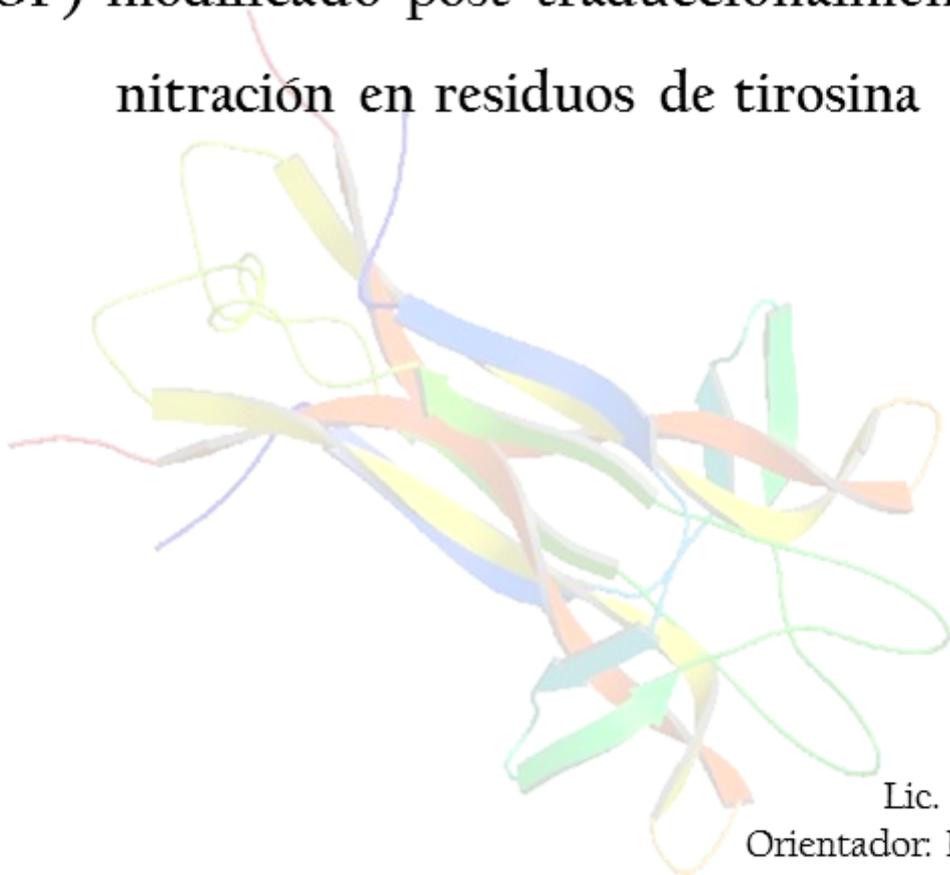


TESIS DE MAESTRÍA

PEDECIBA BIOLOGÍA

BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR

Desarrollo y caracterización de anticuerpos
monoclonales para el Factor de Crecimiento Nervioso
(NGF) modificado post-traduccionamente por
nitración en residuos de tirosina



Lic. Valentina Varela
Orientador: Dr. Luis Barbeito
Montevideo, febrero de 2017

ÍNDICE

| | |
|--|----|
| RESUMEN..... | 5 |
| AGRADECIMIENTOS..... | 6 |
| INTRODUCCIÓN..... | 8 |
| El Factor de crecimiento nervioso (NGF) | 8 |
| Síntesis y maduración del NGF..... | 10 |
| Receptores celulares del NGF | 11 |
| Papel del NGF en respuestas inmunes y la inflamación..... | 14 |
| NGF como blanco del peroxinitrito (ONOO ⁻) en procesos inflamatorios..... | 16 |
| Especies nitradas de NGF | 17 |
| El NGF en la neurodegeneración | 19 |
| El NO ₂ -NGF como mediador de la apoptosis de motoneuronas en ELA..... | 19 |
| Estrategias de inhibición de NGF | 25 |
| HIPÓTESIS | 27 |
| OBJETIVOS | 27 |
| Objetivo general..... | 27 |
| Objetivos específicos | 27 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | 28 |
| Síntesis de β-NGF recombinante humano | 28 |
| Electroforesis de proteínas SDS-PAGE..... | 29 |
| Tinción de geles de proteínas con nitrato de plata | 30 |
| Nitración de NGF con peroxinitrito..... | 30 |
| Western Blot y Dot Blot | 31 |
| Cromatografía de exclusión molecular..... | 32 |
| Búsqueda de NO ₂ -Tyr en muestras de NGF nitrado por Espectrometría de masas..... | 32 |
| Desarrollo de los mAbs anti-NO ₂ NGF | 32 |

| | |
|--|----|
| Síntesis de péptidos en fase sólida y verificación por espectrometría de masa (MS) y cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC)..... | 33 |
| Mapeo de epítipo utilizando Ensayo por Inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA) | 34 |
| Termoforesis en microescala (MST de Microscale Thermophoresis)..... | 35 |
| Experimentos de Resonancia Plasmónica de Superficie (SPR)..... | 37 |
| Tratamiento de células PC12 con NGF, NO ₂ -NGF y su bloqueo por mAbs | 39 |
| Cultivos puros de motoneuronas | 39 |
| Animales | 40 |
| Diseccción de médula espinal de rata adulta hSOD ^{G93A} | 41 |
| Inmunohistoquímica de fluorescencia de médula espinal de rata transgénica hSOD ^{G93A} | 42 |
| RESULTADOS..... | 43 |
| 1. Síntesis de NGF y NO ₂ -NGF recombinante humano en E. coli..... | 43 |
| 2. Desarrollo de anticuerpos monoclonales anti NO ₂ -NGF, que reconocen específicamente a la tirosina 52 nitrada en el contexto de la molécula de NGF. | 47 |
| 3. Especificidad de los mAbs por el NO ₂ -NGF, frente al NGF y a otras proteínas nitradas. | 50 |
| 4. Evaluación de la afinidad de los mAbs por el epítipo aislado vs. la proteína entera mediante ELISA. | 52 |
| 5. Escáner de alaninas mediante ELISA para determinar los aminoácidos del epítipo que participan en el reconocimiento antígeno-anticuerpo..... | 54 |
| 6. Caracterización de la afinidad de los anticuerpos por el antígeno mediante técnicas cuantitativas..... | 57 |
| i. Ensayos de Termoforesis..... | 59 |
| ii. Ensayos de Resonancia Plasmónica | 65 |
| 7. Actividad neutralizante de los anticuerpos monoclonales anti-NO ₂ -NGF | 70 |
| i. Efecto neutralizante de los mAbs anti-NO ₂ -NGF en cultivos puros de motoneuronas | 70 |
| ii. Bioensayo en cultivo de células PC12..... | 72 |

| | |
|---|----|
| 8. Detección de NO ₂ -NGF en médula espinal de rata hSOD ^{G93A} sintomática mediante inmunofluorescencia..... | 73 |
| DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS | 76 |
| CONCLUSIONES..... | 82 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 84 |

RESUMEN

En el año 2006, se comunicó la existencia de especies de la neurotrofina factor de crecimiento nervioso (NGF), modificadas post-traduccionamente por nitración de residuos tirosina (NO₂-NGF). En paralelo, se demostró que el NO₂-NGF posee una actividad pro-apoptótica por estimulación del receptor p75^{NTR} y se identificó esta variante proteica en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer, sugiriendo una asociación entre modificaciones post-traduccionales del NGF y el estrés nitro oxidativo característico de los procesos neurodegenerativos. En este contexto se propone que la neutralización del NO₂-NGF por anticuerpos específicos podría resultar en un efecto terapéutico en la neurodegeneración. Este trabajo de tesis consistió en el desarrollo y caracterización de anticuerpos monoclonales (mAbs) que reconocen un epítipo específico del NO₂-NGF en proximidades del residuo tirosina en la posición 52. Como este residuo está involucrado en la interacción del NGF con receptores de neurotrofinas, se buscó que los mAbs tuvieran actividad neutralizante de función. Se lograron producir cuatro mAbs, dos de ellos idénticos en su secuencia aminoacídica (4C6 y 7G8) y otros dos que poseen solo dos diferencias puntuales dentro del CDR2 de las cadenas pesadas y livianas (12G8 y 16C6). Estos mAbs cumplen con el requisito de unirse específicamente al NGF nitrado, no reconocer al NGF ni a otras proteínas nitradas, y ejercer actividad bloqueante en cultivos celulares. Mediante distintos análisis de afinidad y estructurales, los mAbs 12G8 y 16C6 se seleccionaron como mAbs neutralizantes. Por fin, se observó, que estos mAbs son capaces de reconocer al NO₂-NGF en médula espinal de ratas transgénicas SOD1^{G93A} que desarrollan enfermedad de la motoneurona y neuroinflamación, sugiriendo la utilidad de los mAbs como biomarcadores de neurodegeneración, con potencial uso en diagnóstico y terapéutico.

AGRADECIMIENTOS

Para comenzar quiero agradecer a Luis por abrirme las puertas del laboratorio y permitirme formar parte de su equipo, brindándome la confianza y herramientas necesarias para el trabajo diario.

Durante el desarrollo de este trabajo, muchas personas han colaborado. Agradezco a mis compañeros de laboratorio que estuvieron desde los comienzos, a Andrés, que me recibió el primer día que llegué y me introdujo al mundo del NGF. Natalia y Hugo colaboraron desde un comienzo con el proyecto y siempre estuvieron dispuestos ayudar con todo tipo de problemas cotidianos. También a las más pequeñas, Paty, Nati, Lucha y Emilia que hoy ya no están en el laboratorio, pero formaron parte de nuestro equipo. Especialmente quiero agradecer a mis compañeros actuales, Romi, Sofi y Emiliano, que hace dos años se involucraron con este proyecto, colaboraron en todo sentido, y hoy formamos un muy lindo equipo de trabajo en el que compartimos el día a día.

No quiero dejar de mencionar a las unidades del Instituto Pasteur que han colaborado con mi trabajo. Principalmente la Unidad de Proteínas Recombinantes, que me han ayudado siempre con la purificación de NGF, en particular a Ceci Abreu que me ha dedicado largas horas de su tiempo. Además participó la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica en la identificación de la nitración del NGF.

En estos seis años que llevo trabajando en el Instituto, prácticamente todos han estado vinculados de alguna forma con mi trabajo diario, ya sea con el préstamo de algún reactivo u equipo, o simplemente compartiendo almuerzos e inquietudes.

Quiero agradecerle, a todos los integrantes del laboratorio del Dr. Pedro Alzari en el Institut Pasteur de París, que me recibieron muy cálidamente y me apoyaron durante mi pasantía. En particular Mariano y Brigitte que me enseñaron las técnicas de Termoforesis y Biacore que forman una parte muy importante de esta tesis.

También ha sido importante el departamento de Histología de Facultad de Medicina, que colabora estrechamente con nuestro laboratorio, desde el aporte de animales hasta la constante transferencia de conocimientos.

Quiero agradecerle a la Dra. Giselle Prunell, con la que realicé una pasantía en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE). Durante ese tiempo aprendí a trabajar con cultivos primarios y fue una muy linda experiencia.

También agradezco a la Dra. Adriana Cassina quien nos brindó el peroxinitrito una pieza fundamental de éste trabajo.

Una de las personas más importantes para esta tesis fue Monique, con la que trabajamos codo a codo para sacar adelante al NO₂-NGF, y por sobretodo nos hicimos muy buenas amigas en los dos años que compartimos.

Por último, quiero agradecer a mi familia y amigos que siempre me han estado apoyando.

INTRODUCCIÓN

El Factor de crecimiento nervioso (NGF)

El Factor de Crecimiento Nervioso (del inglés: *Nerve Growth Factor*, NGF) es el miembro fundador de la familia de las neurotrofinas que está compuesta además por el Factor de Crecimiento Derivado del Cerebro (del inglés: *Brain Derived Neurotrophic Factor*, BDNF), la Neurotrofina 3 (NT-3), la Neurotrofina 4/5 (NT 4/5) la Neurotrofina 6 (NT-6) y la Neurotrofina 7 (NT-7) (Nilsson, Fainzilber et al. 1998).

Descubierto en el año 1947 por Rita-Levi Montalcicni (Levi-Montalcini and Amprino 1947), el NGF promueve la diferenciación, proliferación y crecimiento neuronal en el sistema nervioso durante el desarrollo (Korsching, Auburger et al. 1985). Es esencial para el mantenimiento fenotípico de neuronas en el sistema nervioso periférico y para la integridad funcional de neuronas colinérgicas en el sistema nervioso central (SNC) (Aloe, Bracci-Laudiero et al. 1997).

La estructura del NGF fue determinada mediante cristalografía de rayos X en 1991 (McDonald, Lapatto et al. 1991). El monómero de NGF tiene una forma alargada con la parte central formada por dos pares de hojas beta antiparalelas. Uno de los extremos de la molécula posee tres bucles en horquilla, mientras que el otro extremo está formado por un cuarto bucles y una estructura denominada nudo de cisteínas que estabiliza la formación del homodímero. El motivo “nudo de cisteínas”, observado por primera vez en el NGF y compartido por todas las neurotrofinas, está formado por tres puentes disulfuro. Dos de ellos, forman un anillo cerrado que es penetrado por el tercer puente disulfuro. Esta estructura ha sido encontrada más adelante en estructuras de otros factores de crecimiento diméricos que no poseen homología con las neurotrofinas tales como PDGF y TGF- β (Wiesmann and de Vos 2001). En la forma biológicamente activa del NGF, dos monómeros de 118 aminoácidos se disponen en forma paralela para formar un homodímero compacto de 26,5 KDa [Figura 1].

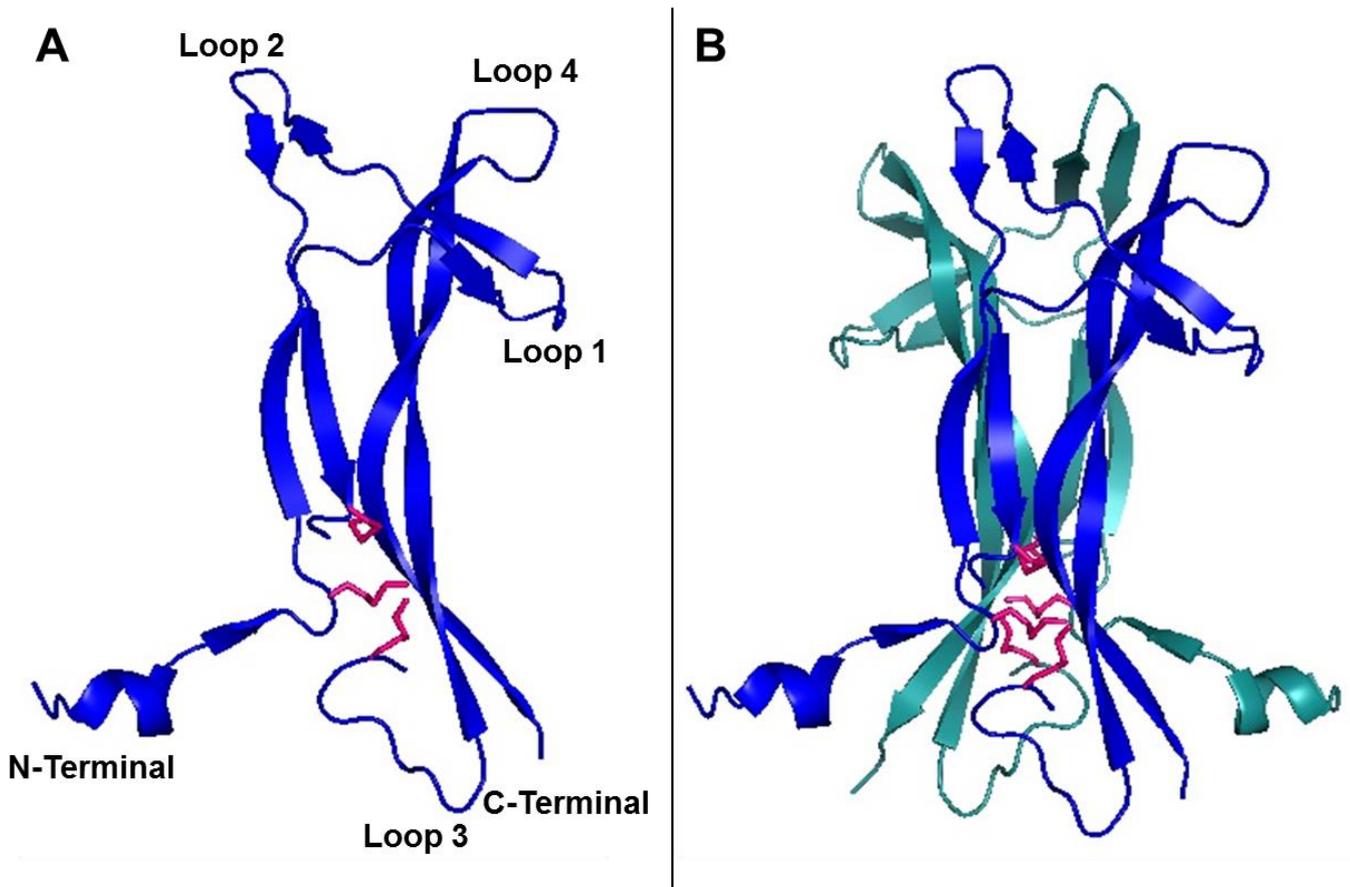


Figura 1. Estructura del NGF [RCSB: 2IFG]. (A) Las características estructurales del monómero de NGF están señaladas: tres puentes disulfuro representados con bastones de color rosado, los loops 1 – 4, y los extremos N y C terminales. (B) Estructura dimérica del NGF, uno de los monómeros está representado en celeste y el otro en azul. Los puentes disulfuro se resaltan en rosado.

El NGF se ha aislado y purificado a partir de la glándula submaxilar de ratón, la cual constituye la fuente natural más abundante de esta proteína (Bocchini and Angeletti 1969, Levi-Montalcini 1987). En este tejido, el NGF forma parte de un complejo pentamérico con dos subunidades alfa (α), una subunidad beta (β) y dos gamma (γ), todas asociadas no covalentemente. La subunidad β (β -NGF), es la responsable de la actividad biológica del NGF y a menudo se la denomina fracción 2,5S debido a su coeficiente de sedimentación (Angeletti and Bradshaw 1971). La secuencia nucleotídica del gen que codifica para el NGF se encuentra altamente conservado en la escala filogenética (Hallbook 1999, McKay, Purcell et al. 1999). Al comparar la secuencia aminoácida del NGF

entre humano y ratón se ve que estos solo difieren en 12 de los 118 aminoácidos (Barde 1989).

Síntesis y maduración del NGF

Como las otras neurotrofinas, el NGF es sintetizado como un precursor proteico o proNGF, que luego de un clivaje proteolítico dentro de la célula, es liberado como una proteína madura y biológicamente activa. Contrariamente a lo que se creía en un comienzo, el proNGF, así como el resto de las pro-Neurotrofinas, posee también actividad biológica y se acumula en mayor proporción tanto en el cerebro humano como murino, y sus niveles se duplican en pacientes con enfermedad de Alzheimer (Fahnestock, Michalski et al. 2001).

Luego de la síntesis proteica, el pro-NGF es internalizado por el retículo endoplásmico gracias a un péptido señal de 18 aminoácidos en su extremo amino terminal, el cual es eliminado tras su ingreso (Lessmann, Gottmann et al. 2003). El plegamiento ocurre en ausencia de chaperonas en un proceso guiado principalmente por el pro-dominio (Kliemann, Golbik et al. 2007). La formación del homodímero ocurre de forma espontánea sin la ayuda de proteínas accesorias (Kolbeck, Jungbluth et al. 1994). Luego del plegamiento, el dímero sufre N-glicosilación y sulfatación de los N-oligosacáridos en ambos monómeros; dichas modificaciones estabilizan la estructura terciaria y evitan la degradación intracelular.

Al momento de la llegada al trans-Golgi se define si la proteína va a ser secretada como proNGF o NGF y qué vía de secreción va a seguir cada isoforma, regulada o constitutiva (Lee, Kermani et al. 2001). En la mayoría de las células no neuronales, las neurotrofinas son secretadas a través de la vía constitutiva, donde los compartimientos de vesículas intracelulares se fusionan espontáneamente con la membrana plasmática para liberarlas en el espacio extracelular (Lee, Kermani et al. 2001). En células neuronales las neurotrofinas son cargadas en gránulos secretorios, que posteriormente se transportan a terminales dendríticas para liberarse de forma post-sináptica (Fahnestock, Yu et al. 2004). Sin embargo, las neurotrofinas también pueden ser liberadas en

las terminales axonales, donde son secretadas en respuesta a un estímulo (Harrington, Leiner et al. 2004). Hay tres destinos posibles para el proNGF intracelular: clivaje intracelular seguido de secreción, secreción seguida de clivaje extracelular, o secreción sin clivaje (Lu, Pang et al. 2005). El clivaje intracelular del proNGF es llevado a cabo una enzima Furina perteneciente a la familia de las convertasas de pro-proteínas (Fahnestock, Yu et al. 2004). Mientras que el clivaje extracelular puede ser llevado a cabo por dos enzimas. Plasmina, genera un NGF maduro, mientras que la Metaloproteasa-9 (MMP-9) genera un intermediario de 17 KDa (Fahnestock, Yu et al. 2004).

Receptores celulares del NGF

Como otros factores de crecimiento, el NGF exhibe su efecto biológico interactuando con receptores específicos de la membrana celular. Se han caracterizado dos tipos de receptores para las neurotrofinas, uno de baja afinidad denominado receptor de neurotrofinas p75 ($p75^{NTR}$), al cual pueden unirse todas las neurotrofinas con similar afinidad, y un receptor perteneciente a la familia tropomiosin quinasa (del inglés: *tropomyosin-related kinase*, Trk). Este segundo tipo de receptores interactúa de forma específica con su ligando, siendo tres los genes que codifican la síntesis de los mismos: TrkA, TrkB y TrkC. Los receptores TrkA se unen al NGF y posiblemente a la NT-6 y a la NT-7, TrkB al BDNF y a las NT 4/5, y TrkC a la NT-3 [Figura 2].

El receptor $p75^{NTR}$ se expresa en neuronas y células gliales, y ejerce entre sus principales funciones: la regulación de la apoptosis neuronal, el transporte retrógrado de neurotrofinas, la cooperación con los receptores de alta afinidad en la unión a las neurotrofinas y secuestro de las neurotrofinas circulantes (Barker 1998, Barrett 2000, Shu, Lu et al. 2015). Además se ha visto que todas las neurotrofinas pueden unirse a $p75^{NTR}$ con similar afinidad (Frade and Barde 1998). $p75^{NTR}$ es un miembro de la superfamilia de los receptores de necrosis tumoral con un dominio extracelular que incluye cuatro motivos ricos en cisteínas, un solo dominio transmembrana y uno intracelular que contiene un dominio de muerte característico de esta familia de receptores (Liepinsh, Ilag et al. 1997, He and Garcia 2004).

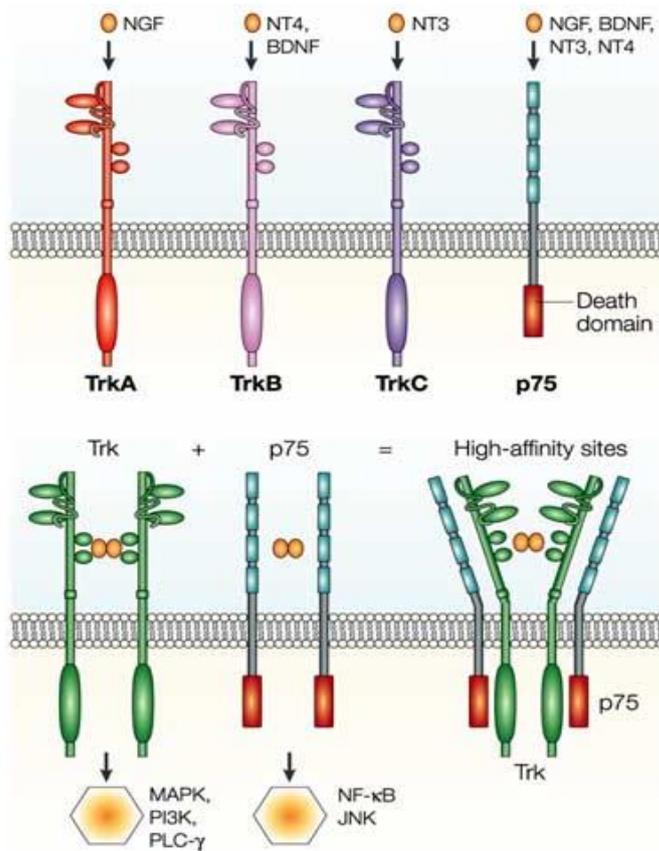


Figura 2. Neurotrofinas y sus receptores. Las neurotrofinas interactúan con dos tipos de receptores: receptor tropomiosin quinasa (Trk) y receptor de neurotrofinas p75 ($p75^{NTR}$). Los receptores Trk unen de forma específica una o más neurotrofinas con alta afinidad, mientras que el receptor $p75^{NTR}$ es capaz de interactuar con todas las neurotrofinas con una menor afinidad. El receptor TrkA interactúa con el NGF, TrkB con BDNF y NT4, TrkC con NT3. Interacciones entre Trk y $p75^{NTR}$ aumentan notablemente la afinidad de unión de las neurotrofinas. A través de $p75^{NTR}$ se activan vías de supervivencia, crecimiento de neuritas y muerte celular, mientras que a través de Trk se encienden vías de supervivencia y diferenciación. Extraído de (Chao 2003).

Los primeros resultados de co-cristalización entre el NGF y $p75^{NTR}$ demostraron que los dominios ricos en cisteínas 2 y 4 de $p75^{NTR}$ interactúan con la interfaz hidrofóbica del NGF (He and Garcia 2004), mientras que el NGF se une a la superficie cóncava del receptor [Figura 3]. Los estudios estructurales también mostraron que un monómero de $p75^{NTR}$ es capaz de interactuar con un dímero de NGF (He and Garcia 2004). A diferencia de las neurotrofinas maduras, las pro-Neurotrofinas pueden formar complejos de alta afinidad con el $p75^{NTR}$ cuando este se encuentra asociado a Sortilina, activando generalmente vías de muerte celular (Nykjaer, Lee et al. 2004). Se ha propuesto que las especies de alto peso molecular de NGF tratado con peroxinitrito podrían ejercer su función a través del receptor $p75^{NTR}$, y particularmente podrían unirse con mayor afinidad al interactuar a su vez con Sortilina, desencadenando señales de muerte dentro de la célula (Pehar, Vargas et al. 2006).

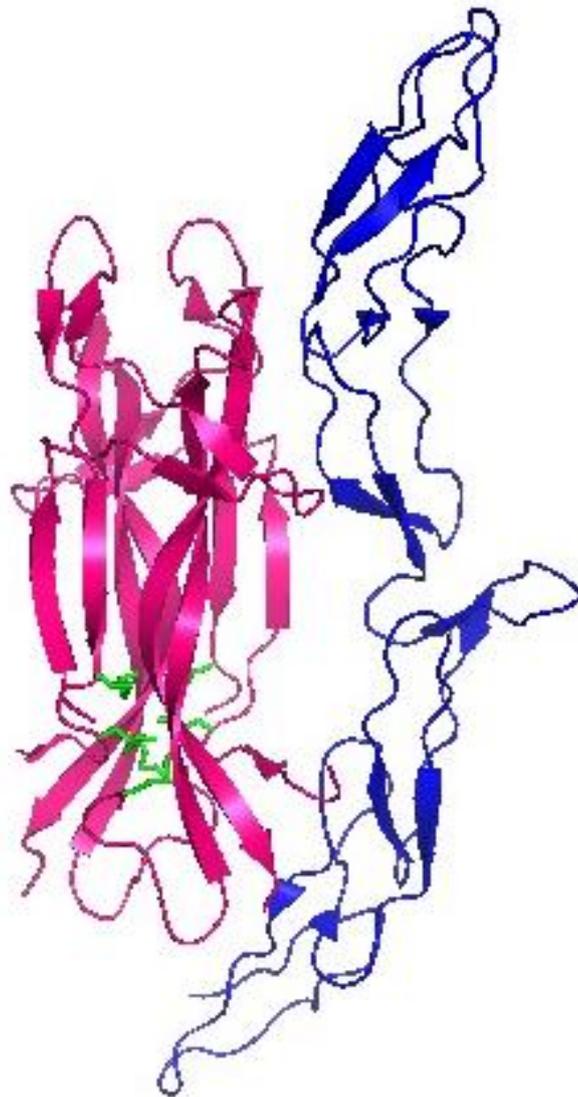


Figura 3. Estructura del NGF unido a la porción extracelular del receptor p75^{NTR} [RCSB: 1SG1]. Se muestra la estructura asimétrica del dímero de NGF, con el monómero del receptor. En la unión participan dos sitios de interacción: 1) los residuos 30-32 y 48-55 del bucle 1 de una de las cadenas de NGF, y los residuos 88, 95 – 100 del bucle 4 de la otra cadena; 2) los residuos 9-23 y 30-32 del bucle 1.

Como se mencionó previamente el NGF interactúa también con un receptor de alta afinidad denominado TrkA. A través de éste receptor es que ocurre, fundamentalmente, la transducción de la señal de las neurotrofinas (Chao 2003, Reichardt 2006). El dominio extracelular de cada receptor Trk consiste en un agrupamiento rico en cisteínas seguido por tres repetidos de leucina, otro cluster de cisteínas y dos dominios inmunoglobulina. Esta región se une a

través de la porción transmembrana con el dominio tirosin quinasa intracelular (Reichardt 2006). La activación de TrkA se produce al interactuar con el NGF, lo que induce la dimerización del receptor y la internalización del complejo receptor-ligando y su trans-fosforilación (Huang and Reichardt 2003). Luego de la dimerización y autofosforilación en los residuos de tirosina, el receptor es capaz de activar por fosforilación o interacción alostérica a sus ligandos intracelulares.

La estructura del dominio d5 del receptor TrkA unido a NGF fue resuelta inicialmente en 1999 y en el 2007 se determinó la estructura del NGF unido al dominio extracelular entero de TrkA [Figura 4] (Eibl, Strasser et al. 2012). Estos resultados demostraron que el NGF se une en una orientación opuesta a la que interacciona con p75^{NTR} con respecto a la membrana plasmática. Además se demostró que el dominio C-terminal que corresponde al dominio de unión tipo inmunoglobulina es el responsable de la interacción directa con el NGF, formando un complejo simétrico (Eibl, Strasser et al. 2012).

