

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



**HACIA LA BÚSQUEDA DE MOLÉCULAS CON CAPACIDAD
ANTIAGREGANTE DE PROTEÍNA TAU: IMPLICACIONES EN EL
TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado académico de
Magíster en Bioquímica, área de especialización en Bioquímica de Proteínas
y Biotecnología, y Memoria para optar al título profesional de Bioquímico**

Por

JOSÉ MANUEL JIMÉNEZ RUBILAR

Director de Tesis

Dr. Ricardo B. Maccioni

**SANTIAGO, CHILE
2011**

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato:

JOSÉ MANUEL JIMÉNEZ RUBILAR

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, área de especialización Bioquímica de Proteínas y Biotecnología, y al título de Bioquímico, en el examen de defensa de Tesis rendido el día _____ de 2011.

Director de Tesis:

Dr. Ricardo B. Maccioni

Comisión Informante de Tesis:

Dra. María A. Valenzuela (Presidenta)

Dra. Ana M. Kettlún

Dra. Alejandra Álvarez

A mi padre...

"Solo con una ardiente paciencia conquistaremos la espléndida ciudad que dará luz, justicia y dignidad a todos los hombres. Así la poesía no habrá cantado en vano"

(Pablo Neruda)

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis se desarrolló en el Laboratorio de Biología Celular, Molecular y Neurociencias, de la facultad de Ciencias de la Universidad de Chile gracias al financiamiento de los proyectos Fondecyt 1110373, Fondecyt 1080254 y Corfo 10 ANT 8051.

Quiero agradecer a mi tutor de tesis, Dr. Ricardo B. Maccioni por permitirme trabajar en su laboratorio y enseñarme lo que significa hacer ciencia en un país llamado Chile pensando siempre en lo más alto. Además de confiar en mis capacidades y apoyarme todas la veces que fue necesario.

Agradecer al Dr. Alberto Cornejo, quien me orientó y trabajó conmigo en el desarrollo de esta tesis. Sin su ayuda y paciencia este trabajo no hubiera sido posible. Además agradecer sus consejos para mejorar mi forma de trabajo.

Agradecer a todos los miembros del Laboratorio de Biología Celular, Molecular y Neurociencias: Inelia Morales, Henriett Pal, Carlos Carrasco, el Dr. Gonzalo Farías, Leonardo Guzmán, Andreas Tapia; por ayudarme siempre que los requerí y hacer que el laboratorio se transforme en el *best place to work* por su gratísima compañía y humanidad. Agradecer también a los *Former Lab Members* Patricio Pérez, Leonardo Navarrete y el Dr. Leonel Rojo.

Agradecer a los miembros de la facultad de Ciencias que contribuyeron al desarrollo de esta tesis, partiendo por los funcionarios, la Sra. Margarita, Carlos y Juan Carlos. También a los Laboratorios de Biología del Envejecimiento, de Bioquímica y de Dinámica Celular y Neuronal, en especial a la vecina Cristina, por todas las facilidades para ocupar los equipos que disponían.

También agradecer al Dr. Francisco Melo de la Universidad de Santiago por permitimos colaborar con su laboratorio y hacer uso del equipo de microscopia de fuerza atómica. Más aún, al Dr. Leonardo Caballero por la paciencia para iniciar los estudios con tau y ayudarnos en el desarrollo experimental e interpretar los datos, así como ayudarnos siempre con su experiencia a mejorar.

Agradecer al programa de becas de estadias cortas de investigación destinadas a estudiantes tesistas de postgrado de la Universidad de Chile, Vicerrectoría de Asuntos Académicos, Departamento de Postgrado y Postítulo por ayudar a financiar una estadia en el laboratorio del Dr. George Perry en EE.UU. Agradecer al Dr. Perry por su gran generosidad, su constante preocupación por mi trabajo y su ayuda mientras estuve allá. Además de enseñarme que la humildad es una virtud que los grandes científicos. También agradecer la posibilidad de trabajar en el laboratorio la Dra. Lafer y a los miembros de su equipo por ayudarme gentilmente cada vez que los necesite.

Agradecer los profesores miembros de mi comisión de tesis: Dra. María A. Valenzuela, Dra. Ana María Kettlún y Dra. Alejandra Álvarez por sus orientaciones y consejos a lo largo de esta tesis, y a las dos primeras, también a lo largo de toda mi estadía en la universidad. También agradecer a la profesora del magíster, Dra. Mancilla, por sus consejos en el arte de la purificación de proteínas.

Nada de esto hubiera sido posible sin la ayuda de mi familia, a quienes quiero con todo mi corazón. A mi mamá Marilú que siempre estuvo pendiente de mí estos años en la U y mis tías María Teresa y Marta que me han querido que como si fuera un hijo. Yo no sería nada sin Uds. También agradecer infinitamente la ayuda de mi brindo mi tío Lucho mientras estuve estudiando en la U, sus consejos, su cuidado y su generosidad para recibirme cuando fuera en su hogar, MUCHA GRACIAS !

No puedo dejar de mencionar a los compañeros de batalla en este largo camino y a quienes agradezco su amistad día a día. A los que sobrevivimos desde el mechoneo, Naria, Fabiola, Giannina, Fabián agradecer por todos los momentos compartidos, apoyarme siempre y hacerme sentir uno más dentro de sus hogares. También agradecer a Javiera, Jennylee y Tai por confiar en mí y apoyarme todas veces que los necesite. Muchas gracias a todos Uds.

Agradecer a todos los miembros de la comunidad de Cs. Químicas y Farmacéuticas donde estudie estos años, desde los funcionarios, en especial las asistentes sociales, a quienes siempre pude recurrir. A los académicos que conocí en las aulas y fuera de ellas, que ayudan a construir día a día la universidad. A los compañeros en la facultad y amigos que hice a lo largo de este recorrido, gracias a todos aquéllos que siempre soñamos en una mejor facultad y universidad, a pesar de la apatía latente. A los muchachos con los que compartí en el hogar Juan Gómez Millas que hicieron más agradable la estadía en la capital y a los amigos que fui construyendo a lo largo en la universidad. Cumplí el sueño de estudiar en la Universidad de Chile y ser parte de ella.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

Agradecimientos	iv
Índice de Contenidos	vi
Índice de Figuras	xi
Índice de Tablas	xiii
Abreviaturas	xiv
RESUMEN	xvi
ABSTRACT	xvii
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1 La Enfermedad de Alzheimer	1
1.2 La proteína Tau: estructura y roles fisiológicos	3
1.3 Agregación de la proteína tau	5
1.4 Neurotoxicidad de tau	10
1.5 Inhibidores de la Agregación de Tau	13
1.6 Hipótesis	16
1.7 Objetivos	16
2. MATERIALES Y MÉTODOS	17
2.1 Materiales	
2.1.1 <u>Biológicos</u>	17
2.1.2 <u>Reactivos</u>	17
2.1.3 <u>Soluciones</u>	19
2.1.4 <u>Materiales</u>	21
2.1.5 <u>Equipos</u>	21

2.2 Métodos	
2.2.1 <u>Clonamiento de htau en vectores de expresión bacteriana</u>	23
2.2.1.1 Digestión Enzimática	23
2.2.1.2 Reacción de Ligación	23
2.2.1.3 Generación de bacterias competentes	23
2.2.1.4 Transformación de bacterias competentes	24
2.2.2 <u>Clonamiento de 4RMBD en vectores de expresión bacteriana</u>	25
2.2.2.1 Amplificación del fragmento de 4RMBD por PCR	25
2.2.2.2 Digestión Enzimática	26
2.2.2.3 Reacción de Ligación	26
2.2.2.4 Transformación de células competentes	26
2.2.3 <u>Expresión de isoformas de proteína htau recombinante</u>	27
2.2.3.1 Control de la Expresión de htau recombinante	27
2.2.3.2 Preparación y análisis de los extractos proteicos	27
2.2.3.3 Optimización de la expresión de htau recombinante	27
2.2.4 <u>Purificación de htau recombinante desde cultivos de E.coli</u>	28
2.2.4.1 Purificación de htau por cromatografía de intercambio y exclusión molecular	28
2.2.4.2 Purificación de htau por IMAC y SEC-HPLC	29
2.2.4.3 Purificación de 4RMBD por IMAC y SEC-HPLC	31
2.2.5 <u>Estudios de agregación de htau <i>in vitro</i></u>	32
2.2.5.1 Inducción de la agregación de htau <i>in vitro</i> con heparina	32
2.2.5.2 Estudios de agregación de htau40 por fluorescencia con Tioflavina S (ThS)	32
2.2.5.3 Estudios de agregación de htau40 y 4RMBD por <i>dynamic light scattering</i>	33

2.2.6	<u>Caracterización microscópica de agregados de htau</u>	34
2.2.6.1	Estudios de microscopía electrónica de transmisión (TEM)	34
2.2.6.1	Estudios de microscopía de fuerza atómica (AFM)	34
2.2.7	<u>Estudios de inhibición de la agregación de htau</u>	35
2.2.7.1	Obtención y disolución de los compuestos estudiados	35
2.2.7.2	Ensayo de fluorescencia con TioflavinaT (ThT) para el <i>screening</i> de moléculas antiagregantes de tau	36
2.2.7.3	Estudios de microscopía de fuerza atómica (AFM) para evaluar el efecto de ácidos fúlvicos en la polimerización de tau	37
2.2.8	<u>Otros métodos</u>	38
2.2.8.1	Cálculo de la Concentración de Proteínas	38
2.2.8.2	Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE	38
2.2.8.3	<i>Dot Blot</i>	39
2.2.8.4	<i>Western Blot</i>	39
2.2.8.5	Análisis Estadísticos	40
3.	RESULTADOS	41
3.1	Clonamiento de htau en vectores de expresión	41
3.2	Amplificación y clonamiento de 4RMBD en vectores de expresión	41
3.3	Expresión y purificación de htau recombinante desde cultivos de <i>E. coli</i>	44
3.3.1	<u>Expresión de htau recombinante en cultivos de <i>E. coli</i></u>	44
3.3.2	<u>Purificación de htau por cromatografía de intercambio y exclusión molecular</u>	47
3.3.3	<u>Purificación de htau por IMAC y SEC-HPLC</u>	51

3.4 Expresión y purificación de 4RMBD recombinante desde cultivos de <i>E. coli</i>	55
3.5 Estudios de agregación de htau40 por fluorescencia con tioflavina-S (ThS)	57
3.6 Estudios de agregación de tau por <i>dynamic light scattering</i> (DLS)	58
3.6.1 <u>Agregación de htau40</u>	58
3.6.2 <u>Agregación de 4RMBD</u>	60
3.7 Caracterización de agregados de tau por microscopía electrónica de transmisión (TEM)	63
3.7.1 <u>Agregación de 4RMBD</u>	63
3.7.2 <u>Agregación de htau40</u>	64
3.8 Caracterización de agregados de tau por microscopía de fuerza atómica (AFM)	66
3.8.1 <u>Estudios en modo <i>tapping</i> aire</u>	66
3.8.2 <u>Estudios en modo <i>tapping</i> fluido</u>	68
3.9 <i>Screening</i> de moléculas antiagregantes de tau con ensayo de fluorescencia con TioflavinaT (ThT)	72
3.9.1 <u>Inhibición de la agregación de 4RMBD con azul de metileno</u>	72
3.9.2 <u>Estudio de efectos antiagregantes de quinolinas</u>	73
3.9.3 <u>Estudio de efectos antiagregantes y desagregantes de ácido fúlvico</u>	76
3.10 Estudios de efecto de ácidos fúlvicos en la formación de agregados de tau por AFM	80
3.10.1 <u>Efectos de ácido fúlvico en la agregación de 4RMBD</u>	80
3.10.2 <u>Efectos de ácido fúlvico en la agregación de htau40</u>	81

3.10.3 Efectos de ácido fúlvico en el desensamble de agregados preformados de htau40	85
4. DISCUSIÓN	88
4.1 Expresión y Purificación de htau y 4RMBD recombinante	88
4.2 Agregación de tau con heparina <i>in vitro</i> y caracterización de estructuras filamentosas	89
4.3 <i>Screening</i> de moléculas que inhiben la agregación de tau	92
4.4 Efectos de ácido fúlvico en la agregación de tau	93
4.5 Proyecciones y alcances de este trabajo de tesis	96
5.- CONCLUSIONES	98
6.- BIBLIOGRAFÍA	99
7.-ANEXOS	108
<u>7.1 Anexo 1</u> Detalle Síntesis Quinolinas Ensayadas	108
<u>7.2 Anexo 2</u> Secuencias de tau en vectores pET-3a y pET-28a(+)	110

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la hipótesis neuroinmunológica de la EA	3
Figura 2. Diagrama de isoformas de htau	4
Figura 3. Etapas de la agregación de tau	9
Figura 4. Agregación patológica de tau	12
Figura 5. Estrategias terapéuticas para reducir la neuropatología mediada por tau	13
Figura 6. Análisis electroforético de los productos de amplificación por PCR del fragmento 4RMBD	42
Figura 7. Análisis electroforético de la digestión de vectores pET-28a/4RMBD con BamHI y NdeI.	43
Figura 8. Estrategia experimental para la purificación de isoformas de htau	46
Figura 9. Cromatografía de intercambio catiónico de htau40	48
Figura 10. Cromatografía de Exclusión Molecular htau40.	49
Figura 11. Etapas purificación de htau40 por método de cromatografía de intercambio y exclusión molecular	50
Figura 12. Análisis electroforético de la purificación de htau HisTag mediante IMAC.	52
Figura 13. Separación de htau24 HisTag por SEC-HPLC	53
Figura 14. Separación de htau40 HisTag por SEC-HPLC	54
Figura 15. Separación de 4RMBD por SEC-HPLC	56
Figura 16. Curva de agregación de htau monitoreada por fluorescencia con Tioflavina S	57
Figura 17. Estudio de agregación de htau40 a distintos tiempos por <i>dynamic light scattering</i> .	60
Figura 18. Análisis en solución de 4RMBD por <i>dynamic light scattering</i> .	61
Figura 19. Cinética de agregación en tiempo real de 4RMBD por <i>dynamic light scattering</i>	62
Figura 20. Microscopia Electrónica de agregados de 4RMBD	63

Figura 21. Microscopia Electrónica de agregados de htau40	65
Figura 22. Imágenes AFM de agregados de htau40 modo <i>tapping</i> aire	67
Figura 23. Imágenes AFM de agregación de 4RMBD a distintos tiempos	69
Figura 24. Imágenes AFM estructuras fibrilares de htau40	70
Figura 25. Imágenes AFM PHF-like htau40	71
Figura 26. Inhibición de la agregación de 4RMBD con azul de metileno	72
Figura 27. Estructura de las quinolinas estudiadas	73
Figura 28. Efecto de quinolinas en la agregación de 4RMBD	74
Figura 29. Curva dosis-respuesta para la inhibición de la agregación de 4RMBD con THQ-55	75
Figura 30. Estructuras propuestas para el ácido fúlvico	76
Figura 31. Curva dosis-respuesta para la inhibición de la agregación de 4RMBD con ácido fúlvico.	77
Figura 32. Curva dosis-respuesta de desagregación de 4RMBD con ácido fúlvico.	78
Figura 33. Efectos de ácido fúlvico en la agregación de 4RMBD	81
Figura 34. Efectos de ácido fúlvico en la agregación de htau40	83
Figura 35. Distribución de la longitud de agregados de htau40 formados en ausencia y presencia de ácido fúlvico	84
Figura 36. Efectos de ácido fúlvico en el desensamble de agregados preformados de tau	86
Figura 37. Distribución de la longitud de agregados preformados de htau40 en ausencia y presencia de ácido fúlvico	87

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores Amplificación 4RMBD	25
Tabla2. Resumen de isoformas de htau expresadas, tamaños y comparación de pesos moleculares reales y aparentes.	44
Tabla 3. Resumen de compuestos ensayados en la agregación de tau	79

ABREVIATURAS

3RMBD	Dominio de unión a microtúbulos de tres repeticiones
4RMBD	Dominio de unión a microtúbulos de cuatro repeticiones
Aa	aminoácidos
AD	Enfermedad de Alzheimer
AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
AGEs	Productos de Glicosilación Avanzada
BSA	Seroalbúmina de bovino
Cdk-5	Quinasa dependiente de ciclina 5
CEM	Cromatografía de exclusión molecular
DC50	Concentración Desagregante Media
DLS	Dynamic light scattering
DMSO	Dimetil Sulfoxido
dNTPs	Desoxirribonucleótidos Trifosfato
DO	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EA	Enfermedad de Alzheimer
EDTA	Ácido Etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido Etilenglicoltetraacético
ELISA	Ensayo de Inmuno-absorbente unido a enzima
<i>Gsk-3β</i>	Glicógeno Sintasa quiinasa 3-beta
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfónico
HOPG	Grafito Pirolítico Altamente Ordenado
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
Htau	Tau humana
Htau HisTag	Tau humana con hexapéptido de histidina
IC50	Concentración Inhibitoria Media
IHSS	Internacional Humic Substances Society
IMAC	Cromatografía de afinidad a ión metálico inmovilizado

IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
LB	Medio Luria-Bertoni
MAPs	Proteínas Asociadas a Microtúbulos
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico
NFTs	Ovillos Neurofibrilares
NMR	Resonancia magnética nuclear
PBS	Tampón Fosfato Salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHFs	Filamentos Helicoidales Pareados
PHFs-like	Filamentos Tipo Helicoidales Pareados
PMSF	Parametilsulfonilfluoruro
PP1A	Proteína Fosfatasa 1 A
PP2	Proteína Fosfatasa 2
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
SEC-HPLC	Cromatografía de Exclusión Molecular acoplada a HPLC
SF	Filamentos Rectos
SOB	Caldo de cultivo super-óptimo
SOC	Caldo de cultivo super-óptimo con represión por catabolito
TEM	Microscopía Electrónica de Transmisión
ThS	Tioflavina S
ThT	Tioflavina T
TLR	Receptor Tipo Toll
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
Tween	Monolaureato de polioxietileno sorbitano
VC	Volumen de Columna

RESUMEN

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa, de evolución lenta y que se caracteriza por ser la forma más común de demencia. En el transcurso de la EA, la proteína tau comienza a hiperfosforilarse irreversiblemente en múltiples sitios, y se autoensambla en estructuras anómalas filamentosas denominadas *filamentos helicoidales pareados* (PHFs), para dar lugar finalmente a los *ovillos neurofibrilares* (NFTs). Se ha demostrado que los oligómeros de tau son neurotóxicos y más interesante aún, correlacionan con el deterioro cognitivo. Se discute sobre la naturaleza precisa de las especies que causan dicho efecto. Por lo tanto, la inhibición de la agregación de tau en estructuras oligoméricas o filamentosas se muestra como un blanco terapéutico para el tratamiento de la EA. Se ha descrito previamente que moléculas de la familia de quinolinas y polifenoles afectarían la agregación de tau *in vitro*.

En este contexto, la hipótesis de este trabajo se enmarca en que nuevos compuestos derivados de quinolinas y polifenoles como el ácido fúlvico, tendrían capacidad inhibitoria en la agregación de tau. El objetivo central es desarrollar una metodología para el estudio de moléculas con propiedades antiagregantes de tau y sus posibles mecanismos de la inhibición.

Para ello se ha purificado htau recombinante y el fragmento 4RMBD desde *E. coli* y se indujo la polimerización *in vitro* con heparina. Se caracterizaron los agregados formados mediante técnicas de espectroscopia de fluorescencia, *dynamic light scattering* (DLS), microscopia electrónica y microscopia de fuerza atómica (AFM). A su vez, se estableció una metodología para el *screening* de moléculas con capacidad antiagregante de tau. Mediante estas técnicas, hemos determinado que solo el compuesto THQ-55 de las quinolinas ensayadas tendría un potencial efecto antiagregante de tau a altas concentraciones. A su vez, el ácido fúlvico presenta un efecto inhibitorio en la agregación de tau y desensamblaría los agregados preformados de ésta. Hacia el futuro se espera dilucidar el mecanismo mediante el cual el ácido fúlvico afecta los procesos de agregación proteica.

ABSTRACT

Alzheimer's Disease (AD) is a neurodegenerative disorder of slow progress that affects the brain. AD is the most common form of dementia. In the course of AD, tau protein begins to be irreversibly hyperphosphorylated at multiple sites, and self-assembles into pathological filamentous structures called paired helical filaments (PHFs), and these filaments assemble into neurofibrillary tangles (NFTs). It has been shown that tau oligomers are neurotoxic and correlate with cognitive decline, although the precise nature of the species that cause this effect is unknown. In this context, the inhibition of tau aggregation in oligomeric or filamentous structures appears as a promising therapeutic target for the treatment of AD. Previously, it has been described that the family of molecules of quinolines and polyphenols would affect the aggregation of tau *in vitro*.

In this context, the hypothesis of this research is based on the activity of quinolines compounds and polyphenols such as fulvic acid, and their inhibitory action on tau aggregation. The central goal is the development of an approach for the study of molecules with anti-tau aggregation properties and its possible mechanisms of inhibition.

Htau and the 4RMBD fragment have been purified from *E. coli* and the *in vitro* aggregation was induced with heparin. Aggregates formed were characterized by fluorescence spectroscopy techniques, dynamic light scattering (DLS), electron microscopy and atomic force microscopy (AFM). Moreover, a methodology for the screening of molecules with antiaggregation capacity of tau was established. Using these techniques, we determined that of the quinolines tested only the THQ-55 compound has an antiaggregation potential on tau at high concentrations. On the other hand, fulvic acid has a significant inhibitory effect on tau aggregation and disassembles tau preformed aggregates. Towards the future, we hope to elucidate the mechanism by which the fulvic acid affects protein aggregation processes.

1.- INTRODUCCIÓN

1.1 La Enfermedad de Alzheimer

La Enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa, de evolución lenta y que se caracteriza por ser la causa más común de demencia, lo que la convierte en uno de los mayores problemas de salud pública en la actualidad (Maccioni et al., 2001). Se estima que los costos asociados a demencias a nivel mundial serán cercanos a los US\$ 600 billones de dólares para el año 2010 y que actualmente hay 35,6 millones de pacientes alrededor del mundo, proyectándose 115 millones para el año 2050 (Wimo & Prince, 2010).

Las características histopatológicas de la EA están representadas por dos lesiones principales: las placas seniles y los ovillos neurofibrilares (NFTs). Las primeras tienen como principal componente al péptido beta amiloide (péptido A β) que adopta estructuras de sábana plegada β ; mientras que las últimas tienen a la proteína tau hiperfosforilada y formas de tau patológica como principal componente (Maccioni et al. 2001). El diagnóstico definitivo de la enfermedad sólo se puede realizar *postmortem* al comprobarse la existencia de estas estructuras histopatológicas en el cerebro de los pacientes, aunque se avanza en nuevos biomarcadores de diagnóstico temprano de la EA (Maccioni et al., 2006).

Entre las hipótesis que tratan de explicar la enfermedad se encuentra la *hipótesis amiloide*, que propone que la acumulación de A β en el cerebro es la influencia primaria conducente en la patogénesis de la enfermedad. El resto de los procesos que ocurren en la EA sería un resultado del desbalance entre la producción y degradación de A β (Hardy et al., 2002). Esta hipótesis que se mantuvo durante 20 años ha caído en descrédito al demostrarse que las placas seniles no son responsables de la etiología, sino más bien los agregados neurotóxicos de tau (Maccioni & Perry, 2009). En este sentido, la *hipótesis de tau* indica que los eventos conducentes a la patogénesis de la EA son producto de la agregación de la proteína

tau hiperfosforilada, ya que los NFTs correlacionan con el deterioro cognitivo, no así las placas seniles (Maccioni & Perry, 2009). También se ha propuesto que el estrés oxidativo ocurre tempranamente en la progresión de la enfermedad, antes del desarrollo de los agregados proteicos de A β y tau; y que afectaría toda clase de macromoléculas lo que conduciría inevitablemente a la disfunción neuronal (Moreira et al., 2008).

Una de las hipótesis de la etiogénesis de la EA con mayor aceptación actualmente es la *neuroinmunológica o teoría unificadora de la EA* (Fernández et al., 2008; Maccioni et al., 2009; Morales et al., 2010), la cual plantea que existen una serie de señales de daño-alarma en el sistema de inmunidad innata, en las etapas tempranas de la patogénesis de la EA (Figura 1). Señales de daño endógeno tales como oligómeros de A β , LDL oxidada, radicales libres, daño mecánico y productos de glicosilación avanzada (AGEs), producidos por factores externos como los traumatismos, alta ingesta de grasa, deficiencia de vitaminas B6 y B12, infecciones y sobrecarga de hierro entre otros, activan la microglía a través de receptores AGEs; así como LDL-oxidadas podrían activar receptores tipo toll (TLRs), en particular TLR4. Separadamente y en varias combinaciones, estas señales podrían gatillar mecanismos de alarma en el sistema de inmunidad innata, resultando en un aumento en los niveles de NF κ -B, factor de transcripción que aumentaría la expresión de los genes de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) liberados por la microglía y que promueven cascadas erróneas de señalización en las neuronas afectadas. Estas señales estarían directamente relacionadas con el daño neuronal, debido a que se activarían enzimas del ciclo celular tales como la Cdk-5, lo cual se ve reflejado en alteraciones como la hiperfosforilación de tau y la formación de filamentos helicoidales pareados (PHFs), procesos que resultan en una degeneración neuronal y progresivamente manifestaciones clínicas severas que afectan procesos cognitivos y conductuales (Fernández et al., 2008; Maccioni et al., 2009). Por ello, es de especial interés el estudio de la proteína tau y sus procesos de agregación.

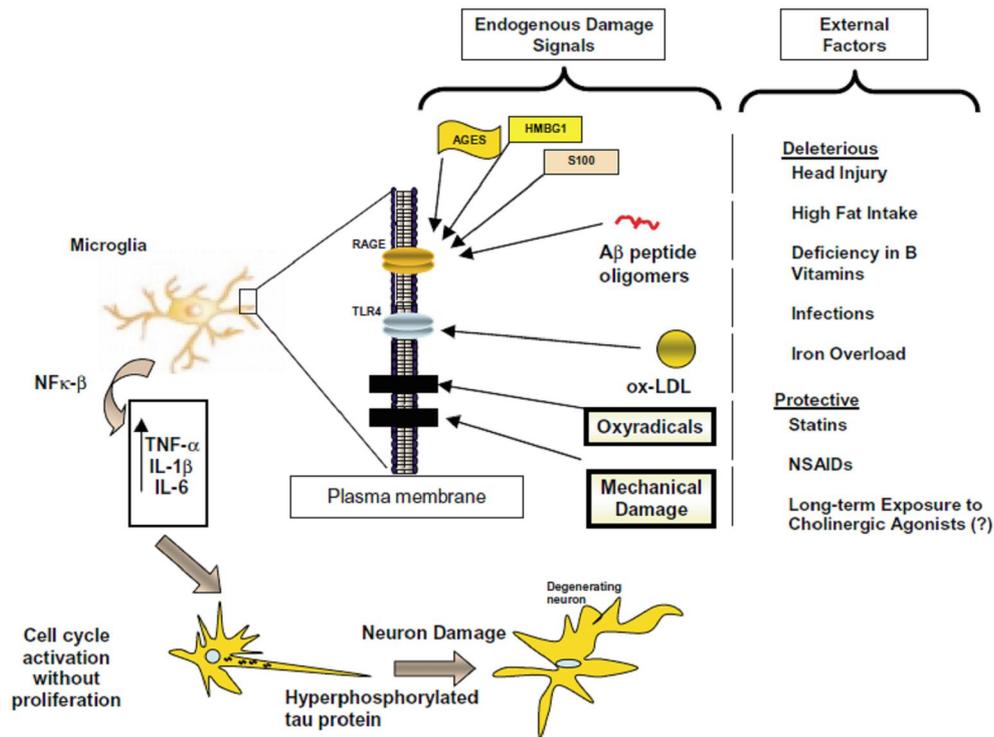


Figura 1.- Esquema de la hipótesis neuroinmunológica de la EA (Fernández et al., 2008)

1.2 La proteína Tau: estructura y roles fisiológicos

La proteína tau pertenece a la familia de las *MAPs* o *proteínas asociadas a los microtúbulos*. Cumple una función importante en el ensamble de estos, así como en su estabilización contra la inestabilidad dinámica y la unión de los microtúbulos con otros filamentos del citoesqueleto (Maccioni et al, 1995). Tau está codificada por un gen simple localizado en el cromosoma 17. En la especie humana se expresa casi exclusivamente en las neuronas y a partir de un solo gen se derivan por procesos de *splicing alternativo* seis isoformas distintas que poseen entre 352 a 441 residuos aminoacídicos. Las isoformas se encuentran definidas por la presencia o ausencia de uno o dos insertos en su extremo amino-terminal y la presencia o ausencia de la secuencia repetitiva R2 en el dominio de unión a microtúbulos (Goedert et al., 1989). En la Figura 2 se muestran las distintas isoformas de tau humana (htau) y los dominios de unión a microtúbulos.

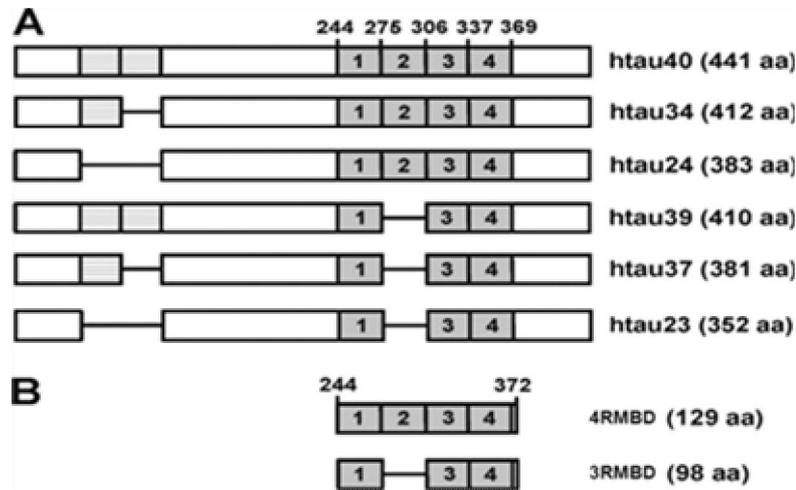


Figura 2.- Diagrama de isoformas de htau. A.- Isoformas de htau, B.- Dominios de unión a microtúbulos de tres y cuatro repeticiones.

La región N-terminal de tau puede contener secuencias ácidas de tamaño variable, dependiendo si la isoforma presenta los exones 2 y 3. Esta región constituye el *dominio de proyección*, debido a que una vez que la proteína tau interactúa con los microtúbulos se proyecta desde éstos hacia el exterior. A través de esta proyección tau es capaz de interactuar con otros elementos del citoesqueleto como filamentos de actina o espectrina (Cross et al., 1993; Farias et al., 2002) o con la membrana plasmática (Hernández et al., 2009). La región *C-terminal* contiene el dominio de unión a microtúbulos ya que es el encargado del ensamblaje y estabilización de los microtúbulos. En esta región se ubican los dominios de las secuencias repetitivas en tándem. Éstos presentan 3 o 4 segmentos de 18 aminoácidos cada uno altamente conservados, los que se encuentran separados por regiones de alrededor de 13 aminoácidos, y cuya función fundamental es la unión a los microtúbulos (Maccioni et al., 1989).

Durante el proceso de patogénesis de la EA, tau comienza a hiperfosforilarse irreversiblemente en múltiples sitios, y se integra en estructuras anómalas filamentosas denominadas *filamentos helicoidales pareados* (PHFs), para dar lugar

finalmente a los NFTs (Maccioni et al., 1995). La fosforilación de tau juega un rol importante en la regulación de la unión de tau a los microtúbulos y por ende, regula la estabilidad de los microtúbulos dentro de las neuronas. Sin embargo, en EA y otras taupatías la proteína tau se encuentra en un estado anormalmente fosforilado, presumiblemente por una alteración en el balance de las actividades de varias quinasas (como *Gsk-3 β* y *Cdk-5*) y fosfatasas, PP1A y PP2. Las alteraciones en el estado de fosforilación de tau pueden generar cambios irreversibles en la dinámica de los microtúbulos, disfunción celular y finalmente la muerte celular (Mi et al., 2006).

1.3 Agregación de la proteína tau

Para estudiar los procesos de agregación de tau se ha analizado la polimerización a partir de tau recombinante *in vitro*. A diferencia de otras proteínas que se agregan, tau no forma fibras espontáneamente cuando se incuba en condiciones fisiológicas (Kuret et al., 2005). Para facilitar el estudio de polimerización *in vitro*, se requieren moléculas polianiónicas inductoras tales como heparina, heparan sulfato, ácidos grasos poli-insaturados o RNA (Goedert et al., 1996, Kampers et al., 1996 y Wilson et al., 1997). Sin embargo, los mecanismos subyacentes de la transición estructural desde una proteína inocua naturalmente desplegada a sus polímeros neurotóxicos y a sus estructuras agregadas macromoleculares mayores son aún desconocidos (Maccioni et al.; 2010). Desde un punto de vista estructural, tau se ha caracterizado como una proteína “*random coil*” sin zonas marcadas de estructura definida, mientras su agregación se basa en la transición parcial desde dominios “*random coil*” a estructura de sábana β (von Bergen et al., 2005; Jeganathan et al., 2008).

La conformación de tau soluble no se conoce en detalle, siendo altamente variable, ya que corresponde a lo que se llama una proteína sin plegamiento nativa. Los estudios de NMR del dominio repetitivo han revelado muy poca estructura secundaria, pero se observan motivos de estructura β nascente cercanas a las repeticiones 2 y 3 (Mukrasch et al., 2005). Recientemente por estudios de NMR avanzados se ha logrado un modelo de tau en solución de la proteína completa, aunque de baja resolución, que muestra la gran capacidad dinámica en solución (Mukrasch et al., 2009). La compactación interna del dominio repetitivo fue evidenciada por la proximidad relativa de residuos marcados fluorescentemente mediante estudios de FRET (*fluorescence resonance energy transfer*), que han mostrado un plegamiento tipo “*paperclip*”, resultando en la yuxtaposición del dominio repetitivo con el extremo C-terminal y N-terminal de la proteína (Jeganathan et al., 2006). Por estudios de SAXS (*small-angle x-ray scattering*) se han caracterizado formas de la proteína tau normales y mutantes agregantes, no encontrándose grandes diferencias en las conformaciones en forma monomérica en solución, sugiriendo que los cambios conformacionales ocurren luego que el núcleo de agregación se ha formado (Mylonas et al., 2008).

Se ha investigado en la secuencia de los tándemes en repetición de tau y se ha determinado que la agregación de ésta se basa en dos motivos hexapeptídicos: $^{275}\text{VQIINK}^{280}$ (PHF6*) y $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ (PHF6) al comienzo de las secuencias de repetición 2 y 3 respectivamente, siendo este último motivo común a todas las isoformas de tau (von Bergen et al., 2000). Estos “motivos de agregación” tienen un carácter parcialmente hidrofóbico y tienden a interactuar con estructura β cruzada, contribuyendo al núcleo de los PHFs, mientras el resto de la proteína se mantiene desordenada mayormente. El motivo $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$, es capaz de formar fibrillas de apariencia amiloide en solución, determinándose que forma estructura β cruzada en forma paralela (Goux et al., 2004). Recientemente dicho motivo fue caracterizado estructuralmente por difracción de rayos X confirmando la espina de *estructura β -cruzada* (“ *β -cross spine*”), es decir, un set de hebras β que corren perpendiculares al eje longitudinal de la fibra. A su vez se describió que la unidad fundamental de las fibrillas tipo amiloide es una estructura tipo “*steric zipper*” (cremallera estérica) ya

que los segmentos peptídicos pueden interactuar con otras copias de sí mismas y formar dos sábanas β interdigitadas herméticas, formando una interfase seca, dominada por las interacciones hidrofóbicas y otra interfase húmeda hacia el exterior, dominada por las interacciones iónicas (Sawaya et al., 2007). Gracias a los adelantos en la preparación de las muestras y las técnicas de difracción, ha sido demostrada la naturaleza amiloide de los filamentos de tau purificados de cerebro humano o ensamblados de proteína recombinante completa (Berriman et al., 2003, Barghorn et al., 2004). Estos motivos hexapeptídicos de agregación coinciden con secuencias de estructura β naciente que pueden ser detectadas en tau soluble por espectroscopia NMR (Mukrasch et al., 2005; Sillen et al., 2005). También estudios de NMR permitieron la caracterización de un fragmento de 198 residuos compuesto por los cuatro tándemes en repetición y los dominios flanqueantes y que contiene la unión completa a microtúbulos y la actividad agregante de tau. La propensión más alta para formar estructura β es dentro de las regiones repetitivas, mientras los dominios flanqueantes están mayormente como “*random coil*”, con una incrementada rigidez en la región rica en prolinas (Mukrasch et al., 2007). Por técnicas de *solid-state NMR* (ssNMR) se ha descrito que los dímeros de tau en solución pueden interactuar por los dominios de la región repetitiva R3, dejando a los dominios R1 y R4 expuestos a la superficie (Andronesi et al., 2008). Por métodos similares se ha comprobado que oligómeros de tau son capaces de interactuar por estas secuencias hexapépticas (VQIINK y VQIVYK), siendo las principales responsables de la interacción proteína-proteína en las etapas tempranas de agregación (Peterson et al, 2008).

