

Javier Macías León

Caracterización estructural de un
nuevo anticuerpo anti-Tn tipo
lectina y desarrollo de Nanobodies
frente a glucanosiltransferasas de
la pared celular de hongos para el
tratamiento de infecciones
fúngicas invasivas

Director/es

Hurtado Guerrero, Ramón

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

El presente documento es un extracto de la tesis original depositada en el Archivo Universitario.

En cumplimiento del artículo 14.6 del Real Decreto 99/2011, de 28 de enero, por el que se regulan las enseñanzas oficiales de doctorado, los autores que puedan verse afectados por alguna de las excepciones contempladas en la normativa citada deberán solicitar explícitamente la no publicación del contenido íntegro de su tesis doctoral en el repositorio de la Universidad de Zaragoza. Las situaciones excepcionales contempladas son:

- Que la tesis se haya desarrollado en los términos de un convenio de confidencialidad con una o más empresas o instituciones.
- Que la tesis recoja resultados susceptibles de ser patentados.
- Alguna otra circunstancia legal que impida su difusión completa en abierto.



Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE UN
NUEVO ANTICUERPO ANTI-TN TIPO LECTINA Y
DESARROLLO DE NANOBODIES FRENTE A
GLUCANOSILTRANSFERASAS DE LA PARED
CELULAR DE HONGOS PARA EL TRATAMIENTO
DE INFECCIONES FÚNGICAS INVASIVAS

Autor

Javier Macías León

Director/es

Hurtado Guerrero, Ramón

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Bioquímica y Biología Molecular

2022

Caracterización estructural de un nuevo anticuerpo anti-Tn tipo lectina y desarrollo de nanobodies frente a glucanosiltransferasas de la pared celular de hongos para el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas.

Memoria presentada por **Javier Macías León**, graduado en Biotecnología, para optar al grado de Doctor en Ciencias.

Zaragoza, septiembre de 2022



Fondo Social Europeo
"Construyendo Europa desde Aragón"



**GOBIERNO
DE ARAGON**

Departamento de Innovación,
Investigación y Universidad

D. RAMÓN HURTADO GUERRERO, investigador ARAID del Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos (BIFI) de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICA:

Que la tesis doctoral Caracterización estructural de un nuevo anticuerpo anti-Tn tipo lectina y desarrollo de nanobodies frente a glucanosiltransferasas de la pared celular de hongos para el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas ha sido realizada, bajo su dirección por el graduado JAVIER MACÍAS LEÓN, en el Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos y que reúne, a su juicio, las condiciones requeridas para optar al grado de Doctor en Ciencias por la Universidad de Zaragoza.

Zaragoza, septiembre de 2022.

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la financiación del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España (BFU2016-75633-P y PID2019-105451GB-I00), de la Agencia Aragonesa para la Investigación y Desarrollo (ARAIID), de los fondos FEDER (2014-2020) y de la Diputación General de Aragón (DGA, proyectos E34_R17, LMP58_18). Se ha colaborado también con los sincrotrones DLS en Oxford (líneas I02, I03, I04 y I24) y ALBA, en Barcelona (línea BL13-XALOC). Durante los cuatro años de realización de esta tesis (desde agosto de 2018 hasta diciembre de 2022, ambos incluidos), el doctorando ha sido beneficiaria de una subvención de la Diputación General de Aragón destinada a la contratación de personal investigador predoctoral en formación (BOA del 15/06/2018) y cofinanciada por el Fondo Social Europeo.

Nunca se me han dado bien las dedicatorias y parece que con estos agradecimientos la cosa no va a ser distinta. Han sido más de cuatro años de experiencias, de conocer a nuevas personas, de agobios y fracasos y de algún éxito de vez en cuando... Es difícil expresar en palabras todo lo que significan estos años, pero bueno, vamos a intentarlo.

En primer lugar, quiero darle las gracias a mis compañeros de grupo por el apoyo constante que he recibido. Hacer un doctorado no es fácil, pero gracias a vuestra ayuda y vuestra amistad ha sido una experiencia que ha valido la pena. Así que Andrés, Víctor, David, Jesús, Mati y todos los demás que habéis pasado por nuestro grupo durante estos años, muchas gracias por estar ahí. Y especialmente quiero agradecer a Ana y a Jorge por haber sido unos excelentes profesores y haberme enseñado tantísimo durante estos años. Si hoy estoy escribiendo esta tesis es en gran parte gracias a vosotros.

Esta gratitud se extiende a todos con los que he trabajado durante estos años. IPs, técnicos y especialmente estudiantes como yo que habéis hecho que este viaje sea mucho más agradable.

También quiero darle las gracias a Ramón por haberme dado esta oportunidad, por haberme guiado durante estos años y por haberme transmitido tantos conocimientos y aunque sea un pequeño fragmento de la pasión que siente por la ciencia.

Quiero darle las gracias a mi familia por haberme apoyado siempre, por haberme animado a seguir mi propio camino (aunque este me llevase a la otra punta del país) y por estar siempre a mí lado, incluso estando a casi mil kilómetros de distancia.

Por último, quiero darle las gracias a Ángela, por haber confiado en mí y haberme apoyado todos estos años. Incluso en los momentos más duros sabía que estabas ahí si te necesitaba. Muchas gracias, cielo.

Tabla de contenido:

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	6
CAPÍTULO 1. VISIÓN GENERAL.....	18
CAPÍTULO 2. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE SCFV-5E5, UN NUEVO ANTICUERPO ANTITUMORAL SIMILAR A LAS LECTINAS.....	21
2.1. INTRODUCCIÓN.....	22
2.1.1. MUCINAS.....	22
2.1.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MUCINAS.....	22
2.1.1.2. MUC1.....	25
2.1.1.3. PAPEL DE MUC1 EN EL CÁNCER.....	30
2.1.2. ANTICUERPOS.....	33
2.1.2.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS SCFVS.....	36
2.1.3. MUC1 COMO DIANA DE ANTICUERPOS EN CÁNCER.....	40
2.2. OBJETIVOS:.....	43
2.3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	45
2.3.1. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA (SPPS).....	45
2.3.2. GENERACIÓN DEL ADN Y TRANSFORMACIÓN EN WK6.....	49
2.3.3. EXPRESIÓN DE SCFV-5E5.....	51
2.3.4. PURIFICACIÓN DE SCFV-5E5.....	52
2.3.4.1. ROTURA DE LA MEMBRANA CELULAR.....	52
2.3.4.2. PURIFICACIÓN DE SCFV-5E5 MEDIANTE COLUMNA DE HISTAG (IMAC).....	52
2.3.4.3. VISUALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA EN GEL SDS-PAGE.....	54
2.3.4.4. ELIMINACIÓN DE IMPUREZAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.....	56
2.3.4.5. INTERCAMBIO DE BUFFER MEDIANTE DESALTING.....	59
2.3.4.6. CONCENTRACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA.....	60
2.3.5. TÉCNICAS BIOFÍSICAS PARA ESTUDIOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA LIGANDO.....	61
2.3.5.1. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS TERMODINÁMICOS DE LA UNIÓN ENTRE SCFV-5E5 Y SUS LIGANDOS MEDIANTE CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA (ITC).....	61

2.3.5.2. CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN ENTRE ANTICUERPO Y ANTÍGENO MEDIANTE TERMOFORESIS DE MICROESCALA.	63
2.3.6. APLICACIÓN DE CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X PARA LA OBTENCIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL COMPLEJO SCFV-5E5/GLICOPÉPTIDO 1.	66
2.3.6.1. FORMACIÓN DE CRISTALES DEL COMPLEJO.....	66
2.3.6.2. DIFRACCIÓN DE RAYOS X.	71
2.3.7. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE DIFERENCIA DE TRANSFERENCIA DE SATURACIÓN (STD-NMR).....	75
2.3.8. EXPERIMENTOS DE SCANNING DE ALANINA Y DE UNIÓN A DIFERENTES NÚCLEOS DE O-GLICOSILACIÓN.	78
2.3.9. SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR (MD).....	79
2.3.9.1. SIMULACIONES MD CON RESTRICCIONES DE TIEMPO PROMEDIO EN MUC1-TN16.....	80
2.4. RESULTADOS.....	82
2.4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS TERMODINÁMICOS DE LA INTERACCIÓN DE SCFV-5E5 Y LOS LIGANDOS POR ITC.	82
2.4.2. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPLEJO SCFV-5E5 CON EL GLICOPÉPTIDO 1.	87
2.4.3. EXPERIMENTOS DE STD-NMR DE SCFV-5E5 JUNTO CON LOS GLICOPÉPTIDOS 1 Y 1'.	90
2.4.4. PARÁMETROS TERMODINÁMICOS DE LA UNIÓN DE LOS MUTANTES DE SCFV-5E5 CON EL GLICOPÉPTIDO 1.	91
2.4.5. RECONOCIMIENTO DEL ANTÍGENO MODIFICADO CON SUSTITUCIONES DE ALANINAS Y DIFERENTES NÚCLEOS DE O-GLICOSILACIÓN.	93
2.4.6. EXPERIMENTOS DE AFINIDAD DE SCFV-5E5 Y 5E5 FRENTE A SUS ANTÍGENOS MEDIANTE TERMOFORESIS.	95
2.4.7. SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR.....	96
2.5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	103
2.6. REFERENCIAS.....	107
CAPÍTULO 3. ESTUDIO DE LA ACCIÓN PROTECTORA FRENTE A INFECCIONES FÚNGICAS INVASIVAS DE UN NANOBODY DIRIGIDO AL SITIO ACTIVO DE β-1,3-GLUCANOSILTRANSFERASAS.	116
3.1 INTRODUCCIÓN.	117

3.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS INFECCIONES FÚNGICAS.	117
3.1.1.1. CRYPTOCOCCUS.	119
3.1.1.2. ASPERGILLUS.	121
3.1.2. RESPUESTA INMUNE FRENTE A INFECCIONES FÚNGICAS.	124
3.1.3. TRATAMIENTOS CONTRA LAS INFECCIONES FÚNGICAS INVASIVAS.	128
3.1.4. CARACTERÍSTICAS DE LA PARED CELULAR EN HONGOS.	133
3.1.4.1. REMODELACIÓN DE LA PARED CELULAR.	138
3.1.5. CARACTERÍSTICAS DE LOS NANOBODIES.	140
3.1.6. ANTICUERPOS PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES FÚNGICAS.	144
3.6. REFERENCIAS.	145
CAPÍTULO 4. ANEXOS.	152
4.1. LISTADO DE ABREVIATURAS.	153
4.2. RECETAS.	159
4.3. PROTEÍNAS RECOMBINANTES UTILIZADAS EN ESTA TESIS.	164

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Figura 1. Representación de la función protectora de las mucinas.	24
Figura 2. Representación de la estructura de MUC1.....	26
Figura 3. Formación de O-glicanos en mucinas.....	28
Figura 4. Diferencias en la distribución y glicosilación de MUC1 entre células sanas y células tumorales.	32
Figura 5. Representación de la estructura de una IgG.	35
Figura 6. Representación de una IgG mostrando la distribución de sus dominios junto con la representación de un scFv.	36
Figura 7. Representación de varios multímeros de scFv.	38
Figura 8. Representación de los péptidos péptido 1-naked, glicopéptido 1, glicopéptido 1' y glicopéptido 2.	46
Figura 9. Representación de los péptidos glicopéptido 3, glicopéptido 4, glicopéptido 5 y MUC1-Tn16.	47
Figura 10. Secuencia aminoacídica de la construcción de scFv-5E5 utilizada en este trabajo.	49
Figura 11. Esquema del funcionamiento de una cromatografía de afinidad.	53

Figura 12. Cromatograma de la purificación con columna de Níquel de scFv-5E5.	54
Figura 13. Gel de acrilamida SDS-Page de la purificación con columna HisTag de scFv-5E5.	55
Figura 14. Esquema del funcionamiento de una cromatografía de intercambio.....	57
Figura 15. Cromatograma de la purificación con columna aniónica de scFv-5E5..	58
Figura 16. Gel de acrilamida SDS-Page de la purificación con columna aniónica de scFv-5E5.	58
Figura 17. Representación del funcionamiento de una columna de desalting.	59
Figura 18. Cromatograma del intercambio de buffer de scFv-5E5.	60
Figura 19. Esquema del funcionamiento del ITC.....	62
Figura 20. Configuración y experimentos de MST.	64
Figura 21. Representación de una red cristalina y una celdilla unidad.	66
Figura 22. Representación de un diagrama de fases de cristalización de proteínas.	68
Figura 23. Representación del funcionamiento de la cristalización por difusión de vapor, tanto en gota colgante (arriba) como gota sentada (abajo).	69
Figura 24. Diagrama del flujo de trabajo para la determinación de la estructura de una proteína mediante cristalografía de rayos X.	72

Figura 25. Transformada de Fourier.....	72
Figura 26. Esquema del experimento STD-NMR.....	76
Figura 27. Perfiles de los ITCs de scFv-5E5 frente a GalNAc-α-1-O-Me y al péptido 1 naked.....	83
Figura 28. Perfiles de ITC de los experimentos de scFv-5E5 con los diferentes glicopéptidos.....	84
Figura 29. Gráfica resumen de los valores de K_D obtenidos para los glicopéptidos 1, 1', 2, 3 y 4.....	86
Figura 30. a) Representación superficial del complejo scFv-5E5 con el glicopéptido 1. b) Mapa de densidad electrónica del glicopéptido 1.....	88
Figura 31. Representación detallada de la estructura de rayos X del complejo scFv-5E5/glicopéptido 1 mostrando los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas.....	89
Figura 32. a) Espectro de STD-NMR del glicopéptido en presencia de scFv-5E5 30 μM. b) Espectros de STD-NMR del glicopéptido 1' en presencia de scFv-5E5.	90
Figura 33. Perfiles de ITC de los experimentos de scFv-5E5 y sus mutantes con el glicopéptido 1.	91
Figura 34. a) Datos de los microarrays de las sustituciones por alanina a lo largo de glicopéptido MUC1-Tn de 20 residuos. b) Datos de lo microarrays de las mutaciones T*-X-P en la región GST*AP.	94

Figura 35. Datos de los microarrays para los isómeros de glicoformas adicionales C2, C3 y C4.	94
Figura 36. Curvas de unión de MST de scFv-5E5 y el anticuerpo 5E5 completo frente al glicopéptido MUC1-Tn16.	95
Figura 37. Imagen representativa del complejo de scFv-5E5 con el glicopéptido 1' obtenidos a partir de las simulaciones de 0.5 μs en disolvente explícito.....	97
Figura 38. Superposición de 10 frames del glicopéptido 3 en complejo con scFv-5E5, muestreados a partir de simulaciones de 0.5 μs realizadas en agua explícita.....	98
Figura 39. Superposición de 10 frames de los glicopéptidos 1, 1', 2 y 4 en complejo con scFv-5E5, muestreados a partir de simulaciones de 0.5 μs realizadas en agua explícita.....	99
Figura 40. Representación de las distancias entre el centro de masa del sistema de electrones π de Y100^L y el centro del anillo de la prolina del C-terminal de los glicopéptidos 1, 1', 2, 3 y 4 (panel izquierdo), junto con los ángulos entre los planos definido por el sistema de electrones π de Y100 y el anillo de esta prolina (panel derecho) derivado de simulaciones MD de 0.5 μs.....	100
Figura 41. (a) Superposición de los conjuntos estructurales derivados de simulaciones guiadas por experimentos de 200 ns para MUC1-Tn16 en agua y su forma natural. Se muestra el valor RMSD (\pmSD) de los átomos. (b) Superposición del fragmento APGST*AP de los confórmeros de MUC1-Tn16 encontrados en solución con la conformación del glicopéptido 1 obtenido a partir de la estructura de rayos X de scFv-5E5/1.	101

Figura 42. a) Superposición de 10 estructuras del glicopéptido APGSS(Tn)AP en complejo con scFv-5E5, muestreados a partir de simulaciones de 0.5 μs realizadas en agua explícita. b) Comparativa de las distancias entre el centro de masa del sistema de electrones π de Y100^L y el centro del anillo de la prolina C-terminal de los glicopéptidos APGST(Tn)AP (arriba) y APGSS(Tn)P (abajo), y de los ángulos entre los planos definidos por el sistema de electrones π de Y100^L y el anillo de la prolina.....	102
Figura 43. Cápsula y pared celular de <i>Cryptococcus neoformans</i>.....	119
Figura 44. Imágenes de pacientes con infección por <i>C. gattii</i>.....	121
Figura 45. Micrografía electrónica de barrido de cultivo de <i>Aspergillus fumigatus</i>, que muestra hifas en el borde de la colonia.....	122
Figura 46. Tomografía computarizada de los pulmones de un paciente (izquierda) que muestra una gran bola fúngica (aspergiloma), que se extrajo quirúrgicamente (derecha).....	123
Figura 47. Función de los TLRs como activador en la respuesta inmune frente a hongos.	125
Figura 48. Mecanismos de defensa frente a la infección por hongos.....	127
Figura 49. Representación de los procesos afectados por las diferentes drogas antifúngicas utilizadas actualmente.	129
Figura 50. Representación de las estructuras de a) caspofungina, b) micafungina y c) anidulafungina.	130

Figura 51. Representación del voriconazol.	132
Figura 52. Micrografía electrónica de la pared celular de <i>C. albicans</i> junto con un esquema de sus principales componentes.....	134
Figura 53. Representación de la organización estructural y composición de a) <i>C. albicans</i>, b) <i>C. neoformans</i> y c) <i>A. fumigatus</i>.....	137
Figura 54. Representación de un anticuerpo IgG estándar, un HcAb y un Nb.....	141

Tabla 1. Recopilación de datos y estadísticas de refinamiento del complejo scFv-5E5/1.	74
Tabla 2. Interacciones de NOE en el glicopéptido MUC1-Tn16 y utilizadas como restricciones experimentales en simulaciones de dinámica molecular con restricciones promediadas en el tiempo (MD-tar).	81
Tabla 3. Parámetros de unión termodinámicos de los ITC de scFv-5E5 con los distintos ligandos.	85
Tabla 4. Parámetros de unión termodinámicos de los ITC de scFv-5E5 y sus mutantes con el glicopéptido 1.	92
Tabla 5. Número de casos estimados y mortalidad estimada de las diez infecciones fúngicas invasivas con mayor mortalidad.	118
Tabla 6. Eficacias de andifulafungina (AND), caspofungina (CSP) y micafungina (MCF) frente a los distintos hongos.	131

CAPÍTULO 1. VISIÓN GENERAL.

En 1986 la FDA aprobó el uso de la primera terapia basada en anticuerpos, consistente en el uso del anticuerpo murino muromonab-CD3 dirigido contra las células T que expresan CD3 con el objetivo de servir como inmunosupresor para el tratamiento de rechazo agudo de trasplante (Lu et al., 2020). Desde entonces el uso de anticuerpos en medicina ha crecido exponencialmente, convirtiéndose en la categoría de medicamento más vendida en el mercado farmacéutico (Lu et al., 2020) y habiendo sido aprobados por la FDA setenta y nueve fármacos basados en anticuerpos monoclonales hasta Diciembre de 2019. De estos anticuerpos treinta se desarrollaron para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, aunque también se han desarrollado anticuerpos para tratar otras enfermedades como enfermedades autoinmunes, metabólicas o infecciosas.

Desde que los anticuerpos empezaron a ser utilizados en el tratamiento de enfermedades se han desarrollado diferentes técnicas para mejorar su eficacia, como anticuerpos humanizados para reducir la respuesta inmune o el uso de fragmentos de anticuerpos en lugar del anticuerpo completo. El primer ejemplo de ambas aproximaciones lo encontramos en el anticuerpo quimérico Abciximab, aprobado por la FDA en 1994 y consistente en el fragmento de unión a antígeno (Fab) de un anticuerpo frente al receptor de glucoproteína IIb/IIIa para inhibir la agregación de plaquetas en enfermedades cardiovasculares (Lu et al., 2020).

De estas estrategias en este trabajo nos hemos centrado en el uso de fragmentos de anticuerpos, ya que poseen características biofísicas y clínicas que les otorgan ciertas ventajas frente a los anticuerpos convencionales. En esta tesis hemos seguido dos estrategias distintas enfocadas en dos enfermedades importantes: en primer lugar, hemos caracterizado un anticuerpo scFv (*single chain fragment variable*) frente al antígeno Tn presente en la proteína MUC1 en diversos tejidos. En segundo lugar, hemos desarrollado

nanobodies frente a la enzima Gel4, responsable de la remodelación de la pared celular en *A. fumigatus* con el objetivo de inhibir esta enzima y, en consecuencia, el crecimiento del hongo. En este caso no solo hemos estudiado el funcionamiento de esta interacción, sino que también se han realizado experimentos in vitro e in vivo para estudiar su eficacia a la hora de tratar infecciones producidas por este y otros hongos.

Como hemos mencionado, aunque existen una gran cantidad de tratamientos basados en anticuerpos dirigidos frente a un gran número de enfermedades, es un campo en continuo crecimiento. Nuestro objetivo en esta tesis es explorar el uso de fragmentos de anticuerpos para el tratamiento de dos enfermedades importantes, el cáncer y las infecciones fúngicas invasivas.

CAPÍTULO 2.
CARACTERIZACIÓN
ESTRUCTURAL DE SCFV-5E5,
UN NUEVO ANTICUERPO
ANTITUMORAL SIMILAR A
LAS LECTINAS.

2.1. INTRODUCCIÓN.

2.1.1. MUCINAS.

2.1.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS MUCINAS.

Las mucinas son una familia de proteínas de gran peso molecular altamente glicosiladas (los azúcares pueden llegar a suponer el 50-90% del peso total de la proteína) producidas por las células del tejido epitelial en la mayoría de los animales. La mayor parte de estas glicosilaciones son del tipo O-glicosilación y ocurren principalmente en regiones con repeticiones en tándem con alto contenido en serina, treonina y prolina, aunque también puede tener algunas N-glicosilaciones fuera de estas regiones. Estas O-glicosilaciones pueden formar clústeres, generando regiones de la molécula altamente hidratadas, resistentes a proteasas y que presentan múltiples sitios de unión para anticuerpos y lectinas (Byrd & Bresalier, 2004).

Las mucinas participan en funciones de regulación de la actividad celular, señalización célula a célula, formación de geles extracelulares y lubricación y protección de superficies epiteliales como el intestino. También están implicadas en otros procesos biológicos, como la formación de tejido óseo (Brum et al., 2018).

A día de hoy se han encontrado más de veinte mucinas distintas en humanos, que se clasifican en dos grupos (Figura 1). En primer lugar, tenemos las mucinas secretadas entre las que encontramos mucinas más pequeñas que son solubles (MUC7 y MUC8) y

proteínas de mayor tamaño que participan en la formación de geles (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC9 y MUC19). Las mucinas secretadas carecen de dominios transmembrana, pero tienen un dominio C-terminal rico en cisteínas que juega un papel clave en los procesos de oligomerización que les permiten adoptar una consistencia gelificada (Ferez-Vilar & Hill, 1999).

Por otro lado, tenemos las mucinas unidas a la membrana celular (MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20, MUC21 y MUC22), proteínas transmembrana de tipo I ancladas a la membrana que poseen un dominio de transmembrana, una región extracelular en el N-terminal y una cola citoplasmática en el C-terminal que les permite interaccionar tanto con el interior como con el exterior celular (Supruniuk & Radziejewska, 2021)(Brockhausen & Melamed, 2021). De todas las mucinas la más estudiada es la MUC1, que será en la que nos centraremos en esta parte de la tesis doctoral.

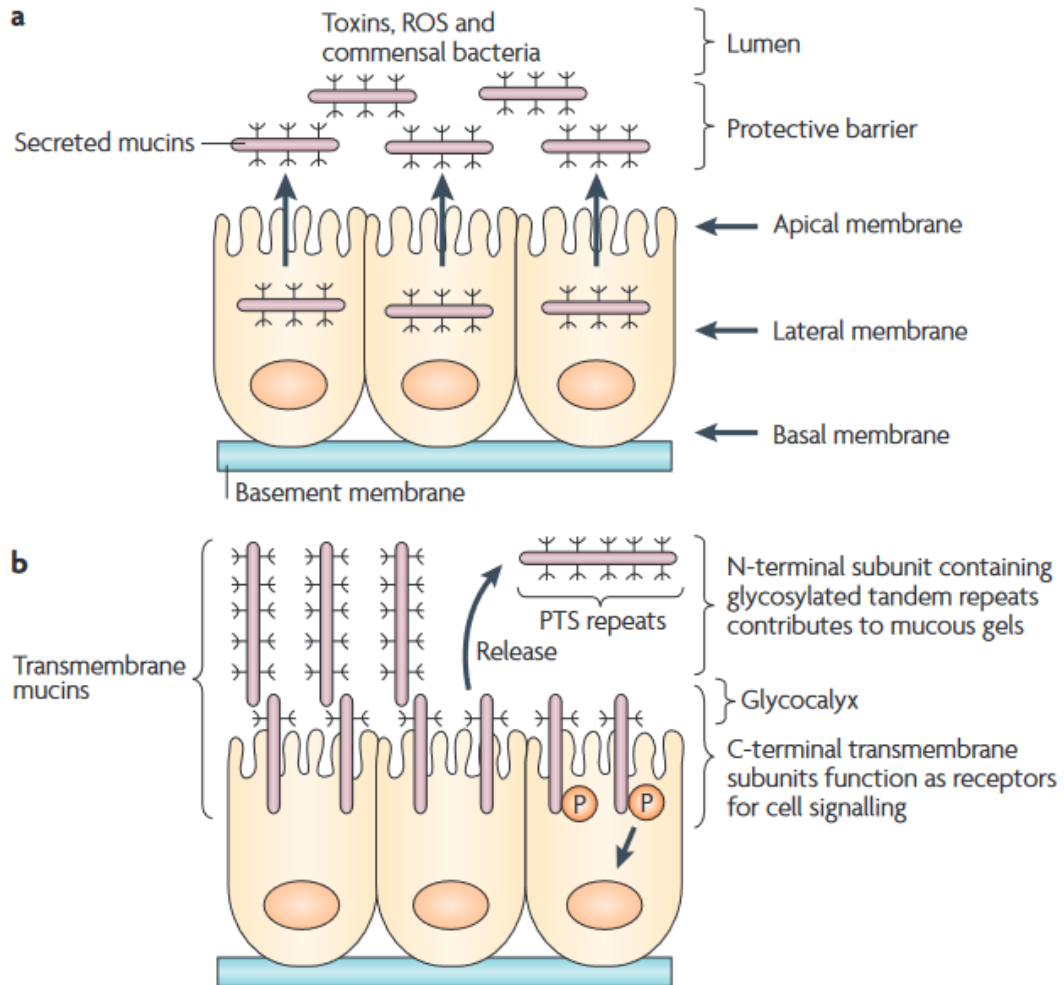


Figura 1. Representación de la función protectora de las mucinas. a) Las mucinas secretadas se liberan desde la membrana apical de la célula al espacio extracelular formando un gel protector. b) Las mucinas transmembrana se expresan en la membrana apical de la célula de forma que sus glicanos constituyen una estructura protectora. La región N-terminal puede liberarse al espacio extracelular dejando que la parte de la mucina anclada a la membrana actúe como receptor. (Kufe, 2009)

2.1.1.2. MUC1.

Como hemos mencionado anteriormente, MUC1 (también conocida como episialina, PEM, H23Ag, EMA, CA15-4 y MCA) es una proteína transmembrana de tipo I con un dominio extracelular altamente glicosilado. En condiciones normales MUC1 se expresa en las células epiteliales glandulares o lumbinales de la glándula mamaria, esófago, estómago, duodeno, páncreas, útero, próstata, pulmones y, en menor medida, en células hematopoyéticas. En tejidos sanos, MUC1 cumple una función protectora gracias a la carga negativa de los azúcares ramificados que crean una barrera física que limita el acceso a posibles amenazas. Además, estas ramificaciones permiten que MUC1 forme un gel que lubrica el epitelio y lo protege de cambios en el pH, contaminantes o patógenos (Sritama Nath and Pinku Mukherjee, 2017).

En un principio MUC1 se expresa como una única cadena polipeptídica que, debido a estrés conformacional, es cortada autoproteolíticamente en el motivo GSVVV localizado en el dominio SEA. De este corte obtenemos dos fragmentos péptidos: la subunidad N-terminal (MUC1-N; subunidad α) de mayor tamaño y una subunidad C-terminal (MUC1-C; subunidad β) de menor tamaño. Ambas subunidades están unidas mediante interacciones no covalentes, como puentes de hidrógeno estables (Figura 2) (Supruniuk & Radziejewska, 2021).

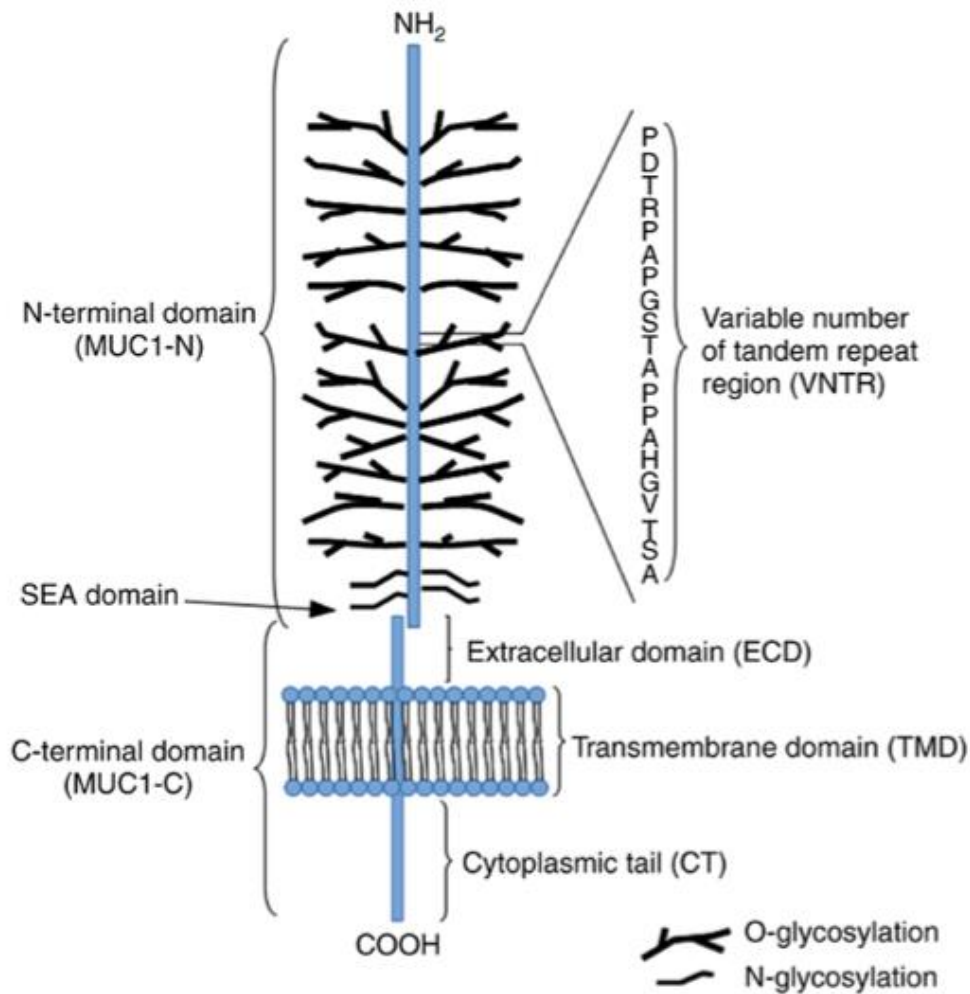


Figura 2. Representación de la estructura de MUC1. (Supruniuk & Radziejewska, 2021)

MUC1-N contiene una secuencia N-terminal de 104 aminoácidos seguida del dominio PTS, también llamado región VNTR (*variable number tandem repeat*), que consiste en un número variable (entre 20 y 200) de repeticiones en tándem de un segmento de 20 aminoácidos ricos en prolinas, treoninas y serinas (PDTRPAPGSTAPPAAHGVTSA) (Supruniuk & Radziejewska, 2021). La secuencia de los VNTR puede presentar variaciones en diferentes líneas de células cancerígenas (Sritama Nath and Pinku Mukherjee, 2017) y está flanqueada por ambos extremos por una corta secuencia degenerada ligeramente similar a la región VNTR, seguida de una secuencia C-terminal de 170 aminoácidos.

MUC1-C por otro lado está compuesta por tres regiones: un dominio extracelular de 58 aminoácidos que contiene residuos de asparagina que sirven como sitios de N-glicosilación, un dominio transmembrana de 28 aminoácidos y una cola citoplasmática (MUC1-CT) compuesta de 72 aminoácidos. Más allá de la región transmembrana MUC1-C presenta unos motivos cisteína-glutamina-cisteína que participan en la formación de homodímeros (Supruniuk & Radziejewska, 2021).

Al igual que otras mucinas, MUC1 es una proteína altamente glicosilada, principalmente debido a O-glicosilaciones. La O-glicosilación de mucinas es un proceso complejo en el que intervienen un gran número de enzimas distintas (Figura 3). Dependiendo del número de repeticiones de la región VNTR y su grado de glicosilación MUC1 puede pesar entre 250 y 500 kDa. La N-glicosilación por su parte tiene menos presencia, pero también ocurre en cinco residuos de asparagina, cuatro de ellos en la secuencia degenerada de MUC1-N y otro en el dominio extracelular de MUC1-C. El patrón de glicosilación de MUC1 varía dependiendo de la expresión específica de tejido de las glicosiltransferasas, además de poder verse afectado por ciertas enfermedades como el cáncer. En MUC1 la O-glicosilación es necesaria para su función biológica, mientras que la N-glicosilación está implicada en el correcto plegamiento de la proteína, su transporte y su secreción (Sritama Nath and Pinku Mukherjee, 2017).

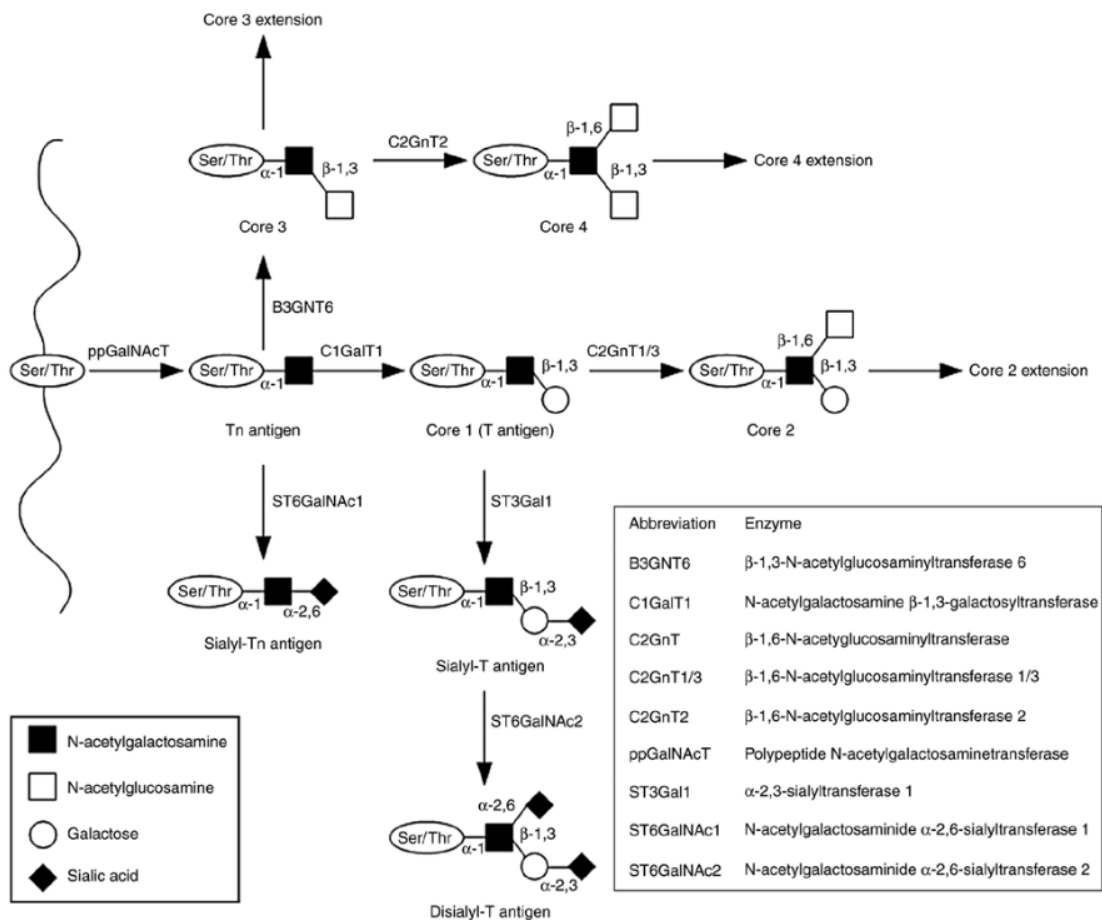


Figura 3. Formación de O-glicanos en mucinas. El proceso comienza con la unión de GalNAc a los grupos hidroxilo de los residuos de serina o treonina catalizada por las enzimas ppGalNAcTs, produciendo el antígeno Tn (GalNAc α 1 - O - Ser/Thr). En este punto el antígeno Tn se puede elongar de varias formas distintas: mediante la adición de galactosa catalizada por C1GalT1 produciendo un antígeno T (o núcleo 1), añadiendo un residuo de GlcNAc mediante B3GNT6 para formar núcleo 3 (la adición de otra GlcNAc mediante C2GnT2 formaría el núcleo 4). Por otro lado, el núcleo se puede modificar mediante la adición de una N-acetilglucosamina mediante las enzimas C3GnT1/T3 para formar el núcleo 2. Estos glicanos pueden continuar alargándose hasta que la elongación termine mediante la adición de fucosa o ácido siálico. (Supruniuk & Radziejewska, 2021)

Como hemos mencionado anteriormente, MUC1 es una mucina de transmembrana y realiza funciones de protección y comunicación célula a célula. En su labor protectora, las abundantes glicosilaciones de MUC1 lubrican el tejido epitelial y previenen la entrada de sustancias nocivas o patógenos. MUC1-N puede incluso separarse de la membrana plasmática y liberarse al espacio extracelular para servir como barrera frente a patógenos (Thathiah et al., 2003), permitiendo a la región transmembrana de la mucina actuar como

receptor de señales de estrés y transmitir las al interior de la célula mediante la fosforilación de residuos de tirosina intracelulares que interactúan con diversas quinasas para participar en las rutas de señalización. En células de cáncer de mama se ha observado que la fosforilación de MUC1-C por parte de EGFR está asociado con un descenso de la actividad de la piruvato quinasa M2 (PKM2), enzima clave en el proceso de glicolisis y la formación de ATP. Por otro lado, la interacción de MUC1 con NF- κ B puede inducir la expresión de interleuquina-6 y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), facilitando la aparición de tumores (Gao et al., 2020). MUC1 también participa en la ruta de señalización de la apoptosis y se ha observado que MUC1-C dificulta la dimerización de Bax y su translocación a la membrana mitocondrial externa, impidiendo la liberación del citocromo c impidiendo la activación de la ruta de apoptosis intrínseca (Supruniuk & Radziejewska, 2021).