Papel del NGF en respuestas inmunes y la inflamación

Durante el desarrollo embrionario, la expresión de receptores de NGF es finamente modulada en órganos linfoides primarios y secundarios (Ciriaco, Dall'Aglio et al. 1996, Aloe, Micera et al. 1997), y desciende durante la vida adulta (Ciriaco, Dall'Aglio et al. 1996). En la médula ósea y en el timo, la expresión de receptores de NGF se ha evidenciado en células del estroma, las cuales liberan factores de crecimiento específicos y señales que regulan la diferenciación de precursores mieloides y linfoides (Lee, Na et al. 2008, Rezaee, Rellick et al. 2010). En los órganos del sistema inmune hay una producción local de NGF que regula la inervación simpática y sensorial, y la producción de neuropéptidos y neurotransmisores tanto en el desarrollo como en la vida adulta (Madden and Felten 1995, Elenkov, Wilder et al. 2000). La constante producción de NGF en órganos linfoides también parece importante para la regulación de la diferenciación de células madre hematopoyéticas (Aloe, Micera et al. 1997).

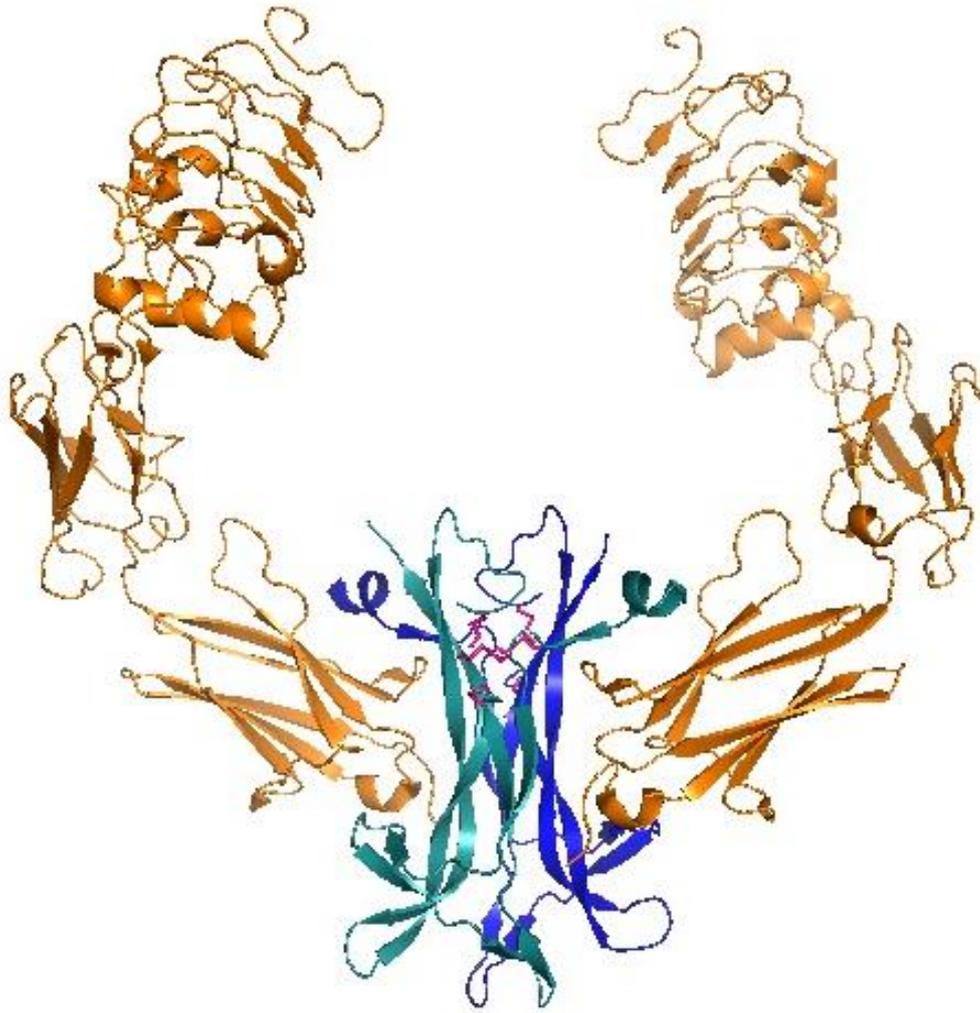


Figura 4. Estructura del complejo TrkA-NGF [RCSB: 2IFG]. Se muestra la unión del NGF a su receptor TrkA de forma simétrica formando un complejo 2:2. Residuos de los bucles 1, 2 y 4 participan en la interacción con el receptor. La orientación del NGF es opuesta a la observada en el complejo NGF-p75^{NTR} con respecto a la posición que adopta el NGF sobre la membrana celular.

La síntesis de NGF puede ser inducida por citoquinas pro-inflamatorias producidas por células del sistema inmune. A su vez, la mayoría de las células inflamatorias como mastocitos, linfocitos B y T, macrófagos, eosinófilos y basófilos son blancos del NGF debido a que poseen tanto TrkA como p75^{NTR}. El NGF estimula la degranulación de mastocitos, quimiotaxis de monocitos, proliferación y diferenciación de linfocitos B y T, síntesis de inmunoglobulinas en linfocitos B y liberación de mediadores químicos por parte de neutrófilos y basófilos (Freund and Frossard 2004, Bracci-Laudiero and De Stefano 2016).

Diversos estudios han evidenciado una sobre-expresión de NGF en condiciones inflamatorias tanto en tejidos periféricos como en el sistema nervioso, y se sabe que el NGF está fuertemente implicado en la generación y mantenimiento del dolor. De hecho, ensayos con moléculas neutralizantes de NGF son efectivos agentes analgésicos en algunos modelos de dolor crónico tanto en animales como en humanos (Fiore, Chaldakov et al. 2009).

Debido a la importancia de la acción del NGF en el sistema inmune, éste se encuentra implicado y juega un rol crítico en desórdenes inflamatorios y neuroinflamatorios tales como la esclerosis múltiple, enfermedad de Alzheimer, lupus sistémico eritematoso y artritis reumatoidea, entre otros (Aloe, Skaper et al. 1994).

NGF como blanco del peroxinitrito (ONOO⁻) en procesos inflamatorios

El peroxinitrito es un potente compuesto nitrante que se forma en una reacción espontánea entre la óxido nítrico y el superóxido (Beckman and Koppenol 1996, Radi, Peluffo et al. 2001). Es producido en un ambiente inflamatorio donde la microglia, macrófagos, astrocitos, células endoteliales o células infiltrantes del sistema inmune tienen la habilidad de producir simultáneamente niveles excesivos de radicales de oxígeno y óxido nítrico. A su vez, el peroxinitrito se comporta como un agente oxidante y nitrante potente, capaz de reaccionar y modificar una amplia variedad de biomoléculas incluyendo proteínas, lípidos y ADN (Beckman and Koppenol 1996, Radi 2004). La nitración de tirosinas, que implica la adición de un grupo nitro (NO₂) al anillo aromático, es considerado como un marcador de daño oxidativo mediado por peroxinitrito (Pacher, Beckman et al. 2007, Daiber, Daub et al. 2013, Viera, Radmilovich et al. 2013). Aunque existen vías alternativas de nitración de tirosinas que implican peroxidasas que utilizan nitrito, el peroxinitrito ha demostrado ser el agente de nitración predominante en la neurodegeneración (Estevez, Spear et al. 1998, Pacher, Beckman et al. 2007). Existe evidencia de que varias proteínas son nitradas por peroxinitrito induciendo cambios en la estructura o función proteicas (Ischiropoulos and Beckman 2003).

Especies nitradas de NGF

El monómero de NGF contiene dos residuos de tirosina bien conservados en las posiciones 52 y 79 (Bradshaw, Murray-Rust et al. 1994). La Tirosina 52 está conservada en todos los miembros de la familia de las neurotrofinas y participa tanto en la estabilización de la formación del dímero como en el reconocimiento del receptor $p75^{\text{NTR}}$ (Ibanez, Hallbook et al. 1990, McDonald, Lapatto et al. 1991, He and Garcia 2004). Por otro lado, la tirosina 79 es conservada en la mayoría de los NGFs pero no en otras neurotrofinas (Bradshaw, Murray-Rust et al. 1994).

Se ha visto que la reacción de nitración de NGF de ratón *in vitro* con peroxinitrito induce la formación de oligómeros de NGF en una forma dosis dependiente [Figura 5 a] (Pehar, Vargas et al. 2006). El peroxinitrito tiene la capacidad de nitrar tanto residuos de tirosinas como de triptófanos. En particular, análisis mediante espectrometría de masas han demostrado que en el NGF, el peroxinitrito es capaz de nitrar la tirosina 52 y el triptófano 99 (Pehar, Vargas et al. 2006). Otro agente nitrante, el Tetranitrometano (TNM) capaz de nitrar solo los residuos de tirosina, también induce la formación de oligómeros del NGF al nitrar ambos residuos de tirosina. Tanto el NO_2 -NGF generado con peroxinitrito como con TNM reducen la supervivencia en cultivos celulares de motoneuronas en una forma dependiente de $p75^{\text{NTR}}$ [Figura 5 b y c] (Pehar, Vargas et al. 2006).

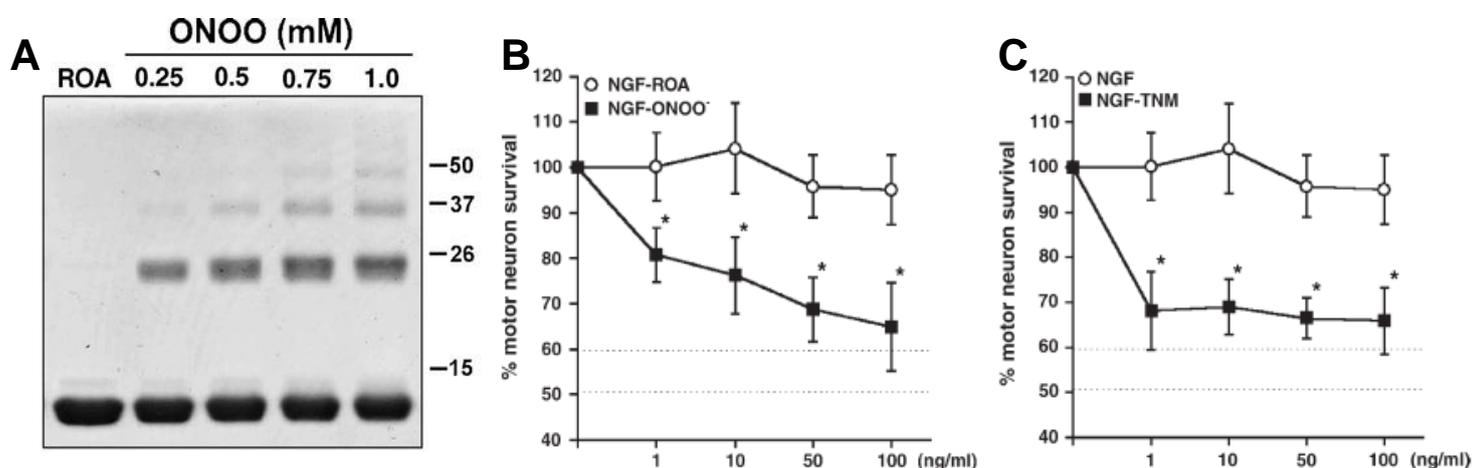


Figura 5. Nitración del NGF con peroxinitrito *in vitro* y su efecto sobre cultivos de motoneuronas. (A) SDS-PAGE del producto de nitración con peroxinitrito (ONOO), como control se sembró NGF₁ tratado con peroxinitrito descompuesto (ROA). Se observa la formación de oligómeros dependiente de la dosis de ONOO. (B) Disminución de la supervivencia de motoneuronas en cultivo al ser tratadas con ONOO. (C) Disminución de la supervivencia de motoneuronas en cultivo al ser tratadas con TNM. Extraído de (Pehar, Vargas et al. 2006).

Debido al gran porcentaje de conservación de estos residuos y a la sobreexpresión del NGF en procesos neurodegenerativos, los residuos de tirosina constituyen un objetivo de nitración por parte del peroxinitrito generado bajo un estrés nitro oxidativo (Pehar, Vargas et al. 2006). Dicha modificación post-traduccional puede tener consecuencias importantes en la actividad biológica del NGF en condiciones inflamatorias [Figura 6].

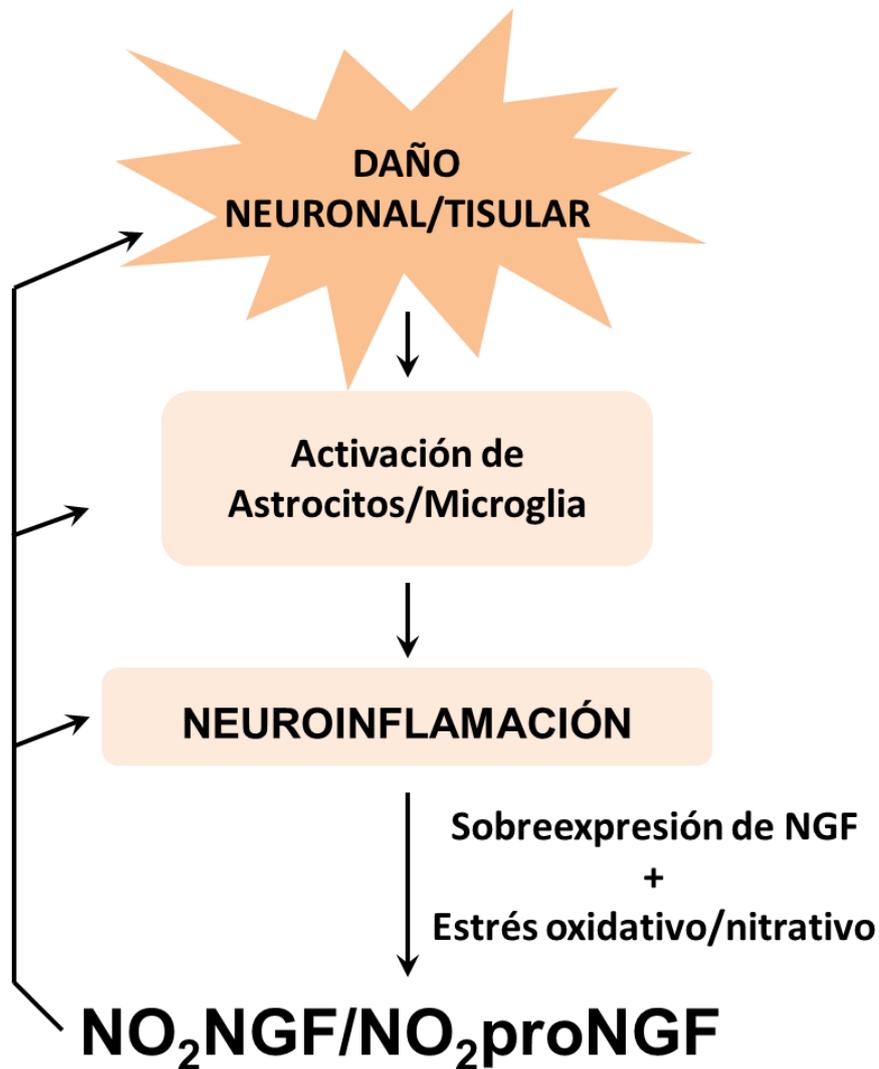


Figura 6. Esquema hipotético que representa la formación de especies nitradas de NGF y/o proNGF bajo condiciones oxidantes y nitrantes generadas durante un proceso de neuroinflamación.

El NGF en la neurodegeneración

La hipótesis neurotrófica establece que la supervivencia de los distintos grupos de neuronas durante el desarrollo es dependiente de la acción de los factores neurotróficos que, actuando a través de receptores específicos, facilitan la supervivencia y diferenciación de las neuronas, así como el desarrollo e innervación del órgano diana. En función de los receptores expresados en su membrana plasmática, cada población de neuronas responde selectivamente a uno o varios factores tróficos. El suministro continuo de un factor neurotrófico específico resulta imprescindible para mantener la vida y el fenotipo de las neuronas (Siegel and Chauhan 2000). Partiendo de esta hipótesis, se ha planteado que la pérdida de actividad trófica en poblaciones neuronales específicas puede favorecer la neurodegeneración en enfermedades como el Parkinson (EP), la enfermedad de Alzheimer (EA), y otras enfermedades neurodegenerativas como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA) (Connor and Dragunow 1998, Bradford, Zhou et al. 1999). Contrariamente a esta hipótesis, en un modelo de ELA, en ratones $SOD1^{G93A}$, los niveles de NGF en la médula espinal se encuentran elevados por encima de lo que ocurre en condiciones no patológicas, estando éste localizado en una población de astrocitos reactivos que rodean las motoneuronas degenerantes. Este aumento coincide con la re-expresión de $p75^{NTR}$ en algunas motoneuronas dañadas (Pehar, Cassina et al. 2004), lo cual establece condiciones favorables para desencadenar procesos apoptóticos en dichas neuronas. La expresión de $p75^{NTR}$ en motoneuronas ocurre durante el período embrionario pero no en individuos adultos. Sin embargo, éste receptor puede ser re-expresado en condiciones desfavorables, como en el caso de daño neuronal, o la neuroinflamación en la ELA, mediando la eliminación de células dañadas (Seeburger, Tarras et al. 1993).

El NO_2 -NGF como mediador de la apoptosis de motoneuronas en ELA

La ELA es una enfermedad neurodegenerativa caracterizada por la muerte selectiva de motoneuronas, tanto de la corteza motora y el tronco encefálico, como de la médula espinal. Las causas de la pérdida progresiva de esta población neuronal es aún desconocida, pero se acepta que las células gliales

juegan un rol importante en la patogénesis de la enfermedad (Barbeito, Pehar et al. 2004, Henkel, Beers et al. 2009, Ilieva, Polymenidou et al. 2009, Trias, Ibarburu et al. 2016). El 90% de los pacientes con ELA experimentan la forma esporádica de la enfermedad sin un componente genético aparente, mientras el 10% restante presentan antecedentes familiares (ELA familiar). La forma esporádica y la familiar de ELA son clínica y patológicamente similares, sugiriendo un proceso patológico común. Los avances en el estudio de los mecanismos subyacentes a la ELA familiar facilitan el entendimiento de ambas formas.

Aproximadamente el 20% de los casos familiares son causados por mutaciones en el gen de la Cu/Zn superóxido dismutasa (SOD1), una enzima citosólica involucrada en la resistencia antioxidante. En la actualidad se conocen más de 114 mutaciones distribuidas a lo largo del gen *sod1*, todas vinculadas a la enfermedad (Mitchell and Borasio 2007). El descubrimiento de las mutaciones en *sod1* ha propiciado el desarrollo de modelos animales transgénicos de ELA. Varias líneas de ratones y ratas sobre-expresan la SOD1 mutada en niveles suficientes como para inducir la degeneración específica de las motoneuronas generando una patología que se asemeja en gran medida a la ELA humana (Gurney, Pu et al. 1994, Ripps, Huntley et al. 1995, Lord, Dayhew et al. 2002).

En los ratones transgénicos que sobre expresan el gen SOD1^{G93A} que causa un fenotipo de ELA familiar, los niveles de NGF se incrementan dos veces en la médula espinal. Este NGF se localiza principalmente en una subpoblación de astrocitos reactivos en los alrededores de motoneuronas degenerantes. Además, la sobreexpresión de NGF en astrocitos coincide con un aumento de p75^{NTR} en la membrana plasmática de las motoneuronas dañadas, lo cual podría provocar la apoptosis celular (Pehar, Cassina et al. 2004).

En condiciones no patológicas, las motoneuronas de individuos adultos carecen de los receptores TrkA y p75^{NTR} y no son susceptibles a la acción del NGF. Sin embargo, las motoneuronas adultas pueden re expresar p75^{NTR} en condiciones de daño celular durante la ELA (Seeburger, Tarras et al. 1993, Rende, Giambanco et al. 1995, Lowry, Murray et al. 2001), volviéndose así

vulnerables a la acción del NGF. En consecuencia, p75^{NTR} ha sido implicado en la muerte de motoneuronas que ocurre en modelos de ratones transgénicos de ELA (Lowry, Murray et al. 2001, Copray, Jaarsma et al. 2003). Curiosamente, los estudios con motoneuronas embrionarias que expresan p75^{NTR} han permitido la caracterización de la apoptosis inducida por NGF y su estrecha asociación con el peroxinitrito [Figura 7 a] (Pehar, Cassina et al. 2004). En este modelo, la apoptosis desencadenada por el NGF depende de un flujo fisiológico de óxido nítrico que, a su vez, promueve la formación intracelular de peroxinitrito. Por lo tanto, el óxido nítrico y especies nitrantes como el peroxinitrito actuarían como mediadores o co-factores en la apoptosis de

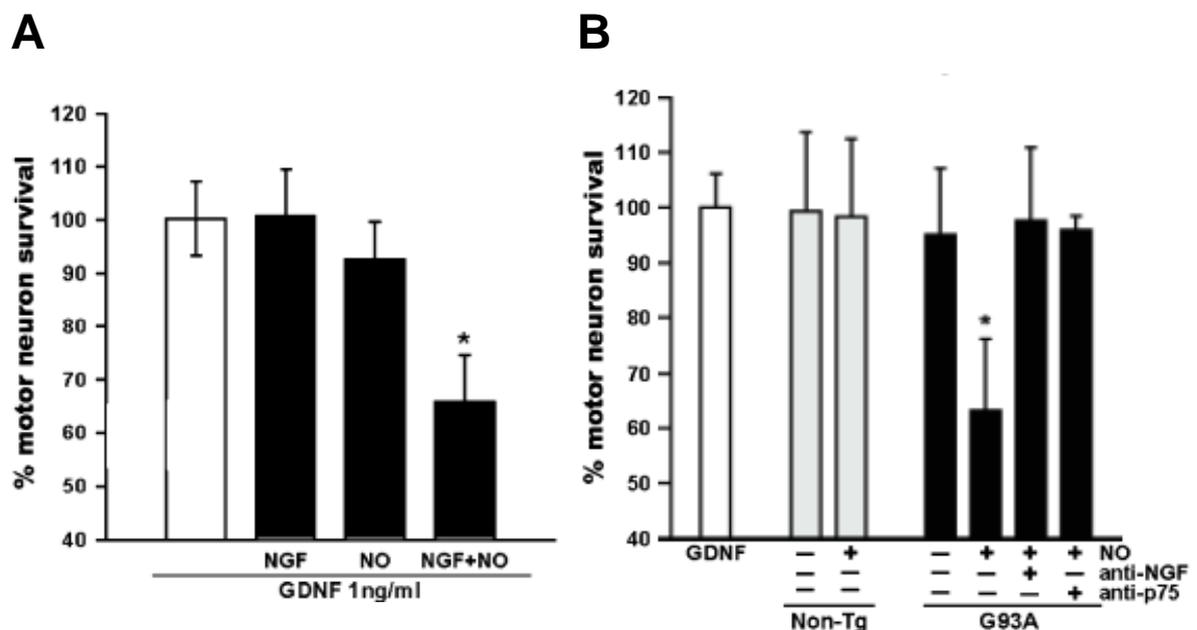


Figura 7. Disminución en la supervivencia de motoneuronas por la acción de NGF exógeno y NGF presente en extractos proteicos de médula espinal de rata transgénica hSOD^{G93A} sintomática. Ensayos realizados sobre cultivos puros de neuronas motoras mantenidos con GDNF 1ng/mL. (A) Cuando los cultivos son tratados con NGF y óxido nítrico (NO) la supervivencia neuronas disminuye de forma significativa; (B) cuando las motoneuronas son tratadas con un extracto proteico de médula espinal de ratas hSOD^{G93A} sintomática, y NO se observa una disminución en el número de motoneuronas. Este efecto no se observa con extractos de médula espinal de ratas salvajes, y es revertido con tanto con anticuerpos anti-NGF como con anticuerpos anti-p75. Extraído de (Pehar, Cassina et al. 2004).

motoneuronas, dónde uno de sus principales objetivos es el NGF.

Se ha reportado que los extractos proteicos de médula espinal de ratones con ELA contienen suficiente NGF para estimular la apoptosis dependiente de p75^{NTR} en cultivos de motoneuronas embrionarias con una fuente externa de óxido nítrico [Figura 7 b] (Pehar, Cassina et al. 2004). Sin embargo, los niveles de NGF medidos por ELISA de ratones transgénicos hSOD^{G93A} mutantes fueron del intervalo de pico gramos por mililitro (pg/mL), una concentración mucho menor de la necesaria para inducir el mismo efecto con el NGF purificado. Estos hallazgos han llevado a buscar especies de NGF modificadas que posean un mayor efecto sobre la apoptosis de motoneuronas dependiente de p75^{NTR}. Sorprendentemente en el año 2006, Pehar *et al* demostraron que la oxidación y nitración de NGF por la exposición a peroxinitrito aumentan la potencia del NGF en la apoptosis de motoneuronas en 10000 veces en presencia de óxido nítrico. En este modelo, el bloqueo de p75^{NTR} por anticuerpos o regulación negativa de su expresión con oligos antisentido, impide completamente la muerte de motoneuronas, indicando una señalización del NGF nitrado a través de p75^{NTR} (Pehar, Cassina et al. 2006). Por lo tanto, el NGF tratado con peroxinitrito parece ser la neurotrofina más potente que causa una muerte celular dependiente de p75^{NTR} en cultivo a concentraciones fisiológicamente activas (pg/mL). De hecho, en este estudio se evidenció que la Tirosina 52 es más susceptible a ser nitrada por el peroxinitrito. Por lo tanto, la ganancia de actividad apoptótica podría ser dependiente de la nitración de Tirosina, que a su vez, conduce a cambios conformacionales en la proteína con la subsecuente formación de agregados proteicos (de dímeros a octámeros) (Pehar, Vargas et al. 2006). Tales oligómeros pueden interactuar con varios receptores p75^{NTR} a la vez (induciendo trimerización) o facilitar la formación de complejos de receptores atípicos (trimerización p75/TrkA). Los datos experimentales que muestran que solo una pequeña fracción del NO₂-NGF es suficiente para inducir la apoptosis en motoneuronas en cultivo apoyan la hipótesis de ganancia de función del NGF nitrado con respecto al NGF. El precursor de NGF, el proNGF, también puede interactuar con p75^{NTR} e inducir apoptosis (Domeniconi, Hempstead et al. 2007). El proNGF se une con menor afinidad a p75^{NTR} que el NGF, pero éste forma un complejo de señalización de alta afinidad al unirse simultáneamente a p75^{NTR} y a sortilina (Nykjaer, Lee et

al. 2004). En la médula espinal, el proNGF se acumula en mayores concentraciones que el NGF maduro y, por tanto, también podría ser un objetivo potencial de nitración mediada por peroxinitrito (Beattie, Harrington et al. 2002).

Por otro lado, las motoneuronas de la médula espinal expresan altos niveles de Factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF-1), el cual puede ser liberado en respuesta a axotomía u otras condiciones estresantes (Cassina, Pehar et al. 2005, Saito, Okano et al. 2007). Cassina *et al* han propuesto un mecanismo en el cual las motoneuronas espinales liberan FGF-1 en respuesta a daño, induciendo la expresión de NGF y un estrés nitrativo en los astrocitos circundantes (Cassina, Pehar et al. 2005). En la literatura es bien conocido que el FGF-1 es un potente inductor de la expresión y secreción de NGF en astrocitos (Yoshida and Gage 1991), y en cultivos de astrocitos de médula espinal, el tratamiento con FGF-1 induce una sobre regulación de la expresión de NGF junto con estrés oxidativo y nitrativo (Vargas, Pehar et al. 2004, Cassina, Pehar et al. 2005), promoviendo la apoptosis de motoneuronas en co-cultivos (Pehar, Cassina et al. 2004).

Mientras que los datos actuales sugieren que especies nitradas del NGF podrían ser producidos y liberados por células gliales activadas en la médula espinal de modelos animales de ELA, no hay evidencia directa de su ocurrencia ni en cultivos celulares ni extractos de tejidos. La mayoría de las técnicas de análisis para detectar y cuantificar especies modificadas de NGF con sensibilidad no pueden ser aplicadas fácilmente debido a varios factores limitantes como: i) la baja concentración de NGF y proNGF en la médula espinal (pg/mg de proteína), ii) la baja proporción de NGF que reaccionaría con las especies nitrantes *in vivo*, iii) la ausencia de anticuerpos que detecten específicamente NGF nitrado y, iv) la variedad de especies oxidadas y nitradas que se producen en la reacción entre el NGF y el peroxinitrito.

Por último, es poco probable que el NGF sea la única proteína nitrada en condiciones de inflamación patológica. Varias proteínas distintas pueden ser simultáneamente modificadas por peroxinitrito (Ischiropoulos and Beckman

2003, Pacher, Beckman et al. 2007). Tanto en el tejido de pacientes con ELA como en modelos animales, la nitro tirosina puede detectarse mediante inmunotinción en motoneuronas dañadas, así como en las células gliales que las rodean, lo que sugiere una extensa nitración de proteínas (Abe, Pan et al. 1997, Peluffo, Shacka et al. 2004, Trias, Diaz-Amarilla et al. 2013). Sorprendentemente, la nitración de un único residuo de tirosina en la proteína Hsp90 convierte a esta chaperona en una proteína tóxica para las motoneuronas, lo que sugiere que la nitración del NGF y Hsp90 podría tener un efecto sinérgico (Franco, Ye et al. 2013).

Además de la ELA, otra enfermedad neurodegenerativa en la que la nitración del NGF podría jugar un rol patogénico es en la enfermedad de Alzheimer. En 2009, Bruno y Cuello reportaron la primera evidencia de la presencia in vivo de especies nitradas del NGF (Bruno, Leon et al. 2009). Este grupo detectó proNGF nitrado en muestras de cerebro de pacientes con EA luego de realizar inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-NGF y posterior detección en WB utilizando anticuerpos específicos anti-nitrotirosina. Este enfoque analítico proporciona evidencia sólida de una modificación post-traducciona asociada a la neuroinflamación en EA. Mientras que el estrés oxidativo y la nitración de tirosinas en proteínas ha sido asociada a una concomitante neuroinflamación en EA (Maccioni, Munoz et al. 2001), el proNGF nitrado parecería ser un objetivo específico con potencial patogénico. A su vez, se vio que la administración de NGF tratado con peroxinitrito en el hipocampo de rata induce una reducción significativa en el nivel de fosforilación de TrkA (Bruno, Leon et al. 2009), sugiriendo una regulación negativa de vía normal trófica mediada por NGF. En este contexto, la nitración de NGF, podría influenciar la señalización a través de p75^{NTR}, TrkA y Sortilina.