Los fenómenos de agregación de tau se han estudiado por diversos métodos. El ensamblaje de tau inducido por heparina involucra dos dímeros distintos (cisteína-dependiente y cisteína-independiente) que difieren en su resistencia a la reducción. Una menor cantidad de oligómeros de orden superior y agregados fueron ensamblados en mutantes que carecen de cisteínas (Cys/Ala) o que presentan una delección del hexapéptido PHF6, lo que indica que los puentes disulfuros intermoleculares en conjunto con el hexapéptido PHF6 facilitan la oligomerización de tau (Sahara et al., 2007). Formas intermedias de filamentos de tau (estructuras

prefibrilares) en solución se han estudiado por microscopía de fuerza atómica (AFM) caracterizando diversas etapas en la formación de los PHFs, los que se han denominado como tau granular (Maeda et al., 2007). Estas formas oligoméricas de orden superior se han caracterizado en cerebros de modelos transgénicos de la enfermedad o en cerebros de pacientes, lo que indica su importancia en los procesos de agregación y posterior daño neurodegenerativo (Maeda et al., 2006; Sahara et al., 2007; Berger et al., 2007). Por otra parte, desde pacientes con EA se pueden aislar filamentos que muestran morfología variada. Estos se han caracterizado por microscopía electrónica, siendo en su mayoría del tipo helicoidal pareado con formación entrecruzada (PHF), aunque hay estructuras de filamentos rectos sin formación entrecruzada ("*straight filaments*", SF) (Crowther et al., 1991).

Se ha propuesto un modelo clásico de agregación del tipo nucleación-agregación para explicar la agregación de tau (Figura 3). Según este modelo, tau "*random coil*" monomérica en solución sufre cambios conformacionales, lo que gatilla la agregación subsecuente. La etapa de formación de dímeros sería la etapa limitante y constituiría el núcleo de agregación básico. Sobre este núcleo se van asociando nuevas moléculas y se forman elementos oligoméricos y prefibrilares, para constituir filamentos a través de un proceso de elongación o extensión de éstos. En términos cinéticos, habría una primera fase *lag* de agregación, que corresponde a la formación de los estos núcleos, de equilibrio lento y luego, una fase de ensamblaje, que corresponde a la extensión de los filamentos formados, con una velocidad de crecimiento exponencial (Kuret et al., 2005; Congdon et al., 2008).

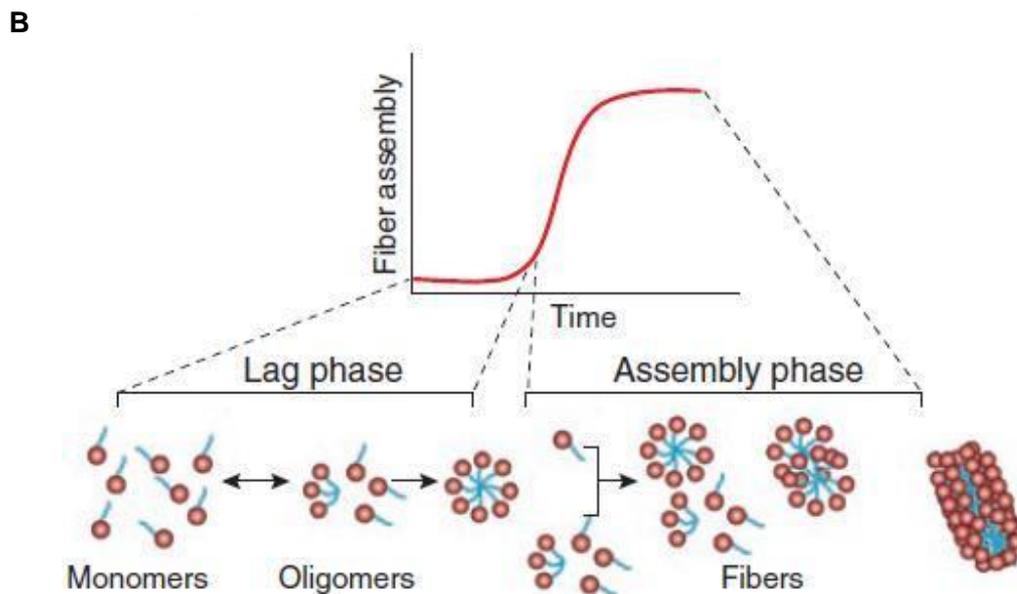
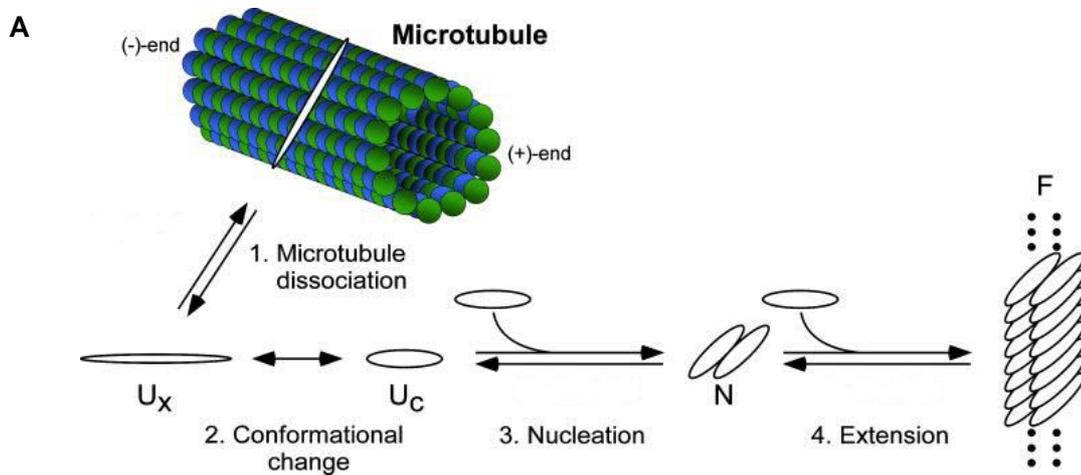


Figura 3.- Etapas de la agregación de tau A.- Modelo de agregación de nucleación-elongación, donde la formación del dímmero corresponde al núcleo de agregación (adaptado de Congdon et al., 2008) B.- Formación de fibras amiloidogénicas, donde se distingue una etapa lag y una etapa de ensamblaje (o elongación) (adaptado de Roberts et al., 2008).

1.4 Neurotoxicidad de tau

Muchas enfermedades neurodegenerativas se han asociado a los procesos de mal plegamiento de proteínas y agregación de éstas en el sistema nervioso central. Con distintos matices, estas patologías se caracterizan en común por presentar la acumulación intra o extracelular de agregados que son tóxicos para las células nerviosas (Soto, 2003). En este contexto, la agregación de tau en diversas estructuras se ha señalado como central en la etiogénesis de la EA (Maccioni et al, 2010).

Dentro de las evidencias para afirmar el rol de tau en la neurodegeneración, se encuentra que la acumulación de NFTs correlaciona con la progresión y severidad de la enfermedad así como con el deterioro cognitivo (Dickson et. al, 1995; Guillozet et al., 2003). A su vez, el descubrimiento que mutaciones puntuales de tau, que le confieren mayor tendencia a agregarse, ha permitido relacionar directamente el gen de tau con enfermedades neurodegenerativas similares a la EA como la demencia frontotemporal (van Swieten et al., 2007). Por otra parte, se han realizado estudios en modelos neuronales, que han mostrado que la sobreexpresión de tau es tóxica para la viabilidad celular. Interesantemente, una reducción en la muerte celular se alcanzó con la adición de inhibidores de la agregación de tau (Khlitunova et al., 2006). Además, se ha ensayado la toxicidad del péptido agregante PHF6 selectivamente a neuronas (Zhao et al., 2010).

Estudios en modelos murinos transgénicos han reportado que la pérdida neuronal y el deterioro en la memoria son concomitantes con la acumulación de especies solubles de tau y aparentemente esta disociadas de la acumulación de NFTs (Santacruz et al., 2005; Yoshiyama et al., 2007). Similarmente, mejorías en la cognición de un modelo productor de NFTs y placas seniles requiere la reducción de la proteína soluble tau, pero no de placas insolubles (Oddo et al., 2006). Recientemente se ha demostrado que la reducción de los niveles tau previene los efectos en el transporte axonal inducidos por A β (Vossel et al., 2010), así como que la toxicidad de A β a nivel sináptico esta mediada por los niveles y la localización subcelular de tau en las dendritas (Ittner et al., 2010).

El concepto de que oligómeros solubles (pequeños agregados) de proteínas amiloides son una especie tóxica y no los agregados insolubles como las placas ha sido aceptado para explicar múltiples enfermedades neurodegenerativas (Hass et al, 2007). Se ha demostrado una correlación entre la progresión de la enfermedad y la acumulación de oligómeros de tau en los cerebros de pacientes con EA (Maeda et al., 2006). Además, recientemente se describió una relación entre la oligomerización patológica de tau y el deterioro cognitivo en modelos murinos de EA. Se ha señalado que las formas de tau que correlacionan mejor con la pérdida neuronal y el déficit de comportamiento son oligómeros solubles en un modelo condicional de taupatía (Berger et al., 2007). A la luz de estos nuevos antecedentes, se ha planteado que estas formas pre-fibrilares agregadas son la principal especie neurotóxica de tau más que las formas altamente organizadas como los NFTs (Ding et al., 2008). Sin embargo, aún no se ha descrito con exactitud el rol neurotóxico de los intermediarios de la agregación de tau y es materia de intenso debate la naturaleza precisa de las especies de tau que llevan a la neurodegeneración.

La neurotoxicidad asociada a tau es multifactorial y depende de modificaciones post-traduccionales (entre ella hiperfosforilación, glicosilación y ubiquitinación), cortes proteolíticos y el estado de agregación de tau. Por una parte, se cree que hay una pérdida de función de tau al disociarse de los microtúbulos, así como una ganancia de función, al autoagregarse y formar elementos tóxicos (Farias et al., 2011). Un detalle sobre las formas patológicas de tau puede observarse de la Figura 4.

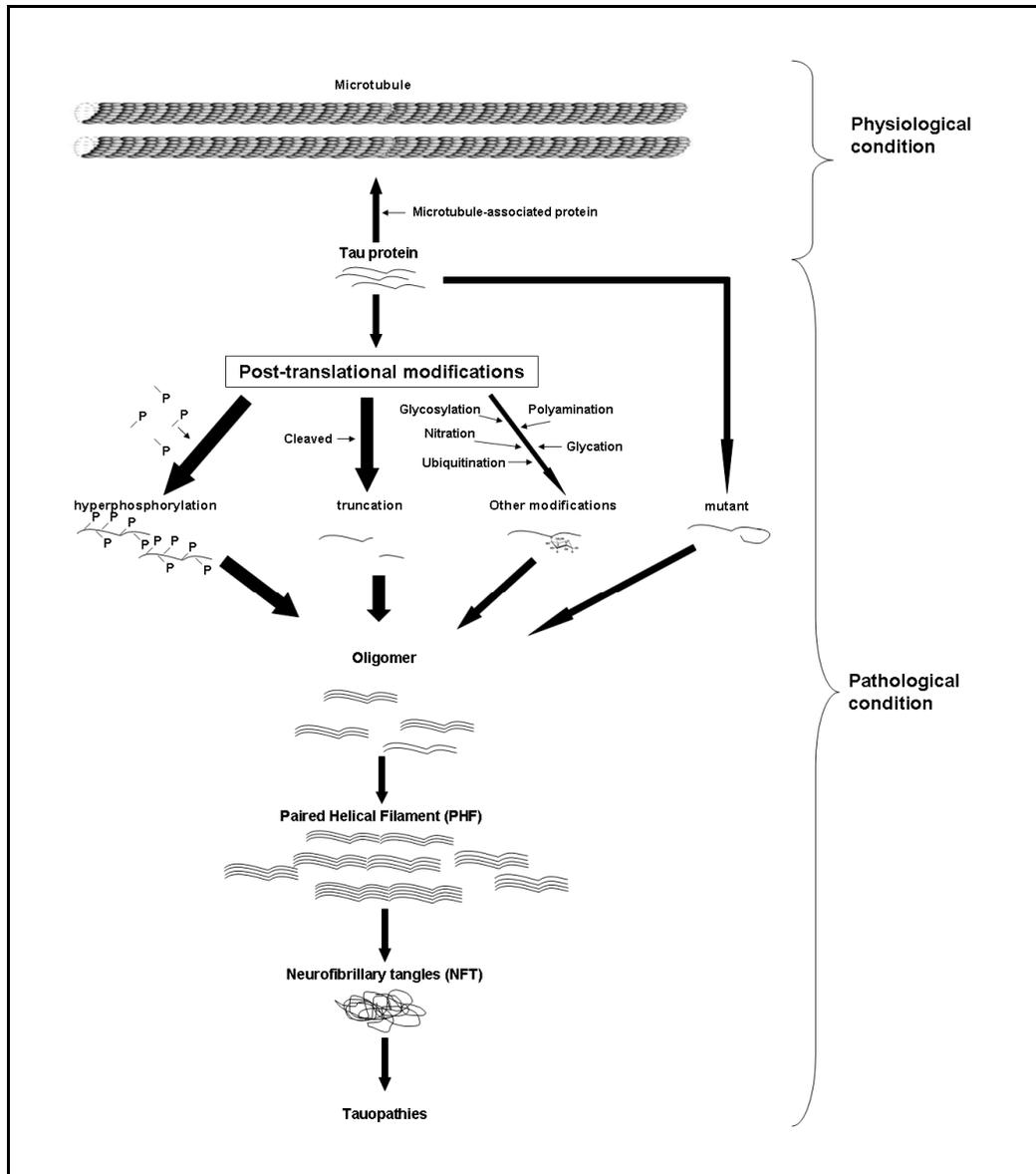


Figura 4.- Agregación patológica de tau. En condiciones patológicas, que pueden incluir mutaciones o modificaciones post-traduccionales, tau se convierte en un estímulo dañino. La forma principal de la función tóxica de tau es aún materia de debate, incluyéndose: pérdida de función de tau normal, formas modificadas de tau monomérica, oligómeros o elementos prefibrilares y PHFs (Farías et al., 2011).

1.5 Inhibidores de la Agregación de Tau

En base a la evidencia del rol patogénico de tau en la EA, una gran cantidad de investigación se está desarrollando para reducir el mal plegamiento o la agregación de tau. Entre las estrategias terapéuticas para reducir la neuropatología mediada por tau se encuentran: i) compensación de la pérdida de función de tau como estabilizadores de microtúbulos, ii) inhibición de la hiperfosforilación de tau mediante compuestos que regulan la actividad de quinasas como Cdk-5 y Gsk-3 β , iii) inhibición de agregación de tau y iv) activación de la degradación intracelular de tau, a través de la modulación de la vía proteosomal y la autofagia (Figura 5) (Brunden et al., 2009). Esta investigación de drogas focalizadas en tau se ha visto potenciada por la búsqueda frustrada de fármacos para la EA basada en la hipótesis amiloide. Estudios recientes dan cuenta del fracaso de los ensayos clínicos con inhibidores de gamma secretasas, en el cual los pacientes en el estudio empeoraron su condición (Extance, 2010), y en la inmunización con anti-amiloide (Rinne et al., 2010; Gandy, 2010).

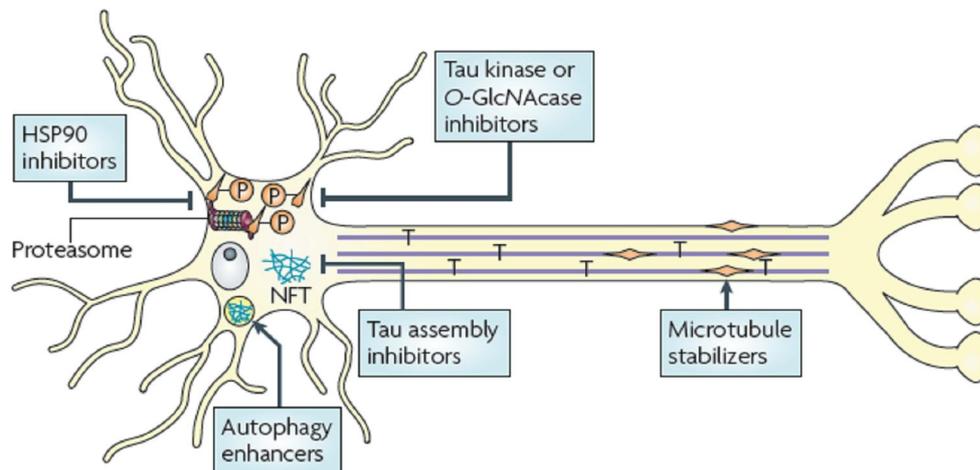


Figura 5.- Estrategias terapéuticas para reducir la neuropatología mediada por tau (Brunden et al., 2009).

El desarrollo de moléculas inhibitoras de la agregación de tau aparece en este contexto como un blanco terapéutico válido en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. El compuesto cloruro de metiltioninio (MTC, también conocido como azul de metileno) de la familia de las fenotiazinas ha sido descrito como un inhibidor de la agregación de tau (Wischnik et al, 1996; Taniguchi et al, 2005). El potencial uso terapéutico de este tipo de drogas se ha visto reforzado gracias a un reciente estudio con dicho compuesto en un ensayo clínico en fase II con 321 pacientes sobre 84 semanas, aún no conocen los avances del estudio fase III. Los resultados preliminares muestran una reducción de 81% del declive cognitivo bajo el uso del compuesto en comparación al placebo (Wischnik et al., 2008).

En los últimos años se ha producido una profusa investigación en la búsqueda de moléculas de bajo peso molecular capaces de inhibir la agregación de la proteína tau *in vitro* e *in vivo* en modelos celulares, así como en el desensamblaje de los PHFs preformados (Bulic et al., 2009). La comprensión de los procesos de autoensamblaje involucrados en la formación de fibrillas y sus mecanismos de inhibición por moléculas pequeñas aún está en sus primeras etapas de estudio. Sin embargo, las características estructurales comunes entre las diferentes clases de compuestos comienzan a emerger, contándose la presencia de grupos aromáticos/hidrofóbicos y elementos de puentes de hidrógeno a lo largo de estructuras planas extendidas (Bulic et al., 2009).

Una de las familias de compuestos descritas por su capacidad antiagregante en la formación de agregados amiloides han sido los polifenoles (Porat et al., 2006). En el caso de tau, polifenoles sintéticos así como polifenoles de origen natural (extractos polifenólicos) han demostrado ser efectivos en inhibir su agregación (Taniguchi et al, 2005; Peterson et al., 2009; Pasinetti et al., 2010).

Uno de los compuestos polifenólicos más interesantes por sus altísimas propiedades antioxidantes y su aparente efecto neuroprotector lo constituye el ácido fúlvico (Ghosal et al, 1993; Wang et al., 1996). El ácido fúlvico es una mezcla de compuestos producto de la degradación microbiana de la lignina, entre otras fuentes, y considerado un componente de las humificaciones (Leenheer, 2007). Se

clasifica como parte de las sustancias húmicas, y se define operacionalmente a partir del protocolo para aislarlos a partir de la fuente natural. Recientemente, se ha descrito la interacción de ácido fúlvico con proteína prion y su efecto inhibitorio en el contenido de estructura sábana β y la formación de agregados proteicos (Corsaro et al, 2010).

Por otra parte, se ha demostrado que ciertas moléculas de la familia de quinolinas tienen afinidad por agregados de htau (Okamura et al, 2005). Estudios en nuestro laboratorio sugieren que moléculas con estructura similar son capaces de inhibir la agregación de tau bovina *in vitro* mediante estudios de microscopía electrónica, turbidimetría y sedimentación (Navarrete, 2008; Tesis de Magíster en Bioquímica UNAB; patente PCT en curso). Sin embargo, aún quedan muchas preguntas abiertas acerca de la capacidad antiagregante de esta familia de moléculas, y así el estudio de nuevos derivados de quinolinas aparece como un objetivo interesante para determinar su real capacidad antiagregante y los mecanismos subyacentes que permiten la inhibición.

En este contexto, se plantea en esta tesis el desarrollo de una metodología para la búsqueda de moléculas con capacidad antiagregante de tau y ensayar compuestos de la familia de quinolinas y compuestos polifenólicos, en particular el ácido fúlvico.

1.6 Hipótesis

En base a los antecedentes expuestos, se propone la siguiente hipótesis: **“Compuestos de la familia de quinolinas y compuestos polifenólicos, en particular el ácido fúlvico, tendrían la capacidad de inhibir la agregación de la proteína tau humana recombinante *in vitro* afectando los procesos de oligomerización y/o formación de estructuras filamentosas”**

1.7 Objetivos

1.7.1 Objetivo General

Estudiar los procesos de agregación de la proteína tau humana recombinante en la presencia de compuestos de la familia de quinolinas y compuestos polifenólicos como el ácido fúlvico y sus posibles mecanismos de la inhibición de la agregación proteica, con miras hacia potenciales aplicaciones biomédicas en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer.

1.7.2 Objetivos Específicos

- 1.- Purificar proteína tau recombinante humana y el fragmento 4RMBD desde cultivos de *E. coli* e inducir la formación de estructuras filamentosas del tipo PHFs *in vitro*.
- 2.- Determinar la capacidad de los compuestos propuestos en la inhibición de la agregación de tau, así como en el desensamblaje de filamentos preformados mediante técnicas de espectroscopia de fluorescencia, microscopía electrónica (TEM) y microscopía de fuerza atómica (AFM).

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Materiales

2.1.1 Biológicos

Cepas bacterianas: *Escherichia coli* DH5 α , *Escherichia coli* XL1-Blue (Stratagene, USA) y *Escherichia coli* BL21(DE3).

2.1.2 Reactivos

2.1.2.1 Anticuerpos

Tau5, que reconoce tau total entre el aa 210-230 (donado gentilmente por el Dr. Lester Binder, Northwestern University, Chicago, USA).

Tau1, que reconoce tau total desfosforilada en el epitopo Ser202/205 (donado gentilmente por el Dr. Lester Binder, Northwestern University, Chicago, USA)

Tau12, que reconoce el extremo amino-terminal de tau humana (donado gentilmente por el Dr. Lester Binder, Northwestern University, Chicago, USA)

Anti-Mouse IgG conjugado a peroxidasa de rábano-HRP (Santa Cruz Biotechnology)

2.1.2.2 Plasmidios

pNG2/htau40 (donado por gentilmente por el Dr. E. Mandelkow, Max Plank Institute, Alemania)

pNG2/htau24 (donado por gentilmente por el Dr. E. Mandelkow, Max Plank Institute, Alemania)

pET-3a (Novagen, USA)

pET-28a(+) (Novagen, USA)

2.1.2.3 Reactivos para clonamiento de htau24 y htau40 en vectores de expresión bacteriana.

BamHI 10 u/ μ L (Fermentas, USA), NdeI 10 U/ μ L (Fermentas, USA), amortiguador BamHI+ 10X (Fermentas, USA), T4 DNA ligasa (Fermentas, USA), amortiguador T4

DNA ligasa 10X (Fermentas, USA), Agua Nanopura, E. Z. N. A. Gel Extraction Kit (200)

2.1.2.4 Reactivos para clonamiento del fragmento 4RMBD en vectores de expresión bacteriana.

Amortiguador 5X *phusion HB*, 4R Forward (0,1 µg/µL) y primer 4R Reverse (0,1 µg/µL), polimerasa *phusion* (NEB F-530S, USA), QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Inc., USA), Amortiguador 2 de restricción 10X (New England BioLabs, USA), NdeI 20 U/uL (New England Biolabs, USA), BamHI 20 U/uL (New England Biolabs, USA), BSA (New England Biolabs, USA) 100X, H₂Odd filtrada, polimerasa *phusion* (NEB F-530S, USA).

2.1.2.5 Reactivos para geles de agarosa DNA

Agarosa, bromuro de etidio

2.1.2.6 Reactivos para aislamiento de plasmidios

QIAprep Spin Miniprep Kit (50) (Qiagen Inc., USA).

2.1.2.7 Reactivos para purificación de proteínas

SP-Sepharose (GE Healthcare, USA), *Sephacryl S-200 HR* (GE Healthcare, USA),

Ni-Sepharose (GE Healthcare, USA)

2.1.2.7 Reactivos para cuantificación de proteínas

Reactivo de Bradford (Biorad, USA)

2.1.2.8 Moléculas ensayadas en la inhibición de la agregación de tau

Inductor: Heparina (Calbiochem, USA)

- Quinolinas:

2-(4-Aminofenil)-6-metilquinolina (THQ-55)

2-Benzo[1,3]dioxol-5-yl-6-methoxy-quinolina (Q3)

1-(2Benzo[1,3]dioxol-5yl-quinolin-6yl)-etanona (Q4)

6-Metoxi-2-piridin-3-yl-quinolina (Q5)

- Azul de metileno (Sigma Aldrich, USA)

- Ácido fúlvico Suwannee River I 1S101F (Internacional Humic Substances Society, USA).

2.1.3 Soluciones

2.1.3.1 Medios de Cultivo Bacteriano

Medio LB

Medio SOB

Medio SOC

2.1.3.2 Soluciones de generación de bacterias competentes.

Amortiguador de Células Competentes (CC): 100 mM KCl, 50 mM $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10% glicerol y 10 mM acetato de potasio, pH 6,2

2.1.3.3 Soluciones para la purificación de htau recombinante

a) Purificación por cromatografía de intercambio catiónico y exclusión molecular

Amortiguador de Extracción: 50 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 0,2 mM MgCl_2 , 5 mM DTT,

1 mM PMSF, 2 mM benzamidina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ leupeptina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pepstatina A y 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aprotinina, pH 8,0

Amortiguador de intercambio A: 20 mM MES, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl_2 , 2 mM DTT, 0,1 mM PMSF, pH 6,8

Amortiguador de intercambio B: 20 mM MES, 1 M NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0,1 mM PMSF, pH 6,8

Amortiguador de Exclusión Molecular: PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4) con 1 mM DTT, pH 7,4.

b) Purificación por IMAC y SEC-HPLC

Amortiguador de extracción: 20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Imidazol, 500 mM NaCl, 1 mM PMSF, pH 7,4 suplementado con cocktail de inhibidor de proteasas EDTA-free (Roche).

Amortiguador de unión: 20 mM NaH₂PO₄, 20 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH 7,4

Amortiguador de lavado: 20 mM NaH₂PO₄, 30 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH 7,4

Amortiguador de elución: 20 mM NaH₂PO₄, 200 mM Imidazol, 500 mM NaCl, pH 7,4

SEC-HPLC:

Amortiguador de SEC-HPLC: 20 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, pH 6,5 (filtrado)

2.1.3.4 Soluciones para la agregación de htau

Amortiguador de agregación

PBS (137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,4)

10 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 7,4 (htau40)

20 mM Hepes, 25 mM KCl, pH 7,4 (4RMBD)

20 mM Hepes, 25 mM NaCl, pH 7,4 (4RMBD)

Dynamic Light Scattering (DLS)

Amortiguador de agregación DLS: 50 mM Tris-HCl, 400 μM DTT, pH 7,6

Estudios de microscopia de fuerza atómica (AFM)

Amortiguador de adsorción

20 mM Hepes, pH 7,4 (modo *tapping* aire)

10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 7,4 (modo *tapping* fluido)

Amortiguador de visualización

10 mM Tris-HCl, 50 mM, pH 7,4 (htau40)

10 mM Tris-HCl, 300 mM, pH 7,4 (4RMBD)

2.1.4 Materiales

Columna Proteema 100 5µm (PSS, Alemania)

Cubetas de cuarzo

Cubetas de plástico (Brand, USA)

Columnas de plástico purificación proteínas (Sigma, USA)

Columna de vidrio purificación proteínas (Sigma, USA)

2.1.5 Equipos

2.1.5.1 Equipos para clonamiento de tau en vectores de expresión

Transiluminador UV Dyna Light (Labnet, USA), Cámara Kodak Digital Science

(Kodak, USA), Termociclador Eppendorf (Eppendorf, Alemania), Baño

Termoregulado Felisa (TLC, Chile), Centrífuga 5403 (Eppendorf, Alemania),

Incubador Memmert (Cientec, Instrumentos Científicos S.A.)

2.1.5.2 Equipos para expresión y purificación de tau

Incubador con agitación Zhichery ZHWY-100B (Zhichery, China), Sonicador

Ultrasonic Processor (USA), Sonicador BRANSON Digital Sonifier (USA),

Ultracentrífuga Sorvall UltraPro⁸⁰ (Sorvall, USA), Centrífuga Rotina 35R (Hettich

Zentrifugen, Alemania), Bomba Peristáltica Masterflex (Clever, UK), Sistema HPLC

Hitachi compuesto por *Autosampler* Hitachi VWR L-2200, bomba cuaternaria Hitachi

VWR L-2130, detector UV-Visible Hitachi Merck L-2420 y organizador Hitachi VWR (Hitachi, Japón).

2.1.5.3 Equipos para estudios de agregación de tau *in vitro* y su inhibición

Horno Agitador Hybaid (USA), Microscopio Electrónico de Transmisión EM1200 (Jeol Ltda. Tokio, Japón), Microscopio de Fuerza Atómica Nanoscope III (Di Veeco, USA), Fluorímetro Biotek Sinergy 2 (Biotek Instruments, USA), Equipo Dynamic Light Scattering (USA).

2.1.5.4 Otros equipos

Balanza granataria electrónica, Balanza Analítica (Denver Instrument Company, USA), pHmetro (LabTec, Chile), Agitador magnético termorregulado Sigma (Sigma, USA), Agitador Orbital BioScan OS-20 (LabTec; Chile), Vortex (LabTec), Lector Absorbancia Placas de ELISA Sunrise (Tecan, USA), Espectrofotómetro UV-Visible Cary50 Conc (Varian, USA), Fuente de Poder Bio-RadPower Pac 200 (Bio-Rad, USA), Cámara Electroforética Mini-Protean Tetra System (Bio-Rad, USA), Microondas (LG), Refrigerador común (Fensa), Refrigerador -20°C (Electrolux), Refrigerador -80°C, Vitrina 4°C (Mimet, Chile) .

2.2 Métodos

2.2.1 Clonamiento de htau en vectores de expresión bacteriana

Las secuencias de las isoformas de htau40 (2N4R) y htau24 (0N4R) contenidas en los vectores pNG2/htau40 y pNG2/htau24 (gentilmente donados por E. Mandelkow, Max Plank Institute, Alemania) fueron escindidas y subclonadas en los vectores de expresión bacteriana pET-3a (Novagen, USA) y pET-28a (Novagen, USA), este último contiene una secuencia de polihistidina en el extremo amino-terminal que facilita su purificación por IMAC.

2.2.1.1 Digestión Enzimática: Para un volumen de 200 μL de reacción de digestión del pNG2/htau24 y pNG2/htau40, se agregaron 40 μL del plasmidio, 20 μL de amortiguador 10X BamHI+, 4 μL de NdeI (10 U/ μL), 4 μL de BamHI (10 U/ μL) y 132 μL de agua nanopura. Para la digestión del vector pET-3a y pET-28(+) se agregaron 40 μL de vector purificado, 20 μL de amortiguador 10X BamHI+, 4 μL de NdeI (10 U/ μL), 4 μL de BamHI (10 U/ μL), y agua nanopura para completar 200 μL de volumen final. Las mezclas se incubaron a 37°C toda la noche. El producto de digestión de tamaño esperado se separó mediante geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y se purificó la banda correspondiente con un kit comercial (E.Z.N.A.) según las instrucciones del fabricante.

2.2.1.2 Reacción de Ligación: Se realizó mezclando 4 μL del vector digerido con 6 μL de inserto, agregando 2 μL de amortiguador T4 DNA ligasa 10X y 1 μL de T4 DNA ligasa (Fermentas) y agua nanopura para completar 20 μL de volumen final. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 3 hrs. Posteriormente, se realizó la transformación de las bacterias competentes con el producto de ligación.

2.2.1.3 Generación de bacterias competentes: Las cepas bacterianas de *Escherichia coli* DH5 α y BL21(DE3) fueron crecidas en placas de LB-agar. A partir de una colonia de cada tipo de bacteria se inocularon 5 mL de medio LB dejándolas

crecer toda la noche a 37°C con agitación constante (220 rpm aprox.). Al día siguiente, con 2,5 mL de este cultivo se inocularon 250 mL de medio LB. Se crecieron a 37°C con la misma agitación hasta alcanzar DO a 600 nm entre 0,4 – 0,6, para luego enfriar en hielo por 30 min y centrifugar las bacterias a 3.000 rpm (1.200xg) por 15 min a 4°C. Las bacterias se resuspendieron en 80 mL de amortiguador de células competentes (CC) frío, que contiene cloruro de calcio, y se incubaron en hielo por 30 min. Enseguida, las bacterias se volvieron a centrifugar a 3.000 rpm (1.200xg) por 15 min a 4°C y se resuspendieron en 20 mL de amortiguador CC, se alicuotaron en volúmenes de 400 µL en tubos *Eppendorf* y se congelaron para su uso posterior a -80°C.

2.2.1.4 Transformación de bacterias competentes: Las células competentes se descongelaron en hielo y se mezclaron 400 µL de esta suspensión de bacterias competentes con 10 µL de producto de ligación o 5 µL de plasmidio (100 ng de DNA aprox.). Esta mezcla se dejó reposar 30 min en hielo y luego, se incubó por 45-60 seg a 42°C en un baño termostático y enseguida se dejó enfriar por 2 min en hielo. Se agregó 1 mL de medio LB y se dejó incubando a 37°C por 1 hora con agitación constante (220 rpm aprox.). A continuación, las bacterias se concentraron centrifugando a 4000 rpm por 5 min hasta un volumen de 100 µL aprox. y sembraron en placas LB-agar que contenían ampicilina (100 µg/mL) para el plasmidio pET-3a y kanamicina (30 µg/mL) para el plasmidio pET-28a(+).

Las placas LB-agar se incubaron a 37°C por 24 horas y se tomaron al menos tres colonias al azar para analizar la presencia del inserto de htau40 o htau24 por ensayo de restricción con las enzimas correspondientes, previa purificación del DNA plasmidial con el sistema *QIAprep Spin Miniprep Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante. Las colonias que contenían el inserto fueron enviadas a secuenciar para comprobar la secuencia de las isoformas de tau. Los plasmidios con las secuencias correctas fueron almacenados a -20°C y *stocks* de bacterias transformadas con los plasmidios pET-3a y pET-28a con las secuencias de htau fueron almacenadas en glicerol 20% (v/v) a -80°C.

2.2.2 Clonamiento de 4RMBD en vectores de expresión bacteriana

La secuencia codificante del fragmento de 4RMBD (htau₂₄₄₋₃₇₂) fue amplificado mediante PCR a partir del vector que contiene el gen de htau40 como templado. Este fragmento de 4RMBD fue subclonado en el vector de expresión bacteriano pET-28a(+) (Novagen, USA), el cual contiene una secuencia de polihistidina en el extremo amino-terminal que facilita su purificación por IMAC.

2.2.2.1 Amplificación del fragmento de 4RMBD por PCR: Para la amplificación de la secuencia codificante del fragmento de 4RMBD se diseñó la siguiente pareja de partidores que contienen los sitios de restricción de NdeI y BamHI:

Tabla 1.- Partidores Amplificación 4RMBD

Nombre	Secuencia (5' – 3')	Sitio de restricción
4R Forward	GGAATTCATATGCAGACAGCCCCCGTGCCCATG	NdeI
4R Reverse	CGCGGATCCTTATTCAATCTTTTTATTTCTCCGCCAG	BamHI

Para la amplificación por PCR se preparó la siguiente mezcla de reacción en volumen final de 50 µL: 34,6 µL de H₂O dd filtrada, 10 µL de amortiguador 5X *phusion* HB, 2 µL de templado, 1 µL de primer 4R Forward (0,1 µg/µL), 1 µL primer 4R Reverse (0,1 µg/µL), 0,4 µL de dNTPs (25 mM) y un 1 µL de polimerasa *phusion*. Se utilizó el siguiente programa de termociclación: una primera etapa de 30 seg a 98°C, una segunda etapa de 30 ciclos de 20 seg a 98°C, 30 seg a 60°C y 30 seg a 72°C y una tercera etapa final de 10 min a 72°C.

Para verificar la presencia del producto de PCR de tamaño esperado se corrió un gel de agarosa al 1% con tinción posterior con bromuro de etidio. El producto de PCR obtenido fue purificado con un kit comercial (QIAquick PCR Purification Kit) según las instrucciones del fabricante.

2.2.2.2 Digestión Enzimática: Para un volumen de 50 μL de reacción de digestión del fragmento de 4RMBD, se agregaron 25 μL de producto de PCR purificado, 5 μL de amortiguador 2 de restricción 10X (New England BioLabs), 0,5 μL de NdeI (20 U/ μL), 0,5 μL de BamHI (20 U/ μL), 0,5 μL de BSA 100X y 18,5 μL de H_2O dd filtrada. Para la digestión del vector pET-28a(+) se agregaron 4 μg de vector purificado, 5 μL de amortiguador 2 de restricción 10X (New England BioLabs), 1 μL de NdeI (20 U/ μL) , 1 μL de BamHI (20 U/ μL), 0,5 μL de BSA 100X y H_2O dd filtrada para completar 50 μL de volumen final. Las mezclas se incubaron por 4 hrs. a 37°C. El producto de digestión de tamaño esperado se separó mediante geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio y se purificó la banda correspondiente con un kit comercial (QIAquick Gel Extraction Kit) según las instrucciones del fabricante.