2.1.1.3. PAPEL DE MUC1 EN EL CÁNCER.

La sobreexpresión de MUC1 suele estar asociada con distintos tipos de cáncer como el cáncer de mama, el cáncer de colon, el cáncer de ovario, el cáncer de páncreas o el cáncer de pulmón. El gen que codifica para MUC1 en humanos se encuentra en la posición 21 del brazo largo del cromosoma 1 (1q21), una región que frecuentemente presenta mutaciones en células de cáncer de mama. En tejido tumoral MUC1 se encuentra sobreexpresada debido a un aumento en su nivel de transcripción y a una pérdida en su regulación postranscripcional. Por ejemplo, la metilación de las islas CpG en el promotor de MUC1 y de la lisina 9 de la histona H3 (H3-K9) provocan una disminución de la expresión, disminución que no se produce si esta histona está acetilada. En células cancerígenas la falta de metilación del promotor de MUC1 y la acetilación de H3-K9 provocan la sobreexpresión de esta mucina (Yamada et al., 2008). Las citoquinas proinflamatorias TNF- α y IFN- γ (sobreexpresadas en algunos tumores) también inducen la expresión de MUC1 (Lagow & Carson, 2002). Además, la expresión de MUC1 también está regulada a nivel postranscripcional, mediante el microRNA miR-125b que se encuentra menos expresado en células de cáncer de mama, lo que contribuye a la alta expresión de MUC1 en estos tejidos (Rajabi et al., 2010). Estas interrupciones en la regulación de la expresión de MUC1 también provocan que se exprese por toda la membrana celular y no solo por la zona apical, interaccionando con proteínas con las que no debería hacerlo (como receptores tirosina quinasa como EGFR) y alterando rutas de señalización (Supruniuk & Radziejewska, 2021). Esta expresión incrementada de MUC1 en pacientes con cáncer de mama hace que la elevada presencia de MUC1-N en suero se pueda utilizar para detectar y monitorizar el progreso de la enfermedad.

Sin embargo, las alteraciones de MUC1 en tejido tumoral no solo afectan a su nivel de expresión, sino que también produce cambios en la composición de la mucina, principalmente en su perfil de glicosilación, presentando glicanos truncados como GalNAc α 1- O- Ser/Thr (antígeno Tn) o Gal β 1- 3NAc α 1- O- Ser/Thr (antígeno T) y sus formas sialiladas Neu5Ac α 2- 6GalNAc α 1- O- Ser/Thr (antígeno STn) y Neu5Ac α 2- 3Gal β 1- 3GalNAc α 1- O- Ser/Thr (Antígeno ST). La presencia de estos azúcares truncados en lugar de oligosacáridos más complejos produce cambios en la estructura de MUC1 y afecta a las funciones de comunicación de señales de MUC1 (Figura 4). La formación de estos glicanos truncados se debe a alteraciones en la expresión de las enzimas implicadas en la elongación de los glicanos (proceso que está explicado en detalle en la Figura 3). Por ejemplo, la enzima N-acetilgalactosamina β -1,3-galactosiltransferasa (C1GalT1) encargada de la adición de una galactosa al antígeno Tn para continuar la elongación del glicano depende de la co-expresión de la chaperona Cosmc. En algunos tipos de cáncer epiteliales la expresión de Cosmc se ve disminuida debido a hipermetilación de su promotor, lo que provoca una pérdida de actividad de C1GalT1 y una mayor acumulación de antígeno Tn (Cascio & Finn, 2016). La expresión anómala en tumores de las sialiltransferasas, como ST6GalNac-1 y ST3Gal1, también está asociada a la formación de antígenos STn y ST, respectivamente (Cascio & Finn, 2016). El antígeno Tn puede detectarse en las primeras etapas del desarrollo tumoral, permitiendo diagnosticar la enfermedad en sus primeras fases. Por su parte, el antígeno STn también se puede expresar durante la carcinogénesis pero también está implicado en la metástasis, por lo que su presencia apunta a una peor prognosis (Munkley, 2016).

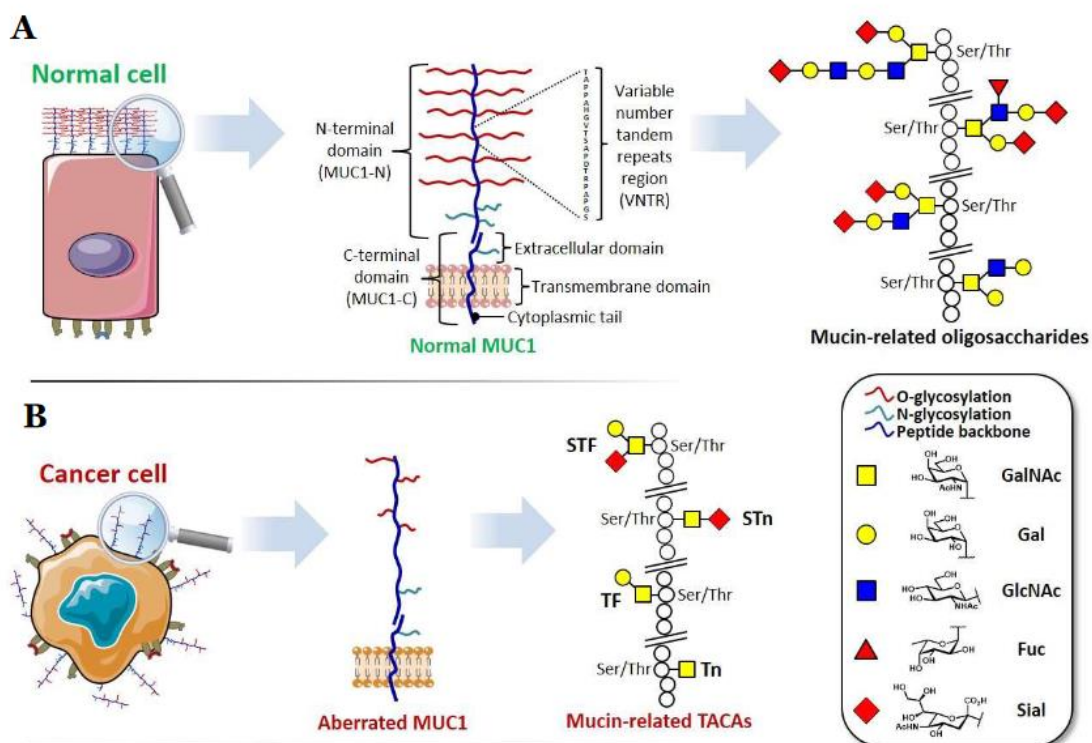


Figura 4. Diferencias en la distribución y glicosilación de MUC1 entre células sanas y células tumorales. a) Célula sana con MUC1 expresándose únicamente en la membrana apical y con un patrón de glicosilación normal. b) Célula de tejido tumoral con MUC1 expresándose en toda la superficie de la membrana y presentando glicanos truncados. (Pifferi, n.d.)

Estos cambios tanto a nivel de expresión como en su propia composición entre células sanas y células de tejido tumoral hacen que MUC1 sea una diana con gran potencial para la detección y tratamiento de diversos tipos de tumores.

2.1.2. ANTICUERPOS.

Los anticuerpos (también llamados inmunoglobulinas o Ig) son grandes proteínas con forma de Y usadas por el sistema inmune para detectar y eliminar amenazas externas como patógenos o virus. Para ello el anticuerpo reconoce una molécula concreta del patógeno, llamada antígeno, mediante los paratopos situados en los extremos de las regiones variables. De esta forma el anticuerpo puede marcar el elemento invasor o una célula que haya sido infectada para que sea eliminada por otros componentes del sistema inmune.

La forma en Y de los anticuerpos en humanos se debe a la presencia de dos cadenas ligeras idénticas (LCs) y dos cadenas pesadas idénticas (HCs). Cada una de las cadenas ligeras se une mediante puentes disulfuro a una cadena pesada formando dos heterodímeros que a su vez están unidos por puentes disulfuro entre las cadenas pesadas. Las cadenas ligeras pueden ser de dos tipos (κ o λ) y tienen dos regiones distintas, una región variable (VL) y una región constante (CL). Por su parte las cadenas pesadas pueden ser de cinco tipos distintos (IgA, IgD, IgE, IgG, o IgM), cada una con diferentes funciones en el sistema inmune adaptativo y que determinan la clasificación de los anticuerpos. La cadena pesada siempre tiene una única región variable (VH) pero dependiendo del tipo de cadena pesada encontramos un número diferente de regiones constantes: las IgAs, IgDs y IgGs tienen tres regiones constantes (CH1, CH2 y CH3) mientras que las IgMs y IgEs tienen cuatro (CH1, CH2, CH3 y CH4). Las IgAs y IgMs tienen una cadena-J adicional que permite la formación de dímeros y pentámeros, respectivamente.

De todos los tipos de anticuerpo uno de los más importantes son las IgGs, siendo el tipo de anticuerpo más numeroso en sangre, que recorre el sistema circulatorio en busca de patógenos y protegiendo al cuerpo frente a infecciones. Las IgGs son producidas por los plasmocitos y suelen pesar en torno a 150 kDa. A partir de este punto nos centraremos en este tipo de anticuerpo, teniendo en cuenta que puede haber particularidades que lo diferencien de los anticuerpos de otras categorías.

Además de por sus cadenas, los anticuerpos se pueden dividir en tres componentes funcionales: dos fragmentos de unión a antígeno (Fabs) y un fragmento cristalizable (Fc), unidos por una región bisagra que ofrece cierta flexibilidad al anticuerpo (Figura 5). Cada uno de los Fabs está constituido por las regiones VL y CL de una de las cadenas ligeras y las regiones VH y CH1 de una de las cadenas pesadas y tienen un sitio de unión a antígeno que es el que permite el reconocimiento del epítipo. Por otro lado, el Fc está constituido por las regiones CH2 y CH3 de ambas cadenas pesadas y es el principal responsable de las interacciones con otros elementos del sistema inmune. Los Fabs se pueden separar fácilmente del Fc mediante digestión con papaína.

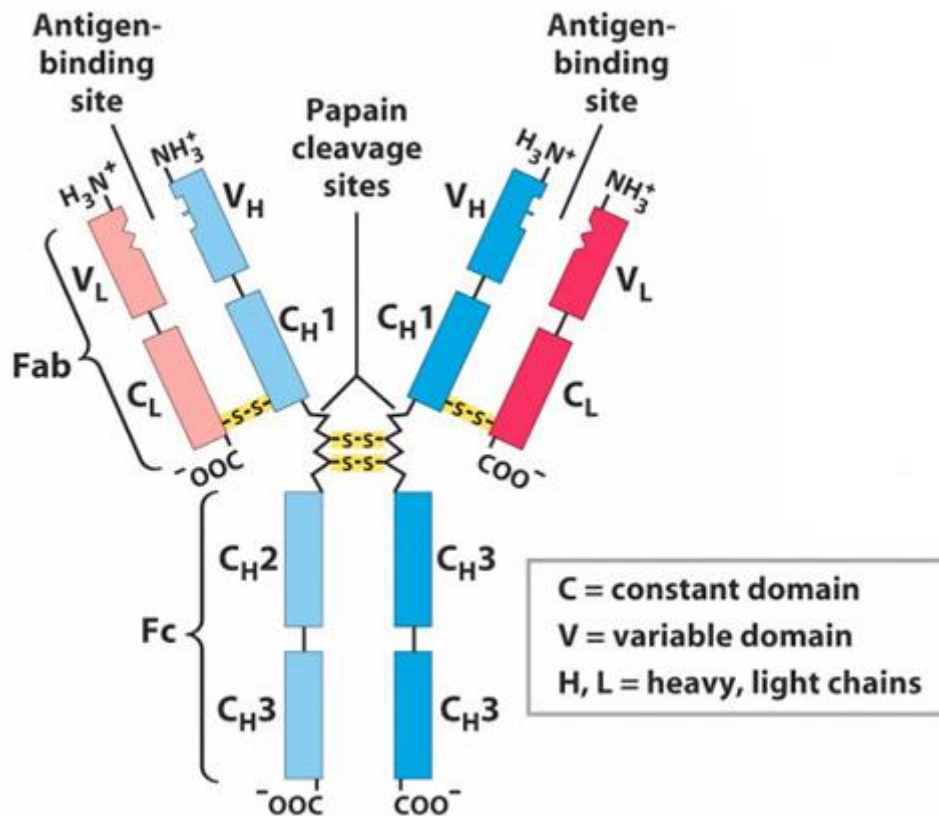


Figura 5. Representación de la estructura de una IgG. (Mandal, 2019)

Como hemos mencionado anteriormente, el sitio de unión a antígeno se encuentra en el extremo N-terminal del Fab y está constituido por el VL y el VH, formando una región denominada Fv. Cada una de las cadenas posee tres regiones determinantes de complementariedad (CDRs, también llamadas regiones hipervariables) que son las responsables de la especificidad de los anticuerpos hacia los diferentes antígenos. De entre todos los CDRs destaca el tercer CDR de la cadena pesada (CDR-H3) por tener una mayor variabilidad de secuencia que el resto y suele tener un papel más importante en las interacciones con el antígeno (Chiu et al., 2019).

2.1.2.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS SCFVS.

Dado que el reconocimiento del antígeno se realiza mediante el Fv no es necesario que el anticuerpo esté completo para unirse a su epítipo. Ni siquiera es necesaria la presencia de todo el Fab, ya que nos basta con el sitio de unión a antígeno. El fragmento más pequeño del anticuerpo que conserva el sitio de unión a antígeno completo es el Fv, un heterodímero de unos 25 kDa aproximadamente compuesto por los dominios VL y VH. Para trabajar más fácilmente con este Fv se puede unir el extremo C-terminal de uno de los dominios variables con el extremo N-terminal del otro dando lugar a un único fragmento (Figura 6). Esta unión está realizada por un linker de unos 15-20 aminoácidos con un alto contenido en glicina y serina para otorgarle flexibilidad (también puede incorporar residuos cargados como lisina o ácido glutámico para mejorar su solubilidad) (Ahmad et al., 2012).

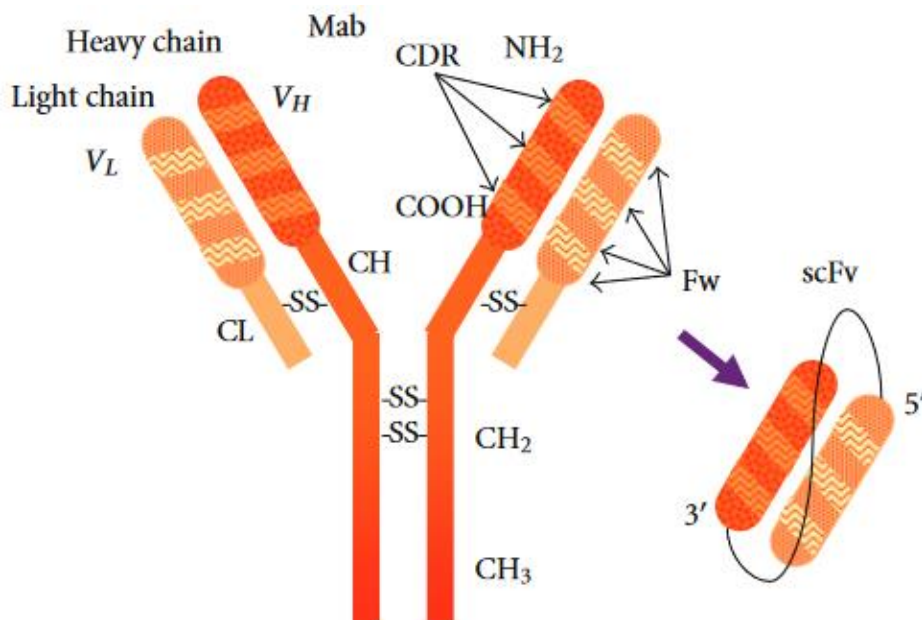


Figura 6. Representación de una IgG mostrando la distribución de sus dominios junto con la representación de un scFv. (Ahmad et al., 2012)

Trabajar con scFvs presenta varias ventajas sobre los anticuerpos completos. En primer lugar, son más fáciles y baratos de expresar, pudiendo expresarse en gran variedad de organismos (como *E. coli* o levaduras) mientras que la expresión de anticuerpos completos requiere de técnicas de cultivos celulares más costosas y complejas. Su pequeño tamaño también les permite ser utilizados en métodos de visualización in vitro como *phage display* (Bradbury et al., 2011). Los scFvs también presentan algunas ventajas clínicas, como una depuración en sangre rápida (que puede ser útil para aplicaciones de imagen), una mayor penetración en el tejido y una inmunogenicidad reducida debido a no poseer una región Fc. Otra gran ventaja de los scFv (y también los Fabs) es que al ser proteínas de menor tamaño y complejidad son mucho más fáciles de cristalizar que los anticuerpos completos.

Por otro lado, los scFvs también presentan algunas desventajas frente a las inmunoglobulinas completas. Los scFvs pueden tener afinidades más bajas, menor estabilidad y una mayor tendencia a agregar debido a su tamaño. Además, su rápida depuración en sangre puede ser un problema para aplicaciones terapéuticas que requieran un mayor tiempo de retención (Ahmad et al., 2012). Sin embargo, estos problemas pueden resolverse mediante ingeniería de los scFvs, introduciendo una secuencia de cisteínas en el extremo C-terminal para formar multímeros (Figura 7) con un mayor tiempo de depuración sin afectar a su capacidad de penetrar en los tejidos (Monnier et al., 2013).

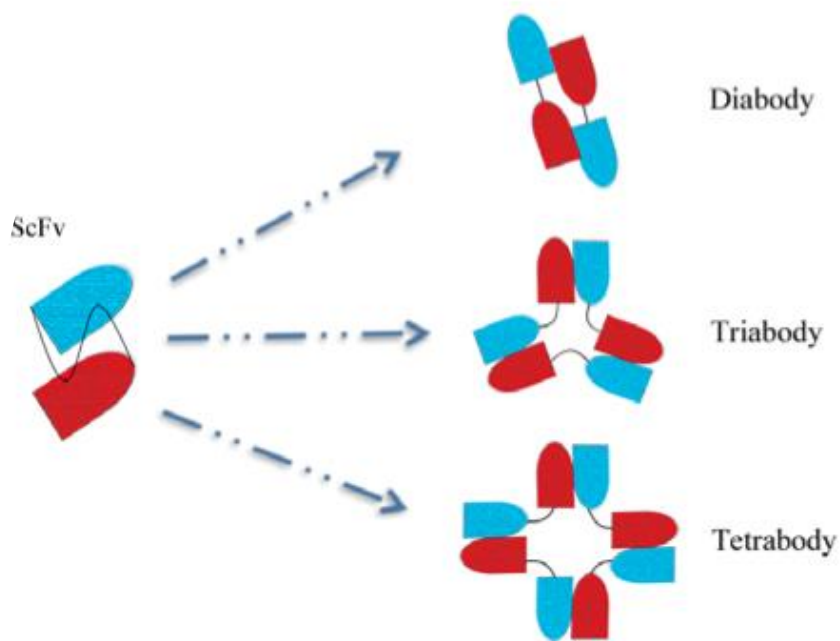


Figura 7. Representación de varios multímeros de scFv. (Monnier et al., 2013)

Los anticuerpos monoclonales son capaces de reconocer marcadores específicos de células cancerígenas, lo que los posiciona como una vía de tratamiento para cáncer, sin embargo, su penetración en tumores sólidos es limitada. Como ya hemos mencionado antes, este problema no está presente en los scFvs, lo que los convierte en una alternativa viable mediante el uso de multímeros. Para ello hay que encontrar un multímero que ofrezca un equilibrio entre un tiempo de depuración en sangre suficiente para que haga efecto y un tamaño que no afecte negativamente a la penetración en el tumor, siendo la mejor opción los multímeros de dos unidades de scFv, que han mostrado una mayor eficacia in vivo que los anticuerpos completos (Monnier et al., 2013).

Al ser fragmentos de anticuerpos, los scFv necesitan un antígeno específico de las células tumorales al que unirse e inhibir su crecimiento, ya sea bloqueando la proteína a la que se une o sirviendo como vehículo para administrar un fármaco, de forma que pueden utilizarse en diversas estrategias. Ehsan Rezaie et al. desarrollaron un scFv que reconocía específicamente a EPHA2 (altamente expresada en muchos cánceres como el cáncer de mama) unido a la inmunotoxina PE38KDEL y demostraron su eficacia en una línea celular de cáncer de mama in vitro (Rezaie et al., 2020). Otra estrategia que se puede seguir es utilizar los scFvs para desarrollar células CAR-T, permitiendo que la célula T modificada esté dirigida específicamente al tejido tumoral. Recientemente Meijia Yang et al. desarrollaron células CAR-T biespecíficas capaces de reconocer CD70 y B7-H3 (ambas expresadas de forma anómala en tumores), dirigiendo las CAR-T a los tumores e inhibiendo su crecimiento tanto in vitro como in vivo (Yang et al., 2020).

2.1.3. MUC1 COMO DIANA DE ANTICUERPOS EN CÁNCER.

Como mencionamos anteriormente MUC1 se encuentra sobreexpresada y presenta patrones de glicosilación anómalos en diversos tumores, lo que hace que sea una diana muy interesante para el uso de anticuerpos. La región VNTR de MUC1 posee numerosas repeticiones del segmento en tándem que además están más expuestos que en células sanas debido a las glicosilaciones truncadas, presentando múltiples antígenos potenciales que podrían ser reconocidos por anticuerpos, especialmente cabe destacar los segmentos PDTR y GSTA, dos secuencias reconocidas por numerosos anticuerpos anti-MUC1 (Huang et al., 2012)(Karsten et al., 2004).

El primer anticuerpo que se utilizó contra MUC1 fue 1SM3 que se usó en pacientes con cáncer de mama, siendo el primer ejemplo de un anticuerpo específico que reconoce el antígeno Tn de MUC1 (aunque también puede reconocer en menor medida glicanos del core 2 y sus predecesores) (Karsten et al., 2004). A este anticuerpo le han seguido otros como 214D4 (que reconoce MUC1 independientemente de su patrón de glicosilación) y 5E5 (que reconoce exclusivamente las glicofomas de MUC1 asociadas al cáncer) (Sørensen et al., 2006).

A día de hoy se han desarrollado decenas de anticuerpos frente a MUC1, varios de ellos incluso llegando a ensayos en fases pre-clínicas. Algunos de estos anticuerpos solo reconocen la secuencia peptídica de MUC1, como PR81 que reconoce específicamente la secuencia PD(T/S/G)RP de las VNTR y ha demostrado una disminución del crecimiento de células tumorales MCF7 de hasta el 80%. Otros reconocen tanto la secuencia proteica como el glicano, como VU-2G7, que reconoce el motivo PDT(Tn)R que se ha utilizado

para el reconocimiento de MUC1 sobreexpresada en varios tejidos tumorales, o el propio 5E5 que se ha utilizado para desarrollar CAR-T frente a MUC1, mostrando efectos positivos en experimentos con ratones. También se están desarrollando anticuerpos bi-específicos (bsAbs) capaces de reconocer un antígeno de MUC1 y otro epítipo distinto, como por ejemplo anticuerpos bi-específicos frente a MUC1 y CD43. Uno de estos anticuerpos bi-específicos frente a MUC1 y CD43 unido a un inhibidor de PD1 se encuentra en ensayos clínicos de fase II para pacientes de cáncer avanzado de mama, hígado, riñón, gástrico, pulmón, colorrectal y pancreático (Pourjafar et al., 2020).

A pesar del potencial de MUC1 como diana para la detección y el tratamiento de cáncer, esta proteína presenta algunas dificultades que hay que tener en cuenta. La mayoría de anticuerpos desarrollados frente a MUC1 tienen como diana secuencias de la región VNTR, que se encuentra en la subunidad MUC1-N. Esta región de la mucina puede separarse de la membrana celular y ser secretada, de forma que el anticuerpo sería incapaz de unirse a las regiones de MUC1 presentes en la membrana y de afectar a la célula tumoral, por lo que la efectividad del tratamiento disminuiría. Además, esta subunidad MUC1-N anómalamente glicosilada se puede encontrar en grandes cantidades en el suero de pacientes de determinados tipos de cáncer, secuestrando el tratamiento e impidiendo que llegue al tejido tumoral (Pourjafar et al., 2020). Estos problemas pueden sortearse ajustando la dosis teniendo en cuenta que parte del anticuerpo administrado no llegará a la diana en el tumor por estos motivos.

Incluso con estos inconvenientes, MUC1 sigue siendo un marcador de gran interés para el uso de anticuerpos tanto en la detección como en el tratamiento de diversos tipos de tumores. El gran número de anticuerpos desarrollados frente a esta mucina, la variedad de estrategias que permite y los resultados positivos obtenidos (llegando algunos incluso

a fases de ensayos pre-clínicos y clínicos) atestiguan el potencial de los anticuerpos contra MUC1 en la lucha contra el cáncer.

2.2. OBJETIVOS:

Como hemos visto, MUC1 es una proteína que se encuentra sobreexpresada y además presenta glicosilaciones aberrantes o truncadas en muchos cánceres, lo que la convierte en una diana muy prometedora en la lucha frente a estas enfermedades. Por ello nuestro principal objetivo es estudiar el reconocimiento de las secuencias repetidas en las VNTR de MUC1 por parte del anticuerpo 5E5, generando para ello un scFv que nos facilite la expresión y la cristalización de la proteína. En este trabajo buscamos no solo caracterizar el mecanismo de interacción de scFv-5E5 con el antígeno Tn, si no también explorar cómo modificaciones tanto en la proteína como en el antígeno afectan a esta unión, buscando un conocimiento más profundo sobre el funcionamiento de este mecanismo.

Para alcanzar este objetivo general se propusieron los siguientes objetivos específicos:

- Elucidar el mecanismo de interacción de scFv-5E5 con el antígeno Tn mediante la determinación de la estructura cristalina del complejo de scFv-5E5 con un glicopéptido conteniendo un antígeno Tn.

- Estudiar cómo afectan los cambios en residuos clave del scFv-5E5 a la unión con el antígeno mediante el estudio los parámetros termodinámicos de estas interacciones.

- Estudiar la especificidad de scFv-5E5 caracterizando los parámetros de unión de scFv-5E5 con diferentes (glico)péptidos.

- Confirmar que no se producen cambios en la capacidad de unión de scFv-5E5 con respecto al anticuerpo completo.

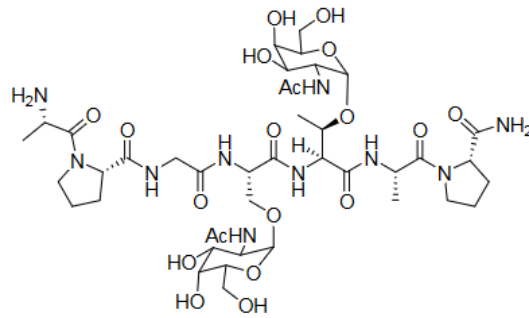
- Estudiar cómo se comportaría el scFv-5E5 en presencia de diferentes (glico) péptidos mediante simulaciones computacionales.

2.3. MATERIALES Y MÉTODOS

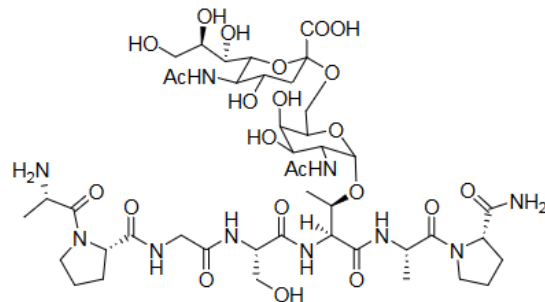
2.3.1. SÍNTESIS DE PÉPTIDOS EN FASE SÓLIDA (SPPS).

Los glicopéptidos utilizados en este trabajo están basados en fragmentos de la secuencia de los VNTR de MUC1 (PDTRPAPGSTAPPAHGVTS_A). La secuencia APGST(Tn)AP (glicopéptido 1) ha servido de base para la mayoría de glicopéptidos utilizados en este trabajo, ya sea eliminando el azúcar para dejar solo la secuencia peptídica (péptido 1-“naked”), añadiendo algunos aminoácidos extra (glicopéptido 1’), añadiendo un segundo residuo de GalNAc a la serina (glicopéptido 3), enlazando un ácido siálico a GalNAc para formar el antígeno STn (glicopéptido 4) o sustituyendo la segunda prolina por una alanina (glicopéptido 5). También hemos utilizado un glicopéptido basado en la secuencia APDT(Tn)RP del VNTR (glicopéptido 2) y un glicopéptido de mayor tamaño (MUC1-Tn16) (Figura 8 y Figura 9).

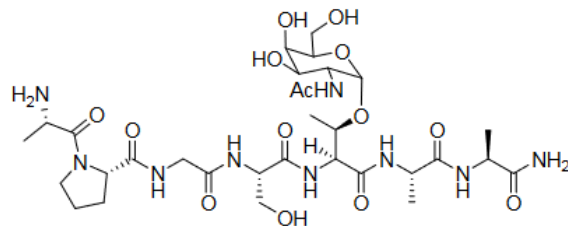
Glicopéptido 3



Glicopéptido 4



Glicopéptido 5



MUC1-Tn16

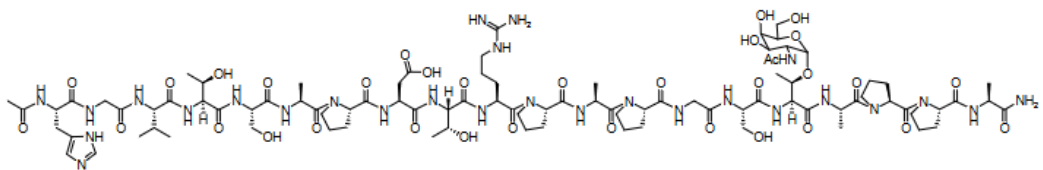


Figura 9. Representación de los péptidos glicopéptido 3, glicopéptido 4, glicopéptido 5 y MUC1-Tn16.

Los glicopéptidos utilizados en este trabajo se sintetizaron mediante síntesis en fase sólida asistida por microondas por etapas en un sintetizador Liberty Blue utilizando la estrategia Fmoc en resina Rink Amide MBHA (0,1 mmol). Fmoc-Thr[GalNAc(Ac) $3-\alpha$ -D]-OH, Fmoc-Ser[GalNAc(Ac) $3-\alpha$ -D]-OH y Neu5Ac(Ac) $4(\text{Bn})-\alpha-(2-6)$ -GalNAc(Ac) $3-\alpha-1$ -O-Thr (2,0 equiv) se sintetizaron como se describe en la literatura (Carolin Plattner, Michael Höfener, 2011) (Liebe, B.; Kunz, H., 1994) y se acoplaron manualmente usando HBTU [(2-(1H-benzotriazol-1-il)-1, hexafluorofosfato de 1,3,3-tetrametiluronio], 0,9 equivalentes y 0,25 ml de DIPEA (2,0 M en NMP) disueltos en 1 ml de DMF, mientras que todos los demás aminoácidos Fmoc (5,0 equivalentes) se acoplaron automáticamente usando oxyma pure/DIC (N,N'-diisopropilcarbodiimida). Los grupos O-acetilo del residuo GalNAc se eliminaron en una mezcla de $\text{NH}_2\text{NH}_2/\text{MeOH}$ (7:3) para el antígeno Tn. A continuación, los glicopéptidos se liberaron de la resina y todos los grupos protectores sensible a ácido se eliminaron simultáneamente utilizando TFA al 95%, TIS (triisopropilsilano) al 2,5 % y H_2O al 2,5 %, seguido de precipitación con éter dietílico frío. En el caso del glicopéptido derivado del antígeno STn, el derivado se separó primero de la resina utilizando el cóctel de escisión antes mencionado, que se evaporó aún más, se purificó a través de cartucho y posteriormente se liofilizó. El grupo bencilo del ácido hesiálico se eliminó mediante hidrogenólisis (Pd-C en MeOH) o/n. Una vez completada esta reacción, Pd-C es filtrado y se evapora el solvente. Finalmente, los grupos AcO- restantes se eliminan utilizando una solución de MeONa/MeOH hasta alcanzar un pH de 9,5. Una vez completada la reacción, la solución se neutraliza y se evapora. Los productos crudos se purificaron por HPLC en una columna Phenomenex Luna C18 (10 μm , 250 mm \times 21,2 mm) y un detector de absorbancia dual, con un caudal de 10 o 20 mL/min.

La síntesis de los péptidos utilizados en este capítulo fue realizada por el grupo del Doctor Francisco Corzana.

2.3.2. GENERACIÓN DEL ADN Y TRANSFORMACIÓN EN WK6.

La secuencia de ADN que codifica los residuos de aminoácidos del scFv-5E5 (Figura 10) fue optimizada y sintetizada por GenScript (EE. UU) para su expresión en células de *E. coli*. La secuencia de ADN de la proteína (con un sitio de corte de PstI en el extremo 5' y una cola de seis histidinas, un codón de stop y un sitio de corte para BstEII en el extremo 3') fue clonado en el vector pHEN6c (un plásmido con un gen de resistencia a ampicilina y una secuencia señal que dirige la proteína expresada al periplasma), dando como resultado el vector pHEN6c-scFv-5E5-6His. Los mutantes de scFv-5E5 (H32A-H35A, Y100A y F102A) fueron generados por GenScript mediante mutagénesis dirigida a partir de este vector.

```
QVQLQQSDAELVKPGSSVKISCKASGYTFTDHA IHWV  
KQKPEQGLEWIGHFSPGNTDIKYNDKFKGKATLTVD R  
SSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCKTSTFFFDYWGGQT T  
LTVSSSSSGGGGSGGGGSSGSS ELVMTQSPSSLTVTA  
GEKVTMICKSSQSLNSGDQKNYLTWYQQKPGQP PKL  
LIFWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS SVQAEDL  
AVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLELKG GHHHHHH
```

Figura 10. Secuencia aminoacídica de la construcción de scFv-5E5 utilizada en este trabajo. La cadena pesada está coloreada en marrón, la ligera en azul, el fragmento de unión entre las dos cadenas en amarillo y la cola de histidinas en azul oscuro.

Los plásmidos fueron transformados en células *E. coli* WK6 (una cepa de *E. coli* utilizada para la expresión de proteínas en periplasma) mediante choque térmico. A una alícuota de 250 µL de células competentes WK6 se le añadieron 200 ng del plásmido que queremos introducir y se dejó incubar durante media hora en hielo, tras lo cual se dio un choque térmico a 42°C durante un minuto y se dejó reposar otros dos minutos en hielo.

Tras este tiempo se añadieron 500 μ L de medio de recuperación SOC (2% (w/v) triptona, 0.5% (w/v) extracto de levadura, 0.05% (w/v) NaCl, 10 mM MgCl₂, 20 mM glucosa) y se incubó a 37°C con agitación a 220 rpm entre una hora y media y tres horas. Al finalizar la incubación las células se sembraron en una placa de LB/Agar (1% (w/v) triptona, 0.5% (w/v) extracto de levadura, 1% (w/v) NaCl, 1.5% (w/v) agar) con 100 μ g/ml de ampicilina (Carbosynth) y se dejaron incubar o/n a 37°C, de forma que solo crecerán colonias de células con resistencia a ampicilina y que por lo tanto hayan integrado el plásmido.

2.3.3 EXPRESIÓN DE SCFV-5E5.

Las colonias seleccionadas se crecieron en un precultivo de 100 mL de medio TB (0.23% (w/v) KH_2PO_4 , 1.625% (w/v) K_2HPO_4 , 1.2% (w/v) triptona, 2.4% (w/v) extracto de lavadura, 0.4% (v/v) glicerol, 0.1% (w/v) glucosa, 2 mM MgCl_2) con 100 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina o/n a 37°C con agitación (180 rpm). A la mañana siguiente se tomaron 700 μl de precultivo y se depositaron en un vial con 300 μl de glicerol 80% (v/v) estéril para hacer un stock de células transformadas. El stock se guardó a -80°C hasta su uso.

El resto del precultivo se pasó a un cultivo de 2L de TB conservando la esterilidad, se dejó incubar en las mismas condiciones hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm de 0.6, momento en el que se indujo la expresión de la proteína añadiendo 400 μM de IPTG (isopropyl β -D-thiogalactoside), se redujo la temperatura a 18°C y se dejó incubar durante 18 horas. Una vez pasado este tiempo las células del cultivo fueron recogidas mediante centrifugación a 10.000 rpm y 4°C durante 10 minutos, tras lo cual se prepararon para el proceso de purificación.

2.3.4. PURIFICACIÓN DE SCFV-5E5.

2.3.4.1. ROTURA DE LA MEMBRANA CELULAR.

El pellet celular obtenido en el paso anterior fue resuspendido en buffer 4xTES (0.5 M sacarosa, 0.2 M TRIS pH 8, 0.5 mM EDTA, se usaron 12 mL por cada litro de cultivo) y agitado a 4°C durante seis horas para romper la membrana celular mediante choque osmótico. Tras este periodo se diluyó añadiendo buffer 4xTES diluido cuatro veces en agua destilada (se añade 24 mL, 6 de buffer 4xTES y 18 de agua destilada, por cada litro de cultivo) y se dejó agitando o/n. La mañana siguiente la muestra se centrifugó a 11.500xg a 4°C durante 30 minutos, tras lo cual fue filtrada usando filtros de 0.45 µm (Scharlab) y dializada contra el buffer de carga (25 mM TRIS pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol).

2.3.4.2. PURIFICACIÓN DE SCFV-5E5 MEDIANTE COLUMNA DE HISTAG (IMAC).

El primer paso de esta purificación se realizó mediante una cromatografía de afinidad con HisTrap (IMAC). Esta técnica consiste en la generación de interacciones específicas entre nuestra proteína y la matriz (en nuestro caso entre la cola de histidinas de nuestra proteína y el níquel de la matriz de la columna) haciendo que nuestra proteína permanezca en la columna mientras que el resto de componentes de la muestra se descartan (Figura 11).

Una vez dializada la proteína se cargó en una columna His-Trap (Cytiva) y fue eluida mediante un gradiente de imidazol de 10 mM hasta 500 mM (el imidazol compite con nuestra proteína para unirse al níquel, liberando de esta forma nuestra proteína) (Figura 12).