En suma, la evidencia experimental sugiere que la producción de NGF y proNGF en condiciones de neuroinflamación se encuentra alterada. Por un lado, el NGF es sobre-expresado por células inflamatorias, mientras que por otro, esto coincide casi siempre con un nivel exacerbado de estrés oxidativo y nitrativo. Las especies de NGF nitrado podrían producirse tanto en ELA como en EA para mediar procesos de señalización asociadas a daño neuronal y/o

activación glial. En este contexto, la neutralización de NGF nitrado por mAbs podría tener una aplicación terapéutica en neurodegeneración.

Estrategias de inhibición de NGF

El NGF está asociado con la transmisión de señales de dolor resultantes de dolor neuropático así como de estímulos nocivos (Dray 2008). Históricamente, ha habido diversas líneas de evidencia que sugieren un rol central del NGF en la activación de las señales del dolor y el mantenimiento del mismo (Hefti, Rosenthal et al. 2006, Dray 2008, Watson, Allen et al. 2008). El aumento en la expresión de NGF da como resultado el crecimiento de neuritas y un aumento de la sensibilidad de los nociceptores (Pezet and McMahon 2006). Se ha demostrado que los niveles de NGF son anormalmente altos cuando existe dolor crónico, tanto en pacientes como en animales (Hefti, Rosenthal et al. 2006, Lane, Schnitzer et al. 2010). Por lo tanto, antagonizar la acción del NGF y su señalización se ha vuelto una estrategia terapéutica prometedora.

En particular, el grupo de Antonio Cattaneo ha desarrollado un anticuerpo monoclonal anti NGF denominado AD11 (Cattaneo, Rapposelli et al. 1988). El anticuerpo AD11 interacciona con el NGF con una afinidad en el orden pico molar y dicha unión elimina la interacción del NGF con el receptor TrkA (Covaceuszach, Cassetta et al. 2008). Debido a las propiedades neutralizantes de este anticuerpo, en el año 2012 es humanizado manteniendo las características neutralizantes de alta afinidad, por lo que surge una herramienta para el tratamiento de patologías donde la acción del NGF se ve exacerbada (Covaceuszach, Marinelli et al. 2012).

A partir del año 2012, varios ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales anti-NGF se han llevado a cabo por varias compañías farmacéuticas y biotecnológicas incluyendo, Pfizer [Tanezumab], Amgen/Johnson & Johnson [Fulranumab], Sanofi-aventis/Regeneron, Mdimune/AstraZeneca, y Laboratorios Abbott (Dray 2008, Cattaneo 2010, Garber 2011, Eibl, Strasser et al. 2012). La terapia con Tanezumab es una de las más avanzadas de anticuerpos monoclonales anti-NGF. Los ensayos clínicos iniciales fueron

prometedores y demostraron eficacia clínica en la reducción del dolor y mejora de la función articular en Fase II de ensayos clínicos para el tratamiento de la osteoartritis (Lane, Schnitzer et al. 2010). Utilizando una variedad de técnicas que incluyen resonancia plasmónica, se estimó la constante de afinidad $K_D > 10 \text{ pM}$ con $t_{1/2}$ de disociación de 100h (Abdiche, Malashock et al. 2008). Debido a la alta afinidad y prolongada asociación antígeno anticuerpo, los estudios sugieren que Tanezumab actúa disminuyendo otras proteínas relacionadas con el NGF en el desarrollo y mantenimiento del dolor, como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y la sustancia P, así como la densidad de neuronas nociceptivas dependientes de NGF (Hoffman, Zhang et al. 2011). Está claro que el Tanezumab es un agente selectivo para el tratamiento del dolor inducido por NGF. Sin embargo, los recientes ensayos clínicos sugieren que la extremadamente estable unión entre el Tanezumab y el NGF estaría eliminando por completo la señal de dolor por tiempos prolongados, resultando en un efecto anestésico más que analgésico.

Además de anticuerpos monoclonales anti NGF se han diseñado otras moléculas que interfieren en la acción del NGF, tales como proteína de fusión TrkA-IgG, inhibidores de protein quinasas específicos para TrkA, péptidos miméticos que interactúan con los receptores TrkA o $p75^{\text{NTR}}$ y compiten en la unión con el NGF, y otras pequeñas moléculas que interfieren con la unión del NGF a sus receptores (Eibl, Strasser et al. 2012).

Tomando la evidencia en su conjunto, el objetivo de este trabajo es el de desarrollar anticuerpos monoclonales que reconozcan específicamente las especies nitradas de NGF y no al NGF y que posean actividad neutralizante de función. De este modo, dichos anticuerpos podrían eliminar las especies de NGF nitradas que se forman durante la inflamación y que poseen una ganancia de función apoptótica con respecto a la proteína no nitrada. Es de gran relevancia que estos anticuerpos no interfieran con la actividad trófica del NGF in vivo, ya que ésta es indispensable para el mantenimiento fenotípico de las poblaciones neuronales.

HIPÓTESIS

El NO₂-NGF se forma in vivo durante procesos inflamatorios como la neurodegeneración en la ELA. El bloqueo de esta molécula por parte de anticuerpos monoclonales neutralizantes que reconozcan específicamente la variante nitrada, podría ser una gran herramienta de aplicaciones diagnósticas y terapéuticas en enfermedades neurodegenerativas.

OBJETIVOS

Objetivo general

Desarrollar y caracterizar anticuerpos monoclonales neutralizantes de NGF nitrado que reconozcan un epítipo específico del NO₂-NGF de la tirosina 52.

Objetivos específicos

1. Desarrollo y caracterización de anticuerpos monoclonales específicos, determinación de constantes de afinidad y mapeo de los aminoácidos del epítipo que participan en el reconocimiento antígeno-anticuerpo.
2. Determinar actividad neutralizante específica en cultivos celulares.
3. Uso de los mAbs para detectar NO₂-NGF in vivo en un modelo de ELA en ratas transgénicas hSOD^{G93A}.

MATERIALES Y MÉTODOS

Todos los reactivos utilizados son de Sigma-Aldrich a menos que se especifique lo contrario.

Objetivo 1: Desarrollo y caracterización de anticuerpos monoclonales específicos, determinación de constantes de afinidad y mapeo de los aminoácidos del epítipo que participan en el reconocimiento antígeno-anticuerpo.

Síntesis de β -NGF recombinante humano

El β -NGF recombinante humano fue producido de acuerdo al protocolo de Rattenhol, A. et al (Rattenholl, Lilie et al. 2001) con algunas modificaciones. Para la expresión de β -NGF la secuencia de proNGF humana fue insertada en el plásmido pET-22b de Novagene entre los sitios de restricción de las enzimas NdeI y BamHI. El vector resultante, pET-22b+proNGF, fue transformado en la cepa de *E. coli* BL21 star DE3 (Invitrogen). Dichas células se crecieron en medio 2YT a 37°C y 220 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) entre 0,5 y 0,8. La expresión génica fue inducida con 2 mM de isopropiltio- β -D-galactósido (IPTG) durante 4 horas a 37°C y 220 rpm. El pellet celular fue obtenido por centrifugación a 5000 g durante 10 minutos a 4°C, y posteriormente fue resuspendido en buffer de lisis (Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 0,5 M e Inhibidor de proteasas SIGMAFAST) en una relación de 10 mL de buffer cada 2 g de pellet . La suspensión celular fue incubada 30 min con lisozima 2 μ g/mL y luego 30 minutos con DNasa 50 u/mL, ambas veces en hielo. Para completar la solubilización de los componentes celulares se sonicó 6 x 20 segundos con una potencia de 50 con macrotip (Branson Digital Sonifier), y luego se incubó con Tritón 100X al 2% durante 30 minutos en hielo. Para aislar los cuerpos de inclusión (IB, del inglés *Inclusion Bodies*) la suspensión se centrifugó a 20.000g durante 45 minutos a 4°C. Los IB se lavaron 3 veces con solución de lavado (Tris HCl 50 mM pH 8, NaCl 0,5 M y EDTA 20mM), y se resuspendieron en Cloruro de guanidinio (GDN-HCl) 6 M, Tris HCl 100mM pH 8, EDTA 10 mM. Luego se agregó DTT 100 mM y se incubó toda la noche (ON, del inglés *over night*) a 4°C. Al día siguiente la

solución de acidificó a pH 4 con HCl y se dializó dos veces contra 500 mL de GDN-HCl 6M, EDTA 5 mM 500mL durante 4 horas a 4°C, con la membrana SnakeSkin® Dialysis Tubing 3,5 KDa (Thermo scientific). La renaturalización del proNGF fue llevada a cabo ON a 4°C en buffer de renaturalización (Tris HCl 100 mM pH 9,3, EDTA 5 mM, L-Arginina 1 M, GSSG 1 mM y GSH 5 mM). Luego de la renaturalización, la muestra se concentró con el filtro Pellicon XL (Millipore) hasta 200mL, y el concentrado se dializó 2 veces durante 10 horas contra 10 L de PBS pH 8, NaCl 0,4M, luego 2 veces durante 10 horas contra 10 L de PBS pH 7,6, y finalmente 2 veces durante 10 horas con tampón fosfato 50 mM pH 7,2. El proNGF, con un punto isoeléctrico de 9,3 fue purificado por cromatografía de intercambio catiónico en una columna Source 15S (GE Healthcare) equilibrada con buffer fosfato 50 mM pH 7,2, en ÄKTA Express system (Amersham Bioscience), y la elución se realizó en un gradiente 0-50% tampón fosfato 50mM pH 7,2, NaCl 1M a un flujo de 1mL/min. El pico de elución fue detectado por absorbancia a 280 nm. Finalmente, el proNGF purificado se dializó dos veces durante 3 horas contra buffer fosfato 50 mM pH 7,2 a 4°C para eliminar el NaCl. En el último paso el proNGF fue parcialmente degradado con Tripsina (0,5 mg/mL) en bicarbonato de amonio 0,2 M pH 8, 0,1 µg de tripsina cada 10µg de proNGF durante 5 minutos a temperatura ambiente (Tamb). Esta paso se realiza para eliminar el pro-dominio del proNGF. El β -NGF recombinante humano fue purificado mediante cromatografía de intercambio catiónico con una columna Resource S (GE Healthcare) en un proceso igual al anterior. Los picos de elución fueron analizados por SDS-PAGE.

Electroforesis de proteínas SDS-PAGE

Las proteínas se separaron según su peso molecular mediante SDS-PAGE siguiendo el protocolo convencional, utilizando un gel concentrador al 6% (p/v) y un gel separador de 12% de acrilamida/bus-acrilamida. Las muestras se diluyeron con buffer de muestra 5x (Tris HCl 0,5 M ph 6,8, SDS 5%, glicerol 30%, azul de bromofenol 0,02%, β -mercaptoetanol 12,5%) y se calentaron durante 5 minutos a 95°C. Se utilizó el sistema de electroforesis de BioRad. Se utilizó buffer Tris-Glicina (250mM Tris, 1,92 M Glicina, 1% SDS) para la

electroforesis. El voltaje aplicado fue de 100 voltios durante 15 minutos y 200 voltios hasta que el frente de corrida visualizado por la banda de azul de bromofenol llegó a la parte inferior del gel. El peso molecular de las muestras se estimó por comparación con un estándar de peso molecular (Page Ruler Prestained Protein Ladder, ThermoScientific).

Tinción de geles de proteínas con nitrato de plata

Luego de la electroforesis el gel se colocó en solución de fijación (12% ácido acético, 50% etanol, 0,5 % Formaldehído) durante 1 hora. Se realizaron tres lavados de 5 minutos con solución de lavado (50% etanol), se enjuagó rápidamente con solución de tiosulfato (0,02%). Posteriormente el gel se lavó 3 veces con agua y se incubó durante 20 minutos en solución de plata (0,2% nitrato de plata, 0,075% formaldehído 37%). Luego de lavar tres veces con agua, se incubó con solución de revelado (Na_2CO_3 3%, Tiosulfato 0,2 mg/mL, 0,01% Formaldehído) hasta visualizar las bandas. Finalmente, el gel se incubó en solución de fijación durante 5 minutos, se lavó 10 minutos con solución de lavado y se almacenó en solución de conservación (25% etanol, 3% glicerol). Todas las soluciones fueron realizadas con agua ultra pura.

Nitración de NGF con peroxinitrito

El peroxinitrito sintetizado en el laboratorio del Dr. Rafael Radi fue generosamente proporcionado por la Dra. Adriana Cassina. Se utilizaron varias partidas. La concentración del peroxinitrito se determinó por absorbancia a 302nm ($\epsilon=1670 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), para ello se realizó una dilución 1:500 en NaOH 1M. Luego se preparó la concentración adecuada en NaOH 0,01M. La reacción de nitración se llevó a cabo con una concentración final de NGF (humano recombinante y de glándula submaxilar de ratón comercial) de 0,2mg/mL (7,69 μM) en buffer PO_4 pH 7,4 conteniendo 20mM de bicarbonato de sodio.

Para la reacción de nitración el peroxinitrito fue agregado al NGF en 10 bolos de 1 μL para llegar a una concentración final de peroxinitrito de 1mM. Cada bolo de peroxinitrito se adicionó rápidamente en la superficie el tubo y se mezcló

con vortex por 3s, procedimiento que se repite 10 veces en total. El mismo protocolo fue empleado para la nitración de BSA.

En el caso de la nitración de NGF de glándula submaxilar de ratón comercial para los ensayos de Termoforesis y Resonancia plasmónica, se evitó el vortex y se mezcló con pipeteo. Luego de finalizada la adición de peroxinitrito, se incubó 15 minutos en hielo y se cambió el buffer a PO_4 pH 7,2 mediante desalado con cromatografía de exclusión molecular (PD10 desalting columns, Sephadex G-25, GE Healthcare), eliminando así el buffer de la reacción y los restos de peroxinitrito.

Western Blot y Dot Blot

Para el Western Blot las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (0,45 μM , Thermo Scientific, USA) a 300 mA durante 1:30 horas en buffer de transferencia (Buffer d electroforesis + 20% de etanol). En el caso del Dot Blot se realizaron gotas de 2 μL (200ng) en cada punto sobre la membrana y se dejaron secar. Las membranas se bloquearon durante 1 hora en buffer de bloqueo (5% BSA o leche descremada Conaprole, 0,1% Tween 20 en TBS, pH 7,4) con subsiguiente incubación del anticuerpo primario diluido en buffer de bloqueo toda la noche a 4°C. Luego de lavar con TBS + 0,1% Tween (TBS-T), la membrana se incubó con el anticuerpo secundario Goat anti-rabbit IgG (H+L) conjugado a peroxidasa (1:5000; Abcam, USA), o Goat anti-mouse IgG1 conjugado a peroxidasa (1:10.000, Abcam, USA) durante 1 hora. Posteriormente se realizaron lavados con TBS-T y se reveló con quimioluminiscencia. Las membranas se incubaron 1 minuto con solución ECL (Vivo Science, Argentina) y se expusieron con HyperfilmsTM (Amersham, GE Healthcare, USA) varias veces utilizando HypercassetteTM (Amersham, GE Healthcare, USA). Los films se revelaron con soluciones de revelado y fijado de Química MediQ (Uruguay). Los anticuerpos primarios utilizados fueron anti- NO_2 -NGF (monoclonal de ratón 1:500), anti-nitrotirosina (anti- NO_2 -Tyr) (policlonal de conejo, 1:500, Upstate Biotechnology), y anti-NGF (policlonal de ratón, 1:250, Abcam, USA).

Cromatografía de exclusión molecular

La cromatografía de exclusión molecular se llevó a cabo en una columna Superdex 200 10/300 (GE Healthcare), equilibrada con buffer fosfato 50 mM pH 7,5, conectada a un equipo AKTA (GE Healthcare). Se inyectaron 250 μ L de NGF y NO₂-NGF a 2 mg/mL con un loop de 200 μ L en buffer fosfato 50 mM pH 7,5 a un flujo de 0,75 mL/min.

Búsqueda de NO₂-Tyr en muestras de NGF nitrado por Espectrometría de masas

El análisis se realizó en colaboración con la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica (UByPA) del Instituto Pasteur de Montevideo. El NGF y NO₂-NGF de Harlan, utilizado en Termoforesis y Biacore fueron sometidos a digestión con tripsina (grado de secuenciación, Promega) a 37°C ON. Los péptidos fueron desalados utilizando micro columnas C18 de fase reversa (OMIX Pippete tips, Varian). La elución de los péptidos fue colocada directamente en la placa de muestra del espectrómetro con 3 μ L de solución matriz (ácido α -ciano-4-hidroxicinámico en 60% de acetonitrilo con 0,2% de TFA).

El espectro de masa de las muestras fue adquirido en el equipo MALDI TOF/TOF MS 4800 series (AB-SCIEX, Framingham, USA) en modo reflector y fue externamente calibrado con una mezcla de péptidos estándar (Applied Biosystems). Se seleccionaron los péptidos de 962,5 y 1007 de relación masa/carga (m/z) y se sometieron a espectrometría de masas en tándem (MS/MS) para corroborar la identidad de dichos péptidos.

Desarrollo de los mAbs anti-NO₂NGF

El desarrollo de anticuerpos monoclonales anti-NO₂-NGF fue encargado a la empresa GenScript USA Inc. Se inmunizaron 10 ratones Balb/c con el péptido NGF₄₈₋₅₈[Y-NO₂] (VFKQY(NO₂)FFETKC) conjugado a KLH como inmunógeno. Este péptido incluye la Tirosina 52 nitrada dentro de la una de las regiones que interactúa con el receptor p75^{NTR} (Eibl, Strasser et al. 2012). El mismo fue diseñado en nuestro laboratorio y producido en la empresa Genscript. Todos

los ratones mostraron respuesta inmune, y los de mayor respuesta fueron utilizados para la fusión celular y producción de hibridomas. Los sobrenadantes de los clones fueron testeados mediante ELISA y se seleccionaron por dos criterios: i) que reconozcan al péptido nitrado y al NO₂-NGF, ii) que no reconozcan al péptido no nitrado. Una vez seleccionados los clones, la producción de los anticuerpos se realizó por ascitis y se purificaron por cromatografía de afinidad con proteína A/G.

El NO₂-NGF utilizado en los ensayos de ELISA para la selección de los clones positivos fue desarrollado en nuestro laboratorio.

Síntesis de péptidos en fase sólida y verificación por espectrometría de masa (MS) y cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC)

Los péptidos nitrados y no nitrados fueron sintetizados en GenScript USA Inc. de acuerdo a la secuencia de NGF humano de los aminoácidos 48-58. Para el escáner de alaninas (Ala-Scan) se desarrollaron péptidos con la misma secuencia pero sustituyendo aminoácido por aminoácido por un residuo de alanina, de forma que se sintetizaron 11 péptidos con la tirosina 52 nitrada. Los mismos fueron sintetizados por el Dr. Roland Böttger del Institute of Bioanalytical Chemistry de la Universidad de Leipzig, Alemania, en el marco de una colaboración. Los péptidos para el escáner de alaninas se sintetizaron utilizando la química estándar de 9-Fluorenylmethoxycarbonil-terc-butilo (Fmoc/tBu) sobre base de poliestireno de amida en resina de Rink (MBHA) (0,65 mmol/g, Multi Syn Tech GmbH, Witten, Alemania) en una escala de 2,5 mmol. Los aminoácidos protegidos con Fmoc se acoplaron en exceso, 8M utilizando N,N'-di-isopropilcarbodiimida (DIC) en presencia de 1-hidroxibenzotriazol (HBOt) en Syro2000, sintetizador de péptidos múltiple equipado con un bloque de síntesis de punta (Multi Syn Tech GmbH) (Richter, Hoffmann et al. 2013). El aminoácido 3-nitro-tirosina se introdujo como aminoácido no natural. Luego de la síntesis, la resina lavada con DMF y DCM se secó al aire y se liberaron los péptidos con una solución de ácido trifluoroacético 87,5% (TFA) y 12,5% del scavenger (etanoditiol, m-cresol,

tioanisol, H₂O ; 1 :2 :2 :2, v/v/v/v) durante 2 horas a temperatura ambiente. Los péptidos fueron precipitados con dietil éter frío, lavados tres veces, secados al aire y almacenados a 4°C. La purificación se llevó a cabo utilizando HPLC de fase reversa con un gradiente acuoso de acetonitrilo y TFA en una columna Nucleosil C₁₈ (diámetro interno 4,6mm, 250mm de largo, 10µm de tamaño de partícula, 100 Amstrong de tamaño de poro; Macherey-Nagel GmbH, Düren, Alemania). La identidad de los péptidos fue confirmada por espectrometría de masas de ionización por electrospray en el equipo Esquire HCT (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Alemania) utilizando acetonitrilo 30% acuoso como solvente en presencia de 0,1% de ácido fórmico.

Mapeo de epítotope utilizando Ensayo por Inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA)

Para el mapeo del epítotope de los mAbs se utilizaron placas de ELISA de 96 pocillos de alta adherencia (Costar®, Corning Incorporated, USA). En las mismas se adsorbió 1 µg/mL de cada péptido disuelto en agua desionizada y se dejaron secar a 37°C durante 16h. Se bloqueó con 200µL de buffer de bloqueo (PBS, 0,3M NaCl, 0,05% (v/v) Tween® 20, 1% (w/v) BSA) durante 1 hora a 37°C, se hicieron 3 lavados con 300 µL con buffer de lavado (PBS, 0,3 M NaCl, 0,05% (v/v) Tween® 20), luego se incubó con los mAbs 1 µg/mL diluidos en buffer de lavado con 0,1% de BSA durante 1 hora a 37°C. Se realizaron 3 lavados y se incubó con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano producido en cabra anti-IgG1 de ratón en una dilución 1:10.000 en buffer de lavado con 0,1% de BSA durante 1 hora a 37°C. Luego de 3 lavados se reveló por método colorimétrico adicionando una solución de 0,4mM 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidina (TMB), 0,12% H₂O₂ en 0,05 M de buffer citrato-fosfato (100 µL/pocillo) durante 15 minutos en oscuridad. La reacción se detuvo con la adición de 100 µL/pocillo de ácido sulfúrico 0,5 M y la absorción se midió a 450 nm.

Para el ELISA de los mAbs anti-NO₂-NGF con NO₂-NGF y NO₂-péptido se siguió el mismo procedimiento, adsorbiendo 0,2 µg/mL NO₂-NGF en solución a 37°C durante 16h.

Estudios de interacción entre los mAbs anti-NO₂-NGF y NO₂-NGF y NO₂-péptido

El β -NGF empleado para los estudios de Biacore y Termoforesis fue obtenido a partir de la glándula submaxilar de ratón por la empresa Harlan (EEUU), y corresponde a la fracción 2,5S.

Termoforesis en microescala (MST de Microscale Thermophoresis)

Estos experimentos fueron realizados en el marco de una pasantía llevada a cabo en el laboratorio de Microbiología Estructural en el Institut Pasteur de Paris a cargo del Dr. Pedro Alzari.

El método de Termoforesis en microescala se basa en la detección de cambios en la capa de solvatación, carga o tamaño de moléculas al medir cambios en la movilidad de las mismas en gradientes microscópicos de temperatura. La ventaja principal de este método es la posibilidad de trabajar sin inmovilización y en casi cualquier buffer o fluido complejo tal como suero o lisado celular. Otras ventajas comprenden fácil preparación de la muestra y escaso consumo (~4 μ L a concentraciones nM), y alto rango dinámico de constantes de disociación entre sub-nM y mM.

El método de medición se basa en el movimiento dirigido de las moléculas a lo largo de un gradiente de temperatura. Una diferencia de temperatura conduce a un cambio local en la concentración de la molécula. El fenómeno de Termoforesis depende de los cambios en tamaño, carga y capa de solvatación de las moléculas. En cada corrida se realiza un seguimiento de la termoforesis de moléculas marcadas fluorescentemente en experimentos de titulación donde el buffer se mantiene siempre constante. Como el buffer se mantiene constante, las alteraciones termoforéticas solo pueden surgir de cambios en el tamaño, carga o entropía de solvatación de las moléculas fluorescentes. Como la concentración de la molécula marcada fluorescentemente también se mantiene constante, la interacción con otra molécula, puede cuantificarse midiendo el cambio en termoforesis de la molécula marcada.

El movimiento termoforético de la molécula fluorescente se mide mediante el monitoreo de la distribución de fluorescencia F dentro del capilar en el equipo NanoTemper Monolith NT. 115. El gradiente microscópico de temperatura es generado por un láser infrarrojo, el cual se enfoca en el capilar y es fuertemente absorbido por el agua. Antes que se encienda el láser, las moléculas se distribuyen de forma homogénea dentro del capilar. Cuando se enciende el láser se observan dos fenómenos separados en escala temporal. Como primera respuesta, la fluorescencia del colorante cambia debido a su dependencia intrínseca con la temperatura. Como segunda respuesta, las moléculas se mueven desde la zona más caliente del gradiente a la zona más fría en la parte más externa del capilar y por lo tanto la concentración de las moléculas en la región caliente disminuye hasta que alcanza un estado estable en una escala de tiempo de aproximadamente 10s a 30s.

Al aumentar la concentración del ligando sin marcar y manteniendo la concentración de la molécula marcada constante, la fracción de complejos aumenta hasta que todas las moléculas fluorescentes forman complejos con el ligando valorado. Así, la fracción de moléculas unidas x se puede derivar a partir del cambio medido en la fluorescencia normalizada F_{norm} (ΔF_{norm}) [User Manual for the Monolith NT.115].

Los anticuerpos fueron marcados con Monolith NTTM Protein Labeling Kit RED-NHS. Para el marcado de los anticuerpos se utilizaron 100 μ L ~15 μ M de anticuerpo a los que se adicionaron 100 μ L del fluoróforo a una concentración de 45 μ M en 100% DMSO. La mezcla se incubó 30 minutos en oscuridad a Tamb.

Para eliminar el exceso de fluoróforo se realizó una cromatografía de exclusión molecular en columnas Sphadex G-25 proporcionadas por el kit. La columna se equilibró con 3 x 3mL de buffer PBS. Se sembraron los 200 μ L de muestra y luego que este volumen entró completamente en la columna se adicionaron 300 μ L de PBS, luego se agregaron 600 μ L de PBS y se descartaron los primeros μ L que salieron de la columna. Los últimos 500 μ L se colectaron en

alícuotas y se midió la concentración para evaluar la concentración de proteína. Para ello se midió la absorbancia a 280 nM y a 650nM ($\epsilon = 250.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

Para la medida de termoforesis se prepararon 16 tubos con diluciones seriadas de NO₂-NGF, siendo la concentración más alta 35 μM y la más baja 0,011 μM . En los experimentos con el péptido la concentración más elevada de péptido fue de 40 μM y la más baja 0,012 μM . Además cada tubo contiene concentración constante de anticuerpo marcado fluorescentemente ($\sim 0,2 \mu\text{M}$). Previo a cargar la muestra en los capilares se incubó 60 minutos a Tamb en oscuridad. Se utilizaron capilares con tratamiento estándar y una potencia de led de 20.

Todas las corridas se realizan por duplicado y los resultados fueron analizados con los softwares MO-S001 MO. Control & MO. Affinity Analysis y MO-S002 MO. Affinity Analysis. Como el análisis con estos programas no fue comparativo, se graficó la fluorescencia normalizada en función de la concentración del ligando (NO₂-NGF o NO₂-péptido) con el programa Graph Pad Prism 5.02. Los datos se representan como promedios \pm desvío estándar de experimentos independientes.

Experimentos de Resonancia Plasmónica de Superficie (SPR)

El sistema de Biacore monitorea interacciones moleculares en tiempo real, usando una tecnología libre de marcaje que responde a cambios en la concentración de moléculas en una superficie sensor cuando las moléculas se unen o se disocian de dicha superficie. El principio de detección está basado en la resonancia plasmónica (SPR de su sigla en inglés, *Surface Plasmon Resonance*), la cual es sensible a cambios en el índice de refracción dentro de aproximadamente 150nm desde la superficie del sensor. Para estudiar la interacción entre dos moléculas, una es unida a la superficie (ligando) y la otra es inyectada en un flujo continuo en la solución amortiguadora de la muestra a través de la superficie (analito). La respuesta SPR es directamente proporcional al cambio en la concentración de masa cerca de la superficie.

Las medidas de afinidad fueron realizadas en el equipo GE Healthcare Biacore T200 del laboratorio de Microbiología Estructural del Institut Pasteur de Paris a cargo del Dr. Pedro Alzari.

Ensayo 1

Los anticuerpos anti-NO₂-NGF, 12G8 y 4C6 en 10mM acetato de sodio pH 5 fueron inmovilizados en un chip CM5 a través de grupos amino de los anticuerpos utilizando procedimientos estándares de acoplamiento (Amine Coupling Kit, GE Healthcare) a niveles de 6500 y 7200 unidades de respuesta (RU) respectivamente. La celda de flujo de referencia corresponde a carboximetildextrano.

Los ensayos de unión se realizaron a 25°C inyectando distintas concentraciones en serie de NO₂-péptido a un flujo de 50µL/min. La disociación del péptido fue realizada por inyección del buffer de corrida, y la superficie fue regenerada inyectando un pulso de 15 segundos de 0,01% de SDS.

Ensayo 2

Las proteínas NO₂-NGF y NGF diluidas en 10mM acetato de sodio pH 4,5 fueron inmovilizados en un chip CM5 utilizando procedimientos estándares de acoplamiento (Amine Coupling Kit, GE Healthcare) a niveles de 2000 y 3300 unidades de respuesta (RU) respectivamente. La celda de flujo de referencia fue preparada con el mismo procedimiento en ausencia de proteína.

Los ensayos de unión se realizaron a 25°C inyectando diluciones seriadas de mAbs 12G8 y 4C6 a un flujo de 25 µL/min. Para verificar la ausencia de uniones inespecíficas se utilizó una inmunoglobulina heteróloga (anti-AMA1 de *Plasmodium vivax*). La disociación de los anticuerpos se llevó a cabo inyectando buffer de corrida, y la superficie fue regenerada inyectando un pulso de 15 segundos de 10mM Glicina/HCl pH 1,5. El buffer de corrida para ambos métodos fue PBS 0,05% Tween 20. Los datos de SPR fueron analizados con el software suministrado por el fabricante del equipo.

Como la fase de asociación no alcanzó un estado de equilibrio final, los valores estimados del nivel de respuesta de equilibrio (Req) se obtuvieron por extrapolación de las curvas experimentales previstas de un modelo de ligando heterogéneo. Las curvas de saturación obtenidas de la gráfica de Req en función de la concentración péptido/mAb se ajustaron a un modelo de estado estacionario para obtener un equilibrio de disociación con las constantes K_D . Las velocidades de disociación (K_{off}) se obtuvieron por ajuste global de la tasa de disminución de RU luego de la inyección del analito. El tiempo medio de disociación ($t_{1/2}$) se calculó con la ecuación: $t_{1/2} = \ln 2/K_{off}$.

