H., Battaglia, V., Reverdy, C., Simon, S., Lenzen, G., Petel, F., Wojcik, J., Schachter, V., Chemama, Y., Labigne, A. & Legrain, P. 2001, "The protein-protein interaction map of *Helicobacter pylori*", *Nature*, vol. 409, no. 6817, pp. 211-215.
- Ramirez-Alvarado, M. 2012, "Amyloid formation in light chain amyloidosis", *Current topics in medicinal chemistry*, vol. 12, no. 22, pp. 2523-2533.
- Ramírez-Alvarado, M., Kelly, J.W. & Dobson, C.M. 2010, *Protein misfolding diseases: current and emerging principles and therapies*. Vladimir N. Uversky, Series Editor edn, John Wiley & Sons, New York.
- Randles, E.G., Thompson, J.R., Martin, D.J. & Ramirez-Alvarado, M. 2009, "Structural alterations within native amyloidogenic immunoglobulin light chains", *Journal of Molecular Biology*, vol. 389, no. 1, pp. 199-210.
- Ray, S.S., Singh, S.K. & Balaram, P. 2001, "An electrospray ionization mass spectrometry investigation of 1-anilino-8-naphthalene-sulfonate (ANS) binding to proteins", *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 12, no. 4, pp. 428-438.
- Rezaei-Ghaleh, N., Blackledge, M. & Zweckstetter, M. 2012, "Intrinsically disordered proteins: from sequence and conformational properties toward drug discovery", *Chembiochem : a European journal of chemical biology*, vol. 13, no. 7, pp. 930-950.

- Rinne, J.O., Brooks, D.J., Rossor, M.N., Fox, N.C., Bullock, R., Klunk, W.E., Mathis, C.A., Blennow, K., Barakos, J., Okello, A.A., Rodriguez Martinez de Liano, S., Liu, E., Koller, M., Gregg, K.M., Schenk, D., Black, R. & Grundman, M. 2010, "<sup>11</sup>C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid-beta load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study", *Lancet neurology*, vol. 9, no. 4, pp. 363-372.
- Rivera-Hernandez, G. 2013, *Tesi Doctoral en redacció*, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Rivera-Hernandez, G. 2009, *Expresión recombinante, purificación y caracterización inicial de un fragmento variable de cadena sencilla (scFv) específico para el péptido Abeta*, Treball de Màster, Universitat Autònoma de Barcelona.
- Rivera-Hernandez, G., Marin-Argany, M., Blasco-Moreno, B., Bonet, J., Oliva, B. & Villegas, S. 2013, "Elongation of the C-terminal domain of an anti-amyloid beta single-chain variable fragment increases its thermodynamic stability and decreases its aggregation tendency", *mAbs*, vol. 5, no. 5, pp. 678-689.
- Robert, R., Dolezal, O., Waddington, L., Hattarki, M.K., Cappai, R., Masters, C.L., Hudson, P.J. & Wark, K.L. 2009, "Engineered antibody intervention strategies for Alzheimer's disease and related dementias by targeting amyloid and toxic oligomers", *Protein engineering, design & selection : PEDS*, vol. 22, no. 3, pp. 199-208.
- Rousseau, F., Schymkowitz, J. & Serrano, L. 2006, "Protein aggregation and amyloidosis: confusion of the kinds?", *Current opinion in structural biology*, vol. 16, no. 1, pp. 118-126.
- Royer, C.A. 1995, "Fluorescence spectroscopy", *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, vol. 40, pp. 65-89.
- Sadqi, M., Fushman, D. & Munoz, V. 2006, "Atom-by-atom analysis of global downhill protein folding", *Nature*, vol. 442, no. 7100, pp. 317-321.
- Sali, A. & Blundell, T.L. 1993, "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints", *Journal of Molecular Biology*, vol. 234, no. 3, pp. 779-815.
- Sanchez, R., Pieper, U., Melo, F., Eswar, N., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M.S., Mirkovic, N. & Sali, A. 2000, "Protein structure modeling for structural genomics", *Nature structural biology*, vol. 7 Suppl, pp. 986-990.
- Sanger, F. & Coulson, A.R. 1975, "A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase", *Journal of Molecular Biology*, vol. 94, no. 3, pp. 441-448.
- Saraceno, C., Musardo, S., Marcello, E., Pelucchi, S. & Luca, M.D. 2013, "Modeling Alzheimer's disease: from past to future", *Frontiers in pharmacology*, vol. 4, pp. 77.
- Saro, D., Li, T., Rupasinghe, C., Paredes, A., Caspers, N. & Spaller, M.R. 2007, "A thermodynamic ligand binding study of the third PDZ domain (PDZ3) from the mammalian neuronal protein PSD-95", *Biochemistry*, vol. 46, no. 21, pp. 6340-6352.
- Schenk, D. 2002, "Amyloid-beta immunotherapy for Alzheimer's disease: the end of the beginning", *Nature reviews.Neuroscience*, vol. 3, no. 10, pp. 824-828.