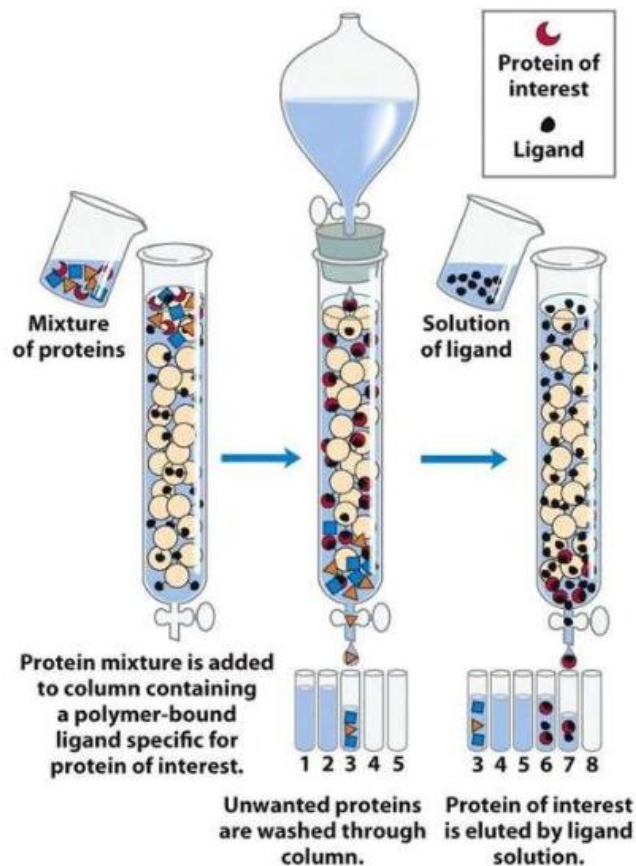


Figura 11. Esquema del funcionamiento de una cromatografía de afinidad. La muestra de proteína se carga y nuestra proteína de interés se une al ligando, quedando atrapada en la columna mientras eluyen el resto de proteínas y biomoléculas. Una vez que se ha lavado la columna y se han retirado las proteínas no deseadas se utiliza una solución de elución que competirá para unirse a los ligandos de la proteína de forma que ésta es eluida. (Nelson, 2009)

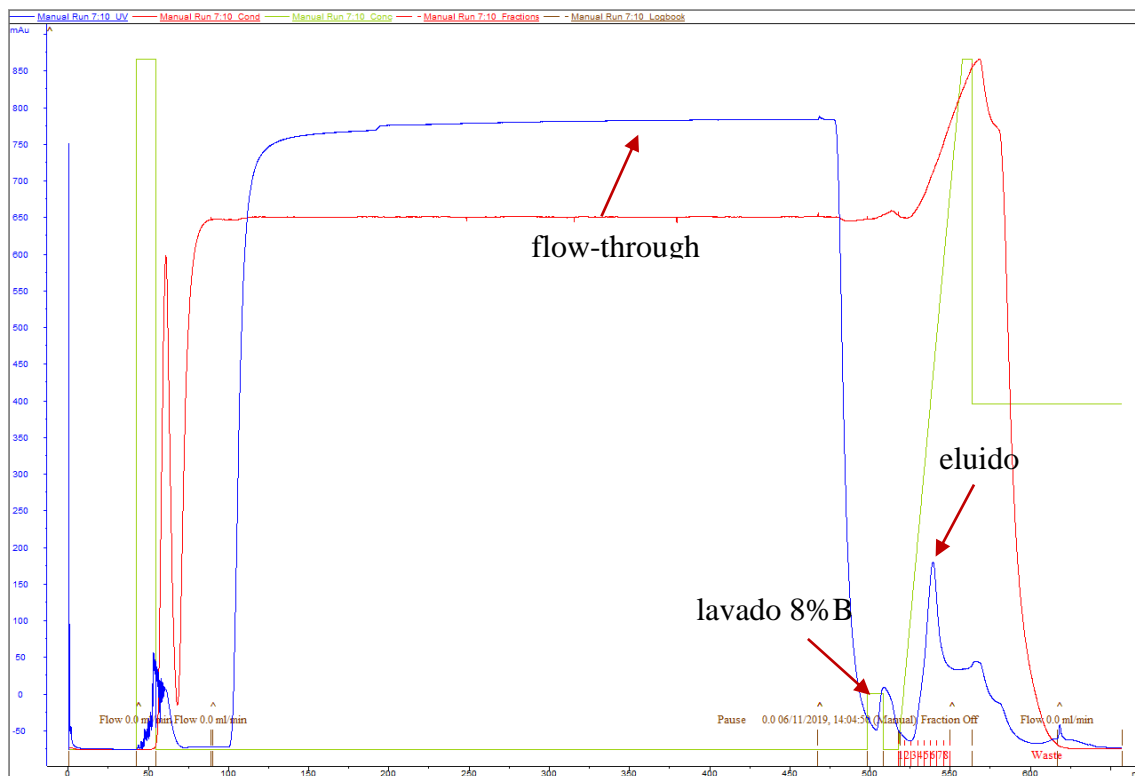


Figura 12. Cromatograma de la purificación con columna de Níquel de scFv-5E5. La curva azul representa la absorbancia, la curva roja la conductividad y la verde el porcentaje de buffer B. Durante la carga de muestra las proteínas no unidas a la columna aumentan la absorbancia, que disminuye en la fase de lavado, vuelve a aumentar al lavar con 8% de buffer B debido a las proteínas que se unen a la columna de forma inespecífica que se separan con esta baja concentración de imidazol y durante el gradiente la absorbancia aumenta al salir las proteínas unidas a la columna.

2.3.4.3. VISUALIZACIÓN DE LA PROTEÍNA EN GEL SDS-PAGE.

Para visualizar la presencia y pureza de la proteína se realizó un gel SDS-page, que permite la separación y visualización de proteínas en función de su peso molecular, sometiendo la proteína cargada negativamente a una diferencia de potencial eléctrico en un gel de acrilamida. Previamente a la carga de la muestra es necesario desnaturalizar la proteína añadiendo un tampón de carga (24% (v/v) TRIS 1M pH 6.8, 8% (w/v) SDS, 40% (v/v) glicerol, 10% (v/v) β -mercaptoetanol, 0.1% (w/v) azul de bromofenol) y calentando la proteína a 100°C. El SDS del tampón de carga es un detergente aniónico que se une

inespecíficamente a las proteínas y les confiere una relación tamaño/carga constante. Una vez cargadas las muestras en el gel, se somete a un voltaje constante de 130 V durante 80-90 minutos haciendo que las proteínas migren por el gel de acrilamida a una velocidad inversamente proporcional a su peso molecular. Como referencia se puede utilizar un patrón estándar, en nuestro caso usamos Page Ruler Protein Ladder, (Thermo Fisher). El porcentaje de acrilamida del gel dependerá del tamaño de nuestra proteína, ya que porcentajes más bajos (10-12% de acrilamida) permiten que las bandas correspondientes a proteínas de gran tamaño se separen mejor, mientras que porcentajes más altos (15%) hace lo mismo con proteínas más pequeñas. Por su pequeño tamaño (en torno a 25 kDa) en el caso de scFv-5E5 utilizamos geles de acrilamida del 12% (Figura 13).

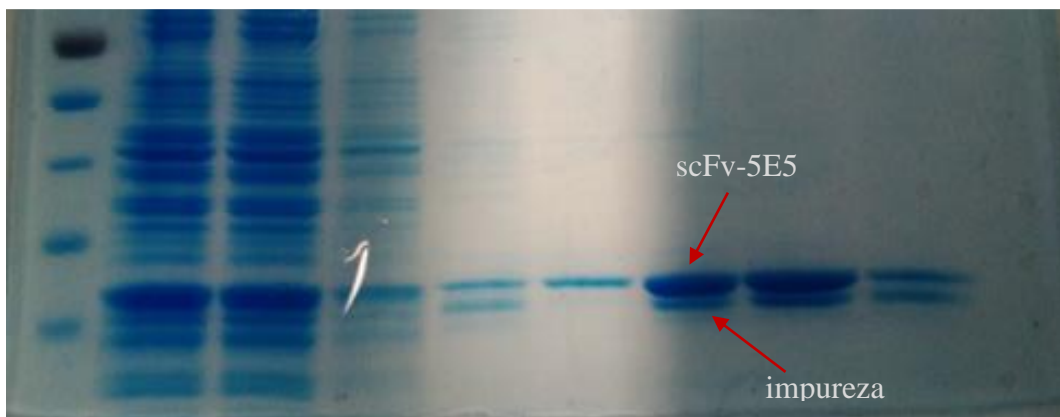


Figura 13. Gel de acrilamida SDS-Page de la purificación con columna HisTag de scFv-5E5. De izquierda a derecha: Marcador de pesos moleculares, inyectado, flow-through, lavado, lavado 50 mM imidazol y fracciones del gradiente de imidazol. Se puede observar que debajo de la banda correspondiente a scFv-5E5 hay una banda de impurezas.

2.3.4.4. ELIMINACIÓN DE IMPUREZAS MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.

Tras esta primera purificación quedan algunas impurezas en la muestra de nuestra proteína (se confirmó que esta segunda banda inferior eran impurezas de *E. coli* y no una degradación de nuestra proteína mediante espectrometría de masas). Para eliminarlas se realizó una cromatografía de intercambio iónico. Esta técnica aprovecha las diferencias de las cargas eléctricas netas de las proteínas a un pH determinado (Figura 14). La matriz de la columna es un polímero sintético que tiene unidos grupos cargados: si tiene unidos grupos aniónicos, se denominan intercambiadores catiónicos, y si estos grupos son catiónicos se denominan intercambiadores aniónicos. La afinidad de cada proteína por los grupos cargados de la columna está determinada por el pH (que afecta al estado de ionización de la molécula) y la concentración de los iones salinos libres competidores presentes en la disolución que las rodea. La separación puede optimizarse cambiando gradualmente el pH y/o la concentración de sal de la fase móvil, de forma que se cree un gradiente de pH o sal.

ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY

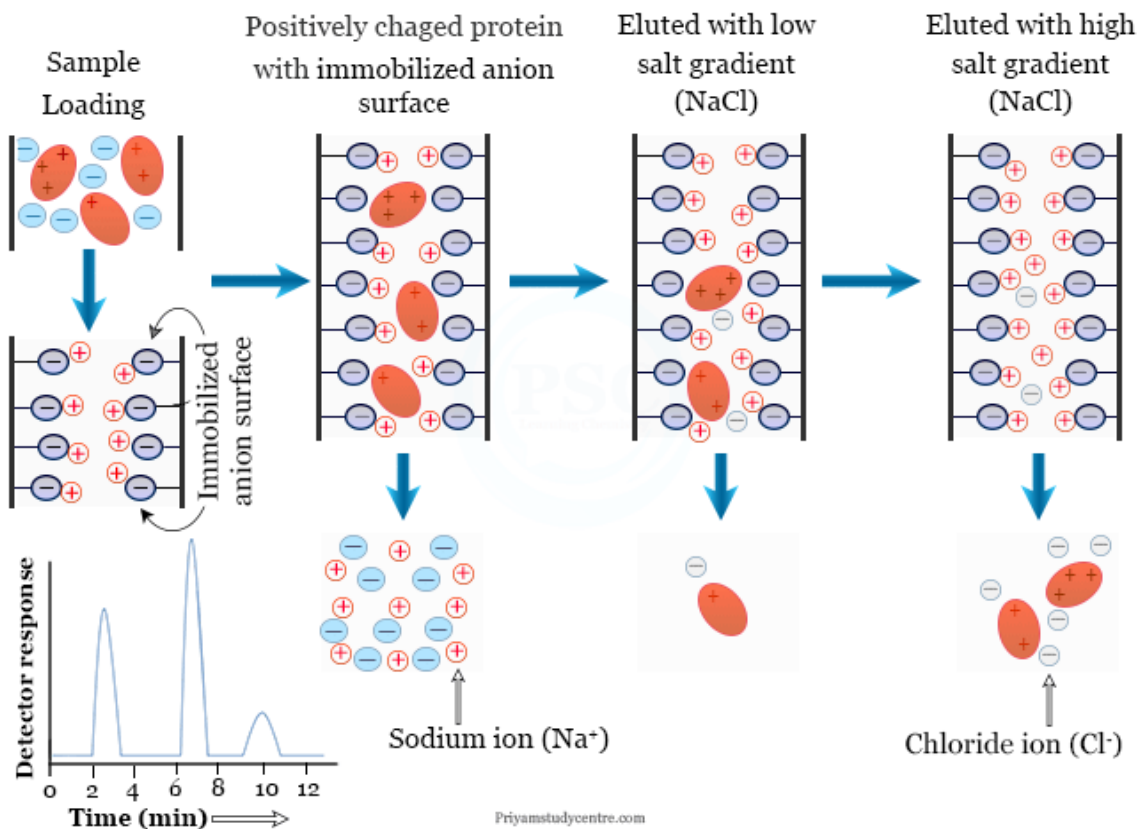


Figura 14. Esquema del funcionamiento de una cromatografía de intercambio. Esta imagen muestra un intercambiador catiónico en el que las moléculas con carga positiva quedan unidas a la matriz y son eluidas mediante un gradiente de sal, eluyéndose primero las proteínas con menos carga positiva y luego las que tienen más. (*Ion Exchange Chromatography*, n.d.)

Dado que el pI teórico de scFv-5E5 es 6.81 decidimos utilizar una columna de intercambio aniónico. Las fracciones con nuestra proteína obtenidas en el paso anterior fueron dializadas contra un buffer de carga para columnas de intercambio aniónico (25 mM TRIS pH 9) y cargado en una columna de intercambio aniónico HiTrap QFF (Cytiva), eluyéndose con un gradiente de NaCl hasta 1M (Figura 15).

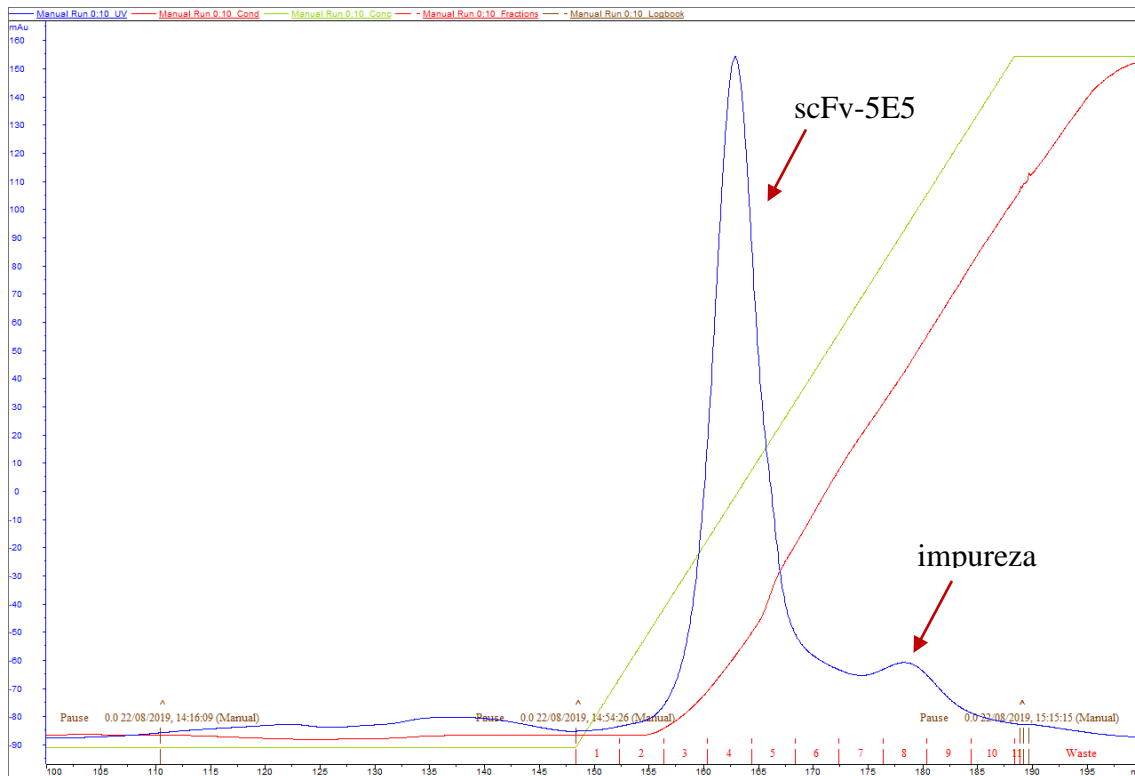


Figura 15. Cromatograma de la purificación con columna aniónica de scFv-5E5. La curva azul representa la absorbancia, la curva roja la conductividad y la verde el porcentaje de buffer B. Al aumentar la concentración de sal con el gradiente podemos separar nuestra proteína (primer pico) de la impureza (segundo pico).

Tras esta purificación volvimos a correr las muestras en un gel de acrilamida para confirmar la separación de las impurezas (Figura 16).

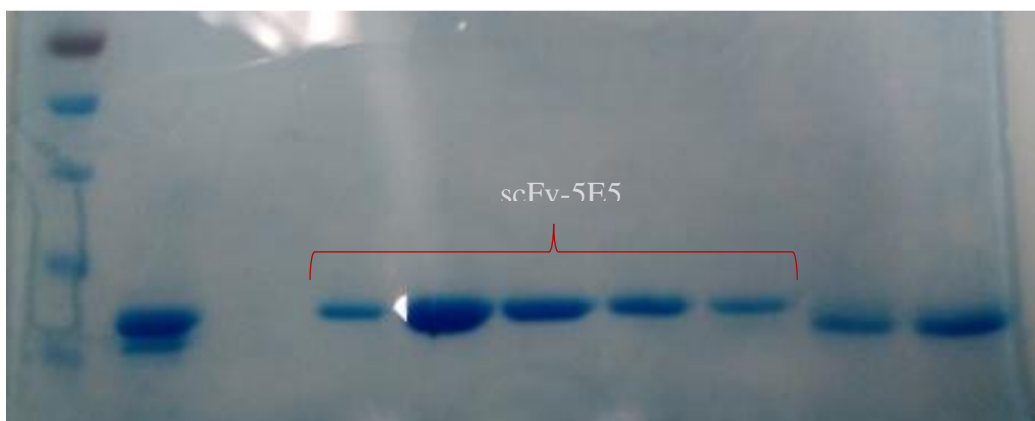


Figura 16. Gel de acrilamida SDS-Page de la purificación con columna aniónica de scFv-5E5. De izquierda a derecha: Marcador de peso moleculares, inyectado, flow-through, fracciones del gradiente de NaCl. Tras esta purificación se puede observar que las bandas correspondientes a nuestra proteína y las bandas correspondientes a la impureza se han separado.

2.3.4.5. INTERCAMBIO DE BUFFER MEDIANTE DESALTING.

Por último, se realizó un cambio de buffer al buffer final (25 mM TRIS pH 7.5, 50 mM NaCl) utilizando una columna de desalting HiPrep 26/10 (Cytiva) que permite separar moléculas en función de su tiempo de retención en la matriz de sefarosa de la columna que vendrá determinado por su tamaño (Figura 17), pasando más rápido las moléculas de mayor tamaño (como nuestra proteína) y quedando retenido más tiempo las moléculas más pequeñas (como los componentes del buffer inicial de la proteína) (Figura 18).

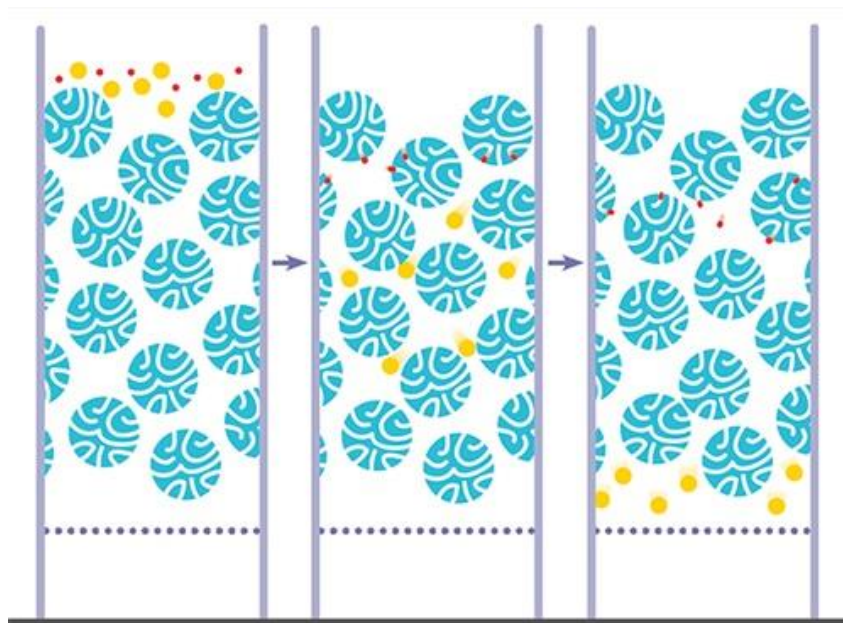


Figura 17. Representación del funcionamiento de una columna de desalting. Las moléculas pequeñas de la muestra original (roja) entran en los poros de las perlas y, por lo tanto, siguen un camino más largo y más lento a través de la columna que la proteína (amarilla). Como resultado, la proteína se separa de las sales del buffer original y se intercambia con el buffer de la columna. (Thermofisher, n.d.)

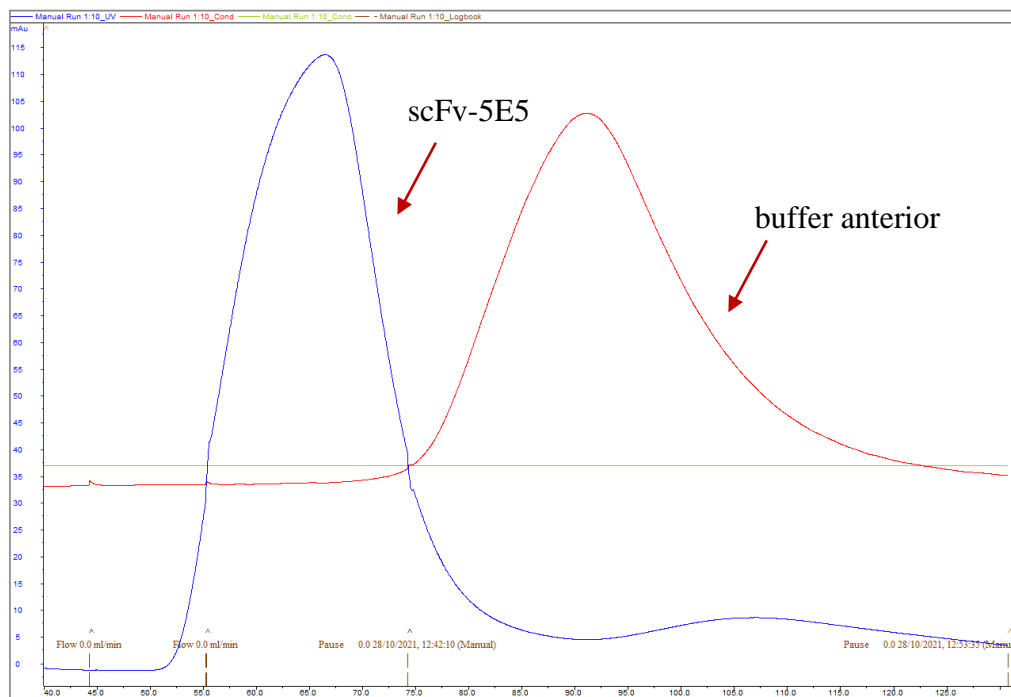


Figura 18. Cromatograma del intercambio de buffer de scFv-5E5. La curva azul representa la absorbancia y la curva roja la conductividad. El primer pico de absorbancia corresponde a nuestra proteína eluida en el buffer en el que está equilibrada la columna y el pico de conductividad (junto al menor pico de absorbancia causado por el imidazol) corresponde al buffer anterior saliendo de la columna.

2.3.4.6. CONCENTRACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA.

Una vez que la proteína se encontraba en el buffer deseado se concentró mediante ultrafiltración utilizando concentradores Centricon con un tamaño de poro de 10 kDa (Amicon Ultra-15 centrifugal Filter, Merck Millipore). Finalmente, se cuantificó la proteína (utilizando el espectrofotómetro y fluorímetro DeNovix DS-11FX) midiendo la absorbancia a 280 nm y usando su coeficiente de extinción teórico obtenido en PROTPARAM a partir de la secuencia de la proteína ($\epsilon_{280 \text{ nm}}(\text{scFv-5E5}) = 43890 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) y, en caso de no utilizarse en los siguientes días, se congeló mediante nitrógeno líquido y se almacenó en un congelador a $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

Los mutantes de scFv-5E5 se expresaron y purificaron usando el mismo protocolo.

2.3.5. TÉCNICAS BIOFÍSICAS PARA ESTUDIOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA LIGANDO.

2.3.5.1. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS TERMODINÁMICOS DE LA UNIÓN ENTRE SCFV-5E5 Y SUS LIGANDOS MEDIANTE CALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA (ITC).

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC) es una técnica que permite estudiar la interacción entre dos moléculas a través del calor absorbido o emitido en una serie de inyecciones secuenciales de una de estas moléculas que se encuentra en la jeringa (normalmente el ligando) sobre el otro compuesto que se encuentra en la celda (normalmente la proteína). Si hay interacción entre ambas se producen pequeños cambios de temperatura que son registrados por el aparato y comparados con una celda de referencia que contiene agua a la misma temperatura que la celda de muestra (ambas celdas se encuentran en una cámara adiabática para evitar cambios de temperatura producidos por el exterior). La diferencia de calor medido es directamente proporcional a la cantidad de interacción entre ambas moléculas (Figura 19).

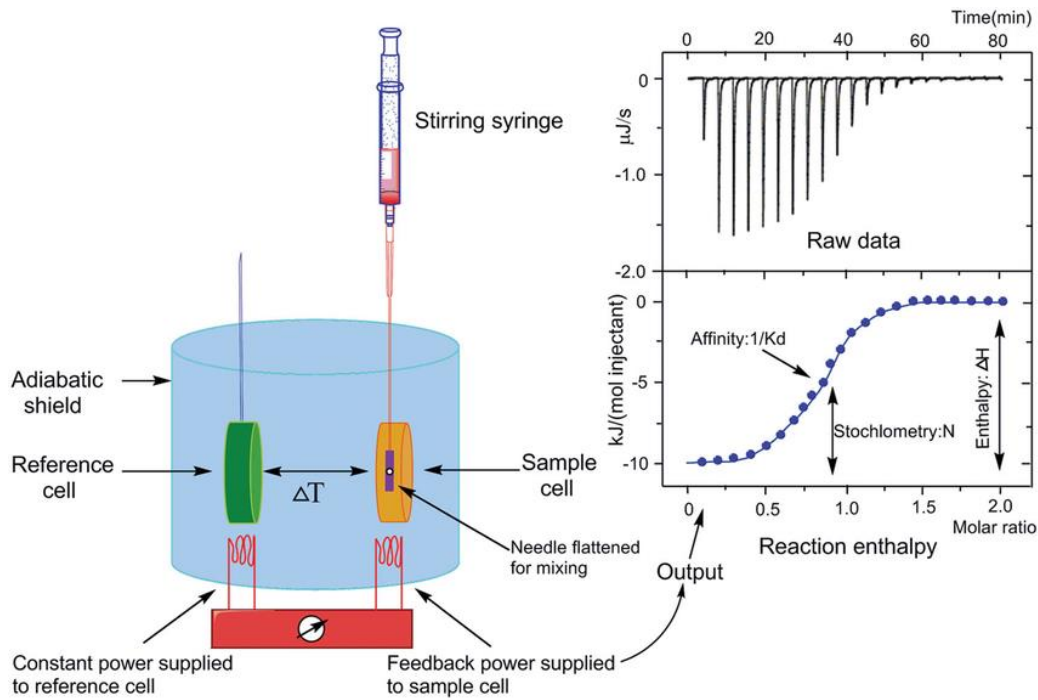


Figura 19. Esquema del funcionamiento del ITC. La jeringa inyecta el ligando en la celda con la proteína, si hay cambios de calor se registran y se comparan con la celda de referencia y esto nos permite obtener información sobre la interacción entre ambos. (Song et al., 2015)

El ITC presenta varias ventajas frente a otras técnicas similares ya que con un solo experimento permite determinar todos los parámetros de unión: constante de unión (K_D), estequiometría de la reacción (n), entalpía (ΔH) y entropía (ΔS), además de no necesitar ningún tipo de marcaje o preparación previa de las muestras (más allá de que ambas moléculas se encuentren en el mismo buffer para evitar alteraciones producidas por calor de dilución al usar buffers distintos). La principal desventaja de esta técnica es que requiere de más volumen y cantidad de proteína que otras técnicas similares como la termoforesis.

Utilizamos ITC para caracterizar la interacción de scFv-5E5 y sus mutantes con los diferentes glicopéptidos. Todos los experimentos fueron llevados a cabo con el equipo Auto-iTC200 (Microcal, Cytiva) con un programa de 19 inyecciones con 150 segundos de reposo entre inyecciones y 2 μL por inyección a una temperatura constante de 25°C.

ScFv-5E5 y sus mutantes se prepararon a una concentración de entre 20-30 μM y los glicopéptidos a una concentración desde 300 μM hasta 2 mM en buffer 25 mM TRIS pH 7.5 150 mM NaCl. Los experimentos fueron realizados en duplicado y las muestras fueron desgasificadas previamente. La integración de datos, su corrección y análisis se realizaron en Origin 7 (Microcal). Los datos fueron ajustados a un modelo de equilibrio de un sitio de unión.

2.3.5.2. CARACTERIZACIÓN DE LA UNIÓN ENTRE ANTICUERPO Y ANTÍGENO MEDIANTE TERMOFORESIS DE MICROESCALA.

La termoforesis a microescala (MST) es una técnica que permite el análisis biofísico de las interacciones entre biomoléculas. MST se basa en la detección de un cambio inducido por la temperatura en la fluorescencia de una proteína marcada en función de la concentración de un ligando no fluorescente. El cambio observado en la fluorescencia se basa en dos efectos distintos: en primer lugar, en un cambio de intensidad relacionado con la temperatura (TRIC) de la sonda fluorescente, que puede verse afectado por eventos de unión. Por otro lado, se basa en la termoforesis, el movimiento dirigido de partículas en un gradiente de temperatura microscópico, que también se vería afectado en caso de interacción con otra molécula. Cualquier cambio del microambiente químico de la sonda fluorescente, así como los cambios en la capa de hidratación de las biomoléculas, dan como resultado un cambio relativo de la fluorescencia detectada cuando se aplica un gradiente de temperatura y se puede utilizar para determinar las afinidades de unión (Figura 20).

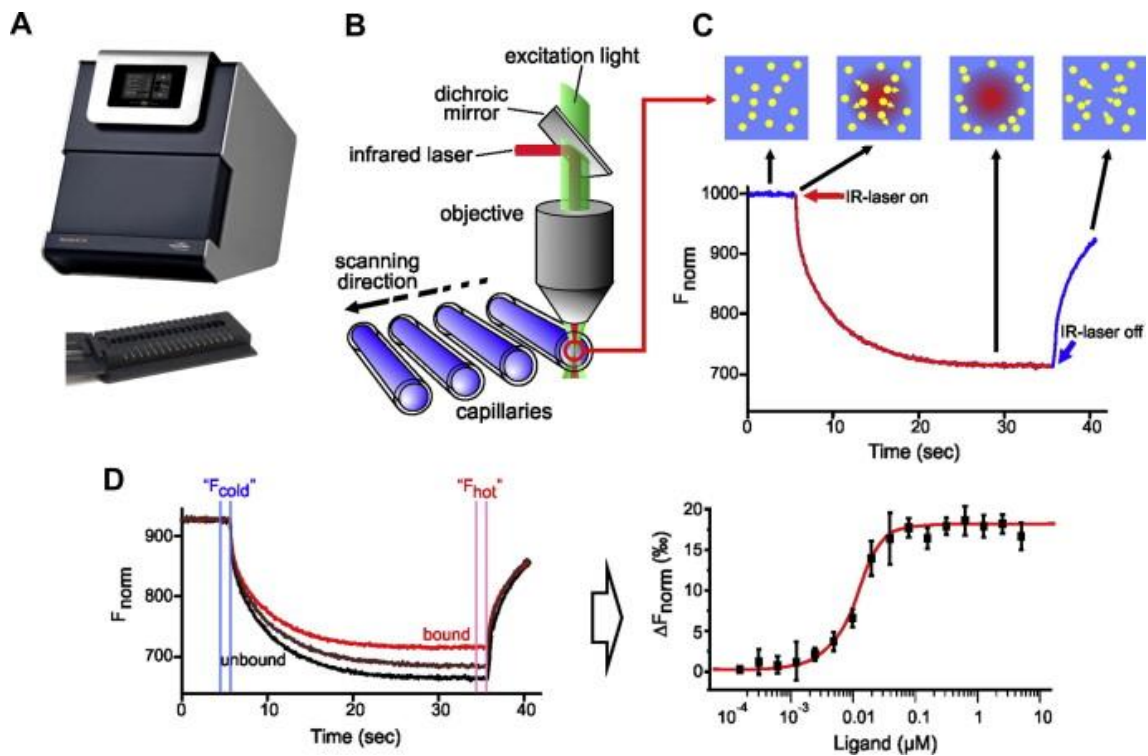


Figura 20. Configuración y experimentos de MST. (A) Equipo Monolith NT.115 (NanoTemper Technologies). (B) Representación esquemática de la medida de MST. La fluorescencia dentro del capilar se excita y detecta a través del mismo objetivo. Se utiliza un láser IR enfocado para calentar localmente un volumen de muestra definido. La termoforesis de moléculas fluorescentes se detecta a través del gradiente de temperatura. (C) Señal típica de un experimento MST. Inicialmente, las moléculas se distribuyen homogéneamente y se detecta una "fluorescencia inicial" constante. Dentro del primer segundo después de la activación del láser IR, se observa el "T-Jump", que corresponde a un cambio rápido en las propiedades del fluoróforo debido al cambio rápido de temperatura. Posteriormente, se puede detectar el movimiento termoforético de las moléculas marcadas con fluorescencia fuera del volumen de muestra calentado. Normalmente, el cambio de fluorescencia se mide durante 30 s. Después de la desactivación del láser infrarrojo, se produce un salto en T inverso, seguido de la "retrodifusión" de moléculas, que es impulsada únicamente por la difusión de masa. (D) Experimento de unión típico. El movimiento termoforético de una molécula fluorescente (trazo negro; "no unido") cambia al unirse a un ligando no fluorescente (trazo rojo; "unido"), lo que da como resultado diferentes rastros. Para el análisis, el cambio en la termoforesis se expresa como el cambio en la fluorescencia normalizada (ΔF_{norm}), que se define como F_{hot}/F_{cold} (los valores F corresponden a los valores promedio de fluorescencia entre las áreas definidas marcadas por los cursores rojo y azul, respectivamente). La titulación del ligando no fluorescente da como resultado un cambio gradual en la termoforesis, que se representa como ΔF_{norm} para generar una curva de unión, que se puede ajustar para derivar las constantes de unión. (Jerabek-Willemsen et al., 2014)

Realizamos ensayos de unión de scFv-5E5 y del anticuerpo completo 5E5 con el péptido MUC1-Tn16 mediante MST usando el equipo Monolith NT.115 Pico (NanoTemper Technologies). Optamos por realizar un ensayo de MST del anticuerpo completo 5E5 en

lugar de un experimento de ITC porque requiere menos muestra debido a la poca disponibilidad del anticuerpo. El ensayo con scFv-5E5 se realizó para usarlo de referencia y compararlo con los resultados obtenidos por el anticuerpo completo.

Como paso previo, las proteínas se marcaron con el éster N-hidroxisuccinimida (NHS) que reacciona de manera eficiente con las aminas primarias de proteínas para formar conjugados colorante-proteína altamente estables (Monolith NTTM Protein Labeling kit RED-NHS 2^a generación, NanoTemper Technologies). Para el etiquetado de proteínas, la concentración de proteínas se ajustó a 20 μ M utilizando el tampón de etiquetado (provisto por el kit). El fluoróforo se disolvió en DMSO al 100% y se preparó una disolución del fluoróforo a tres veces la concentración de la proteína utilizando el tampón de marcaje. Se añadió la disolución de fluoróforo a la proteína y se dejó incubar 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Tras ello se eliminó el fluoróforo no unido mediante columnas de desalinización por rotación (columnas de desalinización por rotación ZebaTM, ThermoFisher). Los experimentos se realizaron en tampón de unión (HEPES 50 mM pH 7,5, 50 mM NaCl) utilizando una concentración constante de las dos proteínas (5 nM) y diluciones seriadas del ligando abarcando desde 10 mM hasta 150 nM de los glicopéptidos. Se realizaron mediciones duplicadas en capilares Premium a 25°C utilizando un 40% de potencia láser y un 20% de potencia LED para obtener resultados óptimos. La constante de disociación (K_D) se calculó usando análisis de afinidad MO.

2.3.6. APLICACIÓN DE CRISTALOGRAFÍA DE RAYOS X PARA LA OBTENCIÓN DE LA ESTRUCTURA DEL COMPLEJO SCFV-5E5/GLICOPÉPTIDO 1.

2.3.6.1. FORMACIÓN DE CRISTALES DEL COMPLEJO.

La cristalización es una herramienta clave para el estudio de la estructura y función de las proteínas. Los cristales de proteína aparecen cuando las moléculas son capaces de formar una matriz tridimensional ordenada de repeticiones de la celdilla unidad que se mantiene mediante diferentes interacciones proteína-proteína (puentes de hidrógeno, interacciones iónicas e hidrofóbicas). La celdilla unidad se puede describir como la unidad más pequeña que conserva la simetría de la estructura del cristal. La geometría de la celdilla unidad se define como un paralelepípedo, proporcionando seis parámetros de red tomados como las longitudes de los bordes de la celda (a , b , c) y los ángulos entre ellos (α , β , γ). Los índices de Miller son un conjunto de tres números (h , k , l) que se utilizan para definir una familia de planos especificando sus pendientes (Figura 21).

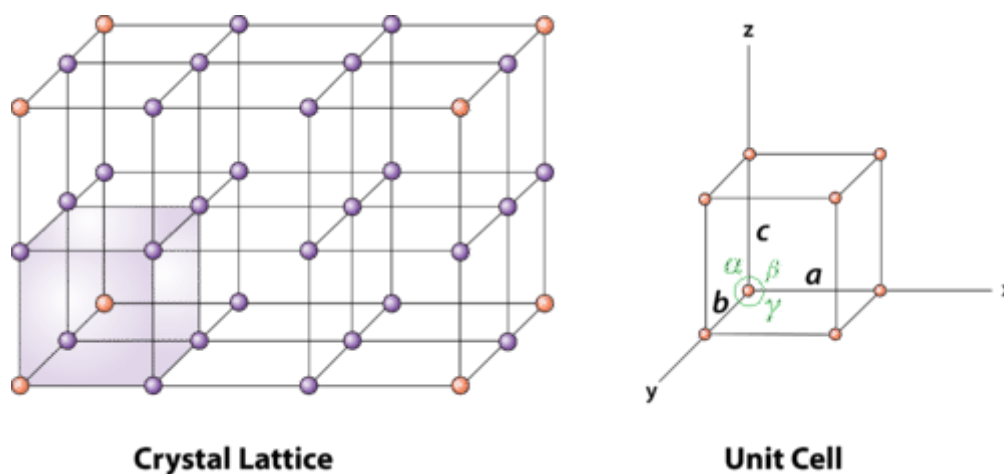


Figura 21. Representación de una red cristalina y una celdilla unidad. (Auyeung, n.d.)

