



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CARACTERISTICAS INMUNOLOGICAS Y ESTRUCTURALES DE MIMOTOPOS DE NOXIUSTOXINA, SELECCIONADOS DE BIBLIOTECA DE PEPTIDOS EN FAGO POR MEDIO DE DOS ANTICUERPOS MONOCLONALES.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE BIOLOGA

PRESENTA

Vasilevskaia Tatiana

Director de Tesis Dr. Karlen Gazarian.

MEXICO, D.F.

1999

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

28-10-99





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO  
Jefa de la División de Estudios Profesionales  
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Características inmunológicas y estructurales de mimotopos de noriustoxina, seleccionados de biblioteca de péptidos - en fago por medio de dos anticuerpos monoclonales"

realizado por Tatiana Vasilevskaia

Con número de cuenta 94618295 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de tesis

Propietario Dr. Karlen Gazarian Gazarian

Propietario Dr. Luis Felipe Jiménez García

Propietario Dr. Víctor Manuel Valdés López

Suplente M. en IBB Saúl Cano Colín

Suplente M. en C. Tatiana Gazarian Ananjanz

*Edna M. Suarez D.*

Consejo Departamental de Biología  
DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ

## RESUMEN:

Las toxinas de los alacranes son venenos muy poderosos. Al picar un alacrán a una persona se producen síntomas a nivel del sistema nervioso simpático, parasimpático y efectos paralíticos.

Este trabajo tiene una gran importancia desde los puntos de vista de la investigación aplicada, como la básica, ya que actualmente no se cuenta con un método efectivo de protección (ni a nivel de medicamento, ni a nivel del sistema inmune, ya que la persona fallece antes de que haya producción de anticuerpos). La importancia básica de este trabajo radica en el uso de la nueva y poderosa técnica de expresión de péptidos en fago ("Phage Display") en la determinación de epítomos de la toxina.

## INDICE:

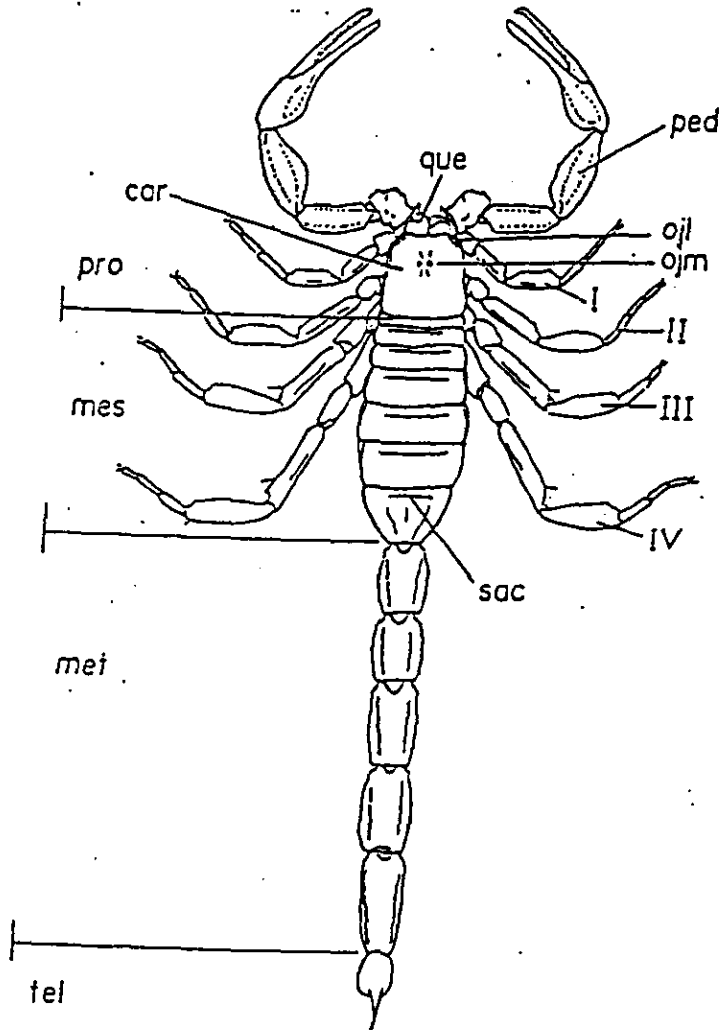
INTRODUCCIÓN:	4
Diagnosis del Orden Scorpiones.	4
Toxinas de los alacranes.	7
<u>Generalidades del veneno.</u>	7
<u>Acción del veneno.</u>	9
<u>Importancia médica.</u>	10
Noxiustoxina (NTX).	11
Obtención de anticuerpos monoclonales contra NTX.	14
Propiedades antigénicas de NTX.	15
Estructura del bacteriófago M13:	16
<u>Datos generales.</u>	16
<u>Proteínas p3 y p8.</u>	20
Ciclo de vida del bacteriófago M13.	21
Expresión de péptidos en fago ("Phage display"):	23
<u>Generalidades.</u>	23
<u>Sistemas de péptido en fago.</u>	24
<u>El sistema fágico p3.</u>	28
<u>Uso y perspectivas.</u>	29
OBJETIVOS.	31

<b>MATERIALES Y METODOS:</b>	<b>32</b>
<b>Materiales.</b>	<b>34</b>
Medios de cultivo.	35
Amortiguadores y soluciones.	35
Biotamizaje ("Biopanning").	37
Titulación.	41
Aislamiento de clones.	42
Amplificación.	43
Purificación del DNA.	43
<i>Determinación de la secuencia.</i>	45
Análisis inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA).	48
<b>RESULTADOS.</b>	<b>51</b>
Los clones seleccionados de una biblioteca fágica de 12 aminoácidos por medios de monitoreo con BNTX16.	51
Los clones seleccionados de una biblioteca fágica de 12 aminoácidos por medios de monitoreo con BNTX18.	56
<b>DISCUSIÓN.</b>	<b>64</b>
<b>CONCLUSIONES.</b>	<b>76</b>
<b>REFERENCIAS.</b>	<b>77</b>

## INTRODUCCION.

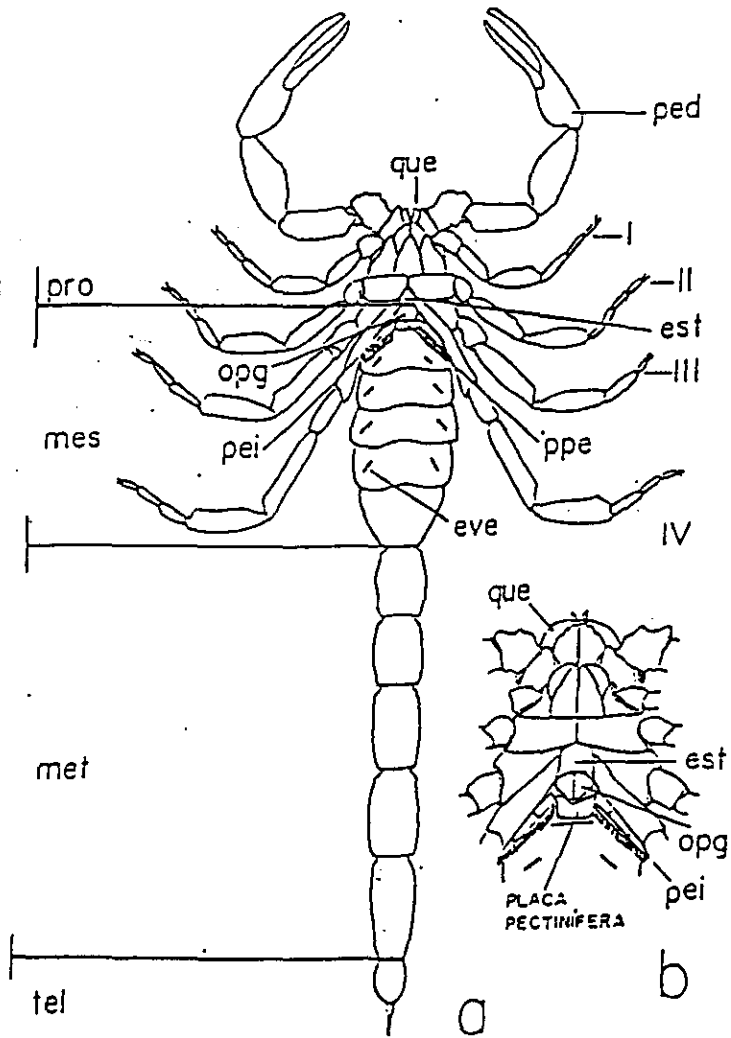
### Diagnosis del Orden Escorpiones:

Los miembros de este grupo se conocen en México como alacranes o escorpiones y se caracterizan por presentar el prosoma articulado al opistosomá a todo lo ancho, estando cubierto por un caparacho dorsal único (figura 1 y 2). El caparacho presenta dos ojos medios y dos a cinco pares de ojos laterales, aunque existen especies anoftalmas. Los quelíceros tienen forma de pinza y están formados por tres artejos. Los pedipalpos son grandes y están compuestos por seis segmentos, con las tibia y los tarsos modificados a manera de pinzas. Los cuatro pares de patas presentan siete artejos, con el tarso biarticulado y con dos uñas en su parte distal. El opistosoma se encuentra diferenciado en dos porciones: la anterior o mesosoma, compuesta por siete segmentos visibles anchos y la posterior o metasoma, formada por cinco segmentos anillados delgados (que aparentan una cola) y el telson vesicular con un aguijón en su extremo terminal. El primer segmento opistosomal (el primero visible) presenta ventralmente un par de opérculos genitales que cubren el gonoporo y, por detrás de él, originados del segundo segmento visible, una placa que da origen a un par de apéndices a manera de peines. Los segmentos mesosomales tercero al sexto muestran cada uno un par de filotraqueas ventrales. (Vazquez-Garcia y col., 1987)



**Figura 1.** Vista dorsal de un alacrán mostrando sus partes. car: caparacho; mes: mesosoma; mei: metasoma; ojl: ojo lateral; ojm: ojo medio; ped: pedipalpos; pro: prosoma; que: queliceros; sac: surco antecostal; tel: telson; I, II, III, IV: primero al cuarto par de patas. (Tomado de Vázquez-García, 1987)





**Figura 2.** Vista ventral de un alacrán mostrando sus partes. a) cuerpo completo. b) detalle del área esterno-genital. est: esternón; eve: estigma ventilador; mes: mesosoma; met: metasoma; opg: opérculo genital; ped: pedipalpos; pei: peines; ppe: placa pectinífera; pro: prosoma; que: queliceros; tel: telson; I, II, III, IV: primero al cuarto par de patas. (Tomado de Vázquez-García, 1987)

## **Toxinas de los alacranes:**

### Generalidades del veneno:

Las neurotoxinas de los alacranes son proteínas considerados como unos de los más poderosos venenos que se conocen hasta ahora. Expresado en concentración molar, la letalidad de las toxinas de los alacranes solo es rebasada por ciertas toxinas bacterianas, mientras que es comparable al veneno de algunas serpientes. Aunque el cianuro es generalmente considerado como un potente veneno metabólico (dosis letal media de cianuro de potasio es  $1.5 \times 10^{-4}$ ), en la concentración molar es  $10^5$  veces menos toxico que algunas toxinas de alacranes. (Polis, 1991)

El veneno de alacrán es una fuente rica en péptidos de bajo peso molecular y que son tóxicos para una variedad de organismos, invertebrados y vertebrados, incluyendo los humanos. La mayoría de los venenos de alacrán estudiados hasta ahora contienen dos tipos de toxinas: (1) polipéptidos de cadena larga de 60 a 70 residuos de aminoácidos que bloquean canales de  $\text{Na}^+$  de células excitables, y (2) péptidos de cadena pequeña de 35 a 39 residuos de aminoácidos que afectan diferentes tipos de canales de  $\text{K}^+$ . (Herion y col. 1995). Los venenos de los alacranes son mezclas complejas, en parte porque son secreciones apocrinas. Característicamente, el veneno de una especie contiene proteínas básicas de bajo peso molecular (neurotoxinas), mucus (5-10%), sales y varios componentes orgánicos (oligopéptidos, nucleótidos, aminoácidos).

La composición de aminoácidos de 70 toxinas de alacranes se determinó. Estas toxinas contienen solo los 20 L-aminoácidos comunes de las proteínas. Cuantitativamente, sin embargo, la composición de aminoácidos es algo inusual, comparada con otras proteínas. Las toxinas de alacrán tienen un alto contenido en cisteína – ocho residuos con cuatro puentes disulfuro por molécula, lo cual es una cantidad inusual para una proteína globular de bajo peso molecular. Cantidades considerables de glicina, tirosina, aminoácidos dicarboxílicos, sus amidas y lisina también están presentes. Hay una ausencia notable en la mayoría de las toxinas de alacranes de metionina y, en menor grado, de histidina. (Polis, 1991)

Una pregunta interesante se refiere a la presencia de toxinas múltiples en un veneno dado. Los alacranes usan el veneno para la inmovilización de su presa y la protección contra sus depredadores. Estas dos funciones evolutivas pudieron ejercer presiones de selección que favorecieron el desarrollo de venenos complejos. Los resultados de los estudios con toxinas aisladas demostraron un alto grado de especificidad del hospedero para ciertas toxinas. Por ejemplo, el veneno de una especie puede contener una toxina preferentemente tóxica para insectos, otra para crustáceos y todavía otra para mamíferos. (Polis, 1991) En algunas circunstancias, el veneno con múltiples toxinas se favorece por una acción sinérgica entre los componentes. La composición del veneno puede variar cuando una sola especie habita en regiones geográficas diferentes.

Muchos venenos de alacranes, a diferencia de los venenos de serpientes y arañas, no tienen una actividad enzimática, o han demostrado tener muy poca. (Polis, 1991)

En América, los venenos de las especies de *Centruroides* y *Tityus* son los más venenosos.

#### Acción del veneno:

Los principales blancos moleculares de las toxinas de los alacranes son los canales de  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  dependientes de voltaje que se encuentran en muchos tejidos excitables.

El efecto acumulativo en todo el animal sujeto al envenenamiento es muy complejo. Como consecuencia del envenenamiento, los órganos y tejidos especialmente afectados son el sistema cardiovascular, pulmones, músculo liso visceral, útero, varias glándulas y el músculo esquelético. Las terminales nerviosas del sistema autónomo y la médula adrenal son despolarizadas causando una liberación masiva de neurotransmisores, incluyendo catecolaminas. El envenenamiento resulta en una serie de síntomas a nivel del sistema nervioso simpático, parasimpático y efectos paralíticos.