2.2.2.3 Reacción de Ligación: Se realizó mezclando 150 ng del vector digerido con 26 ng de inserto, agregando 1 μL de amortiguador T4 DNA ligasa y 0,5 μL de T4 DNA ligasa y H_2O dd filtrada para completar 10 μL de volumen final. Se incluyó un control negativo sin inserto en la reacción de ligación. La mezcla se incubó en un baño termostático a 16°C por 4 hrs.

2.2.2.4 Transformación de células competentes: Se transformaron 50 μL de bacterias competentes XL1-Blue (Stratagene, USA) con 5 μL del producto de ligación y a su vez, con 5 μL del control negativo según las instrucciones del fabricante. Las bacterias se sembraron en placas LB-agar que contenían kanamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Las placas LB-agar se incubaron a 37°C por 24 hrs. Al día siguiente, se picaron entre seis y ocho colonias al azar para analizar la presencia del inserto de 4RMBD por ensayo de restricción con las enzimas correspondientes, previa purificación del DNA plasmidial con el sistema *QIAprep Spin Miniprep Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las colonias que contenían el inserto fueron enviadas a secuenciar para comprobar la secuencia de 4RMBD. Los plasmidios con las secuencias correctas

fueron almacenados a -20°C y stocks de bacterias transformadas con el plasmidio pET-28a(+)/4RMBD fueron almacenadas en glicerol 20% (v/v) a -80°C.

2.2.3 Expresión de isoformas de proteína htau recombinante

2.2.3.1 Control de la Expresión de htau recombinante: Una colonia de *E coli* BL21 (DE3) transformada con cada uno de los plasmidios que contenían las secuencias de htau24 y htau40 se creció a 37°C en un tubo con 5 mL de medio LB con el respectivo antibiótico de selección hasta alcanzar una DO a 600 nm de 0,6 aproximadamente. Posteriormente se indujo la expresión de las isoformas de htau recombinante por 2 horas a 37°C con 1 mM de IPTG y se centrifugó a 3.000xg por 10 min a 4°C. Se utilizaron como controles negativos bacterias transformadas con el vector sin inserto y bacterias no transformadas, en ausencia o presencia de IPTG, respectivamente. Como control positivo de inducción se utilizó el control de inducción A (β -galactosidasa, Novagen, USA).

2.2.3.2 Preparación y análisis de los extractos proteicos: Los pellets obtenidos fueron tratados con 500 μ L de amortiguador de resuspensión de células, sonicados por 30 a 60 seg a máxima potencia en sonicador *Ultrasonic Processor* y centrifugados a 11.000 rpm (13.500xg). Se separaron las fracciones solubles e insolubles para analizar la presencia de htau en cuerpos de inclusión y generalmente, se midió la concentración de proteínas totales por el método de Bradford. Con el objeto de verificar la inducción y tamaño molecular de las isoformas de htau recombinante, estas fracciones fueron analizadas por separado mediante geles de SDS-PAGE al 12% teñidos con azul de *Coomassie* y *Western Blot* con el anticuerpo Tau5, y en algunos casos, con los anticuerpos Tau1 y Tau12.

2.2.3.3 Optimización de la expresión de htau recombinante: Para optimizar la expresión de htau recombinante, se probaron distintas condiciones para la inducción de la expresión de htau en *E. coli* BL21(DE3) transformada con el plasmidio pET-3a/htau40 y pET-3a/htau24. Se realizaron ensayos de expresión a

distintos tiempos de inducción a 37°C, concentraciones crecientes de IPTG y se probó la inducción a distintas DO a 600 nm para evaluar el comportamiento de la expresión proteica.

2.2.4 Purificación de htau recombinante desde cultivos de *E.coli*

2.2.4.1 Purificación de htau por cromatografía de intercambio y exclusión molecular

Para purificar htau recombinante se siguió el protocolo de Barghorn et al. (2005) con algunas modificaciones, que incluye etapas de cromatografía de intercambio catiónico y de cromatografía de exclusión molecular. A partir de un stock de células de *E. coli* BL21(DE3) transformadas con los plasmidios de expresión pET-3a/htau24 y pET-3a/htau40 se inoculó un cultivo de 50 mL de medio LB con ampicilina 100 µg/mL, que se dejó crecer toda la noche a 37°C. A la mañana siguiente, se inoculó con 20 mL de este cultivo 1 L de medio LB con ampicilina 100 µg/mL y se cultivó a 37°C con agitación constante (220 rpm) hasta alcanzar DO a 600 nm entre 0,5 y 0,6 y se indujo la expresión con 1 mM de IPTG durante 3 horas y posteriormente, el cultivo fue centrifugado a 5.000 rpm (3.000xg) durante 10 min. En algunos casos, se congelaron los pellets a -80°C hasta su posterior tratamiento uno o dos días después. Los pellets fueron resuspendidos con 100 mL de amortiguador de resuspensión de células frío que contiene inhibidores de proteasa, y fueron sonicados en sonicador *Ultrasonic Processor* en hielo con 8 a 10 pulsos de 30 seg a máxima potencia.

Como primera etapa de purificación, se utilizó la propiedad de termoestabilidad de htau. Para ello, al extracto total de proteínas se agregaron 2,92 g de NaCl para alcanzar la concentración final de 500 mM y se hirvió durante 20 min. Enseguida, se centrifugó a 127.000xg por 40 min a 4°C en ultracentrífuga Sorvall y el sobrenadante fue dializado toda la noche contra 2 L de amortiguador de cromatografía de intercambio A a 4°C en constante agitación con recambio del amortiguador al día siguiente.

Como segunda etapa de purificación, se preparó una columna de intercambio catiónico de *SP-Sepharose* (volumen aproximado 20 mL) que fue equilibrada con 10 volúmenes de columna (VC) de amortiguador de intercambio A. El dializado fue cargado en la columna a un flujo aproximado de 0,2 mL/min toda la noche a 4°C. Luego, se lavó la columna con un flujo 1 mL/min con al menos 5 VC de amortiguador de intercambio A y las proteínas unidas a la columna fueron eluidas a igual flujo con un gradiente de fuerza iónica en 6 VC entre amortiguador de intercambio A y amortiguador de intercambio B, recolectando fracciones de 5 mL y analizando la presencia de proteínas por absorbancia a 280 nm. Las fracciones fueron analizadas por *Dot Blot* con anticuerpo Tau5 y aquellas htau positivas fueron recolectadas y concentradas en tubos Millipore (10 kDa) hasta un volumen de 1 mL.

Como tercera etapa de purificación, se preparó una columna de exclusión molecular de Sefacril 200-HR de volumen aproximado de 35 mL (razón altura/diámetro= 45), que fue equilibrada con 10 volúmenes de columna (VC) de amortiguador de exclusión molecular. La proteína concentrada se aplicó sobre la columna y se eluyó a un flujo de 0,15 mL/min con amortiguador de exclusión molecular recolectando fracciones de 1,5 mL. Se analizó la presencia de proteínas por absorbancia a 280 nm y geles de SDS-PAGE al 12%. Aquellas fracciones con calidad de pureza deseada fueron recolectadas y guardadas a -20°C hasta su uso posterior. Las fracciones que contenían htau, pero sin la calidad deseada, fueron agrupadas y concentradas en tubos Millipore (10 kDa) hasta 1 mL para ser sometidas a un segundo paso de cromatografía de exclusión molecular según lo descrito.

2.2.4.2 Purificación de htau por IMAC y SEC-HPLC

Para purificar htau recombinante unida un hexapéptido de histidina (Carmel et. al, 1996) se incluyó una etapa de IMAC y una etapa de cromatografía de exclusión molecular acoplada a HPLC (SEC-HPLC). A partir de un stock de células de *E. coli*

BL21(DE3) transformadas con los plasmidios de expresión pET-28a(+)/htau24 y pET-28a(+)/htau40 se inoculó un cultivo de 50 mL de medio LB con kanamicina 100 µg/mL, que se dejó crecer toda la noche a 37°C. A la mañana siguiente, se inoculó con 20 mL de este cultivo 1 L de medio LB con kanamicina 30 µg/mL y se dejó crecer a 37°C con agitación constante (220 rpm) hasta alcanzar DO a 600 nm entre 0,5 y 0,6 y se indujo la expresión con 1 mM de IPTG durante 4 horas y posteriormente, el cultivo fue centrifugado a 5000 rpm (3.000xg) durante 10 min. Se congelaron los pellets a -80°C hasta su posterior tratamiento al día siguiente. Los pellets fueron resuspendidos con 10 mL de amortiguador de extracción frío que contiene inhibidores de proteasa, y fueron sonicados en equipo BRANSON Digital Sonifier en hielo con 15 pulsos de 20 seg, descansos de 1 min y amplitud del 20%. El extracto total de proteínas fue centrifugado a 11.000 rpm (15800xg) por 30 min a 4°C.

Como primera etapa de purificación, se preparó una columna de *Ni-Sepharose* de 3 mL de volumen, que fue equilibrada con 10 volúmenes de columna (VC) de amortiguador de unión. El sobrenadante del extracto total de proteínas centrifugado se dejó en contacto con la resina en agitación durante 1 hora a 4°C en tubo Falcon de 50 mL. Luego se rearmó la columna, se dejó pasar por gravedad el flujo que no unido, y se lavó con 10 VC de amortiguador de lavado a flujo de 1 mL/min y enseguida, las proteínas unidas a la columna fueron eluidas a igual flujo con 5 VC de amortiguador de elución, recolectándose fracciones de 3 mL aprox. Aquéllas que contenían proteína se agruparon y concentraron en tubos Milipore (10 kDa) hasta un volumen de 1 mL, dializándose contra 1 L de amortiguador de SEC-HPLC toda la noche a 4°C con agitación constante.

Como segunda etapa de purificación, se utilizó el sistema de cromatografía de exclusión molecular acoplado a HPLC (SEC-HPLC), utilizándose la columna Proteema 100 5 µm (PSS, Alemania) en sistema HPLC Hitachi. La columna fue equilibrada por 30 min con amortiguador de SEC-HPLC a flujo de 0,5 mL/min antes de ser utilizada y se cargaron 100 µL de muestra dializada por cada inyección,

eluyéndose a igual flujo con detección automática de absorbancia a 215 nm. Según el cromatograma generado, se aislaron fracciones que correspondían a la proteína htau con el grado de pureza deseado. El mismo proceso se repitió hasta pasar por la columna el volumen total de la muestra dializada, y todas las fracciones purificadas fueron agrupadas y concentradas en tubos Milipore (10 kDa) hasta un volumen final entre 1 y 2 mL. Finalmente, la proteína htau purificada de esta forma se dializó contra el amortiguador de agregación a utilizar y se midió la concentración mediante el coeficiente de extinción molar a 280 nm ($\epsilon = 7700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La muestra fue alicuotada y almacenada a -20°C hasta su uso posterior.

2.2.4.3 Purificación de 4RMBD por IMAC y SEC-HPLC

Para purificar 4RMBD recombinante unida un hexapéptido de histidina se siguió el protocolo de Yao et al. (2003) con algunas modificaciones, que incluyó una etapa de IMAC y una etapa de cromatografía de exclusión molecular acoplada a HPLC (SEC-HPLC). A partir de un stock de células de *E. coli* BL21 (DE3) transformadas con el plasmidio de expresión pET-28a(+)/4RMBD, se siguió el mismo protocolo de purificación de htau recombinante con hexapéptido de histidina, con la excepción que en la etapa de elución de la columna de *Ni-Sepharose* el amortiguador de elución contenía una mayor concentración de imidazol (300 mM). Finalmente, el fragmento 4RMBD purificado de esta forma se dializó contra el amortiguador de agregación a utilizar y se midió la concentración mediante el coeficiente de extinción molar a 280 nm ($\epsilon = 1520 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). La muestra fue alicuotada y almacenada a -20°C hasta su uso posterior.

2.2.5 Estudios de agregación de htau *in vitro*

2.2.5.1 Inducción de la agregación de htau *in vitro* con heparina

Para la inducción de la agregación de las distintas isoformas de htau *in vitro* se utilizó el método de Friedhoff et al. (1998) que utiliza el inductor polianiónico heparina en la relación proteína inductor 4:1.

En el caso de las isoformas de htau40 y htau24 las condiciones de polimerización fueron las siguientes: se prepararon 100 μL de 50 μM de htau y heparina 12,5 μM en el amortiguador de agregación indicado. La mezcla de reacción se dejó en agitación constante a 37 °C por al menos una semana (de 7 a 10 días según se especifique). Como control negativo se incubó la proteína en ausencia de inductor.

En el caso del fragmento 4RMBD las condiciones de polimerización fueron las siguientes: se prepararon 100 μL de 40 μM de 4RMBD y heparina 10 μM en amortiguador de agregación indicado. La mezcla de reacción se dejó en agitación constante a 37°C por 24 horas. Como control negativo se incubó la proteína en ausencia del inductor.

2.2.5.2 Estudios de agregación de htau40 por fluorescencia con Tioflavina S (ThS)

La agregación de htau40 fue monitoreado por fluorescencia con Tioflavina S (ThS) según lo descrito por Friedhoff et al. (1998) y Barghorn et al. (2005) con modificaciones. Brevemente, a partir de 300 μL de htau40 en agregación con heparina en PBS, se extrajeron alícuotas para evaluar la formación de agregados a distintos tiempos. En una placa de 96, se prepararon 100 μL por pocillo que contenían 15 μM de proteína y 6,25 μM de ThS en PBS y se incubó durante una hora a temperatura ambiente en oscuridad para permitir la unión de la sonda fluorescente con las estructuras de sábana- β formadas. Enseguida, se midió la

fluorescencia en equipo Biotek Sinergy 2 (Biotek Instruments, USA) con excitación a 440 nm y emisión a 508 nm (filtro de excitación de 440/30 y filtro de emisión a 508/20), descontando la fluorescencia basal del blanco incubado en las mismas condiciones. Como control negativo de agregación se incubó la proteína en ausencia del inductor.

2.2.5.3 Estudios de agregación de htau40 y 4RMBD por *dynamic light scattering* (DLS)

Los estudios de *dynamic light scattering* (DLS) fueron realizados en colaboración en el Dr. George Perry (UTSA, Texas, USA) y la Dra. Eileen Lafer (UTHCSA, Texas, USA). Mediante DLS se estudiaron las formas de tau en solución y en el proceso de agregación inducido por heparina. Htau40 fue estudiada en PBS a concentración de 25 μM e induciendo su agregación con heparina a 6,25 μM . El estudio de 4RMBD se basó en lo descrito por Sugino et al. (2009), a saber, el fragmento 4RMBD fue preparado diluyendo un stock concentrado en amortiguador de agregación DLS. Se adicionan 6 μL de heparina 4 μM (0,4 μM final) a 54 μL de 4RMBD diluido a concentración final de 10 μM , esta mezcla fue transferida a una cubeta de cuarzo y la intensidad de DLS fue medida a la temperatura ambiente (22°C) por 2,5 horas en el equipo. Como control negativo de agregación se midió la intensidad de DLS en ausencia del inductor. Todos los amortiguadores ocupados en estos estudios fueron filtrados con membrana de 0,22 μm , y las muestras de proteínas se centrifugaron a 100.000 rpm (609.000xg) durante 10 min a 4°C en ultracentrífuga Optima max-E previo a cada medición para eliminar las microburbujas. Los datos fueron analizados con el software Dynamics 6,0 proporcionado por el fabricante del equipo.

2.2.6 Caracterización microscópica de agregados de htau

2.2.6.1 Estudios de microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Los agregados de htau fueron visualizados a través de microscopía electrónica de transmisión (TEM) mediante tinción negativa con acetato de uranilo. Para ello, 10 μL de muestra fueron depositadas en grillas de cobre de 300-mesh cubiertas con una película de *parlodion* y vapor de carbono o grillas de cobre de 300-mesh cubiertas con una película de *formvar* y vapor de carbono. Las muestras fueron adsorbidas por 1 min sobre estas grillas, siendo el exceso de proteína removido con papel filtro y luego, se depositaron 10 μL de acetato de uranilo al 2% durante 10-15 seg y se dejó secar un par de minutos. En el caso de los agregados de 4RMBD, se lavó una vez con amortiguador de adsorción. La solución de acetato de uranilo fue preparada al momento de usar y filtrada a través de membrana de 0,22 μm .

Las grillas preparadas se examinaron en microscopio electrónico de transmisión EM1200 (Jeol Ltda. Tokio, Japón) a 80 kV. Las muestras fueron observadas con distintas magnificaciones (de 5.000X a 40.000X), recorriendo distintas zonas y tomando entre 5-10 fotografías de campos representativos con presencia de filamentos o agregados de proteína tau.

2.2.6.1 Estudios de microscopía de fuerza atómica (AFM)

Los estudios de AFM fueron realizados en colaboración con el Dr. Francisco Melo y el Dr. Leonardo Caballero de la Universidad de Santiago de Chile.

La inmovilización de la muestra sobre mica y HOPG se basó en lo descrito por Wegmann et al. (2010). La muestra de tau fue diluida en amortiguador de adsorción a una concentración de 5-10 μM . Una gota ($\sim 20 \mu\text{L}$) de la solución de tau fue colocada sobre una mica cortada recientemente o HOPG para permitir la adsorción de la muestra por 15 min aproximadamente. El exceso de proteína fue removido

lavando la muestra con amortiguador de visualización. Para optimizar la formación la visualización de fibrillas de tau, este amortiguador se varió en las concentraciones de electrolito (0-50-300 mM KCl). En el caso de las muestras absorbidas en mica son analizadas en el modo de aire. En el caso de HOPG las muestras son analizadas en fluido.

La generación de imágenes de AFM fue realizada en modo *tapping* (contacto intermitente) ya sea en seco o en fluido usando un equipo Nanoscope III (Di-Veeco, USA) y *cantilever* de Si₃N₄ (NPS series, Di-Veeco, USA) exhibiendo constantes de fuerza de 40-60 N/m a frecuencias de resonancia en amortiguador de 8,5 -10 kHz. Para alcanzar las fuerzas mínimas de visualización entre la aguja del AFM y la muestra, la amplitud de conducción fue establecida entre 0,5 y 1,0 V y la amplitud del punto de inicio fue ajustada manualmente para compensar el corrimiento térmico del AFM. El análisis de las imágenes obtenidas fue realizado utilizando el programa proporcionado por el proveedor del equipo.

2.2.7 Estudios de inhibición de la agregación de htau

2.2.7.1 Obtención y disolución de los compuestos estudiados

Las moléculas de la familia de quinolinas utilizadas en esta tesis han sido proporcionadas por el Dr. Luis Astudillo, Laboratorio de Síntesis Orgánica, Universidad de Talca. Para detalles sobre la síntesis y la pureza de las muestras véase Anexo 1. El estándar de ácidos fúlvicos (Suwanne River I 1S101F) fue obtenido de la *Internacional Humic Substances Society*, USA. Azul de metileno fue obtenido de Sigma Aldrich.

Las quinolinas fueron disueltas en DMSO preparándose soluciones stock de 10 mM, de las cuales se prepararon diluciones seriadas y se disolvieron en el medio de agregación hasta ajustar una concentración de 1% DMSO (v/v). Azul de metileno y

el estándar de ácidos fúlvicos fueron disueltos en agua preparándose soluciones stock de 10 mM o 20 mM, de las cuales se prepararon diluciones seriadas en el amortiguador de trabajo que se probaron en los ensayos de agregación.

2.2.7.2 Ensayo de fluorescencia con TioflavinaT (ThT) para el *screening* de moléculas antiagregantes y desagregantes de tau

El ensayo para el *screening* de moléculas con potencial antiagregante de tau se basó en lo descrito por el grupo de E. Mandelkow (Pickhardt et al., 2005) y V. Lee (Crowe et al., 2007), con algunas modificaciones. La mezcla de reacción incluyó 20 μM de 4RMBD, el compuesto con potencial antiagregante a distintas concentraciones y 5 μM de heparina en amortiguador acetato de sodio 100 mM pH 7,0 en un volumen final de 100 μL . La mezcla se preparó en placa de 96 pocillos y se dejó incubar en agitación por 20 horas a 37°C. Posteriormente, se adicionaron 100 μL de una solución de ThT 25 μM por pocillo y se dejó en agitación una hora a temperatura ambiente en oscuridad para permitir la unión de la sonda fluorescente con las estructuras de sábana- β formadas. Enseguida, se midió la fluorescencia en equipo Biotek Sinergy 2 (Biotek Instruments, USA) con excitación a 440 nm y emisión a 508 nm (filtro de excitación de 440/30 y filtro de emisión a 508/20), descontando la fluorescencia basal del amortiguador o los compuestos probados según corresponda. Como control positivo para cada ensayo realizado se incubó la proteína en las mismas condiciones sin la presencia de los compuestos (con DMSO 1% v/v para el control positivo de las quinolinas) y se fijó el promedio de las lecturas de un triplicado como el 100% de agregación.

A su vez, para investigar moléculas con potencial de desensamblaje de agregados preformados se adaptó el protocolo de Pickhardt et al. (2005). Primeramente, se dejó agregar una mezcla de 20 μM de 4RMBD y 5 μM de heparina en amortiguador acetato de sodio 100 mM pH 7,0 en un volumen final de 100 μL . Dicha mezcla se preparó en placa de 96 pocillos y se dejó incubar en agitación por 21 horas a 37°C. Al día siguiente, se adicionó el compuesto con

potencial desagregante a distintas concentraciones y se dejó en las mismas condiciones por 21 horas. Posteriormente, se adicionaron 100 μ L de una solución de ThT 25 μ M por pocillo y se dejó en agitación una hora a temperatura ambiente en oscuridad para permitir la unión de la sonda fluorescente con las estructuras de sábana- β formadas. Enseguida, se midió la fluorescencia en equipo Biotek Sinergy 2 (Biotek Instruments, USA) con excitación a 440 nm y emisión a 508 nm (filtro de excitación de 440/30 y filtro de emisión a 508/20), descontando la fluorescencia basal del amortiguador o los compuestos probados según corresponda. Como control positivo para cada ensayo realizado se incubó la proteína en las mismas condiciones sin la presencia de los compuestos (con DMSO 1% v/v para el control positivo de las quinolinas) y se fijó el promedio de las lecturas de un triplicado como el 100% de agregación.

2.2.7.3 Estudios de microscopía de fuerza atómica (AFM) para evaluar el efecto de ácido fúlvico en la polimerización de tau

Para evaluar el efecto de moléculas antiagregantes en la formación de estructuras filamentosas y/o oligómeros de tau se realizaron estudios de AFM. Para ello, se prepararon 100 μ L de 20 μ M de 4RMBD, heparina 5 μ M y 120 μ M de ácidos fúlvicos en amortiguador de agregación (Hepes 20 mM, NaCl 25 mM, pH 7,4). La mezcla de reacción se dejó en agitación constante a 37°C por 24 horas. Como control positivo se incubó la proteína en ausencia de ácidos fúlvicos, como control negativo se incubó la proteína en ausencia del inductor, y como control de inhibición de la agregación se incubó con 100 μ M de azul de metileno en las condiciones descritas. Las muestras fueron congeladas a -80°C hasta su análisis por AFM. Por otra parte, se prepararon 100 μ L de 40 μ M de htau40, heparina 10 μ M y 200 μ M de ácidos fúlvicos en amortiguador de agregación (Hepes 10 mM, NaCl 100 mM, pH 7,4). La mezcla de reacción se dejó en agitación constante a 37°C por 7 días. Como control positivo se incubó la proteína en ausencia de ácidos fúlvicos, como control negativo se incubó la proteína en ausencia del inductor. Las muestras fueron congeladas a -80°C hasta su análisis por AFM.

Los estudios de las muestras se realizaron según el protocolo descrito anteriormente, diluyendo las muestras en amortiguador de adsorción hasta 10 μM aprox. Se tomaron imágenes de varios (al menos diez) campos representativos de las muestras y los datos fueron tratados con el software de imágenes de AFM del fabricante.

2.2.8 Otros métodos

2.2.8.1 Cálculo de la Concentración de Proteínas

Se utilizó el método de Bradford basado en la unión del colorante Azul de Coomassie G-250 a las proteínas (Bradford et al., 1976). En este trabajo se utilizó la modalidad de microBradford en placas de 96 pocillos. Primero, el reactivo de Bradford concentrado 5X (Biorad) se diluyó en cuatro volúmenes de H_2O dd y se filtró a través de papel Whatman #1. Luego, se prepararon los estándares de BSA desde 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en dilución seriada y en triplicado en una placa de micropocillos, agregando 10 μL de solución de estándar y 200 μL de solución de reactivo Bradford filtrado, dejando tres pocillos para el blanco. Posteriormente se prepararon las diluciones de las muestras a analizar en duplicado, agregando 10 μL de solución de muestra y 200 μL de solución de reactivo Bradford filtrado. La placa se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia de cada pocillo, corrigiendo por el blanco, en un lector de Absorbancia de ELISA Sunrise (Tecan, USA) con filtro a 595 nm.

2.2.8.2 Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE

La electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE se realizó según lo descrito por Laemmli et al. (1970). Se prepararon geles al 12% para la separación de la isoformas htau24 y htau40 y geles al 15% para la separación de 4RMBD. Cada gel se sometió a un voltaje constante de 130 volts hasta la caída del frente de

corrida. Luego de la corrida, el gel se tiñó por 1 hora en una solución de tinción con azul de comassie y finalmente se destiñó en solución de destinción toda la noche.

2.2.8.3 *Dot Blot*

Para seguir la presencia de tau en las distintas fracciones de purificación por la columna de intercambio catiónico de *SP-Sepharose* se realizó *Dot Blot*. Brevemente, sobre una membrana de nitrocelulosa se colocaron 2 μ L de cada fracción eluida tratando de minimizar la superficie de expansión. La membrana se dejó secar a temperatura ambiente y se bloqueó con leche al 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Se incubó con anticuerpo primario Tau5 diluido 1:5000 en leche al 1% en PBS durante 30 min a temperatura ambiente y se realizaron tres lavados de cinco minutos con PBS-T. Luego se incubó con anticuerpo secundario anti-mouse IgG conjugado con HRP diluido 1:5000 en leche al 1% en PBS por 30 min a temperatura ambiente y se realizaron dos lavados de cinco minutos con PBS-T y un último lavado de igual duración con PBS. Finalmente, la membrana fue tratada con el kit de quimioluminiscencia Pierce y fue expuesta al film de revelado a distintos tiempos en oscuridad.

2.2.8.4 *Western Blot*

Las proteínas separadas electroforéticamente fueron electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa durante 1 hora a 100 V. Luego, se bloqueó la membrana de nitrocelulosa con leche descremada al 5 % en PBS-T y agitación constante a temperatura ambiente durante 1 hora. Una vez transcurrido este periodo, se incubó con los anticuerpos primarios diluidos en leche al 1% en PBS (Dilución 1:5000 para Tau5, 1:1000 para Tau1 y Tau12) durante 2 horas a temperatura ambiente o a 4°C toda la noche y se realizaron tres lavados de cinco minutos con PBS-T. Luego se incubó con anticuerpo secundario anti-mouse IgG conjugado con HRP diluido 1:5000 en leche al 1% en PBS por 1 hora a temperatura ambiente y se realizaron tres lavados de cinco minutos con PBS-T. Finalmente, la

membrana fue tratada con el kit de quimioluminiscencia Pierce y fue expuesta al film de revelado a distintos tiempos en oscuridad.

2.2.8.5 Análisis Estadísticos

Los análisis estadísticos presentados en esta tesis fueron realizados usando los programas Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA) en los análisis descriptivos. Origen6.0 fue usado para graficar los datos obtenidos en la mayoría de los casos y en los ajustes de modelos matemáticos. Para el análisis de datos de frecuencias relativas y distribuciones de tamaños de los agregados de tau se utilizó el programa MatLab.

3. RESULTADOS

3.1 Clonamiento de htau en vectores de expresión

Las secuencias de las isoformas de htau40 y htau24 provenientes de los vectores pNG2-htau40 y pNG2-htau24 (donados gentilmente por el Dr. Mandelkow, Alemania) fueron clonados en los plasmidios de expresión bacteriana pET-3a y pET-28a(+), con el objeto de expresarlos en *E. coli* y permitir su purificación por diferentes estrategias. El vector pET-3a genera la proteína recombinante sin modificaciones, en cambio, el vector de expresión pET-28a(+) se caracteriza por producir una proteína recombinante unida a su extremo amino terminal un hexapéptido de histidina, que facilita su purificación por IMAC.

En primera instancia, los vectores pNG2-htau40 y pNG2-htau24 fueron digeridos con las enzimas de restricción BamHI y NdeI, los fragmentos resultantes de la secuencias de htau40 (1326 bp) y htau24 (1152 bp) fueron ligados en los sitios de restricción descritos en los vectores pET-3a (4640 bp) y pET-28a (5369 bp) y las plasmidios generados se aislaron. Los plasmidios fueron denominados como pET-3a/htau40 (5933 bp), pET-3a/htau24 (5759 bp), pET-28a/htau40 (6662 bp) y pET-28a/htau24 (6488 bp), los cuales fueron secuenciados para comprobar la presencia correcta de las isoformas de htau clonadas. Como resultado se obtuvieron exitosamente los vectores pET-3a y pET-28a(+) con las secuencias correctas de htau40 y htau24. Para detalle de las secuencias obtenidas véase el Anexo 2.

3.2 Amplificación y clonamiento de 4RMBD en vectores de expresión

Con el propósito de realizar estudios con el dominio responsable de la agregación de htau correspondiente al *dominio de unión a microtúbulos de 4 repeticiones* (4RMBD), a partir de la secuencia de htau40 se amplificó y clonó dicho segmento en el vector de expresión pET-28a(+), que se caracteriza por producir una

proteína recombinante unida a su extremo amino terminal un hexapéptido de histidina, que facilita su purificación por IMAC.

Para amplificar por PCR el dominio 4RMBD se diseñaron los partidores 4R Forward y 4R Reverse, que incluyen los extremos de la secuencia aminoacídica de htau40 desde Q244 hasta E372, con los sitios de restricción para BamHI y NdeI. Utilizando como templado el vector pET-28a/htau40 y los partidores señaladores, se obtuvieron los productos de PCR que se pueden apreciar en la Figura 6.

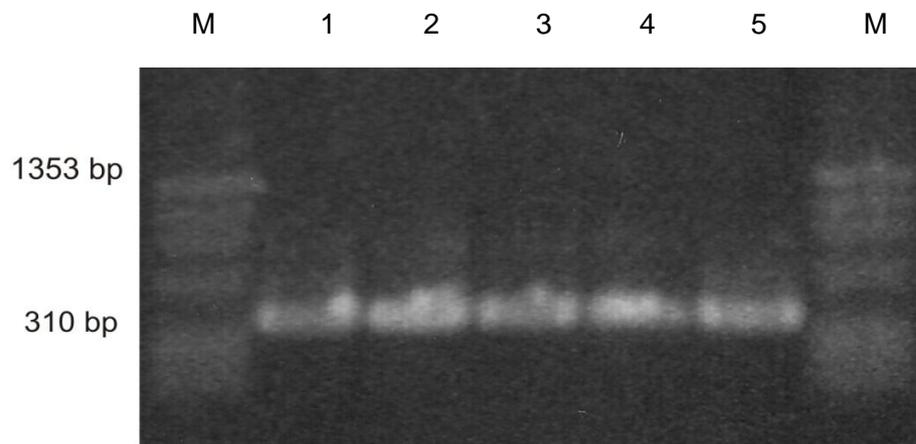


Figura 6.- Análisis electroforético de los productos de amplificación por PCR del fragmento 4RMBD. La secuencia codificante del fragmento 4RMBD (htau₂₄₄₋₃₇₂, 387 pb) fue amplificado mediante PCR a partir del gen de htau40 como templado. Gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio. donde, M: Ladder de peso molecular de rango 1353-72 bp, carriles 1-5: quintuplicado de la reacción de PCR.

En la Figura 6 se observa que el producto de PCR corresponde a una banda cercana a 310 bp, lo que correspondería al tamaño esperado del producto de amplificación de 387 bp. Los productos de amplificación obtenidos fueron purificados, mezclados y digeridos con las enzimas de restricción BamHI y NdeI, los que se ligaron en los sitios respectivos con el vector pET-28a(+). Se logró ligar

exitosamente el inserto a este plasmidio, denominándose pET-28a/4RMBD (5723 bp). Este fue secuenciado para comprobar la presencia correcta del fragmento 4RMBD. Como resultado se obtuvo exitosamente el vector pET-28a(+) con la secuencia correcta para dicho dominio. Para detalle de la secuencia obtenida véase el Anexo 2.

En la Figura 7 se muestran las digestiones con las enzimas de restricción BamHI y NdeI del pET-28a/4RMBD. El primer carril muestra el vector sin inserto; del segundo al octavo, se muestran los clones del vector con el inserto de 4RMBD donde se distingue una banda de alrededor de 400 bp que se libera producto de la digestión enzimática.

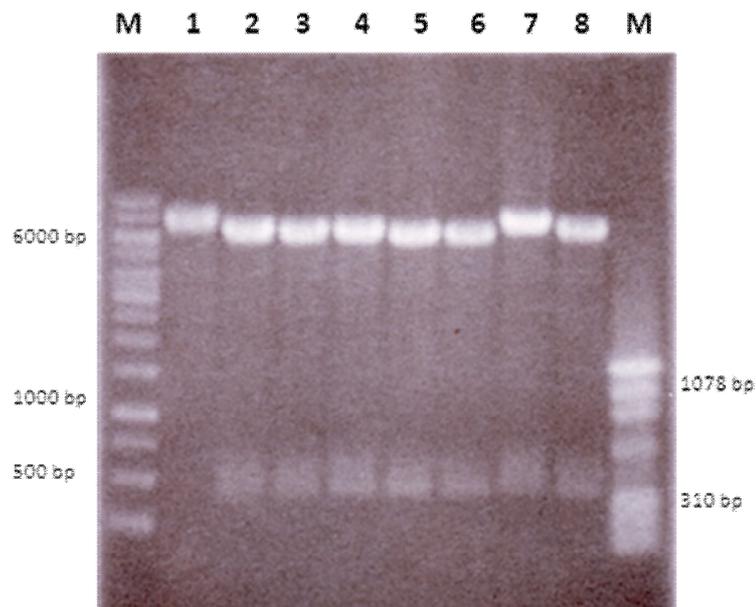


Figura 7.- Análisis electroforético de la digestión de vectores pET-28a/4RMBD con BamHI y NdeI. Gel de agarosa al 1% con bromuro de etidio, donde M: ladder de peso molecular, 1: plasmidio sin inserto, 2 al 8: vector digerido con enzimas y M: ladder peso molecular.

3.3 Expresión y purificación de htau recombinante desde cultivos de *E. coli*

3.3.1 Expresión de htau recombinante en cultivos de *E. coli*

Para la expresión de htau recombinante se utilizó el sistema *E. coli* BL21(DE3). Las bacterias fueron transformadas con los plasmidios generados de las isoformas de htau40 (pET-3a/htau40, pET-28a/htau40) y htau24 (pET-3a/htau24, pET-28a/htau24). Se realizaron estudios preliminares para comprobar la expresión de htau recombinante induciendo con IPTG 1 mM. Con el sistema *E. coli* BL21(DE3)/pET-3a, que expresa htau sin modificaciones, se comprobó la sobreexpresión de una banda de 68 kDa para htau40 y 50 kDa para htau24. Con el sistema *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+), que expresa htau unido a un hexapéptido de histidinas, se comprobó la sobreexpresión de una banda de 72 kDa para htau40 y 54 kDa para htau24. Estos valores se corresponden con los pesos moleculares descritos para las isoformas de htau estudiadas: 67 kDa para htau40 y 52 kDa para htau24 (Goedert et al, 1990). El resumen de los datos de las isoformas expresadas se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2.- Resumen de las isoformas de htau expresadas, tamaños y comparación de pesos moleculares reales y aparentes.

Isoforma htau	Insertos			Total Aminoácidos	MW Real	MW aparente (SDS-PAGE)
	1	2	3			
Htau40	+	+	+	441	45850	68 kDa
Htau24	-	-	+	383	40007	50 KDa
Htau40-HisTag	+	+	+	461	48012	72 kDa
Htau24-HisTag	-	-	+	403	42169	54 kDa

La expresión proteica se verificó mediante *Western Blot* con el anticuerpo Tau5, que reconoce tau total, encontrándose reacción positiva con el anticuerpo para las bacterias transformadas con los plasmidios de htau, utilizando como control negativo las bacterias transformadas con los plasmidios sin el inserto. Se observó la presencia marcada de una banda correspondiente a los pesos moleculares descritos para todas las isoformas de htau expresadas, sin embargo, bajo ésta se

observa una serie de bandas de menor peso molecular correspondientes a productos de degradación de la expresión de htau recombinante (véase Figura 11). La generación de este bandeo de productos de degradación también se reprodujo con los anticuerpos Tau1 (que reconoce htau desforilada) y Tau12 (que reconoce htau en su extremo amino-terminal), lo que confirma que se trata de productos de degradación que se están produciendo en la expresión y/o preparación del extracto total de proteínas. Según la literatura, dicho patrón sería característico y se produce en las condiciones de expresión de htau recombinante en *E. coli* (Barghon et al., 2005).