Para formar estos cristales la proteína se disuelve en un medio acuoso y se combina con una condición de cristalización hasta que alcanza un estado sobresaturado. Cada proteína tiene unas propiedades distintas y por lo tanto las características de la condición de cristalización necesarias para obtener cristales variarán dependiendo de la proteína que intentemos cristalizar, por lo que es habitual probar un gran número de condiciones de cristalización (cribados) en un intento de encontrar aquellas en las que se forman los cristales.

La cristalización se puede entender como un fenómeno de cambio de fase en la que nos encontramos cuatro zonas distintas (Figura 22): una zona supersaturada donde la proteína se encuentra precipitada, una zona de saturación moderada donde ocurre la nucleación espontánea, una zona de menor saturación en la que no ocurre nucleación, pero los cristales son estables y pueden crecer y una zona de baja saturación donde la proteína está completamente soluble y no formará cristales. Nuestro objetivo es, ajustando tanto la concentración de proteína como las condiciones de la solución de cristalización, encontrar unas condiciones en las que la proteína entre en una zona de nucleación que favorezca la formación de cristales. Una vez que se ha producido la nucleación el crecimiento de los cristales ocurre espontáneamente (Chayen & Saridakis, 2008).

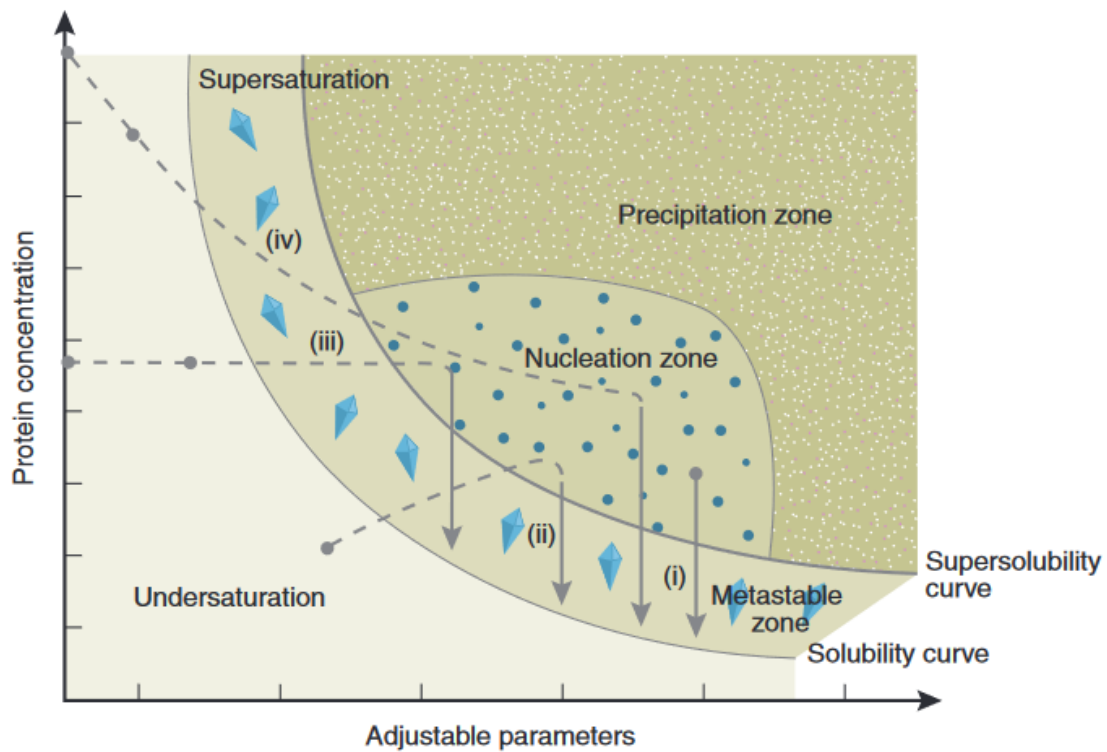


Figura 22. Representación de un diagrama de fases de cristalización de proteínas. Los parámetros ajustables incluyen concentración del precipitante y el aditivo, pH y temperatura. Las flechas indican las rutas que siguen los diferentes métodos de cristalización: (i) microlotes, (ii) difusión de vapor, (iii) diálisis y (iv) FID. (Chayen & Saridakis, 2008)

Para obtener estos cristales podemos utilizar diferentes técnicas: experimentos de microlotes (en la que la solución de proteína y la solución precipitante se combinan bajo una capa de aceite de parafina de baja densidad), diálisis (la solución de proteína está separada de la solución precipitante por una membrana semipermeable que permite se mezclen lentamente), difusión de interfaz libre (FID) (la solución de proteína y precipitante están yuxtapuestos, de forma que se produce una difusión entra las soluciones formando un gradiente de concentración que cambia con el tiempo y el sistema selecciona la condición óptima) y difusión de vapor, que es el método de cristalización más utilizado y el que hemos usado nosotros para los experimentos de esta tesis.

En la cristalización por difusión de vapor se combinan la solución de proteína con la solución precipitante en una gota y se sellan dejando un canal de comunicación con un reservorio de mayor tamaño que contiene la solución precipitante, permitiendo que con el tiempo se forme un equilibrio entre ambos, aumentando la concentración de agente precipitante y proteína en la gota (Figura 23). Esta técnica se puede realizar de dos formas distintas, mediante gota sentada (con la gota depositada en un pocillo separado pero conectado al reservorio) o gota colgante (con la gota depositada en un cubreobjetos que queda suspendido sobre el reservorio). Una vez preparada la placa se conserva a una temperatura estable (en nuestro caso 18°C) en un entorno que ofrezca protección frente a vibraciones.

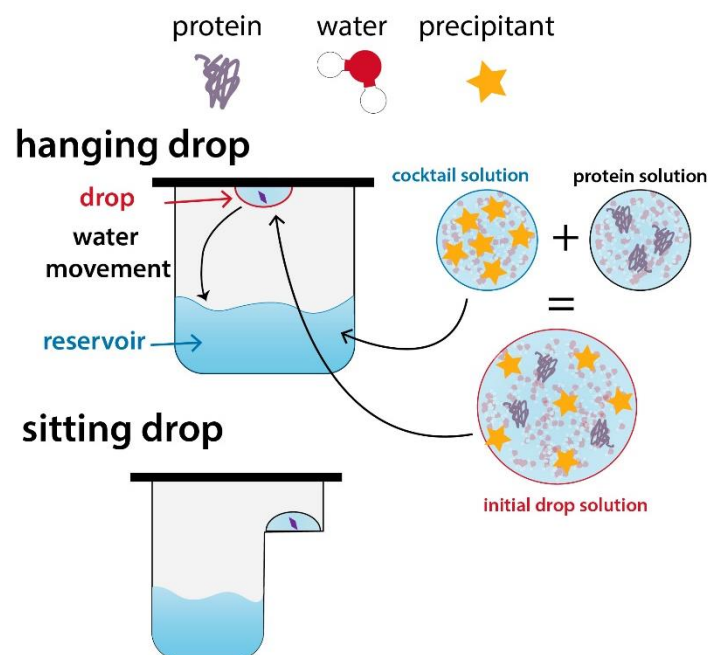


Figura 23. Representación del funcionamiento de la cristalización por difusión de vapor, tanto en gota colgante (arriba) como gota sentada (abajo). (Bibel, n.d.)

Aunque obtengamos cristales de proteína es posible que no sean de la suficiente calidad como para difractarlos y obtener información útil sobre su estructura. En esta situación se pueden seguir varias estrategias para intentar conseguir mejores cristales. Podemos

hacer un nuevo cribado con condiciones similares (cambios en el pH, cambios en la concentración de precipitante, etc.) a la solución de cristalización en la que han aparecido los cristales para ver si en alguna de estas nuevas condiciones aparecen mejores cristales. Si han aparecido cristales pero son muy pequeños podemos sembrar cristales, es decir, pasarlos a una nueva gota idéntica a la gota de la que proviene el cristal pero con menos precipitante con el objetivo de que sirva como núcleo de cristalización y que la proteína presente en esta gota se una al cristal que hemos puesto y de esta forma crezca. También podemos utilizar construcciones modificadas de nuestra proteína (por ejemplo, eliminando zonas muy móviles que dificulten la cristalización) o bien utilizar ortólogos que podrían cristalizar mejor.

Una vez que tenemos cristales se recogen utilizando crioloops (Hampton®), hebras sintéticas superenrolladas formando una hélice que permiten manipular el cristal y que no interfieren en la difracción, se ultracongelan con nitrógeno líquido (utilizando un crioprotector para evitar dañar el cristal y que se formen cristales de hielo internos que puedan afectar al patrón de difracción) y se conservan en nitrógeno líquido hasta el momento de la difracción.

Para obtener los cristales de scFv-5E5 hemos realizado ensayos de gota sentada usando placas de 96 pocillos (Axygem™ 96 well) y los siguientes cribados comerciales de 96 condiciones: JCSG HTS, Classic I, Basic, PEG-SALT (Jena Bioscience), AmSO4 suite (QUIAGEN), Proplex, Midas y Morpheus I (Molecular Dimensions). En cada pocillo se colocó una gota consistente en 0.4 µl de la solución del complejo (6.7 mg/ml scFv-5E5 y 5 mM glicopéptido 1 en buffer 25 mM TRIS pH 7.5 50 mM NaCl) con un volumen igual de la solución del cribado. En el reservorio de cada pocillo se colocaron 60 µl de la solución del cribado. Se obtuvieron cristales en el pocillo correspondiente a la condición

H4 del cribado MIDAS (0.2 M de cloruro de amonio, 0.1 M HEPES pH 7.5, 25% (v/v) glicerol etoxilato). En el momento de la preparación para la difracción los cristales fueron crioprotectados con solución del reservorio con 20% glicerol (v/v) y ultracongelados con nitrógeno líquido.

2.3.6.2. DIFRACCIÓN DE RAYOS X.

Una vez que tenemos los cristales de proteína realizamos la difracción para obtener información acerca de su estructura. Estos datos se obtienen incidiendo el cristal de proteína con un haz de rayos X con una longitud de onda similar al espacio entre los átomos del cristal ($\sim 1\text{\AA}$) mientras el cristal va cambiando su orientación. Cada exposición a la radiación de los rayos X genera un patrón de difracción y cada punto en el patrón de difracción corresponde con un haz de rayos X difractado proveniente de los electrones del cristal, que son detectados por un detector de rayos X (Figura 24). La cristalografía de rayos X es el método más utilizado para la determinación de estructuras cristalinas de proteínas, suponiendo alrededor del 90% de las entradas de estructuras de proteínas en la base de datos PDB (Gawas et al., 2019).

Durante este proceso el cristal está situado bajo una corriente de nitrógeno para mantenerlo a una baja temperatura, ayudándolo a resistir mejor los rayos X. Los datos de los cristales resueltos en esta tesis doctoral se han tomado en el sincrotrón ALBA, en Barcelona y en el sincrotrón Diamond Light Source (DLS), en Oxford.

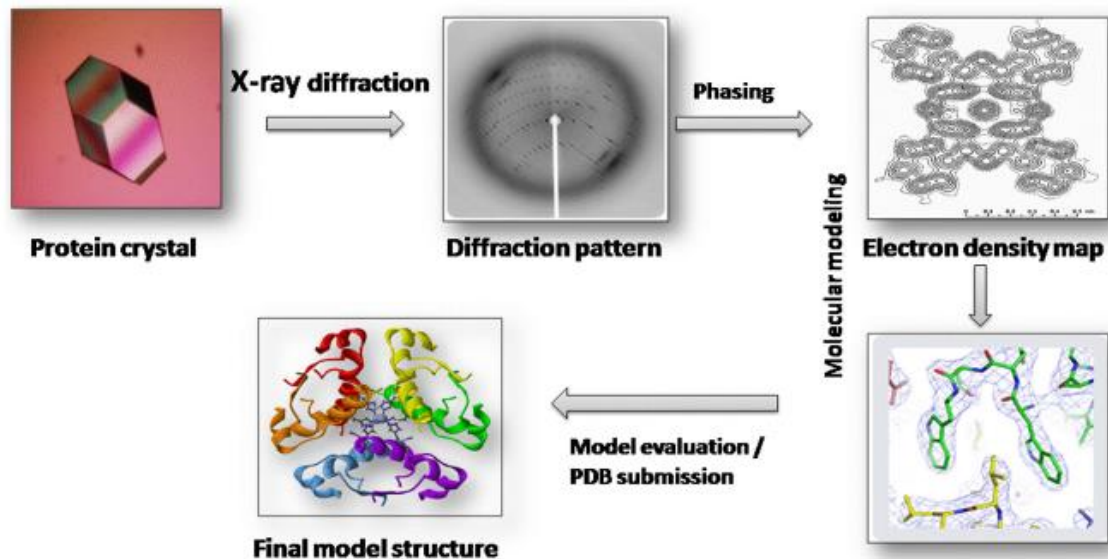


Figura 24. Diagrama del flujo de trabajo para la determinación de la estructura de una proteína mediante cristalografía de rayos X. (Gawas et al., 2019)

A partir de estos patrones de difracción podemos reconstruir la estructura de la proteína, empezando por un mapa de densidad electrónica de la proteína. Este mapa se puede obtener mediante la transformada de Fourier (Figura 25):

$$p(xyz) = \frac{1}{V} \sum_{-\infty}^{+\infty} |F(hkl)| \cdot e^{-2\pi i[hx+ky+lz-\phi(hkl)]}$$

Figura 25. Transformada de Fourier.

Esta ecuación nos permite obtener la medida de los factores de estructura hkl, sin embargo, la información de la fase no se puede determinar mediante este experimento y requiere del uso de métodos experimentales o de cálculo. Este problema se puede resolver mediante tres métodos: difracción anómala de múltiples longitudes de onda (MAD), reemplazo isomorfo múltiple (MIR) y reemplazamiento molecular (MR). El reemplazamiento molecular consiste en utilizar estructuras similares a nuestra proteína ya conocidas y utilizarla como molde para obtener unas fases calculadas que podremos

utilizar para resolver la ecuación de Fourier, obteniendo así un primer mapa de densidad electrónica.

Una vez tenemos este primer modelo estructural de la proteína se realizan varios ciclos de refinamiento (tanto manuales como automáticos) usando tanto los datos calculados obtenidos del mapa de densidad electrónica como los datos obtenidos en la difracción para obtener el modelo final.

Los datos de difracción de scFv-5E5 junto con glicopéptido 1 fueron recolectados en la línea de luz de sincrotrón I03 de Diamond Light Source (Harwell Science and Innovation Campus, Oxfordshire, Reino Unido) a una longitud de onda de 0,97 Å y una temperatura de 100 K. Los datos se procesaron y escalaron utilizando los paquetes de software XDS (Kabsch, 2010) y CCP4 (Collaborative Computational Project, 1994; Murshudov et al., 2011). La estructura cristalina se resolvió mediante reemplazo molecular con Phaser (McCoy et al., 2007) usando la estructura de un scFv con el código de PDB 5YD5 como plantilla. Las fases iniciales se mejoraron aún más con ciclos de construcción manual en Coot (Emsley & Cowtan, 2004) y refinamiento con REFMAC5 (Murshudov et al., 2011) hasta obtener la estructura final. La unidad asimétrica del cristal tiene un grupo espacial $P2_12_12_1$ y contiene seis moléculas de scFv-5E5. El diagrama de Ramachandran para el complejo scFv-5E5 con glicopéptido 1 muestra que el 86,10 %, 12,90%, 0,60% y 0,30% de los aminoácidos están en las regiones más favorecidas, permitidas, generosamente permitidas y no permitidas, respectivamente. El modelo final fue validado con PROCHECK y la estructura fue depositada en el servidor de PDBs con el código 6TNP. Los datos del refinamiento están recogidos en la Tabla 1.

Tabla 1. Recopilación de datos y estadísticas de refinamiento del complejo scFv-5E5/1. Los valores entre paréntesis se refieren a la capa de mayor resolución. Las estadísticas de los diagramas de Ramachandran se determinaron con PROCHECK.

	scFv-5E5/1
Space group	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Wavelength (Å)	0.97
Resolution (Å)	20.00-3.00 (3.16-3.00)
Cell dimensions (Å)	<i>a</i> = 86.57 <i>b</i> = 113.19 <i>c</i> = 151.20
Unique reflections	30356
Completeness	99.7 (100.0)
<i>R</i> _{pim}	0.072 (0.620)
Mn(I) half-set correlation CC(1/2)	0.993 (0.503)
<i>I</i> /σ(<i>I</i>)	7.7 (2.1)
Redundancy	6.8 (6.7)
<i>R</i> _{work} / <i>R</i> _{free}	0.202/0.250
RMSD from ideal geometry, bonds (Å)	0.010
RMSD from ideal geometry, angles (°)	1.786
< <i>B</i> > protein (Å ²)	101.33
< <i>B</i> > glycopeptide (Å ²)	106.16
< <i>B</i> > solvent (Å ²)	65.11
Ramachandran plot:	
Most favoured (%)	86.80
Allowed (%)	13.00
Generously allowed (%)	0.60
Disallowed (%)	0.50
PDB ID	6TNP

2.3.7. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DE DIFERENCIA DE TRANSFERENCIA DE SATURACIÓN (STD-NMR).

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear de diferencia de transferencia de saturación (STD-NMR) es un método que nos permite estudiar las interacciones proteína-ligando en solución a nivel atómico. STD-NMR se basa en el efecto Overhauser nuclear (NOE), que consiste en la transferencia de la polarización de espín nuclear de una población de espines a otra cercana, y en la observación de las señales de resonancia del ligando, ya que si hay un ligando se produce un intercambio entre el estado de unión y el de no unión. En un experimento de STD-NMR se realiza un espectro en el que la proteína está selectivamente saturada (espectro *on-resonance*), irradiando una región del espectro que solo contiene resonancias de la proteína, con intensidades de señal I_{SAT} y se sustrae a otro espectro sin saturación de proteína (espectro *off-resonance*), con intensidad de señal I_0 . La diferencia entre los espectros ($I_{STD} = I_0 - I_{SAT}$) correspondería solo a las señales del ligando que ha recibido transferencia de saturación de la proteína (debido al efecto Overhauser). Si no hubiese interacción entre la proteína y el compuesto I_0 y I_{SAT} serían iguales. Para una molécula que se une al receptor, solo las señales de los hidrógenos que estén en estrecho contacto con la proteína (menor a 5 Å) y reciban transferencia de magnetización aparecerán en el espectro de diferencia y de esos los que están más cerca de la proteína tendrán señales más intensas, debido a una transferencia de saturación más eficiente. (Figura 26) (Viegas et al., 2011)

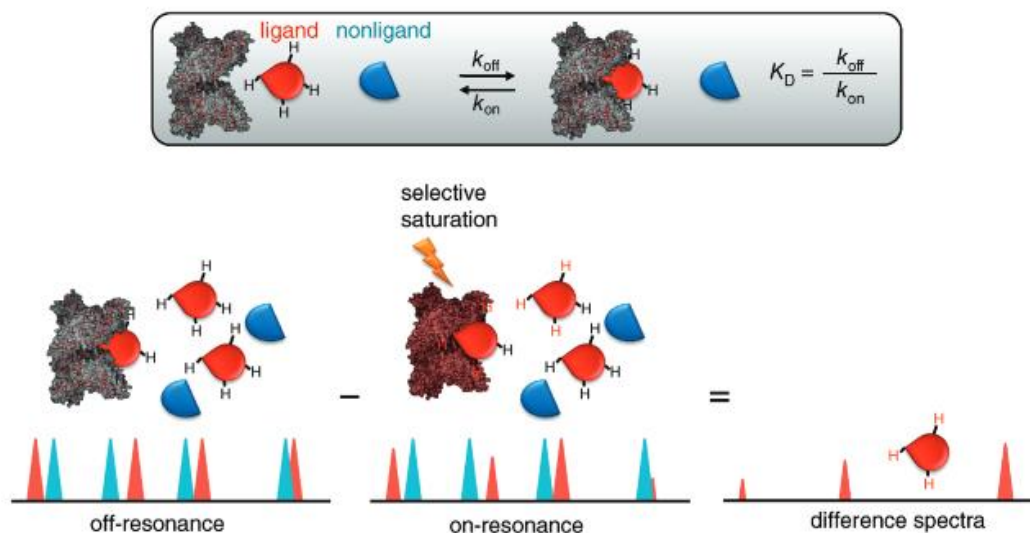


Figura 26. Esquema del experimento STD-NMR. El intercambio entre el ligando libre y el unido permite la transferencia intermolecular de magnetización desde la proteína al ligando. (Viegas et al., 2011)

Los experimentos se registraron en un espectrómetro Bruker (Avance) de 600 MHz equipado con una criosonda de triple canal (secuencia de pulsos de Bruker: stddiffesgp) a 310K. Se utilizó una concentración de 830 μM para el glicopéptido 1 y 1' y 30 μM de scFv-5E5 en TRIS (D11)-DCI (Sigma-Aldrich) pD 7.5 perdeuterado 25 mM en D₂O que contenía NaCl 150 mM y azida de sodio al 0.1 %. Los espectros se adquirieron con 2112 escaneos en una matriz con datos de 64K. Se utilizó un módulo de escultura de excitación con gradientes para suprimir las señales de protones de agua. La saturación selectiva de las resonancias de proteínas (en el espectro de resonancia) se realizó irradiando a 7 ppm (residuos aromáticos) utilizando una serie de 40 pulsos de 90° en forma de Eburp2.1000 (50 ms) durante un tiempo de saturación total de 2 segundos y un retardo de relajación de 3 segundos (D1 en secuencia bruker stddiffesgp). Para el espectro de referencia (fuera de resonancia), las muestras se irradiaron a 100 ppm. Los experimentos de STD-NMR de control se realizaron con glicopéptido 1 y 1' a la misma concentración y usando la misma configuración experimental, pero en ausencia de scFv-5E5. Los espectros STD-NMR se obtuvieron restando el espectro en resonancia al espectro fuera de resonancia.

Los experimentos de STD-NMR se llevaron a cabo por el grupo de la Doctora Filipa Marcelo.

2.3.8. EXPERIMENTOS DE SCANNING DE ALANINA Y DE UNIÓN A DIFERENTES NÚCLEOS DE O-GLICOSILACIÓN.

El “*scanning*” de alanina es una técnica que nos permite determinar la contribución de un residuo específico en la función o estructura de una proteína o péptido. Estos residuos se sustituyen por residuos de alanina debido a su grupo metilo que es poco voluminoso y químicamente poco activo, pero aun así no altera mucho la estructura secundaria de la cadena peptídica. Esta técnica se puede realizar en proteínas mediante mutagénesis dirigida como es el caso de los mutantes de scFv-5E5 y en el caso de secuencias peptídicas más cortas como los glicopéptidos se pueden generar mediante síntesis química.

Para este trabajo se realizaron sustituciones por alanina en todos los aminoácidos de la secuencia peptídica repetida en los VNTR (VTSAPDTRPAPGST(Tn)APPAHG) y mediante experimentos de microarrays se evaluó la capacidad de unión del anticuerpo 5E5 a cada una de estos glicopéptidos modificados. Además, para estudiar el efecto que los diferentes aminoácidos en la posición X del epítipo T(Tn)XP podrían tener en la unión se generaron glicopéptidos modificados con los distintos aminoácidos en la posición X (VTSAPDTRPAPGST(Tn)XPPAHG) y se estudió su capacidad de unión con 5E5 mediante microarrays. Por último, se generaron glicopéptidos modificados de APGST(Tn)APPAHGVTSAPDTRP en los que en lugar del antígeno Tn unido a la primera treonina se acoplaron los diferentes núcleos o “*cores*” de O-glicosilación que se pueden encontrar en MUC1 en células sanas (C2, C3 y C4) y se estudió la interacción con 5E5 mediante microarrays.

Estos experimentos fueron realizados por el grupo del Doctor Ola Blixt.

2.3.9. SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR (MD).

Las simulaciones de dinámica molecular permiten estudiar el movimiento de las proteínas y sus cambios conformacionales a lo largo del tiempo. Las proteínas generalmente se simulan mediante una representación a nivel atómico, donde todos o la mayoría de los átomos están explícitamente presentes. Si bien el sistema de simulación más simple implicaría una sola molécula de proteína disuelta en agua, también se pueden incluir otras moléculas relevantes, como ligandos o bicapas lipídicas, siempre que todas se puedan modelar utilizando el mismo campo de fuerza (Thomas A. Collier, Thomas J. Piggot, 2020). Utilizando esta técnica también podemos simular como sería la interacción entre una proteína y su ligando utilizando datos previos como base para los experimentos.

En nuestro caso utilizamos las coordenadas de la estructura cristalina del complejo scFv5E5 y glicopéptido 1 para generar estructuras 3D putativas para los complejos del scFv-5E5 con los glicopéptidos 1, 1', 2, 3, 4 y 5. Las simulaciones se llevaron a cabo con el paquete AMBER18 implementado con los campos de fuerza ff14SB y GLYCAM06j. La estructura del complejo de scFv-5E5 con el glicopéptido 1 obtenida mediante rayos X utilizada como estructura inicial fue modificada con PyMOL para obtener el complejo deseado. El complejo fue sumergido en una caja de agua con buffer de 10 Å de moléculas de agua TIP3P. El sistema fue neutralizado añadiendo contra iones específicos (Cl⁻). Se realizó una aproximación de optimización de geometría en dos fases, la primera solo minimiza las posiciones de las moléculas del solvente y la segunda es una minimización sin restricciones de todos los átomos en la simulación. El sistema fue entonces calentado suavemente incrementando la temperatura de 0 a 300 K bajo una presión constante de 1 atm y condiciones de frontera periódicas. Se aplicaron restricciones armónicas de 30

kcal·mol⁻¹ al soluto y se utilizó el esquema de acoplamiento de temperatura de Andersen para controlar e igualar la temperatura. El paso de tiempo se mantuvo en 1 fs durante las etapas de calentamiento, lo que permitió el autoajuste de posibles faltas de homogeneidad. Los efectos electrostáticos de largo alcance se modelaron utilizando el método de malla de partículas-Ewald. Se aplicó un límite de 8 Å a las interacciones de Lennard-Jones. Cada sistema se equilibró durante 2 ns con un paso de tiempo de 2 fs a un volumen constante y una temperatura de 300 K. Luego, se corrieron las trayectorias de producción durante 0,5 μs adicionales en las mismas condiciones de simulación.

2.3.9.1. SIMULACIONES MD CON RESTRICCIONES DE TIEMPO PROMEDIO EN MUC1-TN16.

El protocolo empleado anteriormente para simulaciones MD convencionales también se usó en estos cálculos. Para la trayectoria de producción final, las distancias derivadas de ROESY se impusieron como restricción promediada en el tiempo, aplicando un promedio de r^{-6} . Las trayectorias se corrieron a 298 K, con una constante de caída de 20 ns y un paso de tiempo de 1 fs. Las constantes de fuerza rk2 y rk3 utilizadas en cada caso fueron 10 kcal·mol⁻¹·Å⁻². La duración total de la simulación fue de 200 ns. Las coordenadas se guardaron cada 1 ps, obteniendo trayectorias MD de 200000 cuadros cada una. Los rangos de distancia para las restricciones de NOE fueron 1,8-2,3, 1,8-3,0, 1,8-3,5, 1,8-4,0 Å para fuerte, medio, débil y muy débil, respectivamente, utilizando los parámetros de la Tabla 2.

Tabla 2. Interacciones de NOE en el glicopéptido MUC1-Tn16 y utilizadas como restricciones experimentales en simulaciones MD con restricciones promediadas en el tiempo (MD-tar)

#	Proton A	Proton B	Intensity
1	NH-G2	H β -V3	weak
2	NH-G2	H α -H1	strong
3	H β -V3	H α -T4	medium
4	NH-V3	H α -G2	strong
5	NH-T4	H γ -V3	medium
6	NH-T4	NH-V3	medium
7	NH-T4	H β -V3	medium
8	NH-T4	H α -V3	strong
9	NH-S5	H β -T4	strong
10	NH-S5	H α -T4	strong
11	NH-S5	H γ -V3	weak
12	NH-A6	H α -S5	strong
13	NH-A6	H β -S5	strong
14	H β -A6	H δ 2-P7	medium
15	H β -A6	H α -A5	medium
16	NH-D8	H α -P7	strong
17	NH-D8	H δ 2-P7	medium
18	NH-D8	H β -A6	medium
19	NH-D8	NH-T9	strong
20	NH-T9	H α -D8	strong
21	NH-T9	NH-R10	strong
22	NH-R10	H α -D8	medium
23	NH-R10	H α -P11	weak
24	NH-R10	H α -T9	strong
25	NH-R10	H β -T9	strong
26	NH-R10	H δ 3-P11	medium
27	NH-R10	H δ 2-P11	medium
28	H δ 3-P11	H α -R10	strong
29	H α -P11	H β -A12	medium
30	NH-A12	H γ 2-P11	strong
31	NH-A12	H β -P11	strong
32	NH-A12	H δ 2-P11	medium
33	NH-A12	H δ 3-P11	weak
34	NH-A12	H α -P11	strong
35	H β -A12	H α -P11	medium
36	H β -A12	H α -G14	weak
37	H δ 2-P13	H α -A12	strong
38	NH-G14	H α -A12	weak
39	NH-G14	H β -P13	medium
40	NH-G14	H α -P13	strong
41	NH-G14	H δ 3-P13	weak
42	NH-S15	NH-G14	strong
43	NH-S15	H α -G14	strong

44	NH-S15	H β -A12	weak
45	NH-T16	H β -S15	strong
#	Proton A	Proton B	Intensity
46	NH-T16	H α -S15	strong
47	NH-T16	H3-GalNAc-	weak
48	NH-T16	H5-GalNAc-T16	weak
49	NH-T16	H1-GalNAc-	medium
50	NH-T16	NH-GalNAc-	strong
51	NH-T16	NH-A17	strong
52	NH-T16	NH-S15	strong
53	NH-GalNAc	H α -S15	weak
54	NH-GalNAc	H β -T16	very weak
55	NH-GalNAc	H2-GalNAc	strong
56	NH-GalNAc	H3-GalNAc	strong
57	NH-GalNAc	H4-GalNAc	very weak
58	NH-GalNAc	H5-GalNAc	very weak
59	NH-GalNAc	H8-GalNAc	strong
60	NH-GalNAc	H γ -T16	very weak
61	H β -A17	H δ 3-P18	medium
62	NH-A17	H β -T16	strong
63	NH-A17	H1-GalNAc	medium
64	NH-A17	H α -T16	strong
65	NH-A20	H α -P19	Strong
66	NH-A20	H β -P19	medium
67	NH-A20	H γ 3-P19	weak
68	NH-A20	H γ 2-P19	medium

Los experimentos de simulación de dinámica molecular fueron llevados a cabo por el grupo del Doctor Francisco Corzana.

2.4. RESULTADOS.

2.4.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS TERMODINÁMICOS DE LA INTERACCIÓN DE SCFV-5E5 Y LOS LIGANDOS POR ITC.

Para comprender mejor la especificidad de scFv-5E5 se realizaron ensayos de ITC con varios ligandos distintos. Se evaluó la unión de scFv-5E5 con el residuo de GalNAc metilado y el péptido 1 sin glicosilar para discernir si el anticuerpo requiere el glicopéptido completo o basta con una de las partes. También se estudió la unión con varios glicopéptidos distintos, utilizando diferentes secuencias peptídicas y diferentes azúcares unidos al péptido.

En primer lugar, observamos que el experimento de ITC de scFv-5E5 y el péptido 1 sin glicosilar no presenta capacidad de unión, mientras que el ensayo con GalNAc metilado presenta una afinidad muy débil, como ya se había descrito previamente (Figura 27) (Tarp et al., 2007).

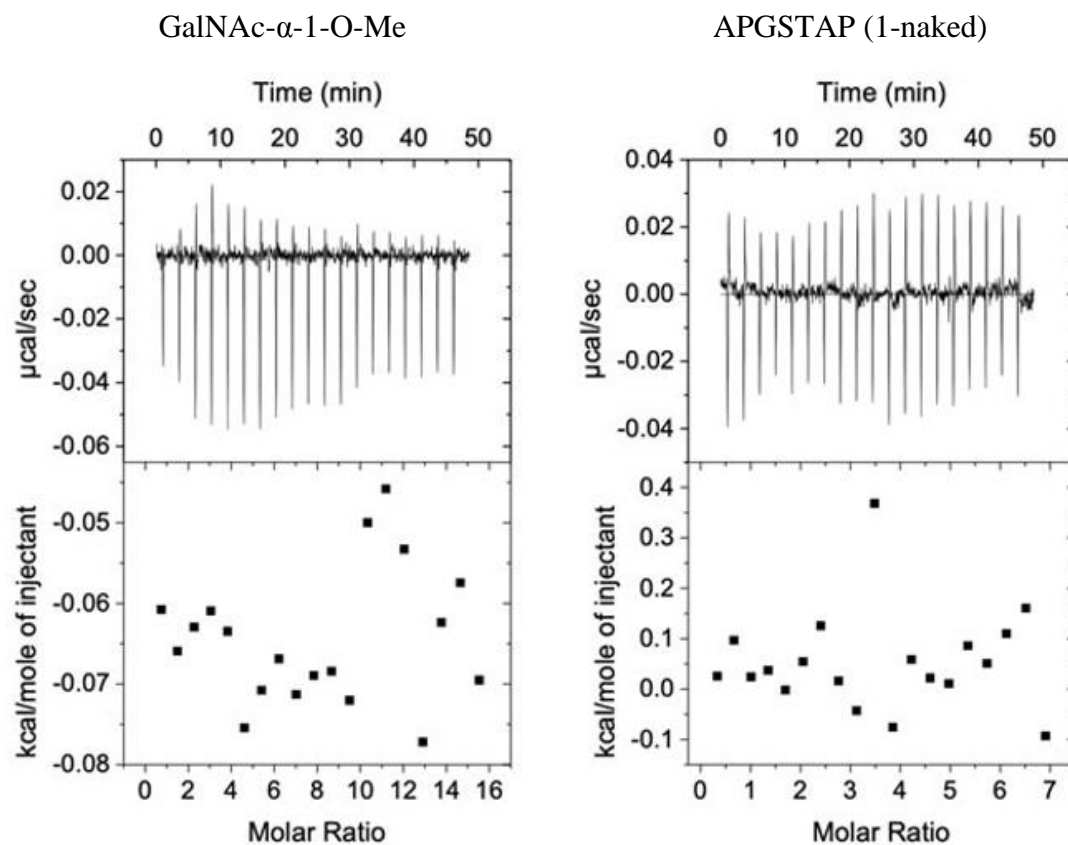


Figura 27. Perfiles de los ITCs de scFv-5E5 frente a GalNAc- α -1-O-Me y al péptido 1 naked.

Por otro lado, al realizar los ITCs de scFv-5E5 frente a los diferentes glicopéptidos sí se produjo interacción entre ambos (Figura 28), lo que sugiere que tanto la secuencia peptídica como el azúcar son necesarios para el reconocimiento de scFv-5E5.

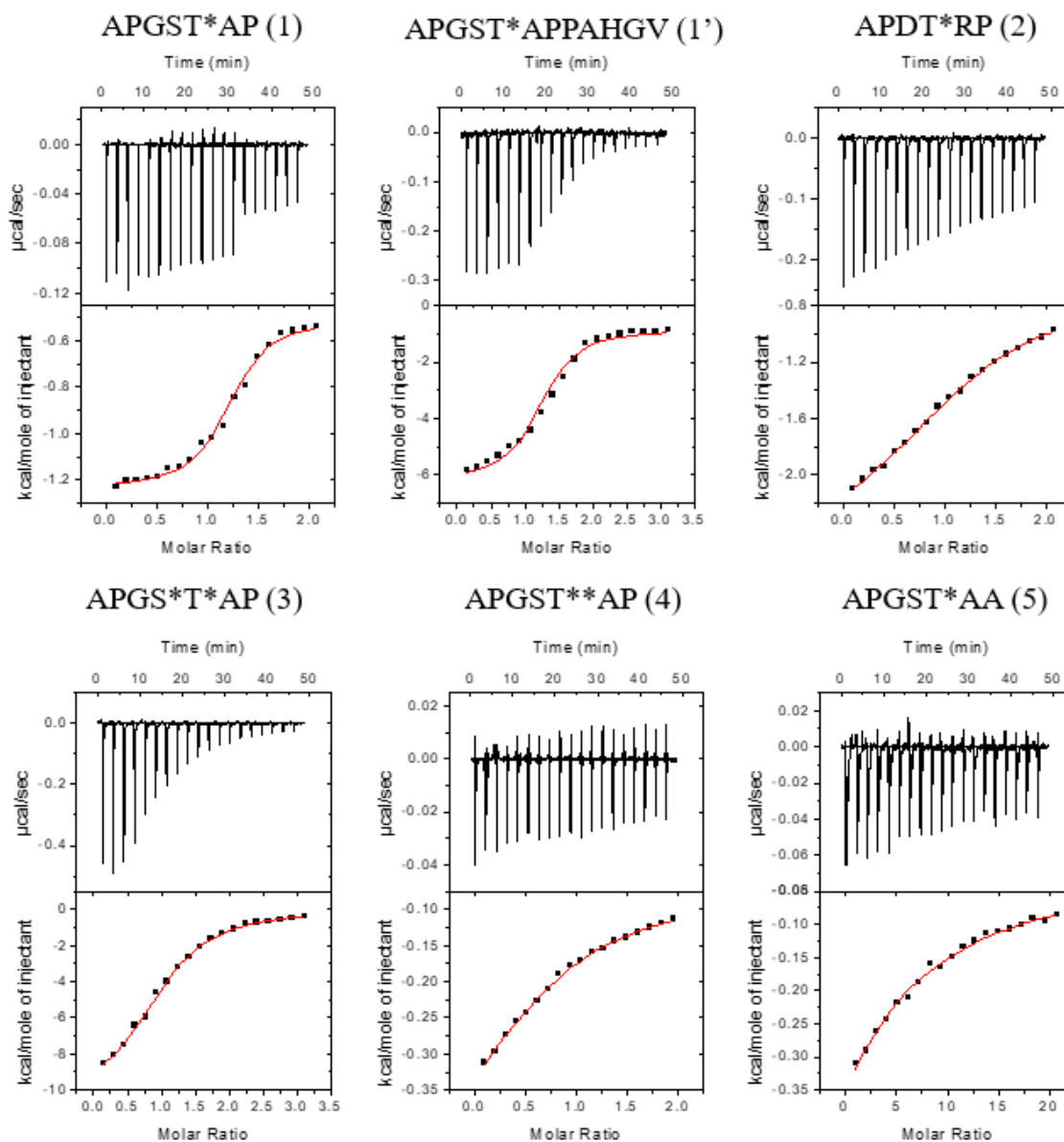


Figura 28. Perfiles de ITC de los experimentos de scFv-5E5 con los diferentes glicopéptidos.
 * = GalNAc α -1-O-Thr (antígeno Tn). ** = Neu5Ac α -(2-6)-GalNAc α -1-O-Thr (antígeno STn).