- Schenk, D., Barbour, R., Dunn, W., Gordon, G., Grajeda, H., Guido, T., Hu, K., Huang, J., Johnson-Wood, K., Khan, K., Kholodenko, D., Lee, M., Liao, Z., Lieberburg, I., Motter, R., Mutter, L., Soriano, F., Shopp, G., Vasquez, N., Vandeventer, C., Walker, S., Wogulis, M., Yednock, T., Games, D. & Seubert, P. 1999, "Immunization with amyloid-beta attenuates Alzheimer-disease-like pathology in the PDAPP mouse", *Nature*, vol. 400, no. 6740, pp. 173-177.
- Serio, T.R., Cashikar, A.G., Kowal, A.S., Sawicki, G.J., Moslehi, J.J., Serpell, L., Arnsdorf, M.F. & Lindquist, S.L. 2000, "Nucleated conformational conversion and the replication of conformational information by a prion determinant", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 289, no. 5483, pp. 1317-1321.
- Serpell, L.C., Sunde, M., Benson, M.D., Tennent, G.A., Pepys, M.B. & Fraser, P.E. 2000, "The protofilament substructure of amyloid fibrils", *Journal of Molecular Biology*, vol. 300, no. 5, pp. 1033-1039.
- Serrano, L., Matouschek, A. & Fersht, A.R. 1992, "The folding of an enzyme. III. Structure of the transition state for unfolding of barnase analysed by a protein engineering procedure", *Journal of Molecular Biology*, vol. 224, no. 3, pp. 805-818.
- Shapiro, A.L., Vinuela, E. & Maizel, J.V., Jr 1967, "Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels", *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 28, no. 5, pp. 815-820.
- Sheng, M. & Sala, C. 2001, "PDZ domains and the organization of supramolecular complexes", *Annual Review of Neuroscience*, vol. 24, pp. 1-29.
- Shi, J., Guan, J., Jiang, B., Brenner, D.A., Del Monte, F., Ward, J.E., Connors, L.H., Sawyer, D.B., Semigran, M.J., Macgillivray, T.E., Seldin, D.C., Falk, R. & Liao, R. 2010, "Amyloidogenic light chains induce cardiomyocyte contractile dysfunction and apoptosis via a non-canonical p38alpha MAPK pathway", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 9, pp. 4188-4193.
- Shnyrov, V.L., Villar, E., Zhadan, G.G., Sanchez-Ruiz, J.M., Quintas, A., Saraiva, M.J. & Brito, R.M. 2000, "Comparative calorimetric study of non-amyloidogenic and amyloidogenic variants of the homotetrameric protein transthyretin", *Biophysical chemistry*, vol. 88, no. 1-3, pp. 61-67.
- Sierralta, J. & Mendoza, C. 2004, "PDZ-containing proteins: alternative splicing as a source of functional diversity", *Brain research. Brain research reviews*, vol. 47, no. 1-3, pp. 105-115.
- Sikkink, L.A. & Ramirez-Alvarado, M. 2010, "Cytotoxicity of amyloidogenic immunoglobulin light chains in cell culture", *Cell death & disease*, vol. 1, pp. e98.
- Sikkink, L.A. & Ramirez-Alvarado, M. 2008, "Salts enhance both protein stability and amyloid formation of an immunoglobulin light chain", *Biophysical chemistry*, vol. 135, no. 1-3, pp. 25-31.
- Solomon, A., Weiss, D.T. & Wall, J.S. 2003, "Immunotherapy in systemic primary (AL) amyloidosis using amyloid-reactive monoclonal antibodies", *Cancer biotherapy & radiopharmaceuticals*, vol. 18, no. 6, pp. 853-860.