La expresión proteica se optimizó en términos de concentración de inductor IPTG, tiempo de inducción y DO a 600 nm. Se determinó que la concentración de inducción de 1 mM de IPTG y un tiempo de inducción de 3 a 4 horas a 37°C y una DO 600 nm entre 0,5 y 0,6 se optimiza la expresión de htau, encontrándose en la fracción soluble y desfavoreciendo la formación de cuerpos de inclusión.

La purificación de htau recombinante siguió dos estrategias distintas, según el sistema de expresión que se utilizó. El sistema de expresión *E. coli* BL21(DE3)/pET-3a siguió un protocolo basado en las propiedades intrínsecas de htau (Barghon et al., 2005). Los pasos de purificación consistieron en: a) Shock Térmico (Hervir 20 min), b) Cromatografía de Intercambio Iónico y c) Cromatografía de Exclusión Molecular. El sistema de expresión *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+) genera una proteína con un hexapéptido de polihistidina en su extremo amino terminal que facilita su purificación (Carmel et al., 1996). Para este caso, los pasos de purificación consistieron en: a) Cromatografía IMAC y b) Cromatografía SEC-HPLC. En ambos casos la proteína htau recombinante fue cuantificada utilizándose su coeficiente de extinción molar ($\epsilon = 7700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$). Los experimentos de agregación *in-vitro* para la formación de PHF-like fueron realizados en el amortiguador correspondiente en la presencia del inductor polianiónico heparina. La Figura 8 resume la estrategia experimental general de purificación de las isoformas de htau. Por motivos de rapidez, rendimiento relativo y facilidad en el proceso, se escogió el protocolo basado en IMAC para purificar htau para los experimentos subsecuentes.

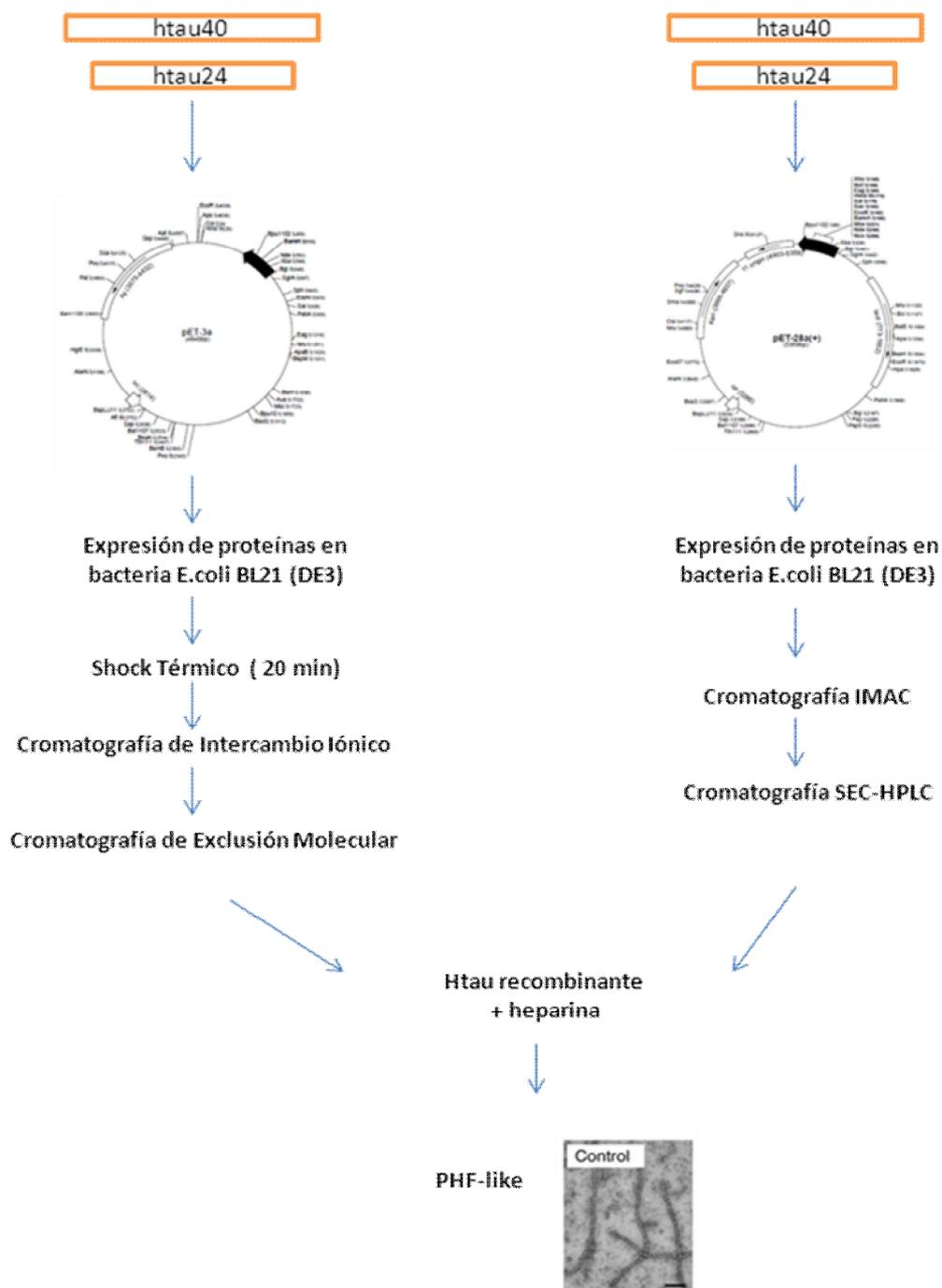


Figura 8.- Estrategia experimental para la purificación de isoformas de htau. Las secuencias de htau40 y htau24 fueron clonadas en los vectores pET-3a y pET-28a(+). Se utilizó Heparina como inductor de la agregación *in-vitro* de htau.

3.3.2 Purificación de htau por cromatografía de intercambio y exclusión molecular

La estrategia de purificación se basó en lo descrito por Barghon et al. (2005), con algunas modificaciones. En general, se dejó crecer 1 L de cultivo con las bacterias *E. coli* BL21(DE3) transformadas con los plasmidios pET-3a/htau40 o pET-3a/htau24 en las condiciones de inducción proteica enunciadas anteriormente. El primer paso de purificación luego de preparar el extracto total de proteínas, es someter dicho extracto a un shock térmico en la presencia de NaCl 500 mM, hirviendo el extracto por 20 min y ultracentrifugando posteriormente para separar el sobrenadante. Este tratamiento aprovecha la propiedad de termoestabilidad de htau, lo que permite que se mantenga soluble a altas temperaturas.

Dicho sobrenadante fue dializado contra el amortiguador de intercambio iónico A, y se cargó en una columna de cromatografía de intercambio catiónico de *SP-Sepharose*. Las proteínas unidas a la columna se eluyeron con un gradiente de fuerza iónica entre 0 - 1 M de NaCl, colectando distintas fracciones, las cuales se analizaron por *Dot Blot* con anticuerpo tau5 para analizar la presencia de tau en las fracciones. En la Figura 9 se muestra el perfil de elución de una columna de *SP-Sepharose* cargada con el sobrenadante de la primera etapa de purificación con proteína htau40. Las fracciones htau positivas, las cuales son coincidentes con el peak de elución de proteínas, se muestran en la parte B de la Figura 9.

Dichas fracciones fueron concentradas y cargadas en una columna de *Sephacryl S-200 HR*, con el objeto de eliminar los productos de degradación de inferior masa mediante separación cromatográfica de exclusión molecular. La Figura 10 muestra un cromatograma típico de elución de una columna de *S-200 HR* de htau40 y el análisis electroforético mediante SDS-PAGE de las fracciones eluidas. Se verifica que se obtienen fracciones de la calidad de pureza deseada (ej. fracción 13) y otras fracciones (ej. fracción 14) que pueden ser sometidas a un segundo paso de purificación por cromatografía de exclusión molecular para mejorar la contaminación con productos de degradación proteica.

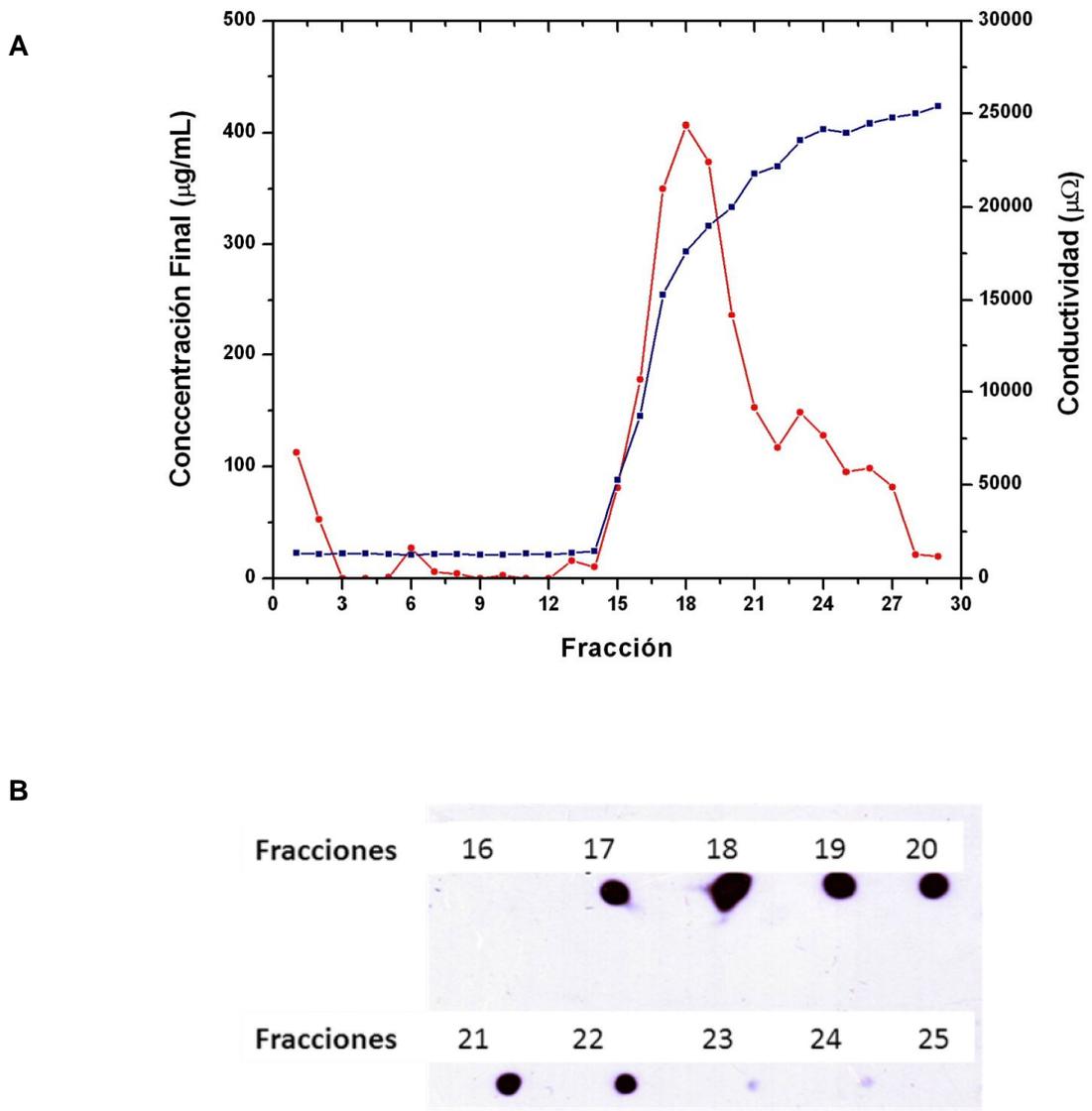


Figura 9.- Cromatografía de intercambio catiónico de httau40 **A.-** Perfil de elución característico de una columna de *SP-Sepharose* (20 mL) cargada con extracto dializado pos-tratamiento térmico, a flujo de 0,2 mL/min a 4°C toda la noche, lavado con 5 VC de amortiguador de intercambio A y elución con 6 VC con un gradiente de 0 – 1 M NaCl a flujo 1 mL/min y recolección de fracciones de 5 mL. La concentración de proteínas se determinó por el método de Bradford. **B.-** *Dot Blot* de las fracciones eluidas con anticuerpo Tau5 1:5000. Se cargaron 2 µL de cada fracción sobre la membrana de nitrocelulosa.

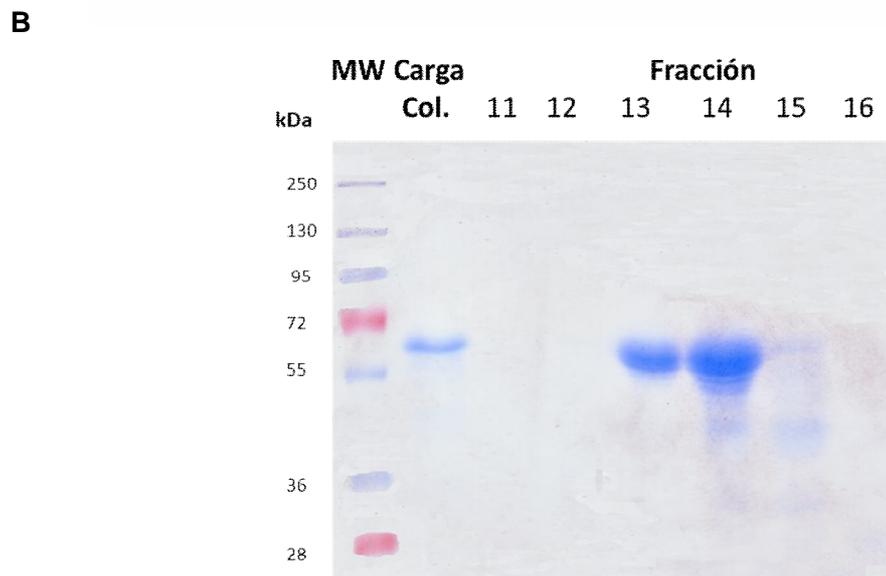
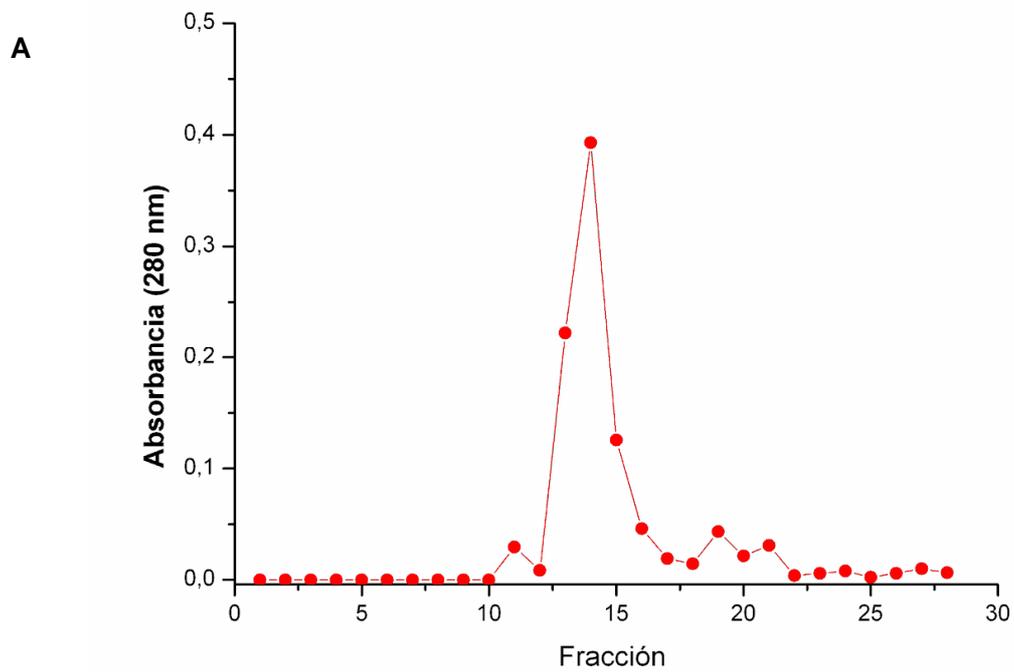


Figura 10.- Cromatografía de Exclusión Molecular htau40. A.- Perfil de elución característico de elución de una columna de *Sephacryl S-200 HR* a un flujo de 0,15 mL/min aprox y recolección de fracciones de 1,5 mL. **B.-** Electroforesis en gel SDS-PAGE (12%) de las fracciones obtenidas, carriles de izquierda a derecha: estándar de peso molecular, cargado en la columna, fracciones de 11-16.

Las fracciones con la pureza deseada se concentraron y se midió su concentración por el coeficiente de extinción molar a 280 nm ($\epsilon = 7700 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), para luego congelarlas a -20°C para su uso posterior en los ensayos de agregación *in vitro*. Los rendimientos promedio de proteína htau obtenido desde 1 L de cultivo bacteriano por el método recién descrito oscilan entre 2 a 3 mg. En la Figura 11 se analizan por electroforesis SDS-PAGE las etapas de purificación por este método y se comprueba la identidad de htau40 expresada mediante *Western Blot* con anticuerpo tau5.

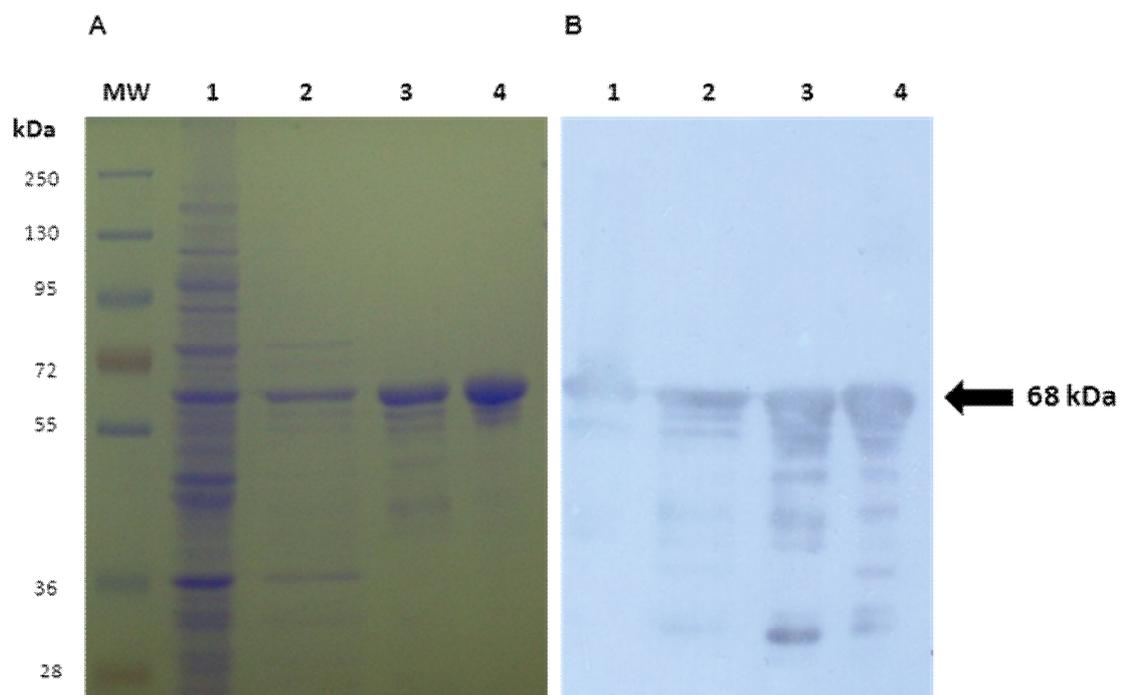


Figura 11.- Etapas purificación de htau40 por método de cromatografía de intercambio y exclusión molecular A.- Electroforesis en gel SDS-PAGE (12%) donde se muestran las etapas de purificación secuencialmente por carril: 1.- extracto total de proteínas 2.- sobrenadante shock término 3.- columna de intercambio catiónico 4.- columna de exclusión molecular. **B.-** *Western Blot* para comprobar la presencia de htau40 con anticuerpo tau5 1:5000 (iguales carriles que en A).

3.3.3 Purificación de htau por IMAC y SEC-HPLC

La estrategia de purificación se basó en lo descrito por Carmel et al. (1996), con algunas modificaciones. En general, se dejó crecer 1 L de cultivo con las bacterias *E. coli* BL21(DE3) transformadas con los plasmidios pET-28a/htau40 o pET-28a/htau24 en las condiciones de inducción proteica enunciadas anteriormente. El primer paso de purificación luego de preparar el extracto total de proteínas, a diferencia del método anterior, es poner en contacto directamente dicho extracto soluble con la matriz de níquel utilizada en IMAC. Luego, las proteínas unidas a la matriz de níquel son eluidas con amortiguador en presencia de imidazol. La htau recombinante se une a la matriz de *Ni-Sephrose*, sin embargo, mediante el análisis electroforético de la fracción que se separa con la elución con imidazol, se observan una serie de bandas de menor peso molecular que corresponderían a productos de degradación de la proteína que copurifican con htau de tamaño completo. La Figura 12 muestra el análisis electroforético de las fracciones eluidas desde la columna de *Ni-Sephrose* de htau24 y htau40 recombinante con el hexapéptido de histidina.

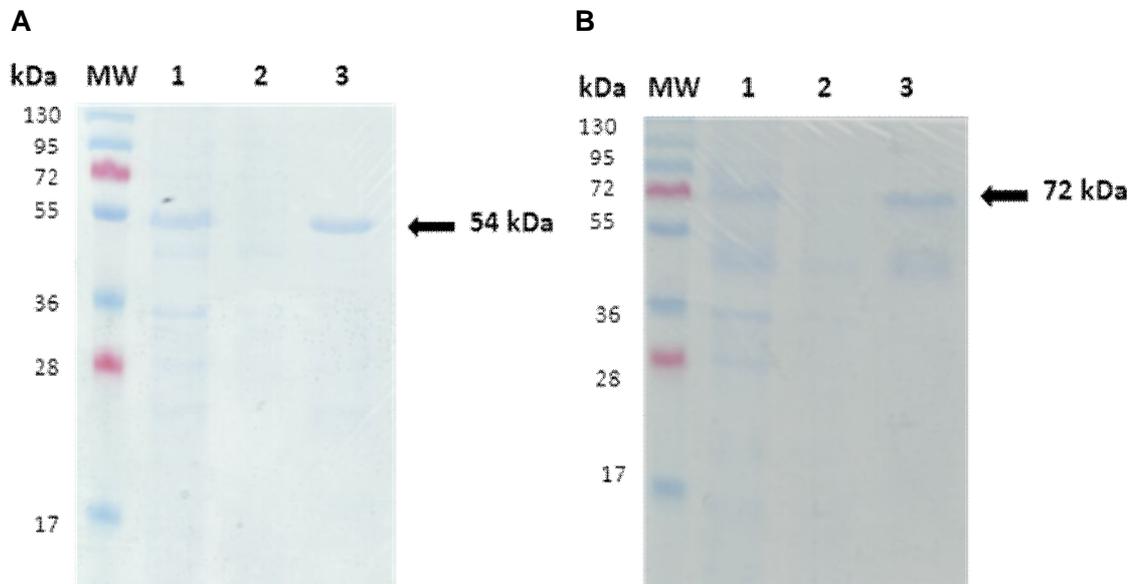


Figura 12.- Análisis electroforético de la purificación de htau HisTag mediante IMAC. A.- Electroforesis en gel SDS-PAGE (12%) de htau24, carriles: 1.- extracto total (*input*), 2.- no unido a columna (*flow through*), 3.- eluído de la columna níquel. B.- Electroforesis en gel SDS-PAGE (12%) de htau40, carriles: 1.- extracto total (*input*), 2.- no unido a columna (*flow through*), 3.- eluído columna níquel.

Como segundo paso de purificación, se utilizó cromatografía de exclusión molecular acoplada a HPLC con una columna semipreparativa (SEC-HPLC). Las muestras de las fracciones eluidas desde la columna de *Ni-Sepharose* fueron concentradas y dializadas contra el amortiguador de SEC-HPLC y cargadas en pasadas sucesivas en el equipo. Para el caso de htau24 el perfil del cromatograma generado junto con la calidad de pureza de la proteína obtenida (fracción 1) se muestra en la Figura 13. Para el caso de htau40 los resultados de la separación cromatográfica se muestran en la Figura 14.

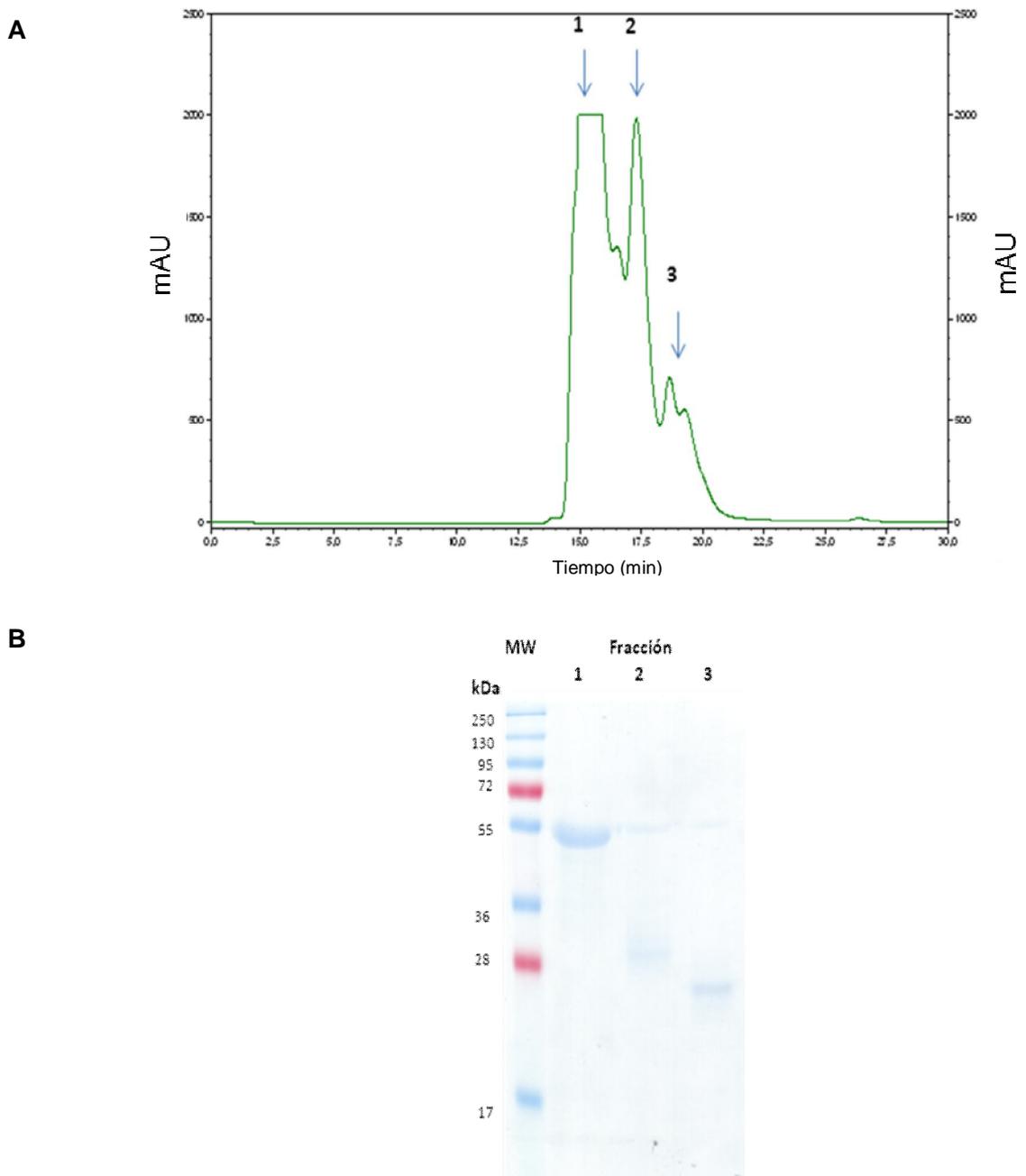


Figura 13.- Separación de htau24 HisTag por SEC-HPLC A.- Cromatograma característico de elución en columna Proteema 100 a flujo 0,5 mL/min en función de la lectura de absorbancia a 215 nm (mAU: unidades de miliabsorbancia), en el cual se observan tres *peaks* característicos. B.- Electroforesis en gel SDS-PAGE (12 %) donde se analizan los *peaks* obtenidos, donde la fracción 1 corresponde a la proteína purificada.

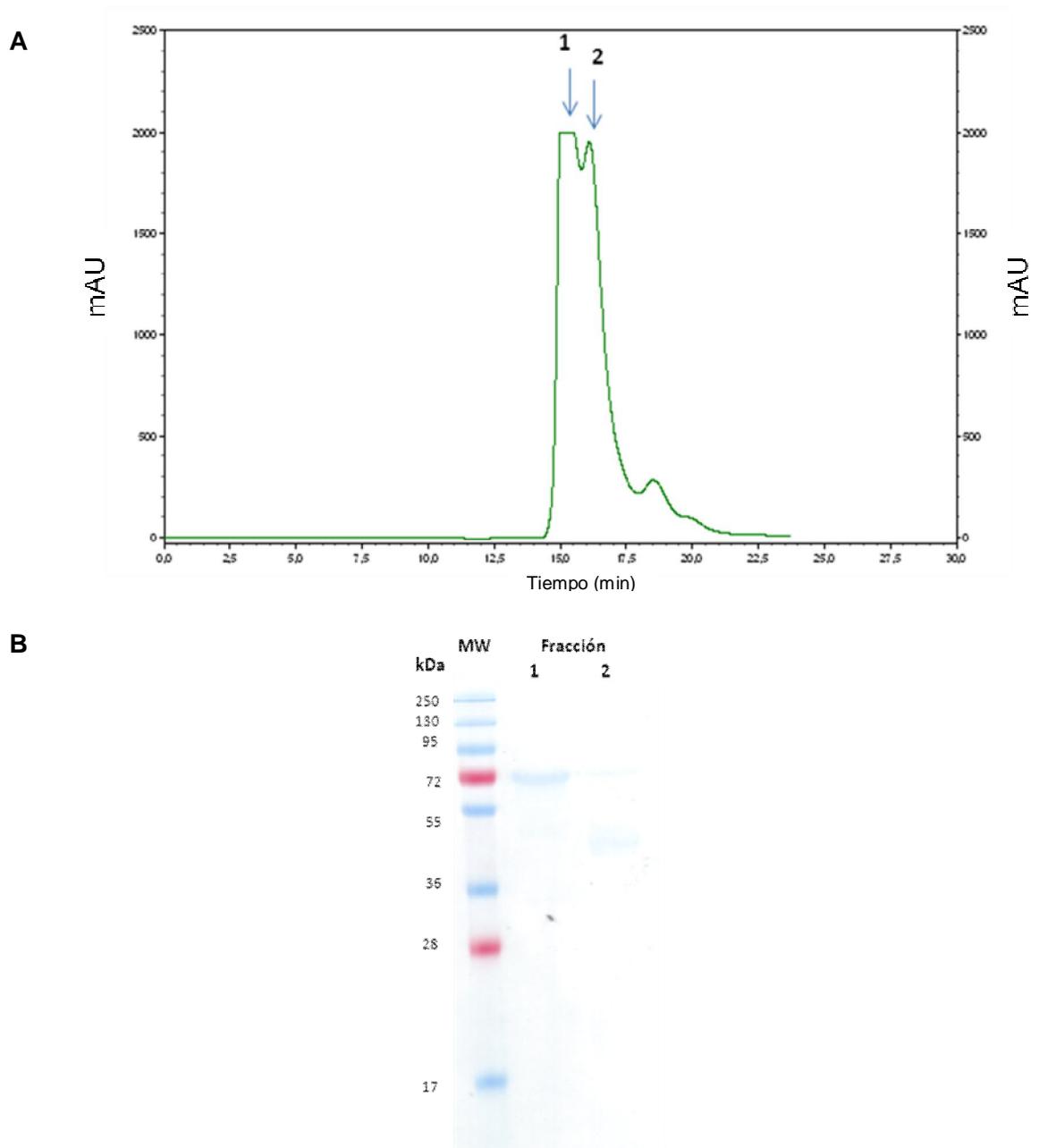


Figura 14.- Separación de htau40 HisTag por SEC-HPLC A.- Cromatograma característico de elución en columna Proteema 100 a flujo 0,5 mL/min en función de la lectura de absorbancia a 215 nm (mAU: unidades de miliabsorbancia), en el cual se observan dos *peaks* característicos. B.- Electroforesis en gel SDS-PAGE (12 %) donde se analizan los *peaks* obtenidos, donde la fracción 1 corresponde a la proteína purificada.

3.4 Expresión y purificación de 4RMBD recombinante desde cultivos de *E. coli*

Para la expresión del fragmento 4RMBD recombinante se utilizó el sistema *E. coli* BL21(DE3). Las bacterias fueron transformadas con el plasmidio generado con la secuencia del fragmento de 4RMBD (pET-28a/4RMBD). Se realizaron estudios preliminares para comprobar la expresión del fragmento de *unión a microtúbulos de 4 repeticiones recombinante* induciendo con IPTG 1 mM (datos no mostrados). Con el sistema *E. coli* BL21(DE3)/pET-28a(+), que expresa la proteína unida a un hexapéptido de histidinas, se comprobó la sobreexpresión de una banda de 16 kDa para 4RMBD. Este valor se ajusta al peso molecular real de 15.976 Da predicho por la composición de la cadena de 150 aminoácidos de longitud (Anexo 2).

La inducción de la expresión proteica siguió las mismas condiciones que las utilizadas para htau recombinante. En general, se dejó crecer 1 L de cultivo con las bacterias *E. coli* BL21(DE3) transformadas con el plasmidio pET-28a/4RMBD. El primer paso de purificación luego de preparar el extracto total de proteínas es poner en contacto directamente dicho extracto soluble con la resina de níquel utilizada en IMAC. Como segundo paso de purificación, se utilizó cromatografía de exclusión molecular acoplada a HPLC con una columna semipreparativa (SEC-HPLC). Las muestras de las fracciones eluidas desde la columna de *Ni-Sepharose* fueron concentradas y dializadas contra el amortiguador de SEC-HPLC y cargadas en pasadas sucesivas en el equipo. Para el caso de 4RBMD el perfil del cromatograma generado junto con la calidad de pureza de la proteína obtenida (fracción 1) se muestra en la Figura 15.

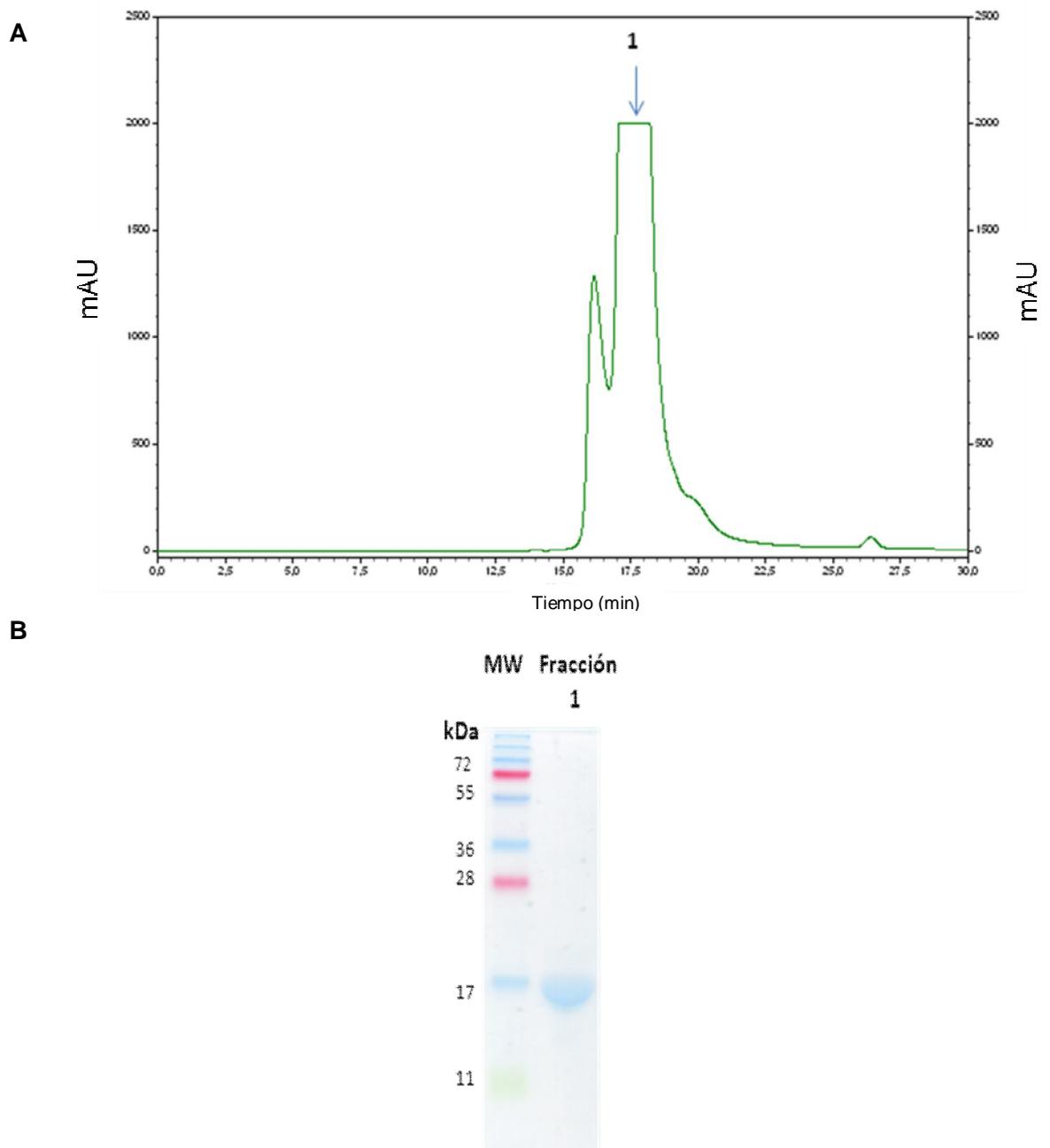


Figura 15.- Separación de 4RMBD por SEC-HPLC A.- Cromatograma característico de elución en columna Proteema 100 a flujo 0,5 mL/min en función de la lectura de absorbancia a 215 nm (mAU: unidades de miliabsorbancia), en el cual se observan dos *peaks* característicos. B.- Electroforesis en gel SDS-PAGE (15 %) donde se analiza el *peak* principal, que corresponde a la proteína purificada.