Objetivo 2: Determinar actividad neutralizante específica en cultivos celulares

Tratamiento de células PC12 con NGF, NO₂-NGF y su bloqueo por mAbs

La actividad biológica del β -NGF puede ser analizada en cultivos de células PC12 de acuerdo al protocolo de Greene et al. (Greene, Aletta et al. 1987). El día 1 se plaquearon 15000 células por pocillo en una placa p24 pre-tratada con colágeno en medio RPMI con 10% de suero de caballo (HS, del inglés *Horse serum*) y 5% de suero fetal bovino (FBS, del inglés *Fetal Bovin Serum*) con penicilina – streptomycin (reactivos de Gibco, Life technologies, Thermo scientific, USA). Luego de 24 horas se lavaron las células con PBS y se trataron con β -NGF 20 ng/mL (0,7 nM) en medio RPMI deprivado de suero. Los anticuerpos 12G8, 4C6 y anti-NGF (Millipore) se adicionaron conjuntamente con el NGF a una concentración de 1 μ g/mL. La diferenciación celular fue evaluada cinco días post-tratamiento observando el crecimiento de neuritas.

Cultivos puros de motoneuronas

En los siguientes experimentos participé en el diseño experimental de los mismos, en la preparación del β -NGF y en la discusión y procesamiento de los resultados.

Los cultivos de motoneuronas fueron preparados a partir de médula espinal de embriones de rata de 15 días de gestación (E15) mediante una combinación de

centrifugación en gradiente con OptiprepTM e inmunopanning con el anticuerpo monoclonal Ig192 anti p75^{NTR}, como se describió previamente en Pehar et al. 2006 (Pehar, Vargas et al. 2006) (reactivos de Gibco, Life technologies, Thermo scientific, USA). Las motoneuronas fueron plaqueadas a una densidad de 3500 células por pocillo en placas p24 pre-tratadas con poliornitina-laminina. Los cultivos fueron mantenidos en medio Neurobasal suplementado con 2% de HS, 25 mM de L-glutamato, 25 μ M de 2-mercaptoetanol, 0,5 mM de L-glutamina, y 2% de suplemente B-27. Para la sobrevivencia de las motoneuronas se adicionó Factor Neurotrófico Derivado de la Glía 1 ng/mL (GDNF) adicionado al medio de cultivo. La muerte de motoneuronas inducida por la deprivación del factor trófico fue determinada en todos los experimentos como control y nunca superó el 50%. Los tratamientos con NO₂-NGF 100ng/mL, con anticuerpos anti-NGF 2 μ g/mL, y con los mAbs anti- NO₂-NGF 2 μ g/mL se realizaron 3 horas después del plaqueo. La supervivencia de motoneuronas fue analizada 48 horas después por conteo de las neuronas con un tamaño de neuritas mayor a cuatro veces el tamaño del soma celular. Para ello, las motoneuronas se fijaron con 4% de paraformaldehído (PFA) y 0,1% de glutaraldehído, y teñidas finalmente con hematoxilina.

Cada experimento se repitió 4 veces y los datos se mostraron como promedio \pm desvío estándar. La comparación de los promedios fue realizada con ANOVA de un factor con el test de Tukey de comparación múltiple. Las diferencias se mostraron como estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Los análisis se realizaron con el programa GraphPad Prism 5.02.

Objetivo 3: Uso de los mAbs para detectar NO₂-NGF in vivo en un modelo de ELA en ratas transgénicas hSOD^{G93A}

Animales

Todos los procedimientos realizados con los animales de laboratorio fueron realizados de acuerdo a la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA) y fueron aprobados por el comité institucional animal. Las ratas transgénicas Sprague Dawley SOD1G93A L26H, originalmente desarrolladas

por Howlan y col. (Howland, Liu et al. 2002), fueron adquiridas en Taconic Farms Inc. y mantenidas en URBE (Facultad de Medicina, UdelaR). Estos animales sobreexpresan el gen SOD1 humano mutante, donde el residuo Glicina 93 es sustituido por una Alanina. Este transgénico desarrolla una patología similar a la ELA en humanos con una parálisis y distrofia muscular progresivas que terminan con la muerte del individuo. El inicio de la enfermedad fue determinado mediante el examen clínico periódico de trastornos en el movimiento, expresados típicamente como una sutil cojera o arrastre de una extremidad posterior. Las ratas fueron sacrificadas cuando alcanzaron la etapa final de la enfermedad.

Para determinar cuales animales son transgénicos es necesario realizar un genotipado mediante PCR con cebadores que detectan la presencia del gen SOD1 humano. El mismo se realizó a partir de una muestra de la cola de ratas de 21 días las cuales se incubaron en buffer de lisis (28mM Tris-HCl; 72mM Tris base; 5mM EDTA; 7mM SDS; 200mM NaCl y 20µg/mL de proteinasa K) a 65°C por 15 minutos, luego 16 horas a 50°C, y finalmente 15 minutos a 95°C. Se centrifugó a 14000g por 5 minutos y se utilizó 1µL de una dilución 1:20 en H₂O del sobrenadante para realizar una PCR con los cebadores correspondientes a la SOD1 humana (f-CATCAGCCCTAATCCATCTGA y r-CGCGACTAACAATCAAAGTGA). Las condiciones de la PCR fueron las siguientes: una desnaturalización de 5 minutos a 94°C seguida de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 45 segundos a 60°, 30 segundos a 72° y una terminación de 10 minutos a 72°. El resultado de la reacción fue evaluado mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% con tinción en base a nitrato de plata.

Diseción de médula espinal de rata adulta hSOD^{G93A}

Los animales fueron anestesiados profundamente con 90% de Ketamina y 10% de Xilacina, y perfundidos transcardiacamente con tampón salino 0,9%, PFA 4% en PBS (0,1M, pH 7,4) a un flujo constante de 10 mL/min con 250mL por animal aproximadamente. La médula espinal fijada fue extraída y post-fijada en PFA 4% en PBS durante 24 horas. Se realizaron tres lavados con PBS y se

incubó el tejido en sacarosa 30% durante 72 horas. La médula espinal crioprottegida se congeló en nitrógeno líquido y se almacenó a -80°C .

Inmunohistoquímica de fluorescencia de médula espinal de rata transgénica hSOD^{G93A}

Se realizaron cortes de $30\mu\text{m}$ de espesor en criostato a -20°C , las secciones fueron colectadas en PBS para la inmunohistoquímica. Los cortes fueron permeabilizados durante 30 minutos a temperatura ambiente con Tritón X-100 0,5% en PBS, se realizaron tres lavados con PBS, y se bloqueó con BSA 5% en PBS durante 1 hora a Tamb. Los anticuerpos primarios, mAbs 12G8, 4C6 (1:200), y anti-GFAP (1:500 SIGMA), se incubaron ON a 4°C en una solución de Tritón X-100 0,3%. Para el ensayo de competencia con el NO_2 -péptido los anticuerpos primarios fueron incubados conjuntamente con 50 y $200\mu\text{g}/\text{mL}$ del mismo. Se realizan tres lavados de 10 minutos con PBS, y se incubó con los anticuerpos secundarios conjugados a Alexa Fluor 488 y Alexa Fluor 633 (Invitrogen) durante 2 horas a Tamb. Las secciones de médula espinal con inmunotinción fueron montadas sobre portaobjetos gelatinizados (DELTALAB) con Mowiol (24 g de Glicerol, 9,6 g Mowiol, 48 mL Tris HCL 0,2 M pH 8,5 para un volumen final de 250 mL).

RESULTADOS

1. Síntesis de NGF y NO₂-NGF recombinante humano en *E. coli*

Para poder desarrollar anticuerpos monoclonales que reconozcan particularmente el residuo de tirosina 52 de la molécula de NGF modificado post-traduccionalmente por nitración, fue imprescindible sintetizar NGF de forma recombinante para obtener las cantidades necesarias a un menor costo que el NGF comercial. EL NGF recombinante se sintetizó en bacterias *E. coli* de acuerdo al protocolo desarrollado por Rattenholl *et al* en el año 2001 (Rattenholl, Lilie *et al.* 2001).

En la figura 8 se muestran los cromatogramas de la purificación del proNGF por intercambio catiónico (A) y del NGF (B). En ambos puede observarse un pico principal que eluye a la mitad del gradiente de NaCl de 0 – 0,5M. Tanto en la purificación de proNGF, como en la de NGF maduro se observa un pico único, apareciendo un segundo pico correspondiente a la tripsina en el cromatograma del NGF digerido con tripsina.

Luego de la purificación, las muestras se analizaron por SDS-PAGE con tinción de nitrato de plata [Figura 9]. Tanto en carril correspondiente al pico de elución del cromatograma del proNGF como en el carril del cromatograma de la purificación de NGF, se observan bandas del tamaño esperado de proNGF y NGF con una alta pureza.

Para determinar si el NGF recombinante posee actividad biológica, se realizaron cultivos de células PC12 que se diferencian por la acción del NGF adoptando un fenotipo neuronal fácilmente observable por el crecimiento de neuritas que proyectan desde el soma [Figura 10]. Como resultado se observa la diferenciación de las células PC12 con un gran crecimiento de neuritas, lo cual indica que el NGF recombinante posee actividad biológica.

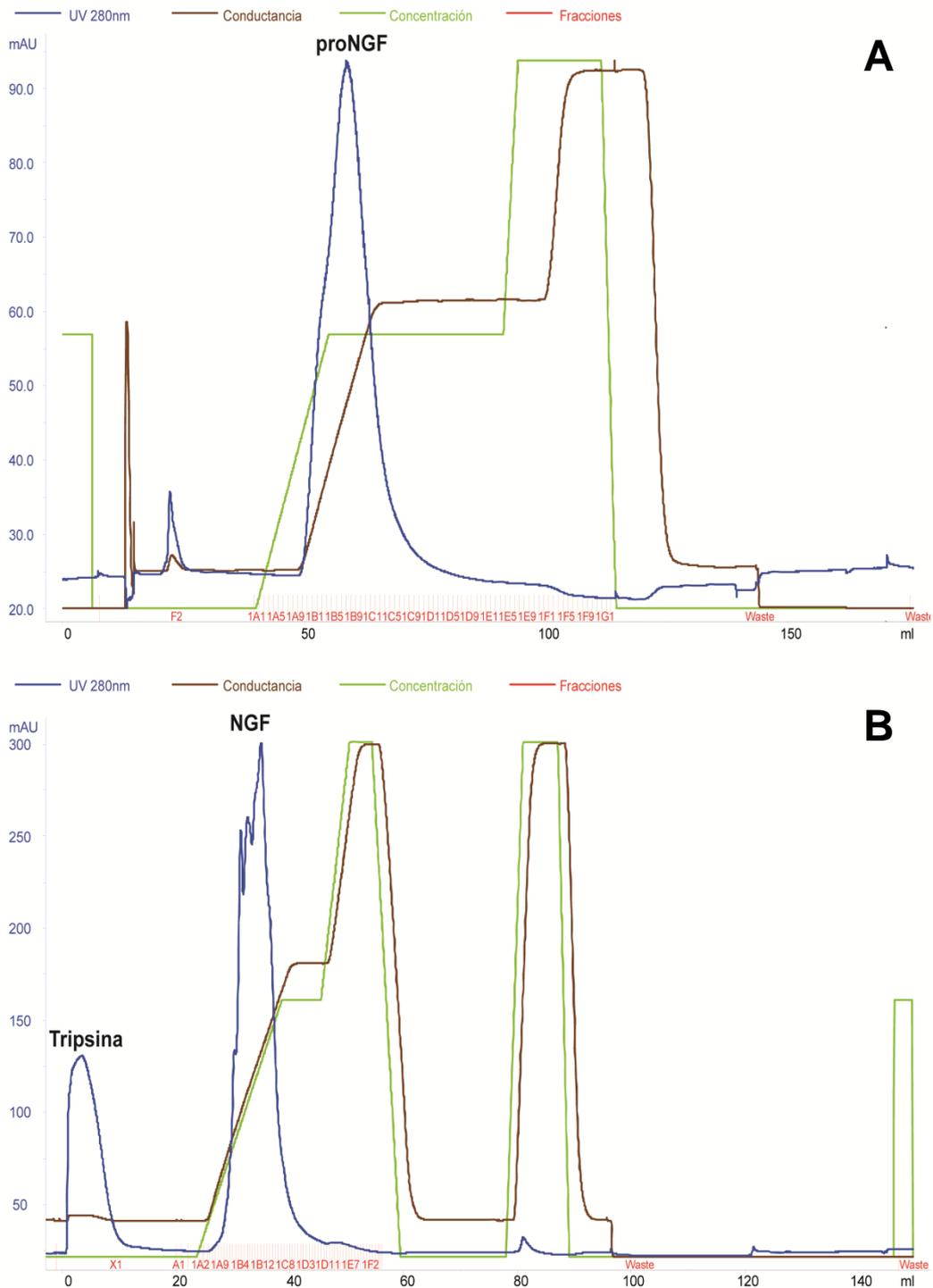


Figura 8. Purificación de proNGF y NGF mediante cromatografía de intercambio catiónico. La línea azul corresponde a la concentración de proteína medida a una longitud de onda de 280nm, la línea marrón es la variación de la conductancia, la verde muestra el cambio de concentración de NaCl y en color rojo se muestra el fraccionamiento durante la elución. En A se observa el cromatograma de purificación del proNGF con un pico único que tiene su punto medio en la mitad del gradiente de NaCl. En B se muestra el cromatograma de la purificación del NGF luego de la digestión con tripsina. Al comienzo del mismo se observa un pico correspondiente a la tripsina, y dentro del gradiente de NaCl se observa el pico de elución del NGF.

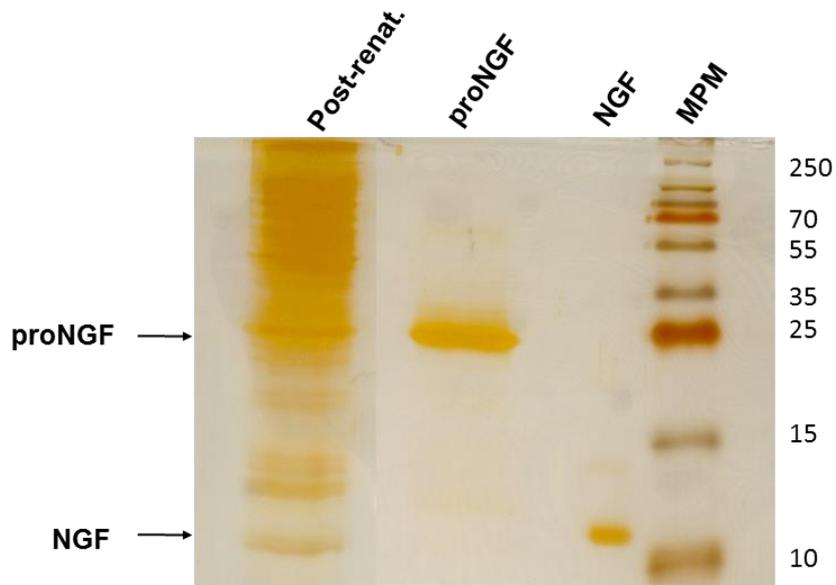


Figura 9. SDS-PAGE de la purificación de NGF. El gel fue teñido con nitrato de plata. En la línea 1 se sembró la muestra renaturalizada previo al intercambio catiónico; en el carril 2, el pico mayoritario de la elución de la cromatografía; y en el carril 3, el pico de elución correspondiente al NGF maduro luego del corte con Tripsina y posterior purificación mediante cromatografía de intercambio catiónico. En la línea 4 se observa el marcador de peso molecular de Fermentas.

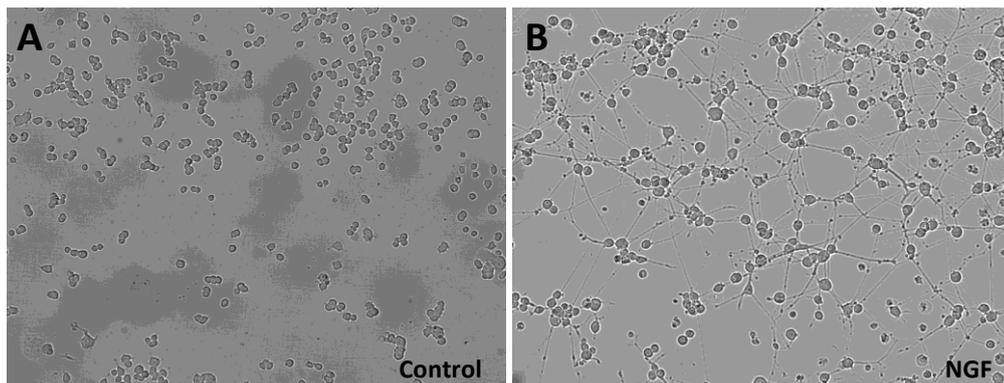


Figura 10. Actividad del NGF recombinante en cultivos de células PC12. En la parte A se muestra el control donde las células fueron privadas de FBS y no recibieron tratamiento. En la parte B, las células PC12 se cultivaron sin FBS luego de 24 horas de cultivo y se trataron con NGF 20 ng/mL durante 5 días.

El rendimiento del protocolo de expresión es bajo, debido a que el NGF se produce de forma insoluble y forma cuerpos de inclusión. En todos los pasos de purificación precipita un porcentaje de proteína, y finalmente el rendimiento es de aproximadamente 10 mg de proNGF, cada 8 g de pellet inicial, que se reducen a aproximadamente 5 mg de NGF activo luego de la proteólisis con tripsina.

Estos rendimientos son bajos comparados con lo reportado en la bibliografía para protocolos similares (Rattenholl, Lilie et al. 2001). Esto podría ser optimizado si el NGF recombinante se produce de forma soluble en bacterias, lo cual es dificultoso debido a la estructura de nudo de cisteínas.

Para utilizar como antígeno, el NGF recombinante fue nitrado con peroxinitrito y luego de la reacción se analizó por SDS-PAGE la formación de oligómeros [Figura 11]. Si bien se observa formación de especies de alto peso molecular, este patrón no es igual al observado con el NGF de ratón de Harlan (Pehar, Vargas et al. 2006). Esto podría deberse a pequeñas cantidades de proNGF que no llegaron a digerirse con tripsina y que forman oligómeros heterogéneos con las moléculas de NGF maduras.

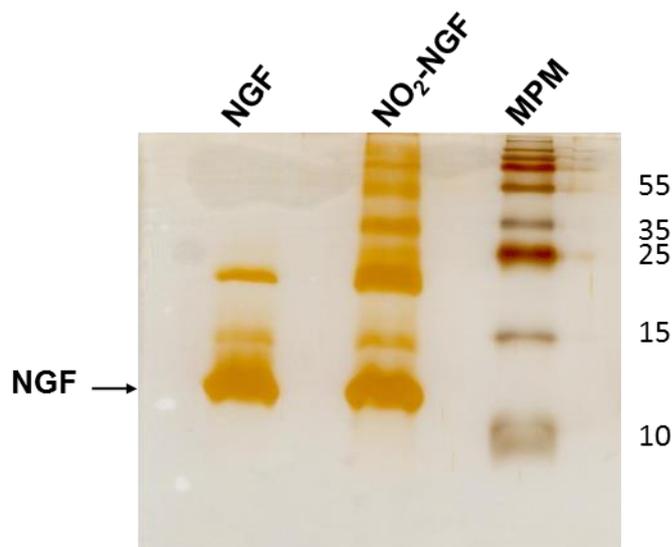


Figura 11. SDS-PAGE de NO_2 -NGF recombinante. El gel fue teñido con nitrato de plata. En el carril 1 se observa el NGF, y en el carril 2 el NO_2 -NGF luego de la reacción de nitración con peroxinitrito. En la línea 3 se muestra el marcador de peso molecular de Fermentas.

2. Desarrollo de anticuerpos monoclonales anti NO₂-NGF, que reconocen específicamente a la tirosina 52 nitrada en el contexto de la molécula de NGF.

El objetivo principal del proyecto fue la generación de anticuerpos monoclonales (mAbs) que reconozcan específicamente al NGF nitrado y no al NGF ni a otras proteínas nitradas.

En los primeros intentos de generar anticuerpos que reconozcan específicamente un epítipo del NO₂-NGF que contenga la Tirosina 52 nitrada, se realizaron inmunizaciones con la proteína entera nitrada con peroxinitrito. Esto se realizó varias veces, tanto en nuestro laboratorio como en la empresa Genscript. Estos procedimientos nos llevaron a generar anticuerpos que no reconocían de forma específicamente la variante nitrada.

Finalmente, se diseñó un péptido sintético de 11 aminoácidos, que contiene la secuencia del NGF de una de las regiones que interacciona con el receptor p75^{NTR}. Dicha región contiene la Tirosina 52 es su parte central, por lo que el péptido contiene una NO₂-Tirosina. Dicho péptido fue utilizado para inmunizar ratones y posteriormente para detectar los clones productores de anticuerpos de interés.

Para la generación de anticuerpos se inmunizaron 10 ratones BALB/c con el péptido [VFKQ-Tyr-NO₂-FFETKC] conjugado a la proteína KLH (del inglés *Keyhole limpet hemocyanin*) como inmunógeno. Todos los ratones mostraron respuesta inmune satisfactoria para aislar los linfocitos B y generar hibridomas. Los sobrenadantes de los clones (hibridomas) fueron analizados por dos estrategias de ELISA [Tabla1], y se seleccionaron aquellos que: i) se unieron al péptido nitrado y al NO₂-NGF, ii) no se unieron al péptido sin nitrar [VFKQYFFETKC]. En estas condiciones se encontraron cuatro clones con las características deseadas, denominados **4C6**, **7G8**, **12G8** y **16C6**.

| Clones | Dilución del sobrenadante | | | | | | Blanco | Título | Antígeno | Isotipo del mAb |
|--------|---------------------------|-------|-------|-------|-------|--------|----------|---------|----------|-----------------|
| | 1:10 | 1:30 | 1:90 | 1:270 | 1:810 | 1:2430 | Promedio | | | |
| 4C6 | 1,822 | 1,552 | 1,136 | 0,953 | 0,885 | 0,508 | 0,073 | >1:2430 | A | IgG1, κ |
| | 0,16 | 0,112 | 0,089 | 0,082 | 0,081 | 0,076 | 0,081 | <1:10 | B | IgG1, κ |
| | 2,435 | 2,194 | 1,485 | 0,944 | 0,457 | 0,223 | 0,080 | 1:2430 | C | IgG1, κ |
| 7G8 | 1,798 | 1,658 | 1,129 | 0,959 | 0,816 | 0,392 | 0,073 | 1:2430 | A | IgG1, κ |
| | 0,109 | 0,106 | 0,098 | 0,083 | 0,083 | 0,079 | 0,081 | <1:10 | B | IgG1, κ |
| | 2,154 | 1,934 | 1,469 | 0,774 | 0,54 | 0,244 | 0,080 | 1:2430 | C | IgG1, κ |
| 12G8 | 2,953 | 2,355 | 1,763 | 0,948 | 0,656 | 0,359 | 0,073 | 1:2430 | A | IgG1, κ |
| | 0,109 | 0,107 | 0,093 | 0,090 | 0,089 | 0,083 | 0,081 | <1:10 | B | IgG1, κ |
| | 2,192 | 1,812 | 1,559 | 1,030 | 0,628 | 0,327 | 0,080 | 1:2430 | C | IgG1, κ |
| 16C6 | 2,013 | 1,577 | 0,924 | 0,562 | 0,472 | 0,249 | 0,073 | 1:2430 | A | IgG1, κ |
| | 0,103 | 0,094 | 0,093 | 0,087 | 0,079 | 0,079 | 0,081 | <1:10 | B | IgG1, κ |
| | 1,715 | 1,636 | 1,324 | 0,81 | 0,584 | 0,282 | 0,080 | 1:2430 | C | IgG1, κ |

Tabla 1. Título de sobrenadantes de los clones seleccionados. Cada sobrenadante fue analizado en tres ELISAS donde se sensibilizó con tres antígenos distintos: A) Péptido nitrado, B) péptido sin nitrar, y C) NO₂-NGF. Los cuatro clones mostraron una alta afinidad tanto por el péptido nitrado como por el NO₂-NGF, mientras que no reconocen el péptido sin nitrar. EL título es la mayor dilución con un cociente Positivo/Blanco $\geq 2,1$. Todos los mAbs son del isotipo IgG1, κ .

Estos hibridomas fueron inoculados en ratones para su producción *in vivo* por generación de ascitis. Donde los hibridomas se multiplican a gran escala y liberan a la cavidad peritoneal el anticuerpo monoclonal. De ésta forma se producen grandes cantidades del anticuerpo de interés que luego debe ser purificado. En este caso, los mAbs fueron purificados mediante cromatografía de afinidad con proteína A/G. La especificidad, título [Tabla 2] y pureza [Figura 12] fue analizada luego de la purificación.

Luego de la purificación mediante cromatografía de afinidad, los cuatro mAbs mostraron especificidad en ensayos de ELISA por el NO₂-NGF frente al NGF sin nitrar. El título fue el mismo para los cuatro clones, siendo de 1:81000 en el caso del reconocimiento del péptido nitrado, y de 1:27000 cuando se unen al NO₂-NGF.

| 12G8 | Dilución | Anticuerpo purificado (A450) | | |
|------|----------|------------------------------|---------|---------|
| | | A | B | C |
| 1 | 1:1000 | 1,041 | 0,089 | 0,427 |
| 2 | 1:3000 | 0,773 | 0,081 | 0,372 |
| 3 | 1:9000 | 0,582 | 0,076 | 0,275 |
| 4 | 1:27000 | 0,414 | 0,076 | 0,186 |
| 5 | 1:81000 | 0,28 | 0,074 | 0,122 |
| 6 | Blanco | 0,066 | 0,64 | 0,067 |
| | Título | 1:81000 | <1:1000 | 1:27000 |

| 7G8 | Dilución | Anticuerpo purificado (A450) | | |
|-----|----------|------------------------------|---------|---------|
| | | A | B | C |
| 1 | 1:1000 | 1,063 | 0,11 | 0,512 |
| 2 | 1:3000 | 0,918 | 0,084 | 0,365 |
| 3 | 1:9000 | 0,721 | 0,083 | 0,239 |
| 4 | 1:27000 | 0,559 | 0,077 | 0,152 |
| 5 | 1:81000 | 0,365 | 0,071 | 0,097 |
| 6 | Blanco | 0,066 | 0,064 | 0,067 |
| | Título | 1:81000 | <1:1000 | 1:27000 |

| 16C6 | Dilución | Anticuerpo purificado (A450) | | |
|------|----------|------------------------------|---------|---------|
| | | A | B | C |
| 1 | 1:1000 | 0,703 | 0,082 | 0,414 |
| 2 | 1:3000 | 0,56 | 0,075 | 0,314 |
| 3 | 1:9000 | 0,423 | 0,071 | 0,237 |
| 4 | 1:27000 | 0,26 | 0,070 | 0,170 |
| 5 | 1:81000 | 0,209 | 0,070 | 0,112 |
| 6 | Blanco | 0,066 | 0,064 | 0,067 |
| | Título | 1:81000 | <1:1000 | 1:27000 |

| 4C6 | Dilución | Anticuerpo purificado (A450) | | |
|-----|----------|------------------------------|---------|---------|
| | | A | B | C |
| 1 | 1:1000 | 1,023 | 0,123 | 0,531 |
| 2 | 1:3000 | 0,889 | 0,09 | 0,343 |
| 3 | 1:9000 | 0,742 | 0,078 | 0,250 |
| 4 | 1:27000 | 0,535 | 0,069 | 0,159 |
| 5 | 1:81000 | 0,384 | 0,067 | 0,097 |
| 6 | Blanco | 0,066 | 0,064 | 0,067 |
| | Título | 1:81000 | <1:1000 | 1:27000 |

Tabla 2. Título de anticuerpos purificados. Los cuatro clones fueron analizado en tres ELISAS donde se sensibilizó con tres antígenos distintos: A) Péptido nitrado, B) péptido sin nitrar, y C) NGF-NO₂. Los cuatro clones mostraron una alta afinidad tanto por el péptido nitrado como por el NGF-NO₂, mientras que no reconocen el péptido sin nitrar. La dilución 1:1000 equivale a una concentración de 1µg/mL. El título es la mayor dilución con un cociente Positivo/Blanco ≥ 2,1.

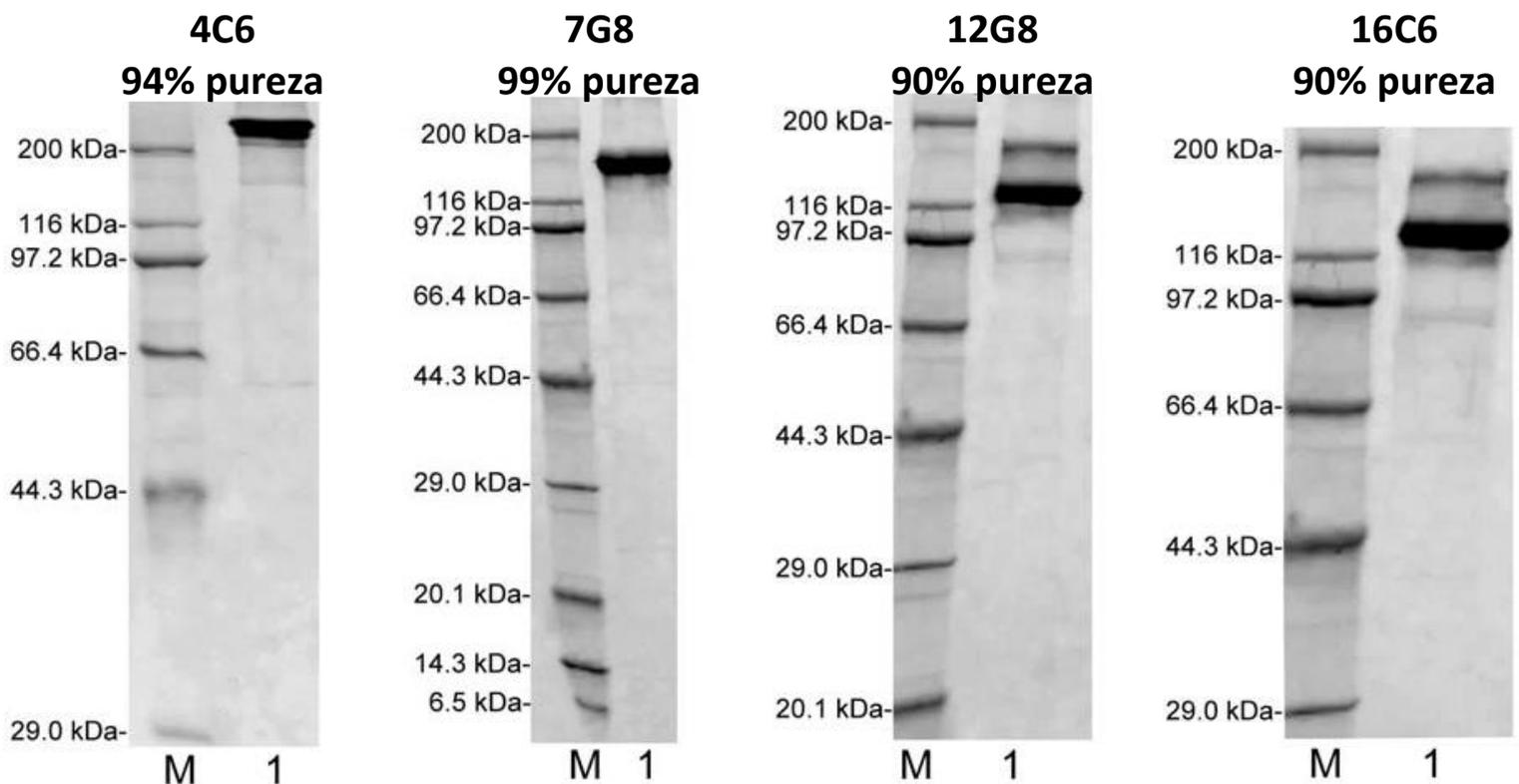


Figura 12. Análisis de pureza mediante SDS-PAGE. Se sembraron 3µg de cada anticuerpo purificado por cromatografía de afinidad con proteína A/G, y se determinó la pureza. Los porcentajes de pureza determinados por el análisis fueron de 94% para el mAb 4C6, 99% para el mAb 7G8 y 90% para los mAbs 12G8 y 16C6. El análisis fue realizado por Genscript.