Tabla 3. Parámetros de unión termodinámicos de los ITC de scFv-5E5 con los distintos ligandos. Los parámetros de unión de scFv-5E5 con GalNAc- α -1-O-Me y el péptido 1-naked no se pudieron determinar debido a la mala unión.

Proteína	Ligando	K _D (μ M)	Δ G (cal/mol)	Δ H(cal/mol)	-T* Δ S(cal/mol)	n
scFv-5E5	GalNAc- α -1-O-Me	n.d.				
scFv-5E5	APGSTAP (1-naked)	n.d.				
scFv-5E5	APGST(Tn)AP (1)	0.96 \pm 0.2	-8205.5	-726.1 \pm 30.1	-7479.4	1.2 \pm 0.02
scFv-5E5	APGST(Tn)APPAHGV (1')	1.28 \pm 0.4	-8035.2	-5383.9 \pm 276.1	-2651.2	1.2 \pm 0.03
scFv-5E5	APDT(Tn)RP (2)	22.5 \pm 3.3	-6337.0	-1885.1 \pm 276.1	-4451.9	1.2 \pm 0.04
scFv-5E5	APGS(Tn)T(Tn)AP (3)	4.24 \pm 0.5	-7325.9	-10726 \pm 376.1	3400.0	1.0 \pm 0.02
scFv-5E5	APGST(STn)AP (4)	19.0 \pm 4.9	-6438.0	-467.4 \pm 77.7	-5970.6	0.7 \pm 0.03
scFv-5E5	APGST(Tn)AA (5)	382.0 \pm 44.7	-4660.5	-6542.5 \pm 854.3	1881.9	1.0 \pm 0.02

Además, también podemos apreciar diferencias en la unión entre los diferentes glicopéptidos (Tabla 3). Las mayores afinidades se han encontrado en los ensayos con el glicopéptido 1 y el glicopéptido 1' y comparándolos podemos ver que apenas hay diferencias, lo que en principio podría sugerir que los aminoácidos extras del glicopéptido 1' no participan en esta interacción (Figura 29). Del mismo modo el ensayo de ITC con el glicopéptido 3 parece indicar que el segundo residuo de GalNAc unido al residuo de serina tampoco afecta significativamente a la unión. Por otro lado, la presencia del antígeno STn en el glicopéptido 4 parece afectar significativamente a la unión, sugiriendo que la presencia del ácido siálico interfiere en el reconocimiento, como ya se había

observado anteriormente (Yoshimura et al., 2019). Aunque sin obtener una afinidad tan alta como el ensayo con el glicopéptido 1, los resultados del experimento con el glicopéptido 2 demuestran que scFv-5E5 es capaz de reconocer otras secuencias de los VNTR de MUC1. Sin embargo, el mayor cambio lo encontramos al realizar una sustitución por alanina del segundo residuo de prolina de la secuencia, mostrando una gran disminución en la capacidad de unión. Esto sugiere que este residuo de prolina es muy importante para el reconocimiento del sustrato por parte de scFv-5E5.

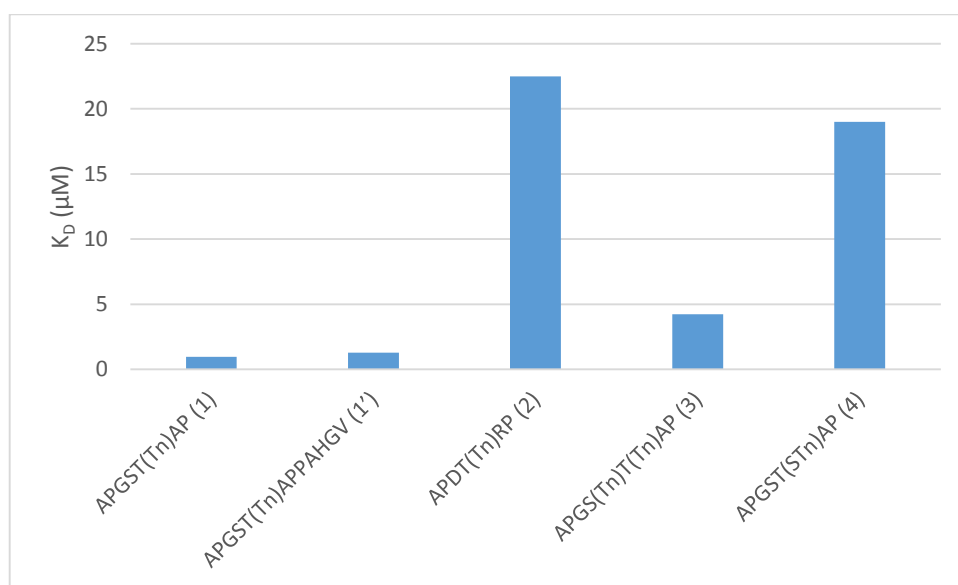


Figura 29. Gráfica resumen de los valores de K_D obtenidos para los glicopéptidos 1, 1', 2, 3 y 4.

2.4.2. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL COMPLEJO SCFV-5E5 CON EL GLICOPÉPTIDO 1.

Los experimentos de ITC nos han permitido obtener información acerca de la especificidad de sustrato de scFv-5E5, sin embargo, para estudiar con más detalle su mecanismo de acción son necesarias otras técnicas como la cristalografía de rayos X.

Para ello cristalizamos el scFv-5E5 con el glicopéptido 1. La estructura mostró una cavidad en el scFv-5E5 formada entre la cadena ligera y la pesada que reconoce el glicopéptido, principalmente mediante los bucles b3^H-b4^H, b9^H-b10^H, b8^L-b9^L y b4^H (Figura 30). El residuo de GalNAc es la parte más reconocida del glicopéptido, con la excepción del grupo OH6 todos sus grupos hidroxilos están formando puentes de hidrógeno con la proteína (Figura 31): el grupo OH3 del GalNAc interactúa con el grupo NH de la Ala33^H y el grupo OH4 con las cadenas laterales de His32^H y Ser99^H. Incluso el oxígeno endocíclico de GalNAc está formando un puente de hidrógeno con Ser99^H. El grupo carbonilo de GalNAc participa en dos puentes de hidrógeno con las cadenas laterales de His35^H y Thr100^H y el grupo metilo participa en una interacción CH/ π con His50^H. El grupo OH6 del azúcar está completamente expuesto al solvente, lo que explica por qué este anticuerpo también puede reconocer (aunque ligeramente en menor medida) glicopéptidos que contengan el antígeno STn. El enlace glicosídico adopta la típica conformación 'eclipsada', con valores ϕ/ψ de 68.1°/151.0°, respectivamente.

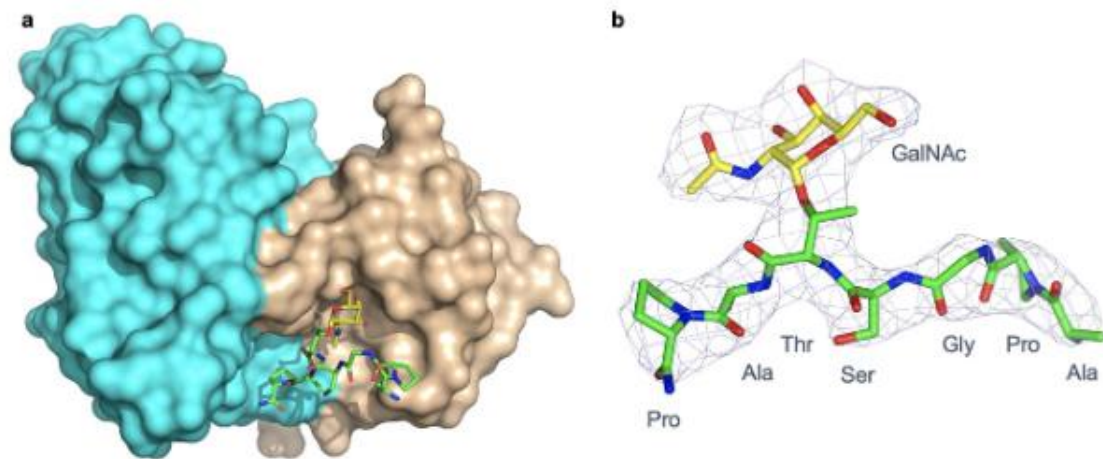


Figura 30. a) Representación superficial del complejo scFv-5E5 con el glicopéptido 1. Los aminoácidos correspondientes a la cadena ligera están coloreados en cian y los de la cadena pesada en marrón. El residuo de GalNAc se introduce en la cavidad sin estar en contacto con el solvente mientras que la mayor parte del péptido queda expuesta. **b) Mapa de densidad electrónica del glicopéptido 1.** El mapa de densidad electrónica ($F_o - F_c$) está contorneado a 2.2σ para el glicopéptido 1.

Por su parte el péptido forma un único puente de hidrógeno con la proteína, entre el grupo amida de la prolina de la región C-terminal del glicopéptido y el grupo carbonilo de Tyr98^L (Figura 31). Además, esta misma prolina establece una interacción CH/ π con la Tyr100^L. La región N-terminal del glicopéptido (APGS) está completamente expuesta al solvente y no establece ningún contacto con el anticuerpo. Este resultado contrasta con lo previamente descrito para el anticuerpo SN-101, que forma una extensa red de puentes de hidrógeno entre el anticuerpo y el péptido (Wakui et al., 2020). Esta falta de conexiones entre scFv-5E5 y el péptido podría explicar su capacidad de reconocer otras secuencias peptídicas. Notablemente, al igual que ocurre con el anticuerpo monoclonal 1SM3 (Martínez-Sáez et al., 2015), el residuo de treonina glicosilado adopta una conformación helicoidal en el estado de unión (posiblemente debido a un puente de hidrógeno intramolecular entre el grupo NH de Ala17 y el grupo hidroxilo de Ser15), favoreciendo que el glicopéptido adopte una forma complementaria al anticuerpo.

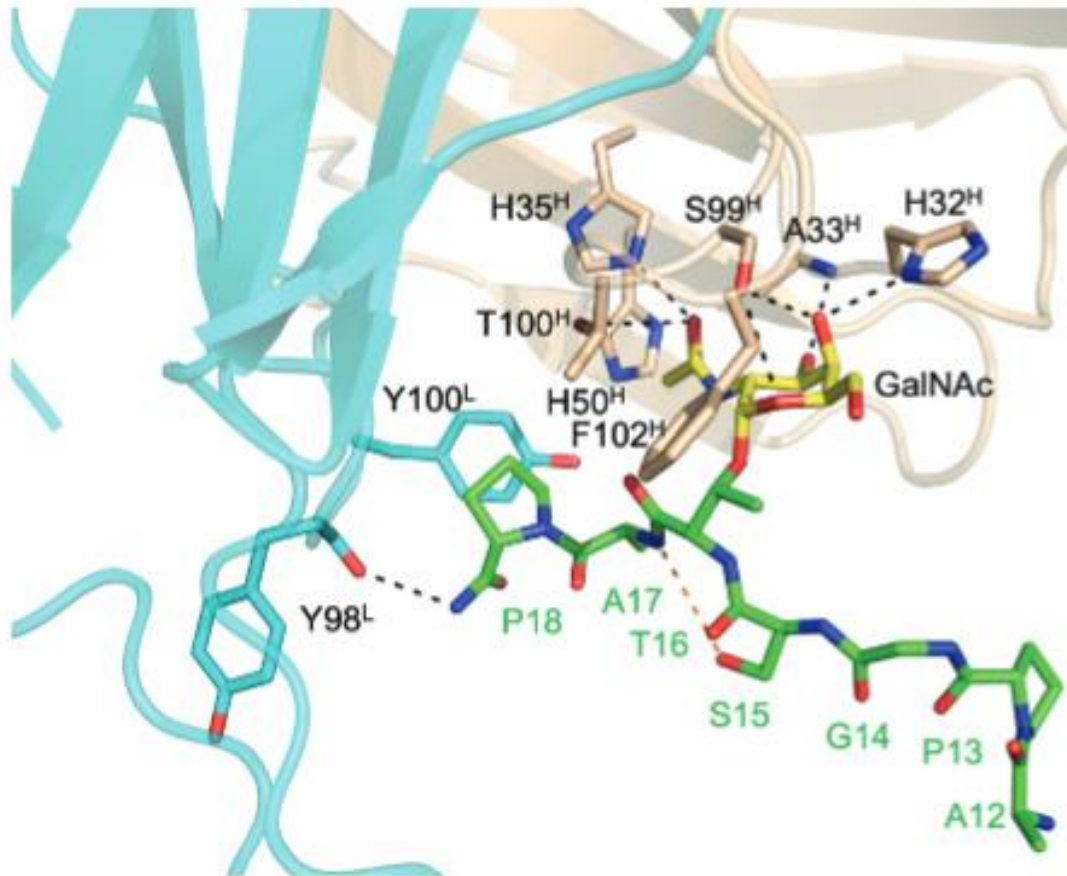


Figura 31. Representación detallada de la estructura de rayos X del complejo scFv-5E5/glicopéptido 1 mostrando los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofóbicas. La cadena ligera está coloreada en cian y la cadena pesada en naranja. Las líneas discontinuas negras indican las interacciones entre scFv-5E5 y el glicopéptido 1 y la línea discontinua naranja indica el puente de hidrógeno intramolecular entre Ala17 y Ser15.

2.4.3. EXPERIMENTOS DE STD-NMR DE SCFV-5E5 JUNTO CON LOS GLICOPÉPTIDOS 1 Y 1'.

Los resultados obtenidos del espectro de STD-NMR del glicopéptido 1 con scFv-5E5 coinciden con los resultados obtenidos mediante cristalografía de rayos X, con la mayor parte de la interacción entre anticuerpo y sustrato ocurriendo en el residuo de GalNAc. Los resultados obtenidos con el glicopéptido 1' son similares, aunque se observa una interacción débil con la Ala20 de este glicopéptido. Por desgracia no fuimos capaces de determinar el mapeado del epítipo mediante STD-NMR debido al solapamiento de señales clave (Figura 32).

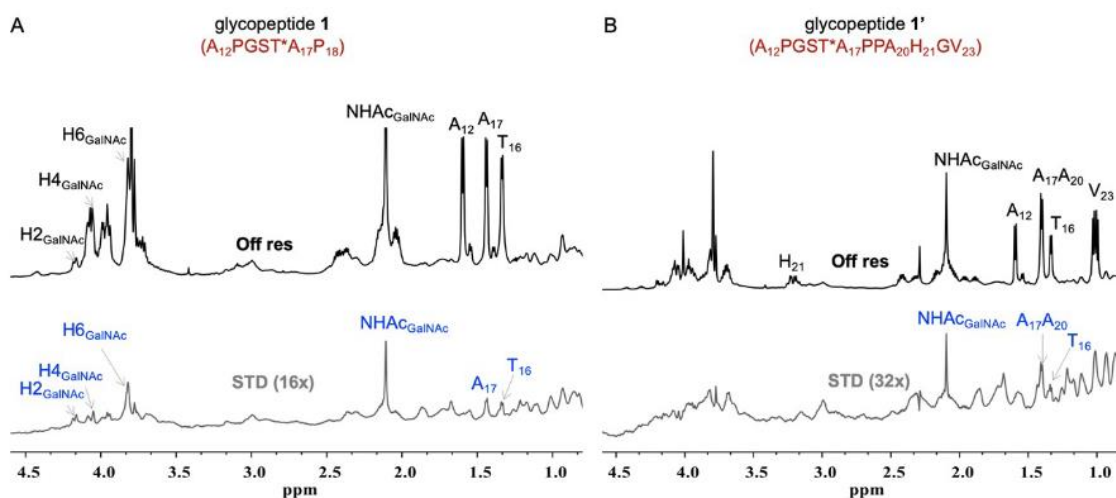


Figura 32. a) Espectro de STD-NMR del glicopéptido en presencia de scFv-5E5 30 μ M. b) Espectros de STD-NMR del glicopéptido 1' en presencia de scFv-5E5. El espectro de referencia sin resonancia (marcado como Off res) se muestra en negro, y el espectro STD-NMR (marcado como STD) está en gris oscuro. Las resonancias de protones clave están etiquetadas en los espectros STD-NMR.

2.4.4. PARÁMETROS TERMODINÁMICOS DE LA UNIÓN DE LOS MUTANTES DE SCFV-5E5 CON EL GLICOPÉPTIDO 1.

Tras caracterizar los residuos clave de scFv-5E5 para el reconocimiento del péptido mediante la cristalografía de rayos X se quiso determinar la importancia de estos residuos para la interacción. Para ello se realizaron mutantes de scFv-5E5 con sustituciones por alanina de los residuos claves H32, H35, Y100 y F102 y se realizaron ensayos de ITC en las mismas condiciones que los ensayos anteriores.

Como era de esperar, estas mutaciones produjeron un descenso severo en la capacidad de unión. El mutante H32^HA/H35^HA redujo la capacidad de unión aproximadamente ~1330 veces, el mutante Y100^LA ~790 veces y el mutante F102^HA también tuvo una disminución similar, aunque en este caso no fuimos capaces de obtener valores cuantitativos (Figura 33 y Tabla 4).

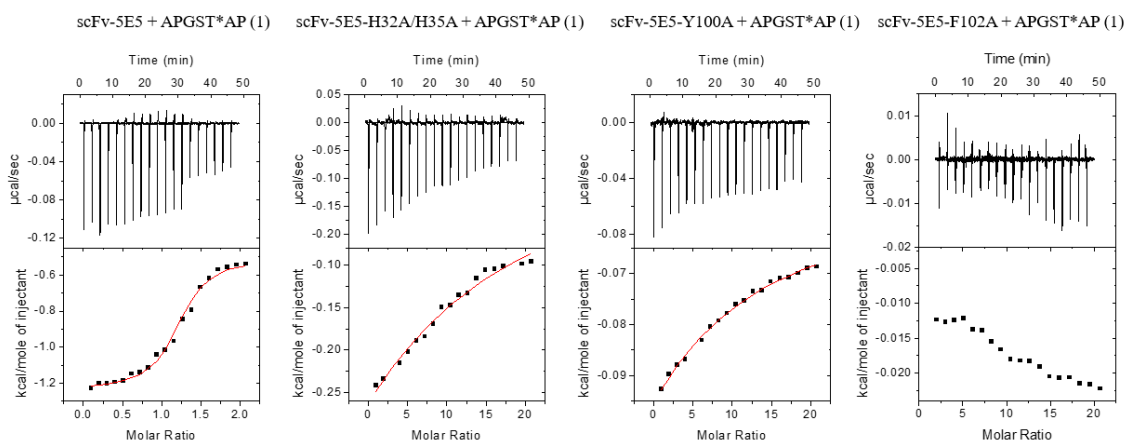


Figura 33. Perfiles de ITC de los experimentos de scFv-5E5 y sus mutantes con el glicopéptido 1.
* = GalNAc α -1-O-Thr (antígeno Tn).

Tabla 4. Parámetros de unión termodinámicos de los ITC de scFv-5E5 y sus mutantes con el glicopéptido 1. Los parámetros de unión de scFv-5E5-F102^HA con el glicopéptido 1 no se pudieron determinar debido a la mala unión.

Proteína	Ligando	K _D (μM)	ΔG (cal/mol)	ΔH(cal/mol)	-T*ΔS(cal/mol)	n
scFv-5E5	APGST(Tn)AP (1)	0.96 ± 0.2	-8205.5	-726.1 ± 30.1	-7479.4	1.2 ± 0.02
scFv-5E5- H32 ^H A/H35 ^H A	APGST(Tn)AP (1)	1275.4 ± 517.5	-3946.6	-16383.6 ± 8549.1	12436.4	1.2 ± 0.01
scFv-5E5-Y100 ^L A	APGST(Tn)AP (1)	757.6 ± 99.7	-4255.1	-1340.2 ± 220.0	-2914.8	1.2 ± 0.08
scFv-5E5-F102 ^H A	APGST(Tn)AP (1)	n.d.				

Los resultados obtenidos mediante estos experimentos de ITC respaldan los datos obtenidos mediante la cristalografía de rayos X y confirman la importancia de estos residuos para el scFv-5E5 en el reconocimiento del ligando.

2.4.5. RECONOCIMIENTO DEL ANTÍGENO MODIFICADO CON SUSTITUCIONES DE ALANINAS Y DIFERENTES NÚCLEOS DE O-GLICOSILACIÓN.

Los experimentos de ITC de scFv-5E5 con el glicopéptido 5 mostraron que la sustitución del residuo de prolina por uno de alanina afectaba considerablemente a la unión, obteniendo una K_D en torno a 400 veces peor que la obtenida con el glicopéptido 1. Por ello se realizaron una serie de experimentos de microarrays con glicopéptidos modificados cambiando los aminoácidos de parte de la secuencia de del VNTR (en la que se encuentra contenido el glicopéptido 1) por alaninas, para determinar el efecto de estos cambios en la unión. Se observó que estas sustituciones solo afectaban considerablemente a la unión con 5E5 cuando se mutaban la treonina o la prolina, lo que sumado a los resultados obtenidos mediante ITC y cristalografía apuntan a que el epítipo mínimo de scFv-5E5 es el motivo T(Tn)-X-P, lo que coincide con lo descrito previamente (Kračun et al., 2010). La sustitución de Ser10 también produjo un pequeño descenso en la capacidad de unión, posiblemente debido a la pérdida del puente de hidrógeno intramolecular descrito mediante cristalografía. También se llevó a cabo un experimento de sustitución similar, pero reemplazando el aminoácido X del motivo T(Tn)-X-P para determinar si el tipo de residuo en esa localización afectaba a la unión y se observó que, aunque hay variaciones dependiendo del aminoácido (el triptófano en esta posición parece ser que afectan negativamente a la unión, posiblemente debido a ser el más voluminoso), no hay ningún aminoácido que impida completamente el reconocimiento (Figura 34).

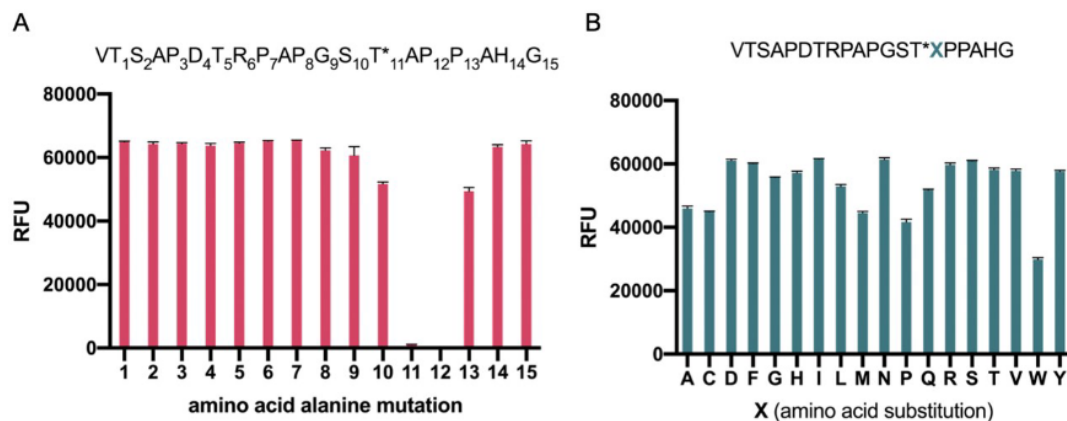


Figura 34. a) Datos de los microarrays de las sustituciones por alanina a lo largo de glicopéptido MUC1-Tn de 20 residuos. b) Datos de lo microarrays de las mutaciones T*-X-P en la región GST*AP.

Además, mediante síntesis química se produjeron glicofomas que incluían el núcleo o core-2 (C2), core-3 (C3) y core-4 (C4), que no fueron reconocidos por el anticuerpo (Figura 35). Las glicofomas C2, C3 y C4 se encuentran en MUC1 en células sanas, mientras que los glicanos truncados Tn y STn se encuentran en células tumorales, explicando la especificidad de 5E5 por este tipo de células.

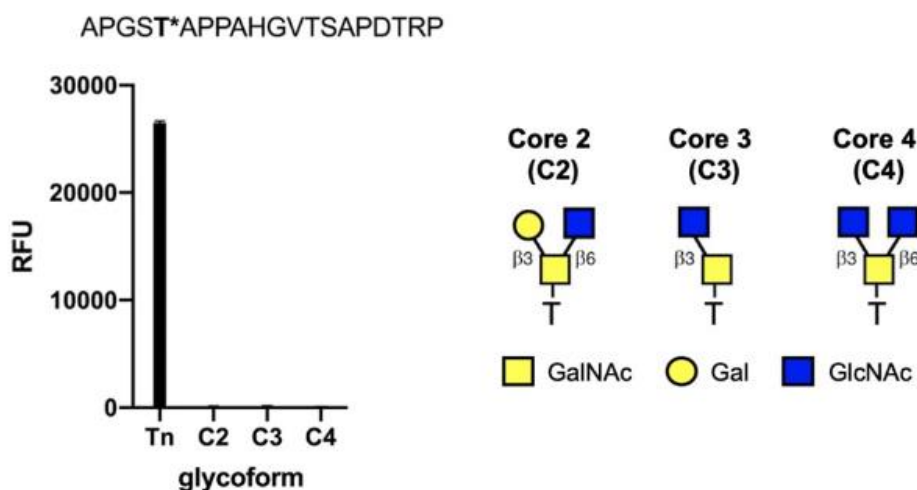


Figura 35. Datos de los microarrays para los isómeros de glicofomas adicionales C2, C3 y C4.

2.4.6. EXPERIMENTOS DE AFINIDAD DE SCFV-5E5 Y 5E5 FRENTE A SUS ANTÍGENOS MEDIANTE TERMOFORESIS.

Se han realizado múltiples experimentos para estudiar la capacidad de reconocimiento de scFv-5E5 frente a diferentes ligandos, sin embargo, aún no hemos determinado si hay diferencias entre el scFv-5E5 y el anticuerpo monoclonal 5E5 completo. Para ello realizamos experimentos de MST del scFv-5E5 y el anticuerpo completo frente al glicopéptido MUC1-Tn16, obteniendo unas K_D s de $3.42 \pm 1.37 \mu\text{M}$ y $2.59 \pm 1.17 \mu\text{M}$ respectivamente (Figura 36), resultados muy similares que indican que el scFv-5E5 mantiene la capacidad de reconocimiento del ligando del anticuerpo completo.

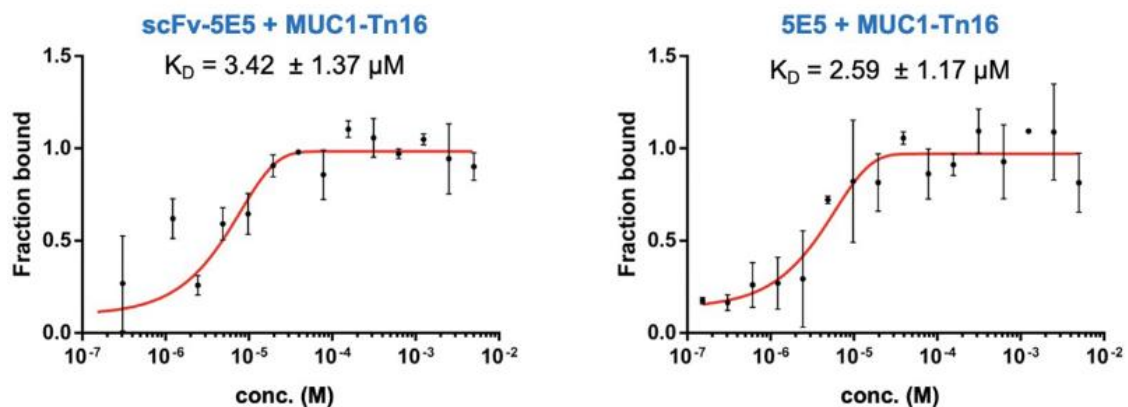


Figura 36. Curvas de unión de MST de scFv-5E5 y el anticuerpo 5E5 completo frente al glicopéptido MUC1-Tn16. El error representa la desviación estándar entre los duplicados.

2.4.7. SIMULACIONES DE DINÁMICA MOLECULAR.

Por último, realizamos simulaciones de la interacción de scFv-5E5 con algunos de los glicopéptidos utilizados en este trabajo (1, 1', 2, 3 y 4), utilizando la información obtenida de la estructura del complejo scFv-5E5 con glicopéptido 1 como punto de partida.

Para empezar, es importante señalar que los puentes de hidrógeno entre el residuo de GalNAc y el anticuerpo observados en la estructura obtenida mediante rayos X se mantuvieron en todos los complejos, lo que refuerza una vez más la importancia de estas interacciones. Con la excepción de los complejos con los glicopéptidos 2 y 3, las regiones N-terminal de los glicopéptidos se mantuvieron bastante flexibles debido a la falta de interacciones con el anticuerpo.

El complejo de scFv-5E5 con glicopéptido 1 fue estable durante toda la simulación y tanto los puentes de hidrógenos como las interacciones CH/ π coincidieron con las observadas en la estructura cristalina. Durante la simulación con el glicopéptido 1' se observaron que la Pro19 y la Ala20 (APGST(Tn)APP₁₉A₂₀HGV) participaban en interacciones CH/ π con la Tyr38^L y la Tyr98^L del anticuerpo, respectivamente (Figura 37). Sin embargo, a juzgar por las K_{DS} obtenidas en los experimentos de ITC estas interacciones extra parecen no mejorar la capacidad de unión con respecto al glicopéptido 1. Ese fenómeno podría deberse a que la secuencia peptídica más corta del glicopéptido 1 causaría una reducción en la penalización entrópica del proceso de unión, lo que compensaría las interacciones extras del glicopéptido 1', tal como está reflejado en los valores termodinámicos obtenidos en los ITCs.

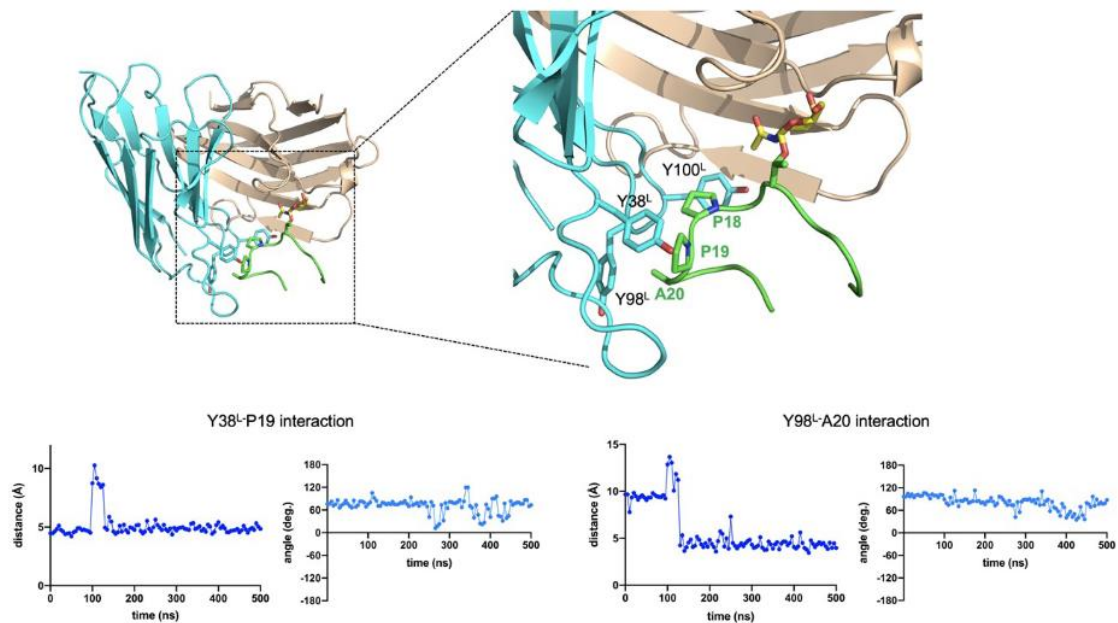


Figura 37. Imagen representativa del complejo de scFv-5E5 con el glicopéptido 1' obtenidos a partir de las simulaciones de 0.5 μ s en disolvente explícito. El anticuerpo se muestra de color cian (cadena ligera) y marrón (cadena pesada). El esqueleto peptídico del antígeno se muestra en verde y los carbonos del GalNAc en amarillo. Se muestran la distancia entre el centro de masa del sistema de electrones π de Y38^L y el centro del anillo de Pro19, la distancia entre el centro de masa del sistema de electrones π de Y98^L y el grupo metilo de Ala20, junto con el ángulo entre los planos definidos por el sistema de electrones π de Y38L y el anillo de Pro19, y el ángulo entre los planos definidos por el sistema de electrones π de Y98L y el grupo metilo de Ala20.

Por otro lado, la simulación del complejo con el glicopéptido 3 muestra que el GalNAc extra unido al residuo de serina vuelve más rígido la región N-terminal del péptido y produce una conformación helicoidal (Figura 38). La penalización de entropía asociada a la unión que se observa en los resultados de los ITCs podría compensar los contactos extras de este segundo GalNAc y el anticuerpo, lo que explica una K_D ligeramente menor (Figura 40).

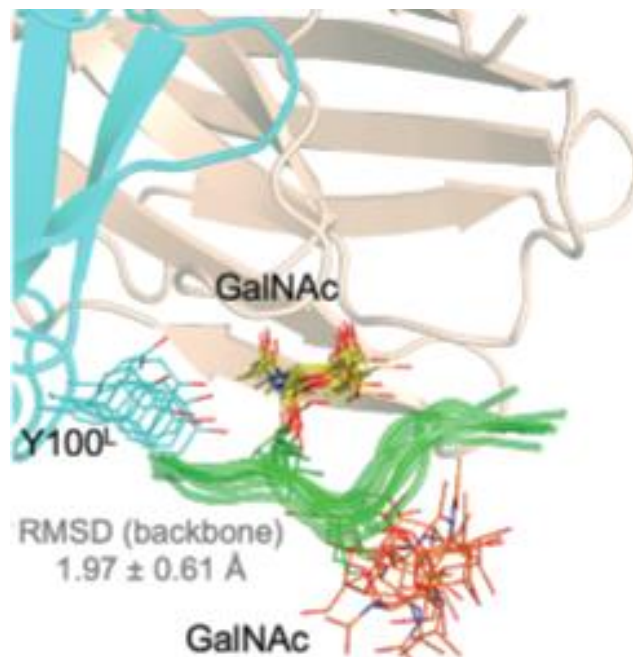


Figura 38. Superposición de 10 frames del glicopéptido 3 en complejo con scFv-5E5, muestreados a partir de simulaciones de 0.5 μ s realizadas en agua explícita. Solo se muestra la estructura del primer marco del anticuerpo para mayor claridad. El anticuerpo se muestra de color cian (cadena ligera) y marrón (cadena pesada). Los valores de la desviación cuadrática media (RMSD) de la cadena principal del péptido y su desviación estándar se muestran en rojo e indican un valor bajo y por tanto reflejan que el glicopéptido es bastante estable excepto por el segundo azúcar que está expuesto al solvente. El esqueleto peptídico de los antígenos se muestra en verde. Los átomos de carbono de los dos GalNAc están en amarillo y naranja, respectivamente.

En cuanto al complejo con el glicopéptido 4, las simulaciones indican que el ácido siálico del antígeno STn perjudica el reconocimiento de la secuencia peptídica. Tras 120 ns, las interacciones CH/ π entre la prolina del extremo C-terminal y la Tyr100^L se vieron significativamente reducidas debido a la distancia incrementada entre ambos residuos, lo que explicaría la menor unión del glicopéptido 4 con respecto al glicopéptido 1 (Figuras 39 y 40).

Con el complejo de scFv-5E5 con el glicopéptido 2 encontramos más cambios, debido a usar una secuencia peptídica distinta. El residuo de ácido aspártico se ve obligado a adoptar una conformación helicoidal para favorecer una forma complementaria al sitio de unión. Este péptido en solución se encuentra en una disposición más extendida, y este

cambio conformacional podría explicar el coste de entropía asociado a la unión con scFv-5E5 y su menor afinidad (Figuras 39 y 40).

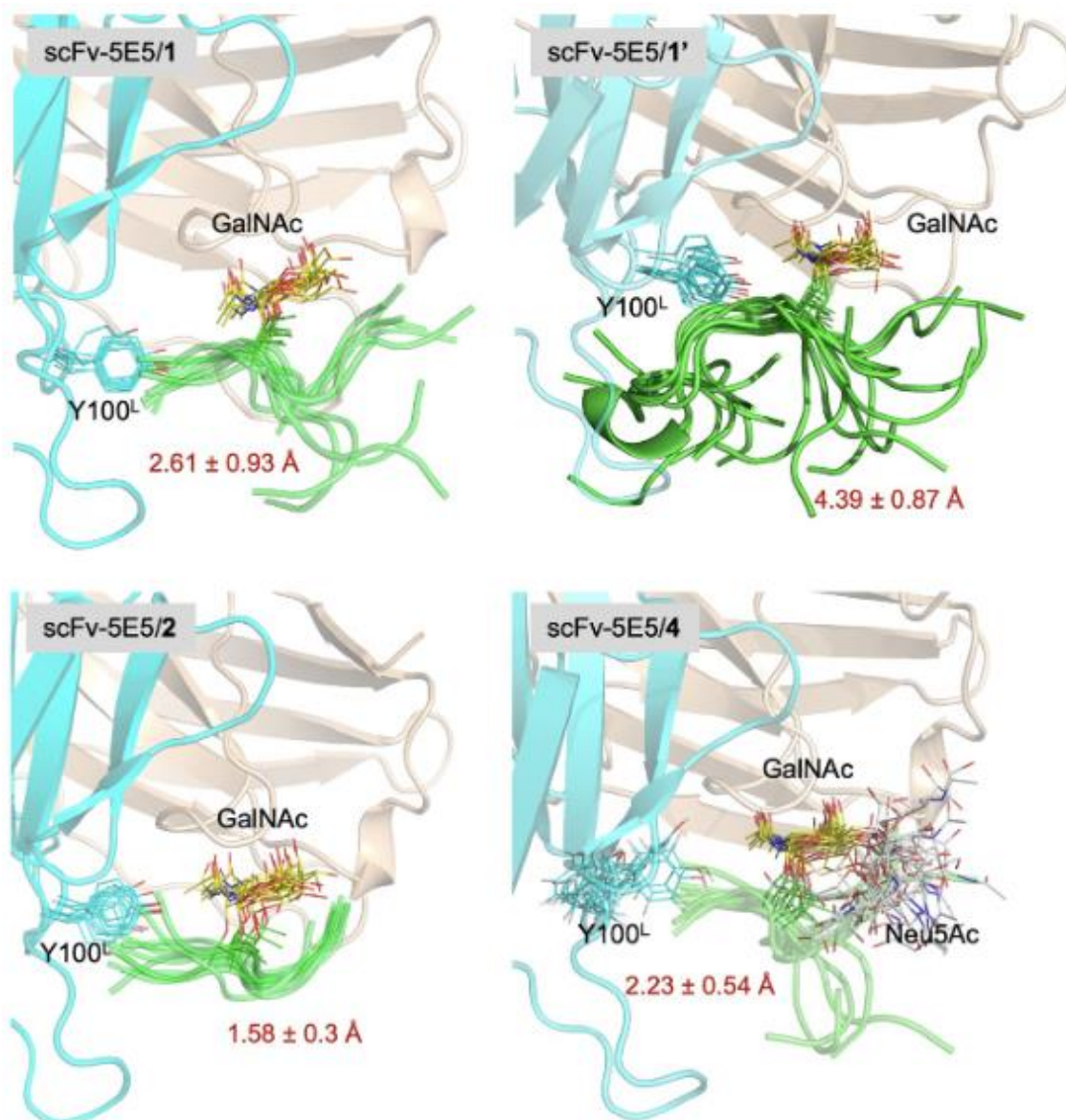


Figura 39. Superposición de 10 frames de los glicopéptidos 1, 1', 2 y 4 en complejo con scFv-5E5, muestreados a partir de simulaciones de 0.5 μ s realizadas en agua explícita. Solo se muestra la estructura del primer marco del anticuerpo para mayor claridad. El anticuerpo se muestra de color cian (cadena ligera) y marrón (cadena pesada). Los valores de la desviación cuadrática media (RMSD) de la cadena principal del péptido y su desviación estándar se muestran en rojo. El esqueleto peptídico de los antígenos se muestra en verde. Los átomos de carbono de los restos GalNAc y Neu5Ac están en amarillo y gris, respectivamente.