3.5 Estudios de agregación de htau40 por fluorescencia con tioflavina-S (ThS)

Una forma de cuantificar la formación de agregados de fibrillas amiloides es mediante la unión de tioflavina S, que se une a estructuras de lámina β , como forma indirecta de medida de los agregados formados. Para evaluar la agregación *in vitro* de htau y monitorearla en función del tiempo, se realizó un ensayo de agregación según lo descrito en la literatura (Friedhoff et al., 1998 y Barghorn et al., 2005).

La proteína htau40 (50 μ M) se dejó agregar *in vitro* con heparina 12,5 μ M en amortiguador PBS a 37°C con agitación leve y se sacaron alícuotas a distintos tiempos para realizar las lecturas de fluorescencia. Como control negativo se dejó agregar la proteína en las mismas condiciones de agregación en la ausencia de heparina. Los resultados de la curva de agregación en el tiempo se muestran en la Figura 16. Se observa que la cinética de agregación tiende a seguir un modelo exponencial y alcanza un máximo a las cerca de dos semanas, lo que está de acuerdo con Barghorn et al. (2005).

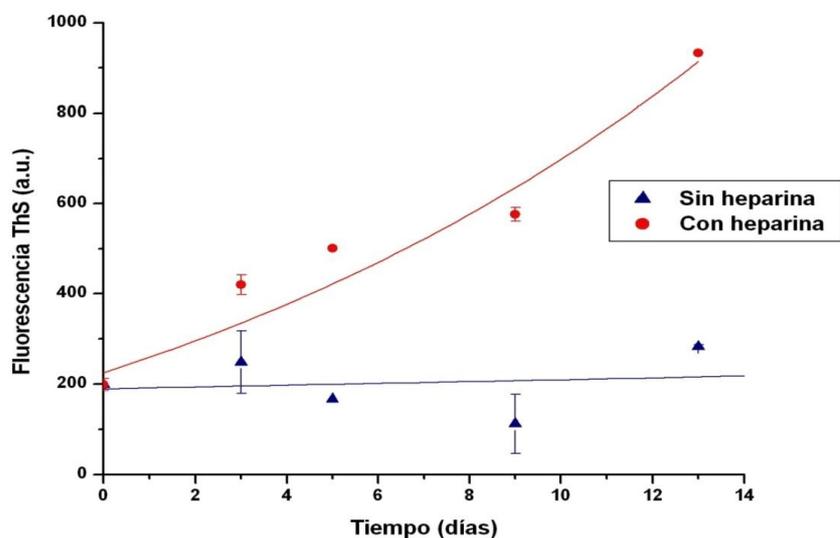


Figura 16.- Curva de agregación de htau40 monitoreada por fluorescencia con Tioflavina S. La cinética de agregación fue realizada a 50 μ M de proteína y 12,5 Heparina como inductor en amortiguador PBS pH 7,4 a 37°C en los tiempos indicados. Se cuantificó la fluorescencia (a.u.= unidades arbitrarias) con Tioflavina S excitando a 440 nm y emitiendo a 508 nm (n=2).

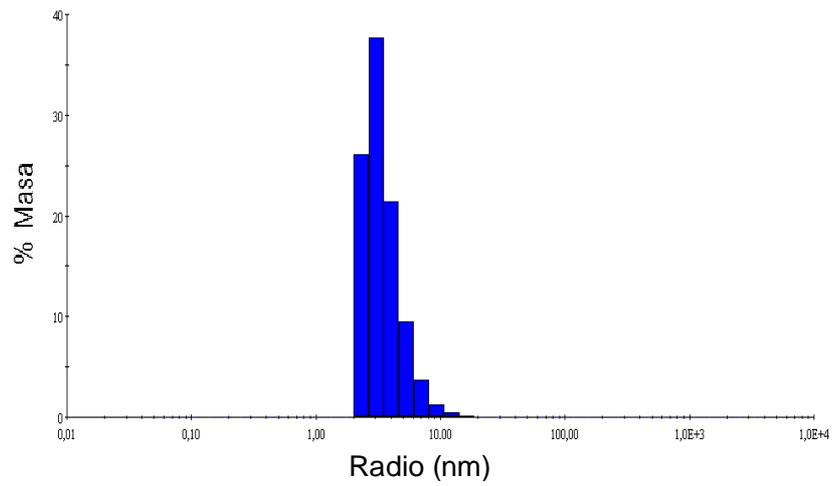
3.6 Estudios de agregación de tau por *dynamic light scattering* (DLS)

3.6.1 Agregación de htau40

Se realizaron estudios de *dynamic light scattering* para evaluar los cambios en la agregación de htau40 en la presencia del inductor. En primer lugar, se realizaron estudios de la proteína en solución sin el inductor (Figura 17A). El 100% de la masa presenta un radio hidrodinámico promedio de 3,57 nm, lo que asumiendo un modelo globular, correspondería a 66 kDa de peso molecular promedio. Luego, se agregó el inductor heparina y dejó agregar durante 1,5 horas en la cubeta a temperatura ambiente (Figura 17B). Los cambios en el estado de agregación de htau 40 son leves, observándose que el 98,8% de la masa se encuentra en el estado monomérico y solo cerca de un 1% se encuentra en una gran partícula agregada de tamaño no definido. Esto reflejaría que la agregación en presencia de heparina es un proceso cinético lento, donde es difícil evaluar los cambios en tiempos breves. Finalmente, dicha muestra se dejó agregando a 37°C por un 24 hrs y luego se midió en el equipo de DLS (Figura 17C). Los resultados muestran que la distribución de la agregación se invirtió, ya que el 99% de ésta se encuentra en una gran partícula agregada, que se encuentra en el límite superior de sensibilidad del equipo. Dicho perfil también se observa después de dejar la muestra agregando por 5 días en las mismas condiciones (resultados no mostrados). Como conclusión, es posible observar los cambios en los estadios de agregación de htau40 en presencia del inductor por DLS, sin embargo, por la cinética de la reacción y la sensibilidad del equipo empleado, no es posible aplicarlo para el estudio de cambios en la agregación de htau40 en tiempo real.

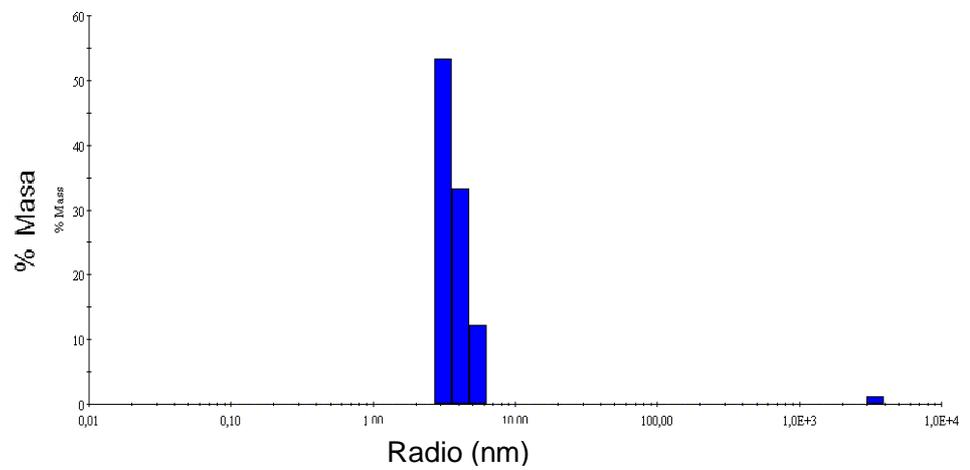
A) Htau40 t = 0 hrs (sin heparina)

Item	R (nm)	%Pd	MW-R (kDa)	%Int	%Mass
Peak 1	3.57	42.6	66	100.0	100.0



B) Htau40 t = 1,5 hrs

Item	R (nm)	%Pd	MW-R (kDa)	%Int	%Mass
Peak 1	3.76	21.1	75	10.9	98.8
Peak 2	53.19	23.9	N.D.	26.2	0.1
Peak 3	3416.8	0.0	N.D.	62.9	1.1



C) Htau40 t= 24 hrs

Item	R (nm)	%Pd	MW-R (kDa)	%Int	%Mass
Peak 1	90.53	0.0	127570	13.8	1.0
Peak 2	3436.3	0.0	N.D.	86.2	99.0

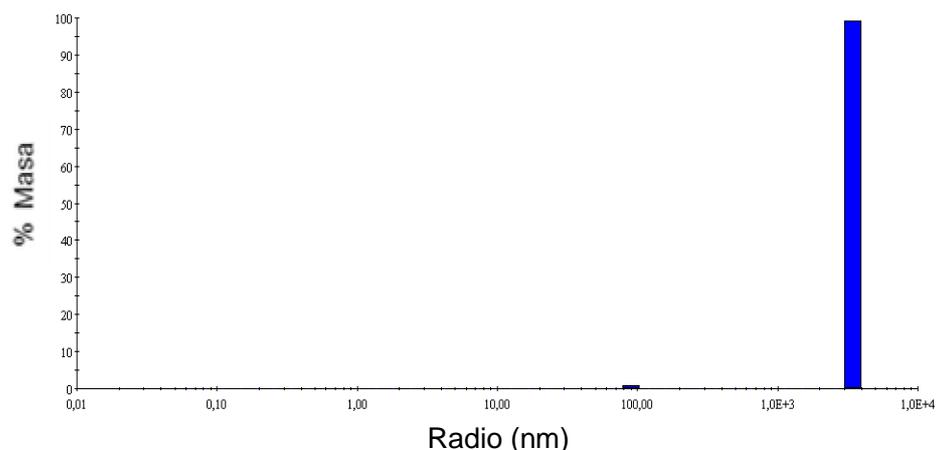


Figura 17.- Estudio de agregación de htau40 a distintos tiempos por *dynamic light scattering*. La agregación se realizó a concentración de 25 μM para la proteína y 6,25 μM para heparina en amortiguador PBS pH = 7,4. A.- Htau40 sin agregar en ausencia de heparina (t= 0 hrs.) B.- Htau40 agregada (t= 1,5 horas, temperatura ambiente) y C.- htau40 agregada (t= 24 hrs, 37°C), N.D.=no determinado.

3.6.2 Agregación de 4RMBD

El fragmento 4RMBD fue analizado en solución por DLS, lo que se observa en la Figura 17. Para el ajuste de los datos en este caso se utilizó un modelo de aproximación de polímero lineal para extrapolar el peso molecular promedio en solución. Se encontró que 4RMBD tiene un radio en solución de 3,12 nm y que el peso molecular promedio en solución corresponde a 16 kDa, lo que se ajusta a que se encuentra en estado monomérico principalmente.

Item	R (nm)	%Pd	MW-R (kDa)	%Int	%Mass
Peak 1	3.12	8.9	16	92.4	100.0

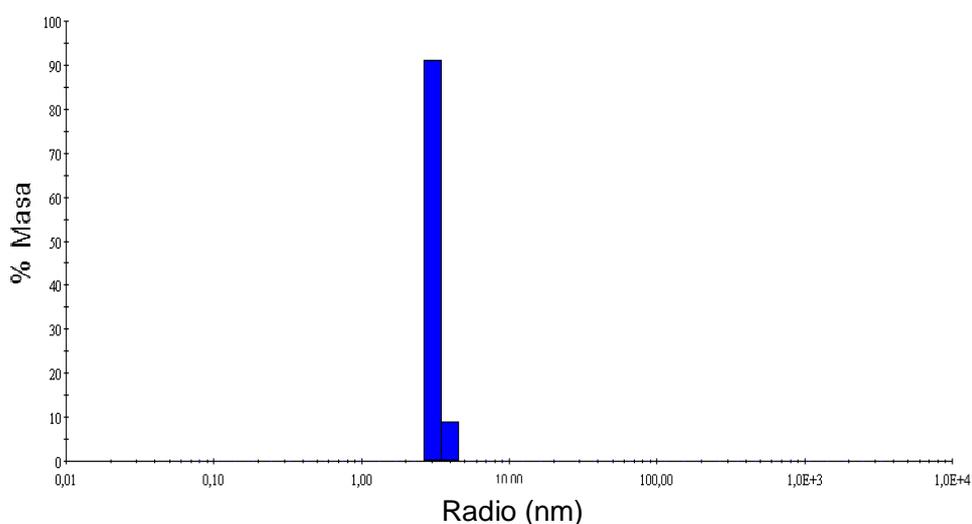


Figura 18.- Análisis en solución de 4RMBD por *dynamic light scattering*. Proteína a concentración de 10 mg/mL en amortiguador PBS pH 7,4.

El siguiente experimento fue evaluar la agregación en tiempo real de 4RMBD. La perspectiva de este estudio fue diseñar un ensayo de agregación que permita evaluar los cambios producidos en la presencia del inductor y eventualmente, en la presencia de compuestos que puedan inhibir el proceso. A partir de lo propuesto por Sugino et al. (2009), el fragmento 4RMBD de concentración 10 μ M fue mezclado con heparina 0,4 μ M a baja proporción tau: inductor (25:1). Como control negativo, se dejó la proteína en ausencia del inductor. Los resultados para esta cinética de agregación de 4RMBD en tiempo real se muestran en la figura 19. Es posible observar que la cinética muestra una fase inicial corta de agregación, luego una fase de crecimiento exponencial hasta estabilizarse en agregados en torno a los 2000 nm

de radio hidrodinámico al par de horas de iniciado el experimento. Cabe señalar que la sensibilidad del equipo utilizado en la discriminación de elementos tiene un límite aproximado de 1000 nm de radio hidrodinámico, por lo que sobre dichos valores se genera un ruido en la señal.

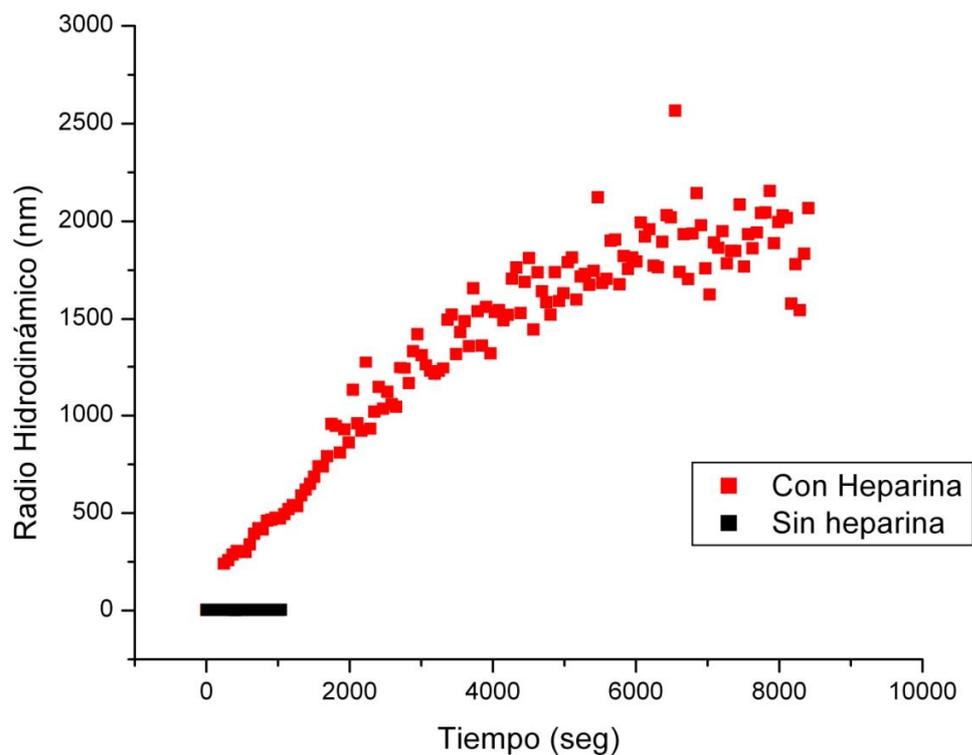


Figura 19.- Cinética de agregación en tiempo real de 4RMBD por *dynamic light scattering*. La agregación se realizó a 10 μM de proteína y 0,4 μM de heparina como inductor, en amortiguador de agregación DLS (50 mM Tris-HCl, 400 μM DTT, pH 7,6) a temperatura ambiente (22°C). Como control negativo se dejó la proteína en ausencia del inductor en las mismas condiciones descritas.

3.7 Caracterización de agregados de tau por microscopía electrónica de transmisión (TEM)

3.7.1 Agregación de 4RMBD

La formación de estructuras filamentosas de 4RMBD se realizó en amortiguador de agregación (Hepes 20 mM, 25 mM KCl, pH 7,4) en la razón proteína/heparina de 4:1 (40 μ M y 10 μ M, respectivamente) en agitación constante a 37°C. Se evaluó la formación de agregados por microscopía electrónica de transmisión a tiempos de 1 y 3 días de agregación. Debido a las limitaciones de la técnica, la búsqueda de estructuras filamentosas en los diversos campos fue dificultosa. No se lograron encontrar campos poblados en fibras, sin embargo, se observaron fibras individuales de diversos tamaños. En la Figura 20 se muestran fibras representativas de un día de agregación (16A) y tres días de agregación (16B).

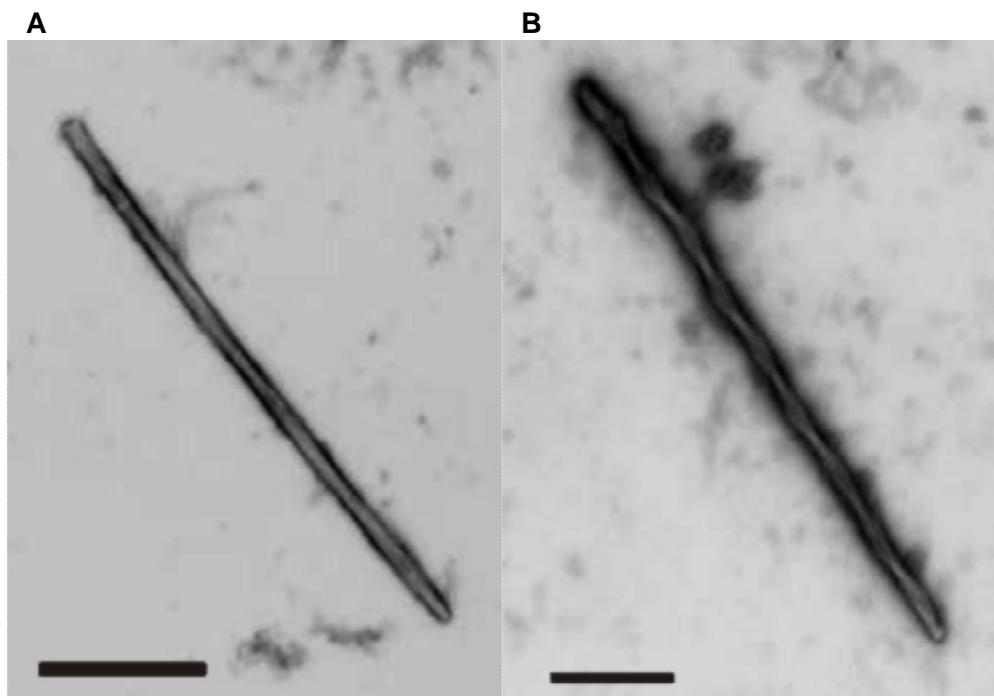


Figura 20.- Microscopia Electrónica de agregados de 4RMBD La agregación se realizó con 40 μ M de 4RMBD y 10 μ M de heparina en amortiguador de agregación (20 mM Hepes, 25 mM KCl, pH 7,4) A.- 1 día de agregación (magnificación 8.000X, barra=500 nm), B.- 3 días de agregación (magnificación 10.000X, barra = 500 nm).

Los filamentos formados presentan morfología del tipo *straight filament (SF-like)* y *paired helical filament (PHF-like)*. Los primeros son filamentos rectos sin formación entrecruzada y los segundos, filamentos entrecruzados en forma helicoidal. Mediante TEM, en su mayoría se observaron estructuras de tipo *SF-like* (Figura 20A), sin embargo, es posible encontrar varias estructuras del tipo *PHF* (Figura 20B).

Morfológicamente, la fibra del tipo *SF-like* presenta un ancho de 37 nm y largo de 1,9 μm . La fibra del tipo *PHF-like* presenta un ancho en su parte más angosta 25 nm y en su parte más extendida 50 nm, sección de repetición (*cross-over*) de 300 nm y largo de 2,75 μm .

3.7.2 Agregación de htau40

La formación de estructuras filamentosas de htau40 se realizó en amortiguador de agregación (Hepes 10 mM, 100 mM NaCl, pH 7,4) en la razón proteína/heparina de 4:1 (44 μM y 11 μM , respectivamente) en agitación constante a 37°C. Se evaluó la formación de agregados por microscopía electrónica de transmisión a los 7 días de agregación. La búsqueda de estructuras filamentosas en los diversos campos también fue dificultosa como en el caso anterior, sin embargo, se lograron encontrar campos poblados en fibras, y a su vez, se observaron fibras individuales de diversos tamaños. En la figura 21 se muestran las fibras representativas de htau40 con 7 días de agregación.

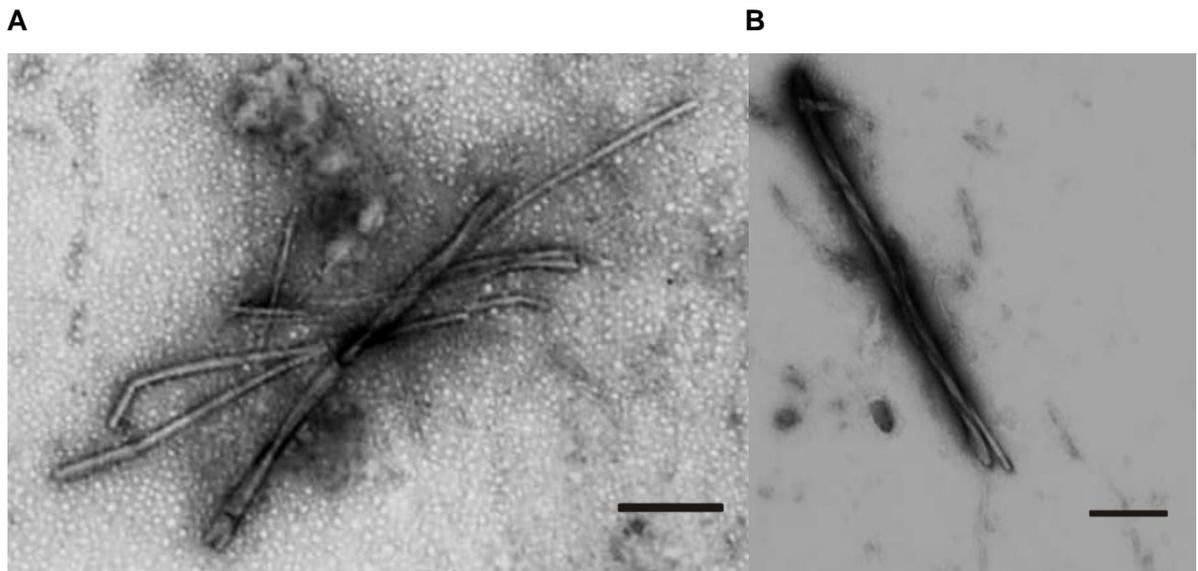


Figura 21.- Microscopia Electrónica de agregados de htau40 La agregación se realizó con 44 μM de htau40 y 11 μM de heparina en amortiguador de agregación (10 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 7,4) por un tiempo de 7 días A.- Fibras de htau40 (magnificación 10.000X, barra = 500 nm), B.- *PHF-like* característico (magnificación 10.000X, barra = 500 nm).

Los filamentos formados también presentaron morfología del tipo *straight filament (SF-like)* y *paired helical filament (PHF-like)*. Mediante TEM, en su mayoría se observaron estructuras de tipo *SF-like*, sin embargo, es posible encontrar bastantes estructuras del tipo *PHF-like* (Figura 21A).

3.8 Caracterización de agregados de tau por microscopía de fuerza atómica (AFM)

Los estudios de AFM fueron realizados en distintos modos y superficies para determinar las mejores condiciones que se aproximan al estudio de nuestro sistema. Se hicieron estudios en modo *tapping* (contacto intermitente) aire y modo *tapping* (contacto intermitente) fluido. Además se realizaron estudios sobre superficies de mica y HOPG (grafico pirolítico altamente ordenado).

3.8.1 Estudios en modo *tapping* aire

Los primeros estudios se realizaron en modo *tapping* (contacto intermitente) aire. Para ello, las muestras de agregados de htau40 de 7 días de incubación son dejados secar sobre la mica y luego se depositan para su análisis en el equipo de microscopia de fuerza atómica.

Con el modo *tapping* aire se lograron visualizar estructuras de agregados de htau40. La figura 22 muestra el tipo de estructuras visualizadas. Sin embargo, este método fue muy poco reproducible al tratar de repetir la experiencia diferentes veces. La distribución sobre la mica es poco homogénea y además, las fibras son inestables y frágiles al paso del cantilever. Existe poca adherencia de las fibras en la superficie de mica y a su vez, se observaron escasas fibras al escanear distintos campos. Por lo tanto, se concluye que este modo no ofrece las mejores condiciones para la descripción de nuestro sistema, por los artefactos y poca reproducibilidad que se observan.

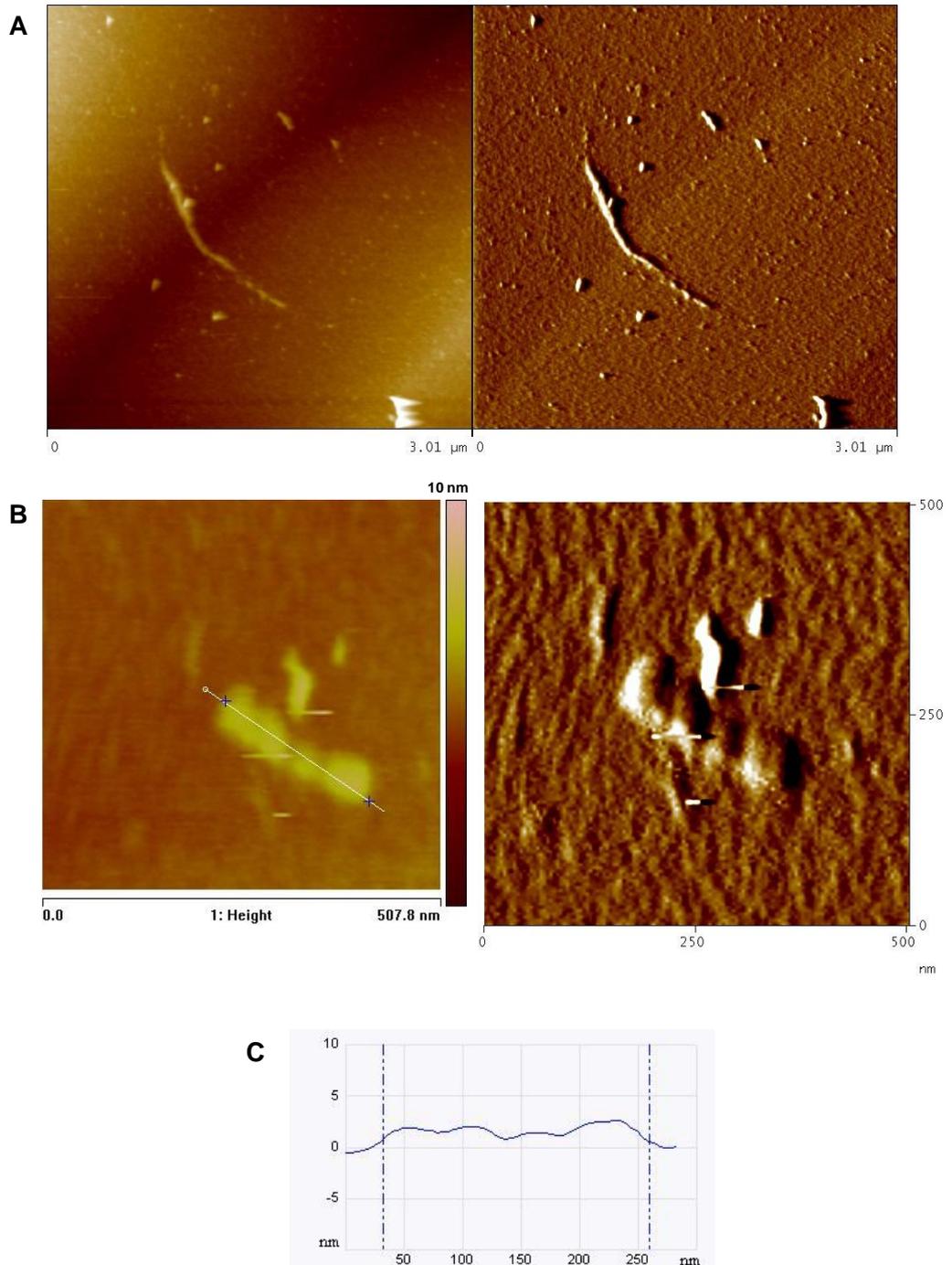


Figura 22.- Imágenes AFM de agregados de htau40 modo *tapping* aire (contacto intermitente) Superficie mica, la agregación se realizó a 50 μM proteína, 12,5 μM heparina por 7 días a 37°C. A.- Fibra de htau40 agregada (izquierda imagen de altura y derecha imagen de amplitud) B.- Agregados prefibrilares htau40 (izquierda imagen de altura y derecha imagen de amplitud) C.- Topografía de altura de corte en B.

3.8.2 Estudios en modo *tapping* fluido

Los siguientes estudios se realizaron en modo *tapping* (contacto intermitente) fluido. Para ello, las muestras de agregados de tau fueron diluidos en amortiguador de adsorción sobre HOPG y luego se depositan en la celda de fluido con amortiguador de visualización para su análisis en el equipo de microscopía de fuerza atómica.

Con el modo *tapping* fluido se lograron visualizar estructuras de agregados de tau, ya que las fibras presentan mejor adherencia y estabilidad sobre HOPG en fluido. La distribución sobre el HOPG es homogénea y las fibras son más estables al paso del *cantilever*. La reproducibilidad es alta al escanear distintos campos. Por lo tanto, se concluye que este modo ofrece una condición óptima para la estudio de nuestro sistema.

Con el modo *tapping* fluido se lograron visualizar estructuras de agregados de 4RMBD a distintos tiempos. La Figura 23 muestra el tipo de estructuras visualizadas para la agregación a los tiempos de 8, 12 y 24 hrs. Se puede observar que la formación y tamaño de fibrillas aumenta con el tiempo, sin embargo, hay presencia de estructuras prefibrilares y oligoméricas que coexisten en cada uno de los tiempos estudiados.

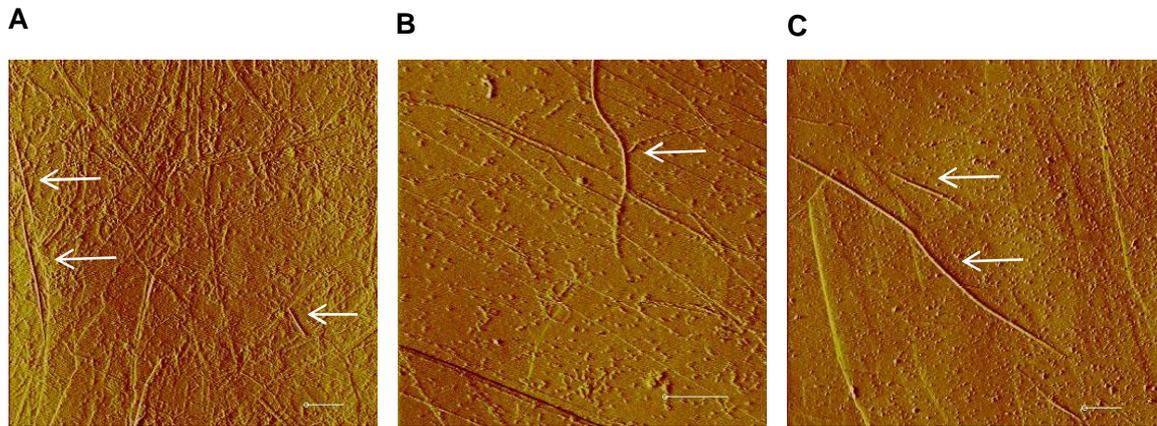


Figura 23.- Imágenes AFM de agregación de 4RMBD a distintos tiempos. Imágenes de amplitud en superficie HOPG, la agregación se realizó con 20 μM 4RMBD y 5 μM de heparina a 37°C en amortiguador (20 mM Hepes, 25 mM NaCl, pH 7,4). Las flechas indican la presencia de fibras formadas. A.- 8 hrs de agregación B.- 12 hrs de agregación C.- 24 hrs de agregación (barra inferior =1 μm para cada imagen).

Con el modo *tapping* fluido también se lograron visualizar estructuras de agregados de htau40 de siete días de incubación. La figura 24 muestra el tipo de estructuras fibrilares típicas visualizadas para esta agregación. Se trata de estructuras de largo de 300-400 nm y ancho 25-30 nm en promedio y una altura (espesor) de alrededor de 5 nm. En los diversos campos, las fibras varían bastante de largo, conservándose una predominancia de estructuras de alrededor de 300 nm de largo, pero con existencia abundante de fibras tipo *SF-like* o *PHF-like* de alrededor de varios μm de longitud.

La Figura 25 muestra una fibra *PHF-like* en diversos contrastes. Las fibras tienen una altura promedio de 10 nm, una sección de repetición (*cross-over*) de 200 nm y un ancho en su parte más angosta 60 nm y en su parte más extendida 80 nm aproximadamente, con un ancho de las fibras individuales que constituyen el PHF-like de 40 nm.