Debido a una rápida absorción y distribución de las toxinas, la muerte por envenenamiento debido a la picadura del alacrán puede ser dramáticamente rápida.

### Importancia medica:

A pesar de la importancia médica e histórica de los envenenamientos por picadura de alacrán en humanos, un problema de salud que data desde la antigüedad, la información precisa de la mayoría de los aspectos es escasa y sólo se ha alcanzado un pequeño progreso en el tratamiento.

Los alacranes peligrosos para los humanos se encuentran en regiones desérticas o semiáridas, a lo largo de todo el mundo. En América, las especies peligrosas de alacranes se encuentran en la parte suroeste de Estados Unidos, México, área este-central de América del Sur y las islas del Caribe. Las especies de importancia médica pertenecen a la familia Buthidae: los géneros incluyen *Androctonus*, *Buthacus*, *Buthus*, *Centruroides*, *Leiurus*, *Mesobuthus*, *Parabuthus*, y *Tityus*.

Para el genero *Centruroides* se estima una incidencia de 100,000 picaduras por año. Estadísticas recientes de mortalidad consideran alrededor de 800 muertes por año. (Possani, 1988). Los adultos son las víctimas más frecuentes de las picaduras de alacranes que los niños, pero la mortalidad es mayor en los niños. (Polis, 1991) Al parecer, hay una variación en la incidencia de envenenamientos de acuerdo a la época del año, con un número mayor durante el verano y principios de otoño.

## Noxiustoxina:

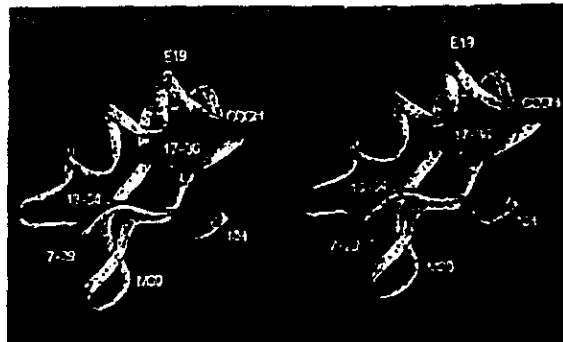
La Noxiustoxina (NTX) es un polipéptido de 39 residuos de aminoácidos con tres puentes disulfuro que se ha aislado del veneno de un alacrán mexicano: el *Centruroides noxius*. La NTX tiene un peso molecular alrededor de 4000 Da (figura 3).

La primera evidencia de sus efectos sobre los canales de  $K^+$  dependientes de voltaje provino de los experimentos de voltaje fijo en el axón de calamar. También se demostró que la NTX indujo la liberación de neurotransmisor de los sinaptosomas del ratón, mediante el bloqueo de la permeabilidad al  $K^+$  y que además es un inhibidor de los canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$ , en el músculo esquelético. La NTX bloquea los canales de  $K^+$  de tipo n en linfocitos T y se une a la membrana plasmática sináptica del cerebro. También bloquea otras clases de canales de  $K^+$  dependientes de  $Ca^{2+}$  y de voltaje, de varios tejidos excitables y no excitables, con constantes de afinidad ( $k_d$ ) muy variables que van desde  $\mu M$  hasta pM, dependiendo del tejido bajo estudio.

Los péptidos sintéticos correspondientes al extremo N-terminal de la secuencia de aminoácidos de la NTX se demostró que tienen efectos tóxicos similares a aquellos de la toxina nativa e inducen diversos grados del bloqueo de los canales de  $K^+$  activados por  $Ca^{2+}$  de las células endoteliales aórticas de bovino.

	1	10	20	30	38
ChTX	pEFTNVSCSTIS KEQNSVQORL IYNTSRG-KCM NKKCKRCYS				
1-16	pEFTNVSCSTIS				
24-37	SRG-KCM NKKCKRCYS				
	1	10	20	30	39
NTX	TIIINVKCTSP KQCSKPKCEL YGSSAGAKCM NGKCKCYNN				
1-14	TIIINVKCTSP KQCS				
1-20	TIIINVKCTSP KQCSKPKCEL				
11-29	QCSKPKCEL YGSSAGAKCM NGKCKCYNN				
30-39	K NGKCKCYNN				
1-39	TIIINVKCTSP KQCSKPKCEL YGSSAGAKCM NGKCKCYNN				
1-21A1a	TIIINVKCTSP KQCSKPKCEL Y				

**Figura 3.** Secuencia aminoácida de péptidos sintéticos correspondientes a las secuencias de NTX y ChTX. (Tomado de Gurrola, 1995)



**Figura 4.** Imagen estereoscópica del modelo tridimensional del NTX. (Tomado de Gurrola, 1995)

Una imagen estereoscópica del modelo tridimensional de la NTX se obtuvo usando los parámetros de la resonancia magnética nuclear determinados para ChTX (toxina de alacrán que tiene 44% de similitud con NTX y que también es un bloqueador de canales de  $K^+$ , figura 4). Se usó un conjunto de programas de homología de Biosym Technologies (San Diego, CA, USA) que se ocupó en la generación del modelo, incluyendo la minimización de energía y dinámica molecular. Los residuos Lys11-Leu20 están formando tres vueltas de alfa-hélice, mientras que los segmentos Thr1-Asn4, Ala25-Cys29 y Lys33-Tyr37 están probablemente formando estructuras de tres hojas beta anti-paralelas. La metionina de la posición 30 está situada en la vuelta, entre dos estructuras de hojas beta. La presencia de la región alfa – hélice intacta es importante para la unión a los canales. El extremo N-terminal es importante para reconocer a los canales, mientras que el segmento C-terminal no es muy importante para la unión a las membranas. La posibilidad de que el segmento C-terminal sea importante para el posicionamiento del segmento N-terminal en el arreglo espacial correcto para la unión, es una posibilidad que queda para ser explorada. Esta última especulación es muy importante, dado que la mayoría de los fragmentos sintéticos de la porción N-terminal no se unieron al canal con la misma afinidad, lo que significó que algo estaba faltando, ya fuera en la estructura primaria o en el arreglo tridimensional de la NTX. Cuando la NTX es reducida o alquilada ya sea con yodometano o ácido iodoacético, la toxina se inactiva completamente. Sin embargo, cuando la NTX se reduce pero no se



alquifa y posteriormente se purifica, alcanza su conformación nativa (replegamiento).

### **Obtención de anticuerpos monoclonales contra NTX:**

Varios anticuerpos monoclonales (Mabs) específicos para NTX (BNTX4, BNTX12, BNTX14, BNTX16, BNTX18 y BNTX21) se han obtenido por medio del uso de técnicas con hibridoma y se han descrito sus propiedades (Herion y col, 1995). Los MAbBNTX4, BNTX12, BNTX14, y BNTX16 pertenecen a la subclase IgG<sub>1</sub>, mientras que los BNTX18 y BNTX21 pertenecen a la subclase IgG<sub>2a</sub>.

Para investigar si los seis Mabs se unen a epítomos independientes o traslapados, se llevaron a cabo ensayos de tipo "ELISA" en sándwich en las que un miembro de cada par de anticuerpos se inmovilizó en una placa y el otro se marcó con peroxidasa y se uso para detectar el complejo NTX-anticuerpo inmovilizado. Todos los pares posibles de Mabs se ensayaron. Los resultados indicaron que ninguno de los pares de anticuerpos pudieron unirse simultáneamente a NTX, lo que significaría que los epítomos identificados por los Mabs son idénticos, sobrepuestos o próximos.

Para examinar la relación entre epítomo(s) y el sitio activo de la toxina, los seis Mabs se probaron respecto a su habilidad de inhibir la unión de la NTX a las membranas sinaptosomales de cerebro *in vivo*. Todos los Mabs inhibieron la unión de la toxina a su receptor. El inhibidor más fuerte fue el MAb BNTX21.

Estos resultados sugirieron que los epítipo(s) definidos por los Mabs podrían estar traslapados o cerca del sitio activo de la toxina o que la unión de Mabs induzca un cambio conformacional en la toxina, reduciendo su afinidad por el receptor, o bien que la unión de los Mabs reduzca la velocidad de reacción de la toxina con su receptor.

Para detectar la presencia de toxinas que pudieran tener una reacción cruzada con el veneno de alacranes de otras especies, reaccionando con los Mabs utilizados, se hicieron ELISA de competencia (El Mab unido a la NTX se probó en presencia del veneno crudo de diferentes especies del género *Centruroides*). El MAb BNTX16 identificó toxinas parecidas a la NTX provenientes de tres subespecies de *C. Limpidus*, *C. Infamatus infamatus*, y *C.suffusus suffusus*, pero no de *C. Elegans*.

#### **Propiedades antigénicas de NTX:**

Siendo un péptido la NTX es un antígeno que podría dirigir una respuesta inmune humoral. Esta propiedad podría ser muy importante para proteger al organismo del efecto tóxico del veneno del alacrán. Sin embargo, el efecto tóxico toma algunas horas y el montaje de la reacción inmune protectora requiere de 2 a 3 semanas, por lo que la capacidad antigénica de NTX no se realiza.

Como una solución al problema anteriormente mencionado se propone la obtención de vacunas que induzcan la producción de anticuerpos antes del posible envenenamiento confiriendo la protección. Métodos tradicionales de

vacunación usan el mismo péptido o al organismo atenuado como inmunógeno. Este abordaje del problema, en el caso de NTX, no es posible por la neurotoxicidad intrínseca del péptido. Una alternativa podría ser la separación de epítomos de las porciones que se unen a la membrana, causando el efecto tóxico, inmunizando únicamente con la porción que contiene el epítomo. Bajo este planteamiento, esta claro que la piedra angular que permitiría completar el trabajo sería la identificación de epítomos de NTX.

Los primeros intentos de fraccionamiento al azar de la molécula, sin el conocimiento previo de dónde está el epítomo han sido pocos e infructuosos (Possani, 1995). Recientemente se ha desarrollado un nuevo y poderoso método que permite la investigación y localización de epítomos llamado "Phage Display" (expresión de péptidos en fago). El presente trabajo se basa en una de las variaciones de este método que ocupa una biblioteca de 12 aminoácidos construida en la proteína recombinante p3 del bacteriófago M13.

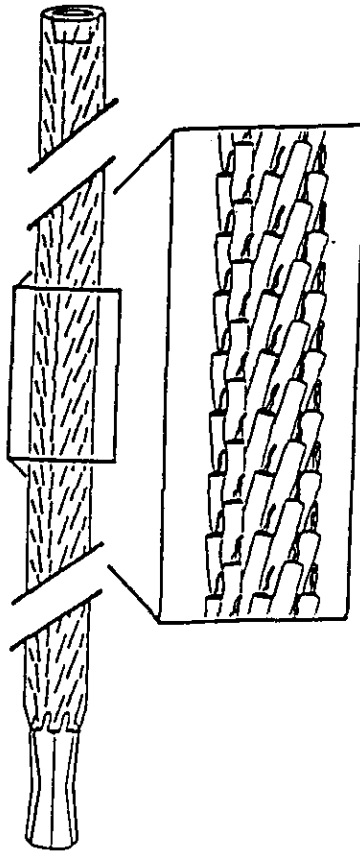
### **Estructura del bacteriófago M13.**

#### Datos generales.

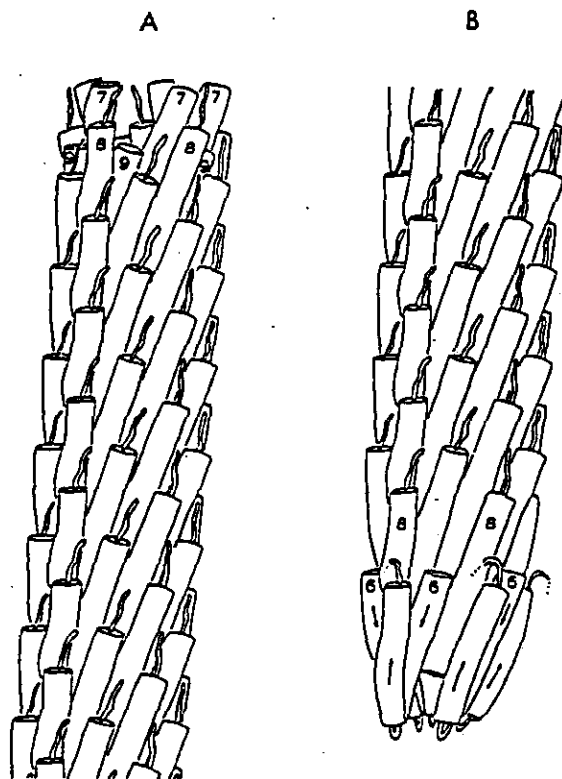
Una imagen de alta resolución de M13 no se ha obtenido todavía. La difracción de rayos X se uso para determinar la estructura del virión a 7Å de resolución. La posición de los residuos de Tyr de p8, que es una proteína codificada por el gen 8 (Tyr<sup>21</sup> y Tyr<sup>24</sup>) se determino. La difracción de neutrones

se realizó para determinar las posiciones tridimensionales de los residuos de Phe, Ile y Tyr en p8. La resonancia magnética nuclear del estado sólido se hizo para determinar la orientación de todos los enlaces N-H en la proteína y la dinámica de un número grande de grupos de cadena principal y cadenas laterales. Modelos estructurales de las proteínas menores (p7, p9, p3, p6) se han construido basados en su similitud de secuencia y con la proteína de envoltura, asumiendo que estas similitudes en secuencia son indicativas de similitudes estructurales.

La figura 5 muestra la organización global de M13, siendo de alrededor de 65Å de diámetro con el largo que depende del largo del genoma encapsulado. Una fracción considerable de la masa del virión se debe a muchas copias de la proteína de envoltura de 50 residuos de aminoácidos, p8, que forma un cilindro grueso flexible de 15-20Å alrededor del genoma viral de una sola hebra. El largo del virión es de aproximadamente 3,3Å por subunidad de proteína mayor de la envoltura mas aproximadamente 175Å para las proteínas menores. La superficie exterior del virus tiene un radio de 33Å. Péptidos altamente hidrofóbicos p7 (33 aminoácidos) y p9 (32aminoácidos) están localizados en el extremo que es expulsado primero de la célula durante el ensamblaje del virus o el extremo distal (figura 6). Cada virión contiene cinco copias de cada una de estas. La proteína de unión al hospedero p3 es sintetizada como una proteína de 424 residuos de aminoácidos, cuyo extremo N-terminal de 18 residuos de aminoácidos es removido durante la inserción a la membrana. El polipéptido maduro de 406 residuos de aminoácidos se ancla al virión mediante



**Figura 5.** Organización global del fago M13. (Tomado de Makowski, 1993)



**Figura 6.** Modelos de los extremos del fago M13. a) extremo distal. b) extremo proximal. (Tomado de Makowski, 1993)

interacciones con p6 (113 aminoácidos). Son cinco copias de cada una (p3 y p6) en el extremo proximal del virión.