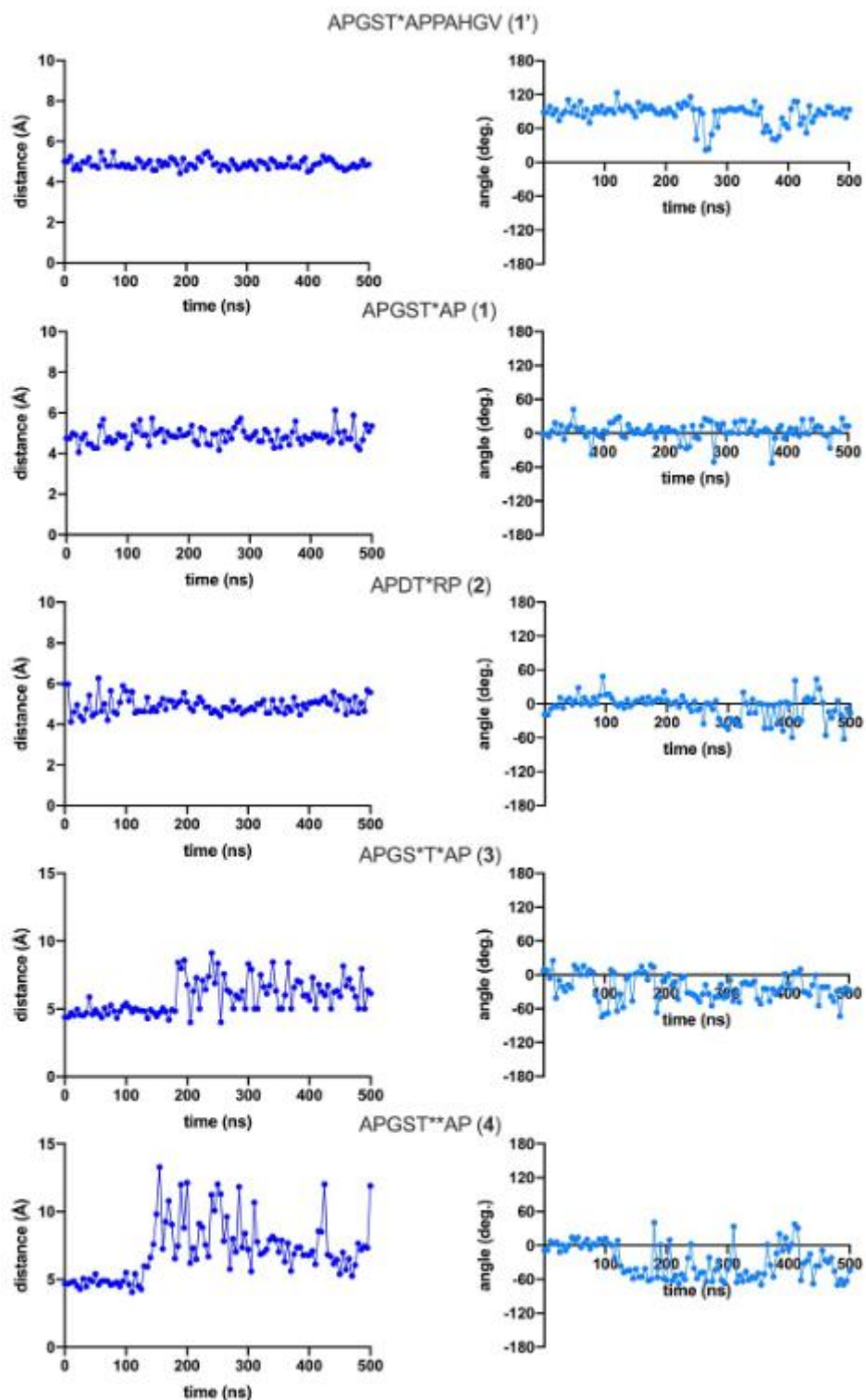


Figura 40. Representación de las distancias entre el centro de masa del sistema de electrones π de Y100^L y el centro del anillo de la prolina del C-terminal de los glicopéptidos 1, 1', 2, 3 y 4 (panel izquierdo), junto con los ángulos entre los planos definido por el sistema de electrones π de Y100 y el anillo de esta prolina (panel derecho) derivado de simulaciones MD de 0.5 μ s.

También se realizó una simulación del complejo de scFv-5E5 con el glicopéptido MUC1-Tn16 con el objetivo de estudiar los cambios conformacionales que se producen en el glicopéptido durante el reconocimiento. Al superponer esta conformación forzada con la conformación natural del glicopéptido (Figura 41) se observó que el esqueleto peptídico es bastante flexible en agua, particularmente para aquellos aminoácidos en posiciones distales desde el punto de glicosilación y que el residuo de GalNAc obliga a la treonina subyacente a adoptar una conformación extendida, en línea con estudios previos y al igual que ocurre con el anticuerpo SM3 (Madariaga et al., 2015). En cambio, en el caso de SN-101 la estructura del glicopéptido en el estado unido es idéntica a su estructura derivada de NMR en solución.

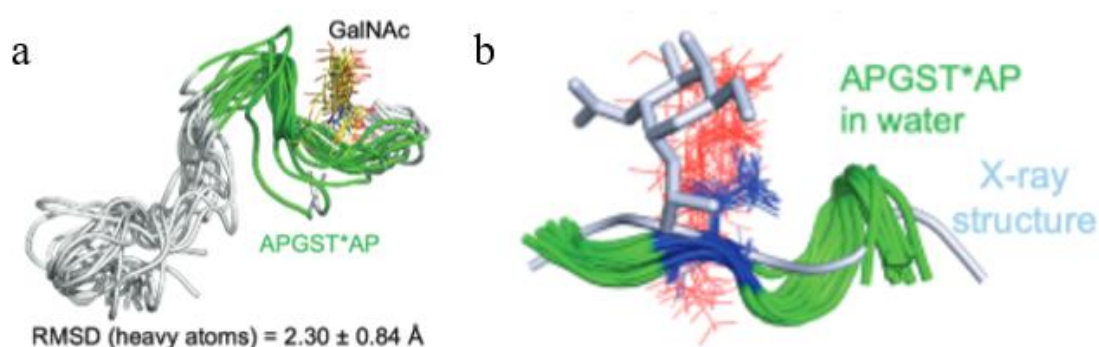


Figura 41. (a) Superposición de los conjuntos estructurales derivados de simulaciones guiadas por experimentos de 200 ns para MUC1-Tn16 en agua y su forma natural. Se muestra el valor RMSD (\pm SD) de los átomos. (b) Superposición del fragmento APGST*AP de los conformeros de MUC1-Tn16 encontrados en solución con la conformación del glicopéptido 1 obtenido a partir de la estructura de rayos X de scFv-5E5/1.

Por último, se realizó la simulación con el glicopéptido APGSS(Tn)AP, similar al glicopéptido 1 pero sustituyendo la treonina por una serina. Las interacciones CH/ π en las que participan F102^H y Y100^L con el grupo metilo de la treonina se pierden al comienzo de la simulación y solo se mantienen las interacciones estabilizantes entre GalNAc y el anticuerpo (Figura 42). Estos resultados refuerzan nuestra hipótesis de que

el epítipo mínimo de 5E5 es el motivo T(Tn)XP, lo que coincide con resultados previos en los que el motivo TS(Tn)AP en el tándem de MUC1 no eran tan buen ligando para el anticuerpo 5E5 (Blixt et al., 2010).

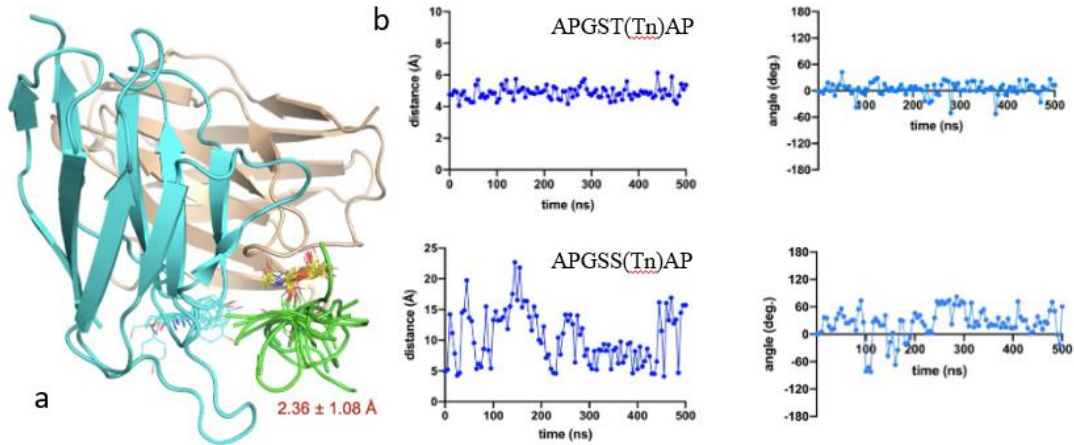


Figura 42. a) Superposición de 10 estructuras del glicopéptido APGSS(Tn)AP en complejo con scFv-5E5, muestreados a partir de simulaciones de 0.5 μ s realizadas en agua explícita. Los valores de la desviación cuadrática media (RMSD) junto a su desviación estándar de la cadena principal del péptido se muestran en rojo. Solo se muestra la estructura del primer marco del anticuerpo para mayor claridad. El anticuerpo se representa de color cian (cadena ligera) y marrón (cadena pesada). El esqueleto peptídico del antígeno se muestra en verde y los carbonos de GalNAc en amarillo. b) Comparativa de las distancias entre el centro de masa del sistema de electrones π de Y100^L y el centro del anillo de la prolina C-terminal de los glicopéptidos APGST(Tn)AP (arriba) y APGSS(Tn)P (abajo), y de los ángulos entre los planos definidos por el sistema de electrones π de Y100^L y el anillo de la prolina.

2.5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

Como mencionamos al comienzo de este capítulo los anticuerpos son una herramienta muy versátil e importante a la hora de diseñar terapias y tratamientos para frenar el desarrollo de tumores. Para seguir avanzando en este campo es necesario comprender los mecanismos de acción entre estos anticuerpos y sus posibles dianas terapéuticas. Una de estas dianas es la proteína MUC1, que se encuentra sobreexpresada y muestra un patrón de glicosilación anómalo en diferentes tumores.

Con este fin hemos obtenido la estructura cristalina del scFv-5E5 con un glicopéptido contenido en las VNTR de MUC1 de células cancerígenas, determinando que la mayor parte del reconocimiento del anticuerpo va dirigido hacia el GalNAc presente en este glicopéptido, con muy poca interacción con la secuencia peptídica, principalmente con el residuo de treonina al que está unido el azúcar y la prolina en posición +2 respecto al azúcar. Este reconocimiento preferente por el GalNAc explica la capacidad de 5E5 de unirse a diferentes secuencias peptídicas, incluso aquellas que presentan ácido siálico además de GalNAc, siempre y cuando se respete el epítipo mínimo del anticuerpo, T(Tn)-X-P. Sin embargo, scFv-5E5 es incapaz de unirse a glicopéptidos más complejos, como los del core2, core3 o core4, lo que refuerza su especificidad frente a células tumorales.

También se ha determinado que los aminoácidos del anticuerpo más importantes para el reconocimiento son los residuos de His32^H, His35^H, Y100^L y F102^H y se ha confirmado que la eliminación de estos residuos reduce significativamente la capacidad de unión con el antígeno.

A pesar de que ya existen múltiples anticuerpos dirigidos a MUC1, 5E5 presenta ciertas características que lo hacen destacar. A diferencia del anticuerpo 214D4, 5E5 es incapaz de unirse a glicanos presentes en células sanas, lo que lo hace específico de células tumorales (Sørensen et al., 2006). El anticuerpo 1SM3 es más selectivo hacia el antígeno Tn, pero también puede unirse en menor medida al core 2 (Karsten et al., 2004) y por tanto a células sanas, algo que con 5E5 no ocurre. El anticuerpo SN-101 por su parte forma más interacciones con el esqueleto peptídico del glicopéptido, lo que le impide reconocer otras secuencias diferentes, capacidad que sí posee 5E5.

Por último, se ha confirmado que el scFv-5E5 mantiene la capacidad de unión del anticuerpo completo, lo que abre las puertas a tratamientos utilizando el scFv, que presentarían una mayor penetración en tejidos de difícil acceso como los tumores sólidos. El problema del menor tiempo de depuración con respecto al anticuerpo completo podría resolverse fácilmente añadiendo un residuo de cisteína libre a la secuencia de scFv-5E5 que permitiese la formación de dímeros.

Debido a estas características el anticuerpo 5E5 tiene un gran potencial como herramienta para el desarrollo de tratamientos contra el cáncer y en concreto ya se ha demostrado que este anticuerpo en la forma de un CAR-T tuvo una eficacia del 100% para el tratamiento del cáncer de páncreas en ratones (Pourjafar et al., 2020). Por último, en este trabajo se ha profundizado en el conocimiento sobre la estructura y el mecanismo de unión de 5E5 con sus antígenos, conocimiento que podría utilizarse en el futuro para el desarrollo de nuevas terapias utilizando este anticuerpo o para utilizarlo como herramienta de diagnóstico para diversos tipos de cáncer.

Dentro del contexto en el que se ha desarrollado la presente tesis doctoral, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Mediante los experimentos de ITC observamos que scFv-5E5 carece de la capacidad de unirse al péptido 1 sin glicosilar, mientras que su unión con GalNAc metilado es muy débil. Sin embargo, si puede unirse a los diferentes glicopéptidos conteniendo el antígeno Tn, lo que sugiere que tanto la secuencia peptídica como el azúcar son necesarios para el reconocimiento. Además, se observó que el reconocimiento de scFv-5E5 permite cierta variabilidad en la secuencia de los glicopéptidos, aunque la eliminación del segundo residuo de prolina de la secuencia peptídica afecta severamente a la unión.

- El complejo cristalino de scFv-5E5 con el glicopéptido 1 muestra que el residuo de GalNAc es la parte más reconocida del glicopéptido, mientras que el péptido (“backbone” de la Pro18) forma un único puente de hidrógeno con la proteína (“backbone” de Tyr98) y una interacción CH- π entre la Pro18 del glicopéptido y la Tyr100 del scFv-5E5. Cabe destacar que mientras que el GalNAc es reconocido exclusivamente por residuos de la cadena pesada, el péptido es reconocido por la cadena ligera.

- Los resultados obtenidos del espectro de STD-NMR del glicopéptido 1 con scFv-5E5 apoyan los resultados obtenidos mediante cristalografía de rayos X, con la mayor parte de la interacción ocurriendo entre el anticuerpo y el GalNAc del glicopéptido.

- Al reemplazar los residuos His32, His35, Tyr100 y Phe102 por alaninas se observaron disminuciones severas en la capacidad de unión con el glicopéptido 1.

- Los experimentos de sustituciones por alanina mostraron que el epítipo mínimo de scFv-5E5 es el motivo T(Tn)-X-P, pudiendo ser X cualquier aminoácido. En cambio scFv-5E5 es incapaz de unirse a glicopéptidos que presenten otros núcleos en lugar del Tn.

- El scFv-5E5 mantiene la capacidad de unión al glicopéptido 1 del anticuerpo 5E5 completo.

2.6. REFERENCIAS.

Ahmad, Z. A., Yeap, S. K., Ali, A. M., Ho, W. Y., Alitheen, N. B. M., & Hamid, M.

(2012). ScFv antibody: Principles and clinical application. *Clinical and*

Developmental Immunology, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/980250>

Auyeung, C. (n.d.). *CC BY-NC 3.0*. CK-12 Foundation.

<https://dr282zn36sxxg.cloudfront.net/datastreams/f->

[d%3A279976372565b3d35be62a84de06152559edf96aeb308e746b08d185%2BIM](https://dr282zn36sxxg.cloudfront.net/datastreams/f-d%3A279976372565b3d35be62a84de06152559edf96aeb308e746b08d185%2BIMAGE_THUMB_POSTCARD_TINY%2BIMAGE_THUMB_POSTCARD_TINY.1)

[AGE_THUMB_POSTCARD_TINY%2BIMAGE_THUMB_POSTCARD_TINY.](https://dr282zn36sxxg.cloudfront.net/datastreams/f-d%3A279976372565b3d35be62a84de06152559edf96aeb308e746b08d185%2BIMAGE_THUMB_POSTCARD_TINY%2BIMAGE_THUMB_POSTCARD_TINY.1)

1

Bibel, B. (n.d.). *Vapor diffusion crystallization – theory & practice*.

Thebumblingbiochemist.Com. [https://thebumblingbiochemist.com/365-days-of-](https://thebumblingbiochemist.com/365-days-of-science/vapor-diffusion-crystallization-theory-practice/)

[science/vapor-diffusion-crystallization-theory-practice/](https://thebumblingbiochemist.com/365-days-of-science/vapor-diffusion-crystallization-theory-practice/)

Blixt, O., Cló, E., Nudelman, A. S., Sørensen, K. K., Clausen, T., Wandall, H. H.,

Livingston, P. O., Clausen, H., & Jensen, K. J. (2010). A high-throughput O-

glycopeptide discovery platform for seromic profiling. *Journal of Proteome*

Research, 9(10), 5250–5261. <https://doi.org/10.1021/pr1005229>

Bradbury, A. R. M., Sidhu, S., Dübel, S., & McCafferty, J. (2011). Beyond natural

antibodies: The power of in vitro display technologies. *Nature Biotechnology*,

29(3), 245–254. <https://doi.org/10.1038/nbt.1791>

- Brockhausen, I., & Melamed, J. (2021). Mucins as anti-cancer targets: perspectives of the glyco biologist. *Glycoconjugate Journal*, 38(4), 459–474.
<https://doi.org/10.1007/s10719-021-09986-8>
- Brum, A. M., van der Leije, C. S., Schreuders-Koedam, M., Chaibi, S., van Leeuwen, J. P. T. M., & van der Eerden, B. C. J. (2018). Mucin 1 (MUC1) Deficiency in Female Mice Leads to Temporal Skeletal Changes During Aging. *JBMR Plus*, 2(6), 341–350. <https://doi.org/10.1002/jbm4.10061>
- Byrd, J. C., & Bresalier, R. S. (2004). Mucins and Mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer and Metastasis Reviews*, 23(1–2), 77–99.
<https://doi.org/10.1023/A:1025815113599>
- Carolin Plattner, Michael Höfener, and N. S. (2011). One-Pot Azidochlorination of Glycals. *Org. Lett.* <https://doi.org/https://doi.org/10.1021/ol102750h>
- Cascio, S., & Finn, O. J. (2016). Intra- and extra-cellular events related to altered glycosylation of MUC1 promote chronic inflammation, tumor progression, invasion, and metastasis. *Biomolecules*, 6(4), 1–16.
<https://doi.org/10.3390/biom6040039>
- Chayen, N. E., & Saridakis, E. (2008). Protein crystallization: From purified protein to diffraction-quality crystal. *Nature Methods*, 5(2), 147–153.
<https://doi.org/10.1038/nmeth.f.203>
- Chiu, M. L., Goulet, D. R., Teplyakov, A., & Gilliland, G. L. (2019). Antibody

Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies*, 8(4), 55. <https://doi.org/10.3390/antib8040055>

Emsley, P., & Cowtan, K. (2004). Coot: Model-building tools for molecular graphics. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 60(12 I), 2126–2132. <https://doi.org/10.1107/S0907444904019158>

Ferez-Vilar, J., & Hill, R. L. (1999). The structure and assembly of secreted mucins. *Journal of Biological Chemistry*, 274(45), 31751–31754. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.45.31751>

Gao, T., Cen, Q., & Lei, H. (2020). A review on development of MUC1-based cancer vaccine. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 132(October), 110888. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.110888>

Gawas, U. B., Mandrekar, V. K., & Majik, M. S. (2019). Structural analysis of proteins using X-ray diffraction technique. In *Advances in Biological Science Research: A Practical Approach*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817497-5.00005-7>

Huang, Z. H., Shi, L., Ma, J. W., Sun, Z. Y., Cai, H., Chen, Y. X., Zhao, Y. F., & Li, Y. M. (2012). A totally synthetic, self-assembling, adjuvant-free MUC1 glycopeptide vaccine for cancer therapy. *Journal of the American Chemical Society*, 134(21), 8730–8733. <https://doi.org/10.1021/ja211725s>

Ion Exchange Chromatography. (n.d.).

<https://www.priyamstudycentre.com/2021/10/ion-exchange-chromatography.html>

Jerabek-Willemsen, M., André, T., Wanner, R., Roth, H. M., Duhr, S., Baaske, P., & Breitsprecher, D. (2014). MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. *Journal of Molecular Structure*, *1077*, 101–113.

<https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2014.03.009>

Kabsch, W. (2010). XDS. *Biological Crystallography, Acta Cryst.*

<https://doi.org/10.1107/S090744490904733>

Karsten, U., Serttas, N., Paulsen, H., Danielczyk, A., & Goletz, S. (2004). Binding patterns of DTR-specific antibodies reveal a glycosylation-conditioned tumor-specific epitope of the epithelial mucin (MUC1). *Glycobiology*, *14*(8), 681–692.

<https://doi.org/10.1093/glycob/cwh090>

Kračun, S. K., Cló, E., Clausen, H., Levery, S. B., Jensen, K. J., & Blixt, O. (2010).

Random glycopeptide bead libraries for seromic biomarker discovery. *Journal of Proteome Research*, *9*(12), 6705–6714. <https://doi.org/10.1021/pr1008477>

Kufe, D. W. (2009). Mucins in cancer: Function, prognosis and therapy. *Nature*

Reviews Cancer, *9*(12), 874–885. <https://doi.org/10.1038/nrc2761>

Lagow, E. L., & Carson, D. D. (2002). Synergistic stimulation of MUC1 expression in normal breast epithelia and breast cancer cells by interferon- γ and tumor necrosis factor- α . *Journal of Cellular Biochemistry*, *86*(4), 759–772.

<https://doi.org/10.1002/jcb.10261>

Liebe, B.; Kunz, H. (1994). Synthesis of Sialyl-Tn Antigen . Regioselective Sialylation of a Galactosamine Threonine Conjugate Unblocked in the Carbohydrate Portion. *Tetrahedron Lett*, 35(47), 8777–8778.

Madariaga, D., Martínez-Sáez, N., Somovilla, V. J., Coelho, H., Valero-González, J., Castro-Lopez, J., Asensio, J. L., Jiménez-Barbero, J., Busto, J. H., Avenoza, A., Marcelo, F., Hurtado-Guerrero, R., Corzana, F., & Peregrina, J. M. (2015). Detection of tumor-associated glycopeptides by Lectins: The peptide context modulates carbohydrate recognition. *ACS Chemical Biology*, 10(3), 747–756. <https://doi.org/10.1021/cb500855x>

Mandal, A. (2019). *Antibody function*. News Medical Life Sciences. <https://www.news-medical.net/health/Antibody-Function.aspx>

Martínez-Sáez, N., Castro-López, J., Valero-González, J., Madariaga, D., Compañón, I., Somovilla, V. J., Salvadó, M., Asensio, J. L., Jiménez-Barbero, J., Avenoza, A., Busto, J. H., Bernardes, G. J. L., Peregrina, J. M., Hurtado-Guerrero, R., & Corzana, F. (2015). Deciphering the Non-Equivalence of Serine and Threonine O-Glycosylation Points: Implications for Molecular Recognition of the Tn Antigen by an anti-MUC1 Antibody. *Angewandte Chemie - International Edition*, 54(34), 9830–9834. <https://doi.org/10.1002/anie.201502813>

McCoy, A. J., Grosse-Kunstleve, R. W., Adams, P. D., Winn, M. D., Storoni, L. C., & Read, R. J. (2007). Phaser crystallographic software. *Journal of Applied Crystallography*, 40(4), 658–674. <https://doi.org/10.1107/S0021889807021206>

- Monnier, P., Vigouroux, R., & Tassew, N. (2013). In Vivo Applications of Single Chain Fv (Variable Domain) (scFv) Fragments. *Antibodies*, 2(4), 193–208.
<https://doi.org/10.3390/antib2020193>
- Munkley, J. (2016). The role of sialyl-Tn in cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(3). <https://doi.org/10.3390/ijms17030275>
- Murshudov, G. N., Skubák, P., Lebedev, A. A., Pannu, N. S., Steiner, R. A., Nicholls, R. A., Winn, M. D., Long, F., & Vagin, A. A. (2011). REFMAC5 for the refinement of macromolecular crystal structures. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 67(4), 355–367.
<https://doi.org/10.1107/S0907444911001314>
- Nelson, D. L. (2009). *LEHNINGER: PRINCIPIOS DE BIOQUIMICA (5ª EDICION)*.
- Pifferi, C. (n.d.). *Anti-cancer Immunotherapy*. GlycoPedia. <https://glycopedia.eu/e-chapters/Anti-cancer-Immunotherapy/MUC1-and-tumor-associated-carbohydrate-antigens-TACAs>
- Pourjafar, M., Samadi, P., & Saidijam, M. (2020). MUC1 antibody-based therapeutics: The promise of cancer immunotherapy. *Immunotherapy*, 12(17), 1269–1286.
<https://doi.org/10.2217/imt-2020-0019>
- Rajabi, H., Jin, C., Ahmad, R., McClary, A. C., Joshi, M. D., & Kufe, D. (2010). Mucin 1 oncoprotein expression is suppressed by the miR-125b oncomir. *Genes and Cancer*, 1(1), 62–68. <https://doi.org/10.1177/1947601909357933>

- Rezaie, E., Amani, J., Bidmeshki Pour, A., & Mahmoodzadeh Hosseini, H. (2020). A new scfv-based recombinant immunotoxin against EPHA2-overexpressing breast cancer cells; High in vitro anti-cancer potency. *European Journal of Pharmacology*, *870*, 172912. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2020.172912>
- Song, C., Zhang, S., & Huang, H. (2015). Choosing a suitable method for the identification of replication origins in microbial genomes. *Frontiers in Microbiology*, *6*(SEP), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01049>
- Sørensen, A. L., Reis, C. A., Tarp, M. A., Mandel, U., Ramachandran, K., Sankaranarayanan, V., Schwientek, T., Graham, R., Taylor-Papadimitriou, J., Hollingsworth, M. A., Burchell, J., & Clausen, H. (2006). Chemoenzymatically synthesized multimeric Tn/STn MUC1 glycopeptides elicit cancer-specific anti-MUC1 antibody responses and override tolerance. *Glycobiology*, *16*(2), 96–107. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwj044>
- Sritama Nath and Pinku Mukherjee. (2017). MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression Sritama. *Physiology & Behavior*, *176*(12), 139–148. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.02.007.MUC1>
- Supruniuk, K. & Radziejewska, I. (2021). MUC1 is an oncoprotein with a significant role in apoptosis (Review). *International Journal of Oncology*, *59*(3), 1–11. <https://doi.org/10.3892/ijo.2021.5248>
- Tarp, M. A., Sørensen, A. L., Mandel, U., Paulsen, H., Burchell, J., Taylor-Papadimitriou, J., & Clausen, H. (2007). Identification of a novel cancer-specific

immunodominant glycopeptide epitope in the MUC1 tandem repeat. *Glycobiology*, 17(2), 197–209. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwl061>

Thathiah, A., Blobel, C. P., & Carson, D. D. (2003). Tumor necrosis factor- α converting enzyme/ADAM 17 mediates MUC1 shedding. *Journal of Biological Chemistry*, 278(5), 3386–3394. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208326200>

ThermoFisher. (n.d.). *Desalting and Gel Filtration Chromatography*.

<https://www.thermoFisher.com/es/es/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/desalting-gel-filtration-chromatography.html>

Thomas A. Collier, Thomas J. Piggot, and J. R. A. (2020). Molecular Dynamics Simulation of Proteins. In *Protein Nanotechnology Protocols, Instrumentation, and Applications* (Vol. 2073, pp. 247–285). https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9869-2_14

Viegas, A., Manso, J., Nobrega, F. L., & Cabrita, E. J. (2011). Saturation-transfer difference (STD) NMR: A simple and fast method for ligand screening and characterization of protein binding. *Journal of Chemical Education*, 88(7), 990–994. <https://doi.org/10.1021/ed101169t>

Wakui, H., Tanaka, Y., Ose, T., Matsumoto, I., Kato, K., Min, Y., Tachibana, T., Sato, M., Naruchi, K., Martin, F. G., Hinou, H., & Nishimura, S. I. (2020). Erratum: A straightforward approach to antibodies recognising cancer specific glycopeptidic neoepitopes (Chem. Sci. (2020) 11 (4999-5006) DOI: 10.1039/D0SC00317D).

Chemical Science, 11(46), 12588–12589. <https://doi.org/10.1039/d0sc90254c>

Yamada, N., Nishida, Y., Tsutsumida, H., Hamada, T., Goto, M., Higashi, M., Nomoto, M., & Yonezawa, S. (2008). MUC1 expression is regulated by DNA methylation and histone H3 lysine 9 modification in cancer cells. *Cancer Research*, 68(8), 2708–2716. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6844>

Yang, M., Tang, X., Zhang, Z., Gu, L., Wei, H., Zhao, S., Zhong, K., Mu, M., Huang, C., Jiang, C., Xu, J., Guo, G., Zhou, L., & Tong, A. (2020). Tandem CAR-T cells targeting CD70 and B7-H3 exhibit potent preclinical activity against multiple solid tumors. *Theranostics*, 10(17), 7622–7634. <https://doi.org/10.7150/thno.43991>

Yoshimura, Y., Denda-Nagai, K., Takahashi, Y., Nagashima, I., Shimizu, H., Kishimoto, T., Noji, M., Shichino, S., Chiba, Y., & Irimura, T. (2019). Products of Chemoenzymatic Synthesis Representing MUC1 Tandem Repeat Unit with T-, ST- or STn-antigen Revealed Distinct Specificities of Anti-MUC1 Antibodies. *Scientific Reports*, 9(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53052-1>

CAPÍTULO 3. ESTUDIO DE LA
ACCIÓN PROTECTORA
FRENTE A INFECCIONES
FÚNGICAS INVASIVAS DE UN
NANOBODY DIRIGIDO AL
SITIO ACTIVO DE β -1,3-
GLUCANOSILTRANSFERASAS.

3.1 INTRODUCCIÓN.

3.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LAS INFECCIONES FÚNGICAS.

Los hongos son un reino de organismos eucariotas enormemente diverso (se estima que está compuesto por entre 2,2 y 3,8 millones de especies (Hawksworth & Lücking, 2017)), incluyendo desde microorganismos unicelulares como las levaduras o la *Chytridiomycota* hasta organismos pluricelulares como las setas. A pesar de ser un grupo tan diverso sus integrantes comparten ciertas características. Los hongos son heterótrofos (normalmente utilizan enzimas digestivas secretadas), siendo los principales descomponedores de los sistemas ecológicos, y poseen una pared celular rica en quitina (un polímero formado por repeticiones de N-acetilglucosamina). Los hongos siempre han sido organismos de gran interés para los humanos, especialmente las levaduras, siendo utilizados en la fermentación del pan o cerveza y más recientemente en la producción de proteínas. Sin embargo, estos organismos también pueden suponer una gran amenaza debido a las enfermedades que pueden provocar tanto en humanos como en cultivos.

El peligro que las patologías causadas por hongos suponen es a menudo menospreciado y son frecuentemente diagnosticadas erróneamente como otras enfermedades, cuando pueden provocar numerosos problemas de salud, desde infecciones superficiales menores que afectan hasta al 25% de la población (como el “pie de atleta”, una infección causada por dermatofitos que afecta a uno de cada cinco adultos) hasta infecciones invasivas

severas que pueden alcanzar hasta un 50% de mortalidad, aún recibiendo tratamiento (Brown et al., 2012).

Estas infecciones fúngicas invasivas ocurren con mucha menos frecuencia que las infecciones superficiales, pero son responsables de la muerte de más de un millón y medio de personas cada año (Brown et al., 2012). Estas infecciones pueden estar causadas por diversas especies de hongos (Tabla 5), sin embargo, el 90% de todas las muertes causadas por infecciones fúngicas invasivas están asociadas a cuatro familias: *Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus* y *Pneumocystis*. De estas cuatro familias nosotros nos centraremos en *Cryptococcus* y *Aspergillus*.

Tabla 5. Número de casos estimados y mortalidad estimada de las diez infecciones fúngicas invasivas con mayor mortalidad. (Brown et al., 2012)

Disease (most common species)	Location	Estimated life-threatening infections/ year at that location*	Mortality rates (% in infected populations)*
Opportunistic invasive mycoses			
Aspergillosis (<i>Aspergillus fumigatus</i>)	Worldwide	>200,000	30–95
Candidiasis (<i>Candida albicans</i>)	Worldwide	>400,000	46–75
Cryptococcosis (<i>Cryptococcus neoformans</i>)	Worldwide	>1,000,000	20–70
Mucormycosis (<i>Rhizopus oryzae</i>)	Worldwide	>10,000	30–90
Pneumocystis (<i>Pneumocystis jirovecii</i>)	Worldwide	>400,000	20–80
Endemic dimorphic mycoses* ¹			
Blastomycosis (<i>Blastomyces dermatitidis</i>)	Midwestern and Atlantic United States	~3,000	<2–68
Coccidioidomycosis (<i>Coccidioides immitis</i>)	Southwestern United States	~25,000	<1–70
Histoplasmosis (<i>Histoplasma capsulatum</i>)	Midwestern United States	~25,000	28–50
Paracoccidioidomycosis (<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>)	Brazil	~4,000	5–27
Penicilliosis (<i>Penicillium marneffeii</i>)	Southeast Asia	>8,000	2–75

En personas sanas el sistema inmune dispone de mecanismos efectivos para prevenir infecciones fúngicas, pero las infecciones fúngicas invasivas son infecciones oportunistas, apareciendo en individuos con un sistema inmune comprometido, ya sea debido a infecciones inmunosupresoras como el VIH/SIDA o bien debido a tratamientos inmunosupresores que se han administrado a pacientes de otras enfermedades o trasplantes. Por ejemplo, la gran mayoría de los pacientes con criptococosis mostraron defectos en los linfocitos CD4⁺.

3.1.1.1. CRYPTOCOCCUS.

Cryptococcus es una levadura encapsulada capaz de infectar tanto plantas como animales que se reproduce por gemación. Su característica más diferenciadora es la cápsula de polisacáridos que la envuelve (Figura 43). Esta cápsula está formada principalmente por glucuronoxilomanano (GXM) y glucuronoxilomanogalactano (GXMGal) y es vital para la infectividad del hongo (Srikanta et al., 2014).

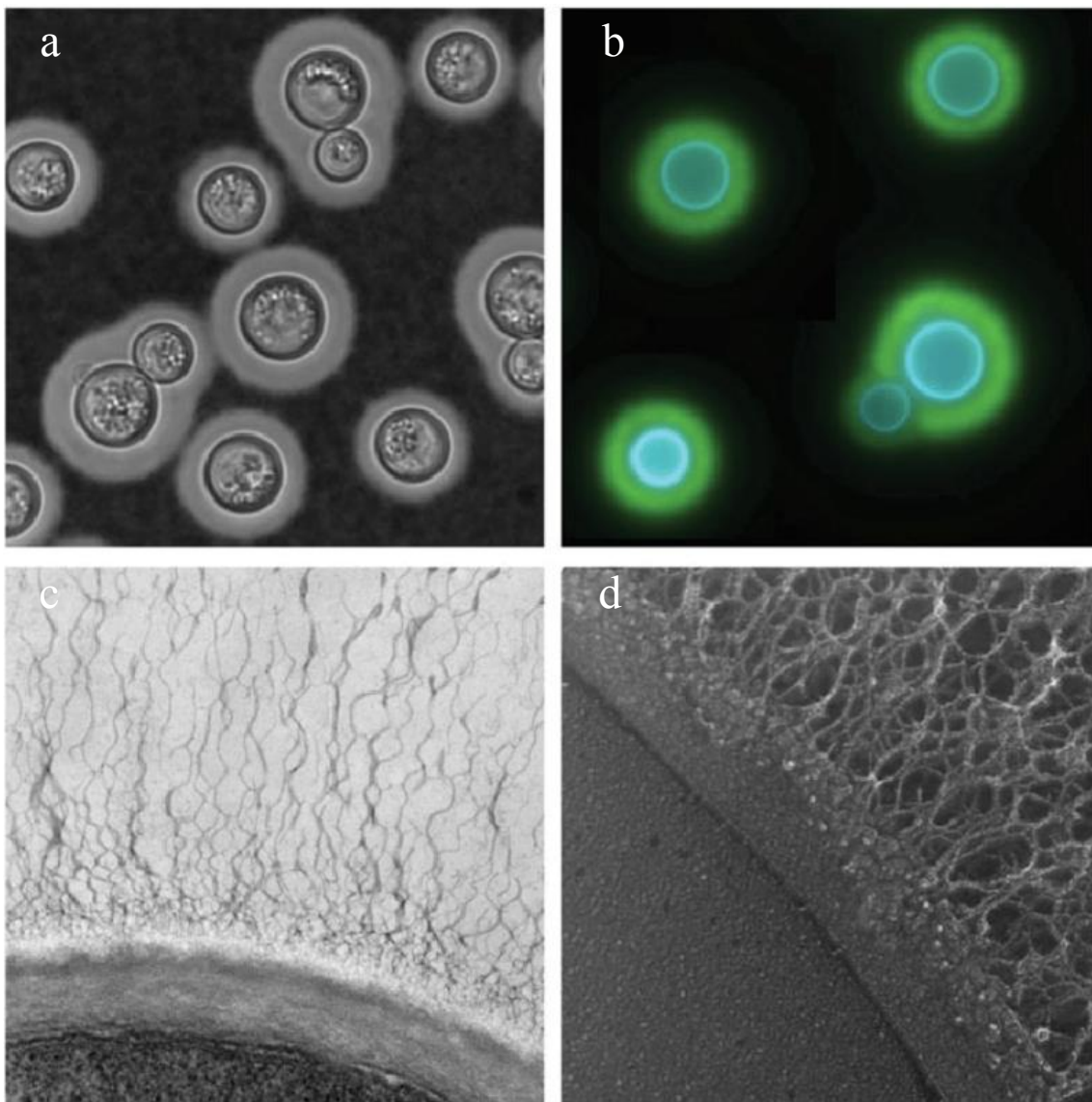


Figura 43. Cápsula y pared celular de *Cryptococcus neoformans*. a) Tinción negativa de células de cryptococcus con tinta china. b) Montaje de inmunofluorescencia de células inducidas por cápsula teñidas

con blanco Calcofluor (azul, tiñe la pared celular) y anticuerpo contra el polisacárido principal de la cápsula (verde). c) Transmisión EM del borde de la célula con fibras de la cápsula que se extienden hacia arriba desde la pared celular. d) Micrografía electrónica (EM) de grabado profundo y congelación rápida de una porción de la membrana plasmática (región inferior izquierda de la micrografía), delimitada por las dos capas de la pared celular y las fibras de la cápsula asociadas (que se extienden hacia arriba y hacia la derecha). (Wang et al., 2018)

Prácticamente todos los casos de criptococosis en humanos están causadas por *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gattii*. *C. neoformans* se encuentra presente en todo el mundo, mientras que *C. gattii* está más localizada en áreas tropicales y subtropicales, aunque en los últimos años han aparecido casos de meningitis causada por *C. gattii* en otros lugares como Canadá o Estados Unidos. La CDC estima que la meningitis producida por *Cryptococcus* afecta a más de un millón de personas al año, con más de 620.000 muertes en el África sub-sahariana (Park et al., 2009), siendo el principal causante de infecciones graves por hongos.