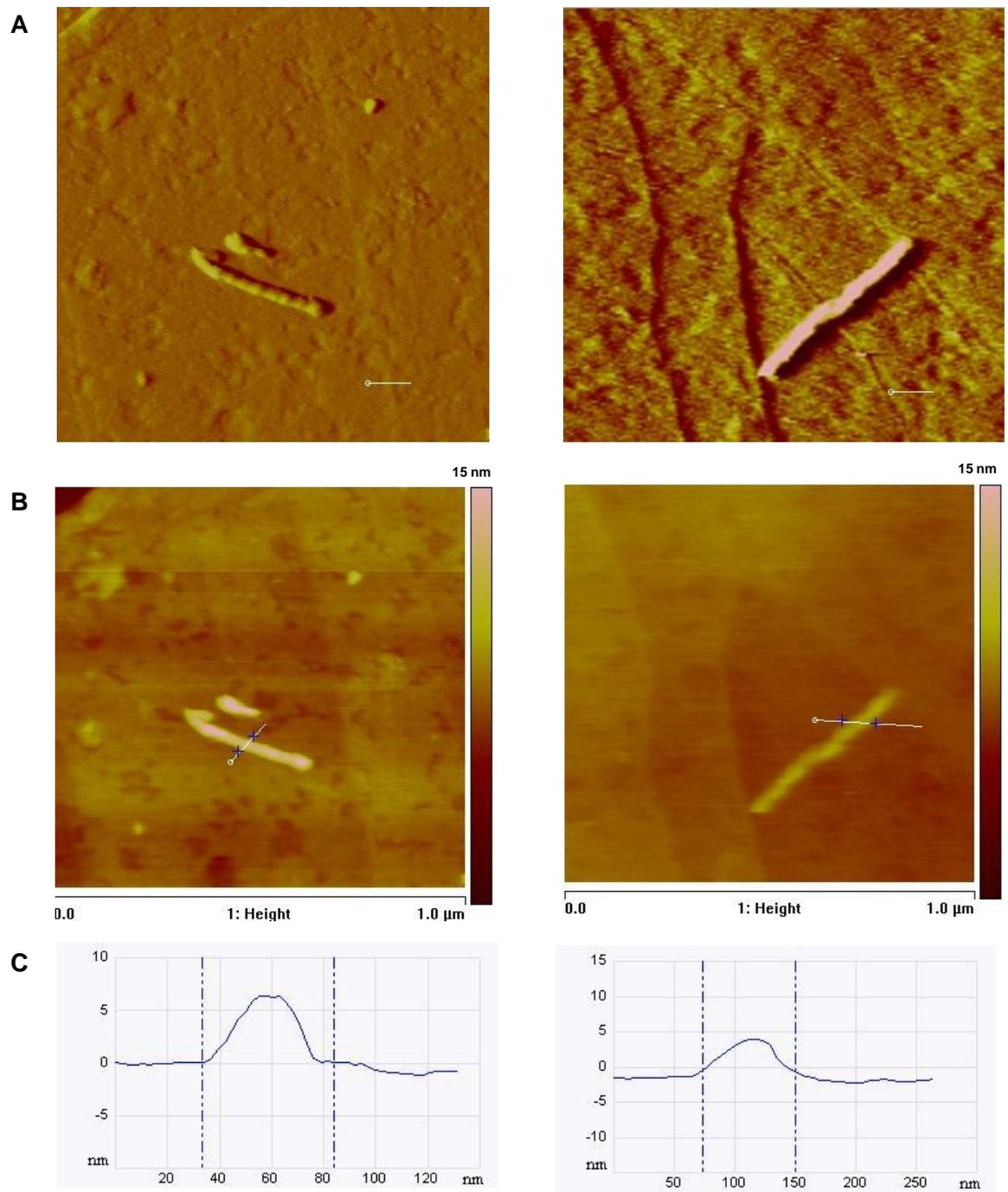


Figura 24.- Imágenes AFM estructuras fibrilares de htau40 Superficie HOPG, la agregación se realizó a 44 μM proteína y 11 μM heparina por 7 días a 37°C en amortiguador (10 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 7,4). A.- Imágenes de Amplitud (barra= 100 nm) B.- Imágenes de Altura C.- Topografías de altura de B

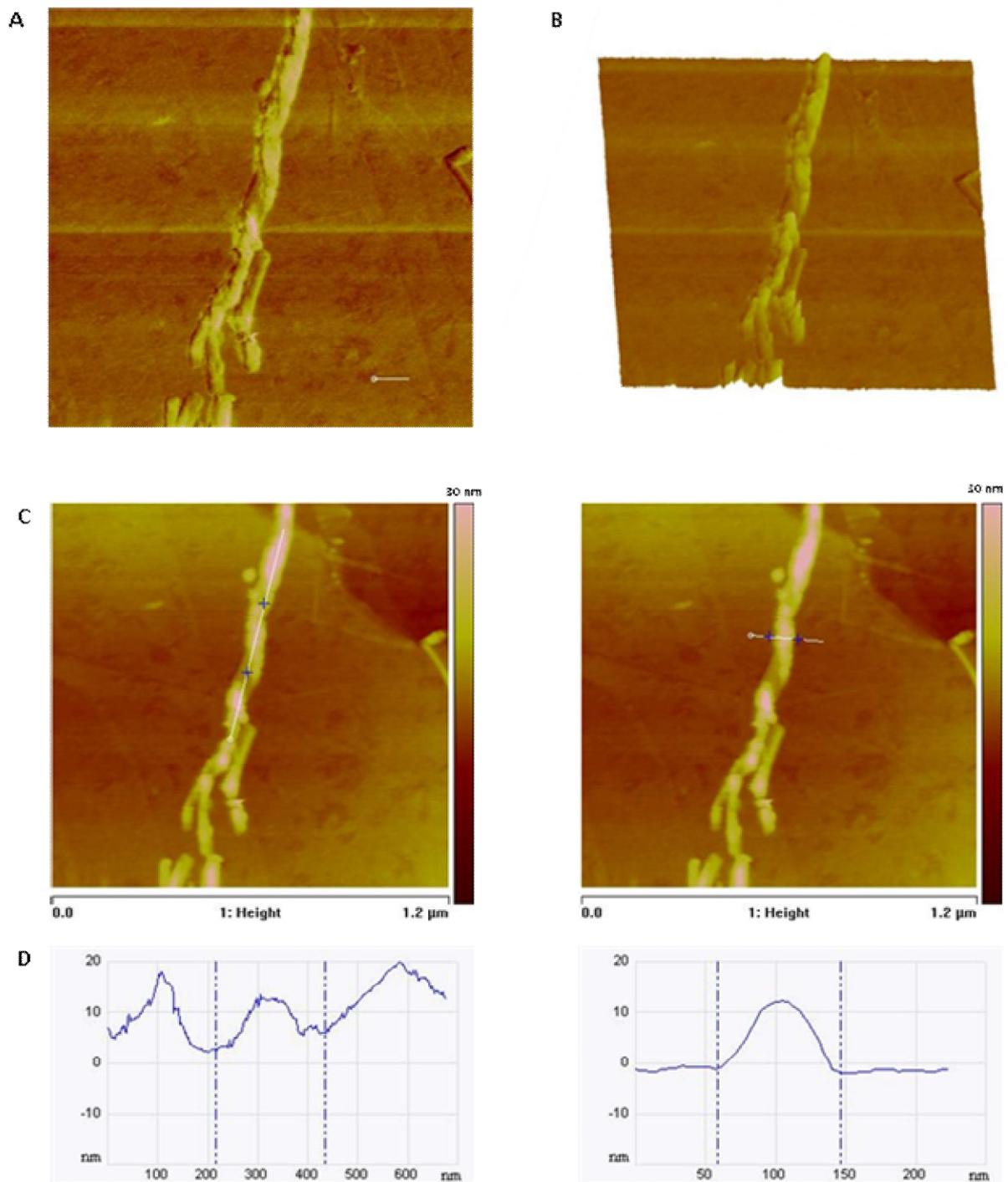


Figura 25.- Imágenes AFM PHF-like htau40 Superficie HOPG, la agregación se realizó a 44 μM proteína y 11 μM heparina por 7 días a 37°C en amortiguador (10 mM HEPES, 100 mM NaCl, pH 7,4). A.- Imagen de fase (barra = 100 nm) B.- Imagen 3D C.- Imágenes de altura D.- Topografía de alturas de C

3.9 Screening de moléculas antiagregantes de tau con ensayo de fluorescencia con TioflavinaT (ThT)

3.9.1 Inhibición de la agregación de 4RMBD con azul de metileno

Para ensayar la actividad antiagregante de diferentes compuestos se utilizó el ensayo de fluorescencia con Tioflavina T adaptado de Crowne et al. (2007). Para validar el ensayo se examinó el efecto del compuesto azul de metileno, conocido inhibidor de la agregación de tau *in vitro* (Wischik et al. 1996, Taniguchi et al., 2005). En la Figura 26A se muestra la curva dosis-respuesta para la inhibición de la agregación de 4RMBD. A partir de dichos datos se calculó que la concentración inhibitoria media (IC₅₀) para este compuesto era IC₅₀=0,4 μM, lo que se corresponde con datos publicados por métodos de fluorescencia de IC₅₀=1 μM para la isoforma 4RMBD (Hattori et al., 2008). A su vez, se comprobó mediante AFM que las características morfológicas para los agregados de 4RMBD en presencia de azul de metileno 100 μM son distintas que los controles (Figura 23) y corresponden en su mayoría a agregados poco estructurados del tipo oligoméricos o prefibrilares (Figura 26B).

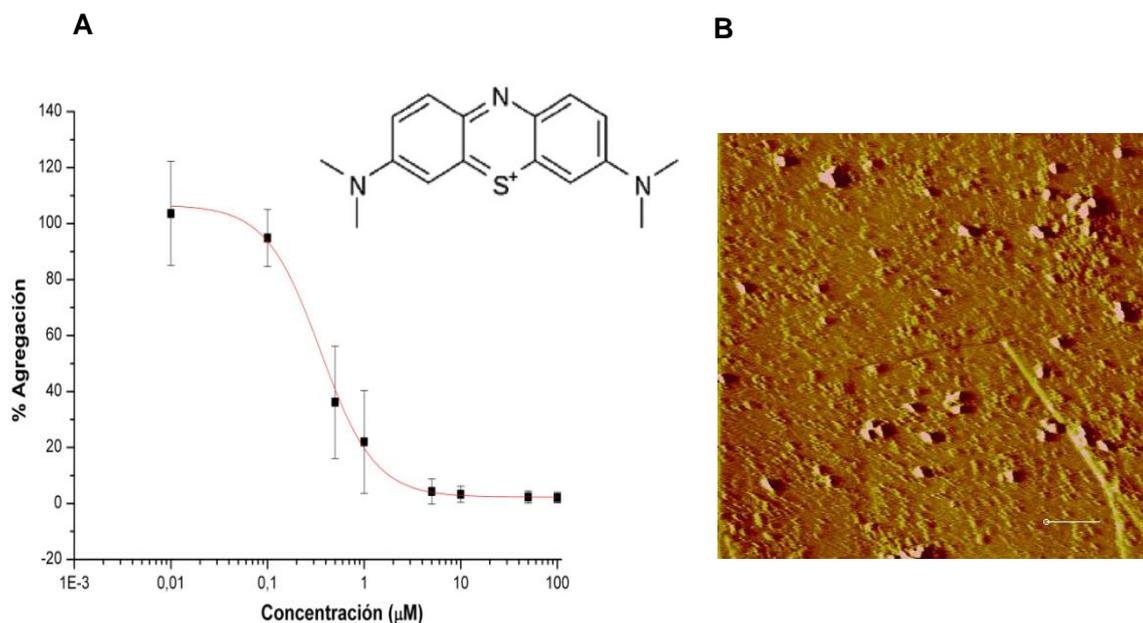


Figura 26.- Inhibición de la agregación de 4RMBD con azul de metileno La agregación se realizó con 20 μ M 4RMBD y 5 μ M de heparina a 37°C en amortiguador acetato de sodio 100 mM, pH 7,0. A.- Curva dosis-respuesta de la inhibición monitoreada con fluorescencia con ThT (IC₅₀=0,4 μ M; n=2), agregando la sonda hasta concentración final de 12,5 μ M luego de 20 hrs de agregación. Se consideró el 100% de agregación la señal promedio en ausencia de azul de metileno. B.- Microscopía de fuerza atómica de agregados (en amortiguador 20 mM Hepes, 25 mM NaCl, pH 7,4) formados en presencia de 100 μ M de azul de metileno.

3.9.2 Estudio de efectos antiagregantes de quinolinas

Las moléculas evaluadas en su efecto antiagregante con el ensayo de fluorescencia con ThT se presentan en la Figura 27. THQ-55 fue descrita anteriormente por su potencial efecto antiagregante (Tesis Mg. Leonardo Navarrete, 2008) y las quinolinas Q3, Q4 y Q5 son nuevos derivados de la familia de quinolinas. Para detalles sobre su síntesis química y calidad véase el Anexo 1.

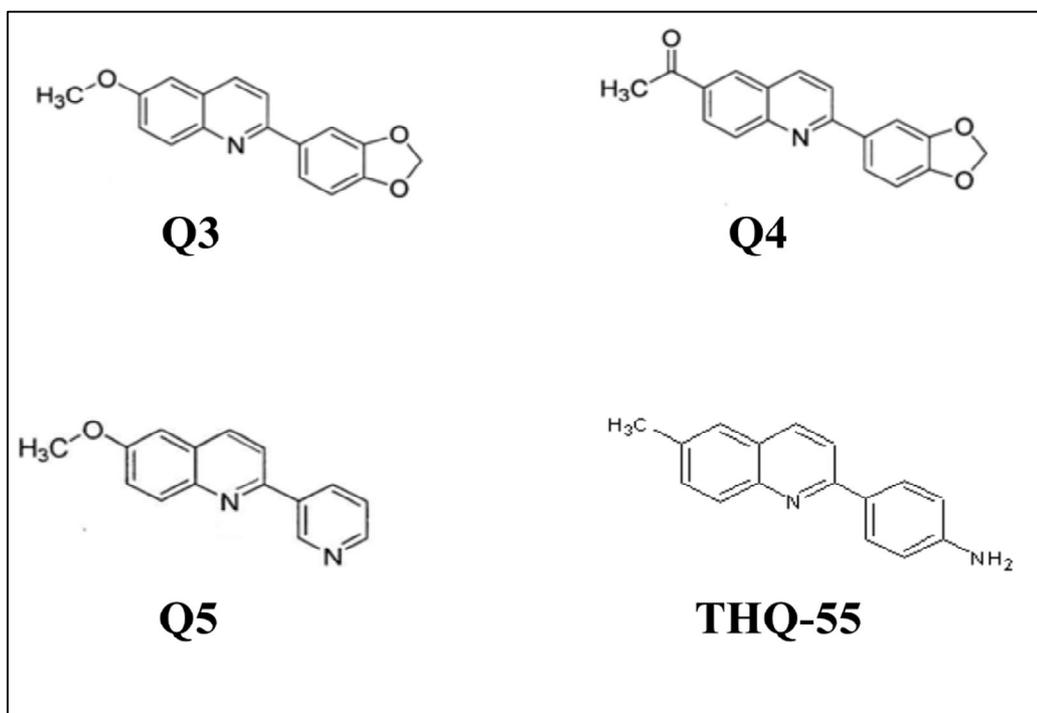


Figura 27.- Estructura de las quinolinas estudiadas. Se muestran los nuevos derivados de la familia de quinolinas (Q3, Q4 y Q5) y la descrita THQ-55.

Estas moléculas fueron ensayadas en el test de fluorescencia con ThT. Se probaron tres concentraciones distintas: 1, 10 y 100 μM para cada compuesto. Las quinolinas fueron disueltas en DMSO por su baja solubilidad en fase acuosa y se agregaron al medio hasta alcanzar el 1% (v/v) del solvente orgánico. Los resultados del efecto en la agregación de 4RMBD de estos compuestos se aprecian en la Figura 28. Los compuestos Q3, Q4 y Q5 no presentan un efecto significativo en la inhibición de la agregación ni una respuesta dosis-respuesta en el rango estudiado. Solamente, la quinolina THQ-55 descrita anteriormente presenta un efecto dosis-respuesta, aunque un efecto parcial en la agregación de tau en el rango estudiado.

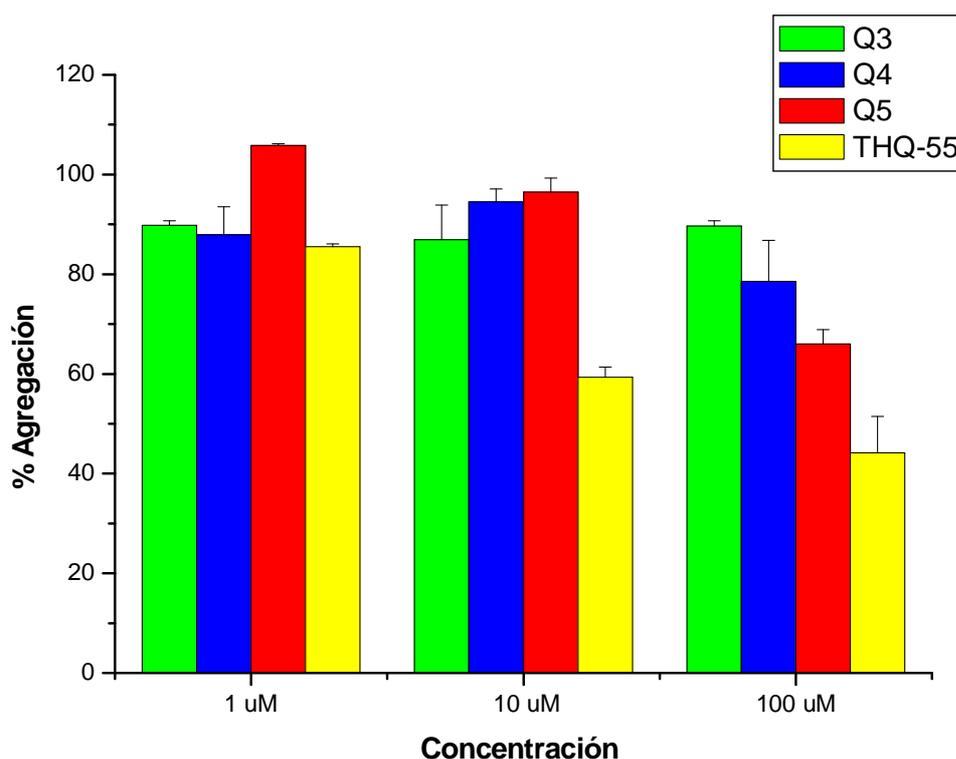


Figura 28.- Efecto de quinolinas en la agregación de 4RMBD Inhibición en la agregación a concentraciones de 1, 10 y 100 μM (1% v/v DMSO) evaluado con ensayo de fluorescencia con ThT (n=2). La agregación se realizó con 20 μM de 4RMBD y 5 μM de heparina a 37°C en amortiguador acetato de sodio 100 mM, pH 7,0, agregando ThT hasta concentración final de 12,5 μM luego de 20 hrs de agregación. Se consideró el 100% de agregación la señal promedio con vehículo DMSO 1% (v/v).

Para estudiar con más detalle el comportamiento dosis-respuesta de THQ-55, se realizó un barrido por diferentes concentraciones desde 0,1 μM – 100 μM y se midió el efecto en la agregación de 4RMBD. El límite superior de concentración está definido en función de la solubilidad máxima de la quinolina en solución. Se determinó que la quinolina THQ-55 tendría un potencial antiagregante de tau, observándose un efecto dosis-respuesta en el rango de concentraciones estudiado. Se ha calculado una concentración inhibitoria media (IC50) aproximada cercana a 100 μM con los datos generados. La curva dosis-respuesta de THQ-55 se presenta en la Figura 29.

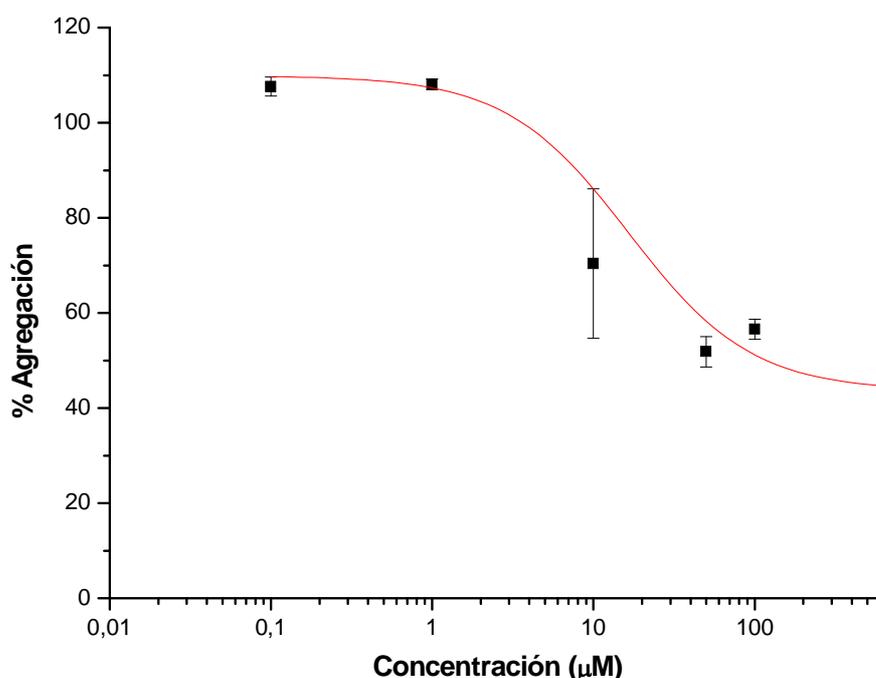


Figura 29. Curva dosis-respuesta para la inhibición de la agregación de 4RMBD con THQ-55. Inhibición en la agregación a concentraciones crecientes de THQ-55 (1% v/v DMSO) evaluado con ensayo de fluorescencia con ThT (n=2). La agregación se realizó con 20 μM de 4RMBD y 5 μM de heparina a 37°C en amortiguador acetato de sodio 100 mM, pH 7,0, adicionando ThT hasta concentración final de 12,5 μM luego de 20 hrs de agregación. Se consideró el 100% de agregación la señal promedio con vehículo DMSO 1% (v/v). Se muestra el efecto antiagregante de THQ-55 a medida que aumenta la concentración, pero sin llegar a una inhibición completa (n=2).

3.9.3 Estudio de efectos antiagregantes y desagregantes de ácido fúlvico

Como fuente de ácido fúlvico se empleó el estándar proporcionado por IHSS (Internacional Humic Substances Society) llamado «*Suwanne River Fulvic Standard I 1S101F*». Según lo descrito por Leenheer et al. (2006), el peso molecular promedio según diversas técnicas para este estándar es 800 g/mol. Sin embargo, el estándar es una mezcla de diversos ácidos posibles, que distribuyen en un amplio rango de pesos moleculares. Las estructuras propuestas que existen actualmente y modelan el comportamiento de estas moléculas se observan en la Figura 30.

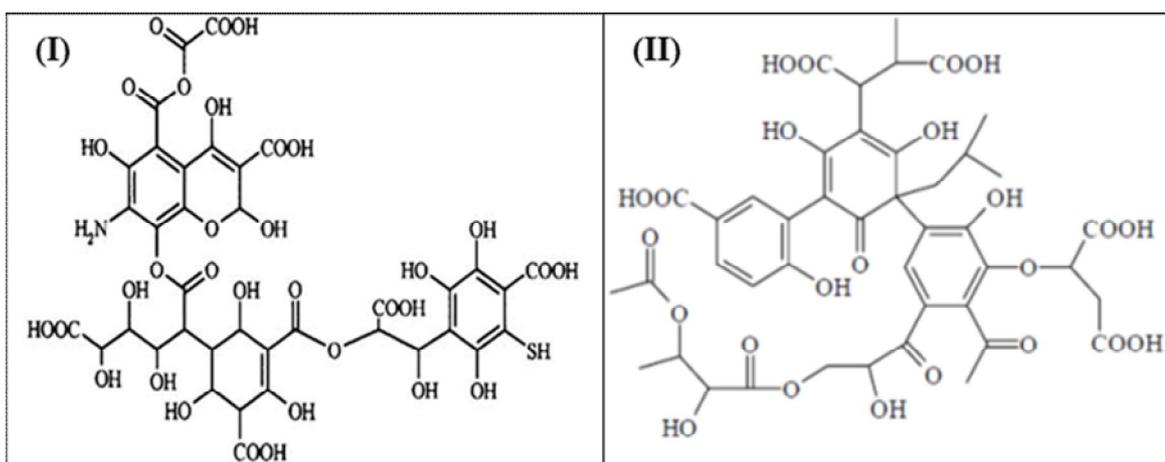


Figura 30.- Estructuras propuestas para el ácido fúlvico (*Suwanne River Fulvic Standard*) Propuesta (I) Referencia Álvarez-Puebla et al. (2006) y Propuesta (II) Referencia Leenheer (2006).

El ácido fúlvico es una molécula altamente soluble en fase acuosa, por lo que se puede preparar a altas concentraciones en solución. Dichas soluciones se prepararon en amortiguador acetato o amortiguador de agregación. El pH de las soluciones del amortiguador no varía cuando se trabaja con ácido fúlvico en las concentraciones empleadas en esta tesis. Se agregaron al medio desde la solución stock hasta alcanzar el 1% (v/v).

El estándar de ácidos fúlvicos fue ensayado en el test de fluorescencia con ThT. Se probó un rango de concentraciones entre 1 y 240 μM para dicho compuesto. Los resultados del efecto en la agregación de 4RMBD se aprecian en la Figura 31. El ácido fúlvico presenta un efecto significativo en la inhibición de la agregación y una respuesta dosis-respuesta en el rango estudiado. Se desprende de los datos que la $\text{IC}_{50} = 37 \mu\text{M}$ para la agregación de 4RMBD.

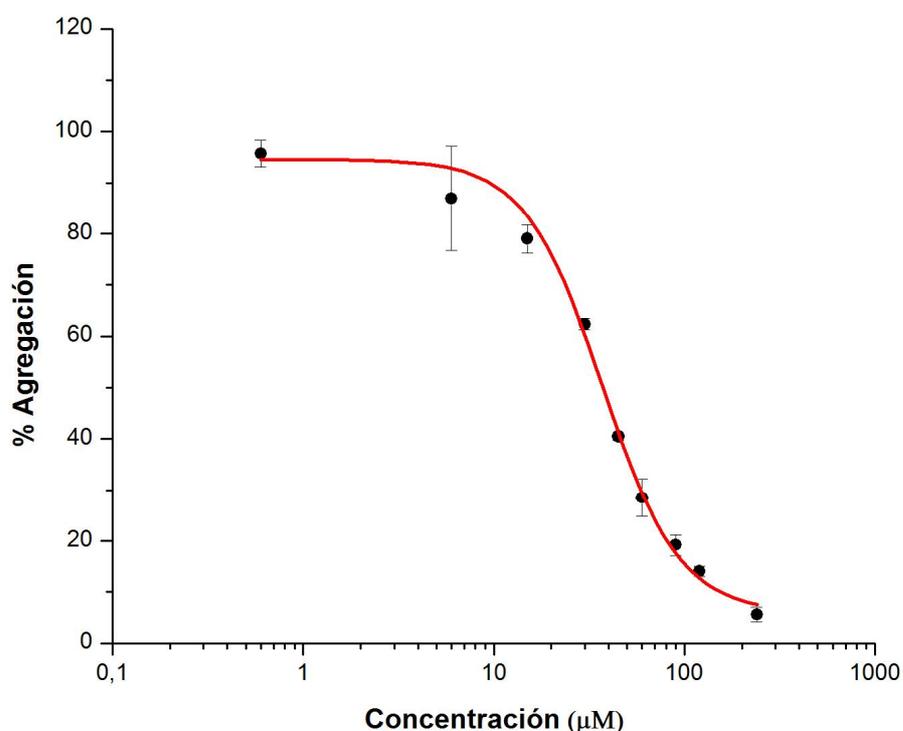


Figura 31.- Curva dosis-respuesta para la inhibición de la agregación de 4RMBD con ácido fúlvico. Se muestra el efecto antiagregante de ácido fúlvico en la agregación de 4RMBD con $\text{IC}_{50} = 37 \mu\text{M}$ ($n=2$). Inhibición a diversas concentraciones evaluadas con ensayo de fluorescencia con ThT. La agregación se realizó con 20 μM de 4RMBD y 5 μM de heparina a 37°C en amortiguador acetato de sodio 100 mM, pH 7,0, agregando ThT hasta concentración final de 12,5 μM luego de 20 hrs de agregación. Se consideró el 100% de agregación la señal promedio sin ácido fúlvico.

Por otra parte, se realizaron estudios para determinar si el ácido fúlvico presentaba un efecto en la desagregación de filamentos o fibras ya formadas. Para ello, el estándar de ácidos fúlvicos fue ensayado en el test de fluorescencia con ThT. Se probó un rango de concentraciones entre 1 y 400 μM para dicho compuesto. Los resultados del efecto en la desagregación de agregados de 4RMBD se aprecian en la Figura 32. El ácido fúlvico presenta un efecto desagregante significativo y una respuesta dosis-respuesta en el rango estudiado. Se desprende de los datos que la concentración desagregante media (DC50) es 95 μM .

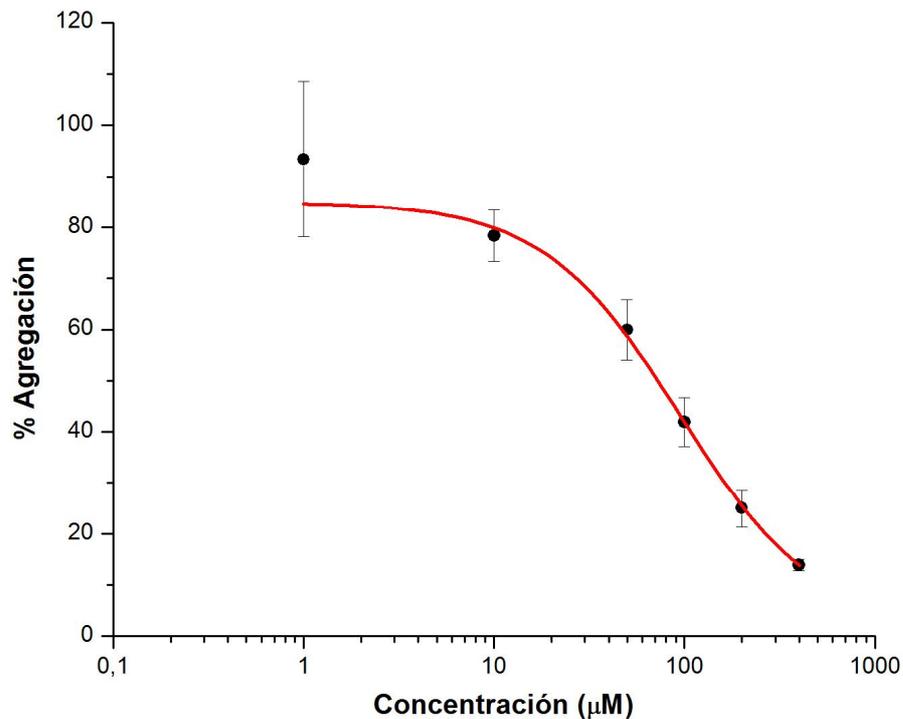


Figura 32: Curva dosis-respuesta de desagregación de 4RMBD con ácido fúlvico. Se muestra el efecto desagregante de ácido fúlvico en la agregación de 4RMBD con $\text{DC}_{50} = 95 \mu\text{M}$ ($n=3$). La agregación se realizó con 20 μM de 4RMBD y 5 μM de heparina a 37°C en amortiguador acetato de sodio 100 mM, pH 7,4 por 21 hrs, luego se adicionó el ácido fúlvico a diversas concentraciones y se dejó en las mismas condiciones por 21 hrs. Los agregados remanentes se evaluaron por fluorescencia adicionando ThT hasta concentración final de 12,5 μM . Se consideró el 100% de agregación la señal promedio sin ácido fúlvico.

El total de compuestos estudiados en el *screening* de moléculas antiagregantes de tau mediante el ensayo de fluorescencia con ThT se resume en la Tabla 3, junto con los parámetros IC50 y DC50 cuando corresponda.

Tabla 3.- Resumen de compuestos ensayados en la agregación de tau. Parámetros calculados de concentración inhibitoria media (IC50) y concentración desagregante media (DC50) según el ensayo de fluorescencia con TioflavinaT (ThT). N.D.= no determinado.

Compuesto	IC50 calculado	DC50 calculado	Isoforma Tau
Azul de metileno	0,4 μ M	3 μ M	4RMBD
THQ-55	~ 100 μ M	N.D.	4RMBD
Q3	>100 μ M	N.D.	4RMBD
Q4	>100 μ M	N.D.	4RMBD
Q5	>100 μ M	N.D.	4RMBD
Ácido Fúlvico	37 μ M	95 μ M	4RMBD

3.10 Estudios de efecto de ácidos fúlvicos en la formación de agregados de tau por AFM

3.10.1 Efectos de ácido fúlvico en la agregación de 4RMBD

Con el propósito de determinar los cambios morfológicos provocados por ácido fúlvico en la agregación de 4RMBD, se incubó dicha proteína en la presencia de 120 μM del compuesto durante un día en las mismas condiciones señaladas que la sección 3.8.2. Como control de agregación se dejó solo la proteína incubada con heparina en la misma relación señalada. Las imágenes de AFM fueron desarrolladas en modo *tapping* fluido sobre HOPG. Los resultados se muestran en la Figura 33. El control se caracteriza por la presencia de fibras de gran largo y pocas estructuras de tipo prefibrillar (Fig. 33A). El tratado con ácido fúlvico muestra una gran cantidad de estructuras oligoméricas y prefibrilares poco estructuradas o amorfas (Fig. 33B). Es decir, la presencia de ácido fúlvico inhibe la agregación de 4RMBD alterando los agregados formados e inhibiendo alguna etapa en la formación de fibras, conduciendo a la formación estructuras del tipo oligomérica y/o prefibrillar.

Sin embargo, no fue posible desarrollar una estadística comparada de varios campos en cuanto al número y largo de las fibras formadas de ambas situaciones, ya que la distribución y adherencia de los agregados de 4RMBD eran poco reproducibles.

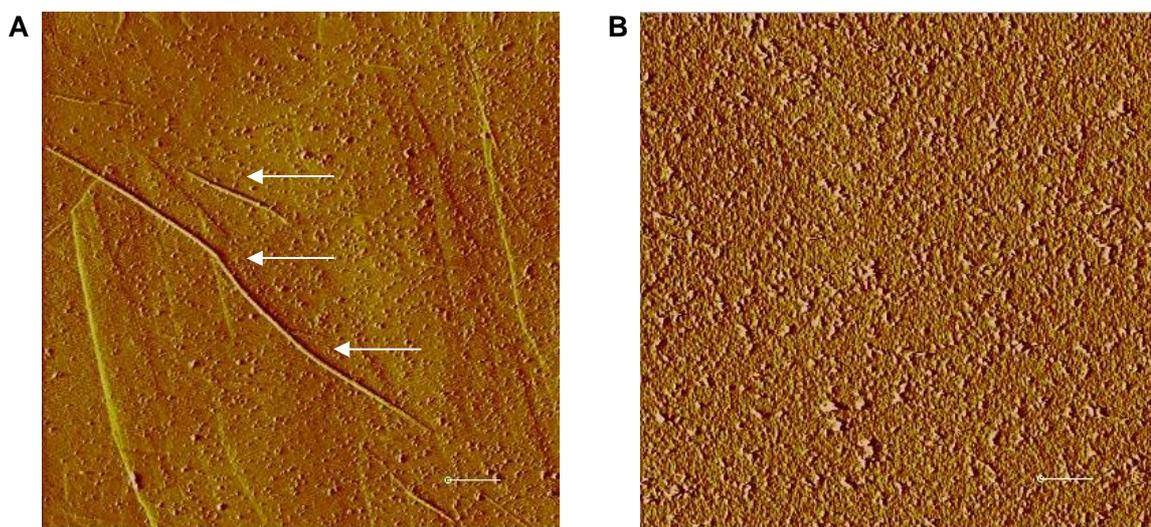


Figura 33.- Efectos de ácido fólvico en la agregación de 4RMBD Imágenes de amplitud modo *tapping* fluido en superficie HOPG, la agregación se realizó con 20 μM 4RMBD y 5 μM de heparina a 37°C en amortiguador (20 mM Hepes, 25 mM NaCl, pH 7,4). Las flechas indican la presencia de fibras formadas. A.- Agregados control 24 hrs (barra = 1 μm) B.- Agregados formados en la presencia de ácido fólvico 120 μM (barra = 1 μm).

3.10.2 Efectos de ácido fólvico en la agregación de htau40

Con el objeto de determinar los cambios morfológicos provocados por ácido fólvico en la agregación de htau40, se incubó dicha proteína en la presencia de 200 μM del compuesto durante siete días en las mismas condiciones señaladas que la sección 3.8.2. Como control de agregación se dejó solo la proteína incubada con heparina en la misma relación señalada. Las imágenes de AFM fueron desarrolladas en modo *tapping* fluido sobre HOPG. Para este caso, fue posible desarrollar una estadística comparada de varios campos del largo de las fibras formadas de ambas situaciones, ya que la distribución y adherencia de los agregados de htau40 son más reproducibles para los diferentes campos.

Los resultados para el control de agregación de htau40 se muestran en la Figura 34 A y B. El control se caracteriza por la presencia de fibras de mayor largo y pocas estructuras de tipo prefibrillar y/o oligomérica. En la Figura 34A se observa un campo representativo y en la Figura 34B un fibrilla típica. Por otra parte, los resultados para la muestra tratada con ácido fúlvico 200 μ M se muestran en la Figura 34 C y D. El tratado con ácido fúlvico muestra estructuras oligoméricas y prefibrilares poco estructuradas o amorfas, y sin fibras de gran tamaño. En la Figura 34C se observa un campo representativo y en la Figura 34D agregados poco estructurados que se generan en la presencia de ácido fúlvico.

Para analizar las diferencias entre las estructuras encontradas en la presencia de ácido fúlvico versus la agregación control, las estructuras formadas fueron clasificadas en función del parámetro de la longitud. Para ello, se analizaron los elementos presentes en al menos diez campos de cada una de las muestras mencionadas anteriormente. La distribución para la longitud fue normalizada y se graficó la frecuencia relativa para la muestra control y tratada con ácido fúlvico como se muestra en la Figura 35. Esta distribución es asimétrica con sesgo positivo para ambos casos, y se observan diferencias en la distribución de probabilidad entre ambas, ya que la frecuencia modal para la agregación en presencia de ácido fúlvico varía hacia valores de menor longitud (50-100 nm). Esto sugiere, que el ácido fúlvico modifica la distribución del tamaño de los agregados formados y en consecuencia, estaría inhibiendo la formación de las fibras favoreciendo la formación de agregados de menor tamaño.