### Proteínas p3 y p8.

La estructura de p3 es flexible. Las micrografías electrónicas que la visualizan han producido imágenes diferentes de su estructura, que van desde la apariencia de una esfera al final de una cuerda, hasta el cilindro de 60-70Å que termina con una estructura en punta con extensión delgada al final. p3 contiene tres arreglos repetitivos del motivo Ser-Gly-Gly-Gly o Ser-Glu-Gly-Gly-Gly. El primer segmento empieza alrededor de 70 aminoácidos del extremo N-terminal y contiene cuatro repeticiones; el segundo empieza alrededor de 215 aminoácidos del extremo N-terminal y contiene ocho tripletes de Gly. Se cree que estos segmentos contribuyen a la flexibilidad aparente de la proteína y a la facilidad con la cual las inserciones pueden ser satisfactoriamente añadidos. Inserciones de pocos aminoácidos en el extremo N-terminal aparentan tener un efecto mínimo en el funcionamiento de p3. Inserción de secuencias al p3 demuestra que su flexibilidad y el hecho de que está expuesta al final del virión hace de ella un excelente sustrato para las aplicaciones que no requieren un alto número de copias por partícula fágica. Ambas, p3 y p8, antes de la incorporación al virión se anclan a la membrana con la porción N-terminal expuesta al periplasma. La proteína codificada por el gen 3 tiene aparentemente dos dominios funcionales, cada uno de 200 residuos aproximadamente: el dominio N-terminal expuesto al

pilus F que no es requerido para el ensamblaje del virión, y el dominio C-terminal que se esconde en la partícula y que es una parte integral de la estructura de la cápside. En el virión, la porción C-terminal de p8 aparenta estar dentro del virión, cerca del DNA, mientras que la porción N-terminal está expuesta al solvente. El tipo silvestre del fago M13 contiene aproximadamente 2700 copias de p8 ensambladas por la interacción de sus dominios helicoidales hidrofóbicos en un largo y delgado tubo que es característico de los fagos filamentosos.

### **Ciclo de vida del bacteriófago M13.**

Hay tres tipos de fagos filamentosos: fd, f' y M13 que son bacteriófagos con el DNA cerrado en el anillo de una sola cadena (ssDNA) de una longitud de alrededor de 6500 nucleótidos. El fago filamentosos no lisa la célula. Las células quedan crónicamente infectadas, creciendo lentamente y produciendo partículas fágicas por un periodo indefinido.

El ciclo infeccioso del fago empieza con su unión vía la proteína menor de la envoltura p3, al extremo libre de los pili F de *E.coli* (sólo las células masculinas de las cepas F' o Hfr pueden ser infectadas). Al momento de la unión al pili, el fago es atraído hacia la superficie de la célula hospedera y las proteínas de la envoltura se disocian en la membrana interna. El genoma fágico internado en la célula es el asa de una sola hebra del DNA. Esta cadena tiene polaridad mas(+) y sirve como molde para la síntesis de la cadena menos(-) que empieza en un origen específico y da como resultado la forma duplicadora de doble



cadena (RF) por medio de la acción combinada de la polimerasa de RNA de la bacteria y la maquinaria de la síntesis de DNA bacterial y no requiere de la participación de ninguna de las proteínas codificadas por el genoma viral. La molécula de RF sirve como molde para la transcripción del RNAm, duplicación del RF, y la producción de la progenie de ssDNA. Una de las proteínas expresadas por el fago, p2, hace un corte específico de la cadena mas del DNA de doble cadena y el extremo 3' resultante es elongado por la maquinaria de síntesis de DNA de la bacteria, hasta que alcance el doble de la longitud unitaria, la cadena desplazada es cortada y circularizada de forma concentrada para dar una cadena sencilla de DNA circular y conservar la molécula original de DNA circular de doble cadena. Todos los genes virales son expresados inmediatamente. Entre los productos de genes fágicos que se acumulan están cinco proteínas estructurales designadas para su incorporación en partículas fágicas recién formadas. Estas son la proteína mayor de la envoltura p8, la proteína de absorción p3, las proteínas menores de envoltura p6, p7 y p9. Conforme la duplicación de RF procede, productos de genes fágicos se acumulan. Una de ellas, la proteína plasmática de unión al DNA, p5, se une a cadenas mas(+) nuevamente sintetizadas, para prevenir su conversión en forma de doble cadena y conserva cadenas mas(+) para su incorporación en las partículas fágicas. p5 impide la generación de mas DNA en su forma duplicativa. Después de que en la célula se acumulan 100-200 copias de RF, la síntesis de DNA del fago M13 se vuelve asimétrica y empieza a formarse una cantidad grande sólo de la cadena mas(+). Los viriones de la progenie no son ensamblados en el

citoplasma, sino por la expulsión de ssDNA a través de la envoltura bacteriana. Moléculas de p5 unidos al DNA son intercambiadas por p8 conforme el DNA es expulsado de la célula, para producir partículas maduras. Conforme emerge de la célula, el ssDNA adquiere su envoltura extracelular de las proteínas de la cubierta de la membrana. La partícula completa entonces abandona la célula. El control metabólico de la producción del virus se da por competencia entre el producto del gen 2 que induce la forma duplicativa y el producto del gen 5 que secuestra al DNA de cadena sencilla para formar virus maduros.

**"Phage display".**

#### Generalidades.

Un "fago de fusión" es un virión filamentosos que muestra sobre su superficie un péptido extraño fusionado a una proteína de superficie y que alberga el gen para la proteína fusionada en su genoma. (Scott y col., 1990) El fago filamentosos tiene varias propiedades que lo hacen atractivo para el uso en los vectores de presentación de péptido. Los fagos están muy bien caracterizados, son fáciles de trabajar y la superficie del virión es de baja complejidad. La inserción de péptidos extraños a cualquiera de estas proteínas tiene el potencial de interrumpir la estabilidad estructural de la partícula fágica, así también como interferir con el ensamblaje e infección.

De acuerdo con los experimentos realizados hasta la fecha, el "phage display" es capaz de realizar un proceso de selección tan preciso como la selección inmune. Un mimotopo es un péptido pequeño que imita las propiedades de unión del epitopo ensamblado (que está formado de residuos distantes en la secuencia primaria del antígeno, pero contiguos en la estructura tridimensional ensamblada). (Scott y col., 1990) Algunos sitios de unión pueden requerir propiedades estructurales que no pueden ser efectivamente imitados por péptidos pequeños.

Los fagos muestran secuencias azarosas de péptidos extraños codificados por oligonucleótidos sintéticos unidos al gen de la proteína de envoltura. Una biblioteca completa representa más que billones de secuencias peptídicas. Si el péptido mostrado por el fago es un ligando fuerte para el anticuerpo u otra proteína de unión, entonces el fago puede ser purificado de la biblioteca por afinidad. Los fagos purificados por afinidad pueden ser eluidos sin destruir su actividad. Sus secuencias peptídicas responsables de la unión pueden conocerse mediante la infección bacteriana por fagos eluidos, la propagación de clones del fago y la secuenciación de la parte relevante de su DNA.

#### Sistemas de péptido en fago.

Rutinariamente se hacen las siguientes variaciones de sistemas de péptidos en fago (figura 7):

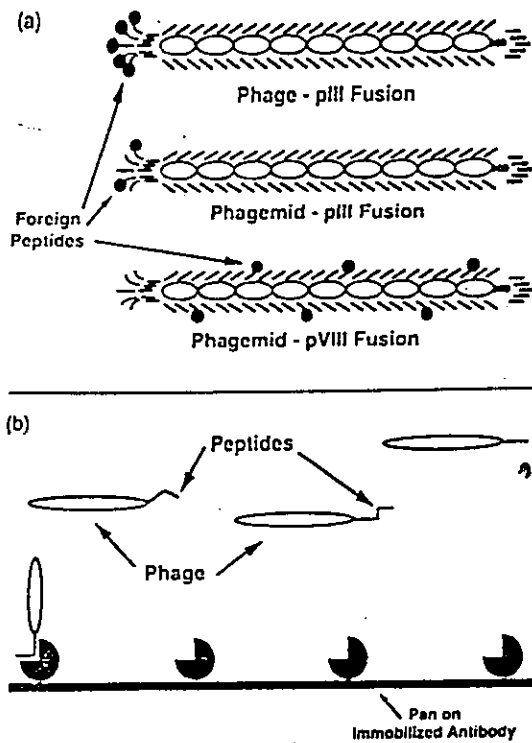


Figura 7. a) estructura de sistemas de "Phage Display". b) monitoreo de la biblioteca fágica. (Tomado de Cwirla, 1990)

A'). El sistema original del fago-p3 contiene oligonucleótido clonado insertado cerca del extremo 5' del gen 3 en el genoma fágico. Los péptidos expresados por estos oligonucleótidos son fusionados en o cerca del extremo N-terminal de la proteína menor de la envoltura 3, y son ensamblados en la superficie de partículas fágicas donde quedan disponibles para la unión con anticuerpos. Cada cinco copias de p3 en el fago presenta el péptido.

A''). Cualquier plásmido circular de DNA que contiene el origen de duplicación y la señal de empaquetamiento tiene el potencial de entrar en el ciclo de vida del fago, produciendo partículas infecciosas del fago conteniendo una hebra del DNA del plásmido. La hebra que contiene el origen fágico (cadena mas (+) es la cadena que se empaqueta. Estos episomas son llamados fagémidos. Los fagémidos contienen la región intergénica del fago filamentoso que contiene los orígenes de síntesis de las cadenas mas y menos y otros elementos que actúan en cis y son necesarios para la síntesis de ssDNA y el empaquetamiento en viriones. También contienen el origen de duplicación no vírico y un gen de resistencia al antibiótico, por lo que ellos pueden ser propagados como cualquier plásmido, independientemente de la función fágica, se duplican normalmente bajo el control de proteínas del hospedero y entran en el modo de duplicación parecido al fágico y el empaquetamiento en presencia de ciertas proteínas fágicas usualmente proporcionadas por otro genoma fágico (fago ayudador) introducido en la célula. Cuando la célula que alberga el fagémido es infectada por el fago filamentoso ayudador, se secreta el fagémido (también el fago ayudador) en forma de viriones infecciosos. Estos viriones muestran una mezcla

de moléculas de proteína recombinante de cubierta codificadas por el fagémido y moléculas de tipo silvestre codificadas por el ayudador. Los viriones fagémicos se distinguen de los viriones ayudadores porque ellos transmiten la resistencia a antibiótico a cualquier célula que ellos infectan. Para obtener el empaquetamiento preferencial de genomas del fagémido, el fago ayudador es debilitado y compite pobremente con el fagémido para las funciones de la duplicación fágica y el empaquetamiento.

Variaciones del sistema de presentación de p3 emplean el vector fagémido. Estos vectores contienen el gen 3 con sitios de clonación de oligonucleótidos. Habitualmente el promotor de p3 es reemplazado por un promotor inducible, para permitir el control de la expresión de la proteína de fusión. Copias de tipo silvestre de p3, con los otros productos de genes fágicos requeridos son proporcionados por el fago ayudador y el número de péptidos presentados en cada partícula fagémica puede variar de cero a cinco, controlando el número relativo de tipo silvestre y péptidos provenientes de moléculas de p3 expresados en la célula. El DNA del fagémido es empacado preferentemente con respecto al DNA del ayudador, proporcionando la unión entre el DNA clonado y el péptido presentado.

B'). Otra proteína estructural , proteína mayor de la envoltura p8, ha sido explorada como vehículo de presentación. Mientras que los péptidos pueden fusionarse a cada una de las varias miles de copias de p8 en la envoltura fágica, el tamaño de los péptidos esta limitado a seis o menos residuos.

B"). Péptidos más grandes pueden presentarse si el fago está envuelto con una mezcla de tipo silvestre y fusionado de p8, y ésto puede hacerse con el vector fagémido.

### El sistema fágico p3.

El sistema fágico p3 es el mas simple de los sistemas para su uso. En este sistema es posible evitar los pasos de inducción de p3 y el uso del fago ayudador. Rutinariamente, se construyen bibliotecas de  $10^8$  a más de  $10^9$  miembros, mostrando péptidos de 6 a 20 residuos. Existen dos sitios en p3 que se pueden usar para la fusión del péptido: uno de ellos es el espaciador flexible entre los dos dominios de p3 y el otro es el extremo N-terminal. En la mayoría de las construcciones de fagos de fusión, los aminoácidos exógenos son insertados "corriente abajo" del péptido señal de p3, y la propagación del fago recombinante requiere que la proteína recombinante p3 retenga sus funciones. Cualquiera que fuera su diseño, la secuencia codificadora insertada tiene que unir correctamente al fragmento de la lectura correcta de la proteína de envoltura a los dos extremos del sitio de clonación, para conservar la función génica y, por lo tanto, ser expresada en el virión.

## Uso y perspectivas.

Disponer de grandes bibliotecas de secuencias peptídicas azarasas, con cada péptido ligado a su DNA codificante, proporciona un formato conveniente para la selección de ligandos que no requiere el conocimiento de la estructura de sitio del unión, ni tampoco ninguna preconcepción de los requerimientos estructurales de los ligandos. Hasta ahora, el uso más prominente de esta técnica de presentación de péptidos ha sido el manejo de epítomos de anticuerpos.

Una biblioteca de epítomos puede identificar ligandos del anticuerpo en un antisuero complejo policlonal, independientemente de que el antígeno sea conocido o disponible. La purificación por afinidad con el suero de pacientes infectados por virus, bacterias o parásitos pueden identificar péptidos que sirvan como vacunas o inmunogenos (el fago por sí mismo es inmunogenico).

El desarrollo futuro de bibliotecas de péptidos puede conducir al descubrimiento de nuevos ligandos para muchos propósitos, incluyendo identificación de nuevos candidatos de drogas. Estos péptidos imitadores pueden modular la acción fisiológica de sus ligandos naturales.

Bibliotecas de secuencias peptídicas al azar, mostradas en fago filamentoso se pueden utilizar en la búsqueda de ligandos peptídicos para anticuerpos, receptores y enzimas.