- Solomon, B. 2009, "Immunotherapeutic strategies for Alzheimer's disease treatment", *TheScientificWorldJournal*, vol. 9, pp. 909-919.
- Solomon, B. 2006, "Alzheimer's disease immunotherapy: from in vitro amyloid immunomodulation to in vivo vaccination", *Journal of Alzheimer's disease : JAD*, vol. 9, no. 3 Suppl, pp. 433-438.
- Solomon, B., Koppel, R., Frankel, D. & Hanan-Aharon, E. 1997, "Disaggregation of Alzheimer beta-amyloid by site-directed mAb", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 8, pp. 4109-4112.
- Songyang, Z., Fanning, A.S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S.M., Chishti, A.H., Crompton, A., Chan, A.C., Anderson, J.M. & Cantley, L.C. 1997, "Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 275, no. 5296, pp. 73-77.
- Sreerama, N., Manning, M.C., Powers, M.E., Zhang, J.X., Goldenberg, D.P. & Woody, R.W. 1999, "Tyrosine, phenylalanine, and disulfide contributions to the circular dichroism of proteins: circular dichroism spectra of wild-type and mutant bovine pancreatic trypsin inhibitor", *Biochemistry*, vol. 38, no. 33, pp. 10814-10822.
- Sreerama, N., Venyaminov, S.Y. & Woody, R.W. 1999, "Estimation of the number of alpha-helical and beta-strand segments in proteins using circular dichroism spectroscopy", *Protein science : a publication of the Protein Society*, vol. 8, no. 2, pp. 370-380.
- Stefani, M. 2012, "Structural features and cytotoxicity of amyloid oligomers: implications in Alzheimer's disease and other diseases with amyloid deposits", *Progress in neurobiology*, vol. 99, no. 3, pp. 226-245.
- Stevens, F.J. 2000, "Four structural risk factors identify most fibril-forming kappa light chains", *Amyloid : the international journal of experimental and clinical investigation : the official journal of the International Society of Amyloidosis*, vol. 7, no. 3, pp. 200-211.
- Stevens, P.W., Raffin, R., Hanson, D.K., Deng, Y.L., Berrios-Hammond, M., Westholm, F.A., Murphy, C., Eulitz, M., Wetzell, R. & Solomon, A. 1995, "Recombinant immunoglobulin variable domains generated from synthetic genes provide a system for in vitro characterization of light-chain amyloid proteins", *Protein science : a publication of the Protein Society*, vol. 4, no. 3, pp. 421-432.
- Thomas, K. 2012, *Trials for Alzheimer's drug halted after poor results.*, The New York Times., US.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J. 1994, "CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice", *Nucleic acids research*, vol. 22, no. 22, pp. 4673-4680.
- Trinkaus-Randall, V., Walsh, M.T., Steeves, S., Monis, G., Connors, L.H. & Skinner, M. 2005, "Cellular response of cardiac fibroblasts to amyloidogenic light chains", *The American journal of pathology*, vol. 166, no. 1, pp. 197-208.

- Trovato, A., Chiti, F., Maritan, A. & Seno, F. 2006, "Insight into the structure of amyloid fibrils from the analysis of globular proteins", *PLoS computational biology*, vol. 2, no. 12, pp. e170.
- Tsai, N.P., Wilkerson, J.R., Guo, W., Maksimova, M.A., DeMartino, G.N., Cowan, C.W. & Huber, K.M. 2012, "Multiple autism-linked genes mediate synapse elimination via proteasomal degradation of a synaptic scaffold PSD-95", *Cell*, vol. 151, no. 7, pp. 1581-1594.
- Tsytlonok, M. & Itzhaki, L.S. 2013, "The how's and why's of protein folding intermediates", *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 531, no. 1-2, pp. 14-23.
- Umeda, K., Ikenouchi, J., Katahira-Tayama, S., Furuse, K., Sasaki, H., Nakayama, M., Matsui, T., Tsukita, S., Furuse, M. & Tsukita, S. 2006, "ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight-junction strand formation", *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 741-754.
- Uversky, V.N. 2013, "A decade and a half of protein intrinsic disorder: Biology still waits for physics", *Protein science : a publication of the Protein Society*, .
- Uversky, V.N. & Fink, A.L. 2004, "Conformational constraints for amyloid fibrillation: the importance of being unfolded", *Biochimica et biophysica acta*, vol. 1698, no. 2, pp. 131-153.
- Vallabhajosyula, R.R., Chakravarti, D., Lutfeali, S., Ray, A. & Raval, A. 2009, "Identifying hubs in protein interaction networks", *PLoS one*, vol. 4, no. 4, pp. e5344.
- van Anken, E. & Braakman, I. 2005, "Endoplasmic reticulum stress and the making of a professional secretory cell", *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, vol. 40, no. 5, pp. 269-283.
- van den Berg, S., Lofdahl, P.A., Hard, T. & Berglund, H. 2006, "Improved solubility of TEV protease by directed evolution", *Journal of Biotechnology*, vol. 121, no. 3, pp. 291-298.
- Van Rossum, G. 1991, *Python (programming language)*, Python Software Foundation.
- Viguera, A.R., Martinez, J.C., Filimonov, V.V., Mateo, P.L. & Serrano, L. 1994, "Thermodynamic and kinetic analysis of the SH3 domain of spectrin shows a two-state folding transition", *Biochemistry*, vol. 33, no. 8, pp. 2142-2150.
- Villegas, V., Azuaga, A., Catasus, L., Reverter, D., Mateo, P.L., Aviles, F.X. & Serrano, L. 1995, "Evidence for a two-state transition in the folding process of the activation domain of human procarboxypeptidase A2", *Biochemistry*, vol. 34, no. 46, pp. 15105-15110.
- Villegas, V., Martinez, J.C., Aviles, F.X. & Serrano, L. 1998, "Structure of the transition state in the folding process of human procarboxypeptidase A2 activation domain", *Journal of Molecular Biology*, vol. 283, no. 5, pp. 1027-1036.
- Vivian, J.T. & Callis, P.R. 2001, "Mechanisms of tryptophan fluorescence shifts in proteins", *Biophysical journal*, vol. 80, no. 5, pp. 2093-2109.