Para determinar la pureza de los mAbs luego de la purificación por cromatografía de afinidad, se realizó un análisis por SDS-PAGE. Los mAbs 4C6 y 7G8 son los de mayor pureza, con valores de 94% y 99% respectivamente. Mientras que para los mAbs 12G8 y 16C6 el proceso de purificación resultó menos eficiente, obteniéndose un 90% de pureza para ambos.

Los valores de los ELISA y la pureza de estos mAbs, hacen de ellos una buena herramienta para diversas técnicas tales como Western Blot, Inmunohistoquímica, ensayos celulares y estudios estructurales, lo cual permitió realizar un abordaje completo para su caracterización. De todas formas, los valores de pureza podrían mejorarse si se realiza una purificación por afinidad con el péptido sintético nitrado.

3. *Especificidad de los mAbs por el NO₂-NGF, frente al NGF y a otras proteínas nitradas.*

Para determinar la especificidad de los mAbs por el NO₂-NGF frente al NGF y a otras proteínas nitradas se realizó un Dot-Blot. En el mismo se sembraron 100µg de NGF, NO₂-NGF, BSA (Seroalbúmina bobina) y NO₂-BSA en gotas individuales de 2µL. Se sembraron seis tiras en total, cada una se reveló con un anticuerpo distinto: mAb 12G8, mAb 4C6, mAb7G8, mAb 16C6, anti-3-Nitrotirosina y anti-NGF. Los cuatro mAbs reconocen únicamente al NO₂-NGF, el anticuerpo anti nitro tirosina reconoce tanto al NGF como al BSA nitrados, y el anticuerpo anti-NGF reconoce tanto el NGF como el NGF nitrado.

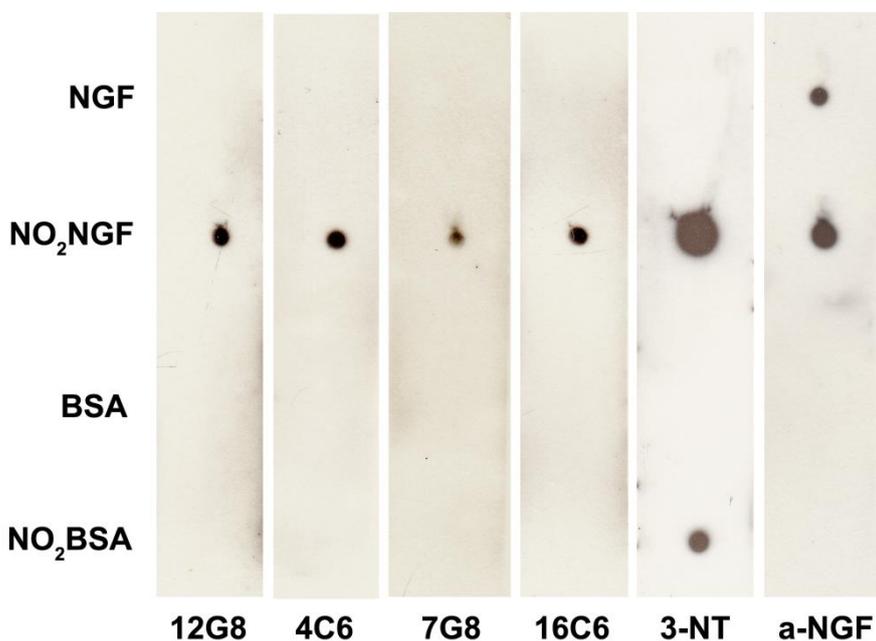


Figura 13. Análisis de la especificidad de los mAbs por Dot Blot. En cada tira de membrana se sembraron 100µg de NGF, NO₂-NGF, BSA y NO₂BSA en gotas individuales de 2µL. Se sembraron seis tiras en total, cada una se reveló con un anticuerpo distinto: mAb 12G8, mAb 4C6, mAb7G8, mAb 16C6, anti-3-Nitrotirosina y anti-NGF. Los cuatro mAbs reconocen únicamente al NO₂-NGF, el anticuerpo anti nitro tirosina reconoce tanto al NGF como al BSA nitrados, y el anticuerpo anti-NGF reconoce tanto el NGF como el NGF nitrado.

Los cuatro clones desarrollados muestran especificidad por el NO₂-NGF en Dot-Blot, lo cual sugiere que en la interacción antígeno-anticuerpo estarían participando no solo el residuo de tirosina nitrado, sino también otros aminoácidos del NGF.

En el año 2006, Pehar *et al* pusieron en evidencia la oligomerización del NGF cuando este es tratado con peroxinitrito. Se observó que el grado de oligomerización y nitración era dependiente de la concentración de peroxinitrito. En particular se utilizaron cuatro concentraciones de peroxinitrito (0,25, 0,5, 0,75 y 1 mM) y se observaron bandas a la altura del monómero, dímero, tetrámero y octámero. La aparición de las bandas de mayor peso molecular aumenta con la concentración de peroxinitrito en la reacción de nitración (Pehar, Vargas et al. 2006). Se ha visto que las concentraciones en el orden de picogramos por mililitro de NO₂-NGF son capaces de inducir la muerte de motoneuronas embrionarias de rata en cultivo. Por este motivo, fue relevante analizar si estos mAbs anti NO₂-NGF eran capaces de reconocer, no solo el monómero, sino también estos oligómeros de NO₂-NGF. Para ello, se realizaron siete reacciones de nitración con concentraciones crecientes de peroxinitrito (0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 5 y 10 mM). Cada una fue analizada por Western Blot [Figura 14], donde además se sembró NGF como control. El Western Blot fue revelado con el mAb 12G8, y con los anticuerpos anti-NGF y anti-NO₂-Tyr como controles. Este experimento se repitió para los mAbs 4C6, 7G8 y 16C6 obteniéndose resultados similares.

Se vio que el mAb 12G8 es capaz de reconocer los oligómeros de NO₂-NGF, tanto el monómero (13,2 KDa), el dímero (26 KDa) como el tetrámero (54 KDa) y el octámero (108 KDa). Los resultados con los mAbs anti-NGF y anti-NO₂-Tyr indican que las bandas de alto peso molecular efectivamente corresponden a NGF nitrado.

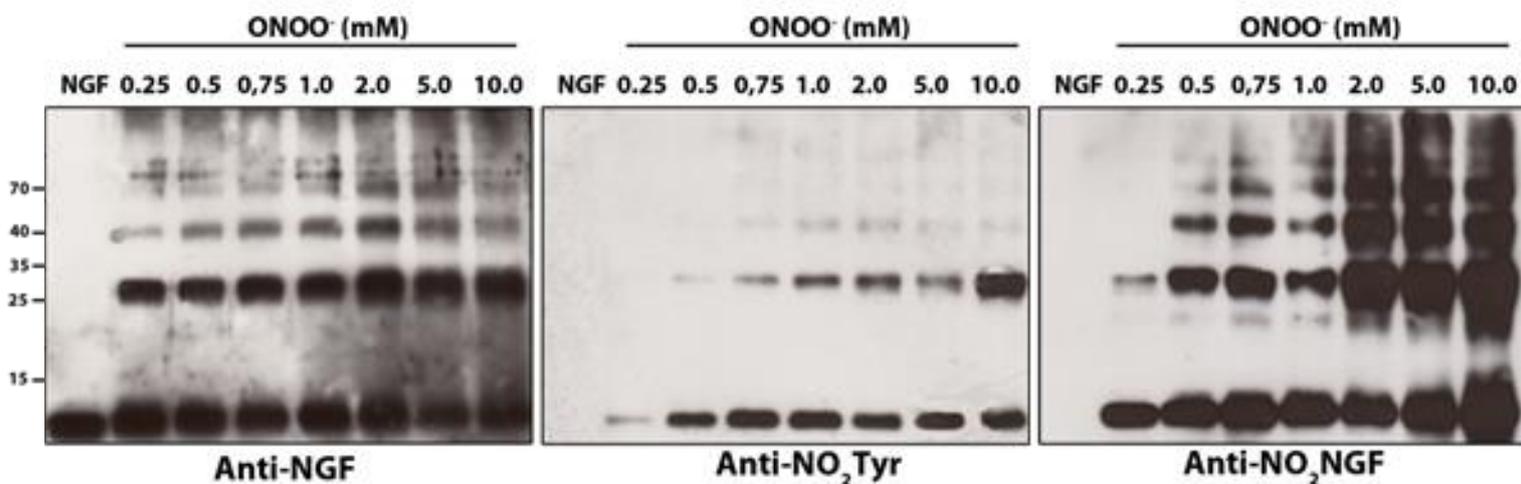


Figura 14. Reconocimiento de oligómeros de NO₂NGF por los mAbs. Se realizaron siete reacciones de nitración con concentraciones crecientes de peroxinitrito (0,25, 0,5, 0,75, 1, 2, 5 y 10 mM). Se sembraron 200ng de proteína en cada carril y en el primer carril se sembró NGF sin nitrar como control. El Western Blot se reveló con anti-NGF, anti-NO₂Tirosina y el mAb 12G8.

4. Evaluación de la afinidad de los mAbs por el epítipo aislado vs. la proteína entera mediante ELISA.

Los mAbs anti-NO₂-NGF fueron diseñados para neutralizar la actividad de esta proteína in vivo, por ello fue importante determinar si son capaces de reconocer la proteína entera con alta afinidad. Para analizar esta característica se realizó un ELISA en donde se comparó la capacidad de los mAbs a unirse al NO₂-NGF vs. el péptido nitrado para los cuatro mAbs [Figura 15]. Estos resultados revelaron que los mAbs 12G8 y 16C6 reconocen más fuertemente al NO₂-NGF que al péptido nitrado, sugiriendo el reconocimiento de un epítipo que abarca más aminoácidos que los contenidos en el péptido. En este ensayo de ELISA no se utilizaron cantidades equimolares de péptido y proteína, de hecho la cantidad de péptido utilizado está ~40 veces más concentrado en unidades de molaridad que el NO₂-NGF. Debido a esto, probablemente se esté subestimando la afinidad que tienen estos anticuerpos por el NO₂-NGF en comparación con el péptido.

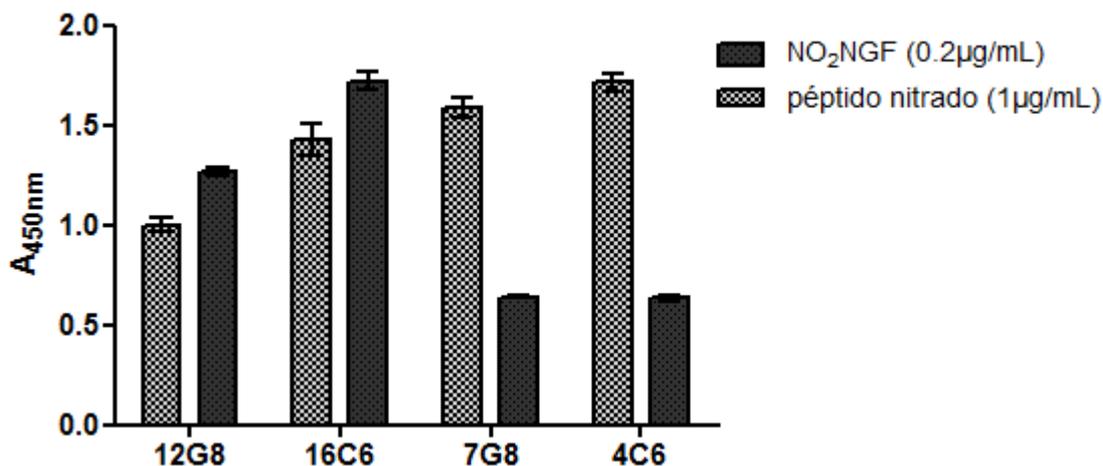


Figura 15. ELISA comparativo, NO₂-NGF vs. Péptido nitrado. ELISA indirecto en el que se sensibilizó con NO₂-NGF y NO₂-péptido con el fin de evaluar la capacidad de unión de cada mAb con ambos antígenos. Los mAbs 12G8 y 16C6 se unen de manera similar al NO₂-NGF y al NO₂-péptido, aunque levemente más al péptido. Mientras que los mAbs 7G8 y 4C6 reconocen más fuertemente el péptido nitrado que el NO₂-NGF. Las barras de error corresponden al desvío estándar de réplicas analíticas.

En el caso de los mAbs 7G8 y 4C6, la gráfica muestra una diferencia notable entre la unión al péptido y la unión a la proteína, siendo esta última la más débil. Si se hubiesen utilizado cantidades equimolares de ambos, seguramente esa relación se revierta. De todas formas, podemos comparar la unión al NO₂-NGF de los mAbs 12G8 y 16C6 y los mAbs 7G8 y 4C6, y concluir que los mAbs 12G8 y 16C6, se unen más fuertemente al NO₂-NGF que los mAbs 7G8 y 4C6. Por lo tanto, los mAbs 12G8 y 16C6 serían mejores candidatos para la neutralización de NO₂-NGF in vivo. Según nuestra hipótesis el NO₂-NGF es un marcador de neuroinflamación en enfermedades neurodegenerativas como la ELA o EA, por lo tanto, estos mAbs podrían ser utilizados para determinar los niveles de neuroinflamación mediante ensayos de ELISA.

Mediante una colaboración con el laboratorio del Dr. Pedro Alzari en el Institut Pasteur de París, se secuenciaron los cuatro mAbs con el objetivo de poder modificar su secuencia en etapas posteriores a este proyecto dónde se mejorarán genéticamente para aumentar la afinidad y especificidad de los

mAbs por el NO₂-NGF. Las secuencias se obtuvieron por la empresa Genscript. Con el fin de determinar si las diferencias observadas en los ensayos de ELISA tienen una base en la diferencia de secuencia entre los mAbs se realizó el alineamiento de los cuatro mAbs [No se muestran los datos]. A partir del análisis de las secuencias se demostró una diferencia de secuencia entre los dos grupos, sobre todo a nivel de la cadena liviana y en el CDR3 (región determinante de la complementariedad 3) de la cadena pesada. Los mAbs 7G8 y 4C6 son idénticos entre sí, mientras que los mAbs 12G8 y 16C6 poseen diferencias en dos posiciones. En el aminoácido 86 de la cadena pesada del mAb 12G8 hay una Arginina y en el 16C6 hay una Lisina, dicha posición se corresponde con el siguiente aminoácido luego del extremo carboxi-terminal del CDR2. La otra diferencia radica en la posición 81 de la cadena liviana, donde se observó que el mAb 12G8 tiene una Histidina y el 16C6 una Asparagina. En este caso, dicha posición se encuentra dentro del CDR2 de la cadena liviana.

Debido a la diferencia de secuencia aminoacídica entre ambos grupos de mAbs, es razonable encontrar diferencias con respecto a la unión con el antígeno. Las dos diferencias puntuales entre los mAbs 12G8 y 16C6 no significarían una gran diferencia, pero no se descartan modificaciones en la constante de afinidad (K_D) de estos con el antígeno.

5. Escáner de alaninas mediante ELISA para determinar los aminoácidos del epítipo que participan en el reconocimiento antígeno-anticuerpo.

En la interacción antígeno-anticuerpo participan tanto aminoácidos del anticuerpo que forman parte del paratope, como aminoácidos presentes en el antígeno que forman el epítipo. Quisimos estudiar cuales aminoácidos del antígeno son relevantes para el reconocimiento por cada uno de los mAbs. Para ello, se diseñaron 11 péptidos sintéticos iguales al péptido utilizado para la producción de los mAbs, pero difieren entre sí ya que cada uno tiene una mutación en una posición del péptido donde se sustituye el aminoácido original

por una Alanina [Figura 16]. Es por esto, que el método empleado se denomina “escáner de alaninas”.

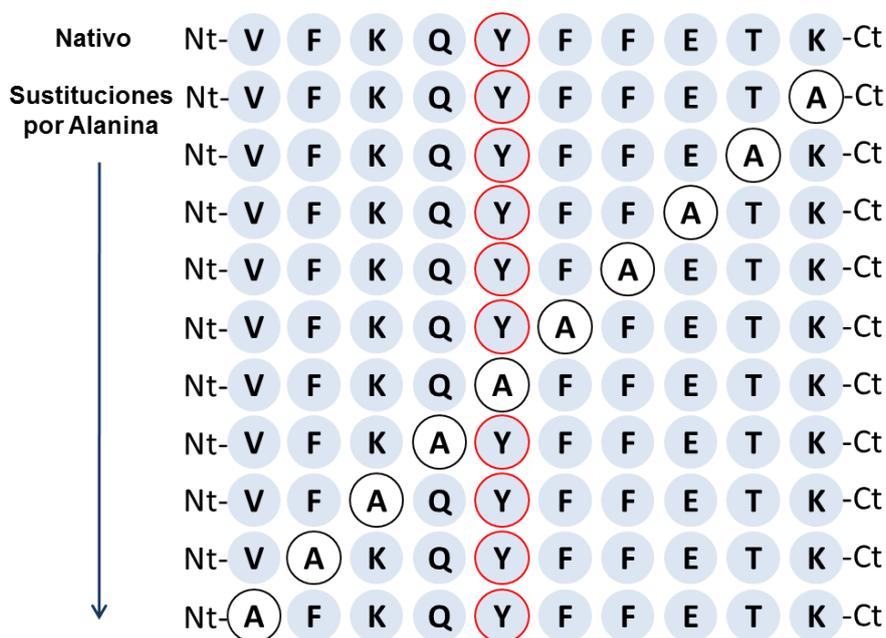


Figura 16. Péptidos utilizados en el scan de alaninas. Se muestran los péptidos diseñados y sintetizados para la determinación de los aminoácidos relevantes dentro del epítipo en la unión antígeno-anticuerpo. En la parte central y con borde rojo se muestra la NO₂-Tyr. En total se utilizaron 11 péptidos.

En la figura 17 se esquematizan los resultados del ELISA del escáner de alaninas. Con respecto al mAb 16C6, los aminoácidos del péptido sintético importantes para la interacción antígeno anticuerpo son la Valina 48, la NO₂-Tyr 52, la Fenilalanina 53 y la Lisina 57. La Fenilalanina 49 también está implicada en dicha interacción, aunque en menor medida que los otros aminoácidos mencionados. En el caso del mAb 12G8 los resultados fueron similares a los del 16C6 con la diferencia de que la Lisina 50 y la Glutamina 51 estarían participando también de la interacción antígeno-anticuerpo. Estas diferencias podrían deberse a la sutil variación de secuencia a nivel del CDR2 entre estos mAbs.

Como se vio anteriormente en el análisis de las secuencias, los mAbs 4C6 y 7G8 son idénticos en su secuencia, por lo que era de esperar que este ELISA resulte similar para ambos. En el caso de estos mAbs, los aminoácidos del epítipo implicados en el reconocimiento antígeno anticuerpo son la Lisina 50, la NO₂-Tyr 52 y la Fenilalanina 54.

Además se observó que las diferencias entre los mAbs 12G8 y 16C6 no estarían modificando los residuos relevantes para en la interacción de los mAbs con el NO₂-péptido. Por otro lado, se evidenciaron bolsillos hidrofóbicos en torno al paratope que favorecerían la unión inespecífica de estos mAbs.

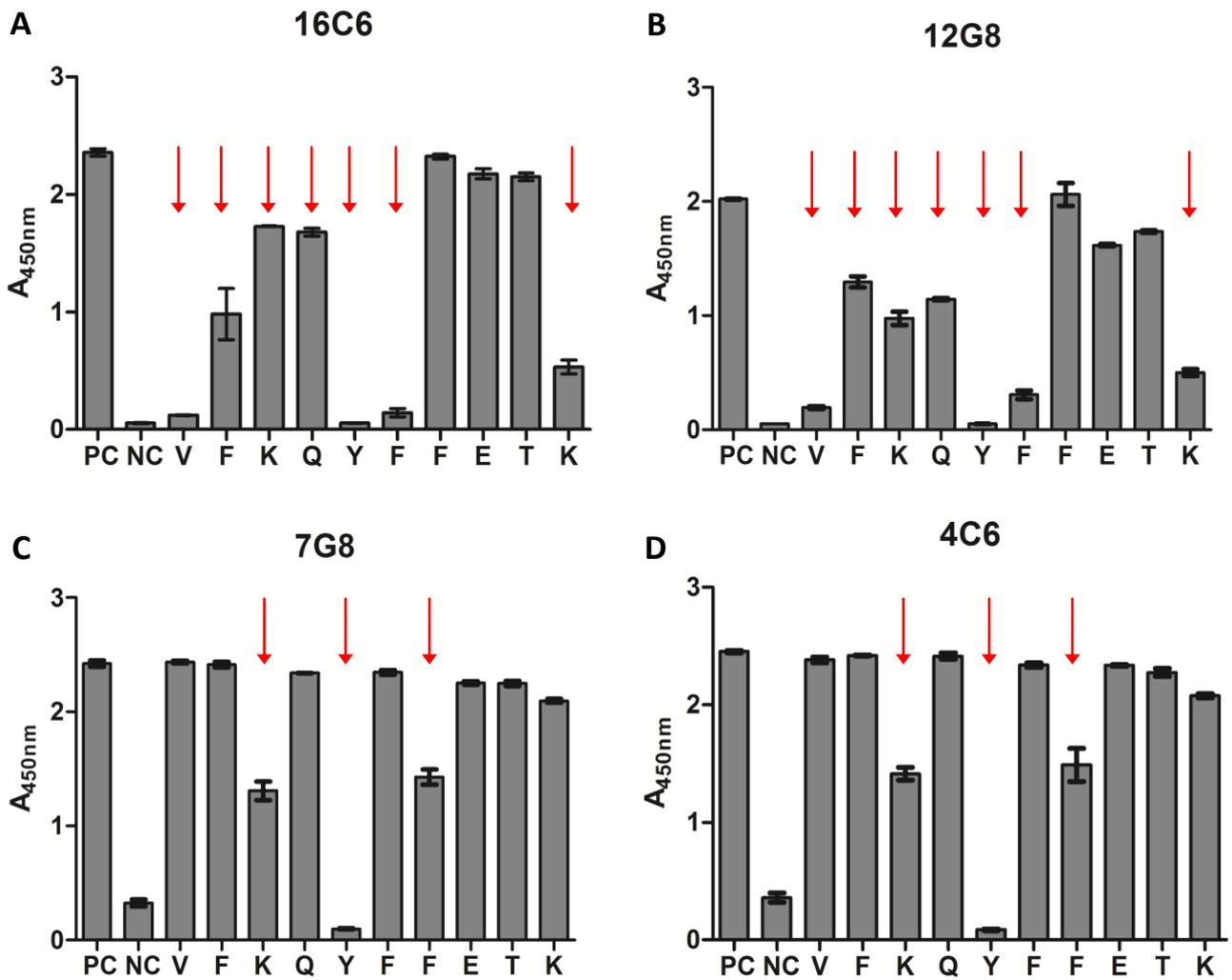


Figura 17. ELISA de scan de alaninas. Los pocillos fueron sensibilizados con los diferentes péptidos esquematizados en la Figura 17. En la parte A, se graficó el ELISA del mAb 16C6; en la B, el del 12G8; en la C la del 7G8; y en la D, la del 4C6. Los aminoácidos implicados en la unión antígeno anticuerpo se resaltan con una flecha. Todos los experimentos se relizaron por duplicado y las barrar de error corresponden a \pm desvío estándar. PC es el control positivo y NC el control negativo.

6. Caracterización de la afinidad de los anticuerpos por el antígeno mediante técnicas cuantitativas.

Para analizar cuantitativamente la unión de los mAbs anti-NO₂-NGF con el antígeno se utilizaron dos abordajes distintos. Por un lado se realizaron ensayos de Biacore donde se inmovilizó al NGF y NO₂-NGF para analizar la unión de estos con los mAbs, mientras que para estudiar la interacción de los mAbs con el péptido se inmovilizaron los mAbs. Por otro lado, se realizaron estudios de Termoforesis en el equipo Monolith N.115. Cabe destacar que en estos ensayos se utilizó el NGF de glándula submaxilar de ratón comercial de

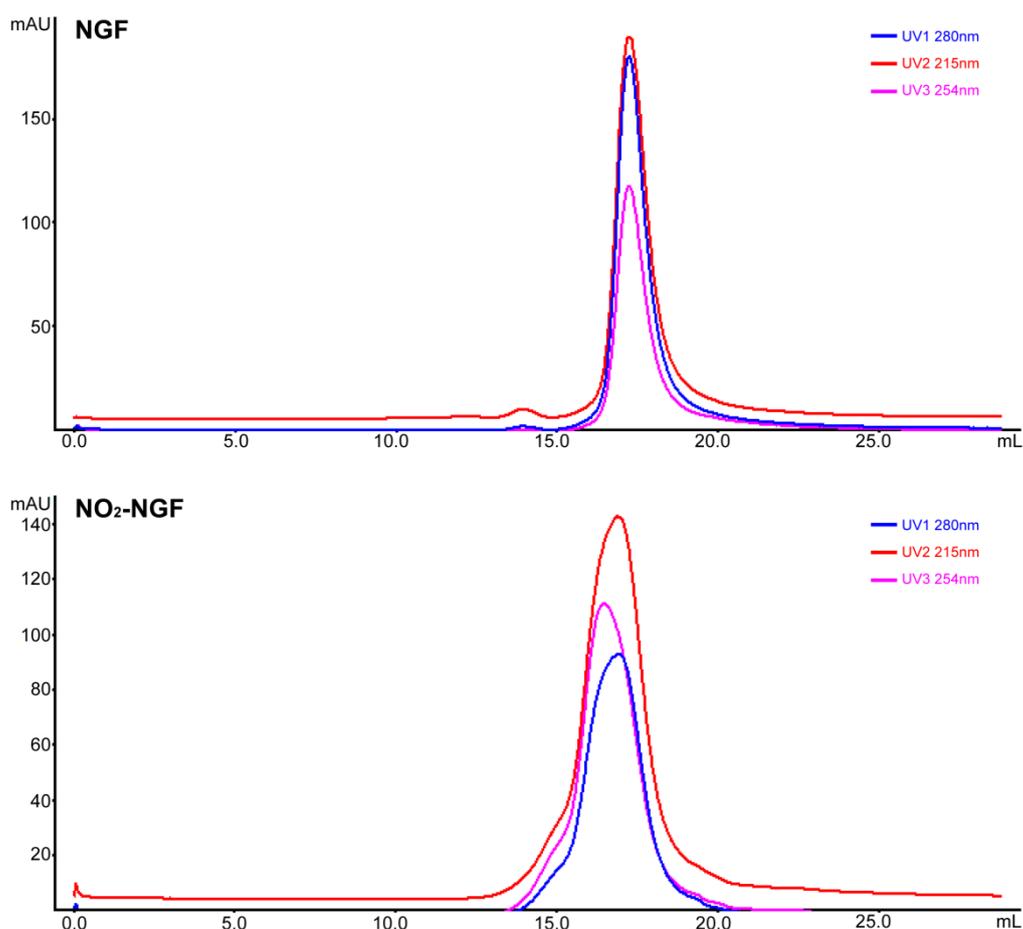


Figura 18. Cromatografía de exclusión molecular de NGF vs. NO₂-NGF. En la parte superior de la figura se muestra el cromatograma del NGF y en la parte inferior el cromatograma del NO₂-NGF, ambos a 280nm, 215nm y 254nm. En ambas curvas se observan picos únicos que eluyen aproximadamente en el mismo volumen.

la empresa Harlan.

i. Ensayos de Termoforesis

Un impedimento importante para la realización de este estudio es la presencia de agregados proteicos en la muestra. Como se mencionó anteriormente, cuando el NGF es sometido a la reacción de nitración con el peroxinitrito, éste forma oligómeros de alto peso molecular. Para intentar eliminar éstos agregados se modificó el protocolo de nitración adicionando un paso de cambio de buffer al final de la reacción y se evitó el congelado y descongelado de la muestra. Para corroborar la ausencia de agregados se realizó un análisis en cromatografía de exclusión molecular [Figura 18]. Si bien los cromatogramas del NO₂-NGF no son idénticos al del NGF sin nitrar, puede observarse un solo pico que correspondería al dímero. Si bien la columna no fue calibrada, el NGF sin nitrar no forma oligómeros, por lo que es un buen parámetro de comparación para evaluar la formación de oligómeros en el NGF tratado con peroxinitrito.