La exposición al *Cryptococcus* suele producirse al inhalar los organismos suspendidos en el aire, comenzando la infección en los pulmones y (en los casos más graves) propagándose por el organismo hasta invadir el sistema nervioso central, donde puede causar meningoencefalitis (Figura 44).

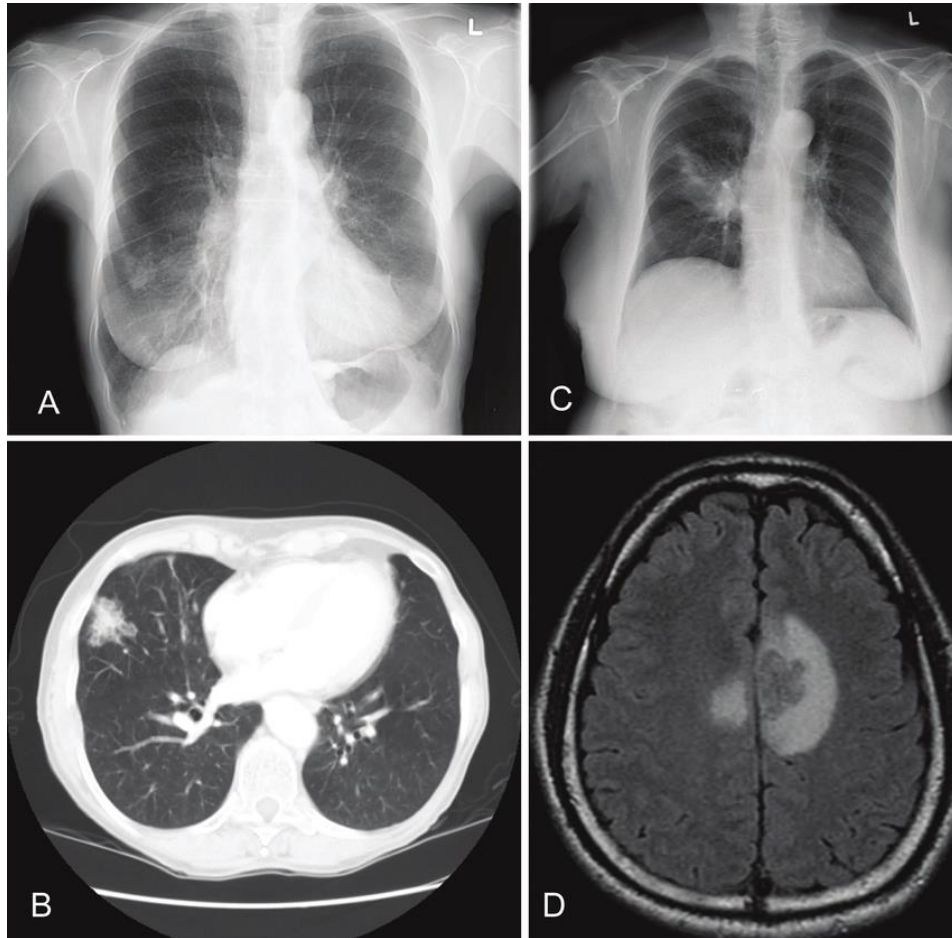


Figura 44. Imágenes de pacientes con infección por *C. gattii*. A) Rayos X del tórax que muestra un nódulo de 2 cm en segmento periférico lateral del lóbulo medio derecho. B) Tomografía computarizada de tórax que muestra un nódulo de 3 cm en el lóbulo medio derecho sin consolidación circundante. C) Radiografía de tórax que muestra consolidación del lóbulo superior derecho y broncograma aéreo. D) Resonancia magnética de la cabeza que muestra la presencia de una lesión con realce anular. (Galanis et al., 2009)

3.1.1.2. ASPERGILLUS.

Por otro lado, las infecciones por aspergillus (a pesar de ser un género compuesto por más de 180 especies) suelen producirse principalmente por *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus flavus*, especies productoras de esporas que se encuentran en el suelo por todo el mundo. Aspergillus presenta dos morfologías básicas: levadura (unicelular) e hifas

(estructura filamentososa formada por cadenas de células), por lo que se consideran hongos filamentosos (Figura 45). Como hemos mencionado anteriormente, *Aspergillus* se reproduce principalmente por esporas, aunque se ha observado ciclos de reproducción sexual en determinadas condiciones (Jean-Paul Latgé, 2019).



Figura 45. Micrografía electrónica de barrido de cultivo de *Aspergillus fumigatus*, que muestra hifas en el borde de la colonia. (Marshall, n.d.)

Estas esporas se encuentran frecuentemente en el ambiente y exposiciones continuas a *Aspergillus* (especialmente en individuos con el sistema inmune comprometido) pueden provocar infecciones severas capaces de desembocar en aspergilosis pulmonar crónica (Figura 46), que puede complicar otras enfermedades pulmonares como la tuberculosis (enfermedad que frecuentemente se encuentra asociada a la aspergilosis invasiva) o extenderse a otros órganos como el cerebro. Se estima que cada año se producen 200.000 casos de aspergilosis invasiva, estando presente en más de un 10% de los pacientes de

leucemia aguda y pacientes de trasplantes (Brown et al., 2012). La aspergilosis invasiva es una enfermedad muy peligrosa con más de un 50% de mortalidad (75% en pacientes vulnerables o con patologías previas), incluso cuando es diagnosticada y tratada, llegando hasta casi el 100% si no se administra el tratamiento adecuado.

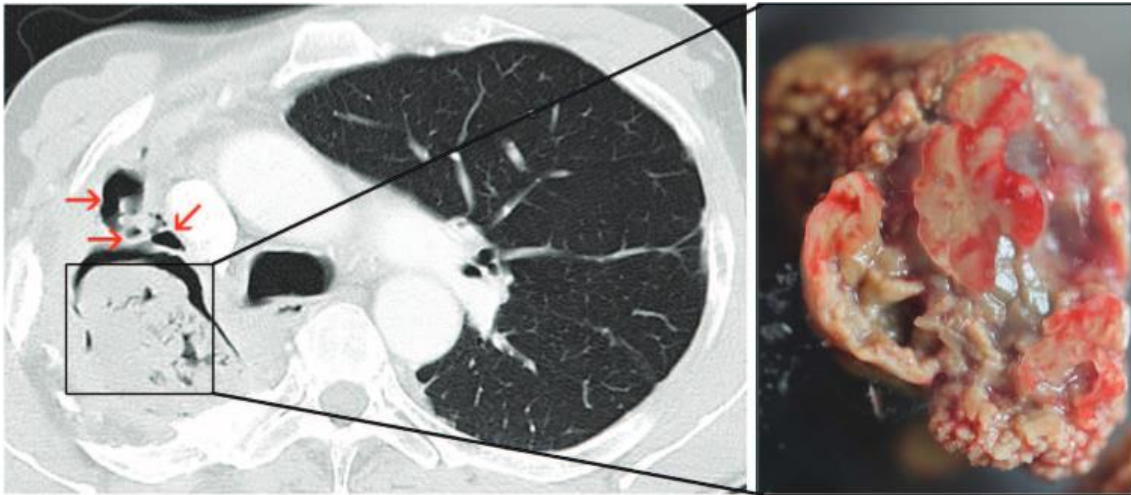


Figura 46. Tomografía computarizada de los pulmones de un paciente (izquierda) que muestra una gran bola fúngica (aspergiloma), que se extrajo quirúrgicamente (derecha). También se ven tres cavidades más pequeñas en la tomografía computarizada (flechas rojas), que es típica de la aspergilosis pulmonar crónica (Brown et al., 2012).

A. fumigatus también es un alérgeno muy común, afectando a millones de personas alrededor del mundo, especialmente a personas susceptibles al padecer condiciones como el asma.

3.1.2. RESPUESTA INMUNE FRENTE A INFECCIONES FÚNGICAS.

Al igual que ocurre con otras infecciones, el cuerpo humano tiene mecanismos de defensa frente a las infecciones por hongos. En este proceso intervienen tanto el mecanismo inmune humoral (anticuerpos) como el celular (fagocitos, células T) y activa la respuesta inmune y la adaptativa.

La respuesta inmune es la primera línea de defensa frente a la infección por hongos, está presente en los lugares con interacción continua con los hongos e incluye la función barrera de las superficies del cuerpo y la mucosa epitelial del tracto respiratorio, gastrointestinal y urinario-genital. Si el patógeno es capaz de atravesar estas barreras los componentes de la pared celular del hongo serán reconocidos por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), incluyendo los receptores de tipo Toll (TLRs), que participan en la respuesta inflamatoria. Dependiendo del hongo que esté atacando al huésped éste será reconocido por distintos PRRs (Figura 47). Tras la activación estos receptores interaccionarán con la molécula adaptadora MYD88 (gen de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88) ubicada en el citosol, que provocará la activación y translocación nuclear del factor nuclear- κ B (NF- κ B) y la activación de genes que producirán un aumento en la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, la producción de IL-12 por las células dendríticas, y la diferenciación de las células T_H1. Además de los TLRs, en el reconocimiento de hongos por parte del sistema inmune en mamíferos también participan otra categoría de PRRs, los receptores de lectina tipo C (CLR), que también tiene sus propias rutas de señalización intracelular. En humanos deficiencias y polimorfismos en ambas categorías (TLRs y CLR) están asociados a una mayor susceptibilidad a sufrir infecciones fúngicas invasivas (Brown et al., 2012).

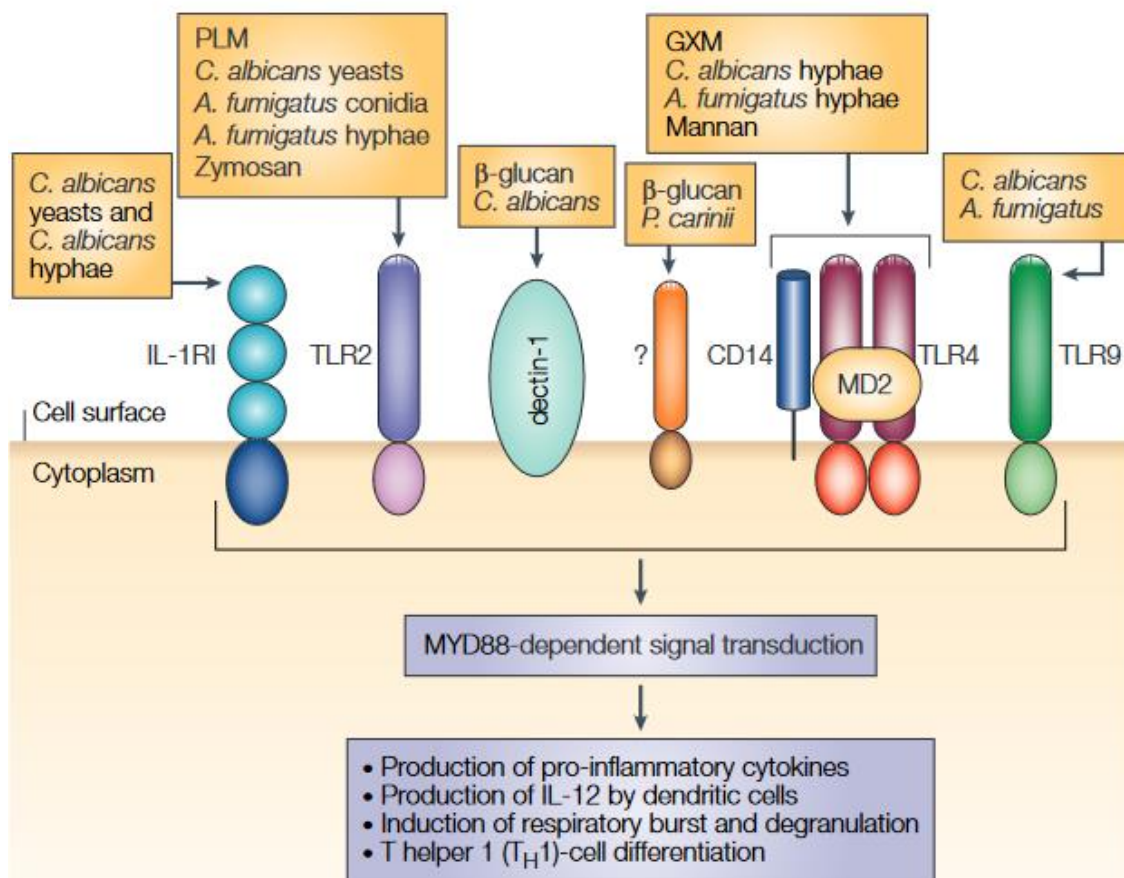


Figura 47. Función de los TLRs como activador en la respuesta inmune frente a hongos. En la imagen se representan los diferentes receptores que participan en la respuesta junto a los componentes que la activan. GXM = glucuronoxilomanano (polisacárido de la cápsula de cryptococcus) (Romani, 2004)

Las defensas antifúngicas innatas de los mamíferos están mediadas por células, receptores celulares y varios factores humorales. Los fagocitos especializados, compuestos por neutrófilos, leucocitos mononucleares (monocitos y macrófagos) y células dendríticas (DC), tienen un papel fundamental eliminando e inhibiendo el crecimiento del hongo. Las células asesinas naturales (NK), las células T $\gamma\delta$ y las células no hematopoyéticas, como las células epiteliales y endoteliales, también participan en esta respuesta (Romani, 2004).

Como hemos mencionado anteriormente, en la mayoría de los casos el contacto con estos hongos no desemboca en patologías graves, pero son suficiente para generar anticuerpos

contra estos hongos. Incluso en personas sanas es frecuente encontrar una alta prevalencia de anticuerpos capaces de reconocer antígenos específicos de *C. neoformans* y los linfocitos de individuos sanos también muestran una respuesta proliferativa tras ser estimulados con antígenos fúngicos, lo que sugiere una inmunización natural frente a este hongo.

Al igual que ocurre frente a otros patógenos, las células T juegan un papel fundamental en la respuesta del sistema inmune adaptativo frente a hongos. La heterogeneidad del repertorio de células T CD4⁺ y CD8⁺ podría explicar la multiplicidad y redundancia de mecanismos efectores a través de los cuales las células T participan en el control de infecciones fúngicas. Estos mecanismos incluyen actividad antifúngica directa, liberación de péptidos antimicrobianos por células CD8⁺, lisis mediante fagocitos y funciones efectoras resultantes de interacciones dinámicas con células T que expresan miembros seleccionados de las familias Vβ del receptor de células T (Romani, 2004). Esta plasticidad funcional señala el potencial de las vacunas para ayudar a pacientes con inmunodeficiencias y se ha observado que las células T CD8⁺ pueden compensar la deficiencia de células T CD4⁺ en modelos experimentales de resistencia inducida por vacunas a hongos endémicos (recordamos que la deficiencia de células T CD4⁺ está fuertemente asociada a la aparición de infecciones fúngicas invasivas) (Romani, 2004). La activación de las células T conduce a la producción de muchos mediadores, como las citoquinas. Debido a su acción sobre los leucocitos circulantes, las citoquinas producidas por las células T específicas de hongos son fundamentales para movilizar y activar los efectores antifúngicos, lo que proporciona un control rápido y efectivo de la infectividad después de que el hongo se haya establecido en los tejidos o se haya propagado a los órganos internos. Por lo tanto, la resistencia del huésped a los hongos parece depender de

la inducción de inmunidad celular, mediada por células T, citoquinas y fagocitos efectores.

Esta respuesta produce la activación de neutrófilos, monocitos/macrófagos y, por parte de la mucosa, células epiteliales, por quimioquinas y citoquinas liberadas por macrófagos y células proinflamatorias TH1 y TH17. Por su parte TH2 y otros linfocitos T reguladores (bajo el control de mecanismos moduladores como la indolamina 2,3-dioxigenasa) liberan citoquinas antiinflamatorias que proporcionan los mecanismos de tolerancia necesarios para equilibrar la inflamación y el daño tisular. Sin embargo, cuando se activa de forma inadecuada o con demasiada fuerza, las respuestas antiinflamatorias TH2 y otras células T reguladoras pueden regular a la baja la inmunidad antifúngica y aumentar la susceptibilidad a la infección (Figura 48).

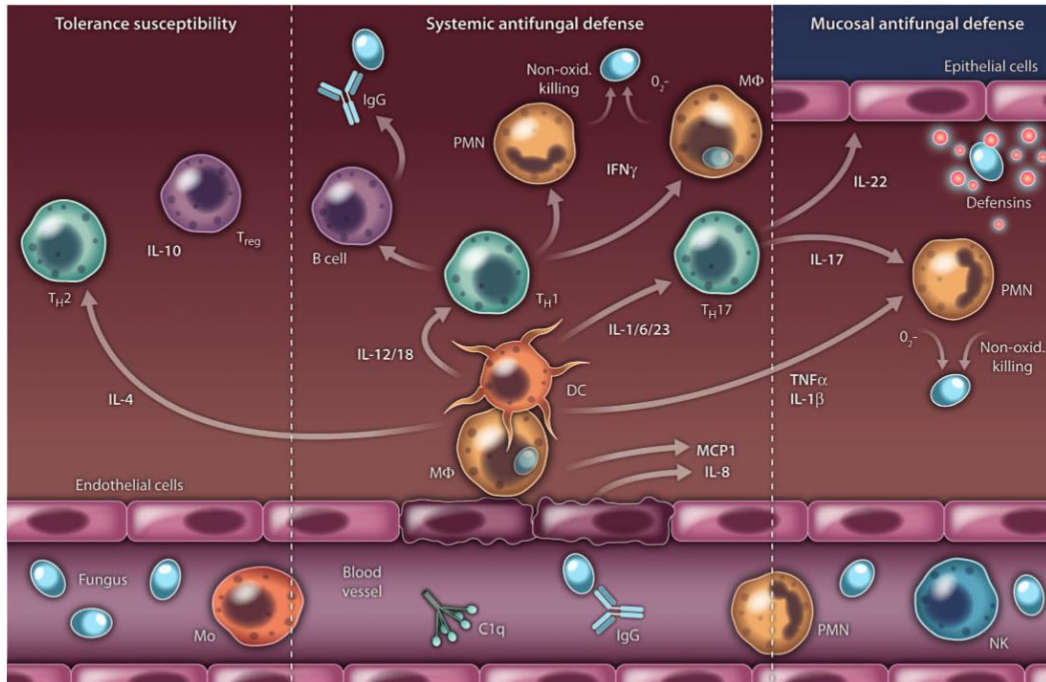


Figura 48. Mecanismos de defensa frente a la infección por hongos. (Brown et al., 2012)

3.1.3. TRATAMIENTOS CONTRA LAS INFECCIONES FÚNGICAS INVASIVAS.

A pesar de que actualmente existen varios fármacos para el tratamiento de infecciones fúngicas invasivas nos encontramos con varios obstáculos a la hora de combatirlos. En primer lugar (y como se ha mencionado anteriormente), los síntomas de las infecciones fúngicas invasivas suelen atribuirse a otras condiciones, de forma que ni siquiera se diagnostica la enfermedad. Aunque la identificación de algunos hongos es sencilla (como es el caso de la detección de antígenos de *Cryptococcus* en sangre), en otros casos es más complicado. Por ejemplo, los cultivos de sangre de aspergilosis invasiva tiene una sensibilidad muy baja y sus síntomas son frecuentemente atribuidos a tuberculosis (Brown et al., 2012).

Aunque los tratamientos antifúngicos contra infecciones fúngicas invasivas han mejorado en los últimos años, sus efectos en pacientes no siempre son óptimos. De entre los diferentes tipos de medicamentos para combatir las infecciones fúngicas invasivas (Figura 49) hay dos que destacan por su efectividad: las equinocandinas y los triazoles de tercera generación.

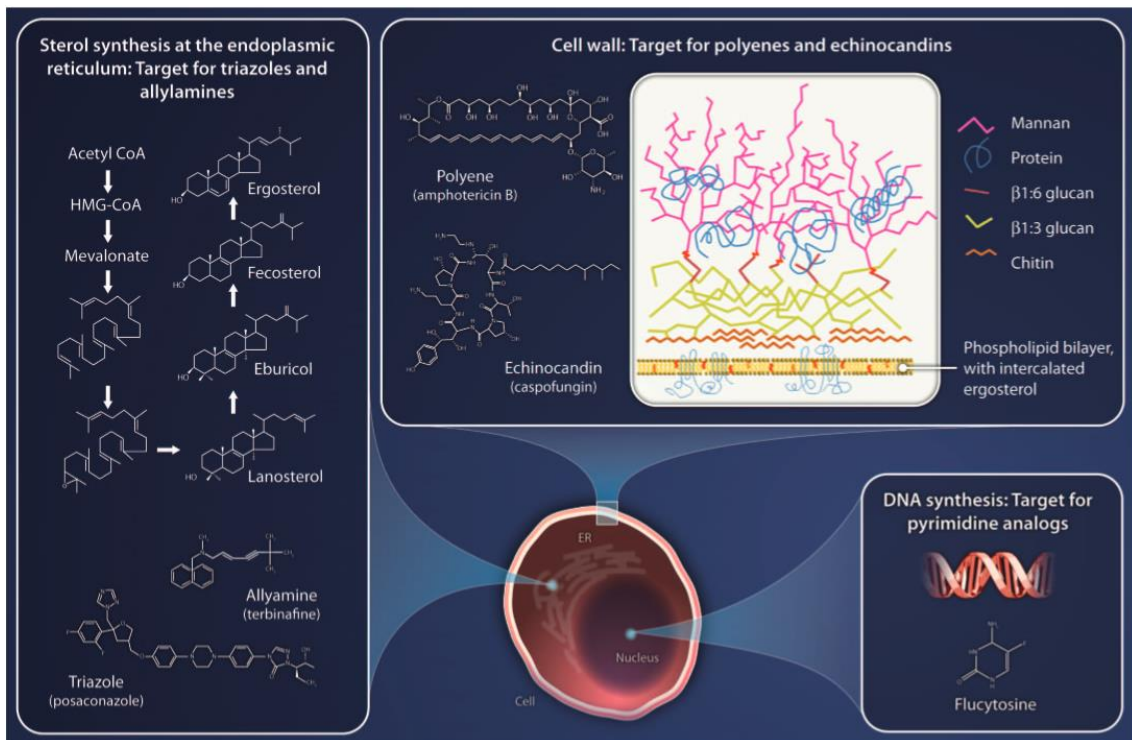


Figura 49. Representación de los procesos afectados por las diferentes drogas antifúngicas utilizadas actualmente. Las estructuras de las drogas también aparecen representadas. (Brown et al., 2012)

Las equinocandinas son metabolitos secundarios de hongos que contienen un núcleo compuesto por un hexapéptido cíclico con residuos lipídicos responsables de su actividad antifúngica. Las equinocandinas inhiben la síntesis del β -1,3-glucano que forma parte de la pared celular de los hongos (es un polisacárido formado por unidades de glucosa y que además se une a otros polisacáridos como quitina) mediante la inhibición no competitiva de la enzima β -1,3-glucano sintasa, de forma similar a como funciona la penicilina en bacterias. Las tres equinocandinas más utilizadas son la caspofungina, la micafungina y la anidulafungina (Figura 50).

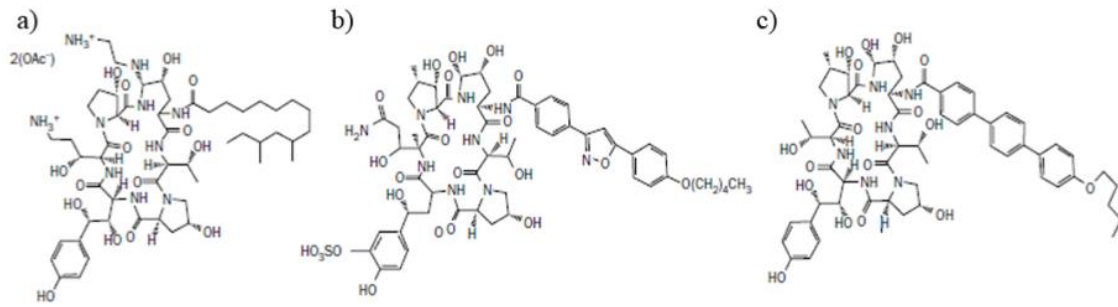


Figura 50. Representación de las estructuras de a) caspofungina, b) micafungina y c) anidulafungina. (Mroczyńska & Brillowska-Dąbrowska, 2020)

Las equinocandinas han mostrado ser efectivas frente a un gran número de hongos y actualmente se utiliza para tratar infecciones fúngicas invasivas causadas por *Candida* y *Aspergillus*, sin embargo, no han demostrado ser efectivas frente a *Cryptococcus* (Tabla 6). Por otro lado, el tratamiento con equinocandinas puede producir numerosos efectos secundarios: enrojecimiento facial, hinchazón, erupción cutánea, prurito, tromboflebitis, hipotensión, fiebre, problemas gastrointestinales (náuseas, vómitos y diarrea), flebitis, anemia, leucopenia, neutropenia, trombocitopenia, niveles anormales de aminotransferasa, fosfatasa alcalina e histamina y toxicidad embrionaria, por lo que no es un tratamiento válido para mujeres embarazadas (Mroczyńska & Brillowska-Dąbrowska, 2020). Además, recientemente se han detectado la aparición de cepas de *Candida* resistentes a equinocandinas asociadas a mutaciones en los genes FKS de *C. albicans* (FKS1) y *C. glabrata* (FKS2). Actualmente hay una nueva equinocandina (rezafungina) en ensayos clínicos que ha demostrado actividad frente a estas cepas resistentes.

Tabla 6. Eficacias de andifulafungina (AND), caspofungina (CSP) y micafungina (MCF) frente a los distintos hongos. +/- indica que se ha observado actividad variable frente al organismo. (Mroczyńska & Brillowska-Dąbrowska, 2020)

Organism	AND	CSP	MCF
<i>Candida albicans</i>	+	+	+
<i>Candida glabrata</i>	+	+	+
<i>Candida parapsilosis</i>	+	+	+
<i>Candida tropicalis</i>	+	+	+
<i>Candida krusei</i>	+	+	+
<i>Candida lusitaniae</i>	+	+	+
<i>Aspergillus fumigatus</i>	+	+	+
<i>Aspergillus flavus</i>	+	+	+
<i>Aspergillus niger</i>	+	+	+
<i>Aspergillus terreus</i>	+	+	+
<i>Acremonium</i>	-	-	-
<i>Alternaria</i>	-	-	-
<i>Blastomyces</i> spp.	+/-	+/-	+/-
<i>Coccidioides</i> spp.	+/-	+/-	+/-
<i>Cryptococcus neoformans</i>	-	-	-
<i>Curvularia</i>	+	+	+
<i>Fusarium</i> spp.	-	-	-
<i>Histoplasma</i> spp.	+/-	+/-	+/-
<i>Mucorales</i>	-	-	-
<i>Rizpous</i>	-	-	-
<i>Scedosporium</i> spp.	-	-	-
<i>Trichoderma</i>	+	+	+
<i>Trichosporon</i>	-	-	-

Por otro lado tenemos los triazoles, compuestos heterocíclicos con un anillo de cinco miembros de dos átomos de carbono y tres de nitrógeno que suelen utilizarse como fungicidas y herbicidas. De entre los triazoles de tercera generación el más relevante es el voriconazol y es en el que nos centraremos a partir de este punto.

El voriconazol es una molécula derivada del triazol (Figura 51) capaz de inhibir el crecimiento de determinados hongos mediante la interrupción de la síntesis de ergosterol fúngico, inhibiendo la enzima lanosterol 14 α -desmetilasa dependiente del citocromo P450, impidiendo la conversión de lanosterol en ergosterol y provocando la acumulación de precursores de esteroides tóxicos, incluidos lanosterol 14 α -metilado, 4,14-dimetilzimosterol y 24-metileno-dihidrolanosterol. La falta de producción de ergosterol causa problemas en la formación de la membrana celular, que desembocan en el cese del crecimiento del hongo (Herbrecht, 2004).

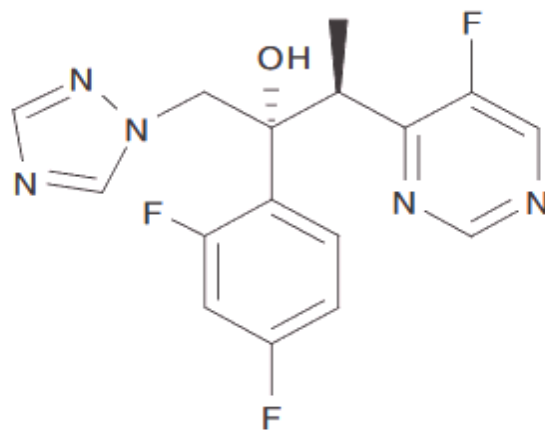


Figura 51. Representación del voriconazol. (Herbrecht, 2004)

El voriconazol se utiliza principalmente para tratar infecciones de *C. albicans* (mostrando actividad incluso con aquellas cepas resistentes a equinocandinas), pero también se ha utilizado para tratar infecciones por aspergillus y cryptococcus. Sin embargo, están apareciendo algunas cepas con resistencia a voriconazol (Herbrecht, 2004). Al igual que las equinocandinas, el voriconazol puede causar efectos secundarios, pero con esta droga

pueden ser incluso más severos. El voriconazol puede causar problemas de visión, náuseas, daño al feto en mujeres embarazadas, dolor abdominal, cansancio extremo, sarpullidos, fiebre, dolor de cabeza e incluso alucinaciones auditivas o visuales, entre otros efectos secundarios.

3.1.4. CARACTERÍSTICAS DE LA PARED CELULAR EN HONGOS.

Como hemos mencionado anteriormente una de las características diferenciadoras de los hongos es que poseen una pared celular que rodea la membrana plasmática. La pared celular tiene una función principalmente protectora, tanto frente a patógenos como frente a diferentes tipos de estrés ambiental como el estrés osmótico. Además, también cumple otras funciones como dar rigidez y forma a la célula o participar en la infectividad del hongo y en la interacción con el medio exterior o entre células, a través de adhesinas o receptores (Pontón, 2008).

La pared celular en hongos tiene una estructura compleja estratificada, compuesta principalmente por quitina, glucanos y glicoproteínas (Figura 52). Las capas más internas de la pared celular poseen una estructura más conservada entre las diferentes especies, mientras que las capas más externas pueden presentar más variaciones (García-Rubio et al., 2020).

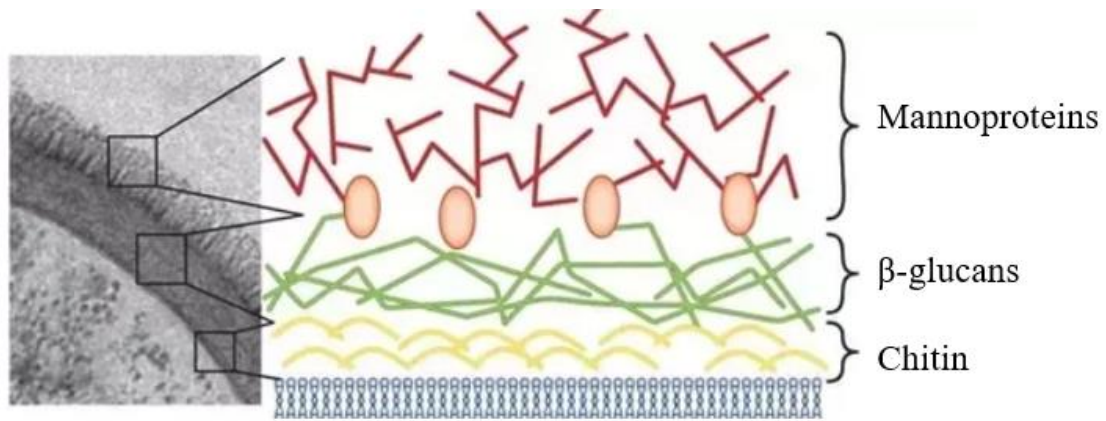


Figura 52. Micrografía electrónica de la pared celular de *C. albicans* junto con un esquema de sus principales componentes. (Modificada de Hardison & Brown, 2012)

La quitina forma la capa más interna de la pared celular. La quitina es sintetizada por la enzima quitina sintasa a partir de UDP-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), formando un polisacárido (quitina) compuesto de unidades de GlcNAc unidas por enlaces β -1,4 que se sitúa en el espacio extracelular junto a la membrana plasmática. La cantidad de quitina en la pared celular puede variar dependiendo de la especie (García-Rubio et al., 2020).

Las glicoproteínas son el segundo componente mayoritario de la pared celular y pueden constituir entre el 30 y el 50% del peso seco de la estructura en levaduras y entre el 20 y 30% en hongos filamentosos. Las proteínas de la pared celular cumplen diferentes funciones, como el mantenimiento de la forma celular, procesos de adhesión, funciones protectoras, transmisión de señales y reorganización de los componentes de la pared celular (Pontón, 2008).

Las paredes celulares de algunos hongos también presentan melanina, un pigmento hidrofóbico de alto peso molecular que protege al hongo frente a estreses ambientales y contribuye en la virulencia del hongo.

Por último, tenemos los glucanos, que son los polisacáridos más importantes para la estructura de la pared celular y pueden suponer entre el 50-60% del peso seco de la pared celular. Los glucanos están formados por repeticiones de glucosa formando tanto enlaces α como β . Los glucanos formados por enlaces tipo α pueden presentar únicamente enlaces α -1,3 o bien una mezcla de α -1,3 y α -1,4. Por su parte, los enlaces tipo β presentan más variedad, pudiendo formar β -1,3 glucanos no ramificados, β -1,3 glucanos con ramificaciones ocasionales de β -1,6 formadas por una única unidad de glucosa, glucanos que contienen enlaces β -1,3 y β -1,4, glucanos que contienen enlaces β -1,3, β -1,4 y β -1,6, β -1,3 glucanos fosforilados, β -1,3 glucanos con numerosas ramificaciones β -1,6 y glucanos formados principalmente por enlaces β -1,6. En la membrana celular de hongos los glucanos más comunes son los glucanos β -1,3 con ramificaciones β -1,6 (Ruiz-Herrera & Ortiz-Castellanos, 2019). Estos glucanos son sintetizados por un complejo de enzimas situadas en la membrana plasmática llamada glucano sintasas que utilizan UDP-glucosa como sustrato. Las primeras glucano sintasas identificadas fueron aquellas codificadas en los genes FKS1 y FKS2 en *S. cerevisiae* y desde entonces se han encontrado ortólogos en varias especies de *Candida*, *Aspergillus* y *Cryptococcus* entre otros hongos (García-Rubio et al., 2020).

Aunque la pared celular comparte características básicas en todos los hongos, podemos encontrar diferencias importantes entre las distintas especies (Figura 53), e incluso entre una misma especie dependiendo de si está formando hifas o no. Por ejemplo, en *Candida* se forma una gruesa capa de manoproteínas que no está presente en otros hongos como *Aspergillus* o *Cryptococcus*. En *Cryptococcus* encontramos una mayor proporción de β -1,6-glucanos que de β -1,3-glucanos (lo contrario que suele verse en otros hongos) y un alto contenido de quitosán (la forma deacetilada de la quitina) en la pared celular, además, algunas cepas de *Cryptococcus* poseen una cápsula externa de exopolisacáridos.

Aspergillus por su parte posee una red de glucanos más compleja, formada mayoritariamente por β -1,3-glucano en conjunción con α -1,3-glucano, galactomanano, galactosaminogalactano y una molécula mixta única de β -1,3-1,4-glucanos que nunca antes se había descrito en hongos, todos ellos unidos covalentemente entre ellos (García-Rubio et al., 2020).