- Wall, J., Schell, M., Murphy, C., Hrnčić, R., Stevens, F.J. & Solomon, A. 1999, "Thermodynamic instability of human lambda 6 light chains: correlation with fibrillogenicity", *Biochemistry*, vol. 38, no. 42, pp. 14101-14108.
- Wall, J.G. & Pluckthun, A. 1999, "The hierarchy of mutations influencing the folding of antibody domains in *Escherichia coli*", *Protein engineering*, vol. 12, no. 7, pp. 605-611.
- Walther, F.J., Waring, A.J., Hernandez-Juviel, J.M., Gordon, L.M., Wang, Z., Jung, C.L., Ruchala, P., Clark, A.P., Smith, W.M., Sharma, S. & Notter, R.H. 2010, "Critical structural and functional roles for the N-terminal insertion sequence in surfactant protein B analogs", *PloS one*, vol. 5, no. 1, pp. e8672.
- Weiss, G.A., Watanabe, C.K., Zhong, A., Goddard, A. & Sidhu, S.S. 2000, "Rapid mapping of protein functional epitopes by combinatorial alanine scanning", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 16, pp. 8950-8954.
- Wiederstein, M. & Sippl, M.J. 2007, "ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins", *Nucleic acids research*, vol. 35, no. Web Server issue, pp. W407-10.
- Wimo, A. & Prince, M. 2010, *World Alzheimer Report 2010*, The Global Economic Impact of Dementia, Alzheimer's Disease International, London, 2010.
- Wisniewski, T. & Konietzko, U. 2008, "Amyloid-beta immunisation for Alzheimer's disease", *Lancet neurology*, vol. 7, no. 9, pp. 805-811.
- Wolynes, P.G., Onuchic, J.N. & Thirumalai, D. 1995, "Navigating the folding routes", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 267, no. 5204, pp. 1619-1620.
- Worn, A. & Pluckthun, A. 2001, "Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments", *Journal of Molecular Biology*, vol. 305, no. 5, pp. 989-1010.
- Worn, A. & Pluckthun, A. 1999, "Different equilibrium stability behavior of ScFv fragments: identification, classification, and improvement by protein engineering", *Biochemistry*, vol. 38, no. 27, pp. 8739-8750.
- Worn, A. & Pluckthun, A. 1998, "Mutual stabilization of VL and VH in single-chain antibody fragments, investigated with mutants engineered for stability", *Biochemistry*, vol. 37, no. 38, pp. 13120-13127.
- Wu, J., Yang, Y., Zhang, J., Ji, P., Du, W., Jiang, P., Xie, D., Huang, H., Wu, M., Zhang, G., Wu, J. & Shi, Y. 2007, "Domain-swapped dimerization of the second PDZ domain of ZO2 may provide a structural basis for the polymerization of claudins", *The Journal of biological chemistry*, vol. 282, no. 49, pp. 35988-35999.
- Wu, J.W., Breydo, L., Isas, J.M., Lee, J., Kuznetsov, Y.G., Langen, R. & Glabe, C. 2010, "Fibrillar oligomers nucleate the oligomerization of monomeric amyloid beta but do not seed fibril formation", *The Journal of biological chemistry*, vol. 285, no. 9, pp. 6071-6079.
- Wu, T.T. & Kabat, E.A. 1970, "An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity", *The Journal of experimental medicine*, vol. 132, no. 2, pp. 211-250.