Una aplicación muy atractiva serán las bibliotecas del fago-anticuerpo: *Clones diferentes en la biblioteca de fago anticuerpo van a mostrar diferentes*



dominios del anticuerpo con diferentes especificidades. Una gran diversidad de especificidades será incorporada a la biblioteca como un conjunto, ya sea por la clonación del repertorio natural de genes de anticuerpos, o mediante la creación de CDR(Regiones Determinantes de la Complementariedad) al azar. Una biblioteca de fago-anticuerpo ideal, todavía no dentro de la realidad, incluiría anticuerpos específicos para cualquier antígeno. La afinidad puede ser mejorada sujetando estos clones iniciales a rondas subsiguientes de selección o a mutagénesis al azar y la selección por purificación por afinidad. Estos podrían ser los anticuerpos monoclonales del futuro: producidos sin necesidad de animales o células animales en cultivo.

## **OBJETIVOS.**

### **Objetivo general:**

Identificar los aminoácidos que forman parte del epítipo de NTX que reconocen los anticuerpos monoclonales utilizados.

### **Objetivos particulares.**

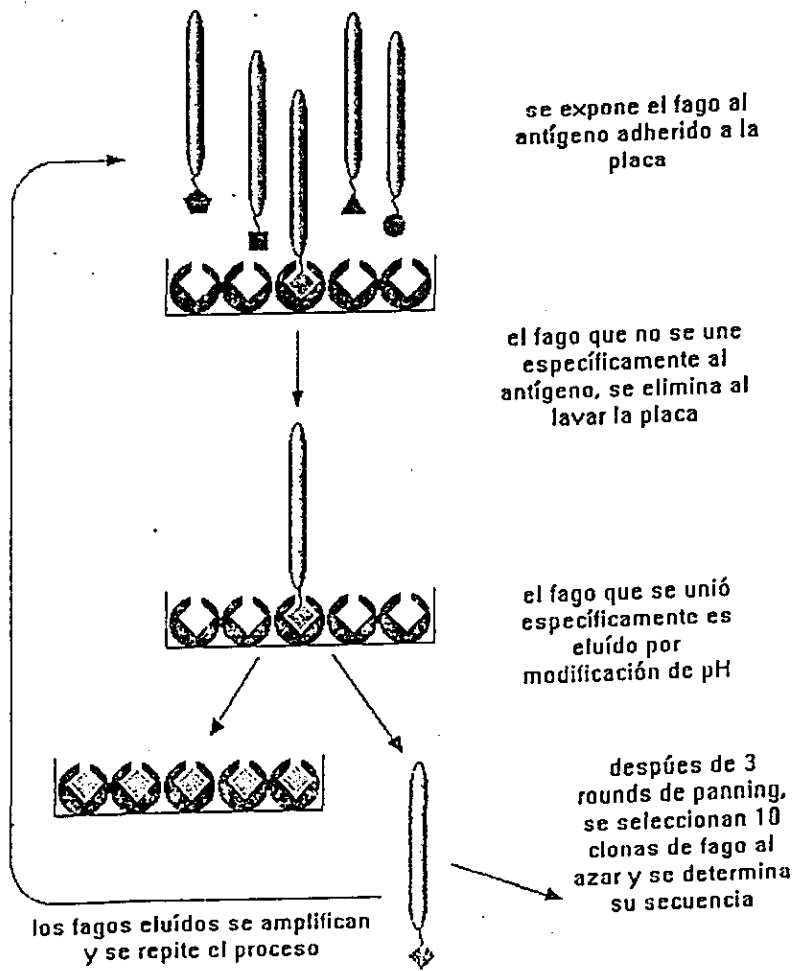
1. Hacer un monitoreo de la biblioteca fágica obteniendo clones seleccionados por el anticuerpo monoclonal BNTX18.\*
2. Hacer ELISA, determinando la capacidad de estos clones para reaccionar con el anticuerpo usado para su selección.
3. Determinar la estructura de los clones de mayor actividad.
4. Hacer un análisis de la similitud entre los péptidos comparándolos con NTX, identificando una posible similitud estructural.
5. Identificar los aminoácidos que forman parte del epítipo de NTX que reconoce este anticuerpo.

\*: Puntos 2-5: respecto a clones seleccionados con el BNTX16 y BNTX18.

## **MATERIALES Y METODOS.**

La primera parte del trabajo experimental consistió en la selección de los clones del fago de la biblioteca original por el anticuerpo monoclonal mediante el proceso de biopanning de matriz de afinidad de anticuerpos inmovilizados. Se obtuvo el título de los clones obtenidos (eluido), se amplificó el eluido y los fagos se purificaron. Esta estrategia general se repitió tres veces, usándose en la segunda y tercera ronda los fagos eluidos, amplificados y purificados de la ronda anterior (figura 8). La primera y segunda ronda se eluyeron a un solo pH. La tercera ronda se eluyó a dos pHs distintos. Los dos eluidos de la ronda tres se titularon y 18 colonias individuales de cada uno se aislaron de la caja por picadura. Una vez hecho esto, los dos eluidos se juntaron, se amplificaron y se usaron para la cuarta ronda de biopanning en solución. La cuarta ronda también se eluyó a dos pHs distintos. Los eluidos también se titularon y 18 colonias de cada uno de los eluatos se aislaron. Como resultado del biopanning se obtuvieron 72 clones seleccionados.

Posteriormente, los 72 clones se amplificaron individualmente. Se realizó el proceso de precipitación del fago, para purificarlo. Del cultivo de noche para amplificar los clones individuales también se tomó 1ml para purificación del DNA, el cual se usó para la determinación de la secuencia de los clones individuales. Luego, con los 72 clones obtenidas se realizaron experimentos de inmunogenicidad (ELISA). Una vez determinada la secuencia individual de aminoácidos del péptido de cada clon individual del fago y los experimentos de



**Figura 8. Panning.** (Tomado del Ph. D.-12 Phage Display Peptide Library Kit; BioLabs, New England, USA)

inmunogenicidad se procedió a comparar las secuencias de las clonas entre si y con secuencia aminoacida de NTX.

## **Materiales.**

NTX; proporcionada por el Dr. Lourival D. Possani, del Departamento de Reconocimiento Molecular y Biología Estructural, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad, 2001, Apartado Postal 510-3, Cuernavaca, 62271 México.

10mg (iofilizado).

BNTX16, BNTX18; proporcionados por el Dr. Herion P., Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, D. F. 04510 México.

BNTX16: 200 $\mu$ l, 0.67mg/ml;

BNTX18: 200 $\mu$ l, 0.87mg/ml;

Ph.D.-12 Phage Display Peptide Library Kit; BioLabs, New England, USA.

Esta biblioteca de "Phage Display" es de tipo p3: el péptido artificial de 12 residuos se encuentra unido a la región N-terminal de la proteína 3 de la cápside del fago, hay de 1 a 5 copias por fago, no requiere de un fago ayudador para ser infectiva. La biblioteca consiste de  $2.7 \times 10^9$  diferentes clonés del fago, cada uno de los cuales presenta un péptido de 12 aminoácidos diferente. La biblioteca fue amplificada por el fabricante para obtener  $10^2$  copias de cada clon individual (título final  $10^{11}$  clonés).

## **Medios de cultivo.**

### **LB (Luria Bertani):**

Triptona 1%; Extracto de levadura 0.5%; NaCl 1%. Para solidificar se añade Agar 1.5%.

### **2xYT:**

NaCl 1%; Extracto de levadura 1%; Triptona 1.6%.

### **Agarose Top:**

Triptona 1%; Extracto de levadura 0.5%; NaCl 0.5%; MgCl<sub>2</sub> 0.1%; Agarosa 0.7%.

## **Amortiguadores y soluciones.**

### **TBS pH 7.5:**

NaCl 150mM 8.774g/l; TRIZMA-base 1.18g/l; TRIZMA-HCl 6 35g/l.

### **PEG/NaC 40%:**

NaCl 5M 292.2g/l; PEG (8000) 400g/l.

### **Gel de Agarosa:**

Agarosa 0.5g + 49ml H<sub>2</sub>O, se hierve y se añade 1ml TAE 50x + 1µl bromuro de etidio.

### **TAE 0.04M pH8.0 (50x):**

Tris 242g/l; CH<sub>3</sub>COOH glacial 57.1ml/l; EDTA 0.5M 100ml/l.

### **TBE pH8.0 (5X):**

Tris 54g/l; Acido Borico 27.5g/l; EDTA 0.5M 20ml/l.

Gel de Acrilamida al 6% para Secuenciacion del DNA:

Urea 33.6g; Stock de Poliacrilamida (40%) 11.6ml; TBE 5x 16.0ml; H<sub>2</sub>O 28.0ml.

Esta mezcla se filtra con papel filtro y se desgasifica usando el vacio local. Para solidificar se añade a la mezcla anterior: persulfato de amonio (10%) 640µl:

TEMED (0.1mg/µl) 16µl.

PBS 10x pH7.4 para biopanning:

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 6.1g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.9g/l; NaCl 80.0g/l; KCl 2.0g/l.

Amortiguador de Ioduro:

Tris-HCl pH8.0 1M 100µl; EDTA 0.5M 20ml; NaJ 6M 6.66ml; se afora a 10ml.

Amortiguador de Dietanolamina al 10% pH 9.8:

Dietanolamina 100ml/l; Cl<sub>2</sub>Mg•6H<sub>2</sub>O 102mg/l; NaN<sub>3</sub> 0.40gr/l; se ajusta al pH deseado con HCl.

Amortiguadores de Elusión:

0.1M HCl-glicina, pH2.2.

0.1M HCl-glicina, pH4.

Tinción para electroforesis en geles de agarosa 5x:

2.7ml glicerina; 0,3ml 10xTBE; 50µl 20% SDS; 1,0ml 0.5M EDTA pH 8.0; 1.0ml bromofenol azul al 1%.

## Biopanning.

Existen dos estrategias básicas que se usan para la selección de péptidos presentados en fago. Una de las estrategias emplea la matriz de afinidad de anticuerpos inmovilizados, a la cual es expuesta la biblioteca fágica, capturando fagos reactivos directamente en la matriz. En una aproximación alternativa el fago y el anticuerpo se unen en la solución y después se recuperan los complejos fago-anticuerpo mediante la captura de anticuerpos.

El método de biopanning es altamente específico (péptidos no relacionados no son seleccionados), pero no discrimina entre una afinidad moderada ( $K_d$  micromolar) y una afinidad alta ( $K_d$  nanomolar). (Cwirla y col., 1990)

La selección de péptidos en fago con una afinidad relativamente baja, al parecer, es el resultado de una interacción multivalente entre el fago (cinco copias de p3) y moléculas de IgG (dos sitios de unión). Aunque se tienen interacciones de baja afinidad en cada sitio, la unión multivalente conduce a una alta aditividad y una adherencia fuerte del fago durante el lavado. Péptidos de moderada afinidad parecen ser más abundantes que péptidos de elevada afinidad. Para enriquecer ligandos de más alta afinidad, probablemente se requiere de interacciones monovalentes entre el fago y los sitios de unión inmovilizados. Además, clones de alta afinidad pueden perderse durante la amplificación del fago entre rondas de biopanning. Otro factor es la existencia de pequeñas diferencias en el crecimiento del fago que alberga diferentes péptidos.



Finalmente, la afinidad de unión de algunos péptidos puede ser influenciada, positiva o negativamente, por la proteína p3 a la que ellos se encuentran fusionados.

La primera ronda de biopanning es crítica para obtener el éxito. Comúnmente, cada clon está representado en la biblioteca original por solamente 100 unidades infecciosas (TU). Debido a que el biopanning deja solamente 1% del fago fuertemente unido, muchos clones capaces de unirse se representan (si lo serían) por único TU. Es por eso que se usa una cantidad grande de anticuerpo en la primera ronda. Comúnmente solo una ronda de biopanning no es suficiente para purificar clones que se unen de una biblioteca grande y compleja. Consecuentemente, fagos del primer eluido se usan para la siguiente ronda después de la amplificación. Usando sustancialmente menos de 4pmol de anticuerpo en la segunda ronda de biopanning, es posible establecer competencia entre clones que se unen, lo que potencialmente incrementa la discriminación.

El proceso de enriquecimiento de clones unidos puede seguirse por la titulación de entrada y salida de la segunda y subsecuentes rondas de biopanning. La entrada de cada ronda es el eluido amplificado de la ronda anterior. La primera ronda de biopanning puede enriquecer el fago seleccionado por el factor de  $10^5$  respecto al fago no reactivo; el enriquecimiento posterior se hace mediante siguientes rondas de biopanning.

Micropanning es la versión miniatura de biopanning destinada a checar la purificación por afinidad de muchos clones individuales. La positividad de los clones se ve dependiendo del título de cada clon.

Biopanning de matriz de afinidad de anticuerpos inmovilizados:

1. Preparar solución de anticuerpo monoclonal BNTX16 100µg/ml en PBS1x.
2. Poner 50µl de anticuerpo monoclonal BNTX16/PBS por cada uno de los 6 pozos, cerrar placa con parafilm e incubar toda la noche a 4°C en agitación suave en cámara húmeda en cuarto frío.
3. Vaciar cada pozo con micropipeta recolectando el anticuerpo monoclonal BNTX16 en un ependorff(tubo para microcentrifuga) para reutilizarlo en ELISA.
4. Bloquear cada pozo con 350µl de PBS1x/BSA1%, tapar con parafilm e incubar una hora a 37°C.
5. Vaciar cada pozo.
6. Lavar cada pozo 6 veces de 3 min con PBS1x/tween20 0.5%, 200µl por pozo.
7. Añadir la biblioteca del fago 10µl en total en PBS1x + BSA0.1%, 100µl por pozo e incubar 2 horas a 4°C en cuarto frío con agitación muy suave.
8. Retirar el fago con micropipeta de cada pozo, recolectar y matar de inmediato en NaOH o autoclave.
9. Repetir paso 6 con la solución en hielo.
10. Incubar cada pozo con 350µl de PBS1x/BSA0.1% (esta solución debe de estar en hielo) durante 30 min a 4°C en cuarto frío sin agitación.
11. Retirar el sobrenadante con pipeta y desechar en NaOH.

12. Repetir paso 6 con la solución en hielo.

13. Eluir el fago con 0.1M glicina/HCl pH2.2 en 1mg/ml BSA0.1%, 100µl por pozo, incubar a temperatura ambiente durante 9-10 min.

14. Recolectar rápido todo el sobrenadante y neutralizar con 35µl de 2M Tris-base.

15. Eluir el fago con 0.1M glicina/HCl pH4 en 1mg/ml BSA0.1%, 100µl por pozo, incubar a temperatura ambiente durante 9-10 min.