Para verificar la nitración del NGF se realizó una espectrometría de masa del NO₂-NGF vs. NGF en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica (UByPA) de Instituto Pasteur de Montevideo. Para analizar los resultados, se realizó una digestión teórica con Tripsina de la secuencia aminoacídica del NGF de ratón en el sitio Expasy (http://web.expasy.org/peptide_mass/) [Tabla 3]. De los péptidos con posibles nitraciones, se analizó el péptido que contiene a la Tirosina 52 (péptido 51-57, resaltado con púrpura en la tabla 3). En el espectro de masa correspondiente al NGF se observa un péptido con una relación masa sobre carga (m/z) de 962,5 que corresponde a dicho péptido [Figura 19], este péptido también fue detectado con un m/z de 945,5 donde el aminoácido Glutamina se encuentra modificado (Piroglutamina). También se detectaron otros péptidos que verifican la identidad de la muestra. Mientras tanto, en el espectro de masa del NO₂-NGF aparece el mismo péptido de m/z 962,5, y otro de 1007 m/z (962 + 45 = 1007) [Figura 19]. Como el grupo nitro tiene un m/z de 45 podemos afirmar que la proteína se encuentra nitrada en la tirosina de la posición 52. Para verificar la identidad de este péptido, el mismo fue sometido a un análisis por fragmentación (MS/MS). Los espectros del análisis MS/MS demuestran la identidad del péptido tanto en el espectro del péptido de m/z de

962,5 como en el de 1007,5 donde todos los fragmentos que contienen la tirosina aparecen con un m/z de +45 con respecto al espectro del péptido de m/z 962,5 [Figura 20].

| Digestión teórica con Tripsina | | |
|--------------------------------|-----------|--|
| Masa | Posición | Secuencia del péptido |
| 2.737 | 1 - 25 | SSTHPVFHMGFEFSVCDSVSV W VGDK |
| 749 | 26 - 32 | TTATDIK |
| 1.804 | 35 - 50 | EVTVLAEVNINNSVFR |
| 962 | 51 - 57 | Q Y FFETK |
| 1.019 | 60 - 69 | ASNPVESGCR |
| 519 | 70 - 74 | GIDSK |
| 1.725 | 75 - 88 | H W N S Y CTTHTFVK |
| 777 | 89 - 95 | ALTTDEK |
| 631 | 96 - 100 | QAA W R |
| 1.180 | 104 - 114 | IDTACVCVLSR |

Tabla 3. Digestión teórica de la secuencia peptídica del NGF de ratón con Tripsina. Se muestran los péptidos en orden de acuerdo a su posición en la secuencia completa, su posición dentro de la proteína y la masa en Daltons de cada uno. Los aminoácidos Tirosina (Y) y Triptofano (W) se resaltan en rojo y verde respectivamente. El péptido resaltado en púrpura corresponde a la nitración encontrada en el análisis por espectrometría de masas.

Al analizar el espectro del NO₂-NGF se observa tanto el péptido con la tirosina nitrada como el péptido sin nitrar lo cual indica que la proteína no se encuentra nitrada en su totalidad. Sería de gran relevancia, en un futuro, poder determinar el porcentaje de nitración luego de la reacción.

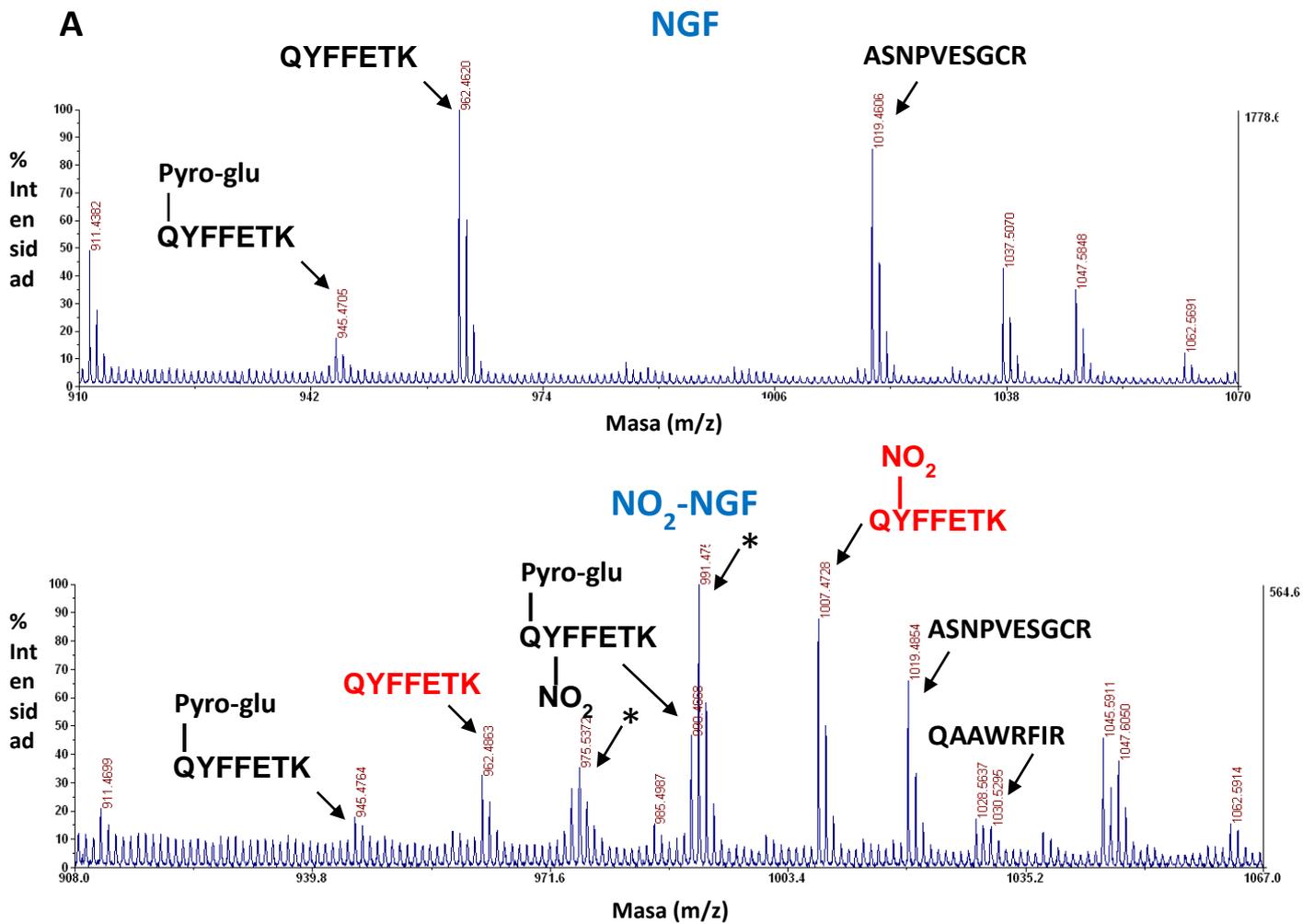


Figura 19. Espectrometría de masas (MS) del NGF y NO₂-NGF digeridos con Tripsina. (A) Espectro de masa de los péptidos obtenidos de la digestión de NGF de ratón, se indican dos péptidos que contienen la tirosina 52, y otro péptido producto de la digestión del NGF; (B) espectro de masa de los péptidos obtenidos de la digestión del NO₂-NGF de ratón, en negro se indican los mismos péptidos que en el espectro del NGF y otro péptido también perteneciente al NGF, el péptido con iroglutamina aparece también con +45 Da indicando la presencia del grupo NO₂. En rojo se indica el péptido que contiene la tirosina 52 sin nitrar de m/z 962,5 y nitrada de m/z 1007,5 (962,5 + 45 = 1007,5). Con un asterisco se muestran dos péptidos con un de -16 y -32 Da con respecto al péptido de m/z 1007,5, los cuales corresponden a la pérdida de uno y dos oxígenos del grupo nitro respectivamente.

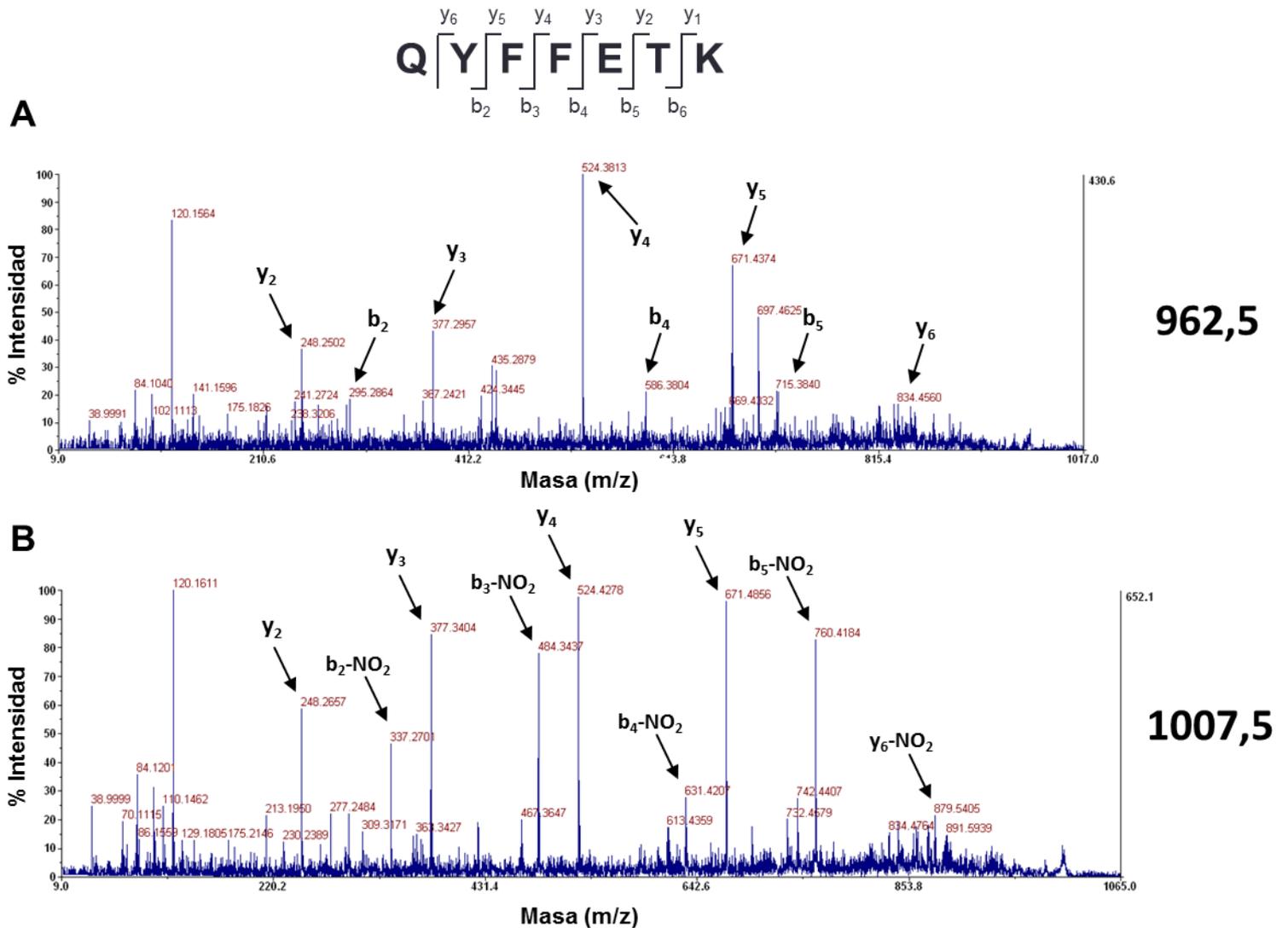


Figura 20. Espectrometría de masas en tándem (MS/MS) de los péptidos de m/z 962,5 y 1007,5. En la parte superior se ilustran con las letras **b** y **y** los fragmentos teóricos del péptido. (A) Espectro de masa de la fragmentación del péptido de m/z 962,5. Las flechas indican los fragmentos detectados; en (B) se muestra el espectro de masa de los fragmentos del péptido de m/z 1007,5, con las flechas se indican los fragmentos detectados, donde todos los fragmentos que contienen la tirosina 52 aparecen con +45 Da con respecto al espectro del péptido sin nitrar.

Para llevar a cabo los estudios de termoforesis en el equipo Monolith NT.115, hay que marcar fluorescentemente una de las moléculas que participa en la interacción. La concentración de la molécula que se marca fluorescentemente se mantiene constante en todos los capilares, y se realizan diluciones seriadas de la otra. En este caso, tanto el anticuerpo como el antígeno son muestras puras, por lo que podría marcarse cualquiera de las dos. En la puesta a punto se determinó que la forma adecuada para realizar el análisis es con el anticuerpo conjugado al fluoróforo a una concentración constante. Debido a la

similitud de secuencia de los anticuerpos 12G8 y 16C6, y 4C6 con 7G8, el experimento se realizó con los mAbs 12G8 y 4C6. El análisis se realizó en 16 capilares con diluciones seriadas de NGF y NO₂-NGF, dónde la concentración más elevada fue de 35µM. Para el análisis de los mAbs con los péptidos nitrado y no nitrado la concentración más elevada de péptido fue de 40µM.

En el caso del estudio entre los mAbs y el NGF y NO₂-NGF la fluorescencia inicial se mantuvo constante en todos los capilares y el tipo de análisis aplicado fue de Termoforesis más Tjump [Figura 21]. Lo mismo sucedió en el análisis del mAb 4C6 con los péptidos, pero en el caso del mAb 12G8 el análisis utilizado fue el de fluorescencia inicial. Esto fue debido a que la fluorescencia de la mezcla entre el mAb 12G8 y el NO₂-péptido variaba de acuerdo a la concentración del péptido, por ello realizar un análisis en la zona de termoforesis no era adecuado. De todas formas, estos resultados no son comparativos. Una solución posible a este fenómeno sería disminuir la concentración de péptido en el análisis hasta que la fluorescencia inicial sea constante en todos los capilares.

Para analizar los resultados se realizaron gráficos de Fluorescencia normalizada (F_{norm}) en función de la concentración de proteína (NGF o NO₂-NGF) o péptido (sin nitrar o NO₂-péptido) [Figura 22]. Si bien los gráficos muestran una interacción entre los mAbs y el NO₂-NGF (verde) que no se observa con el NGF sin nitrar (rojo), no fue posible calcular los valores de K_D mediante esta técnica. Por este motivo los resultados de interacción con esta técnica son meramente cualitativos.

Posiblemente, el hecho de que el NO₂-NGF esté formando estructuras de mayor peso molecular podría estar perjudicando el estudio. Por otra parte, como el NO₂-NGF precipita a mayores concentraciones de las utilizadas se dificulta partir de una concentración mayor a 35µM. Una alternativa para solucionar este problema, sería sintetizar NO₂-NGF de forma recombinante con el sistema desarrollado por Neumann et al. (Neumann, Hazen et al. 2008). Esta metodología utiliza una aminoacil tRNA sintetasa capaz de incorporar una NO₂-Tyr en presencia de un codón stop amber TAG. Esto permitiría incorporar el

grupo nitro de forma co-traducciona mejorando así la solubilidad de esta proteína.

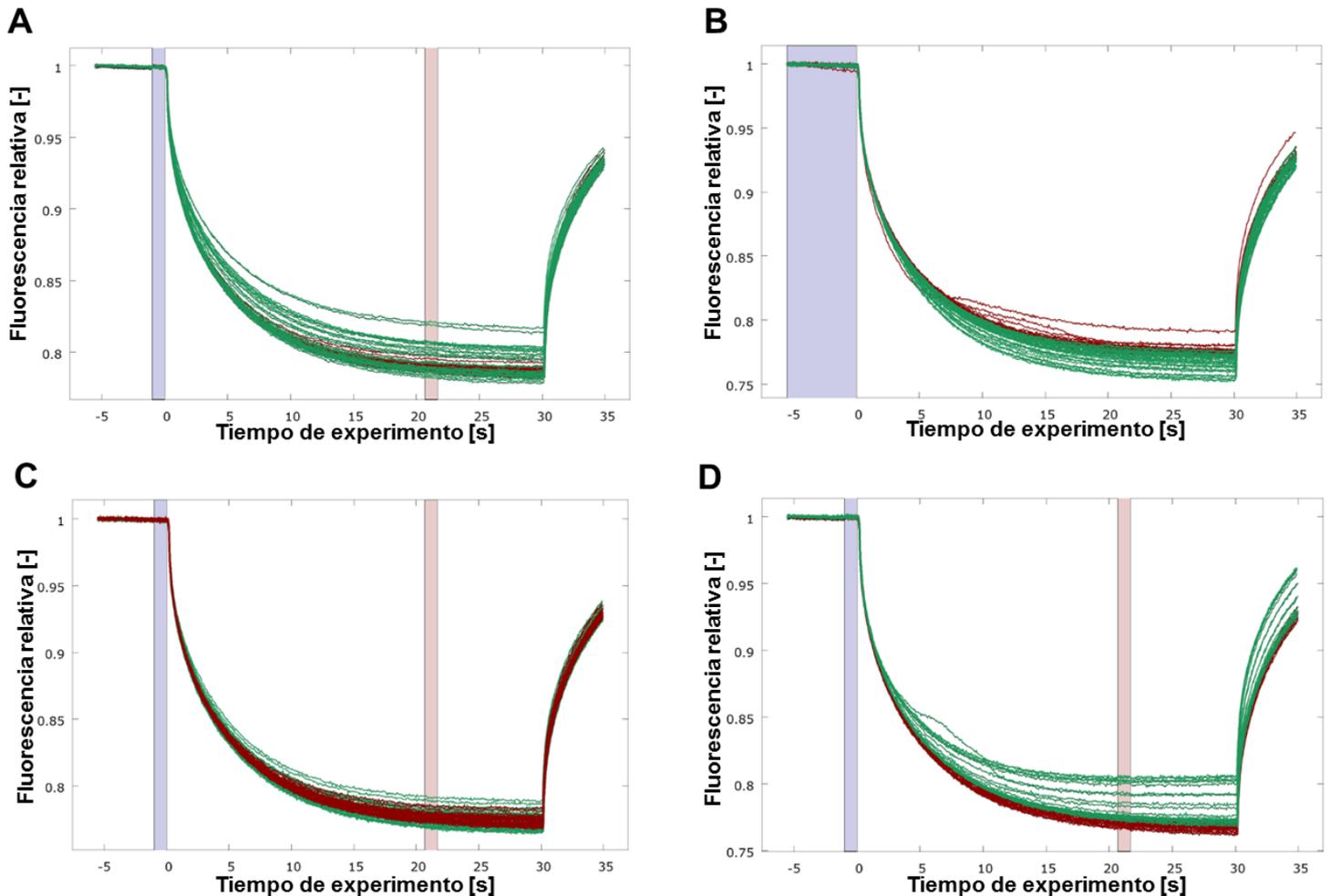


Figura 21. Variación de fluorescencia en la Termoforesis. Los gráficos muestran la fluorescencia relativa de cada capilar en función del tiempo de experimento. La variación en la fluorescencia se debe a la incidencia del láser que incide durante 30 segundos sobre cada capilar. Las franjas celestes y rosadas resaltan los valores de fluorescencia utilizados para el análisis. En la parte A se observa al análisis para el mAb 12G8 con el NGF (en rojo) y con el NO₂NGF (en verde); en la parte B, el análisis del mAb 12G8 con el péptido sin nitrar (en rojo) y con el NO₂-péptido (en verde); en la parte C el análisis para el mAb 4C6 con el NGF (en rojo) y con el NO₂NGF (en verde); en la parte D, el análisis del mAb 4C6 con el péptido sin nitrar (en rojo) y con el NO₂-péptido (en verde). En los experimentos de A, C y D, los valores analizados fueron los de la fluorescencia justo antes de la Termoforesis más el Tjump. En cambio para el experimento en B se utilizaron los valores de fluorescencia inicial.

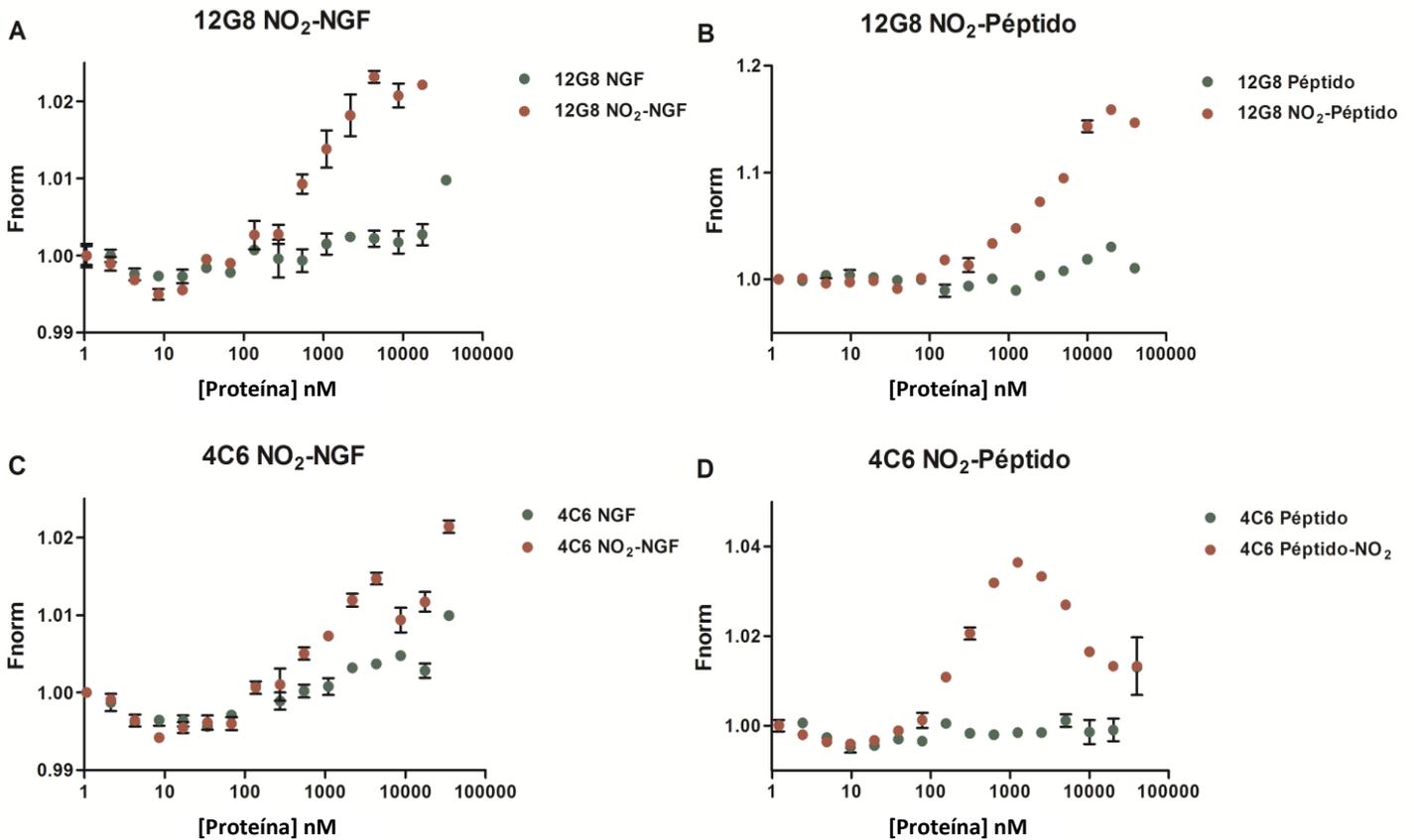


Figura 22. Análisis de Termoforesis. Se muestran los gráficos de fluorescencia en función de la concentración de ligando. Para realizar el análisis se normalizaron las fluorescencias con respecto al valor del capilar con mayor concentración de ligando en función de la concentración de ligando. Estos valores no se ajustan a una curva, son cualitativos. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y las barras de error corresponden a \pm desvío estándar.

ii. Ensayos de Resonancia Plasmónica

En los experimentos con los mAbs anti-NO₂NGF se utilizaron dos estrategias distintas para analizar la unión entre los mAbs con el NO₂-NGF y los mAbs con el NO₂-péptido. Para estudiar la interacción entre los mAbs con el NO₂-NGF se utilizó a éste como ligando, y al anticuerpo como analito. Mientras que para analizar la interacción mAb-NO₂-péptido, el anticuerpo actuó de ligando y el péptido de analito.

En la figura 23 se muestran los sensogramas de cada experimento, donde se grafica la señal SPR en unidades de resonancia (RU, del inglés *Resonance Units*) en función del tiempo, por lo tanto se observa el progreso de la interacción. La concentración del analito fue puesta a punto previamente. A partir de los sensogramas se puede determinar la constante cinética que determina la velocidad de unión del analito con el ligando (K_a , constante de

asociación) y la constante de disociación (K_d) que determina la velocidad de disociación entre ambas moléculas. La primera parte del sensograma, durante la inyección del analito nos brinda información acerca de los fenómenos de asociación y disociación, mientras que en la segunda parte del sensograma, luego de que culmina la inyección de la muestra, aporta información solamente sobre la disociación.

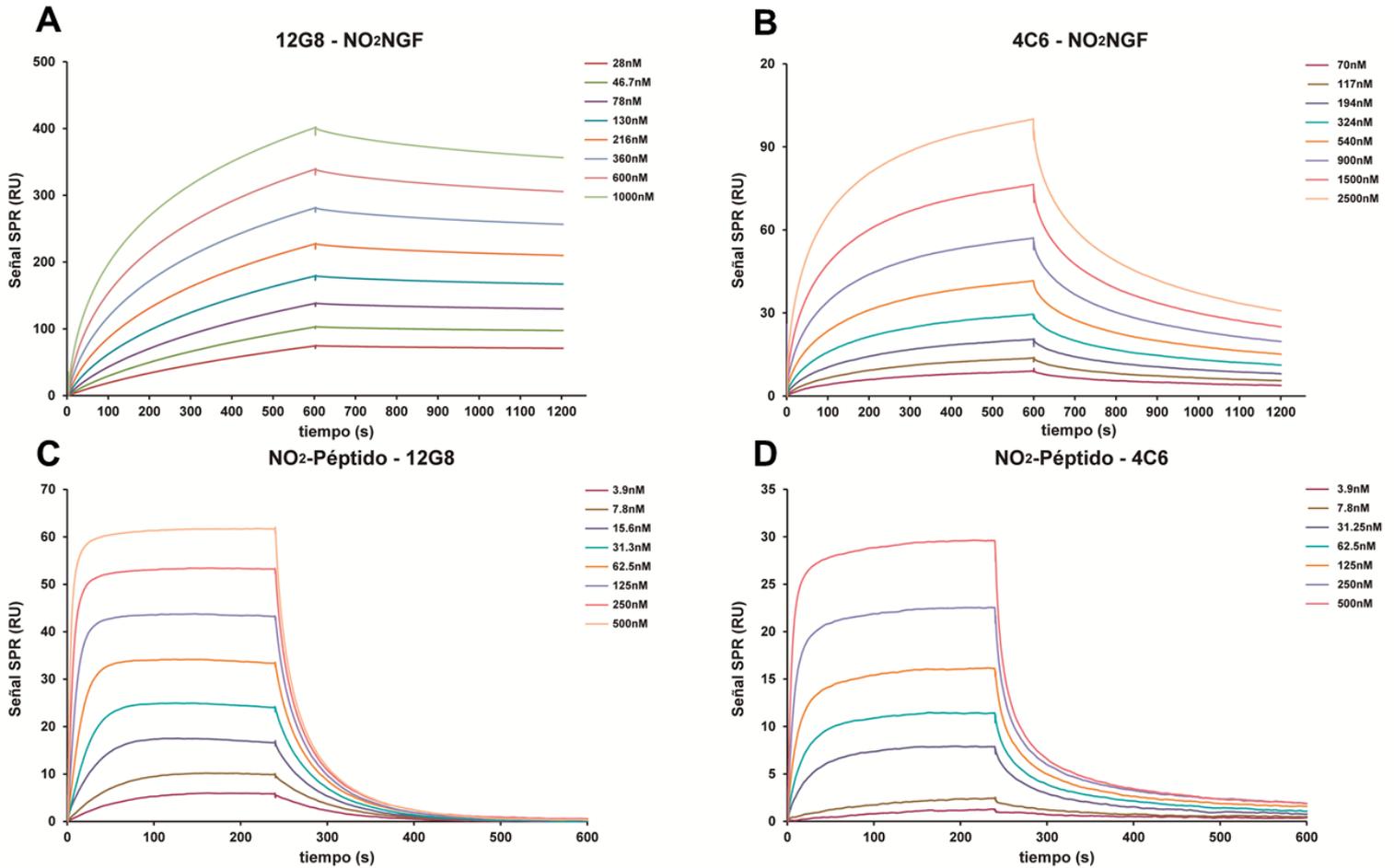


Figura 23. Sensogramas. Se muestra la señal de SPR en unidades de resonancia (RU) en función del tiempo en segundos. (A) Sensograma del mAb 12G8 + NO₂-NGF con concentraciones del anticuerpo desde 28 a 1000 nM; (B) sensograma del mAb 4C6 + NO₂-NGF con concentraciones de anticuerpo desde 70 a 2500 nM; (C) sensograma del NO₂-péptido + 12G8 con concentraciones del péptido desde 3,9 a 500 nM; (D) sensograma del NO₂-péptido + 4C6 con concentraciones del péptido desde 3,9 a 500 nM. A la derecha de cada gráfico se encuentra la referencia de cada corrida, donde las líneas de colores se corresponden con una concentración distinta de analito.

Al desarrollar un anticuerpo con finalidades terapéuticas es de gran relevancia estudiar el valor de K_D , ya que este nos habla del tiempo y la fuerza con que interactúan el anticuerpo y el antígeno. El valor de esta constante se calcula como el cociente entre la constante de disociación y la constante de asociación ($K_D=K_d/K_a$). Lo ideal entonces, es que un anticuerpo tenga grandes valores de K_a y bajos de K_d para obtener un valor de K_D en el orden de concentración pico molar. El valor de K_D se expresa en términos de concentración, y los límites de detección del equipo de Biacore van desde concentraciones picomolar hasta micromolar. Cuanto menor sea el valor de K_D , mejor será la performance de la unión entre el antígeno y el anticuerpo.

La K_D para el mAb 12G8 con el NO_2 -péptido fue de 53 ± 5 nM que en comparación al valor de K_D entre el mAb 4C6 y el NO_2 -péptido 150 ± 24 nM no se observan grandes diferencias en cuanto a que no hay una diferencia en el orden de magnitud. Por otro lado, el tiempo medio de disociación ($t_{1/2}$) fue mayor para el mAb 4C6 (4 minutos) que para el 12G8 (35 segundos) lo cual indica que el 4C6 permanece unido por más tiempo a este antígeno. De todas formas esta diferencia en el $t_{1/2}$ tampoco implica una gran diferencia como para afirmar que el anticuerpo 4C6 posee una mayor afinidad por el péptido que el mAb 12G8.

| Ligando | Analito | K_D | $t_{1/2}$ |
|--------------------|------------------|-------------------------------|-----------|
| IgG12G8 | p- NO_2 | 53 ± 5 nM | 35 s |
| IgG4C6 | p- NO_2 | 150 ± 24 nM | 4 mn |
| NGF- NO_2 | IgG12G8 | 105 ± 18 nM | 3.6 h |
| NGF- NO_2 | IgG4C6 | 1.00 ± 0.14 μM | 10 mn |

Tabla 4. Valores de K_D y $t_{1/2}$ de los mAbs 12G8 y 4C6 con los antígenos NO_2 -NGF y NO_2 -péptido.