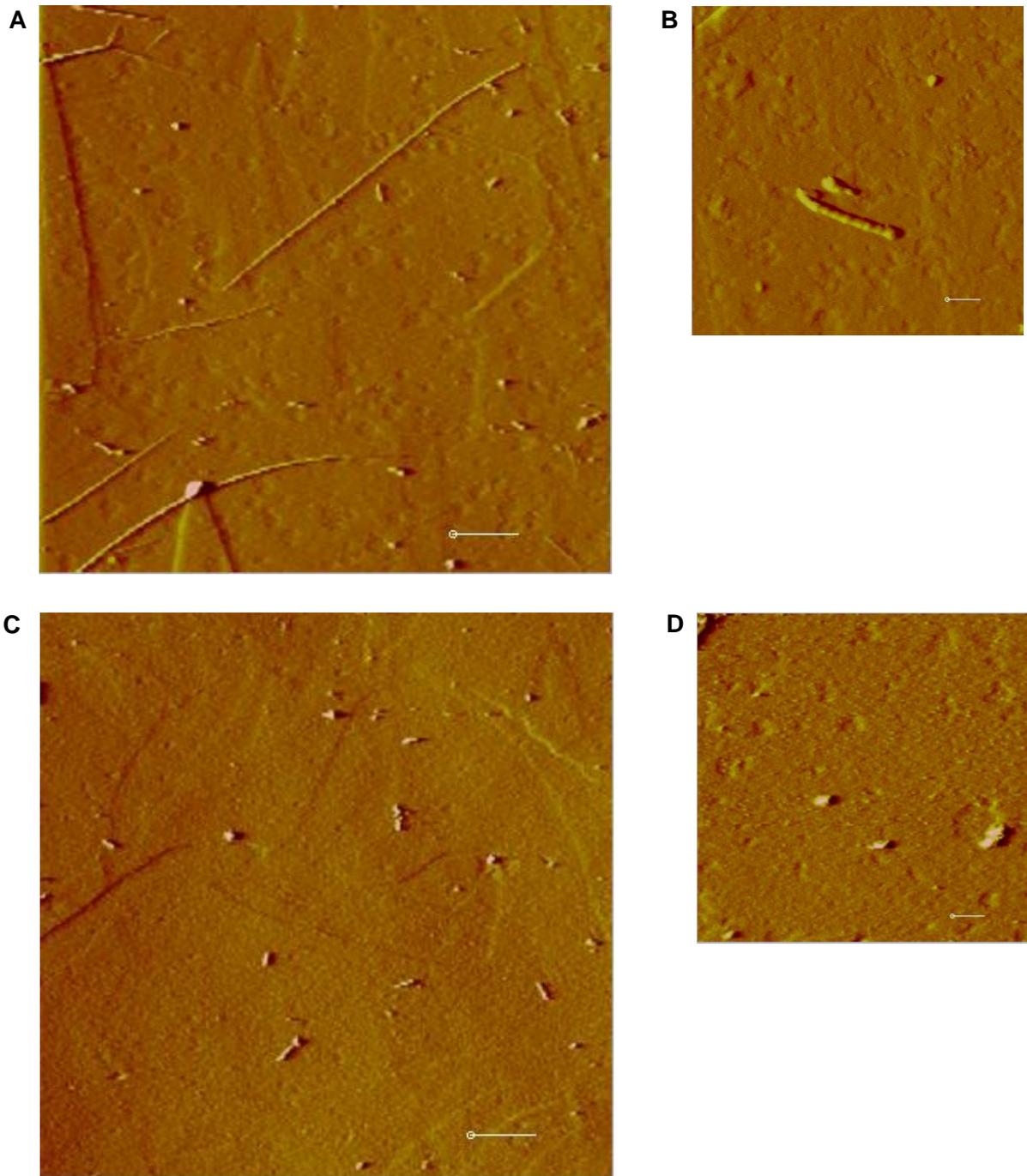


Figura 34.- Efectos de ácido fúlvico en la agregación de htau40. Imágenes AFM de amplitud modo *tapping* fluido sobre HOPG, la agregación se realizó a 44 μM proteína y 11 μM heparina por 7 días a 37°C en amortiguador (10 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 7,4). Agregación control, A.- Campo representativo (barra= 500 nm) B.- Fibrilla (Barra=100 nm). Agregación 200 μM ácido fúlvico, C.- Campo representativo (barra= 500 nm), D.- Agregados no estructurados (Barra=100 nm).

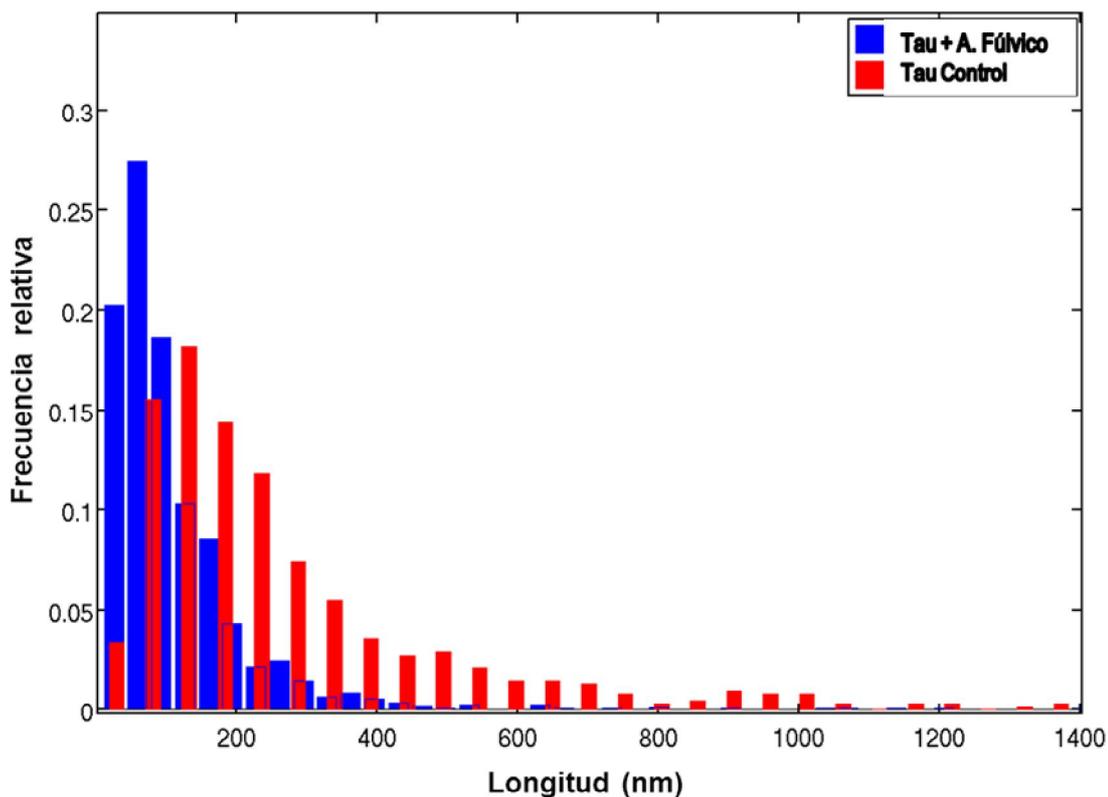


Figura 35.- Distribución de la longitud de agregados de htau40 formados en ausencia y presencia de ácido fúlvico. Los agregados formados fueron analizados en función de la longitud (nm) contabilizando al menos diez campos representativos de imágenes de AFM de cada una de las condiciones descritas. La agregación control (distribución en rojo) se realizó a 44 μM proteína y 11 μM heparina por 7 días a 37°C en amortiguador (10 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 7,4). La agregación con ácido fúlvico 200 μM (distribución en azul) se realizó en las mismas condiciones descritas.

3.10.3 Efectos de ácido fúlvico en desensamble de agregados preformados de htau40

Con el objeto de determinar el efecto de ácido fúlvico en el desensamble de agregados preformados de htau40, se incubó dicha proteína en las mismas condiciones señaladas que la sección 3.8.2 por seis días, luego de lo cual se agregó ácido fúlvico a una concentración final de 200 μM durante seis días en las mismas condiciones de agregación. Como control de agregación se dejó solo la proteína incubada con heparina en la misma relación señalada por seis días y se agregó amortiguador de trabajo en vez de ácido fúlvico para dejar incubar por otros seis días. Las imágenes de AFM fueron desarrolladas en modo *tapping* fluido sobre HOPG. Para este caso, también fue posible desarrollar una estadística comparada de varios campos del largo de las fibras formadas de ambas situaciones, ya que la distribución y adherencia de los agregados de htau40 son más reproducibles para los diferentes campos.

Los resultados para el control de agregación de htau40 se muestran en la Figura 36 A y B. El control se caracteriza por la presencia de fibras de mayor largo y pocas estructuras de tipo prefibrillar y/o oligomérica. A su vez, se forman macroestructuras de gran tamaño y densamente pobladas. En la Figura 36A se observa un campo representativo y en la Figura 36B un fibrilla típica. Por otra parte, los resultados para la muestra tratada con ácido fúlvico 200 μM se muestran en la Figura 36 C y D. El tratado con ácido fúlvico muestra estructuras prefibrilares poco estructuradas o fibras muy cortas, además de no presentar las macroestructuras densamente pobladas. En la Figura 36C se observa un campo representativo y en la Figura 36D agregados poco estructurados que se generan cuando se adiciona ácido fúlvico.

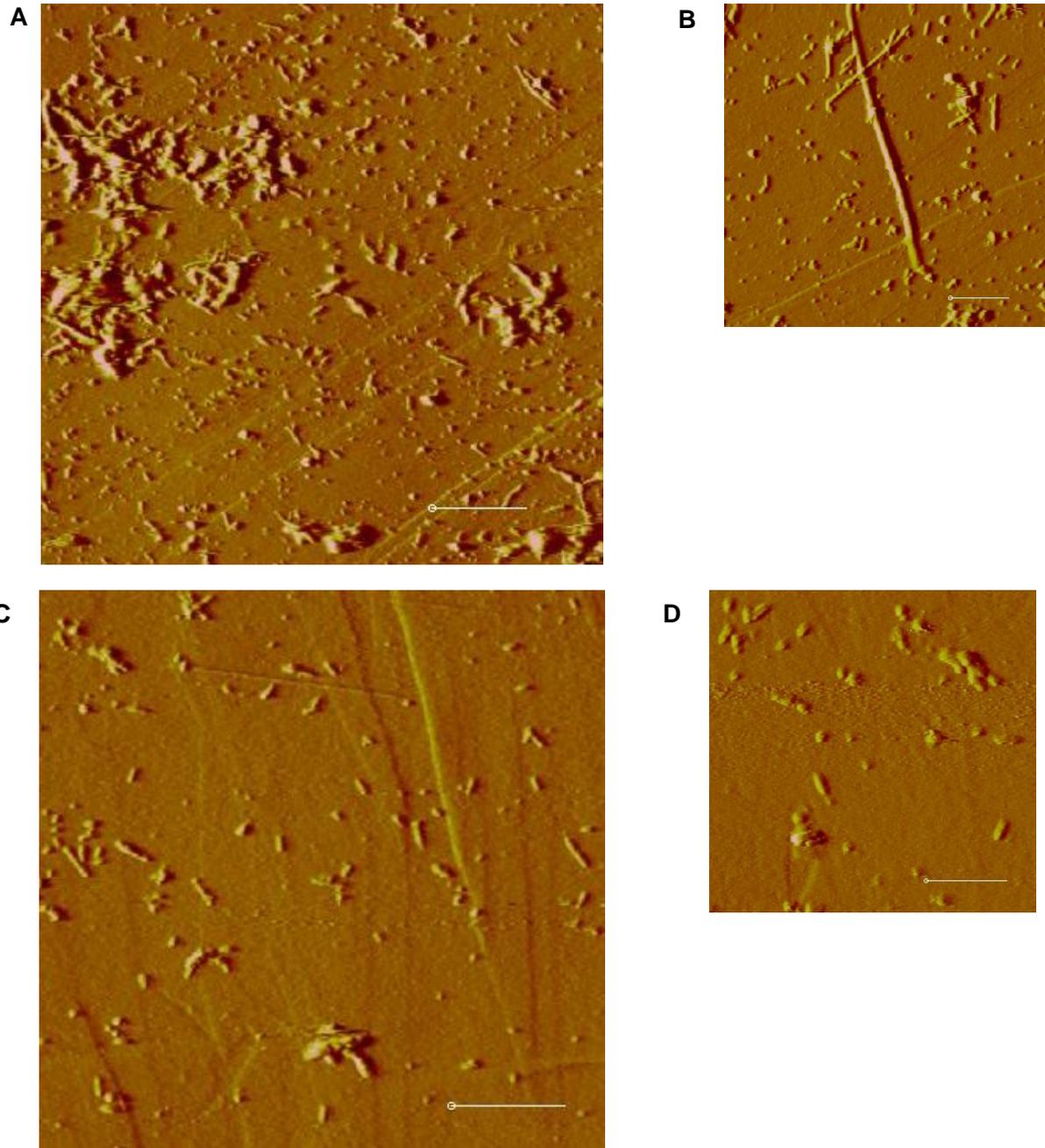


Figura 36.- Efectos de ácido fúlvico en el desensamble de agregados preformados de htau40 Imágenes AFM de amplitud modo *tapping* fluido sobre HOPG, la agregación se realizó a 44 μM proteína y 11 μM heparina por 6 días a 37°C en amortiguador (10 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 7,4) y tratamiento por 6 días con ácido fúlvico. Agregación control, A.- Campo representativo (barra= 1000 nm) B.- Fibrillas (Barra=500 nm). Desensamble con ácido fúlvico 200 μM , C.- Campo representativo (barra= 1000 nm), D.- Agregados prefibrilares formados (Barra=500 nm)

Se analizaron los tamaños de los agregados preformados posterior a la adición del ácido fúlvico. La distribución para la longitud fue normalizada y se graficó la frecuencia relativa para la muestra control y tratada con ácido fúlvico como se observa en la Figura 37. Esta distribución es asimétrica con sesgo positivo para ambas y se observan diferencias en la distribución de probabilidad entre ellas, ya que la frecuencia modal para los agregados preformados en presencia de ácido fúlvico varía hacia valores de menor longitud. Esto sugiere que el ácido fúlvico es capaz de modificar los agregados preformados de htau, desensamblando fibras de tamaño mayor y evitando la formación agregados densamente poblados.

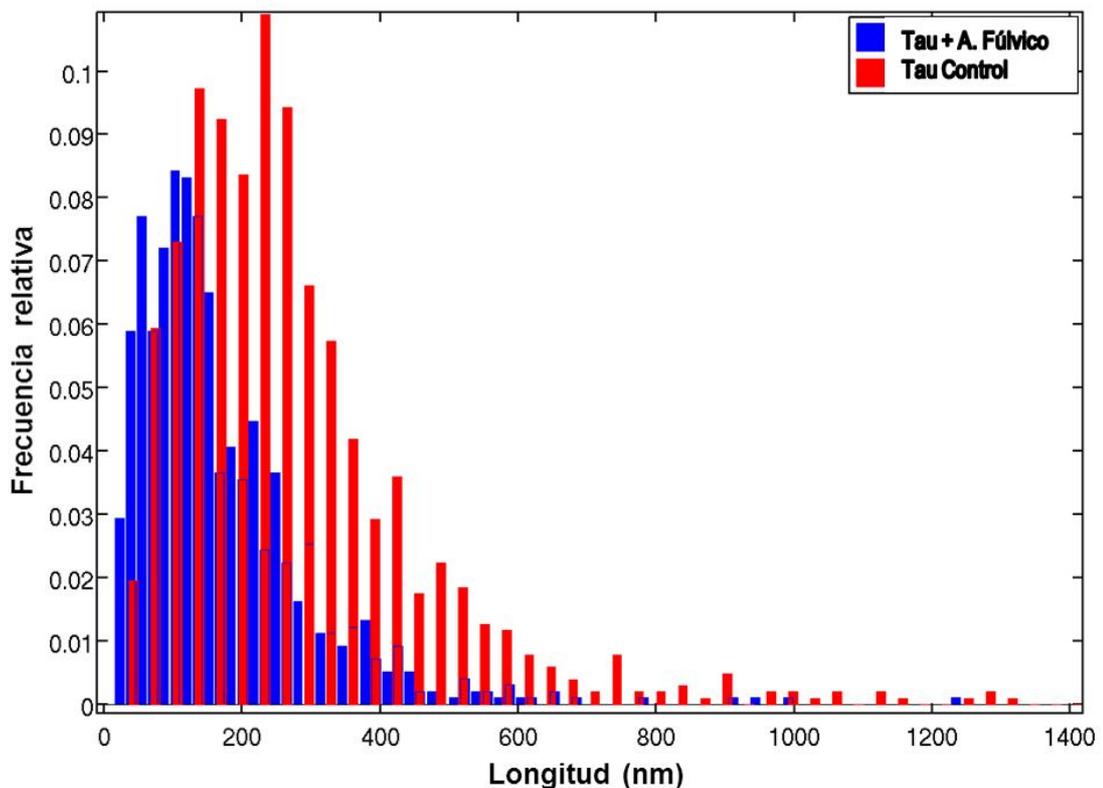


Figura 37.- Distribución de la longitud de agregados preformados de htau40 en ausencia y presencia de ácido fúlvico. Los agregados formados fueron analizados en función de la longitud (nm) contabilizando al menos cuatro campos representativos de imágenes de AFM de cada una de las condiciones descritas. La agregación se realizó a 44 μM proteína y 11 μM heparina por 6 días a 37°C en amortiguador (10 mM Hepes, 100 mM NaCl, pH 7,4) y tratamiento por 6 días con ácido fúlvico 200 μM .

4. DISCUSIÓN

4.1 Expresión y Purificación de htau y 4RMBD recombinante

La expresión de htau recombinante en *E.coli* es un sistema de expresión simple, de fácil reproducción y que genera la proteína sin modificaciones post-traduccionales. Ofrece ventajas en relación a rendimientos, facilidad y eficiencia económica con respecto al método clásico de purificación de tau desde cerebro bovino por ciclos de ensamblaje y desensamblaje de microtúbulos, utilizado anteriormente en nuestro laboratorio (Farias et al, 1992). Los rendimientos relativos desde los cultivos de *E. coli* fueron alrededor de 3 mg para htau recombinante de alta pureza por litro de cultivo aproximadamente, en comparación a los alrededor de 2 a 3 mg de proteína obtenidos desde la purificación de un cerebro bovino promedio, pero con las ventajas de mayor pureza, menores costos y tiempo asociados a la producción recombinante de la proteína. Para efectuar dicho proceso, se montaron las técnicas para la purificación por dos metodologías distintas.

En primera instancia, se logró llevar a cabo el aislamiento de htau valiéndose de sus propiedades intrínsecas, con un protocolo basado en un tratamiento térmico, cromatografía de intercambio catiónico y cromatografía de exclusión molecular. Por otra parte, se logró clonar exitosamente la secuencia de htau en vectores que expresan una proteína unida a un hexapéptido de histidina en su extremo amino-terminal, lo que permitió su aislamiento en base a cromatografía IMAC y posteriormente una cromatografía de exclusión molecular acoplada a HPLC (SEC-HPLC). Ambas metodologías fueron eficaces para obtener htau recombinante con grado de pureza satisfactorio. Comparativamente, por razones de tiempo, rendimiento y facilidad en el proceso, se escogió el protocolo basado en IMAC para purificar htau para los experimentos subsecuentes. Sin embargo, el mayor inconveniente en ambos casos fue la generación de productos de degradación cuando se expresa en *E. coli* que dificultan su purificación. Se ha descrito que htau expresada en dichos sistemas es inestable y tiende a generar diversos patrones de

degradación, lo cual obliga a tratar de aislarlos por alguna técnica de separación por tamaño molecular (Barghorn et al., 2005). A pesar de que se ensayaron diversas condiciones de tratamiento y preparación de los extractos, dicho patrón es intrínseco al sistema de expresión con *E. coli*. Este inconveniente fue subsanado al utilizar técnicas de alto rendimiento para la separación cromatográfica, con una columna de exclusión molecular asociada a HPLC.

A su vez, en este trabajo se logró clonar y expresar el fragmento 4RMBD (htau₂₄₄₋₃₇₂), que permitió estudiar directamente el dominio involucrado en la agregación de tau. La purificación se basó en la cromatografía IMAC y SEC-HPLC según lo descrito anteriormente. Sin embargo, el patrón de degradación generado en este caso fue mucho más discreto y por ende, ofrece una mayor facilidad para purificar dicho fragmento.

4.2 Agregación de tau con heparina *in vitro* y caracterización de estructuras filamentosas

La agregación de htau *in vitro* es un proceso lento, que requiere de inductor para llevarse a cabo. Como contraparte, la agregación del fragmento 4RMBD tiene una cinética de agregación más rápida, aunque siempre requiere la presencia de inductor. Por lo general, dicho compuesto es heparina, aunque se han descrito otras moléculas polianiónicas inductoras como ácido araquidónico (Wilson et al., 1997). En este trabajo, se logró la inducción de la agregación de tau *in vitro* hasta la formación de estructuras filamentosas que fueron caracterizadas por diversas técnicas. La formación de agregados en presencia de heparina se postula provocaría un efecto electrostático que afectaría la estructura "random coil" de tau monomérica e induciría su estructuración en agregados ricos en estructura sábana β . La etapa limitante sería la formación de dímeros y primeros estadios de agregación, conocido como fase de nucleación para luego ir extendiendo la fibra amiloidogénica en formación (Congdon et al, 2008). Sin embargo, no se conoce con exactitud cómo se desarrolla este proceso *in vitro*. En términos fisiológicos, la heparina simularía los efectos provocados en tau por las hiperfosforilaciones (cargas negativas) que sufre en los procesos patológicos. Dicho efecto de compensación

electrostática de tau se ha demostrado por pseudofosforilaciones en residuos claves de su estructura, encontrándose una mayor tendencia a agregar *in vitro e in vivo* (Alonso et al, 2010; Chang et al., 2010).

Mediante estudios con espectroscopia de fluorescencia se siguió la cinética de formación de agregados de htau40. Para ello se utilizó la sonda Tioflavina S (ThS) según lo descrito por Friedhoff et al. (1998). Se observó un aumento continuo de la señal de fluorescencia en los tiempos estudiados. Sin embargo, el uso posterior de ThS en los siguientes ensayos no arrojó la reproducibilidad esperada. A pesar que Friedhoff et al. (1998), señalaron que el uso de ThS es más reproducible que otras sondas como Tioflavina T (ThT), nuestros resultados fueron contradictorios. Esto podría explicarse por la calidad de ThS usada, ya que comercialmente dicho compuesto corresponde a una mezcla con cierto grado de impureza (grado técnico solamente). En cambio, cuando los experimentos fueron realizados con ThT los ensayos fueron más reproducibles. Dicho compuesto se puede adquirir como un compuesto de alta pureza. En consecuencia, los experimentos posteriores para evaluar la formación de agregados en el tiempo mediante espectroscopia de fluorescencia fueron llevados a cabo con ThT.

La formación de agregados también se estudió en tiempo real mediante la técnica de *dynamic light scattering* (DLS), la cual permite calcular la distribución del tamaño de las partículas en solución y el peso molecular asociado. El seguimiento de la agregación de htau40 mediante DLS arrojó que los cambios en tiempos iniciales son mínimos, lo que da cuenta de una cinética lenta de agregación, pero al cabo de un día de agregación, se satura la señal de *scattering* con la formación de agregados superiores al límite superior de detección. En cambio, se logró estudiar la cinética en tiempo real de agregación de 4RMBD en las primeras horas, lo que se corresponde con lo descrito en la literatura (Sugino et al, 2009). Este resultado permitiría desarrollar un ensayo en tiempo real de la agregación de tau con el objeto de evaluar moléculas con capacidad antiagregante.

Mediante la microscopía electrónica se comprobó la formación de estructuras filamentosas tanto de htau40 como de 4RMBD. En dicha formación de estructuras

se observaron filamentos del tipo “*straight filaments*” (*SF-like*) y del tipo filamentos helicoidales pareados (*PHF-like*) según descrito en la literatura (Crowther et al., 1991). Sin embargo, la semicuantificación de estructuras formadas es poco reproducible. Esto dado que la visualización de las estructuras con la tinción negativa con acetato de uranilo es altamente variable, ya que en una misma grilla pueden existir zonas con campos con tinción negativa, con tinción positiva y sin tinción.

Uno de los logros importantes de este trabajo ha sido desarrollar una metodología para el estudio morfológico de agregados de tau mediante microscopia de fuerza atómica (AFM). Se realizaron ensayos con diversas condiciones para determinar las óptimas para su estudio. Sobre las superficies usadas, la mica (características hidrofílicas) y el HOPG (características hidrofóbicas) presentan una adhesión diferencial hacia los agregados de tau, siendo la segunda superficie la que ofrece un mejor soporte, lo que sugiere que las interacciones hidrofóbicas gobiernan la adhesión de los agregados de tau a la superficie. Por otra parte, en modo *tapping* (contacto intermitente), se realizaron estudios en aire y en fluido. En el primer caso, éstos mostraron agregados lábiles y con baja presencia de elementos por campo, con morfologías y distribuciones poco reproducibles. En el modo fluido se lograron obtener las mejores imágenes, ya que la presencia del amortiguador al parecer estabiliza las fibras y permite su adherencia con mayor afinidad a la superficie (de preferencia HOPG). Se observó una distribución homogénea de elementos por campo y morfología reproducible. Esto concuerda con lo descrito recientemente por Wegmann et al. (2010), donde se establece que las fuerzas electrostáticas estabilizan las interacciones de las fibras con la superficie.

Desde el punto de vista de las fibras y agregados formados por 4RMBD y htau40 se observaron distintos estadios de agregación coexistiendo al mismo tiempo. Es posible encontrar oligómeros y agregados prefibrilares, incluso aquellos descritos por Maeda et al. (2007) como “tau granular”. A su vez, las fibras encontradas varían en su largo desde unos cientos de nm hasta varios μm . También como en microscopia electrónica, se observan filamentos del tipo “*straight filaments*” (*SF-like*)

y del tipo filamentos helicoidales pareados (*PHF-like*). El fragmento 4RMBD presentó una adhesión más débil a la superficie de HOPG y a su vez a medida que se va aumentando el tiempo de agregación, los agregados se hacen menos afines a la superficie y tienden a interaccionar entre ellos. Los agregados de htau40 presentaron una adherencia a la superficie de HOPG más fuerte, con una distribución más equitativa entre los diversos campos. Dichas diferencias podrían explicarse por la existencia de otros motivos (hacia los extremos amino o carboxilo-terminal) en la estructura de la proteína que determinen la adherencia de los agregados formados en comparación con 4RMBD.

Con esto se ha abierto el desarrollo de otras aplicaciones biofísicas de la microscopia de fuerza para estudio de este sistema, como determinar las fuerzas de adhesión y elasticidad de las fibras formadas en diversas superficies o en la presencia de compuestos que afecten la estructura y/o estabilidad de los agregados.

4.3 Screening de moléculas que inhiben la agregación de tau

Se estableció un ensayo de fluorescencia con ThT para el *screening* de moléculas con capacidad antiagregante de proteína tau. Para validarlo, se reprodujo el efecto inhibitorio de azul de metileno sobre la agregación de 4RMBD *in vitro*, calculándose un $IC_{50}=0,4 \mu M$ y comprobándose su efecto sobre la formación de filamentos por AFM.

Se ensayaron compuestos derivados de quinolinas para evaluar su efecto en la agregación de tau. De éstos, solo THQ-55, previamente descrito como antiagregante de tau bovina (Navarrete, 2008; Tesis Magíster en Bioquímica UNAB; patente PCT en curso) mostró un efecto inhibitorio a altas concentraciones ($IC_{50} \sim 100 \mu M$). La principal dificultad para el estudio del efecto de estos compuestos fue su baja solubilidad en amortiguadores acuosos. Por ello, se trabajaron en DMSO 1% (v/v), aunque la solubilidad límite alcanzada no superó los $100 \mu M$ para los

compuestos estudiados. Por ello, se concluye que los nuevos derivados de quinolinas empleados en esta tesis (Q3, Q4 y Q5) no poseen una actividad antiagregante de tau y se deben seguir intentando con nuevas quinolinas, con características estructurales más cercanas a THQ-55 y grupos funcionales que puedan aumentar su solubilidad.

Por otra parte, se ensayó de la familia de los polifenoles, un estándar de ácido fúlvico (Suwannee River). Dicho compuesto presentó un efecto inhibitorio de la agregación de tau con un $IC=37 \mu M$. Y a su vez, desensambla agregados preformados de tau con una $DC=95 \mu M$. Estos resultados sugieren que el ácido fúlvico afecta el proceso de agregación de tau *in vitro* inducido por heparina.

4.4 Efectos de ácido fúlvico en la agregación de tau

Mediante estudios de caracterización morfológica con AFM se ha determinado que el ácido fúlvico es capaz de inhibir la formación de estructuras filamentosas de 4RMBD, donde en su mayoría forma agregados poco estructurados. A su vez, inhibe la formación de estructuras filamentosas de htau40, cambiando la curva de distribución de filamentos aumentando la formación de oligómeros, agregados poco estructurados y filamentos más cortos. Este proceso de inhibición estaría relacionado con una disminución en la formación de estructuras sábana β , como se desprende indirectamente por los ensayos con fluorescencia con ThT. Por otra parte, el ácido fúlvico es capaz de desensamblar agregados preformados de htau40 afectando la curva de distribución de tamaños de las fibras formadas, promoviendo la conversión de las fibras en agregados de menor tamaño o simplemente oligómeros poco estructurados. Además evita la formación de estructuras agregadas densas de gran tamaño que se observan en el control. Esto sugiere que el ácido fúlvico tendría un efecto en la remodelamiento de las fibras formadas.

Es necesario realizar experimentos a futuro para determinar los mecanismos involucrados en los efectos antiagregantes de ácido fúlvico sobre tau. Una

interesante observación experimental preliminar realizada por AFM es que las fibras o agregados prefibrilares tratados con ácido fúlvico presentan una adherencia menor a la superficie de HOPG cuando son recorridas por el *cantilever* que las fibras control (resultados no mostrados). Esto estaría indicando que las fuerzas hidrofóbicas que gobiernan la interacción entre el HOPG y los agregados de tau se ven alterados en la presencia del ácido fúlvico. Sin embargo, se requiere mayor investigación sobre los cambios estructurales y las fuerzas de interacción entre las fibras y con la superficie de HOPG. Por otra parte, se podrían caracterizar los agregados de tau formados en la presencia de este compuesto mediante anticuerpos que reconozcan epítomos conformacionales a medida que se forman los agregados de tau, como el anticuerpo MC-1 para estructuras del tipo PHF o el anticuerpo *Officer* caracterizado contra profibrillas anulares amiloides, estructuras específicas de oligómeros, comunes a diversas proteínas amiloidogénicas (Jicha et al., 1997; Kaye et al., 2009). A su vez, se podría ensayar el efecto del ácido fúlvico en la transición desde estructuras sávana β a “*random coil*” mediante dicroísmo circular.

El uso de heparina para inducir la agregación de tau *in vitro* es el método más empleado en la actualidad y validado para la investigación de moléculas con capacidad antiagregante de tau (Taniguchi et al., 2005). Aunque la interacción de heparina con ácido fúlvico no se puede descartar de plano, es poco probable por la repulsión electrostática dada por las cargas netas negativas de ambas moléculas. Sin embargo, para comprobar que los efectos de ácido fúlvico están dissociados de la presencia de heparina en el medio, se puede realizar la agregación de tau en la presencia de otros inductores como ácido araquidónico (Wilson et al., 1997), así como emplear un modelo de agregación *in vitro* que no emplee moléculas inductoras, como el ya descrito péptido $^{306}\text{VQIVYK}^{311}$ (PHF6) (von Bergen et al., 2000).

Con respecto a la interacción específica del ácido fúlvico con la estructura proteica es una materia abierta a la especulación. Por lo experimentos realizados en esta tesis, se puede observar que existe un efecto del compuesto tanto a nivel de

proteína total, como a la región de unión a microtúbulos de la 4 repeticiones (4RMBD). Sin embargo, es riesgoso proponer *a priori* un mecanismo de interacción con las regiones de la proteína involucradas. El ácido fúlvico es una mezcla de diversos compuestos de origen natural, por lo que no se puede establecer con exactitud una estructura determinada que interactúe con tau. No obstante, los modelos propuestos dan cuenta de zonas ricas en polifenoles, ácidos policarboxílicos y anillos aromáticos (Leenheer, 2007). Se puede proponer que dichas moléculas en solución poseen diversas conformaciones, algunas de las cuales serían más afines a las regiones proagregantes de la proteína y/o especies intermedias de agregación, lo que afecta el equilibrio en la formación de fibras o en la desensamble de éstas.

Para los compuestos polifenólicos el mecanismo de inhibición en la formación de fibrillas amiloides implicaría una conformación estructural específica necesaria para la sábana β y la interacción y estabilización del complejo inhibidor-proteína; y a su vez, una interacción aromática entre el compuesto polifenólico y los residuos aromáticos en las secuencias amiloidogénicas, las cuales pueden direccionar el inhibidor al núcleo de agregación e interferir con el ensamblaje de la fibra (Porat et al, 2006). Para moléculas polifenólicas derivadas del té verde, como galato de epigallocatequina se ha descrito que inhibe la formación de fibras *in vitro* de α -sinucleína y β -amiloide, por la unión directa con la proteína nativa desplegada y previniendo la conversión en intermediarios de agregación tóxicos. En este caso, en vez de generarse un amiloide rico en estructura de sábana β , se promueve la formación de oligómeros no estructurados ni tóxicos (Ehrnhoefer et al., 2008). A su vez, galato de epigallocatequina puede remodelar fibras maduras de α -sinucleína y β -amiloide en agregados amorfos más pequeños y que presentan una menor toxicidad celular (Bieschke et al., 2010). Resultados similares se han caracterizado para los efectos antiagregantes del polifenol resveratrol sobre el péptido β -amiloide (Ladiwala et al., 2010). Se ha descrito que estructuralmente son los grupos hidroxilos de los polifenoles, por su habilidad para formar puentes de hidrógeno, así

como la planaridad de sus estructuras, los elementos claves en su capacidad como agentes de la inhibición de la agregación proteica (Bulic et al., 2010).

4.5 Proyecciones y alcances de este trabajo de tesis

Los tratamientos actuales para la EA son solo fármacos sintomáticos, que ayudan a prevenir o mejorar algunos síntomas en los pacientes, pero no detienen el progreso de la enfermedad. Entre los tratamientos que se usan están los inhibidores de la acetilcolinesterasa (como donazepilo, rivastigmina, galantamina) y antagonistas del receptor de NMDA (como memantina) (Thomas et al., 2009; Suh et al., 2010). Esto ha provocado que la investigación biomédica este enfocada a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas contra la EA, capaces de revertir la progresión de la enfermedad y brindar mejores alternativas para los pacientes.

En este contexto, la implementación de una metodología para el *screening* de moléculas con capacidad antiagregante de tau constituye un aporte para el ensayo de nuevas familias de moléculas que puedan afectar el proceso de agregación de tau *in vitro*, los que eventualmente podrían ensayarse en otros modelos para evaluar sus condiciones para el tratamiento clínico de la enfermedad.

En el desarrollo de este trabajo de tesis se expuso que el ácido fúlvico inhibe la agregación de la tau *in vitro* inducida por heparina y desensamblaría los agregados preformados de tau. Esto abre interesantes perspectivas para comprender el efecto de dicha interacción entre tau y los compuestos presentes en el ácido fúlvico. Por otra parte, se requieren desarrollar estudios en modelos celulares para comprender el eventual efecto neuroprotector de dichas moléculas en cultivos neuronales que sobre-expresan tau y a su vez, cual es la toxicidad asociada a los agregados formados en la presencia de ácido fúlvico sobre cultivos neuronales. Interesantemente, se ha señalado que las propiedades antioxidantes de este tipo de compuestos podrían mediar un efecto neuroprotector (Ghosal et al., 1993). Por ende, se deben hacer estudios específicos sobre la acción de ácido fúlvico sobre cultivos neuronales para determinar su rol sobre el estrés oxidativo celular.

Finalmente este trabajo representa una oportunidad para el estudio de extractos fitoactivos que puedan ser efectivos contra los procesos de neurodegeneración. Se ha sugerido que el uso de nutracéuticos, compuestos de origen natural con alto contenido antioxidante, podrían ser usados como un agente complementario en la terapéutica de la enfermedad por sus propiedades antioxidantes, antiamiloidogénicas y antiinflamatorias (Kim et al., 2010). Uno de dichos nutracéuticos es el *shilajit* andino, sustancia mineral vegetal que se caracteriza por su alto contenido de ácido fúlvico. Se requieren estudios posteriores para evaluar *in vitro* e *in vivo* los efectos de ácidos fúlvicos aislados desde este nutracéutico sobre la agregación de tau y sus efectos en la sobrevivencia neuronal. Dichas investigaciones ayudarían a explicar los efectos beneficiosos descritos para esta clase de fitoquímicos.