16. Repetir paso 14.

Esta estrategia general se repitió 3 veces, usándose en la segunda y tercera vez los fagos eluidos y amplificados del biopanning anterior. Las concentraciones de anticuerpo monoclonal en la segunda rondas fue de 1µg/ml y en la tercera ronda 0.1µg/ml.

Bionanning en solución:

1. Transferir 50µl de proteína A-agarosa (suspensión acuosa al 50%) a un ependorff. Adicionar 1ml de TBS1x/Tween20 0.1% (TBST). Resuspender la resina mezclándola bien.

2. Precipitar la resina por centrifugación a 4000rpm durante 30seg. Quitar cuidadosamente el sobrenadante con pipeta.

3. Resuspender la resina en 1ml de amortiguador de bloqueo e incubar durante 1hora a 4°C. Mezclar ocasionalmente.

4. Mientras, diluir  $1.5 \times 10^{11}$  viriones fágicos (10µl de la biblioteca original) y 300ng de anticuerpo monoclonal en TBST hasta el volumen final de 200µl. La

concentración final del anticuerpo es 10nM. Incubar a temperatura ambiente 20 min.

5. Terminando la reacción de bloqueo, precipitar la resina como en el paso 2 y lavar 4 veces con 1ml de TBST, precipitando la resina cada vez.
6. Transferir la mezcla de fago-anticuerpo al eppendorff que contiene la resina lavada. Mezclar suavemente e incubar a temperatura ambiente 15 min, mezclando ocasionalmente.
7. Precipitar la resina como en el paso 2, quitar el sobrenadante, y lavar 10 veces con 1ml de TBST.
8. Eluir el fago suspendiendo la resina en 1ml de 0.1M Glicina-HCl pH2.2/1mg/ml BSA. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
9. Centrifugar la mezcla de elusión 1min a 4000rpm. Cuidadosamente transferir el sobrenadante a un eppendorff.
10. Neutralizar el eluido con 150µl de 1M Tris-HCl pH9.1.
11. Eluir el fago suspendiendo la resina en 1ml de 0.1M Glicina-HCl pH4/1mg/ml BSA. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
12. Repetir paso 10.

### **Titulación.**

Tomar el fago del stock(solución base) sin células.

1. Poner 1ml de LB en cada uno de los tres tubos eppendorff.

2. Hacer tres diluciones de fago 1:1000 (tomar 1 $\mu$ l del eppendorff anterior y mezclar en vortex con 1ml del medio LB).
3. Poner 4ml de Agarose Top en tubo cónico desechable a la temperatura de 47°-48°C.
4. Tener cajas Petri con LB agar a temperatura de 37°C.
5. Mezclar 1 $\mu$ l del fago con 200 $\mu$ l de cultivo de noche fresco de XL-blue(*E.coli*).
6. Infección 3 min.
7. Solidificar 10 min.
8. Incubar a temperatura 37°C toda la noche.
9. Calcular el título del fago en la mañana.

Nota: titulación después de paning se hace en medio LB sólido y X-gal (inductor: IPTG 23mg/ml en H<sub>2</sub>O, se toman 10 $\mu$ l por caja; tinción: X-gal 40mg/ml en Dimetil formamida, se toman 20-30 $\mu$ l por caja).

#### **Aislamiento de los clones:**

Después del proceso de biopanning se procedió a seleccionar 10 clones individuales del fago de los dos eluidos de la ronda tres y cuatro. Los clones se aislaron de las cajas de Petri que se prepararon para la titulación.

## **Amplificación.**

1. Sembrar 2 o 3 colonias de cultivo de ER-2537(*E. Coli*) en 40-50ml de 2xYT.
2. Dejar crecer toda la noche en la incubadora microbiologica a 37°C, con agitación de 200rpm.
3. En la mañana diluir el cultivo 1(células/medio):100(medio estéril) en 2xYT.
- 4<sup>a</sup>. Poner en cada probeta estéril 3ml del medio preparado. Con la punta estéril sacar una colonia de la caja o 10µl de la clona individual y depositarla en la probeta.
- 4b. Poner el eluido al medio preparado.
5. Crecer 4,5 horas a 37°C, 200rpm.

## **Purificación de DNA:**

### **SS forma:**

1. Tomar el material amplificado. Centrifugar las células del fago 2-3 min a 13000rpm. Transferir 1ml del sobrenadante a un ependorff limpio.
2. Añadir 400µl del PEG/NaCl 40%. Mezclar bien y dejar 10 min a temperatura ambiente.
3. Centrifugar 10 min a la misma velocidad y retirar el sobrenadante con vacío.
4. Centrifugar 15seg y retirar el sobrenadante con vacío.

5. Resuspender el boton en 100  $\mu$ l de amortiguador de loduro. Añadir 250 $\mu$ l de etanol absoluto y mezclar. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
6. Centrifugar 10 min, retirar el sobrenadante con vacio. Añadir al boton se le añade 400 $\mu$ l de etanol al 70% e inmediatamente (sin mezclar) centrifugar 3-4 min a la misma velocidad. Retirar el sobrenadante con vacio. El boton se deja secar al aire durante 15 min.
7. Resuspender el boton (DNA) en 20 $\mu$ l de agua.

Las bandas de DNA de clones individuales se verifican mediante una electroforesis en gel de agarosa.

La cantidad *minima* del DNA que se puede apreciar cuando un gel es fotografiado (tinción con bromuro de etidio) es de 2ng teniendo la anchura del pozo de 0,5cm. Por lo regular a cada pozo se debe poner de 0,2-0,5 microgramos del DNA.

El DNA se visualiza exponiendo las muestras teidas con bromuro de etidio a la luz ultravioleta. Este colorante contiene un grupo planar que se intercala entre las bases del DNA. Los rayos ultravioleta, absorbidos por el DNA a 260nm se transfieren al colorante (o los mismos rayos absorbidos por el colorante en la longitud de onda de 300 y 360nm), son devueltos en la zona roja-anaranjada del espectro visible (590nm). El bromuro de etidio puede ser usado para la identificación de ácidos nucleicos de dos y una cadena (tanto DNA como RNA). La *afinidad* del colorante por el ácido nucleico de una sola cadena es

mucho menor que por el de doble cadena, por lo que la fluorescencia en el primer caso es mucho menor.

Nota: bromuro de etidio es fuertemente mutagénico. Todas las manipulaciones de geles y soluciones que lo contienen deben ser realizadas con guantes.

### **Determinación de la secuencia.**

Método de Sanger:

Se usan 2',3'-didesoxinucleótido trifosfatos (ddNTP), que difieren de los sustratos desoxinucleótidos de la síntesis del DNA por sustitución del grupo hidroxilo en 3' por un hidrógeno. Los didesoxinucleótidos son reconocidos por la DNA polimerasa y son adicionados en el extremo 3' de la cadena de crecimiento. Pero como estos nucleótidos carecen de un grupo hidroxilo en 3', no pueden tener lugar las adiciones subsiguientes de nucleótidos. Por tanto, su incorporación hace que termine el crecimiento de la cadena de DNA. Cuando se incluye un nivel bajo de un didesoxinucleótido en particular en una reacción de síntesis de DNA ocasionalmente será incorporado en lugar del dNTP correspondiente y así ocasiona la terminación. La longitud del fragmento resultante de DNA indica la posición en donde el nucleótido correspondiente debería haber sido incorporado.

El DNA que va a ser secuenciado se prepara como moléculas de una sola cadena y se mezcla con un corto oligonucleótido complementario del DNA. Este oligonucleótido actúa como un cebador para la síntesis del DNA catalizada por la



DNA polimerasa. El material oligonucleótido - cebador se divide entonces en cuatro tubos de reacción separados. Cada tubo recibe un exceso de las cuatro moléculas no radioactivas de dNTP y una pequeña cantidad de uno de los cuatro ddNTP radioactivos. Las cadenas nuevas recién sintetizadas de cada reacción de secuenciación se someten a electroforesis en líneas adyacentes del gel de secuenciación, en donde los fragmentos se separan por tamaños moleculares. Se visualiza por autorradiografía. Dado que cada nucleótido de la cadena de DNA es el extremo 3' de un solo fragmento, la secuencia de la molécula de DNA entera, se puede leer del gel.

#### Secuenciación del DNA:

1. Poner las bases 2,5µl por tubo y guardar en congelación. Se usan ependorff de 500µl, estériles.
2. Hacer anealing:

Plasmid reaction buffer 2µl

Primer 1µl

DNA 10µl

Incubar 2 min a 70°C y dejar enfriar en temperatura ambiente hasta 36°C.

3. Mientras se enfría, preparar la mezcla:

Lab mix 0.5µl

DTT 1.0µl

Mn amortiguador 1.0µl

H<sub>2</sub>O 0.5µl

S<sup>35</sup>L ATF (5 $\mu$ Ci) 0.5 $\mu$ l

Enzima 2.0 $\mu$ l

Cantidad de cada uno de los componentes se tiene que multiplicar por 5 que es el número de clones a secuenciar.

Antes de añadir la enzima a la mezcla, centrifugar la mezcla durante 5 seg, así como el DNA con primer (paso 2).

4. Poner 5.5 $\mu$ l de la mezcla (paso 3) a cada clon de DNA con primer (paso 2) con 1 minuto de diferencia. Incubar 5 min a 37°C.
5. Posteriormente añadir 4.5 $\mu$ l de la mezcla anterior (paso 4) a cada base y incubar por 5 min mas a 37°C.
6. Terminar la reacción añadiendo 4 $\mu$ l de "stop solution". Los ependorffs con reacción se guardan a -20°C.

Para conocer la secuencia del injerto peptídico de los clones se aplican las reacciones a un gel de poliacrilamida.

Nota: la acrilamida es muy tóxica; se debe de trabajar con guantes y máscara (penetra a través de la piel muy rápido).

Una vez que el gel ha solidificado y ha sido colocado, es importante lavar los pozos con el amortiguador para electroforesis; de modo contrario las bandas del gel no serán claras y rectas. Se puede aplicar hasta 1 microgramo del DNA al pozo de tamaño de 0,5x0,2cm.

## ELISA:

### Obtención de clones para ELISA:

1. Centrifugar el cultivo con fago 10 min a 10000rpm 4°C.
2. Añadir ¼ parte del volumen de PEG/NaCl 40% al supernadante, dejar en hielo 60 minutos o en el refrigerador toda la noche.
3. Centrifugar 15 min a 10000rpm 4°C.
4. Precipitado resuspender en 50µl de PBS1x/NaN<sub>3</sub> 0.02%. Esperar 20min.
5. Centrifugar 2 min a 10000rpm a 4°C.
6. Trasladar el sobrenadante (fago) a un ependorff limpio.

### Purificación parcial del fago para ELISA:

1. Centrifugar 1 min a 13000rpm. Pasar sobrenadante a otro tubo. Añadir 150µl de PEG/NaCl 40%. Mezclar bien y precipitar toda la noche en refrigeración.
2. Centrifugar 15 min a 13000rpm a temperatura ambiente o a 4°C.
3. Quitar sobrenadante.
4. Resuspender el boton en 110µl de NaCl 0.15M.
5. Centrifugar durante 1 min a 13000rpm.
6. Tomar 100µl de sobrenadante y pasarlo al otro tubo.
7. Agregar 11µl de ácido acético 1M.
8. Incubar 10 min a temperatura ambiente.
9. Incubar 10 min en hielo.

10. Centrifugar 30min a 13000rpm a 4°C.
11. Quitar todo el sobrenadante.
12. Resuspender el boton en 50µl TBS 1x.

Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA) es un ensayo extremadamente sensible que puede usarse para detectar pequeñas cantidades de anticuerpos o antígenos. El método en su forma más simple comprende la unión del antígeno a una superficie fija, usualmente placa de microtitulación, por carga electrostática. La sustancia a revisar, conteniendo anticuerpos es añadida a la fase sólida y puede unirse al antígeno en la superficie de la placa. Todo el material que no se unió se lava, y la cantidad del anticuerpo unido a la placa es determinado al añadirse un segundo anticuerpo que es específico para la especie y clase de inmunoglobulina marcada ligado a una enzima. La cantidad del anticuerpo ligado a la enzima se determina al añadir una sustancia cromogénica (sustrato de la enzima). Existen muchas variaciones de ELISA.

Las ventajas del uso de ELISA son:

1. Es muy sensible y puede ser muy específica.
2. Es independiente de las funciones biológicas del anticuerpo (en contraste a la fijación del complemento, ensayos de hemaglutinación y neutralización).
3. Una cantidad grande de ensayos puede hacerse simultáneamente.
4. Se usa una cantidad pequeña de reactivos por lo que es relativamente barato.

5. El sustrato puede ser escogido de acuerdo al equipo disponible.
6. La flexibilidad del ensayo permite adaptarlo a casi cualquier situación.

#### ELISA del fago:

1. Poner  $10^9$ - $10^{10}$  del fago por pozo en 100 $\mu$ l de PBS1x/BSA 50ng/pozo y incubar durante toda la noche a 4°C.
2. Retirar el contenido de los pozos y lavar 5 veces 4 min cada uno con PBS1x/tween20 0.3% , 150  $\mu$ l por pozo.
3. Bloquear durante 1 hora a 37°C , 100 $\mu$ l por pozo de PBS1x/BSA1%.
4. Repetir paso 2.
5. Agregar el anticuerpo monoclonal en una concentración 1 $\mu$ g/ml, 100 $\mu$ l por pozo en PBS1x/BSA 0.2%/Tween20 0.2%. Incubar durante 1 hora a 37°C.
6. Repetir paso 2.
7. Poner el anticuerpo secundario conjugado a fosfatasa alcalina diluido a 1:1000 en PBS1x/BSA 0.2%/Tween20 0.2%. Añadir 100 $\mu$ l por pozo y incubar durante 1 hora a 37°C.
8. Repetir paso 2.
9. Poner el sustrato de fosfatasa alcalina (p-nitrosfenil fosfato), 100 $\mu$ l por pozo. Son 2 pastillas en 10ml de amortiguador de dietanolamina al 10% pH9.8. La absorbencia se lee a 405nm con un diferencial de 630nm a tiempos de 10 y 30 min.

## RESULTADOS.

Los resultados del presente trabajo comprenden dos partes: 1. obtención y análisis de los clones purificados con el BNTX16; y 2. análisis de los clones purificadas con el BNTX18.