Al analizar los valores de K_D obtenidos para la interacción entre los mAbs y el NO_2 -NGF fueron de 105 ± 18 nM para el 12G8, y $1,00 \pm 0,14$ μM para el 4C6. En este caso si se existe una diferencia en el orden de magnitud de los valores

de K_D y estos resultados son coherentes con lo observado en el ELISA de la figura 15, donde se vio que los mAbs 12G8 y 16C6 interactúan con mayor afinidad con el NO_2 -NGF que la familia de mAbs 4C6 y 7G8. Además, al analizar el $t_{1/2}$ de disociación, observamos que para el 12G8 es de 3,6h, mientras que para el 4C6 fue de 10 minutos. Los valores de K_D y de $t_{1/2}$ se pueden ver en la tabla 4.

Estos resultados posicionan al mAb 12G8 como mejor candidato para futuros ensayos inmuno-terapéuticos. Si bien resta analizar la interacción del mAb 16C6 con el antígeno, es de esperar una gran similitud con el 12G8 debido a la alta homología de secuencia entre ambos anticuerpos. Gracias a una colaboración con el Dr. Pedro Alzari, se obtuvieron las estructuras de co-cristalización entre los mAbs y el NO_2 -péptido, y se observó que si bien todos pueden unirse de forma eficaz al péptido, la familia de los mAbs 4C6 y 7G8 no tendría una estructura adecuada en el paratope para unir de forma eficiente a la proteína entera. En cambio, los mAbs 12G8 y 16C6 sí podrían unirse al NO_2 -NGF de forma adecuada, lo cual es coherente con los resultados obtenidos hasta el momento.

Si bien el mAb 12G8 representa el mejor candidato de los cuatro anticuerpos desarrollados debido a su K_D , $t_{1/2}$, y las otras características analizadas previamente, los valores de K_D y $t_{1/2}$ no se comparan con anticuerpos monoclonales anti-NGF como el Tanezumab que tiene un valor de K_D en el orden de concentraciones pico molar y tiempos de disociación de más de 100 horas (Abdiche, Malashock et al. 2008). Por otro lado, estos valores parecen excesivos al inhibir por tiempos prolongados la acción del NGF (Garber 2011). Sería conveniente mejorar la afinidad de los mAbs por el NO_2 -NGF mediante ingeniería genética para aumentar los tiempos de acción. El hecho de bloquear de forma permanente la acción de especies nitradas del NGF no debería generar efectos adversos, ya que los mAbs no eliminarían la acción del NGF sin nitrar.

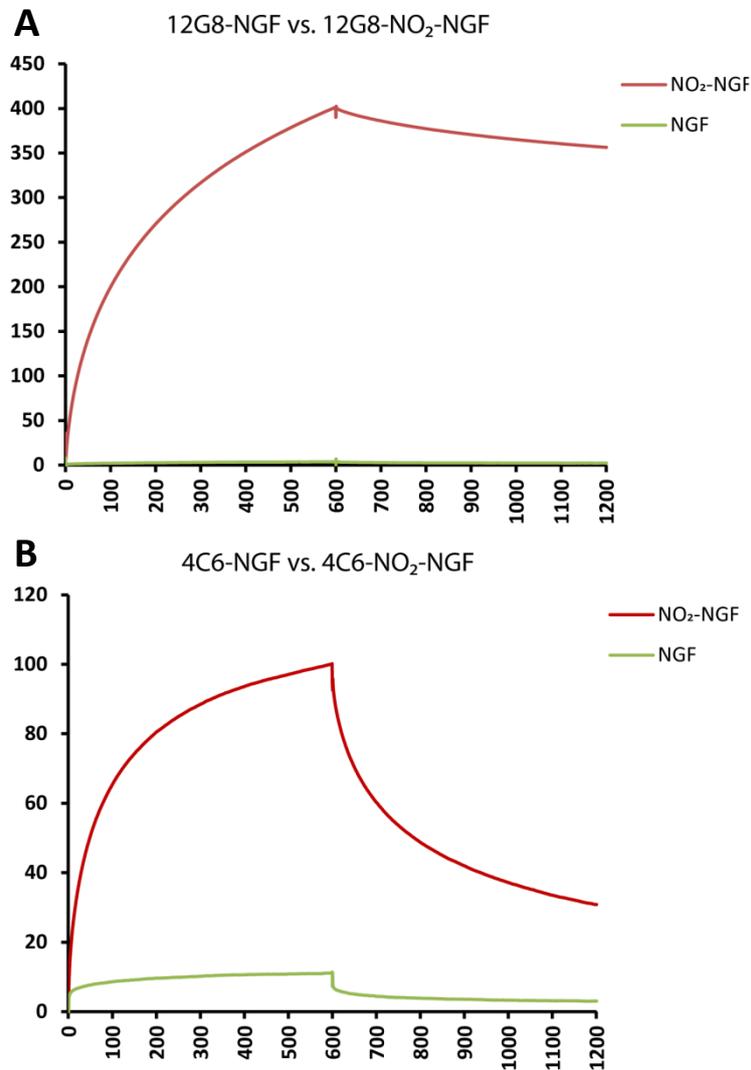


Figura 24. Comparación de sensogramas de los mAbs con NGF vs. NO₂-NGF. Para el análisis se utilizaron los sensogramas correspondientes a la mayor concentración de analito en cada caso. (A) Sensograma comparativo del mAb 12G8 (1000 nM) con el NGF vs. NO₂-NGF; (B) sensograma comparativo del mAb 4C6 (2500 nm) con el NGF vs. NO₂-NGF.

En los estudios de resonancia plasmónica se realizaron también ensayos entre el NGF y los mAbs para comparar la respuesta con respecto al NO₂-NGF [Figura 24]. Al igual que en los experimentos entre NO₂-NGF y los mAbs, el NO₂-NGF fue el ligando y el anticuerpo el analito. Con el fin de comparar la unión a ambas proteínas, se compararon los sensogramas correspondientes a las concentraciones más altas de analito. En el caso del mAb 12G8, el sensograma analizado fue el de 1000 nM y para el 4C6 el de 2500 nM. Al comparar los sensogramas de NGF con los de NO₂-NGF se observa claramente que el mAb 12G8 no interactúa con el NGF, mientras que el 4C6 parecería unirse al NGF aunque muy débilmente.

7. Actividad neutralizante de los anticuerpos monoclonales anti-NO₂-NGF

i. Efecto neutralizante de los mAbs anti-NO₂-NGF en cultivos puros de motoneuronas

En el año 2006 se demostró que las especies nitradas del NGF tienen un efecto tóxico en motoneuronas embrionarias en cultivo (Pehar, Vargas et al. 2006). Dichas células no tienen la capacidad de expresar el receptor TrkA, pero si expresan p75^{NTR}. Debido a que las neuronas del sistema nervioso adulto re-expresan el receptor p75^{NTR} en presencia de daño, estos cultivos constituyen un buen modelo para analizar el comportamiento de las motoneuronas p75^{NTR} positivas.

Para evaluar el efecto neutralizante de los mAbs anti-NO₂-NGF se realizaron cultivos puros de motoneuronas embrionarias (E15) de rata. Las células fueron tratadas con NO₂-NGF recombinante, y con los anticuerpos 4C6, 12G8 y un policlonal anti-NGF para revertir el efecto apoptótico del NO₂-NGF [Figura 25]. Estos resultados indican que los mAbs son capaces de neutralizar la acción del NO₂-NGF en estos cultivos, ya que revierten la muerte de motoneuronas de forma significativa acercándose a valores del control mantenido con GDNF. Sorprendentemente, los mAbs 4C6 y 12G8 mostraron un resultado similar, contrario a lo que se esperaba. En los estudios bioquímicos se vio que el

anticuerpo 12G8 es capaz de unirse al NO₂-NGF de una forma más eficiente que el 4C6. Probablemente, las concentraciones de anticuerpo utilizadas fueron excesivas, si se realizara una curva con concentraciones menores podríamos observar una diferencia entre ambos. Por otro lado, el anticuerpo anti-NGF logró revertir la acción del NO₂-NGF en mayor medida que los mAbs, seguramente porque reconoce varios epítopes dentro del NGF.

La acción de los mAbs en los cultivos de motoneuronas tratados con NO₂-NGF resulta similar a la acción de anticuerpos p75^{NTR} en los mismos cultivos (Pehar, Vargas et al. 2006), lo cual se debe a que los mAbs se unen una región del NO₂-NGF que se sabe que interactúa con el receptor p75^{NTR}, responsable de inducir señales de muerte celular (Eibl, Strasser et al. 2012).

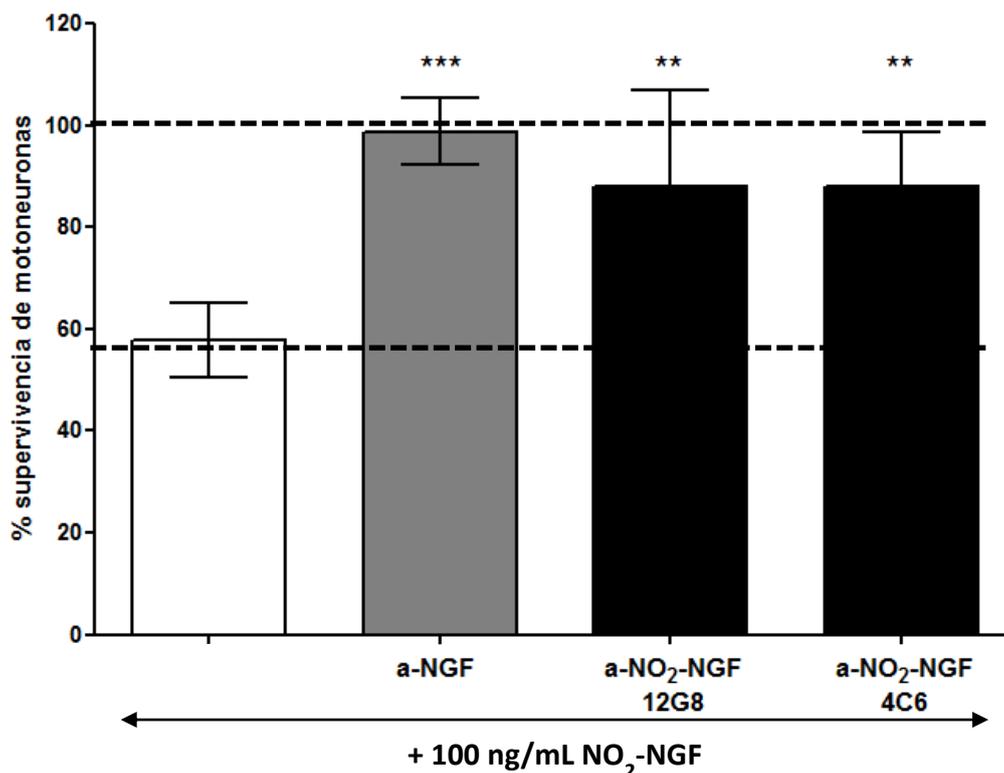


Figura 25. Bloqueo de la actividad de NO₂-NGF por acción de los mAbs 12G8 y 4C6 en cultivos puros de motoneuronas. Los experimentos realizados por cuatuplicado fueron analizados estadísticamente con el test de comparación múltiple de Tukey ANOVA de un factor. La figura muestra como los mAbs 12G8 y 4C6 revierten el efecto del NO₂-NGF en cultivos puros de motoneuronas. Como control se utilizó un anticuerpo policlonal anti-NGF que tiene un efecto similar a los mAbs. La línea punteada superior corresponde a motoneuronas mantenidas con GDNF sin tratamiento (100% de supervivencia). La línea punteada inferior corresponde al efecto apoptótico generado por la sola privación de GDNF.

ii. Bioensayo en cultivo de células PC12

Las células PC12 derivadas de feocromocitoma de la médula adrenal de rata (tumor de la médula suprarrenal de la glándula adrenal) descubierta en 1976 por Greene y Tischler (Greene and Tischler 1976), adoptan un fenotipo neuronal al ser tratadas con NGF durante cinco días. Estas células expresan los receptores TrkA y p75^{NTR} en su superficie celular, que al interactuar con NGF desencadenan cascadas de supervivencia y diferenciación que promueven el crecimiento de neuritas.

En enfermedades neurodegenerativas como la ELA o EA, es imprescindible mantener el soporte trófico proporcionado por el NGF en el sistema nervioso. Por otra parte, los ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales anti-NGF, si bien son efectivos en el bloqueo del dolor, se han observado efectos secundarios no deseados debido posiblemente al bloqueo masivo de su acción. Los mAbs anti-NO₂-NGF deben, por tanto, neutralizar las especies nitradas del NGF sin interferir en el soporte trófico que el NGF brinda, eliminando así su efecto apoptótico. Para estudiar el efecto de los mAbs sobre la actividad trófica del NGF, se realizaron cultivos de células PC12 tratados con NGF y con los mAbs. Como control se utilizó un anticuerpo anti-NGF, demostrando el bloqueo de su actividad sobre estos cultivos.

Los cultivos de células PC12 se realizaron en placas tratadas con colágeno para favorecer el crecimiento neurítico y fueron tratadas con 20 ng/mL de NGF durante cinco días en medio libre de FBS (suero fetal bobino) [Figura 26]. En la parte A de la figura 27 se observa el efecto antes descrito del NGF, donde las células presentan entre 2 y 4 neuritas. Dicho efecto es eliminado, si al mismo tiempo se adiciona un anticuerpo anti-NGF (1µg/mL), observado en el panel B, pero el efecto del NGF se mantiene si las células son tratadas con los mAbs 12G8 y 4C6, partes C y D respectivamente. Esto indicaría que estos anticuerpos monoclonales no interfieren con el efecto trófico del NGF al no bloquear la interacción con sus receptores.

Células PC12 + NGF 20ng/mL

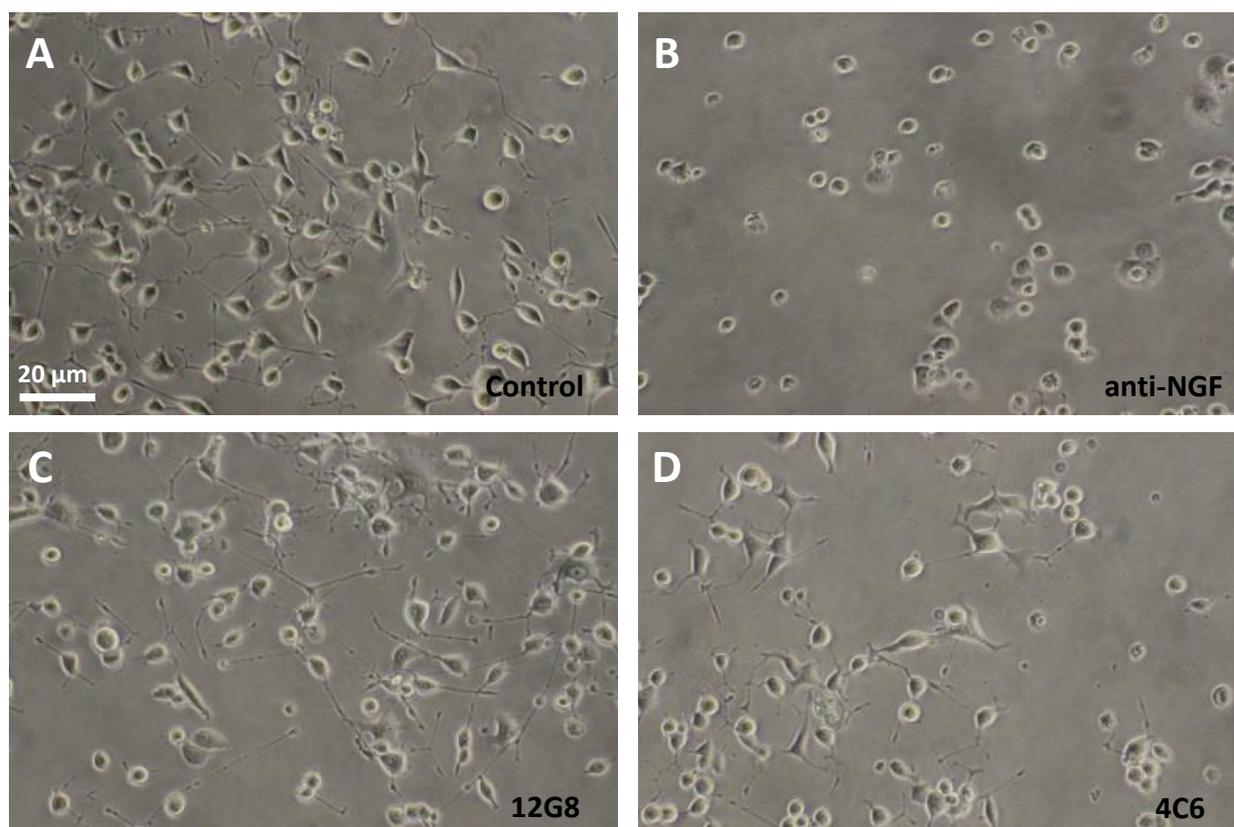


Figura 26. Cultivos de células PC12 tratados con NGF. Las células PC12 fueron tratadas con 20ng/mL de NGF para inducir su diferenciación con crecimiento dendrítico, observado en el panel A. Este efecto es bloqueado con un anticuerpo anti-NGF, panel B. En los paneles C y D se observa que los mAbs 12G8 y 4C6 respectivamente, no bloquean la actividad trófica del NGF al observarse crecimiento dendrítico.

8. Detección de NO₂-NGF en médula espinal de rata hSOD^{G93A} sintomática mediante inmunofluorescencia

Para analizar la presencia de NO₂-NGF en neuroinflamación, se realizó una inmunohistoquímica de médula espinal de rata transgénica hSOD^{G93A} en la fase sintomática tardía de la patología y en la fase asintomática como control [Figura 27]. Además de la marcación con los mAbs 12G8 y 4C6, se marcaron los astrocitos con un anticuerpo anti-GFAP. La proteína GFAP (Proteína Fibrilar Acídica de la Glia), es una de las proteínas fibrosas que se encuentran formando parte de los filamentos intermedios en células gliales como astrocitos y células de Schwann. Debido a la fuerte vinculación de los astrocitos y células

gliales en el desarrollo de la patología (Trias, Ibarburu et al. 2016), resultó interesante analizar una posible co-localización entre las especies nitradas del NGF y dichas células.

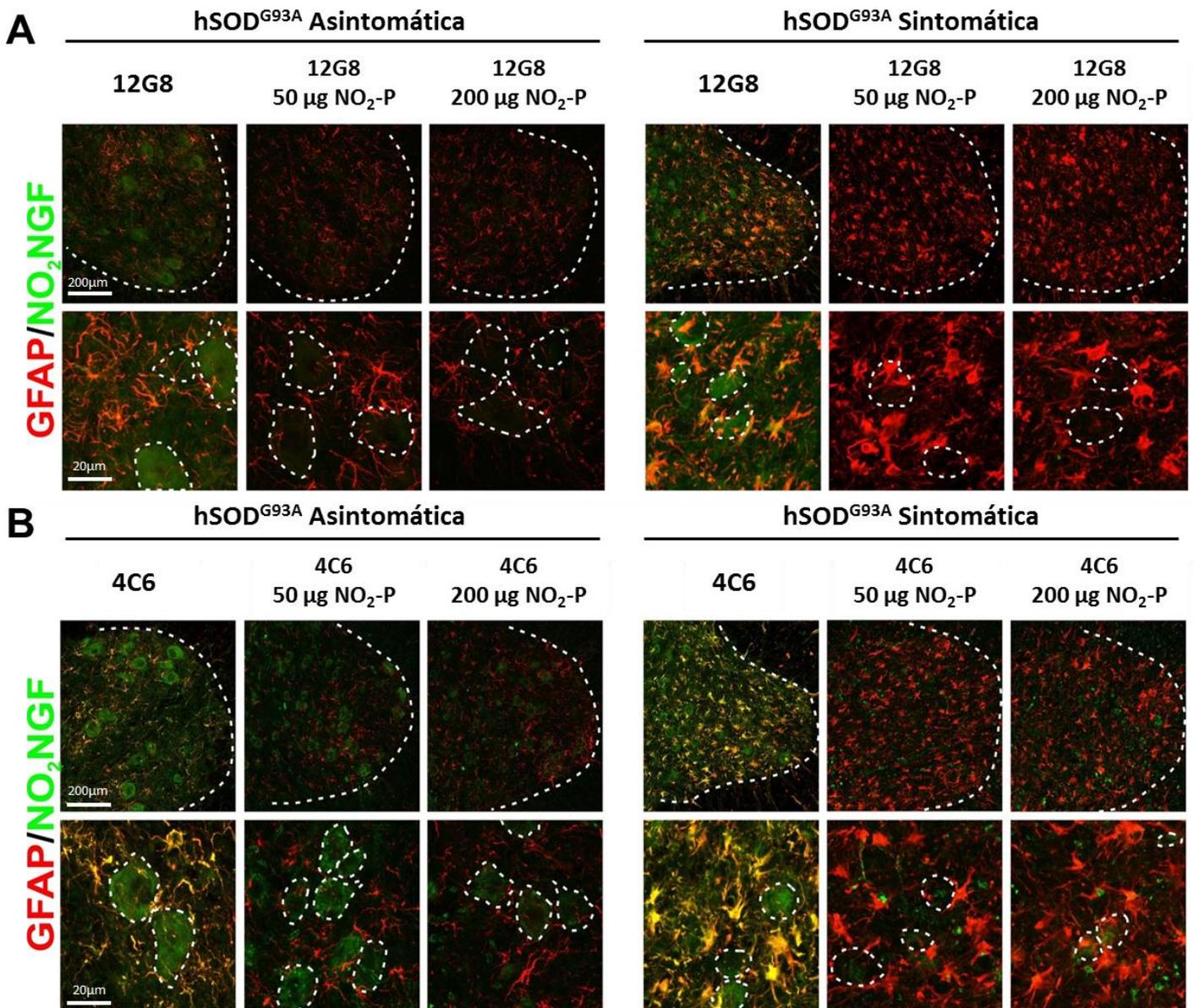


Figura 27. Inmunohistoquímica de fluorescencia de médula espinal de rata transgénica hSOD^{G93A} en la fase Asintomática y Sintomática de la patología. En la parte A se muestra la marcación con el mAb 12G8 y en la parte B con el 4C6. Con una línea punteada blanca se resalta el hasta ventral de la médula espinal y somas de motoneuronas en las imágenes de mayor aumento. En rojo se observa la marcación con GFAP y en verde con los mAbs anti NO₂-NGF 12G8 y 4C6. La incubación de los mAbs con el NO₂-péptido elimina la marcación de NO₂-NGF en el tejido a concentraciones de 50 y 200 µg de NO₂-péptido.

Se observaron diferencias entre las tinciones con los mAbs 12G8 y 4C6, mostrando el 4C6 una marcación más intensa. En particular se observa un marcaje de células GFAP positivas y también una marcación más leve de algunas motoneuronas con los mAbs anti-NO₂-NGF. Para analizar la especificidad del marcaje, se realizó una inmunohistoquímica de competencia con dos concentraciones distintas del NO₂-péptido, 50 y 200µg/mL. La adición de ambas concentraciones de péptido revirtió por completo el marcaje del anticuerpo, lo cual sugiere una unión específica en la médula espinal.

Si bien este resultado indicaría la presencia de NO₂-NGF en médula espinal de rata transgénica hSOD^{G93A} sintomática, se está poniendo a punto un protocolo de inmunoprecipitación con anticuerpos anti-NGF y posterior Western Blot con los mAbs anti- NO₂-NGF para confirmar mediante espectrometría de masas la identidad de esta variante del NGF en dicho tejido.

Resultados preliminares obtenidos recientemente en nuestro laboratorio han demostrado que los mAbs anti-NO₂-NGF son buenos marcadores de la neuroinflamación en ELA. Al analizar médula espinal de ratas hSOD^{G93A} en la fase asintomática de la patología, se observa una disminución en la marcación, la cual se elimina casi por completo en cortes espinales de ratas salvajes. Estos resultados sugieren un aumento del NO₂-NGF a medida que la enfermedad progresa.

DISCUSIÓN Y PERSPECTIVAS

Objetivo 1: Desarrollo y caracterización de anticuerpos monoclonales específicos, determinación de constantes de afinidad y mapeo de los aminoácidos del epítipo que participan en el reconocimiento antígeno-anticuerpo.

Es la primera vez que se desarrolla un anticuerpo monoclonal contra la forma nitrada del NGF. Si bien existen diversos anticuerpos monoclonales desarrollados para el tratamiento de enfermedades osteoarticulares donde los pacientes presentan dolor crónico (Eibl, Strasser et al. 2012), durante los ensayos clínicos se han observado efectos adversos que empeoraron la patología. Al inhibir solo la forma nitrada del NGF se preservaría su función eliminando únicamente la proporción de moléculas que exacerban los procesos inflamatorios.

Para poder desarrollar estos anticuerpos, en primer lugar se sintetizó el NGF humano de forma recombinante para ser utilizado como antígeno. Si bien existe evidencia experimental de su producción en *E. coli* (Rattenholl, Lilie et al. 2001) los protocolos son tediosos y costosos debido a que el proNGF se produce en cuerpos de inclusión y es necesario incluir un paso de renaturalización. Mediante el protocolo reportado por Rattenholl et al. (Rattenholl, Lilie et al. 2001) se logró producir un NGF de calidad que pudo ser utilizado como antígeno a la hora de inmunizar los ratones productores de anticuerpos. De todas formas, los rendimientos de este procedimiento fueron bajos en comparación con lo reportado. Este procedimiento podría ser optimizado si el NGF recombinante se produce de forma soluble en bacterias, lo cual es dificultoso debido a la estructura de nudo de cisteínas. Recientemente se ha desarrollado un protocolo que permite sintetizar al NGF de forma soluble en el espacio periplásmico de *E. coli* cepa BL21 star (DE3) (Gholami Tilko, Hajihassan et al. 2016), ambiente favorable para la formación de puentes disulfuro.

En los primeros intentos de generar anticuerpos monoclonales específicos contra NO₂-NGF los ratones fueron inmunizados con el NGF recombinante nitrado con peroxinitrito. De esta forma se lograron producir mAbs que reconocían tanto al NGF como al NO₂-NGF. Luego de varios intentos, la misma estrategia fue llevada a cabo en la empresa Genscript, donde se obtuvieron mAbs que reconocían de forma específica al NO₂-NGF frente al NGF pero podían unirse también a otras proteínas nitradas. Estos resultados nos llevaron a una segunda estrategia de inmunización con un péptido sintético con la secuencia del NGF que contiene en su parte central a la Tirosina 52 nitrada. Esto nos permitió obtener finalmente mAbs que reconocen específicamente a la variante nitrada frente a la no nitrada y frente a otras proteínas nitradas.

Se lograron producir cuatro mAbs capaces de reconocer al NO₂-NGF de forma específica, lo cual fue analizado mediante ELISA, Western Blot y Dot Blot. Además, se demostró que estos mAbs reconocen también los oligómeros de NO₂-NGF que se forman en el tratamiento de NGF con peroxinitrito. Se ha postulado que especies nitradas de alto peso molecular del NGF podrían potenciar el efecto apoptótico sobre poblaciones de motoneuronas en enfermedades neurodegenerativas como la ELA (Pehar, Vargas et al. 2006), por lo tanto el bloqueo de estas por parte de anticuerpos monoclonales resultaría en un importante efecto terapéutico.

Mediante el análisis de las secuencias aminoacídicas de los mAbs se descubrió que los mAbs 4C6 y 7G8 tienen una identidad del 100%, por lo que realmente se tienen 3 anticuerpos monoclonales distintos contra el NO₂-NGF. Aunque la probabilidad de obtener dos clones que produzcan el mismo anticuerpo es baja, puede haber sucedido que luego de la generación de los hibridomas, dos clones iguales se generaron en pocillos distintos durante el proceso de selección y de esta forma se aislaron como clones diferentes.

Para determinar cuáles aminoácidos del péptido participan en el reconocimiento antígeno-anticuerpo se realizó un escáner de alaninas mediante ELISA. Este análisis podría realizarse también con mutantes de la proteína entera, y de esta forma se podrían determinar todas las regiones

relevantes para la interacción con el NO₂-NGF. Hasta el momento no hemos podido llevar a cabo estos experimentos debido a las dificultades en la expresión del NGF recombinante en *E. coli*. Otros grupos de investigación han desarrollado métodos de expresión de NGF en células eucariotas que les han permitido generar una cantidad de mutantes suficientes como para realizar un escáner de alaninas. Este es el caso del grupo de Cattaneo, el cual desarrolló un anticuerpo monoclonal anti NGF (AD11) y los sitios de interacción con el anticuerpo fueron determinados mediante un escáner de alaninas en el que se utilizaron 44 mutantes del NGF generados en las células COS (Covaceuszach, Cassetta et al. 2008). La expresión en células eucariotas facilita el plegamiento y la formación de estructuras como el nudo de cisteínas. Además, el proceso de purificación es más sencillo partiendo de un producto que se produce de forma soluble y en una correcta conformación.

Mediante una colaboración con el grupo del Dr. Pedro Alzari se realizaron co-cristalizaciones de los mAbs con el péptido nitrado y los resultados mostraron que los mAbs 12G8 y 16C6 pueden acomodar completamente al péptido nitrado, mientras que los mAbs 4C6 y 7G8 no lo hacen tan eficientemente. Además, se corroboraron los residuos relevantes para dicha interacción. Al igual que para el escáner de alaninas, aún resta realizar estudios de co-cristalización entre los mAbs y el NO₂-NGF. Actualmente, en colaboración con el grupo de Pedro Alzari, se está poniendo a punto la expresión de NGF de forma recombinante en cultivos de células eucariotas, con lo que esperamos poder completar estos estudios con la proteína entera.

Para determinar las constantes K_D entre los mAbs y el péptido o la proteína se utilizaron dos abordajes diferentes. Por un lado se realizó la técnica de termoforesis que en nuestro caso arrojó datos meramente cualitativos. No fue posible calcular el valor de K_D , pero los gráficos de intensidad de fluorescencia en función de la concentración de ligando muestran una clara interacción de los mAbs tanto con el NO₂-NGF como con el NO₂-péptido. Estos resultados podrían mejorarse con un NO₂-NGF de mayor calidad, que se mantenga soluble a mayores concentraciones. De esta forma, se podrían incorporar

puntos de mayores concentraciones de NO₂-NGF y disminuir el error en el cálculo de los valores de K_D.