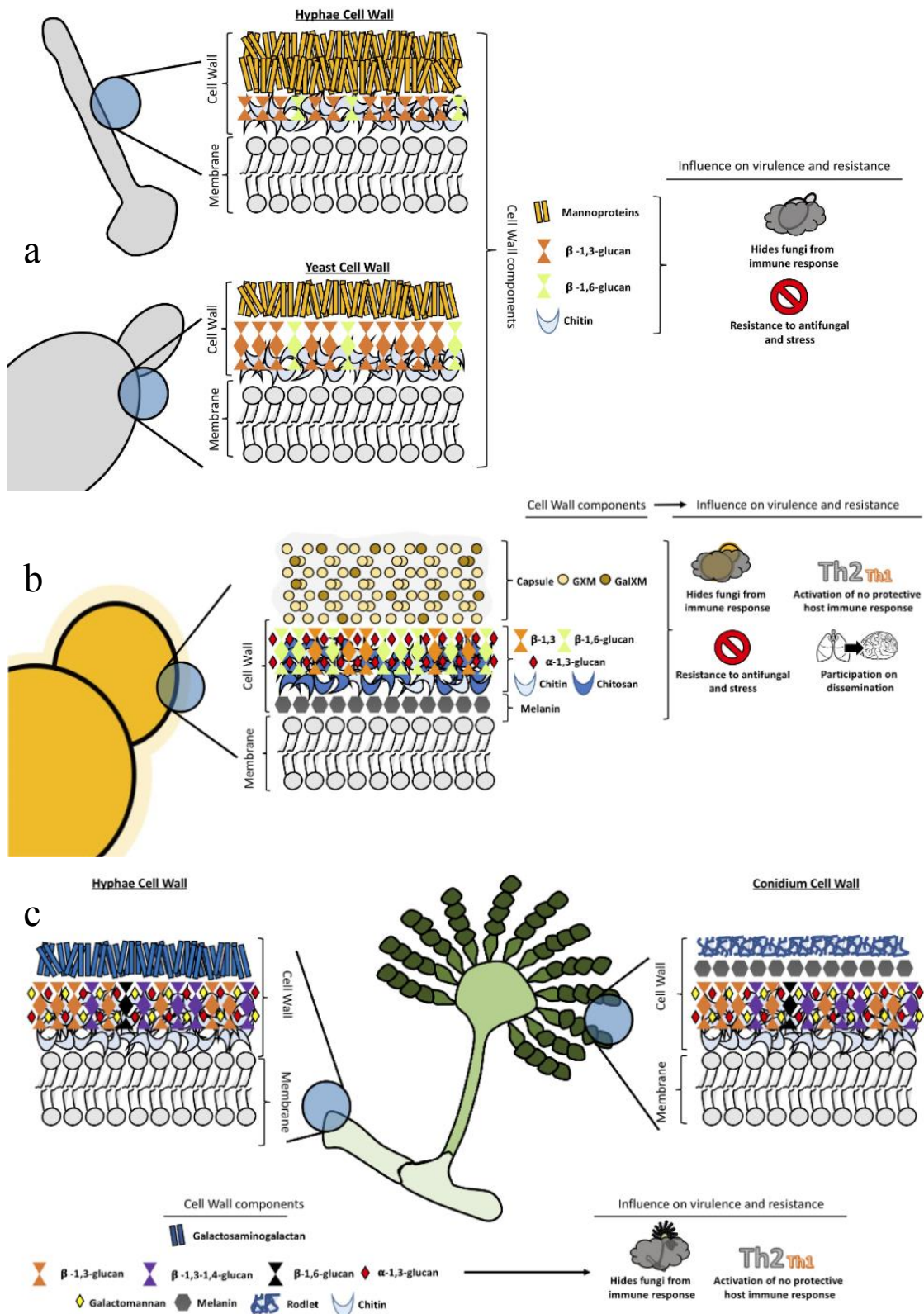


Figura 53. Representación de la organización estructural y composición de a) *C. albicans*, b) *C. neoformans* y c) *A. fumigatus*. También están representados los procesos en los que intervienen los componentes de la pared celular en las distintas especies. Modificada de (García-Rubio et al., 2020)

3.1.4.1. REMODELACIÓN DE LA PARED CELULAR.

Como hemos visto anteriormente, los glucanos de la pared celular de los hongos son una parte clave para la supervivencia del organismo. Estos glucanos están producidos por las diferentes glucano sintetasas, sin embargo, para ser integradas en las estructuras de la pared celular y para formar ramificaciones requieren de la intervención de otras enzimas, las β -1,3-glucanosiltransferasas. Estas enzimas cortan parte de los β -1,3-glucanos formados por las glucano sintetasas gracias a su actividad hidrolasa, creando un extremo reductor que añaden al extremo no reductor de un glucano ya anclado a la pared celular, elongándolo (Mouyna et al., 2000). Las glucanosiltransferasas están ancladas a la membrana plasmática a través de un glicosilfosfatidilinositol (GPI). Estas enzimas fueron identificadas por primera vez en *A. fumigatus* y recibieron el nombre de Gel (*glucan elongating glucanosyltransferase*). Se encontraron siete formas de esta enzima, además de poseer ortólogos en otros hongos, como las proteínas Phr en *C. albicans* o las proteínas Gas en *S. cerevisiae*. La estructura general de estas proteínas consiste en una secuencia señal, un dominio catalítico, un dominio no catalítico rico en cisteínas similar al motivo de unión a carbohidratos CBM43, y una zona rica en serinas y treoninas cerca del extremo carboxilo terminal seguida del anclaje GPI. La presencia o ausencia del dominio de unión a carbohidratos permite la subdivisión de la familia en GH-72⁺ y GH-72⁻. Tanto Gel4 como Gas2 poseen este dominio de unión. Se ha propuesto que el CBM43 actúa como un dominio de unión a glucano, aunque es algo que aún no se ha probado definitivamente (Hurtado-Guerrero et al., 2009).

Estas glucanosiltransferasa no solo se encargan de integrar los nuevos glucanos a la pared celular, sino que también se encargan de remodelar los glucanos de la pared celular en

determinadas situaciones. Las proteínas Gel juegan un papel significativo en la modificación de la pared celular durante la infección de plantas mediada por appressorium (Samalova et al., 2017) y en los mecanismos de respuesta a estrés (Gow et al., 2017).

Como hemos mencionado hay cierta redundancia en los genes que codifican para las glucanosiltransferasas, sin embargo, a pesar de esta redundancia, se ha demostrado que la eliminación de genes concretos puede causar graves carencias al hongo. Aunque *A. fumigatus* posee siete genes para las proteínas Gel, la eliminación de únicamente el gen GEL4 genera un mutante no viable (Gastebois et al., 2010) y la pérdida de los genes PHR1 ó PHR2 en *C. albicans* afecta gravemente a su virulencia (Popolo et al., 2017). Para encontrar ortólogos en *C. neoformans* se realizó una búsqueda BLAST utilizando la secuencia de Gel4 frente al genoma de *C. neoformans*, encontrando un solo ortólogo (41% identidad con Gel4), al que durante este trabajo nos referiremos como *CnGel*.

3.1.5. CARACTERÍSTICAS DE LOS NANOBODIES.

En el capítulo anterior hablamos sobre los anticuerpos IgG, describiendo su estructura y los derivados que podemos generar para trabajar más fácilmente con ellos, como los Fabs y los scFvs. Sin embargo, existe otra estrategia que podemos seguir si buscamos minimizar su tamaño: los nanobodies.

Para refrescar la memoria, los IgGs están compuestos de dos cadenas pesadas con cuatro dominios (tres constantes y uno variable) y dos cadenas ligeras con dos dominios (uno constante y uno variable). Los miembros de la familia de los camélidos además de estas IgGs convencionales también poseen otras inmunoglobulinas formadas únicamente por dos cadenas pesadas de tres dominios (dos constantes y uno variable) llamadas HcAbs. Al igual que con los anticuerpos convencionales, es este dominio variable (VHH) el responsable de la unión con el antígeno (Muyldermans, 2013). Estos fragmentos pueden ser fácilmente identificados mediante “*phage display*” obteniendo solamente este dominio VHH sin los dominios constantes (Figura 54). A esta construcción se le llama nanobody (Nb) o anticuerpo de dominio único (sdAb), manteniendo la capacidad de unión con el antígeno y con un peso mucho menor (~15 kDa) al del anticuerpo estándar.

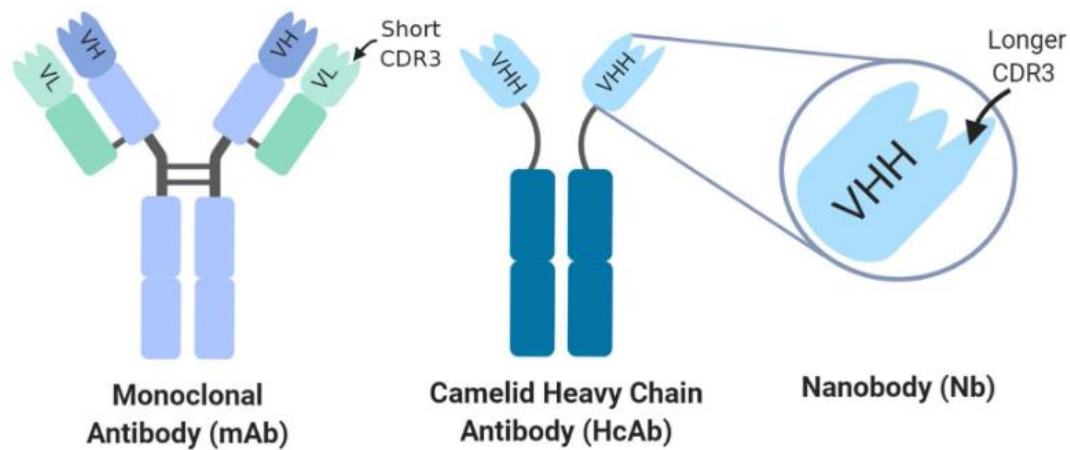


Figura 54. Representación de un anticuerpo IgG estándar, un HcAb y un Nb. (Yang & Shah, 2020)

Al igual que sucede con los dominios variables de los anticuerpos estándar en los VH la variabilidad de secuencia está localizada principalmente en tres regiones hipervariables (siendo el CDR3 más largo que los otros) rodeadas de zonas más conservadas. Su estructura plegada comprende nueve cadenas β (A-B-C-C'-C''-D-E-F-G), organizadas en una hoja β de cuatro cadenas y una hoja β de cinco cadenas, conectadas por bucles y por un enlace disulfuro entre dos cisteínas internas conservadas. Las regiones hipervariables están ubicadas en los bucles H1 a H3 que conectan las hebras B-C, C'-C'' y F-G, respectivamente (Muyldermans, 2013). Aunque estas VHH son muy similares a las VH que encontramos en los anticuerpos estándar hay algunas diferencias, siendo la más importante que en los VHH los loops son más grandes que en los VH, debido a que los VH trabajan junto con los VL mientras que los VHH no disponen de este apoyo y tienen que abarcar una mayor área (Muyldermans, 2013).

Al igual que ocurriría con los scFvs, el tamaño de los Nbs ofrece ciertas ventajas respecto a los anticuerpos completos. Su menor tamaño facilita su penetración en tejidos como tumores, les permite atravesar la barrera hematoencefálica y les concede un tiempo de

depuración más corto y al carecer del Fc presentan una menor inmunogenicidad (al igual que los scFvs). Además, presentan una gran variedad de paratopos y pueden acceder a epítomos que no son accesibles para anticuerpos tradicionales (Yang & Shah, 2020). Sumadas a estas ventajas en el ámbito clínico, los Nbs también son más sencillos de expresar y purificar, además de presentar una mayor solubilidad. Al igual que ocurría con los scFvs, el menor tamaño de los Nbs hace que sean más fáciles de cristalizar que los anticuerpos completos.

Gracias a estas características los Nbs son una herramienta con mucho potencial, tanto para el diagnóstico como para el tratamiento de enfermedades. El uso de los Nbs se ha explotado principalmente en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, donde se han desarrollado múltiples aplicaciones, muchas de ellas aprovechando sus características biofísicas para utilizarlos como vehículos. Se han desarrollado técnicas de “*imaging*” con Nbs, por ejemplo, etiquetando los Nbs con un nucleído emisor de positrones para ser utilizado en PET (Yang & Shah, 2020). También se han utilizado para identificar tumores, con Nbs frente al receptor de factor de crecimiento humano 2 (HER2) siendo capaces de detectar tumores primarios y metastásicos sin causar efectos adversos (Keyaerts et al., 2016). También se han utilizado Nbs para el tratamiento de tumores, siendo el primero de ellos un Nb frente a EGFR que redujo el crecimiento de tumores en ratones inyectados con células A431 (procedentes de carcinoma de epidermis en humanos) por sí solo (Roovers et al., 2007).

Las aplicaciones de los Nbs no se limitan a su uso para el diagnóstico y tratamiento de tumores. Se han desarrollado terapias basadas en Nbs contra IL6R o TNF α para tratar enfermedades inflamatorias, así como Nbs frente al factor Von Willebrand y RANKL para tratar pacientes con púrpura trombocitopénica trombótica (TTP) y con trastornos de

pérdida ósea, respectivamente (Muyldermans, 2013). También se han desarrollado Nbs para tratar infecciones víricas, como las infecciones del tracto respiratorio inferior causadas por virus sincitial respiratorio humano (Detalle et al., 2016) o las graves diarreas en niños causadas por los rotavirus (Sarker et al., 2013).

3.1.6. ANTICUERPOS PARA EL TRATAMIENTO DE INFECCIONES FÚNGICAS.

Como hemos visto antes las infecciones fúngicas invasivas suponen un grave problema para la salud y, aunque hay fármacos disponibles para tratar estas infecciones, no siempre son eficaces y pueden tener efectos secundarios severos. Debido a esto es necesario explorar otras alternativas para el tratamiento de estas enfermedades.

Una de estas alternativas es el uso de anticuerpos, dirigidos principalmente a componentes de la pared celular, que, como se ha mencionado, presentan diferencias entre las distintas especies de hongos, por lo que estos anticuerpos suelen ser específicos para un tipo de infección. Por ejemplo, contra *C. neoformans* se han desarrollado anticuerpos IgG₁ y IgM dirigidos contra el glucuronoxilomanano de la cápsula del hongo, mostrando efectos positivos en ratones infectados con el hongo (Ulrich & Ebel, 2020). Contra *Candida* también se han adoptado diferentes estrategias, por ejemplo, un IgG contra la chaperona de *C. albicans* Hsp90 capaz de inhibir su actividad y que ha mostrado resultados positivos en ensayos de candidiasis sistemática en ratones (Matthews et al., 1991). También se han desarrollado anticuerpos IgG₁ frente a glicoproteínas de la pared celular de *A. fumigatus* que han mostrado una alta efectividad en modelos de ratón (Chaturvedi et al., 2005). No todos los anticuerpos tienen que ir necesariamente dirigidos a antígenos de la cápsula o de la pared celular, Bernardis et al. desarrollaron anticuerpos contra la proteasa secretada Sap2 de *C. albicans* y mostraron que reducía la infección en modelos de vaginitis en rata (De Bernardis et al., 1997).

3.6. REFERENCIAS.

Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A. R., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T.

C. (2012). Hidden killers: Human fungal infections. *Science Translational Medicine*, 4(165). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004404>

Cécile Vincke, Carlos Gutiérrez, Ulrich Wernery, N. D., & Gholamreza Hassanzadeh-

Ghassabeh, and S. M. (2012). Generation of Single Domain Antibody Fragments Derived from Camelids and Generation of Manifold Constructs. *Methods Mol Biol.* https://doi.org/10.1007/978-1-61779-974-7_8

Chaturvedi, A. K., Kavishwar, A., Keshava, G. B. S., & Shukla, P. K. (2005).

Monoclonal immunoglobulin G1 directed against *Aspergillus fumigatus* cell wall glycoprotein protects against experimental murine aspergillosis. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 12(9), 1063–1068. <https://doi.org/10.1128/CDLI.12.9.1063-1068.2005>

De Bernardis, F., Boccanera, M., Adriani, D., Spreghini, E., Santoni, G., & Cassone, A.

(1997). Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats. *Infection and Immunity*, 65(8), 3399–3405. <https://doi.org/10.1128/iai.65.8.3399-3405.1997>

Detalle, L., Stohr, T., Palomo, C., Piedra, P. A., Gilbert, B. E., Mas, V., Millar, A.,

Power, U. F., Stortelers, C., Allosery, K., Melero, J. A., & Depla, E. (2016). Generation and characterization of ALX-0171, a potent novel therapeutic

nanobody for the treatment of respiratory syncytial virus infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 60(1), 6–13. <https://doi.org/10.1128/AAC.01802-15>

Ema Romã o, Vianney Poignavent, Ce´ cile Vincke, C. R., & Serge Muyldermans, and B. M. (2018). *Construction of High-Quality Camel Immune Antibody Libraries*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7447-4>

Galanis, E., Hoang, L., Kibsey, P., Morshed, M., & Phillips, P. (2009). Clinical presentation, diagnosis and management of *Cryptococcus gattii* cases: Lessons learned from British Columbia. *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 20(1), 23–28. <https://doi.org/10.1155/2009/719659>

Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J., & Trevijano-Contador, N. (2020). The Fungal Cell Wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* Species. *Frontiers in Microbiology*, 10(January), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02993>

Gastebois, A., Fontaine, T., Latgé, J. P., & Mouyna, I. (2010). β (1-3)glucanosyltransferase Gel4p is essential for *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell*, 9(8), 1294–1298. <https://doi.org/10.1128/EC.00107-10>

Gow, N. A. R., Latge, J. P., & Munro, C. A. (2017). The fungal cell wall: Structure, biosynthesis, and function. *The Fungal Kingdom, May*, 267–292. <https://doi.org/10.1128/9781555819583.ch12>

Hardison, S. E., & Brown, G. D. (2012). C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nature Immunology*, 13(9), 817–822. <https://doi.org/10.1038/ni.2369>

- Hawksworth, D. L., & Lücking, R. (2017). *Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species*. 1–17. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.FUNK-0052-2016>.Correspondence
- Herbrecht, R. (2004). Voriconazole: Therapeutic review of a new azole antifungal. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 2(4), 485–497. <https://doi.org/10.1586/14787210.2.4.485>
- Hurtado-Guerrero, R., Schüttelkopf, A. W., Mouyna, I., Ibrahim, A. F. M., Shepherd, S., Fontaine, T., Latgé, J. P., & van Aalten, D. M. F. (2009). Molecular mechanisms of yeast cell wall glucan remodeling. *Journal of Biological Chemistry*, 284(13), 8461–8469. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807990200>
- Invitrogen. (2010). Pichia expression vectors for selection on Zeocin™ and purification of secreted, recombinant proteins. *Life Technologies*, 25, 48. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/ppiczalpha_man.pdf
- Jean-Paul Latgé, a G. C. (2019). Aspergillus fumigatus and Aspergillosis in 2019. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(1), 1–75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/CMR.00140-18>
- Kerafast. (n.d.). *Custom Nanobody Production*. Kerafast. <https://www.kerafast.com/productgroup/878/custom-nanobody-production>
- Keyaerts, M., Xavier, C., Heemskerk, J., Devoogdt, N., Everaert, H., Ackaert, C., Vanhoeij, M., Duhoux, F. P., Gevaert, T., Simon, P., Schallier, D., Fontaine, C.,

Vaneycken, I., Vanhove, C., De Greve, J., Lamote, J., Caveliers, V., & Lahoutte, T. (2016). Phase i study of 68Ga-HER2-Nanobody for PET/CT assessment of HER2 expression in breast carcinoma. *Journal of Nuclear Medicine*, 57(1), 27–33. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.162024>

Lee, K. K., Kubo, K., Abdelaziz, J. A., Cunningham, I., de Silva Dantas, A., Chen, X., Okada, H., Ohya, Y., & Gow, N. A. R. (2018). Yeast species-specific, differential inhibition of β -1,3-glucan synthesis by poacic acid and caspofungin. *Cell Surface*, 3(August), 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2018.09.001>

Marshall, D. G. & D. (n.d.). *Aspergillus fumigatus, hyphae, SEM*. <https://wellcomecollection.org/works/jvykwazc>

Matthews, R. C., Burnie, J. P., Howat, D., Rowland, T., & Walton, F. (1991). Autoantibody to heat-shock protein 90 can mediate protection against systemic candidosis. *Immunology*, 74(1), 20–24.

Mazán, M., Ragni, E., Popolo, L., & Farkas, V. (2011). Catalytic properties of the Gas family β -(1,3)-glucanosyltransferases active in fungal cell-wall biogenesis as determined by a novel fluorescent assay. *Biochemical Journal*, 438(2), 275–282. <https://doi.org/10.1042/BJ20110405>

Millipore. (n.d.). *Centrifugal Ultrafiltration devices for...* <https://en.ppt-online.org/344195>

Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W. A., Diaquin, M., Popolo, L.,

- Hartlandt, R. P., & Latgé, J. P. (2000). Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *Journal of Biological Chemistry*, 275(20), 14882–14889.
<https://doi.org/10.1074/jbc.275.20.14882>
- Mroczyńska, M., & Brillowska-Dąbrowska, A. (2020). Review on current status of echinocandins use. *Antibiotics*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/antibiotics9050227>
- Muyldermans, S. (2013). Nanobodies: Natural single-domain antibodies. *Annual Review of Biochemistry*, 82(March), 775–797. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-063011-092449>
- Pandey, A. (2015). *The UNC-53- mediated Interactome Analysis of its Role in the Generation of the C. elegans Connectome* (Issue July).
- Park, B. J., Wannemuehler, K. A., Marston, B. J., Govender, N., Pappas, P. G., & Chiller, T. M. (2009). Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *Aids*, 23(4), 525–530.
<https://doi.org/10.1097/QAD.0b013e328322ffac>
- Pontón, J. (2008). The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin. *Revista Iberoamericana de Micología*, 25(2), 78–82.
[https://doi.org/10.1016/s1130-1406\(08\)70024-x](https://doi.org/10.1016/s1130-1406(08)70024-x)
- Popolo, L., Degani, G., Camilloni, C., & Fonzi, W. A. (2017). The PHR family: The role of extracellular transglycosylases in shaping *Candida albicans* cells. *Journal of*

Fungi, 3(4). <https://doi.org/10.3390/jof3040059>

Romani, L. (2004). Immunity to fungal infections. *Nature Reviews Immunology*, 4(1), 11–23. <https://doi.org/10.1038/nri1255>

Roovers, R. C., Laeremans, T., Huang, L., De Taeye, S., Verkleij, A. J., Revets, H., De Haard, H. J., & Van Bergen En Henegouwen, P. M. P. (2007). Efficient inhibition of EGFR signalling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 56(3), 303–317. <https://doi.org/10.1007/s00262-006-0180-4>

Ruiz-Herrera, J., & Ortiz-Castellanos, L. (2019). Cell wall glucans of fungi. A review. *Cell Surface*, 5(February), 100022. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2019.100022>

Samalova, M., Mérida, H., Vilaplana, F., Bulone, V., Soanes, D. M., Talbot, N. J., & Gurr, S. J. (2017). The β -1,3-glucanosyltransferases (Gels) affect the structure of the rice blast fungal cell wall during appressorium-mediated plant infection. *Cellular Microbiology*, 19(3). <https://doi.org/10.1111/cmi.12659>

Sarker, S. A., Jäkel, M., Sultana, S., Alam, N. H., Bardhan, P. K., Chisti, M. J., Salam, M. A., Theis, W., Hammarström, L., & Frenken, L. G. J. (2013). Anti-rotavirus protein reduces stool output in infants with diarrhea: A randomized placebo-controlled trial. *Gastroenterology*, 145(4), 740-748.e8. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2013.06.053>

Srikanta, D., Santiago-Tirado, F. H., & Doering, T. L. (2014). *Cryptococcus*

neoformans: Historical curiosity to modern pathogen. *Yeast*, 31(2), 47–60.

<https://doi.org/10.1002/yea.2997>

Ulrich, S., & Ebel, F. (2020). Monoclonal antibodies as tools to combat fungal infections. *Journal of Fungi*, 6(1). <https://doi.org/10.3390/jof6010022>

Wang, Z. A., Li, L. X., & Doering, T. L. (2018). Unraveling synthesis of the cryptococcal cell wall and capsule. *Glycobiology*, 28(10), 719–730.

<https://doi.org/10.1093/glycob/cwy030>

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F. T., De Beer, T. A. P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., & Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*, 46(W1), W296–W303.

<https://doi.org/10.1093/nar/gky427>

Yang, E. Y., & Shah, K. (2020). Nanobodies: Next Generation of Cancer Diagnostics and Therapeutics. *Frontiers in Oncology*, 10(July).

<https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01182>

CAPÍTULO 4. ANEXOS.

4.1. LISTADO DE ABREVIATURAS.

ADN. Ácido desoxirribonucleico

ADNc. Ácido desoxirribonucleico complementario

AND. Andifulafungina

Antígeno T. Gal β 1-3NAc α 1-O-Ser/Thr

Antígeno Tn. GalNAc α 1-O-Ser/Thr

Antígeno ST. Neu5Ac α 2-3Gal β 1-3GalNAc α 1-O-Ser/Thr

Antígeno STn. Neu5Ac α 2-6GalNAc α 1-O-Ser/Thr

ARN. Ácido ribonucleico

A. fumigatus. Aspergillus fumigatus

ATP. Adenosín trifosfato

C1GalT1. N-acetilgalactosamina β -1,3-galactosiltransferasa

C. albicans. Candida albicans

C. glabrata. Candida glabrata

Células CAR-T. Células T con receptores quiméricos de antígenos

CDR. Regiones determinantes de complementariedad

CH. Región constante de la cadena pesada de un anticuerpo

CL. Región constante de la cadena ligera de un anticuerpo

C. gattii. Cryptococcus gattii

C. neoformans. Cryptococcus neoformans

C. elegans. Caenorhabditis elegans

CSF. Caspofungina

DC. Células dendríticas

dGel4. Gel4 desglucosilada

DMSO. Dimetilsulfóxido

DTT. Ditioneitol

EDTA. Ácido etilendiaminotetraacético

EGFR. Receptor del factor de crecimiento epidérmico

E. coli. Escherichia coli

Fab. Fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo

Fc. Fragmento cristalizable de un anticuerpo

FID. Difusión de interfaz libre

F.U. *Fluorescent units* / Unidades de fluorescencia

Gel. *Glucan elongating glucanosyltransferase* / Glucanosiltransferasa elongadora de glucanos

gGel4. Gel4 glicosilada

GlcNAc. N-Acetilglucosamina

GPI. Glicosilfosfatidilinositol

GXM. Glucuronoxilomanano

GXMGal. Glucuronoxilomanogalactano

H3-K9. Lisina 9 de la histona 3

HC. Cadena pesada de un anticuerpo

HcAbs. Anticuerpos de cadena pesada

HEPES. Ácido 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfónico

IFN- γ . Interferón γ

IL6R. Receptor de interleukina 6

Ig. Inmunoglobulina

IMAC. Cromatografía de afinidad de metales inmovilizados

IPTG. Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

ITC. Calorimetría de Titulación Isotérmica

K_D. Constante de disociación

LB. Caldo de Lisogenia (Lysogeny broth)

LB/LS. LB con poca sal

LC. Cadena ligera de un anticuerpo

MAD. Difracción anómala de múltiples longitudes de onda

MBP. Proteína de unión a maltosa

MCF. Micafungina

MD. Dinámica molecular

MIR. Reemplazo isomorfo múltiple

MR. Reemplazamiento molecular

MST. Termoforesis a microescala

MUC. Mucina

Nb. Nanobody

Células NK. Células *natural killer*

PBS. Tampón fosfato salino

PRR. Receptor de reconocimiento de patrones

PKM2. Piruvato quinasa M2

VH. Región variable de la cadena pesada de un anticuerpo

VHH. Región variable de la cadena pesada de un anticuerpo de cadena pesada

VL. Región variable de la cadena ligera de un anticuerpo

VNTR. *Variable number tandem repeat* / Repeticiones en tándem de número variable

VOR. Voriconazol

S. cerevisiae. Saccharomyces cerevisiae

ScFv. *Single chain Fragment variable* / Fragmento variable de cadena única

SdAb. Anticuerpo de dominio único

SDS. Dodecilsulfato sódico

SOB. Medio súper óptimo (Super optimal broth)

SOC. Medio súper óptimo con represión de catabolitos

SPPS. Síntesis de péptidos en fase sólida

STD-NMR. Espectroscopia de resonancia magnética nuclear de diferencia de transferencia de saturación

TB. Terrific broth

TLR. Receptor tipo Toll

TNF- α . Factor de necrosis tumoral α

TRIC. Cambio de intensidad relacionado con la temperatura (en un experimento de ITC)

TRIS. Tris(hidroxietil)aminometano

UDP-glucosa. Uridina difosfato glucosa

WT. *Wild type* o silvestre

YNB. Base nitrogenada de levadura

YPD. *Yeast extract Peptone Dextrose* / Extracto de levadura, peptona, dextrosa

4.2. RECETAS.

4xTES

0.5 M sacarosa

0.2 M TRIS pH 8

0.5 mM EDTA

Buffer M9

0.6% (w/v) Na₂HPO₄

0.5% (w/v) NaCl

0.3% (w/v) KH₂PO₄

1 mM MgSO₄

LB/Agar

1% (w/v) triptona

0.5% (w/v) extracto de levadura

1% (w/v) NaCl

1.5% (w/v) agar

LB/LS

1% triptona (w/v)

0.5% extracto de levadura (w/v)

0.5% NaCl (w/v)

pH 7.5

Medio BMGY

1% (w/v) extracto de levadura

2% (w/v) peptona

100 mM tampón fosfato (pH 6,0)

1.34% (w/v) base nitrogenada de levadura (YNB) sin aminoácidos ni sulfato de amonio

1% (v/v) glicerol

1% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.04% (w/v) de biotina

Medio BMMY

1% (w/v) extracto de levadura

2% (w/v) peptona

100 mM tampón fosfato (pH 6,0)

1.34% (w/v) base nitrogenada de levadura (YNB) sin aminoácidos ni sulfato de amonio

1% (v/v) metanol

1% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.04% (w/v) de biotina

SOC

2% (w/v) triptona

0.5% (w/v) extracto de levadura

0.05% (w/v) NaCl

10 mM MgCl_2

20 mM glucosa

Solución de acetato de litio

100 mM acetato de litio

0.6 M sorbitol

10 mM TRIS pH 7.5

10 mM DTT

Tampón de carga de proteínas

24% (v/v) TRIS 1M pH 6.8

8% (w/v) SDS

40% (v/v) glicerol

10% (v/v) β -mercaptoetanol

0.1% (w/v) azul de bromofenol

TB

0.23% (w/v) KH₂PO₄

1.625% (w/v) K₂HPO₄

1.2% (w/v) triptona

2.4% (w/v) extracto de lavadura

0.4% (v/v) glicerol

0.1% (w/v) glucosa

2 mM MgCl₂

4.3 PROTEÍNAS RECOMBINANTES UTILIZADAS EN ESTA TESIS.

ScFv-5E5

QVQLQQSDAELVKPGSSVKISCKASGYTFTDHAHWVKQKPEQGLEWIGHFSP
GNTDIKYNDKFKGKATLTVDRSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCKTSTFFDYWG
QGTTTLTVSSSSGGGGSGGGGGSSGSELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMICKSSQS
LLNSGDQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIFWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS
SVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLELKGHHHHHHH

MW: 27284.15 Da

PI: 6.81

$\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{scFv-5E5}) = 43890 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Número de residuos totales: 253

Número de residuos cargados positivamente (Asp + Glu): 21

Número de residuos cargados negativamente (Arg + Lys): 20

ScFv-5E5-H32^HA/H35^HA

QVQLQQSDAELVKPGSSVKISCKASGYTFTDAAIAWVKQKPEQGLEWIGHFSP
GNTDIKYNDKFKGKATLTVDRSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCKTSTFFDYWG
QGTTTLTVSSSSGGGGSGGGGGSSGSELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMICKSSQS
LLNSGDQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIFWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTIS
SVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLELKGHHHHHHH

MW: 27152.03 Da

PI: 6.71

$\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{scFv-5E5}) = 43890 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Número de residuos totales: 253

Número de residuos cargados positivamente (Asp + Glu): 21

Número de residuos cargados negativamente (Arg + Lys): 20

ScFv-5E5-Y100^LA

QVQLQQSDAELVKPGSSVKISCKASGYTFTDHAHWVKQKPEQGLEWIGHFSP
GNTDIKYNDKFKGKATLTVDRSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCKTSTFFDYWG
QGTTTLTVSSSSGGGGSGGGGGSSGSELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMICKSSQS
LLNSGDQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIFWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTIS
SVQAEDLAVYYCQNDYSAPLTFGAGTKLELKGHHHHHHH

MW: 27192.06 Da

PI: 6.81

$\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{scFv-5E5}) = 42400 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Número de residuos totales: 253

Número de residuos cargados positivamente (Asp + Glu): 21

Número de residuos cargados negativamente (Arg + Lys): 20

ScFv-5E5-F102^HA

QVQLQQSDAELVKPGSSVKISCKASGYTFTDHAHWVKQKPEQGLEWIGHFSP
GNTDIKYNDKFKGKATLTVDRSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCKTSTFADYWG
QGTTLTVSSSSGGGGSGGGGGSSGSELVMTQSPSSLTVTAGEKVTMICKSSQS
LLNSGDQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIFWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFLTIS
SVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLELKGHHHHHHH

MW: 27208.06Da

PI: 6.81

$\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{scFv-5E5}) = 43890 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Número de residuos totales: 253

Número de residuos cargados positivamente (Asp + Glu): 21

Número de residuos cargados negativamente (Arg + Lys): 20

AfGel4

TLPVIEAKGNKFFYSNNGTEFFIRGVAYQQEYQANGTSTENSDYTDPLANVDNC
KRDIPYLKQLRTNVIRTYAVDPTKDHDECMKLLDDAGIYLITDLSAPSESINRAD
PAWNTDLYKRYTSVIDAFKYSNVIGFFAGNEVANDNNNTNSIAYVKA AVR
MKS YIKSKDYRSSLVGYATDDDAHIRADLADYL VCGDKESSIDMFGYNIYEW
CGDSSFEKSGYKDRTEEF SKYPVPAFFSEYGCIDPKPRKFTDVAALYGPQMNDV
WSGGIVYMYFQEANDYGLVSVSGDNVKT KEDFSYLSVQM QKVTATGVNSAS
YTASNTAVPTCPSVGAKWEASNKLPPSPNSELCD CMVETLSCTVKDSVDEKEY
GDLFDYLCAAGVCGGINSNSTSGDYGAYSVCSAKQLSFVMNQYYKKNKAA
TACDFDGKAQTKKGADASGSCASLISQAGTAGTGSV TAGATGSSGSHHHHHH

MW: 51993.42 Da

PI: 4.98

$\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{scFv-5E5}) = 69680 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Número de residuos totales: 476

Número de residuos cargados positivamente (Asp + Glu): 60

Número de residuos cargados negativamente (Arg + Lys): 44

CaPhr1

STPPVEVVGKIFYFSNNGSQFLIRGIA YQQDAAGSVSSGYDADPNRKYNDPLA
DRDACKRDVKYFKESNTNLTNRVY AIDPKDHEECMKIFSDAGIYIVADLSEPTV
SINRNNPEWNL DLYKRYTKVIDKMQEYSNVLGFFAGNEVTN NRSNTDASAFVK
AAIRDMKKYIKESDYRQIPVGYSSNDDEEIRVAIADYFSCGSLDDRADFFGINM
YEWCGKSTFETSGYKDRTEEIKNLTIPAFFSEYGCNANRPRLFQEIGTLYSDKMT
DVWSSGGIVYMYFEEANKYGLVSVDGNSVKTLSDYNNYKSEMKNISPSLAHTST
LSSDASKTLQCPGTAASTWKAATNLPPTPDESYCDCISKSLECVVADDVDKED
YGDLFGQVCGYIDCSAISADGSKGEYGVASFCSDKDRLSYVLNQYYLDQDKKS
SACDFKGSASINSKASASGSCKAVSGVATGKAS

MW: 51079.41 Da

PI: 4.75

$\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{scFv-5E5}) = 66700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Número de residuos totales: 562

Número de residuos cargados positivamente (Asp + Glu): 67

Número de residuos cargados negativamente (Arg + Lys): 50

CaPhr2

AEDLPAIEIVGNKFFYSNNGSQFYIKGIA YQQNNLDSNESFVDPLANPEHCKRDI
PYLEAVDYDSNVIRVYALDTSQDHTECMQMLQDAGIYVIADLSQPDESINRDD
PSWDLDFERYTSSVVDLFHNYTNILGFFAGNEVTNKKSNTDASAFVKA AIRDT
KAYIKSKGYRSIPVGYSANDDSAIRVSLADYFACGDEDEEAADFFGINMYEWCG
DSSYKASGYESATNDYKNLGIPIFFSEYGCNEVRPRKFTEVATLFGDQMTPVWS
GGIVYMYFEEENNYGLVSIKDNTVSTLKDYSYYSSEIKDIHPSSAKASAESASSIS
RTTCPTNTNNWEASTNLPPTPDKEVCECMSASLKC VVDDKVDSDDYSDLFSYI
CAKIDCDGINANGTTGEYGAYSPCHSKDKLSFVMNLYYEQNKESKSACDFGGS
ASLQSAKTASSCSAYLSSAGSSGLG

MW: 50209.07 Da

PI: 4.37

$\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{scFv-5E5}) = 68190 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Número de residuos totales: 455

Número de residuos cargados positivamente (Asp + Glu): 68

Número de residuos cargados negativamente (Arg + Lys): 35

CnGel (H99)

LPNITRTGKLYLYDESGNRFYIKGVAYQPEGELAASSDSNSANGGFPEPSSFHDPL
SSPQNCTRDLPYLQQLGVNAVVRVYSVNSSLNHDDCMKMLNDAGIYVLLDLSLP
LNGSIDRSSPSWSTNLLNEYIETIDAFKKNYENVLGYNVGNVINLASNTNAAPFV
KAAARDIKAYLKSVGSSALVGYAAVDGEPDFRNSLAEYLTCGGDSIAVDLYGL
NNYEWCGNQINSSNWNTITEGFSDLPVATYMSEFGCITSPRLWTEVAALFAS
PVSDVFSGGVAFSYFPTSDNYGMVTISGNDT VTVSDDFTRLATQYNSTSPNSP
TKSSVTANETDCPAESDSSLASSTLPPTPNESVCNCINENSLCKVKQSSANSPEI
VGALLDYACSLGSTDSSASC DPIAGNGTSGTYGQLSFCSPAIKLSYVMSTYYQI
NPEDTSCDFAGNASLSANRPNTVQDANAAASSCLAHHHHH

MW: 50755.67 Da

PI: 4.38

$\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{scFv-5E5}) = 68190 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$

Número de residuos totales: 476

Número de residuos cargados positivamente (Asp + Glu): 49

Número de residuos cargados negativamente (Arg + Lys): 21

ScGas2

MNKKQNFYAAIIVAIFLCLQLSHGSSGVSF EKTPAIKIVGNKFFDSESGEQFFIKG
IAYQLQRSEEELSNANGAFETSYIDALADPKICLRDIPFLKMLGVNTRLRVYAIDP
TKSHDICMEALSAEGMYVLLDLSEPDISINRENPSWDVHIFERYKSVIDAMSSFP
NLLGYFAGNEVTNDHTNTFASPFVKA AIRDAKEYISHSNHRKIPVGYSTNDDA
MTRDNLARYFVCGDVKADFYGINMYEWCGYSTYGTSGYRERTKEFEGYPIPVF
FSEFGCNLVRPRPFTEVSALYGNKMSSVWSGGLAYMYFEEENEYGVVKINDND
GVDILPDFKNLKKFAKADPKGITEEYLTAK EPTEVESVECPHIAVGVWEANE
KLPETPDRSKACCLDEILPCEIVPFGAESGKYEEYFSYLCSKVDCSDILANGKTG
EYGEFSDCSVEQKLSLQLSKLYCKIGANDRHCP LNDKNVYFNLESLQPLTSESIK
KNVFDSIRNITYNHGDYSKSNPSRSKESLNVKYP SSEERENDGTIAFKTSGFVILL
ISMIAAGILL

MW: 62362.26 Da

PI: 4.87

$\epsilon_{280 \text{ nm}} (\text{scFv-5E5}) = 66700 \text{ M}^{-1} \text{cm}^{-1}$

Número de residuos totales: 555

Número de residuos cargados positivamente (Asp + Glu): 81

Número de residuos cargados negativamente (Arg + Lys): 55