### **Clones seleccionados por medio de monitoreo con el BNTX16:**

Se empezó con la realización de un biopanning con el anticuerpo monoclonal BNTX16. Las concentraciones de BNTX16 fueron 100 $\mu$ g/ml, 1 $\mu$ g/ml, 0.1 $\mu$ g/ml y 30ng/ml en la primera, segunda, tercera y cuarta ronda de biopanning, respectivamente. Las primera, segunda y tercera rondas se hicieron por biopanning en matriz de afinidad de anticuerpos inmovilizados y la cuarta ronda se hizo por biopanning en solución de proteína A-agarosa (suspensión acuosa al 50%). Para la primera ronda se tomaron 10 $\mu$ l de la biblioteca original Ph.D-12 en PBS1x/BSA0.1%. Para las rondas subsecuentes se tomaron los eluidos amplificados de la ronda anterior. Las elusiones se hicieron con la solución de 0.1M HCl-glicina a pH que varía de acuerdo al eluido. Las neutralizaciones siempre se hicieron con la misma solución de 1M Tris-HCl pH 9.1. La primera y la segunda ronda de biopanning se eluyó a pH2.2. La tercera ronda de biopanning se eluyó a dos pHs: primero pH4.4 y después pH2.2. La cuarta ronda también se eluyó a dos pHs: 4 y 2.2.

Tabla1. Títulos de los eluidos sin amplificar y amplificados de las cuatro rondas de biopanning con el BNTX16.

Numero de ronda	Título de eluido (ml)	Título del eluido amplificado (ml)
I	$1.5 \times 10^5$	$5 \times 10^{12}$
II	$2.5 \times 10^5$	$5 \times 10^{13}$
III	pH2.2: $1.6 \times 10^5$ pH4.4: $3.3 \times 10^5$	$2.7 \times 10^{13}$ (los dos eluatos juntos)
IV	pH2.2: $1.5 \times 10^5$ pH4.0: $5.8 \times 10^5$	

Nota: todos los eluidos de las cuatro rondas del panning se titularon en cajas Petri con medio LB solido y X-gal (inductor IPTG).

Sólo se obtuvieron los clones individuales de los eluidos de la ronda tres y de la ronda cuatro de los dos pHs cada uno. Por cada eluido y cada pH se obtuvieron por picadura 18 clonas. Como resultado del panning se obtuvieron 72 clones individuales purificados por afinidad. Estos clones se amplificaron individualmente. Parte de este material amplificado se ocupó para SS forma, y otra parte para la purificación de los clones. La calidad de SS forma se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa. Para inferir el título de 72 clones, una vez purificadas después de la amplificación, de cada uno de los dos pHs de la ronda tres, se tomaron tres clones al azar y para cada uno de los dos eluidos de la ronda cuatro, se tomaron dos clones al azar, para titular.

Tabla 2. Título de clones de los eluidos de la III ronda (pH2.2 y pH4.4) y de la IV ronda (pH2.2 y pH4.0) de biopanning con el BNTX16.

Ronda de panning	Total de clones obtenidas	Título de clonas seleccionadas al azar (ml)
IIIr, pH 2.2	18	3cl: $1.2 \times 10^{12}$ 9cl: $9.4 \times 10^{11}$ 15cl: $1.3 \times 10^{12}$
IIIr, pH4.4	18	5cl: $3.7 \times 10^{12}$ 11cl: $2.4 \times 10^{12}$ 16cl: $4 \times 10^{12}$
IVr, pH2.2	18	8cl: $2.2 \times 10^{12}$ 16cl: $1 \times 10^{11}$
Ivr, pH4.0	18	4cl: $9.4 \times 10^{12}$ 8cl: $1.2 \times 10^{12}$

Se realizaron ELISA con todos los clones de los cuatro eluidos. Cada clon se probó por duplicado y los resultados que se muestran son el promedio de los dos valores. Se ponen  $10^9$ - $10^{10}$  clones de fago, por pozo. La concentración del anticuerpo monoclonal BNTX16 es  $1 \mu\text{g/ml}$ . El anticuerpo secundario anti-IgG de ratón conjugado a fosfatasa alcalina se diluyó 1:1000. Para el sustrato de la fosfatasa alcalina (p-nitrosfenil fosfato) se pusieron 2 pastillas en 10ml de amortiguador de dietanolamina al 10% pH9.8 y la absorbencia se leyó a 405nm con un diferencial de 603nm a tiempos de 10 y 30 min. En los resultados sólo se muestra el último tiempo.

Una vez obtenidos los resultados de ELISA se seleccionaron los clones para determinar la secuencia la que se obtuvo.

Nota: Los valores de la absorbencia de los clones de todas las ELISA están ordenados de mayor a menor.



Tabla 3. ELISA con clones 1-18 pH2.2, ronda III de biopanning con el BNTX16.

Antígeno	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Absorbencia 405 nm
NTX 0.5µg/ml	BNTX16	Anti- IgG de raton	2.650
CI12	-/-	-/-	0.121
CI11	-/-	-/-	0.12
CI13	-/-	-/-	0.12
CI18	-/-	-/-	0.116
CI6	-/-	-/-	0.115
CI5	-/-	-/-	0.115
CI14	-/-	-/-	0.110
CI1	-/-	-/-	0.109
CI8	-/-	-/-	0.109
CI4	-/-	-/-	0.108
CI10	-/-	-/-	0.107
CI15	-/-	-/-	0.107
CI2	-/-	-/-	0.106
CI9	-/-	-/-	0.104
CI17	-/-	-/-	0.102
CI3	-/-	-/-	0.100
CI7	-/-	-/-	0.097
CI16	-/-	-/-	0.096

Tabla 4. ELISA con clones 1-18 pH4.4, III ronda de biopanning con el BNTX16.

Antígeno	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Absorbencia 405 nm
NTX:0.5µg/ml	BNTX16	Anti-IgG de raton	2.664
CI4	-/-	-/-	0.395
CI17	-/-	-/-	0.323
CI13	-/-	-/-	0.308
CI12	-/-	-/-	0.296
CI14	-/-	-/-	0.287
CI18	-/-	-/-	0.259
CI5	-/-	-/-	0.254
CI15	-/-	-/-	0.248
CI8	-/-	-/-	0.229
CI16	-/-	-/-	0.215
CI2	-/-	-/-	0.212
CI10	-/-	-/-	0.212
CI7	-/-	-/-	0.198
CI3	-/-	-/-	0.197
TBS	-/-	-/-	0.182
CI1	-/-	-/-	0.180
CI6	-/-	-/-	0.178

PhD1* <sup>1</sup>	-/-	-/-	0.164
CI9	-/-	-/-	0.161
CI11	-/-	-/-	0.145

\*<sup>1</sup>: PhD1 es un clon escogido al azar de la biblioteca original mediante siembra en caja y recuperación por picadura.

Tabla 5. ELISA con clones 1-18 pH2.2 y 1-18 pH4.0, IV ronda de biopanning con el BNTX16.

Antígeno	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Absorbancia 405 nm
NTX:0.5µg/ml	BNTX16	Anti-IgG de raton	2.616
PhD1	-/-	-/-	0.254
PBS/0.3%Tween	-/-	-/-	0.245
CI13 pH2.2	-/-	-/-	0.240
CI11	-/-	-/-	0.236
CI15	-/-	-/-	0.229
CI17	-/-	-/-	0.212
CI14	-/-	-/-	0.198
CI16	-/-	-/-	0.198
CI12	-/-	-/-	0.197
CI8	-/-	-/-	0.196
CI10	-/-	-/-	0.181
CI1	-/-	-/-	0.176
CI2	-/-	-/-	0.170
CI9	-/-	-/-	0.166
CI18	-/-	-/-	0.160
CI5	-/-	-/-	0.158
CI3	-/-	-/-	0.152
CI6	-/-	-/-	0.147
CI7	-/-	-/-	0.145
CI4	-/-	-/-	0.136
CI8 pH4.0	-/-	-/-	0.260
CI17	-/-	-/-	0.249
CI16	-/-	-/-	0.247
CI4	-/-	-/-	0.238
CI15	-/-	-/-	0.237
CI18	-/-	-/-	0.234
CI7	-/-	-/-	0.233
CI5	-/-	-/-	0.231
CI6	-/-	-/-	0.226
CI11	-/-	-/-	0.225
CI9	-/-	-/-	0.220
CI12	-/-	-/-	0.220
CI13	-/-	-/-	0.218

CI3	-//-	-//-	0.213
CI10	-//-	-//-	0.211
CI2	-//-	-//-	0.188
CI1	-//-	-//-	0.173

Figura 9. Secuencia de los clones de pH2.2 seleccionadas de la IV ronda de biopanning con el BNTX16.

8cl: T-M-G-F-T-A-P-R-F-P-H-Y  
 17cl: G-T-P-P-M-S-P-L-V-S-R-V

Figura 10. Secuencia de los clones de pH4.0 de la IV ronda de biopanning con el BNTX16.

4cl: W-H-W-Q-H-T-P-W-W-R-C-W  
 8cl: G-T-P-P-M-S-P-L-V-S-R-V  
 15cl: N-T-T-T-T-T-V-V-S-T-L-L  
 16cl: S-V-S-V-G-M-K-P-S-P-R-P  
 17cl: G-T-P-P-M-S-P-L-V-S-R-V

**Clones seleccionados de la biblioteca por medio de monitoreo con el BNTX18:**

En nuestro laboratorio se obtuvieron, por medio de biopanning, los clones purificados con el anticuerpo monoclonal BNTX18. Los clones se aislaron de los eluidos de la ronda tres y cuatro. La ronda tres se eluyó a pH2.2 y se aislaron 101 clones. La ronda cuatro se eluyó a dos pHs: 4.0(18clones) y 2.2(17 clones). Como resultado del panning se obtuvieron 136 clones purificadas por afinidad.

Los clones obtenidas se amplificaron individualmente, y el material amplificado se usó para la purificación de los clones y para el aislamiento de SS forma. También se realizaron ELISA con todos los clones y se determinó la secuencia de los clones escogidos.

Tabla 6. ELISA con clones 1-25 pH2.2, III ronda de biopanning con el BNTX18.

Antígeno	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Absorbancia 405 nm
CI23	BNTX18	Anti-IgG de raton	0.692
CI4	-/-	-/-	0.362
CI12	-/-	-/-	0.331
CI20	-/-	-/-	0.276
CI5	-/-	-/-	0.170
CI7	-/-	-/-	0.132
CI1	-/-	-/-	0.122
CI25	-/-	-/-	0.113
CI6	-/-	-/-	0.111
CI2	-/-	-/-	0.102
CI3	-/-	-/-	0.100
CI8	-/-	-/-	0.100
CI19	-/-	-/-	0.099
CI11	-/-	-/-	0.097
CI24	-/-	-/-	0.096
CI9	-/-	-/-	0.095
CI16	-/-	-/-	0.094
CI18	-/-	-/-	0.093
CI22	-/-	-/-	0.093
CI14	-/-	-/-	0.092
CI13	-/-	-/-	0.089
CI10	-/-	-/-	0.089
CI21	-/-	-/-	0.085
CI15	-/-	-/-	0.088
CI17	-/-	-/-	0.086
PhD1	-/-	-/-	0.081

Tabla 7. ELISA con clones 26-55 pH2.2, III ronda de biopanning con el BNTX18.

Antígeno	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Absorbencia nm 405
CI28	BNTX18	Anti-IgG de raton	0.371
CI36	-/-	-/-	0.247
CI50	-/-	-/-	0.235
CI31	-/-	-/-	0.233
PhD1	-/-	-/-	0.175
CI49	-/-	-/-	0.147
CI35	-/-	-/-	0.139
CI46	-/-	-/-	0.110
CI47	-/-	-/-	0.097
CI55	-/-	-/-	0.094
CI32	-/-	-/-	0.092
CI33	-/-	-/-	0.090
CI43	-/-	-/-	0.089
CI27	-/-	-/-	0.087
CI54	-/-	-/-	0.087
CI44	-/-	-/-	0.087
CI45	-/-	-/-	0.086
CI52	-/-	-/-	0.085
CI40	-/-	-/-	0.084
CI51	-/-	-/-	0.084
CI30	-/-	-/-	0.084
CI37	-/-	-/-	0.084
CI34	-/-	-/-	0.082
CI38	-/-	-/-	0.082
CI42	-/-	-/-	0.080
CI41	-/-	-/-	0.080
CI26	-/-	-/-	0.076
CI39	-/-	-/-	0.076
CI48	-/-	-/-	0.074
CI29	-/-	-/-	0.073

Tabla 8. ELISA con clones 56-101 pH2.2, III ronda de biopanning con el BNTX18.

Antígeno	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Absorbencia 405 nm
NTX:0.5µg/ml	BNTX18	Anti-IgG de raton	2.707
Cl61	-/-	-/-	1.395
Cl60	-/-	-/-	1.008
Cl65	-/-	-/-	0.658
Cl98	-/-	-/-	0.597
Cl58	-/-	-/-	0.550
Cl81	-/-	-/-	0.472
Cl59	-/-	-/-	0.459
Cl78	-/-	-/-	0.35
Cl62	-/-	-/-	0.348
Cl79	-/-	-/-	0.329
Cl56	-/-	-/-	0.311
Cl95	-/-	-/-	0.308
Cl94	-/-	-/-	0.303
Cl88	-/-	-/-	0.294
Cl70	-/-	-/-	0.29
Cl96	-/-	-/-	0.282
Cl101	-/-	-/-	0.273
Cl86	-/-	-/-	0.272
Cl93	-/-	-/-	0.263
Cl91	-/-	-/-	0.261
Cl80	-/-	-/-	0.256
Cl77	-/-	-/-	0.252
Cl83	-/-	-/-	0.251
Cl97	-/-	-/-	0.246
Cl57	-/-	-/-	0.244
Cl82	-/-	-/-	0.236
Cl76	-/-	-/-	0.236
Cl87	-/-	-/-	0.233
Cl100	-/-	-/-	0.231
Cl92	-/-	-/-	0.229
Cl99	-/-	-/-	0.226
Cl72	-/-	-/-	0.216
Cl63	-/-	-/-	0.215
Cl64	-/-	-/-	0.214
Cl71	-/-	-/-	0.214
Cl67	-/-	-/-	0.212
Cl75	-/-	-/-	0.212
Cl89	-/-	-/-	0.21
Cl90	-/-	-/-	0.208
Cl84	-/-	-/-	0.206

CI68	-/-	-/-	0.203
CI85	-/-	-/-	0.199
CI73	-/-	-/-	0.196
CI69	-/-	-/-	0.193
CI74	-/-	-/-	0.192
CI66	-/-	-/-	0.191

Tabla 9. ELISA con clones 1-17 pH2.2 y 1-18 pH4.0, IV ronda de biopanning con el BNTX18.

