

Proyecto: Métodos de caracterización de biomarcadores para prognosis en ELA.
I.P. Francisco Javier Oroz Gardo

El Proyecto persigue generar variantes del fragmento prionoide de la proteína TDP-43 para usarlo como reactivo de amplificación de núcleos presentes en muestras de pacientes (líquido cefalorraquídeo, plasma) de ELA y FTD y así, servir de reactivo de diagnóstico bioquímico de la enfermedad.

Como resumen, durante el año de proyecto hemos generado 9 variantes de fragmentos de TDP-43 humana que nos ayudan a comprobar la especificidad de la sonda.

Hemos establecido un método robusto, reproducible y eficiente para generar todos los fragmentos diferentes (con modificaciones oxidativas) los cuales pueden ser empleados en laboratorios de diagnóstico de una forma rápida y efectiva. En concreto, se almacenan muestras congeladas de 100 microlitros conteniendo las sondas en concentraciones 100-130 microMolar en 20 mM Hepes pH 7.0 y 6 M GdmHCl. Para realizar el ensayo, las alícuotas de la sonda se descongelan y filtran a través de filtros de 50 kDa de cutoff para eliminar agregados preformados que pudieran tener un impacto en la reacción. Una vez filtrados, se usan 4 microlitros de la sonda en volúmenes de reacción de 150 microlitros. Hemos estado usando 10-15 microlitros de LCR (líquido cefalorraquídeo) como validación del ensayo, pero es probable que debamos aumentar el volumen para incrementar el número de propagones (núcleos) a amplificar por nuestra sonda. Sin embargo, el limitado volumen de las muestras recibidas nos obliga a emplear volúmenes de reacción reducidos. Aún así, hemos conseguido observar especificidad y sensibilidad en muestras de ELA/FTD por nuestro método de amplificación SAA (Figura 1).

Para validación del ensayo, hemos recibido muestras de los siguientes hospitales:

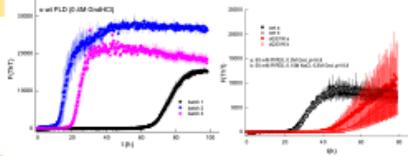
- El Dr. Oriol Dols de la clínica Sant Pau (Barcelona) nos envió en mayo'24 muestras de LCR de 20 pacientes de ELA, 30 pacientes de FTD y 30 controles.
- En diciembre de 2022, recibimos muestras de la Dr. Raquel Sánchez-Valle del Hospital Clinic (Barcelona) de 6 pacientes de ELA, 7 pacientes de FTD y 5 pacientes de Alzheimer.
- En septiembre de 2024 hemos recibido muestras de TargetALS: muestras de 10 pacientes de ELA esporádica, 10 muestras de pacientes con mutaciones y 10 sujetos sanos.
- Actualmente estamos en conversaciones con Mónica Povedano del Hospital de Bellvitge (Barcelona) que tiene una gran cantidad de muestras (estratificadas y longitudinales) de pacientes de ELA, diferenciando incluso entre *slow* y *fast progressors*.

En resumen, tal y como se muestra en la Figura 1, hemos determinado que existen diferencias significativas en la cinética de agregación entre los distintos batches. Tras un examen detallado, concluimos que las diferencias se deben a los procesos de incubación en urea, lo cual promueve una dehidratación dependiente del tiempo de incubación. Esa dehidratación introduce cargas negativas, impactando significativamente en las cinéticas de agregación. Por tanto, estamos estudiando mutantes que imiten esa dehidratación la cual puede retrasar la agregación. Además, hemos estudiado el impacto de las condiciones de tampón (pH y fuerza iónica) en los resultados experimentales. En particular, estas variables no afectan a la proteína pero afectarán a su resultado en presencia de LCR.

AMPLIFICACIÓN

COMPARACIÓN DE BATCHES

- 1 Los batch de proteínas se analizaron en función de su capacidad de ensamblaje en: 20 mM Hepes, 0.4 M GndHCl, 0.5 mM EDTA, 0.5 mM DTT pH 7.0, 0.03% azida sódica. Las diferencias de deben al proceso de purificación/almacenaje



RESPUESTA ANTE FIBRAS SINTÉTICAS

- 2 Todos los batch de proteínas reponden ante la presencia de 0.1% de fibras sintéticas de PLD wt

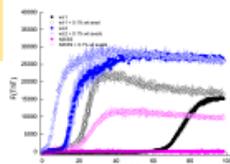
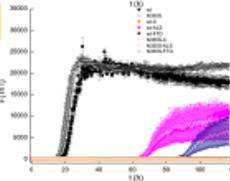


Figura 1. Validación de nuestras sondas para SAA.

Batches de proteína diferentes muestran una cinética de agregación alterada, lo cual puede deberse a protocolos diferentes de incubación en urea (la urea promueve la deamidación y por tanto convierte la Q/N en E/D, aumentando las cargas negativas lo cual impacta en la agregación). Hemos generado mutantes que impedirían o minimizarían este efecto para aumentar la reproducibilidad. Este efecto se observa en variantes diferentes, por lo que no es dependiente de secuencia, si no que es debido al protocolo de purificación.

RESPUESTA ANTE LCR

- 3 El sustrato de TDP-43 preparado fresco amplifica de forma diferencial semillas de ELA/FTD



Todas las variantes muestran cinéticas de agregación aceleradas en presencia de fibras sintéticas (fibras formadas *in vitro*) lo cual significa que son capaces de reconocer propagones.

Las sondas muestran especificidad de muestras de paciente frente a control.

Por tanto, hemos mejorado la calidad de las sondas generando una batería de variantes que aumentan la sensibilidad. Estamos terminando el protocolo para establecer el método definitivo de diagnóstico.

Con respecto al Objetivo 2, hemos caracterizado los motivos que son reconocidos de forma preferencial en TDP-43 soluble, oligomérica y fibrilar por *arrays* de péptidos. Esta información es esencial para diseñar epítopos antigénicos específicos para la producción de *nanobodies* de camélidos o para generar *nanobodies* sintéticos o recombinantes. Hemos generado los péptidos de interés por síntesis química como antígenos para inmunización.

Una vez que los péptidos sean validados, pretendemos generar *nanobodies* por inmunización de una llama mediante un encargo a una compañía, o bien mediante procesos recombinantes en el laboratorio. Una vez los hayamos generado, emplearemos esos *nanobodies* para aislar los agregados de plasma y poder usar este fluido biológico (de obtención mucho menos invasiva que el LCR) para diagnóstico de ELA/FTD.

Con respecto al objetivo 3, estamos realizando un estudio estructural pormenorizado del polimorfismo de las fibras amiloides de TDP-43 por crio-microscopía electrónica, lo cual nos permitirá revelar determinantes estructurales que definan las variantes generadas y su posible correlación con el desarrollo de la patología.