Mediante la técnica de resonancia plasmónica, si se pudieron calcular los valores de K_D para los mAbs 12G8 y 4C6, tanto con el NO₂-péptido como con el NO₂-NGF. Posiblemente, los valores de K_D obtenidos se estén subestimando ya que el tratamiento del NGF con peroxinitrito no alcanza a nitrar el 100% de las moléculas de NGF. Para saber cuánto estamos subestimando este valor podríamos realizar una cuantificación de NO₂-Tyr en la muestra y de esa forma saber de forma precisa que porcentaje de NGF se encuentra nitrado. En la actualidad existen diversos métodos para la cuantificación de NO₂-Tyr (Ana Denicola 2008) que nos permitirían estimar que porcentaje de NGF se encuentra nitrado luego del tratamiento con peroxinitrito.

Si bien el mAb 12G8 es un buen candidato para bloquear la acción de NO₂-NGF in vivo, su valor de K_D correspondiente a la interacción con el antígeno no es suficiente. Es necesario mejorar la afinidad por el antígeno así como la especificidad. Mediante la colaboración que hemos establecido con el laboratorio del Dr. Pedro Alzari en el instituto Pasteur de París, se va a llevar a cabo la mejora de la secuencia del paratope mediante ingeniería genética. Esto se lograría mediante mutagénesis de la secuencia de los mAbs y luego su expresión en sistemas de cultivos celulares eucariotas.

Otra estrategia posible para la producción de anticuerpos contra NO₂-NGF podría ser el desarrollo de un anticuerpo de llama. Estos anticuerpos poseen solo cadenas pesadas, y se ha desarrollado una estrategia mediante *Phage Display* (Smith 1985) que permite seleccionar los genes de los anticuerpos específicos para la proteína de interés. De esta forma, dicho gen luego es clonado dentro de un vector para su expresión en bacterias.

Objetivo 2: Determinar actividad neutralizante específica en cultivos celulares.

En cuanto a la determinación de la actividad neutralizante de los mAbs, se obtuvieron resultados satisfactorios en cultivos primarios de motoneuronas. Los mAbs revirtieron a niveles del control, la muerte provocada por el NO₂-NGF.

Sería interesante en un futuro poder desarrollar un bioensayo para NO₂-NGF con una línea celular como las células NSC34. Cuando estas células se diferencian en motoneuronas constituyen un buen modelo de neurodegeneración (Maier, Bohm et al. 2013).

Otro resultado relevante, es el hecho de que los mAbs anti NO₂-NGF no interfieren con la actividad trófica del NGF en cultivos de células PC12. Esto es de gran relevancia, ya que el objetivo es neutralizar únicamente la actividad de la variante nitrada y de esta forma no interferir con el soporte trófico que el NGF brinda a las distintas poblaciones neuronales. Otro bioensayo clásico en el cuál podría comprobarse esta cualidad de los mAbs sería en cultivos de ganglio dorsal (Zuchero 2014), que al ser tratado con NGF, las neuronas extienden largas neuritas.

Si bien estos resultados son de gran importancia, es necesario probar la acción de los mAbs en un modelo *in vivo* para poner a punto su efecto terapéutico. Uno de los ensayos que se van a realizar es la administración de anticuerpos monoclonales de forma sistémica en ratas hSOD^{G93A} al comienzo de la patología. En primer lugar se analizará el progreso de la patología a nivel tisular y posteriormente ensayos de sobrevivencia para evaluar si los posibles efectos a nivel celular se reflejan en un aumento en la expectativa de vida.

Otros modelos interesantes donde podría probarse el efecto de los mAbs anti NO₂-NGF es en dolor crónico como la osteoartritis. Se han probado diversas moléculas que inhiben al NGF con el fin de disminuir el dolor en esta patología, entre ellas se encuentra el Tanezumab, un anticuerpo monoclonal anti NGF (Eibl, Strasser et al. 2012). El Tanezumab ha alcanzado ensayos clínicos de fase 3, pero los pacientes que fueron tratados con las dosis superiores presentaron efectos adversos por uso excesivo de la articulación y en algunos casos necesitaron transplante. Con los mAbs anti NO₂-NGF buscamos evitar esos efectos adversos ya que no se inhibiría la acción trófica del NGF en el tejido.

Objetivo 3: Uso de los mAbs para detectar NO₂-NGF *in vivo* en un modelo de ELA en ratas transgénicas hSOD^{G93A}.

Finalmente, logramos detectar NO₂-NGF *in vivo* mediante inmunohistoquímica en médula espinal de rata transgénica hSOD^{G93A} en la fase sintomática de la patología. En estos experimentos pudimos determinar que el marcaje de los mAbs era específico, ya que se realizó un ensayo de competición con el NO₂-péptido.

En estos momentos estamos poniendo a punto una técnica mediante inmunoprecipitación y Western Blot que nos permita identificar finalmente por espectrometría de masas la identidad de la proteína a la que se unen los mAbs *in vivo*. Hasta el momento hemos encontrado dificultades ya que el NGF se encuentra en bajas concentraciones en el tejido y aún más bajas son las de NO₂-NGF. Una vez puesto a punto éste método, nuestro objetivo es analizar la presencia de NO₂-NGF en distintos modelos de inflamación y neuroinflamación.

CONCLUSIONES

Se desarrollaron tres anticuerpos monoclonales que reconocen específicamente al NO₂-NGF frente al NGF y a otras proteínas nitradas. Estos anticuerpos se dividen en dos familias, por un lado los mAbs 4C6 y 7G8 que son idénticos en su secuencia aminoacídica y que se unen más débilmente al NO₂-NGF que al NO₂-péptido. En el otro grupo se encuentran los mAbs 12G8 y 16C6 que poseen dos aminoácidos diferentes en las cercanías del CDR2 tanto en la cadena liviana como en la pesada. Este último grupo se une más fuertemente a la proteína entera que el grupo del 4C6 y 7G8 según el análisis por ELISA. Además se observó mediante el escáner de alaninas que en interacción de estos mAbs con el antígeno participan una mayor cantidad de aminoácidos en comparación al otro grupo. Los estudios de Termoforesis y Biacore permitieron estudiar los procesos de asociación y disociación de los mAbs tanto con el NO₂-NGF como con el NO₂-péptido. Estos estudios demostraron que el mAb 12G8 sería el mejor candidato para la neutralización del NO₂-NGF in vivo debido a su valor de KD y al alto valor del t ½ de disociación antígeno-anticuerpo.

Un ensayo con motoneuronas en cultivo demostró el efecto neutralizante de los mAbs al revertir casi por completo el efecto apoptótico que el NO₂-NGF tiene sobre éstas células. Además, un inmunoensayo con células PC12 en cultivo demostró que los mAbs no poseen un efecto bloqueante de la actividad trófica del NGF, por lo que los efectos secundarios no deseados serían hipotéticamente nulos o mínimos, a diferencia de lo que ocurre en inmunoterapias con anticuerpos monoclonales anti-NGF.

Mediante inmunohistoquímica de secciones de médula espinal de rata transgénica hSOD^{G93A} en la etapa final de la enfermedad, se observó que los mAbs son capaces de reconocer de forma específica las especies nitradas del NGF presentes en el tejido con neuroinflamación.

Estos resultados posicionan a los mAbs anti-NO₂-NGF como posibles biomarcadores de neurodegeneración con posible uso diagnóstico y terapéutico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdiche, Y. N., D. S. Malashock and J. Pons (2008). "Probing the binding mechanism and affinity of tanezumab, a recombinant humanized anti-NGF monoclonal antibody, using a repertoire of biosensors." Protein Sci **17**(8): 1326-1335.
- Abe, K., L. H. Pan, M. Watanabe, H. Konno, T. Kato and Y. Itoyama (1997). "Upregulation of protein-tyrosine nitration in the anterior horn cells of amyotrophic lateral sclerosis." Neurol Res **19**(2): 124-128.
- Aloe, L., L. Bracci-Laudiero, S. Bonini and L. Manni (1997). "The expanding role of nerve growth factor: from neurotrophic activity to immunologic diseases." Allergy **52**(9): 883-894.
- Aloe, L., A. Micera, L. Bracci-Laudiero, E. Vigneti and P. Turrini (1997). "Presence of nerve growth factor in the thymus of prenatal, postnatal and pregnant rats." Thymus **24**(4): 221-231.
- Aloe, L., S. D. Skaper, A. Leon and R. Levi-Montalcini (1994). "Nerve growth factor and autoimmune diseases." Autoimmunity **19**(2): 141-150.
- Ana Denicola, B. A., Leonor Thomson (2008). "3-Nitrotyrosine, a post-translational modification associated with nitroxidative stress." Free Radical Pathophysiology.
- Angeletti, R. H. and R. A. Bradshaw (1971). "Nerve growth factor from mouse submaxillary gland: amino acid sequence." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(10): 2417-2420.
- Barbeito, L. H., M. Pehar, P. Cassina, M. R. Vargas, H. Peluffo, L. Viera, A. G. Estevez and J. S. Beckman (2004). "A role for astrocytes in motor neuron loss in amyotrophic lateral sclerosis." Brain Res Brain Res Rev **47**(1-3): 263-274.
- Barde, Y. A. (1989). "Trophic factors and neuronal survival." Neuron **2**(6): 1525-1534.
- Barker, P. A. (1998). "p75^{NTR}: A study in contrasts." Cell Death Differ **5**(5): 346-356.
- Barrett, G. L. (2000). "The p75 neurotrophin receptor and neuronal apoptosis." Prog Neurobiol **61**(2): 205-229.
- Beattie, M. S., A. W. Harrington, R. Lee, J. Y. Kim, S. L. Boyce, F. M. Longo, J. C. Bresnahan, B. L. Hempstead and S. O. Yoon (2002). "ProNGF induces p75-mediated death of oligodendrocytes following spinal cord injury." Neuron **36**(3): 375-386.
- Beckman, J. S. and W. H. Koppenol (1996). "Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly." Am J Physiol **271**(5 Pt 1): C1424-1437.
- Bocchini, V. and P. U. Angeletti (1969). "The nerve growth factor: purification as a 30,000-molecular-weight protein." Proc Natl Acad Sci U S A **64**(2): 787-794.

- Bracci-Laudiero, L. and M. E. De Stefano (2016). "NGF in Early Embryogenesis, Differentiation, and Pathology in the Nervous and Immune Systems." Curr Top Behav Neurosci **29**: 125-152.
- Bradford, H. F., J. Zhou, B. Pliego-Rivero, G. M. Stern and E. Jauniaux (1999). "Neurotrophins in the pathogenesis and potential treatment of Parkinson's disease." Adv Neurol **80**: 19-25.
- Bradshaw, R. A., J. Murray-Rust, C. F. Ibanez, N. Q. McDonald, R. Lapatto and T. L. Blundell (1994). "Nerve growth factor: structure/function relationships." Protein Sci **3**(11): 1901-1913.
- Bruno, M. A., W. C. Leon, G. Fragoso, W. E. Mushynski, G. Almazan and A. C. Cuello (2009). "Amyloid beta-induced nerve growth factor dysmetabolism in Alzheimer disease." J Neuropathol Exp Neurol **68**(8): 857-869.
- Cassina, P., M. Pehar, M. R. Vargas, R. Castellanos, A. G. Barbeito, A. G. Estevez, J. A. Thompson, J. S. Beckman and L. Barbeito (2005). "Astrocyte activation by fibroblast growth factor-1 and motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis." J Neurochem **93**(1): 38-46.
- Cattaneo, A. (2010). "Tanezumab, a recombinant humanized mAb against nerve growth factor for the treatment of acute and chronic pain." Curr Opin Mol Ther **12**(1): 94-106.
- Cattaneo, A., B. Rapposelli and P. Calissano (1988). "Three distinct types of monoclonal antibodies after long-term immunization of rats with mouse nerve growth factor." J Neurochem **50**(4): 1003-1010.
- Ciriaco, E., C. Dall'Aglio, J. Hannestad, J. J. Huerta, R. Laura, G. Germana and J. A. Vega (1996). "Localization of Trk neurotrophin receptor-like proteins in avian primary lymphoid organs (thymus and bursa of Fabricius)." J Neuroimmunol **69**(1-2): 73-83.
- Connor, B. and M. Dragunow (1998). "The role of neuronal growth factors in neurodegenerative disorders of the human brain." Brain Res Brain Res Rev **27**(1): 1-39.
- Copray, J. C., D. Jaarsma, B. M. Kust, R. W. Bruggeman, I. Mantingh, N. Brouwer and H. W. Boddeke (2003). "Expression of the low affinity neurotrophin receptor p75 in spinal motoneurons in a transgenic mouse model for amyotrophic lateral sclerosis." Neuroscience **116**(3): 685-694.
- Covaceuszach, S., A. Cassetta, P. V. Konarev, S. Gonfloni, R. Rudolph, D. I. Svergun, D. Lamba and A. Cattaneo (2008). "Dissecting NGF interactions with TrkA and p75 receptors by structural and functional studies of an anti-NGF neutralizing antibody." J Mol Biol **381**(4): 881-896.
- Covaceuszach, S., S. Marinelli, I. Krastanova, G. Ugolini, F. Pavone, D. Lamba and A. Cattaneo (2012). "Single cycle structure-based humanization of an anti-nerve growth factor therapeutic antibody." PLoS One **7**(3): e32212.
- Chao, M. V. (2003). "Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways." Nat Rev Neurosci **4**(4): 299-309.

- Daiber, A., S. Daub, M. Bachschmid, S. Schildknecht, M. Oelze, S. Steven, P. Schmidt, A. Megner, M. Wada, T. Tanabe, T. Munzel, S. Bottari and V. Ullrich (2013). "Protein tyrosine nitration and thiol oxidation by peroxynitrite-strategies to prevent these oxidative modifications." Int J Mol Sci **14**(4): 7542-7570.
- Domeniconi, M., B. L. Hempstead and M. V. Chao (2007). "Pro-NGF secreted by astrocytes promotes motor neuron cell death." Mol Cell Neurosci **34**(2): 271-279.
- Dray, A. (2008). "Neuropathic pain: emerging treatments." Br J Anaesth **101**(1): 48-58.
- Eibl, J. K., B. C. Strasser and G. M. Ross (2012). "Structural, biological, and pharmacological strategies for the inhibition of nerve growth factor." Neurochem Int **61**(8): 1266-1275.
- Elenkov, I. J., R. L. Wilder, G. P. Chrousos and E. S. Vizi (2000). "The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system." Pharmacol Rev **52**(4): 595-638.
- Estevez, A. G., N. Spear, S. M. Manuel, R. Radi, C. E. Henderson, L. Barbeito and J. S. Beckman (1998). "Nitric oxide and superoxide contribute to motor neuron apoptosis induced by trophic factor deprivation." J Neurosci **18**(3): 923-931.
- Fahnestock, M., B. Michalski, B. Xu and M. D. Coughlin (2001). "The precursor pro-nerve growth factor is the predominant form of nerve growth factor in brain and is increased in Alzheimer's disease." Mol Cell Neurosci **18**(2): 210-220.
- Fahnestock, M., G. Yu and M. D. Coughlin (2004). "ProNGF: a neurotrophic or an apoptotic molecule?" Prog Brain Res **146**: 101-110.
- Fahnestock, M., G. Yu, B. Michalski, S. Mathew, A. Colquhoun, G. M. Ross and M. D. Coughlin (2004). "The nerve growth factor precursor proNGF exhibits neurotrophic activity but is less active than mature nerve growth factor." J Neurochem **89**(3): 581-592.
- Fiore, M., G. N. Chaldakov and L. Aloe (2009). "Nerve growth factor as a signaling molecule for nerve cells and also for the neuroendocrine-immune systems." Rev Neurosci **20**(2): 133-145.
- Frade, J. M. and Y. A. Barde (1998). "Nerve growth factor: two receptors, multiple functions." Bioessays **20**(2): 137-145.
- Franco, M. C., Y. Ye, C. A. Refakis, J. L. Feldman, A. L. Stokes, M. Basso, R. M. Melero Fernandez de Mera, N. A. Sparrow, N. Y. Calingasan, M. Kiaei, T. W. Rhoads, T. C. Ma, M. Grumet, S. Barnes, M. F. Beal, J. S. Beckman, R. Mehl and A. G. Estevez (2013). "Nitration of Hsp90 induces cell death." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(12): E1102-1111.
- Freund, V. and N. Frossard (2004). "[Nerve growth factor (NGF) in inflammation and asthma]." Rev Mal Respir **21**(2 Pt 1): 328-342.
- Garber, K. (2011). "Fate of novel painkiller mAbs hangs in balance." Nat Biotechnol **29**(3): 173-174.

- Gholami Tilko, P., Z. Hajihassan and H. Moghimi (2016). "Optimization of recombinant beta-NGF expression in Escherichia coli using response surface methodology." Prep Biochem Biotechnol: 1-8.
- Greene, L. A., J. M. Aletta, A. Rukenstein and S. H. Green (1987). "PC12 pheochromocytoma cells: culture, nerve growth factor treatment, and experimental exploitation." Methods Enzymol **147**: 207-216.
- Greene, L. A. and A. S. Tischler (1976). "Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(7): 2424-2428.
- Gurney, M. E., H. Pu, A. Y. Chiu, M. C. Dal Canto, C. Y. Polchow, D. D. Alexander, J. Caliendo, A. Hentati, Y. W. Kwon, H. X. Deng and et al. (1994). "Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation." Science **264**(5166): 1772-1775.
- Hallbook, F. (1999). "Evolution of the vertebrate neurotrophin and Trk receptor gene families." Curr Opin Neurobiol **9**(5): 616-621.
- Harrington, A. W., B. Leiner, C. Blechschmitt, J. C. Arevalo, R. Lee, K. Morl, M. Meyer, B. L. Hempstead, S. O. Yoon and K. M. Giehl (2004). "Secreted proNGF is a pathophysiological death-inducing ligand after adult CNS injury." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(16): 6226-6230.
- He, X. L. and K. C. Garcia (2004). "Structure of nerve growth factor complexed with the shared neurotrophin receptor p75." Science **304**(5672): 870-875.
- Hefti, F. F., A. Rosenthal, P. A. Walicke, S. Wyatt, G. Vergara, D. L. Shelton and A. M. Davies (2006). "Novel class of pain drugs based on antagonism of NGF." Trends Pharmacol Sci **27**(2): 85-91.
- Henkel, J. S., D. R. Beers, W. Zhao and S. H. Appel (2009). "Microglia in ALS: the good, the bad, and the resting." J Neuroimmune Pharmacol **4**(4): 389-398.
- Hoffman, E. M., Z. Zhang, M. B. Anderson, R. Schechter and K. E. Miller (2011). "Potential mechanisms for hypoalgesia induced by anti-nerve growth factor immunoglobulin are identified using autoimmune nerve growth factor deprivation." Neuroscience **193**: 452-465.
- Howland, D. S., J. Liu, Y. She, B. Goad, N. J. Maragakis, B. Kim, J. Erickson, J. Kulik, L. DeVito, G. Psaltis, L. J. DeGennaro, D. W. Cleveland and J. D. Rothstein (2002). "Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS)." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(3): 1604-1609.
- Huang, E. J. and L. F. Reichardt (2003). "Trk receptors: roles in neuronal signal transduction." Annu Rev Biochem **72**: 609-642.
- Ibanez, C. F., F. Hallbook, T. Ebendal and H. Persson (1990). "Structure-function studies of nerve growth factor: functional importance of highly conserved amino acid residues." EMBO J **9**(5): 1477-1483.
- Ilieva, H., M. Polymenidou and D. W. Cleveland (2009). "Non-cell autonomous toxicity in neurodegenerative disorders: ALS and beyond." J Cell Biol **187**(6): 761-772.

- Ischiropoulos, H. and J. S. Beckman (2003). "Oxidative stress and nitration in neurodegeneration: cause, effect, or association?" J Clin Invest **111**(2): 163-169.
- Kliemann, M., R. Golbik, R. Rudolph, E. Schwarz and H. Lilie (2007). "The pro-peptide of proNGF: structure formation and intramolecular association with NGF." Protein Sci **16**(3): 411-419.
- Kolbeck, R., S. Jungbluth and Y. A. Barde (1994). "Characterisation of neurotrophin dimers and monomers." Eur J Biochem **225**(3): 995-1003.
- Korsching, S., G. Auburger, R. Heumann, J. Scott and H. Thoenen (1985). "Levels of nerve growth factor and its mRNA in the central nervous system of the rat correlate with cholinergic innervation." EMBO J **4**(6): 1389-1393.
- Lane, N. E., T. J. Schnitzer, C. A. Birbara, M. Mokhtarani, D. L. Shelton, M. D. Smith and M. T. Brown (2010). "Tanezumab for the treatment of pain from osteoarthritis of the knee." N Engl J Med **363**(16): 1521-1531.
- Lee, H. W., Y. J. Na, P. K. Jung, M. N. Kim, S. M. Kim, J. S. Chung, B. S. Kim, J. B. Kim, J. O. Moon and S. Yoon (2008). "Nerve growth factor stimulates proliferation, adhesion and thymopoietic cytokine expression in mouse thymic epithelial cells in vitro." Regul Pept **147**(1-3): 72-81.
- Lee, R., P. Kermani, K. K. Teng and B. L. Hempstead (2001). "Regulation of cell survival by secreted proneurotrophins." Science **294**(5548): 1945-1948.
- Lessmann, V., K. Gottmann and M. Malcangio (2003). "Neurotrophin secretion: current facts and future prospects." Prog Neurobiol **69**(5): 341-374.
- Levi-Montalcini, R. (1987). "The nerve growth factor 35 years later." Science **237**(4819): 1154-1162.
- Levi-Montalcini, R. and R. Amprino (1947). "[Not Available]." Arch Biol (Liege) **58**(3): 265-288.
- Liepinsh, E., L. L. Ilag, G. Otting and C. F. Ibanez (1997). "NMR structure of the death domain of the p75 neurotrophin receptor." EMBO J **16**(16): 4999-5005.
- Lord, S. R., J. Dayhew and A. Howland (2002). "Multifocal glasses impair edge-contrast sensitivity and depth perception and increase the risk of falls in older people." J Am Geriatr Soc **50**(11): 1760-1766.
- Lowry, K. S., S. S. Murray, C. A. McLean, P. Talman, S. Mathers, E. C. Lopes and S. S. Cheema (2001). "A potential role for the p75 low-affinity neurotrophin receptor in spinal motor neuron degeneration in murine and human amyotrophic lateral sclerosis." Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord **2**(3): 127-134.
- Lu, B., P. T. Pang and N. H. Woo (2005). "The yin and yang of neurotrophin action." Nat Rev Neurosci **6**(8): 603-614.
- Maccioni, R. B., J. P. Munoz and L. Barbeito (2001). "The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders." Arch Med Res **32**(5): 367-381.
- Madden, K. S. and D. L. Felten (1995). "Experimental basis for neural-immune interactions." Physiol Rev **75**(1): 77-106.

- Maier, O., J. Bohm, M. Dahm, S. Bruck, C. Beyer and S. Johann (2013). "Differentiated NSC-34 motoneuron-like cells as experimental model for cholinergic neurodegeneration." Neurochem Int **62**(8): 1029-1038.
- McDonald, N. Q., R. Lapatto, J. Murray-Rust, J. Gunning, A. Wlodawer and T. L. Blundell (1991). New protein fold revealed by a 2.3-A resolution crystal structure of nerve growth factor. Nature. **354**: 411-414.
- McDonald, N. Q., R. Lapatto, J. Murray-Rust, J. Gunning, A. Wlodawer and T. L. Blundell (1991). "New protein fold revealed by a 2.3-A resolution crystal structure of nerve growth factor." Nature **354**(6352): 411-414.
- McKay, S. E., A. L. Purcell and T. J. Carew (1999). "Regulation of synaptic function by neurotrophic factors in vertebrates and invertebrates: implications for development and learning." Learn Mem **6**(3): 193-215.
- Mitchell, J. D. and G. D. Borasio (2007). "Amyotrophic lateral sclerosis." Lancet **369**(9578): 2031-2041.
- Neumann, H., J. L. Hazen, J. Weinstein, R. A. Mehl and J. W. Chin (2008). "Genetically encoding protein oxidative damage." J Am Chem Soc **130**(12): 4028-4033.
- Nilsson, A. S., M. Fainzilber, P. Falck and C. F. Ibanez (1998). "Neurotrophin-7: a novel member of the neurotrophin family from the zebrafish." FEBS Lett **424**(3): 285-290.
- Nykjaer, A., R. Lee, K. K. Teng, P. Jansen, P. Madsen, M. S. Nielsen, C. Jacobsen, M. Kliemannel, E. Schwarz, T. E. Willnow, B. L. Hempstead and C. M. Petersen (2004). "Sortilin is essential for proNGF-induced neuronal cell death." Nature **427**(6977): 843-848.
- Pacher, P., J. S. Beckman and L. Liaudet (2007). "Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease." Physiol Rev **87**(1): 315-424.
- Pehar, M., P. Cassina, M. R. Vargas, R. Castellanos, L. Viera, J. S. Beckman, A. G. Estevez and L. Barbeito (2004). "Astrocytic production of nerve growth factor in motor neuron apoptosis: implications for amyotrophic lateral sclerosis." J Neurochem **89**(2): 464-473.
- Pehar, M., P. Cassina, M. R. Vargas, Y. Xie, J. S. Beckman, S. M. Massa, F. M. Longo and L. Barbeito (2006). "Modulation of p75-dependent motor neuron death by a small non-peptidyl mimetic of the neurotrophin loop 1 domain." Eur J Neurosci **24**(6): 1575-1580.
- Pehar, M., M. R. Vargas, K. M. Robinson, P. Cassina, P. England, J. S. Beckman, P. M. Alzari and L. Barbeito (2006). "Peroxyntirite transforms nerve growth factor into an apoptotic factor for motor neurons." Free Radic Biol Med **41**(11): 1632-1644.
- Peluffo, H., J. J. Shacka, K. Ricart, C. G. Bisig, L. Martinez-Palma, O. Pritsch, A. Kamaid, J. P. Eiserich, J. P. Crow, L. Barbeito and A. G. Estevez (2004). "Induction of motor neuron apoptosis by free 3-nitro-L-tyrosine." J Neurochem **89**(3): 602-612.

- Pezet, S. and S. B. McMahon (2006). "Neurotrophins: mediators and modulators of pain." Annu Rev Neurosci **29**: 507-538.
- Radi, R. (2004). "Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(12): 4003-4008.
- Radi, R., G. Peluffo, M. N. Alvarez, M. Naviliat and A. Cayota (2001). "Unraveling peroxynitrite formation in biological systems." Free Radic Biol Med **30**(5): 463-488.
- Rattenholl, A., H. Lilie, A. Grossmann, A. Stern, E. Schwarz and R. Rudolph (2001). "The pro-sequence facilitates folding of human nerve growth factor from Escherichia coli inclusion bodies." Eur J Biochem **268**(11): 3296-3303.
- Reichardt, L. F. (2006). "Neurotrophin-regulated signalling pathways." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **361**(1473): 1545-1564.
- Rende, M., I. Giambanco, M. Buratta and P. Tonali (1995). "Axotomy induces a different modulation of both low-affinity nerve growth factor receptor and choline acetyltransferase between adult rat spinal and brainstem motoneurons." J Comp Neurol **363**(2): 249-263.
- Rezaee, F., S. L. Rellick, G. Piedimonte, S. M. Akers, H. A. O'Leary, K. Martin, M. D. Craig and L. F. Gibson (2010). "Neurotrophins regulate bone marrow stromal cell IL-6 expression through the MAPK pathway." PLoS One **5**(3): e9690.
- Richter, M., R. Hoffmann and D. Singer (2013). "T-cell epitope-dependent immune response in inbred (C57BL/6J, SJL/J, and C3H/HeN) and transgenic P301S and Tg2576 mice." J Pept Sci **19**(7): 441-451.
- Ripps, M. E., G. W. Huntley, P. R. Hof, J. H. Morrison and J. W. Gordon (1995). "Transgenic mice expressing an altered murine superoxide dismutase gene provide an animal model of amyotrophic lateral sclerosis." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(3): 689-693.
- Saito, A., H. Okano, H. Bamba, Y. Hisa, Y. Oomura, T. Imamura and I. Tooyama (2007). "Low expression of FGF1 (fibroblast growth factor-1) in rat parasympathetic preganglionic neurons." Histol Histopathol **22**(12): 1327-1335.
- Seeburger, J. L., S. Tarras, H. Natter and J. E. Springer (1993). "Spinal cord motoneurons express p75NGFR and p145trkB mRNA in amyotrophic lateral sclerosis." Brain Res **621**(1): 111-115.
- Shu, Y. H., X. M. Lu, J. X. Wei, L. Xiao and Y. T. Wang (2015). "Update on the role of p75NTR in neurological disorders: A novel therapeutic target." Biomed Pharmacother **76**: 17-23.
- Siegel, G. J. and N. B. Chauhan (2000). "Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain." Brain Res Brain Res Rev **33**(2-3): 199-227.
- Smith, G. P. (1985). "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface." Science **228**(4705): 1315-1317.
- Trias, E., P. Diaz-Amarilla, S. Olivera-Bravo, E. Isasi, D. A. Drechsel, N. Lopez, C. S. Bradford, K. E. Ireton, J. S. Beckman and L. Barbeito (2013). "Phenotypic

transition of microglia into astrocyte-like cells associated with disease onset in a model of inherited ALS." Front Cell Neurosci **7**: 274.

Trias, E., S. Ibarburu, R. Barreto-Nunez and L. Barbeito (2016). "Significance of aberrant glial cell phenotypes in pathophysiology of amyotrophic lateral sclerosis." Neurosci Lett.

Vargas, M. R., M. Pehar, P. Cassina, A. G. Estevez, J. S. Beckman and L. Barbeito (2004). "Stimulation of nerve growth factor expression in astrocytes by peroxynitrite." In Vivo **18**(3): 269-274.

Viera, L., M. Radmilovich, M. R. Vargas, C. N. Dennys, L. Wilson, S. Barnes, M. C. Franco, J. S. Beckman and A. G. Estevez (2013). "Temporal patterns of tyrosine nitration in embryo heart development." Free Radic Biol Med **55**: 101-108.

Watson, J. J., S. J. Allen and D. Dawbarn (2008). "Targeting nerve growth factor in pain: what is the therapeutic potential?" BioDrugs **22**(6): 349-359.

Wiesmann, C. and A. M. de Vos (2001). "Nerve growth factor: structure and function." Cell Mol Life Sci **58**(5-6): 748-759.

Yoshida, K. and F. H. Gage (1991). "Fibroblast growth factors stimulate nerve growth factor synthesis and secretion by astrocytes." Brain Res **538**(1): 118-126.

Zuchero, J. B. (2014). "Purification and culture of dorsal root ganglion neurons." Cold Spring Harb Protoc **2014**(8): 813-814.