Antígeno	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario	Absorbencia 405 nm
NTX: 0.5µg/ml	BNTX18	Anti-IgG de raton	2.707
CI14 pH2.2	-/-	-/-	0.246
CI11	-/-	-/-	0.223
CI4	-/-	-/-	0.222
CI7	-/-	-/-	0.219
CI3	-/-	-/-	0.218
CI17	-/-	-/-	0.218
CI9	-/-	-/-	0.214
CI5	-/-	-/-	0.209
CI2	-/-	-/-	0.206
CI12	-/-	-/-	0.193
CI13	-/-	-/-	0.192
CI15	-/-	-/-	0.184
CI16	-/-	-/-	0.173
CI6	-/-	-/-	0.157
CI8	-/-	-/-	0.155
CI10	-/-	-/-	0.144
CI1	-/-	-/-	0.135
CI2 pH4.0	-/-	-/-	0.258
CI3	-/-	-/-	0.248
CI7	-/-	-/-	0.221
CI15	-/-	-/-	0.215
CI5	-/-	-/-	0.195
CI13	-/-	-/-	0.177
CI8	-/-	-/-	0.172
CI4	-/-	-/-	0.170
CI1	-/-	-/-	0.17
CI11	-/-	-/-	0.168
CI9	-/-	-/-	0.163
CI6	-/-	-/-	0.161
CI14	-/-	-/-	0.155
CI12	-/-	-/-	0.154
CI18	-/-	-/-	0.153

CI16	-/-	-/-	0.143
CI10	-/-	-/-	0.140
CI17	-/-	-/-	0.136

Figura 11. Secuencia de clones de pH2.2 de la III ronda de biopanning con el BNTX18.

1cl: H-W-P-F-L-Q-W-H-M-Y-Y-P  
2cl: F-N-S-S-H-S-L-L-R-R-P-P  
4cl: S-P-T-R-A-V-N-E-L-F-G-M  
5cl: G-P-E-Q-L-L-F-L-R-P-F-P  
6cl: A-P-M-H-K-A-L-W-V-Q-P-G  
7cl: Q-M-L-N-R-L-S-E-L-N-G-M  
8cl: H-W-P-F-L-Q-W-H-M-Y-Y-P  
9cl: K-L-A-Q-T-F-P-Q-V-L-L-A  
10cl: H-W-S-H-A-F-M-S-V-W-G-M  
11cl: Y-R-W-W-P-F-Q-V-K-P-S-A  
12cl: H-T-N-L-P-Q-A-L-W-G-M-Q  
14cl: S-L-V-E-L-P-S-P-P-M-L-A  
16cl: T-S-F-T-G-W-W-N-L-M-A-R  
19cl: T-A-S-T-L-H-K-T-L-F-G-M  
20cl: Y-V-G-P-L-T-Q-T-L-Y-G-M  
22cl: S-F-A-A-S-E-P-D-R-A-R-T  
23cl: S-L-P-R-V-Y-Y-E-I-F-G-A  
24cl: A-M-S-P-R-M-D-G-K-V-F-A  
25cl: H-W-P-F-L-Q-W-H-M-Y-Y-P



28cl: S-L-P-R-V-Y-Y-E-I-F-G-A  
31cl: H-T-N-L-P-Q-A-L-W-G-M-G  
33cl: N-Q-L-I-A-S-L-S-P-R-V-D  
35cl: Y-T-A-A-P-R-Y-W-A-E-L-F  
36cl: H-N-N-Q-R-L-M-L-Y-G-M-H  
46cl: T-L-N-W-P-P-T-L-W-G-M-H  
47cl: Y-H-W-W-Q-F-Q-M-K-H-S-A  
50cl: S-P-T-R-A-V-N-E-L-F-G-M  
55cl: K-L-A-Q-T-F-P-Q-V-L-L-A  
57cl: S-Y-F-S-Q-Q-P-Q-Y-S-K-L  
60cl: S-L-P-R-V-Y-Y-E-I-F-G-A  
61cl: S-L-P-R-V-Y-Y-E-I-F-G-A  
63cl: S-F-A-A-S-E-P-D-R-A-R-T  
65cl: S-L-P-R-V-Y-Y-E-I-F-G-A  
78cl: N-S-V-I-G-C-R-T-Q-S-C-D  
83cl: R-F-P-W-F-F-H-E-S-S-H-S  
84cl: Q-I-R-T-L-P-I-Y-S-L-Q-S  
86cl: W-W-Q-F-P-W-P-P-Y-T-S-V  
91cl: Y-V-G-P-L-T-Q-T-L-Y-G-M

Figura 12. Secuencia de los clones de pH2.2 de la Iv ronda de biopanning con el BNTX18.

11cl: S-P-T-R-A-V-N-E-L-F-G-M

12cl: S-P-T-R-A-V-N-E-L-F-G-M

13cl: S-P-T-R-A-V-N-E-L-F-G-M

14cl: S-P-T-R-A-V-N-E-L-F-G-M

15cl: S-P-T-R-A-V-N-E-L-F-G-M

Figura 13. Secuencia de los clones de pH4.0 de la IV ronda de biopanning con el BNTX18.

4cl: Y-T-A-A-P-R-Y-W-A-E-L-F

5cl: H-N-N-Q-R-L-M-L-Y-G-M-H

6cl: Y-T-A-A-P-R-Y-W-A-E-L-F

11cl: Y-T-A-A-P-R-Y-W-A-E-L-F

## DISCUSION.

Los métodos tradicionales de obtención de anticuerpos y antígenos, que se basaban en procedimientos costosos, que usaban líneas celulares especializadas y animales, últimamente se han ido sustituyendo por una metodología más eficiente, rápida y económica basada en la Ingeniería Genética. Uno de estos métodos aprovecha la capacidad de los fagos filamentosos de expresar en su superficie proteínas y péptidos ajenos a ellos mismos. Debido a que los fagos son uno de los mejores vectores moleculares para la clonación simultánea de muchos genes diferentes, ellos se pueden usar para la construcción de bibliotecas de epítomos reales o potenciales (como mimotopos).

En el presente trabajo se utiliza la capacidad de estas bibliotecas para ser reconocidas de manera específica por anticuerpos.

El procedimiento para el mapeo de epítomos por el método de "Phage Display" implica: biopanning, amplificación, ensayo para colonias positivas (ELISA), aislamiento del DNA, secuenciación y comparación de las secuencias.

Una ventaja importante de los péptidos al azar sobre péptidos específicos como, por ejemplo, en el método de fragmentación del antígeno, es que el primero no sólo localiza el epítomo en la secuencia antigénica, pero también se puede inferir qué residuos de aminoácidos son más importantes para la unión del anticuerpo.

La gran mayoría de los epítomos son conformacionales, con una compleja estructura estérica, que puede variar bajo diferentes condiciones fisicoquímicas y durante la unión con el anticuerpo. Lo anteriormente mencionado hace que la identificación de los epítomos conformacionales sea mucho más difícil que la identificación de los epítomos lineales.

El "Phage Display" es uno de los métodos más poderosos de localización de epítomos. En la mayoría de los trabajos basados en este método, los epítomos descritos han sido lineales. No se conoce bien si un péptido lineal expresado en fago puede imitar, estructuralmente, a un epítomo discontinuo o si sólo puede imitar su especificidad de unión al anticuerpo.

El objetivo del presente trabajo fue comparar resultados de selección de los clones de la misma biblioteca (Ph.D.12) mediante dos anticuerpos monoclonales distintos (BNTX16 y BNTX18) obtenidos contra NTX. Los datos bibliográficos (Pascal) muestran que ambos anticuerpos reaccionan con NTX de forma competitiva. Lo que se quería averiguar era si los dos anticuerpos monoclonales seleccionaban clones peptídicos semejantes, tanto por la secuencia como por los ensayos inmunológicos.

Se realizaron cuatro rondas de selección con cada uno de los anticuerpos monoclonales con el objeto de obtener un conjunto de clones enriquecidos con clones activos eluidos a pH2.2 y pH4.0. Se eluyó a pH distinto para ver si había diferencia entre los eluidos considerando: 1. positividad – negatividad, y 2. magnitud. Se obtuvo que era más eficiente eluir a pH2.2 (se enriquece el eluato).

Esto sucede porque se requiere de un cambio de pH menor para eluir clones de menor afinidad por el anticuerpo y viceversa. Se requiere de un cambio de pH mayor para eluir clones más afines a anticuerpo.

Tabla 10. Valores de inmunoreactividad positivos de los clones pH2.2 (1-17), pH4.0 (1-18), ronda IV, BNTX18.

Antígeno	Valor de absorbencia a 405 nm
NTX	2.707
Cl 2 (pH4)	0.258
Cl 3 (pH4)	0.248
Cl 14 (pH2.2)	0.246
Cl 11 (pH2.2)	0.223
Cl 4 (pH2.2)	0.222
Cl 7 (pH4)	0.221
Cl 7 (pH2.2)	0.219
Cl 3 (pH2.2)	0.218
Cl 17 (pH2.2)	0.218
Cl 15 (pH4)	0.215
Cl 9 (pH2.2)	0.214
Cl 2 (pH2.2)	0.206

Los resultados obtenidos mostraron lo siguiente:

- I. BNTX16 como consecuencia de 4 rondas de panning no seleccionó clones que en condiciones de ELISA dieron un nivel de reacción positivo importante. Sin embargo, algunos clones dieron un nivel de reacción positivo aceptable alrededor de 0.3, pero este valor no es significativo, ya que Ph.D.1, que es el control negativo, dió resultados comparables. Se procedió a seleccionar algunos clones para secuenciar, con los valores altos de ELISA. Sus secuencias mostraron que no hubo

similitud con el NTX, por lo que no se siguió con la secuenciación.

II. A diferencia de los clones seleccionados con el BNTX16, clones seleccionados con el BNTX18 dieron resultados positivos más notables. El análisis inmunológico (ELISA) dio valores confiables de inmunorreactividad.

1. El análisis de la secuencia de los clones seleccionados con el BNTX18 mostró la recurrencia de los siguientes aminoácidos (subrayado):

Figura 14. Secuencia de clones de pH2.2 de la III ronda de biopanning con el BNTX18.

1cl: H-W-P-F-L-Q-W-H-M-Y-Y-P  
2cl: F-N-S-S-H-S-L-L-R-R-P-P  
4cl: S-P-T-R-A-V-N-E-L-F-G-M  
5cl: G-P-E-Q-L-L-F-L-R-P-F-P  
6cl: A-P-M-H-K-A-L-W-V-Q-P-G  
7cl: Q-M-L-N-R-L-S-E-L-N-G-M  
8cl: H-W-P-F-L-Q-W-H-M-Y-Y-P  
9cl: K-L-A-Q-T-F-P-Q-V-L-L-A  
10cl: H-W-S-H-A-F-M-S-V-W-G-M  
11cl: Y-R-W-W-P-F-Q-V-K-P-S-A  
12cl: H-T-N-L-P-Q-A-L-W-G-M-Q  
14cl: S-L-V-E-L-P-S-P-P-M-L-A

16cl: I-S-F-T-G-W-W-N-L-M-A-R  
19cl: I-A-S-T-L-H-K-T-L-F-G-M  
20cl: Y-V-G-P-L-T-Q-T-L-Y-G-M  
22cl: S-F-A-A-S-E-P-D-R-A-R-T  
23cl: S-L-P-R-V-Y-Y-E-I-F-G-A  
24cl: A-M-S-P-R-M-D-G-K-V-F-A  
25cl: H-W-P-F-L-Q-W-H-M-Y-Y-P  
28cl: S-L-P-R-V-Y-Y-E-I-F-G-A  
31cl: H-I-N-L-P-Q-A-L-W-G-M-G  
33cl: N-Q-L-I-A-S-L-S-P-R-V-D  
35cl: Y-T-A-A-P-R-Y-W-A-E-L-F  
36cl: H-N-N-Q-R-L-M-L-Y-G-M-H  
46cl: T-L-N-W-P-P-T-L-W-G-M-H  
47cl: Y-H-W-W-Q-F-Q-M-K-H-S-A  
50cl: S-P-T-R-A-V-N-E-L-F-G-M  
55cl: K-L-A-Q-T-F-P-Q-V-L-L-A  
57cl: S-Y-F-S-Q-Q-P-Q-Y-S-K-L  
60cl: S-L-P-R-V-Y-Y-E-I-F-G-A  
61cl: S-L-P-R-V-Y-Y-E-I-F-G-A  
63cl: S-F-A-A-S-E-P-D-R-A-R-T  
65cl: S-L-P-R-V-Y-Y-E-I-F-G-A  
78cl: N-S-V-I-G-C-R-T-Q-S-C-D  
83cl: R-F-P-W-F-F-H-E-S-S-H-S

84cl: Q-I-R-T-L-P-I-Y-S-L-Q-S  
86cl: W-W-Q-F-P-W-P-P-Y-T-S-V  
91cl: Y-V-G-P-L-T-Q-T-L-Y-G-M

Figura 15. Secuencia de clones de pH2.2 de la IV ronda de biopanning con el BNTX18.

11cl: S-P-T-R-A-V-N-E-L-F-G-M  
12cl: S-P-T-R-A-V-N-E-L-F-G-M  
13cl: S-P-T-R-A-V-N-E-L-F-G-M  
14cl: S-P-T-R-A-V-N-E-L-F-G-M  
15cl: S-P-T-R-A-V-N-E-L-F-G-M

Figura 16. Secuencia de clones de pH4.0 de la IV ronda de biopanning con el BNTX18.

4cl: Y-T-A-A-P-R-Y-W-A-E-L-F  
5cl: H-N-N-Q-R-L-M-L-Y-G-M-H  
6cl: Y-T-A-A-P-R-Y-W-A-E-L-F  
11cl: Y-T-A-A-P-R-Y-W-A-E-L-F



La cuantificación de las frecuencias de aminoácidos repetitivos es como sigue:

76% de los péptidos contienen P,

51% de los péptidos contienen S,

47% de los péptidos contienen GM o GA,

45% de los péptidos contienen T,

38% de los péptidos contienen Q.

2. La antigenicidad de los péptidos seleccionados con el anticuerpo monoclonal BNTX18 se muestra en la Tabla 11.

Tabla 11. Clones con valores positivos de ELISA, seleccionadas con el BNTX18.