5.- CONCLUSIONES

- a) Se expresó y purificó htau recombinante desde cultivos de *E. coli* por dos métodos de purificación, a saber: i) cromatografía de intercambio y de exclusión molecular, ii) cromatografía IMAC y SEC-HPLC.
- b) Se expresó y purificó el fragmento 4RMBD desde cultivos de *E. coli* mediante cromatografía IMAC y SEC-HPLC.
- c) Se indujo la agregación de tau *in vitro* con heparina y se caracterizaron los agregados formados mediante técnicas de espectroscopia de fluorescencia, *dynamic light scattering* (DLS) y microscopia electrónica.
- d) Se lograron caracterizar morfológicamente distintos agregados (oligoméricos y fibrilares) de tau mediante microscopia de fuerza atómica (AFM), abriendo un campo para otras aplicaciones biofísicas de microscopias de fuerza en el estudio de este sistema.
- e) Se implementó una metodología para el *screening* de moléculas con capacidad antiagregante de tau, abriendo la oportunidad para el estudio de otras familias de moléculas con potencial antiagregante de tau, en el contexto de la búsqueda de nuevos compuestos con actividad farmacológica para el tratamiento de la EA.
- f) De los compuestos derivados de quinolinas evaluados, se determinó que solo THQ-55 tendría un potencial efecto antiagregante de tau a altas concentraciones.
- g) El ácido fúlvico inhibe la agregación de la tau *in vitro* inducida por heparina y desensamblaría los agregados preformados de tau.

6.- BIBLIOGRAFÍA

Alonso AD, Di Clerico J, Li B, Corbo CP, Alaniz ME, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Phosphorylation of tau at Thr212, Thr231, and Ser262 combined causes neurodegeneration. *J Biol Chem*. 2010 Oct 1;285(40):30851-60. 783-93.

Alvarez-Puebla RA, Valenzuela-Calahorra C, Garrido JJ. Theoretical study on fulvic acid structure, conformation and aggregation. A molecular modeling approach. *Sci Total Environ*. 2006 Apr 1;358(1-3):243-54.

Andronesi OC, von Bergen M, Biernat J, Seidel K, Griesinger C, Mandelkow E, Baldus M. Characterization of Alzheimer's-like paired helical filaments from the core domain of tau protein using solid-state NMR spectroscopy. *J Am Chem Soc*. 2008 May 7;130(18):5922-8.

Barghorn S, Davies P, Mandelkow E. Tau paired helical filaments from Alzheimer's disease brain and assembled in vitro are based on beta-structure in the core domain. *Biochemistry*. 2004 Feb 17;43(6):1694-703.

Barghorn S, Biernat J, Mandelkow E. Purification of recombinant tau protein and preparation of Alzheimer-paired helical filaments in vitro. *Methods Mol Biol*. 2005; 299:35-51.

Berger Z, Roder H, Hanna A, Carlson A, Rangachari V, Yue M, Wszolek Z, Ashe K, Knight J, Dickson D, Andorfer C, Rosenberry TL, Lewis J, Hutton M, Janus C. Accumulation of pathological tau species and memory loss in a conditional model of tauopathy. *J Neurosci*. 2007 Apr 4;27(14):3650-62.

Berriman J, Serpell LC, Oberg KA, Fink AL, Goedert M, Crowther RA. Tau filaments from human brain and from in vitro assembly of recombinant protein show cross-beta structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 22;100(15):9034-8.

Bieschke J, Russ J, Friedrich RP, Ehrnhoefer DE, Wobst H, Neugebauer K, Wanker EE. EGCG remodels mature alpha-synuclein and amyloid-beta fibrils and reduces cellular toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Apr 27;107(17):7710-5.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54.

Brunden KR, Trojanowski JQ, Lee VM. Advances in tau-focused drug discovery for Alzheimer's disease and related tauopathies. *Nat Rev Drug Discov*. 2009 Oct;8(10):783-93.

Bulic B, Pickhardt M, Schmidt B, Mandelkow EM, Waldmann H, Mandelkow E. Development of tau aggregation inhibitors for Alzheimer's disease. *Angew Chem Int Ed Engl.* 2009;48(10):1740-52.

Bulic B, Pickhardt M, Mandelkow EM, Mandelkow E. Tau protein and tau aggregation inhibitors. *Neuropharmacology.* 2010 Sep-Oct;59(4-5):276-89.

Carmel G, Mager EM, Binder LI, Kuret J. The structural basis of monoclonal antibody Alz50's selectivity for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem.* 1996 Dec 20;271(51):32789-95.

Chang E, Kim S, Schafer KN, Kuret J. Pseudophosphorylation of tau protein directly modulates its aggregation kinetics. *Biochim Biophys Acta.* 2011 Feb;1814(2):388-95.

Congdon EE, Kim S, Bonchak J, Songrug T, Matzavinos A, Kuret J. Nucleation-dependent tau filament formation: the importance of dimerization and an estimation of elementary rate constants. *Biol Chem.* 2008 May 16;283(20):13806-16.

Corsaro A, Anselmi C, Polano M, Aceto A, Florio T, De Nobili M. The interaction of humic substances with the human prion protein fragment 90-231 affects its protease K resistance and cell internalization. *J Biol Regul Homeost Agents.* 2010 Jan-Mar;24(1):27-39.

Cross D, Vial C, Maccioni RB. A tau-like protein interacts with stress fibers and microtubules in human and rodent cultured cell lines. *J Cell Sci.* 1993 May;105 (Pt 1):51-60.

Crowe A, Ballatore C, Hyde E, Trojanowski JQ, Lee VM. High throughput screening for small molecule inhibitors of heparin-induced tau fibril formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Jun 22;358(1):1-6.

Crowther RA. Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Mar 15;88(6):2288-92.

Dickson DW, Crystal HA, Bevona C, Honer W, Vincent I, Davies P. Correlations of synaptic and pathological markers with cognition of the elderly. *Neurobiol Aging.* 1995 May-Jun;16(3):285-98; discussion 298-304.

Ding H, Johnson GV. The last tangle of tau. *J Alzheimers Dis.* 2008 Aug;14(4):441-7.

Ehrnhoefer DE, Bieschke J, Boeddrich A, Herbst M, Masino L, Lurz R, Engemann S, Pastore A, Wanker EE. EGCG redirects amyloidogenic polypeptides into unstructured, off-pathway oligomers. *Nat Struct Mol Biol.* 2008 Jun;15(6):558-66.

Extance A. Alzheimer's failure raises questions about disease-modifying strategies. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Oct;9(10):749-51.

- Farias G, Cornejo A, Jimenez JM, Guzman L, Maccioni RB. Mechanisms of tau selfaggregation and neurotoxicity. *Current Alzheimer's Research*. 2011 (In press)
- Fariás GA, Vial C, Maccioni RB. Specific macromolecular interactions between tau and the microtubule system. *Mol Cell Biochem*. 1992 May 13;112(1):81-8.
- Farias GA, Muñoz JP, Garrido J, Maccioni RB. Tubulin, actin, and tau protein interactions and the study of their macromolecular assemblies. *J Cell Biochem*. 2002;85(2):315-24.
- Fernandez JA, Rojo L, Kuljis RO, Maccioni RB. The damage signals hypothesis of Alzheimer's disease pathogenesis. *J Alzheimers Dis*. 2008 Jul;14(3):329-33.
- Friedhoff P, Schneider A, Mandelkow EM, Mandelkow E. Rapid assembly of Alzheimer-like paired helical filaments from microtubule-associated protein tau monitored by fluorescence in solution. *Biochemistry*. 1998 Jul 14;37(28):10223-30.
- Gandy S. Testing the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease in vivo. *Lancet Neurol*. 2010 Apr;9(4):333-5.
- Ghosal S, Lal J, Jaiswal AK, Bhattacharya SK. Effects of Shilajit and its active constituents on learning and memory in rats. *Phytother Res*. 1993; 7: 29–34.
- Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA. Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer's disease. *Neuron* 1989; 3:519-526.
- Goedert M, Jakes R. Expression of separate isoforms of human tau protein: correlation with the tau pattern in brain and effects on tubulin polymerization. *EMBO J*. 1990 Dec;9(13):4225-30.
- Goedert M, Jakes R, Spillantini MG, Hasegawa M, Smith MJ, Crowther RA. Assembly of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like filaments induced by sulphated glycosaminoglycans. *Nature*. 1996 Oct 10;383(6600):550-3.
- Goux WJ, Kopplin L, Nguyen AD, Leak K, Rutkofsky M, Shanmuganandam VD, Sharma D, Inouye H, Kirschner DA. The formation of straight and twisted filaments from short tau peptides. *J Biol Chem*. 2004 Jun 25;279(26):26868-75.
- Guillozet AL, Weintraub S, Mash DC, Mesulam MM. Neurofibrillary tangles, amyloid, and memory in aging and mild cognitive impairment. *Arch Neurol*. 2003 May;60(5):729-36.
- Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid beta-peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007 Feb;8(2):101-12.

Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002 Jul 19;297(5580):353-6.

Hattori M, Sugino E, Minoura K, In Y, Sumida M, Taniguchi T, Tomoo K, Ishida T. Different inhibitory response of cyanidin and methylene blue for filament formation of tau microtubule-binding domain. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Sep 12;374(1):158-63.

Hernandez P, Lee G, Sjoberg M, Maccioni RB. Tau phosphorylation by cdk5 and Fyn in response to amyloid peptide A β (25-35): involvement of lipid rafts. *J Alzheimers Dis*. 2009 Jan;16(1):149-56.

Iltner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wölfing H, Chieng BC, Christie MJ, Napier IA, Eckert A, Staufenbiel M, Hardeman E, Götz J. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*. 2010 Aug 6;142(3):387-97.

Jeganathan S, von Bergen M, Brtlich H, Steinhoff HJ, Mandelkow E. Global hairpin folding of tau in solution. *Biochemistry*. 2006 Feb 21;45(7):2283-93.

Jeganathan S, von Bergen M, Mandelkow EM, Mandelkow E. The natively unfolded character of tau and its aggregation to Alzheimer-like paired helical filaments. *Biochemistry*. 2008 Oct 7;47(40):10526-39.

Jicha GA, Bowser R, Kazam IG, Davies P. Alz-50 and MC-1, a new monoclonal antibody raised to paired helical filaments, recognize conformational epitopes on recombinant tau. *J Neurosci Res*. 1997 Apr 15;48(2):128-32.

Kampers T, Friedhoff P, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. RNA stimulates aggregation of microtubule-associated protein tau into Alzheimer-like paired helical filaments. *FEBS Lett*. 1996 Dec 16;399(3):344-9.

Kayed R, Pensalfini A, Margol L, Sokolov Y, Sarsoza F, Head E, Hall J, Glabe C. Annular protofibrils are a structurally and functionally distinct type of amyloid oligomer. *J Biol Chem*. 2009 Feb 13;284(7):4230-7.

Khlistunova I, Biernat J, Wang Y, Pickhardt M, von Bergen M, Gazova Z, Mandelkow E, Mandelkow EM. Inducible expression of Tau repeat domain in cell models of tauopathy: aggregation is toxic to cells but can be reversed by inhibitor drugs. *J Biol Chem*. 2006 Jan 13;281(2):1205-14.

Kim J, Lee HJ, Lee KW. Naturally occurring phytochemicals for the prevention of Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 2010 Mar;112(6):1415-30.

Kuret J, Chirita CN, Congdon EE, Kannanayakal T, Li G, Necula M, Yin H, Zhong Q. Pathways of tau fibrillization. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jan 3;1739(2-3):167-78.

- Ladiwala AR, Lin JC, Bale SS, Marcelino-Cruz AM, Bhattacharya M, Dordick JS, Tessier PM. Resveratrol selectively remodels soluble oligomers and fibrils of amyloid A β into off-pathway conformers. *J Biol Chem*. 2010 Jul 30;285(31):24228-37.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970 Aug 15;227(5259):680-5.
- Leenheer, JA. Progression from Model Structures to Molecular Structures of Natural Organic Matter Components. *Annals of Environmental Science*. 2007, Vol 1:57-68.
- Maccioni RB, Vera JC, Dominguez J, Avila J. A discrete repeated sequence defines a tubulin binding domain on microtubule-associated protein tau. *Arch Biochem Biophys*. 1989 Dec;275(2):568-79.
- Maccioni RB, Cambiazo V. Role of microtubule-associated proteins in the control of microtubule assembly. *Physiol Rev*. 1995 Oct;75(4):835-64.
- Maccioni RB, Muñoz JP, Barbeito L. The molecular bases of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. *Arch Med Res*. 2001 Sep-Oct;32(5):367-81.
- Maccioni RB, Lavados M, Guillón M, Mujica C, Bosch R, Farías G, Fuentes P. Anomalously phosphorylated tau and A β fragments in the CSF correlates with cognitive impairment in MCI subjects. *Neurobiol Aging*. 2006 Feb;27(2):237-44.
- Maccioni RB & Perry G. Current hypotheses and research milestones in Alzheimer's disease. New York, Springer, 2009. 296 p.
- Maccioni RB, Rojo LE, Fernández JA, Kuljis RO. The role of neuroimmunomodulation in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci*. 2009 Feb;1153:240-6.
- Maccioni RB, Farías G, Morales I, Navarrete L. The revitalized tau hypothesis on Alzheimer's disease. *Arch Med Res*. 2010 Apr;41(3):226-31.
- Maeda S, Sahara N, Saito Y, Murayama S, Ikai A, Takashima A. Increased levels of granular tau oligomers: an early sign of brain aging and Alzheimer's disease. *Neurosci Res*. 2006 Mar;54(3):197-201.
- Maeda S, Sahara N, Saito Y, Murayama M, Yoshiike Y, Kim H, Miyasaka T, Murayama S, Ikai A, Takashima A. Granular tau oligomers as intermediates of tau filaments. *Biochemistry*. 2007 Mar 27;46(12):3856-61.
- Mi K, Johnson GV. The role of tau phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res*. 2006 Dec;3(5):449-63.

Morales I, Farías G, Maccioni RB. Neuroimmunomodulation in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neuroimmunomodulation*. 2010;17(3):202-4.
Moreira PI, Santos MS, Oliveira CR, Shenk JC, Nunomura A, Smith MA, Zhu X, Perry G. Alzheimer disease and the role of free radicals in the pathogenesis of the disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets*. 2008 Feb;7(1):3-10.

Mukrasch MD, Biernat J, von Bergen M, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M. Sites of tau important for aggregation populate β -structure and bind to microtubules and polyanions. *J Biol Chem*. 2005 Jul 1;280(26):24978-86.

Mukrasch MD, Markwick P, Biernat J, Bergen M, Bernadó P, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M, Blackledge M. Highly populated turn conformations in natively unfolded tau protein identified from residual dipolar couplings and molecular simulation. *J Am Chem Soc*. 2007 Apr 25;129(16):5235-43.

Mukrasch MD, Bibow S, Korukottu J, Jeganathan S, Biernat J, Griesinger C, Mandelkow E, Zweckstetter M. Structural polymorphism of 441-residue tau at single residue resolution. *PLoS Biol*. 2009 Feb 17;7(2):e34.

Mylonas E, Hascher A, Bernadó P, Blackledge M, Mandelkow E, Svergun DI. Domain conformation of tau protein studied by solution small-angle X-ray scattering. *Biochemistry*. 2008 Sep 30;47(39):10345-53.

Navarrete, Leonardo. Estudios sobre la interacción de quinolinas con formas agregadas de la proteína tau. *Proyecciones Biomédicas en la Enfermedad de Alzheimer*. Tesis (Magíster en Bioquímica). Santiago, Chile. Universidad Nacional Andrés Bello, Facultad de Ciencias de la Salud, 2008. 105 h.

Oddo S, Vasilevko V, Caccamo A, Kitazawa M, Cribbs DH, LaFerla FM. Reduction of soluble A β and tau, but not soluble A β alone, ameliorates cognitive decline in transgenic mice with plaques and tangles. *J Biol Chem*. 2006 Dec 22;281(51):39413-23.

Okamura N, Suemoto T, Furumoto S, Suzuki M, Shimadzu H, Akatsu H, Yamamoto T, Fujiwara H, Nemoto M, Maruyama M, Arai H, Yanai K, Sawada T, Kudo Y. Quinoline and benzimidazole derivatives: candidate probes for in vivo imaging of tau pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2005 Nov 23;25(47):10857-62.

Pasinetti GM, Ksiezak-Reding H, Santa-Maria I, Wang J, Ho L. Development of a grape seed polyphenolic extract with anti-oligomeric activity as a novel treatment in progressive supranuclear palsy and other tauopathies. *J Neurochem*. 2010 Sep;114(6):1557-68.

Peterson DW, Zhou H, Dahlquist FW, Lew J. A soluble oligomer of tau associated with fiber formation analyzed by NMR. *Biochemistry*. 2008 Jul 15;47(28):7393-404.

Peterson DW, George RC, Scaramozzino F, LaPointe NE, Anderson RA, Graves DJ, Lew J. Cinnamon extract inhibits tau aggregation associated with Alzheimer's disease in vitro. *J Alzheimers Dis.* 2009;17(3):585-97.

Pickhardt M, Gazova Z, von Bergen M, Khlistunova I, Wang Y, Hascher A, Mandelkow EM, Biernat J, Mandelkow E. Anthraquinones inhibit tau aggregation and dissolve Alzheimer's paired helical filaments in vitro and in cells. *J Biol Chem.* 2005 Feb 4;280(5):3628-35.

Porat Y, Abramowitz A, Gazit E. Inhibition of amyloid fibril formation by polyphenols: structural similarity and aromatic interactions as a common inhibition mechanism. *Chem Biol Drug Des.* 2006 Jan;67(1):27-37.

Rinne JO, Brooks DJ, Rossor MN, Fox NC, Bullock R, Klunk WE, Mathis CA, Blennow K, Barakos J, Okello AA, Rodriguez Martinez de Liano S, Liu E, Koller M, Gregg KM, Schenk D, Black R, Grundman M. 11C-PiB PET assessment of change in fibrillar amyloid-beta load in patients with Alzheimer's disease treated with bapineuzumab: a phase 2, double-blind, placebo-controlled, ascending-dose study. *Lancet Neurol.* 2010 Apr;9(4):363-72.

Roberts BE, Shorter J. Escaping amyloid fate. *Nat Struct Mol Biol.* 2008 Jun;15(6):544-6.

Sahara N, Maeda S, Murayama M, Suzuki T, Dohmae N, Yen SH, Takashima A. Assembly of two distinct dimers and higher-order oligomers from full-length tau. *Eur J Neurosci.* 2007 May;25(10):3020-9.

Santacruz K, Lewis J, Spires T, Paulson J, Kotilinek L, Ingelsson M, Guimaraes A, DeTure M, Ramsden M, McGowan E, Forster C, Yue M, Orne J, Janus C, Mariash A, Kuskowski M, Hyman B, Hutton M, Ashe KH. Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science.* 2005 Jul 15;309(5733):476-81.

Sawaya MR, Sambashivan S, Nelson R, Ivanova MI, Sievers SA, Apostol MI, Thompson MJ, Balbirnie M, Wiltzius JJ, McFarlane HT, Madsen A, Riekel C, Eisenberg D. Atomic structures of amyloid cross-beta spines reveal varied steric zippers. *Nature.* 2007 May 24;447(7143):453-7.

Sillen A, Leroy A, Wieruszkeski JM, Loyens A, Beauvillain JC, Buée L, Landrieu I, Lippens G. Regions of tau implicated in the paired helical fragment core as defined by NMR. *Chembiochem.* 2005 Oct;6(10):1849-56.

Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 2003 Jan;4(1):49-60.

Sugino E, Nishiura C, Minoura K, In Y, Sumida M, Taniguchi T, Tomoo K, Ishida T. Three-/four-repeat-dependent aggregation profile of tau microtubule-binding domain clarified by dynamic light scattering analysis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Jul 24;385(2):236-40.

Suh GH, Ryu SH, Lee DW, Han C, Ju YS, Kee BS, Lee JN, Bae JN, Choi JH, Kim DJ, Lee NJ, Lee JY, Go HJ, Yi JS, Cho SJ, Jeon YW. Cholinesterase Inhibitors for Alzheimer Disease: Do They Provide More Than Symptomatic Benefits? *Am J Geriatr Psychiatry*. 2010 Jun 25.

Taniguchi S, Suzuki N, Masuda M, Hisanaga S, Iwatsubo T, Goedert M, Hasegawa M., Inhibition of heparin-induced tau filament formation by phenothiazines, polyphenols, and porphyrins. *J Biol Chem*. 2005 Mar 4;280(9):7614-23.

Thomas SJ, Grossberg GT. Memantine: a review of studies into its safety and efficacy in treating Alzheimer's disease and other dementias. *Clin Interv Aging*. 2009;4:367-77.

van Swieten J, Spillantini MG. Hereditary frontotemporal dementia caused by Tau gene mutations. *Brain Pathol* 2007;17:63-73.

von Bergen M, Friedhoff P, Biernat J, Heberle J, Mandelkow EM, Mandelkow E. Assembly of tau protein into Alzheimer paired helical filaments depends on a local sequence motif ((306)VQIVYK(311)) forming beta structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 May 9;97(10):5129-34.

von Bergen M, Barghorn S, Biernat J, Mandelkow EM, Mandelkow E. Tau aggregation is driven by a transition from random coil to beta sheet structure. *Biochim Biophys Acta*. 2005 Jan 3;1739(2-3):158-66.

Vossel KA, Zhang K, Brodbeck J, Daub AC, Sharma P, Finkbeiner S, Cui B, Mucke L. Tau reduction prevents Aβ-induced defects in axonal transport. *Science*. 2010 Oct 8;330(6001):198.

Wang C, Wang Z, Peng A, Hou J, Xin W. Interaction between fulvic acids of different origins and active oxygen radicals. *Sci China C Life Sci*. 1996 Jun;39(3):267-75.

Wegmann S, Jung YJ, Chinnathambi S, Mandelkow EM, Mandelkow E, Muller DJ. Human Tau isoforms assemble into ribbon-like fibrils that display polymorphic structure and stability. *J Biol Chem*. 2010 Aug 27;285(35):27302-13.

Wilson DM, Binder LI. Free fatty acids stimulate the polymerization of tau and amyloid beta peptides. In vitro evidence for a common effector of pathogenesis in Alzheimer's disease. *Am J Pathol*. 1997 Jun;150(6):2181-95.

Wimo A, Prince M. World Alzheimer Report 2010. The Global Economic Impact of Dementia. Alzheimer's Disease International (ADI). 2010

Wischik CM, Edwards PC, Lai RY, Roth M, Harrington CR. Selective inhibition of Alzheimer disease-like tau aggregation by phenothiazines. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996 Oct 1;93(20):11213-8.

Wischik CM, Bentham P, Wischik DJ, Seng KM. "Tau Aggregation Inhibitors (TAI) Therapy with Rember Arrests Disease Progression in Mild and Moderate Alzheimer's Disease over 50 Weeks". Abstract 03 – 04–07. International Conference on Alzheimer's Disease. Chicago, 2008.

Yao TM, Tomoo K, Ishida T, Hasegawa H, Sasaki M, Taniguchi T. Aggregation analysis of the microtubule binding domain in tau protein by spectroscopic methods. *J Biochem*. 2003 Jul;134(1):91-9.

Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, Huang SM, Iwata N, Saido TC, Maeda J, Suhara T, Trojanowski JQ, Lee VM. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron*. 2007 Feb 1;53(3):337-51.

Zhao K, Ippolito G, Wang L, Price V, Kim MH, Cornwell G, Fulenckek S, Breen GA, Goux WJ, D'Mello SR. Neuron-selective toxicity of tau peptide in a cell culture model of neurodegenerative tauopathy: essential role for aggregation in neurotoxicity. *J Neurosci Res*. 2010 Nov 15;88(15):3399-413.

7.- ANEXOS

7.1 Anexo 1: Detalle Síntesis Quinolinas Ensayadas (Dr. Luis Astudillo, U de Talca)

- **2-(4-Aminophenyl)-6-methylquinoline (THQ-55)**

Rendimiento: 90%

Cristales amarillos; mp 178–179 °C.

IR (KBr): 3386, 3301, 3193, 3055, 3023 cm⁻¹.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.03 (d, J = 8.7 Hz, 1 H, 3-HQu), 8.01 (m, 3 H, 2(6) HAr and 8-HQu), 7.76 (d, J = 8.6 Hz, 1 H, 4-HQu), 7.53 (s, 1 H, 5-HQu), 7.52 (dd, J = 8.8, 1.3 Hz, 1 H, 7-HQu), 6.80 (dt, J = 8.6, 2.0 Hz, 2 H, 3(5)-HAr), 3.85 (br s, 2 H, H₂NAr), 2.53 (s, 3 H, 6-CH₃).

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃): δ = 156.4, 147.6, 146.9, 135.8, 135.3, 131.6, 130.1, 129.1, 128.6 (2 C), 126.8, 126.3, 118.3, 115.1 (2 C), 21.5.

GC-MS: t_R = 25.13 min, m/z (%) = 234 (100) [M+].

Anal. Calcd for C₁₆H₁₄N₂: C, 82.02; H, 6.02; N, 11.96. Found: C, 81.88; H, 6.15; N, 12.17.

Grado de Pureza según los espectros adjuntos cercano al 95%.

- **1-(2Benzo[1,3]dioxol-5yl-quinolin-6yl)-ethanone (Q4)**

Rendimiento: 92%.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.44 (d, J = 4.0 Hz, 1 H), 8.28 (t, J = 8.0 Hz, 1 H), 8.27 (dd, J = 8.0 and 4.0 Hz, 1 H), 8.16 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 7.88 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 7.79 (d, J = 2.0 Hz, 1 H), 7.72 (dd, J = 8.0 and 2.0 Hz, 1 H), 6.87 (d, J = 8.0 Hz, 1 H), 6.07 (s, 2H, -OCH₂O-), 2.75 (s, 3H, CH₃CO).

MS (EI, 70 eV): m/z (%) = 291 (70) [M+].

Anal. Calcd for C₁₈H₁₃NO₃: C, 74.22; H, 4.50; N, 4.81; O, 16.48. Found: C, 74.20; H, 4.51; N, 4.80.

Grado de Pureza según los espectros adjuntos cercano al 98%.

- **2-Benzo[1,3]dioxol-5-yl-6-methoxy-quinoline (Q3)**

Rendimiento: 95%.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 8.06 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 8.01 (d, *J* = 9.0 Hz, 1 H), 7.73 (d, *J* = 8.5 Hz, 1 H), 7.68 (d, *J* = 2.0 Hz, 1 H), 7.61 (dd, *J* = 8.0 and 2.0 Hz, 1 H), 7.36 (dd, *J* = 9.0 and 2.0 Hz, 1 H), 7.07 (d, *J* = 3.0 Hz, 1 H), 6.93 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 6.02 (s, 2H, -OCH₂O-), 3.93 (s, 3H, CH₃-O-).

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 279 (70) [M⁺].

Anal. Calcd for C₁₇H₁₃NO₃: C, 73.11; H, 4.69; N, 5.02; O, 17.19. Found: C, 73.10; H, 4.70; N, 5.00.

Grado de Pureza según los espectros adjuntos cercano al 90%.

- **6-methoxy-2-pyridin-3-yl-quinoline (Q5)**

Yields: 89 %.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 9.48 (s, 1 H), 8.83 (d, *J* = 4.0 Hz, 1 H), 8.64 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 8.32 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 8.23 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 8.01 (d, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 7.58 (t, *J* = 8.0 Hz, 1 H), 7.56 (dd, *J* = 8.0 and 2.0 Hz, 1H), 7.27 (s, 1H), 4.12 (s, 3H, CH₃-O-).

MS (EI, 70 eV): *m/z* (%) = 279 (70) [M⁺].

Anal. Calcd for C₁₅H₁₂N₂O: C, 76.25; H, 5.12; N, 11.86; O, 6.77. Found: C, 76.18; H, 5.10; N, 11.80.

Grado de Pureza según los espectros adjuntos cercano al 95%.

7.2 Anexo 2: Secuencias de tau en vectores pET-3a y pET-28a(+)

- pET-3a/htau40

Secuencia Plasmidio htau40 (1338 pb)

ATG GCTGAGCCCCGCCAGGAGTTCGAAGTGATGGAAGATCACGCTGGGACGT
ACGGGTTGGGGGACAGGAAAGATCAGGGGGGCTACACCATGCACCAAGACCA
AGAGGGTGACACGGACGCTGGCCTGAAAGAATCTCCCCTGCAGACCCCACT
GAGGACGGATCTGAGGAACCGGGCTCTGAAACCTCTGATGCTAAGAGCACTCC
AACAGCGGAAGATGTGACAGCACCCCTTAGTGGATGAGGGAGCTCCCGGCAAG
CAGGCTGCCGCGCAGCCCCACACGGAGATCCCAGAAGGAACACAGCTGAAG
AAGCAGGCATTGGAGACACCCCAAGCCTGGAAGACGAAGCTGCTGGTACGT
GACCAAGCTCGCATGGTCAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGATGACA
AAAAAGCCAAGGGGGCTGATGGTAAAACGAAGATCGCCACACCGCGGGGAGC
AGCCCCTCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACCAGGATTCCAGCAAAA
ACCCCGCCCGCTCAAAGACACCACCCAGCTCTGGTGAACCTCCAAAATCAGG
GGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCGGCAGCCGC
TCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAAGGTGG
CAGTGGTCCGTA CTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGCCTGCAG
ACAGCCCCCGTGCCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGATCGGCTC
CACTGAGAACCTGAAGCACCAAGCCGGGAGGCGGGAAGGTGCAGATAATTAATA
AGAAGCTGGATCTTAGCAACGTCCAGTCCAAGTGTGGCTCAAAGGATAATATCA
AACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAAATAGTCTACAAACCAGTTGACCTG
AGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAAACCAGGA
GGTGGCCAGGTGGAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACAGAGTCCA
GTCGAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGAGGAAATA
AAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGCCAAGACA
GACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGCCAGTGGTGTCTGGGGACACGT
CTCCACGGCATCTCAGCAATGTCTCCTCCACCGGCAGCATCGACATGGTAGAC
TCGCCCCAGCTCGCCACGCTAGCTGACGAGGTGTCTGCCTCCCTGGCCAAGC
AGGGTTTGTGATCA

Secuencia proteína htau40 (441 aa)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPTE
DGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGIG
DTPSLEDEAAGHV TQARMVSKSKDGTGSDDK KAKGADGKTKIATPRGAAPPQK
GQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTP
PTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNV KSKIGSTENLKHQPGGG
KVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYK PVDLSKVT SKCGSLGNIHH
KPGGGQVEVKSEKLDKDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT FRENAKAKT
DHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHLSNVSSTGSIDMV DSPQLATLADEV SASLAKQGL.

Análisis Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
NM_005910.4	Homo sapiens microtubule-associated protein tau (MAPT), transcript variant 2, mRNA	2459	2459	99%	0.0	100%
NM_016834.3	Homo sapiens microtubule-associated protein tau (MAPT), transcript variant 3, mRNA	1895	2142	86%	0.0	100%
NM_001123067.2	Homo sapiens microtubule-associated protein tau (MAPT), transcript variant 5, mRNA	1895	2303	93%	0.0	100%
NM_016835.3	Homo sapiens microtubule-associated protein tau (MAPT), transcript variant 1, mRNA	1674	2474	99%	0.0	100%
NM_001123066.2	Homo sapiens microtubule-associated protein tau (MAPT), transcript variant 6, mRNA	1434	2477	99%	0.0	100%
NM_016841.3	Homo sapiens microtubule-associated protein tau (MAPT), transcript variant 4, mRNA	972	1999	85%	0.0	100%

- pET-28a/htau40

Secuencia Plasmidio htau40 (1395 pb)

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCG
 GCAGCCATATGGCTGAGCCCCGCCAGGAGTTCGAAGTGATGGAAGATCACGCT
 GGGACGTACGGGTTGGGGGACAGGAAAGATCAGGGGGGCTACACCATGCACC
 AAGACCAAGAGGGTGACACGGACGCTGGCCTGAAAGAATCTCCCCTGCAGACC
 CCCACTGAGGACGGATCTGAGGAACCGGGCTCTGAAACCTCTGATGCTAAGAG
 CACTCCAACAGCGGAAGATGTGACAGCACCCCTTAGTGGATGAGGGAGCTCCCG
 GCAAGCAGGCTGCCGCGCAGCCCCACACGGAGATCCCAGAAGGAACACAGC
 TGAAGAAGCAGGCATTGGAGACACCCCCAGCCTGGAAGACGAAGCTGCTGGT
 CACGTGACCCAAGCTCGCATGGTCAGTAAAAGCAAAGACGGGACTGGAAGCGA
 TGACAAAAAAGCCAAGGGGGCTGATGGTAAAACGAAGATCGCCACACCGCGG
 GGAGCAGCCCCTCCAGGCCAGAAGGGCCAGGCCAACGCCACCAGGATTCCAG
 CAAAACCCCGCCCGCTCCAAAGACACCACCCAGCTCTGGTGAACCTCCAAAA
 TCAGGGGATCGCAGCGGCTACAGCAGCCCCGGCTCCCCAGGCACTCCCGGCA
 GCCGCTCCCGCACCCCGTCCCTTCCAACCCACCCACCCGGGAGCCCAAGAA
 GGTGGCAGTGGTCCGTACTCCACCCAAGTCGCCGTCTTCCGCCAAGAGCCGC
 CTGCAGACAGCCCCCGTGCCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAGTCCAAGAT
 CGGCTCCACTGAGAACCTGAAGCACAGCCGGGAGGCGGGAAGGTGCAGATA
 ATTAATAAGAAGCTGGATCTTAGCAACGTCCAGTCCAAGTGTGGCTCAAAGGAT
 AATATCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAAATAGTCTACAAACCAGT
 TGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACATCCATCATAA

ACCAGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAATCTGAGAAGCTTGACTTCAAGGACA
 GAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCACCCACGTCCCTGGCGGA
 GGAAATAAAAAGATTGAAACCCACAAGCTGACCTTCCGCGAGAACGCCAAAGC
 CAAGACAGACCACGGGGCGGAGATCGTGTACAAGTCGCCAGTGGTGTCTGGG
 GACACGTCTCCACGGCATCTCAGCAATGTCTCCTCCACCGGCAGCATCGACAT
 GGTAGACTCGCCCAGCTCGCCACGCTAGCTGACGAGGTGTCTGCCTCCCTG
 GCCAAGCAGGGTTTGTGATCA

Secuencia proteína httau40 HisTag (461 aa)

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMAEPRQEFVEMEDHAGTY
 GLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPLQTPTEDGS
 EEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHT
 EIPEGTTAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGT
 GSDDKKAAGADGKTKIATPRGAAPPGQKQANATRIPAK
 TPPAPKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTP
 SLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVMPDL
 KNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVIINKKLDLSNVQSKCGS
 KDNIKHVPGGGSVQIVYKVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPG
 GGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIET
 HKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVS GDTSPRHL SNVSS
 TGSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL.

Análisis Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
NM_005910.4	Homo sapiens microtubule-associated protein tau (MAPT), transcript variant 2, mRNA	2459	2459	95%	0.0	100%
NM_016834.3	Homo sapiens microtubule-associated protein tau (MAPT), transcript variant 3, mRNA	1895	2142	83%	0.0	100%
NM_001123067.2	Homo sapiens microtubule-associated protein tau (MAPT), transcript variant 5, mRNA	1895	2303	89%	0.0	100%
NM_016835.3	Homo sapiens microtubule-associated protein tau (MAPT), transcript variant 1, mRNA	1674	2474	95%	0.0	100%
NM_001123066.2	Homo sapiens microtubule-associated protein tau (MAPT), transcript variant 6, mRNA	1434	2477	95%	0.0	100%
NM_016841.3	Homo sapiens microtubule-associated protein tau (MAPT), transcript variant 4, mRNA	972	1999	81%	0.0	100%

- pET-28a(+)/4RMBD

Secuencia Plasmidio 4RMBD HisTag (453 pb)

ATGGGCAGCAGCCATCATCATCATCACAGCAGCGGCCTGGTGCCGCGCG
GCAGCCATATGCAGACAGCCCCGTGCCATGCCAGACCTGAAGAATGTCAAG
TCCAAGATCGGCTCCACTGAGAACCTGAAGCACCAGCCGGGAGGCGGGAAGG
TGCAGATAATTAATAAGAAGCTGGATCTTAGCAACGTCCAGTCCAAGTGTGGCT
CAAAGGATAATATCAAACACGTCCCGGGAGGCGGCAGTGTGCAAATAGTCTAC
AAACCAGTTGACCTGAGCAAGGTGACCTCCAAGTGTGGCTCATTAGGCAACAT
CCATCATAAACCAGGAGGTGGCCAGGTGGAAGTAAAATCTGAGAAGCTTGACT
TCAAGGACAGAGTCCAGTCGAAGATTGGGTCCCTGGACAATATCACCCACGTC
CCTGGCGGAGGAAATAAAAAGATTGAATAA

Secuencia proteína 4RMBD HisTag (150 aa)

MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMQTAPVMPDLKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQ
IINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDSLKVTSKCGSLGNIHHKPG
GGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIE.

Análisis Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
NM_001123066.2	Homo sapiens microtubule-associated protein tau (MAPT), transcript variant 6, mRNA	719	719	85%	0.0	100%
NM_005910.4	Homo sapiens microtubule-associated protein tau (MAPT), transcript variant 2, mRNA	719	719	85%	0.0	100%
NM_016834.3	Homo sapiens microtubule-associated protein tau (MAPT), transcript variant 3, mRNA	719	719	85%	0.0	100%
NM_016835.3	Homo sapiens microtubule-associated protein tau (MAPT), transcript variant 1, mRNA	719	719	85%	0.0	100%
NM_001123067.2	Homo sapiens microtubule-associated protein tau (MAPT), transcript variant 5, mRNA	719	719	85%	0.0	100%
NM_016841.3	Homo sapiens microtubule-associated protein tau (MAPT), transcript variant 4, mRNA	383	576	81%	5e-104	98%