- Wuthrich, K. 2001, "The way to NMR structures of proteins", *Nature structural biology*, vol. 8, no. 11, pp. 923-925.
- Yankner, B.A., Dawes, L.R., Fisher, S., Villa-Komaroff, L., Oster-Granite, M.L. & Neve, R.L. 1989, "Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease", *Science (New York, N.Y.)*, vol. 245, no. 4916, pp. 417-420.
- Zameer, A., Kasturirangan, S., Emadi, S., Nimmagadda, S.V. & Sierks, M.R. 2008, "Anti-oligomeric Abeta single-chain variable domain antibody blocks Abeta-induced toxicity against human neuroblastoma cells", *Journal of Molecular Biology*, vol. 384, no. 4, pp. 917-928.
- Zandomeneghi, G., Krebs, M.R., McCammon, M.G. & Fandrich, M. 2004, "FTIR reveals structural differences between native beta-sheet proteins and amyloid fibrils", *Protein science : a publication of the Protein Society*, vol. 13, no. 12, pp. 3314-3321.
- Zhang, J., Lewis, S.M., Kuhlman, B. & Lee, A.L. 2013, "Supertertiary Structure of the MAGUK Core from PSD-95", *Structure (London, England : 1993)*, vol. 21, no. 3, pp. 402-413.
- Zhang, J., Petit, C.M., King, D.S. & Lee, A.L. 2011, "Phosphorylation of a PDZ domain extension modulates binding affinity and interdomain interactions in postsynaptic density-95 (PSD-95) protein, a membrane-associated guanylate kinase (MAGUK)", *The Journal of biological chemistry*, vol. 286, no. 48, pp. 41776-41785.
- Zhang, X., Xu, J. & Xiao, W.X. 2013, "A new method for the discovery of essential proteins", *PloS one*, vol. 8, no. 3, pp. e58763.
- Zheng, L., Baumann, U. & Reymond, J.L. 2003, "Production of a functional catalytic antibody ScFv-NusA fusion protein in bacterial cytoplasm", *Journal of Biochemistry*, vol. 133, no. 5, pp. 577-581.





## APÈNDIX D'ARTICLES.

### **An anti-A $\beta$ (amyloid $\beta$ ) single-chain variable fragment prevents amyloid fibril formation and cytotoxicity by withdrawing A $\beta$ oligomers from the amyloid pathway**

Marin-Argany, M.\*, Rivera-Hernández, G.\*, Martí-Clua, J. & Villegas, S.

Biochemical Journal 437, 25–34 (doi:10.1042/BJ20101712) 2011

*\*First co-author*

### **Early intervention in the 3xTg-AD mice with an amyloid $\beta$ -antibody fragment ameliorates first hallmarks of Alzheimer disease.**

Giménez-Llort, L., Rivera-Hernández, G., Marin-Argany, M., Sánchez-Quesada, J.L. & Villegas, S.

mAb 5:5, 665–677 (doi:10.4161/mabs.25424) 2013

### **Elongation of the C-terminal domain of an anti-amyloid A $\beta$ single-chain variable fragment increases its thermodynamic stability and decreases its aggregation tendency**

Rivera-Hernández, G.\*, Marin-Argany, M.\*, Blasco-Moreno, B., Bonet J., Oliva B. & Villegas, S.

mAb 5:5, 678–689 (doi:10.4161/mabs.25382) 2013

*\*First co-author*

### **The interconversion between a flexible $\beta$ -sheet and a fibril $\beta$ -arrangement constitutes the main conformational event during misfolding of PSD95-PDZ3 domain**

Marín-Argany, M.\*, Candel, M.A.\*, Murciano-Calles, J., Martínez, J.C. & Villegas, S.

Biophysical Journal 103, 738–47 (doi:10.1016/j.bpj.2012.07.029) 2012

*\*First co-author*

### **A thermodynamic study of the third PDZ domain of MAGUK neuronal protein PSD-95 reveals a complex three-state folding behavior**

Murciano-Calles, J., Martínez, J.C., Marín-Argany, M., Villegas, S. & Cobos, E.S.

Biophysical Chemistry, *Submitted on September, 2013*

### **The impact of extra-domain structures and post-translational modifications in the folding/misfolding behaviour of the third PDZ domain of MAGUK neuronal protein PSD-95**

Marín-Argany, M.\*, Murciano-Calles, J.\*, Cobos, E.S., Villegas, S. & Martínez, J.C.

*\*First co-author*

*Article en redacció*