Clon	Valor de ELISA
CI61, pH2.2, ronda III	1.395
CI60, pH2.2, ronda III	1.008
CI65, pH2.2, ronda III	0.658
CI23, pH2.2, ronda III	0.629
CI98, pH2.2, ronda III	0.597
CI58, pH2.2, ronda III	0.550
CI81, pH2.2, ronda III	0.472
CI59, pH2.2, ronda III	0.459
CI28, pH2.2, ronda III	0.371
CI4, pH2.2, ronda III	0.362
CI78, pH2.2, ronda III	0.35
CI62, pH2.2, ronda III	0.348
CI12, pH2.2, ronda III	0.331
CI79, pH2.2, ronda III	0.329
CI56, pH2.2, ronda III	0.311
CI95, pH2.2, ronda III	0.308
CI94, pH2.2, ronda III	0.303

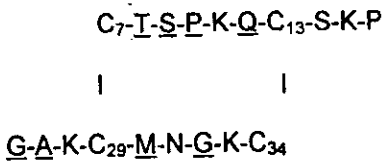
El porcentaje de los clones positivas para ELISA fue de 36%.

3. Los experimentos de secuencia y de inmunoreactividad mostraron que los aminoácidos críticos son: GA (o GM) en región C-terminal y T, S, P y Q en región N-terminal de los péptidos y que ninguno de los péptidos desprovisto de estas secuencias, en los dos extremos, fue positivo para ELISA.

4. En los péptidos positivos para ELISA, los aminoácidos GM o GA de la región C-terminal correspondieron a aminoácidos en la región C-terminal de NTX, mientras que los aminoácidos T, S, P y Q tienen correspondencia con la región N-terminal, por lo que los péptidos antigénicos tienen dos grupos de aminoácidos similares a dos sitios distantes de la secuencia de NTX.

T<sub>1</sub>-I<sub>2</sub>-I<sub>3</sub>-N<sub>4</sub>-V<sub>5</sub>-K<sub>6</sub>-C<sub>7</sub>-T<sub>8</sub>-S<sub>9</sub>-P<sub>10</sub>-K<sub>11</sub>-Q<sub>12</sub>-C<sub>13</sub>-S<sub>14</sub>-K<sub>15</sub>-P<sub>16</sub>-C<sub>17</sub>-K<sub>18</sub>-E<sub>19</sub>-L<sub>20</sub>-Y<sub>21</sub>-G<sub>22</sub>-  
S<sub>23</sub>-S<sub>24</sub>-A<sub>25</sub>-G<sub>26</sub>-A<sub>27</sub>-K<sub>28</sub>-M<sub>30</sub>-N<sub>31</sub>-G<sub>32</sub>-K<sub>33</sub>-G<sub>34</sub>-K<sub>35</sub>-C<sub>36</sub>-Y<sub>37</sub>-Y<sub>38</sub>-N<sub>39</sub>

5. Las dos secuencias importantes para la unión que no son adyacentes en la estructura primaria de NTX, en la toxina plegada se acercan por dos puentes disulfuro de la molécula nativa (C<sub>7</sub>-C<sub>13</sub>; C<sub>29</sub>-C<sub>34</sub>).



Las razones precisas de la diferencia en los resultados de los clones seleccionados con BNTX16 y los clones seleccionados con el BNTX18 no se conocen.

Los resultados obtenidos en este trabajo son congruentes con la bibliografía existente con los cuales se llegó básicamente a dos conclusiones

primordiales:

1. Cuatro o más residuos específicos permiten la localización inequívoca del epítopo, a lo largo de la secuencia antigénica. (Lane, 1993)
2. La selección del grupo de aminoácidos (usualmente relacionados) más que la selección de aminoácidos individuales se observa frecuentemente. (Lane, 1993)

Así mismo, la metodología de "Phage Display" se ha aplicado para problemas de salud tan importantes como el cáncer y el SIDA, tratándose en el primer caso de un epítopo lineal y en el segundo de un epítopo conformacional, como se muestra a continuación:

1. Cáncer (Stephen, 1995):

Antígeno: p53, proteína humana supresora de tumor.

Bibliotecas de: 6 aminoácidos, 12 aminoácidos y 20 aminoácidos.

Anticuerpo monoclonal: PAb240.

Epítopo lineal: R-H-S-V-V

Figura: 17

2. SIDA (Boots, 1997)

Antígeno: gp120

Bibliotecas de: 15 aminoácidos, 21 aminoácido.

Anticuerpo monoclonal: IgG1b12.

Epítopo conformacional: A pesar de las similitudes en los residuos, no fue posible derivar una secuencia consenso para todas las clonas.

Figura: 18.

PAb 240 Reactive Clones

	p53 200 N L R V E Y L D D R N T F R H S V V V P Y E P P E V G S D C T 230	No. sequenced
Clone 1	R H S V I S	1
Clone 2	F R H S L L	1
Clone 3	W R H S V V	1
Clone 4	F K H S V V	1
Clone 5	L R H S I L	1
Clone 6	Y R H S I V	1
Clone 7	L R H S V I	5
Clone 8	F R H S V V D Y G L Y N	1
Clone 9	Y S R H S V V Y G D G Q	1
Clone 10	T L R H S I I F G G E W	1
Clone 11	A V R H S V I E R T L S	1
Clone 12	E G R H S V V H Q G A A	2
Clone 13	G P G I R H S T V P A Y	1
Clone 14	D R A P R I R H S V I I	1
Clone 15	W I A T T L M R H S V V	1
Clone 16	D R H S V V T E D P G A L D R R T H S F	1
Clone 17	D G A L E E R H S V L R R T E A E Y Q M	1
Clone 18	T Q A S A E L E R H S V V I R Q P R F V	1
Clone 19	E P L E K C V R R H S M R D L S G V C P	1
Clone 20	D G E Q G F M I N E R H S V I P P W S S	4
Clone 21	T E V G N M A S R V R H S V I E A A N G	1
Clone 22	I E L G E P K K V V V R H S I I G S H L	1
Clone 23	S G H H S E M R A L K S S L R H S V I S	1

Figura 17. Alineamiento de los residuos 200-300 de p53 humana con la secuencia peptídica deducida de los clones seleccionados con Pab240 de las bibliotecas de 6, 12 y 20 aminoácidos. (Tomado de Stephen y col., 1995)

Number of times found

Clone no.	Sequence of phage insert*	Number of times found
	<pre>           eCD4                         DPE...C GGEFF C MSTQLFNMSTWTL P C RIKGIIMM Q EVG...D   TSH N I Q   K   R   K           P A   V           K T           </pre>	
	<pre>           eCD4                                   HSEGDLSISPNSLTAMPGLP           WLMMAAMPDYITQL           NLRSTSFELWAKWP           GEPDNDNLP LCEG           GRPQWYLQFEDYWRK           DSLRVDEHHEVVVPM           DWVPPFGFFSRLQLP           NMPRWEEFVDKHS           VRFHLAGWLPVAVSVVIFSDH           DGLRSDGSHLARFVFNCSGFY           GNFTASTASHGDELLALY           FWCEHVGF LMRN           NMPRWEEFVDKHS           FAHEGSAFRLSSKVEDWVSR           CVFYANVEEEVQCWL           NMPRWEEFVDKHS           </pre>	3
A. Sequences containing Trp, and one acidic amino acid		
B12-Rd31F-15-52096		
B12-Rd250-17-42296		
R1-43-0809		
R1-18-803		
R2-44-818		
R1-40-809		
R1-43-0809		
R2-37-818		
B12-Rd137-20-32596		
B12-Rd31F-20-52096		
B12-d150-11-32796		
B12-Rd250-8-41196		
B12-Rd250-2-41196		
B12-Rd31F-25-52096		
B12-Rd250-10-41696		
B12-Rd250-5-41696 <sup>b</sup>		

Clone no.	Sequence of phage insert <sup>a</sup>	Number of times found
<b>B. Sequences without Trp, or lacking Trp-acidic amino acid combination</b>		
B12-Rd250-40-42296	F <del>C</del> VRLM <del>C</del> SGLIPFFVLL <del>C</del> FFA	2
B12-Rd31f-11-52096	F <del>S</del> RADFFPLSYSLSSV <del>P</del> STAL	2
B12-Rd250-21-41696	FSPYPPDIVHTTAFSSFVNPVD	
B12-Rd31f-7-52096	SSFFYSALTPSPSPYSQSSR	
B12-Rd250-41-42296	RFFAFPMVCASFLLVAIAFFP	
B12-Rd31f-23-52096	PLPPSRFFITVCLTFLFSL <del>S</del> FF	
B12-Rd31f-8-52096	VRP <del>C</del> VASALLFFELLFLL <del>L</del> PS	
B12-Rd250-30-41696	ICFPNTRYICIFAMVSS <del>L</del> LVF	
B12-Rd31f-9-52096	QQAGSY <del>P</del> GCIDY <del>I</del> YCHASAIG	
B12-Rd250c-9-61396	LLPAYGKSPREP	
B12-Rd31f-14-52096	RHFVPLYLSVSYDGF <del>S</del> RGASI	
B12-Rd31f-27-52096	PIIH <del>P</del> HPRIA <del>M</del> RVSIS <del>P</del> FPF	
B12-Rd31f-14-52096	TPTDSTV <del>R</del> GSSTMDGFLKSVY	
B12-Rd31f-18-52096	TASF <del>R</del> RSVSFP <del>V</del> LVLSFLA <del>F</del> FSH	
R1-26-803	GAGVNRKCAWHPRHI	
R1-01-809	VAKKLVVPPQVSSGSNF	
B12-Rd250-16-42296 <sup>c</sup>	HWG <del>V</del> YR	

<sup>a</sup>Shown at top are residues essential for gp120 binding to CD4. Residues marked ~~C~~CD4 are D<sup>396</sup>, E<sup>370</sup>, W<sup>427</sup>, and D<sup>57</sup> derived from Olshevsky *et al.*,<sup>28</sup>

<sup>b</sup>This phage was found by gp120 competition selection. The sequence was found in 16 phage examined. It is identical to that of phage K2-37-818, which was identified without competition.

<sup>c</sup>The insert in this phage was only 18 bp.

**Figura 18. Secuencias de aminoácidos de fagos seleccionados con el anticuerpo monoclonal humano recombinante IgG1b12 y monitoreo de competencia con gp120. (Tomado de Boots, 1997)**

## CONCLUSIONES:

1. Los péptidos seleccionados con el anticuerpo monoclonal BNTX18 de la biblioteca Ph.D.12 por medio de la metodología de "Phage Display" imitan funcionalmente al epítipo del anticuerpo monoclonal BNTX18.
2. Los péptidos seleccionados tienen dos grupos de aminoácidos idénticos a dos sitios distantes en la secuencia de aminoácidos de NTX, por lo que imitan al epítipo estructuralmente.
3. El epítipo tentativo identificado con el anticuerpo monoclonal BNTX18 es *conformacional*: aminoácidos GA o GM en la región C-terminal y aminoácidos T, S, P y Q en la región N-terminal de NTX.
4. Los péptidos de 12 aminoácidos pueden adquirir conformaciones satisfactorias en cuanto a los requerimientos de especificidad de unión con el anticuerpo monoclonal BNTX18.

## REFERENCIAS:

1. Abbas A. K. y col. 1995. Immunología Celular y Molecular. Interamericana – McGraw-Hill. España, Madrid. 517 pp.
2. Barbas C.F. 1993. Recent advances in phage display. *Current Opinión in Biotechnology*. 4, 526-530.
3. Boots L. J., McKenna P. M., Arnold B. A., Séller P. M., Gorny M. K., Zolla-Pazner S., Robinson J. E. y Conley A. J. 1997. Anti-Human Immunodeficiency Virus Type 1 Human Monoclonal Antibodies that Bind Discontinuous Epitopes in the Viral Glycoproteins Can Identify Mimotopes from Recombinant Phage Peptide Display Libraries. *AIDS Research and Human Retroviruses*. 13 (18), 1549-1559.
4. Cwirla S. E., Peters E. A., Barrett R. W. y Dower V.J. 1990. Peptides on phage: A vast library of prptides for identifying ligands. *Biochemistry*. 87, 6378-6382.
5. Dotavio D. Epitope Mapping Using Phage-Displayed Peptide Libraries. *Methods in Molecular Biology*. 66, 181-193.
6. Gurrola G. B. y Possani L. D. 1995. Structural and functional features of Noxiustoxin: a K<sup>+</sup> channel blocker. *Biochemistry and Molecular Biology Internatíonal*. 37 (3), 527-535.
7. Herion P., Gurrola-Briones G., Sánchez M., Saavedra R. y Possani L. D. 1995. Monoclonal Antibodies against Noxiustoxin. *Hybridoma*. 14 (3), 247-251.
8. Horton H. R y col.1995. Bioquímica. Prentice-Hall Hispanoamericana, S. A. México, D. F.



9. Jefferies D. 1998. Selection of Novel Ligands from Phage Display Libraries: An Alternative Approach to Drug and Vaccine Discovery? *Parasitology Today*. 14(5), 202-206.
10. Lane D.P. y Stephen C. W. 1993. Epitope mapping using bacteriophage peptide libraries. *Current Opinión in Immunology*. 5, 268-271.
11. Makowski L. 1993. Structural constraints on the display of foreign peptides on filamentous bacteriophages. *Gene*. 128, 5-11.
12. Pereboev A. y Morris E. Reiterative Screening of Phage-Display Peptide Libraries with Antibodies. *Metods in Molecular Biology*. 66, 195-193.
13. Polis G.A. 1991 The Biology of Scorpions. Stanford University Press. Stanford, California.
14. Scott J. K. y Smith G. P. 1990. Searching for Peptide Ligands with an Epitope Library. *Science*. 249, 368-290.
15. Sitges M., Possani L. D. y Bayon A. 1986. Noxiustoxin, A Short-Chain Toxin from the Mexican Scorpion *Centruroides noxius*, Induces Transmitter Release by Blocking K<sup>+</sup> Permeability. *The Journal of Neuroscience*. 6 (6), 1570-1574.
16. Smith G. P. y Scott J. K. 1993. Libraries of Peptides and Proteins Displayed on Filamentous Phage. *Metods in Enzimology*. 217, 228-257.
17. Stanier R. Y. y col. 1986. Microbiología. Repla, S. A. México. 836 pp.
18. Stephen C. W., Helminen P. y Lane D. P. 1995. Characterisation of Epitopes on Human p53 using Phage-displayen Peptide Libraries: Insights into Antibody-Peptide Interactions. *J. Mol. Biol.* 248, 58-78.

19. Vazquez-Garcia L. y Villalobos A. 1987. Phylum Arthropoda. Interamericana. México, D.F. 352pp.
20. Widsom G. B. 1994. Peptide antigens. A practical aproach. IRP Press. Oxford University Press. N. J. USA. 139-179, 219-243 pp.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**