



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Expresión de fragmentos del péptido beta amiloide en la  
proteína de superficie P8 del fago filamentoso M13  
y su caracterización**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**LIZETH VERÓNICA BOLAÑOS SUÁREZ**



**MÉXICO, D. F.**

**2007**



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.

## **JURADO ASIGNADO**

**Presidente:** Prof. Alicia Beatriz Cervantes Peredo.

**Vocal:** Prof. Jorge Fernando Paniagua Solís.

**Secretario:** Dr. Karen Manoutcharian Airapetian.

**1er. Suplente:** Prof. Constantino III Roberto López Macías.

**2do. Suplente:** Prof. María Benita Leonor Fernández Salgado.

**Sitio donde se desarrollo el tema:**

**El presente trabajo fue desarrollado en el Instituto de investigaciones  
Biomédicas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, UNAM.**

**Circuito exterior SN Apdo. Postal 70225 04510 México D. F**

**Asesor:** Dr. Karen Manoutcharian Airapetian. \_\_\_\_\_

**Supervisor técnico:** M en C. María Elena Munguía Zamudio. \_\_\_\_\_

**Sustentante:** Lizeth Verónica Bolaños Suárez. \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A DIOS:**

Por permitirme vivir, tener a mi familia y por cuidarme todos los días de mi vida.

### **A MI MADRE:**

Por todo lo que me has dado desde el día que nací, ya que éste logro ha sido alcanzado gracias a la ayuda, dedicación, amor y esfuerzo que me has brindado incondicionalmente.

### **A MI PADRE:**

Por que siempre nos has brindado amor, cuidado y por tu esfuerzo de todos los días.

### **A JUAN:**

Porque hemos crecido juntos y siempre me has ayudado cuando más lo necesito, espero que sigamos juntos muchos años más.

### **A MIS AMIGAS: GABRIELA Y ERIKA.**

Por su amistad y por haberme apoyado durante estos años.

**AL DR. KAREN MANOUTCHARIAN:**

Por haberme permitido ser parte de su grupo de trabajo y participar en un proyecto muy interesante, el cual me ha permitido aprender técnicas que me ayudarán en mi desarrollo profesional.

**AL DRA. GOHAR GEVORGIAN:**

Por haber permitido trabajar en su laboratorio y a su excelente asesoría.

**AL BIÓLOGO. GONZALO ACERO:**

Por su excelente asesoría técnica, apoyo en resolver mis dudas y su atención durante mi estancia en el laboratorio.

**A LA M. EN C. MARÍA ELENA MUNGUÍA ZAMUDIO**

Un agradecimiento muy especial ya que gracias a su excelente asesoría técnica, conocimientos en el área y su apoyo personal, este trabajo se logró desarrollar y terminar.

# ÍNDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b> .....                              | <b>8</b>  |
| <b>1. Resumen</b> .....  | <b>10</b> |
| <b>2. Antecedentes</b> .....   | <b>11</b> |
| 2.1 Enfermedad de Alzheimer. ....                                    | 11        |
| 2.2 Definición y características de la Enfermedad. ....              | 11        |
| 2.3 Proteína precursora del amiloide ( <b>APP</b> ). ....            | 13        |
| 2.4 Procesamiento de la APP. ....                                    | 14        |
| 2.5 El péptido beta amiloide ( <b>βA</b> ). ....                     | 15        |
| 2.6 Hipótesis amiloide. ....   | 17        |
| 2.7 Factores de riesgo para la enfermedad de Alzheimer. ....         | 19        |
| 2.8 Tratamientos contra la enfermedad de Alzheimer. ....             | 21        |
| 2.9 Inmunoterapia. ....  | 21        |
| 2.10 Tecnología de despliegue en fago ( <i>phage display</i> ). .... | 23        |
| <b>3. Justificación</b> .....  | <b>30</b> |
| <b>4. Objetivos</b> .....  | <b>31</b> |
| 4.1. Objetivo general. ....  | 31        |
| 4.2. Objetivos particulares. ....                                    | 31        |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>5. Material y Métodos</b> -----   | <b>32</b> |
| <b>6. Resultados</b> -----   | <b>47</b> |
| <b>6.1</b> Diseño e hibridación de oligonucleótidos. -----                   | <b>47</b> |
| <b>6.2</b> Digestión del vector fagémido pG8SAET. -----                      | <b>48</b> |
| <b>6.3</b> Transformación bacteriana. -----                                  | <b>48</b> |
| <b>6.4</b> Colonias recombinantes. -----                                     | <b>49</b> |
| <b>6.5</b> Caracterización de colonias. -----                                | <b>49</b> |
| <b>6.6</b> Producción de fagos recombinantes y secuenciación de su ADN.----- | <b>52</b> |
| <b>6.7</b> Ensayos de inmunoadsorción ligados a enzima (ELISA).-----         | <b>52</b> |
| <b>6.8</b> Ensayo inmunoenzimático de tipo Western. -----                    | <b>59</b> |
| <b>6.9</b> Tinción con plata.-----   | <b>60</b> |
| <b>7. Discusión</b> -----  | <b>62</b> |
| <b>8. Conclusiones</b> -----   | <b>70</b> |
| <b>9. Perspectivas</b> -----   | <b>71</b> |
| <b>10. Bibliografía</b> -----  | <b>72</b> |
| <b>11. Anexos</b> -----  | <b>79</b> |
| ➤ <b>1. Vector fagémido pG8SAET.</b> -----                                   | <b>79</b> |
| ➤ <b>2. Secuencia de las construcciones.</b> -----                           | <b>80</b> |
| ➤ <b>3. Fago auxiliar M13K07.</b> -----                                      | <b>82</b> |
| ➤ <b>4. Preparación de reactivos y medios de cultivo.</b> -----              | <b>83</b> |



## ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

### FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>FIGURA 2.1.</b><br>Placas neuríticas y marañas neurofibrilares en el cerebro con la enfermedad de Alzheimer. -----                 | 12 |
| <b>FIGURA 2.2.</b><br>Estructura de la proteína precursora del amiloide (APP) humana.-----  | 13 |
| <b>FIGURA 2.3.</b><br>Procesamiento de la APP. -----  | 15 |
| <b>FIGURA 2.4.</b><br>El péptido beta amiloide ( $\beta$ A). -----  | 16 |
| <b>FIGURA 2.5.</b><br>Hipótesis de la cascada amiloide.-----  | 18 |
| <b>FIGURA 2.6.</b><br>Representación esquemática del fago filamentoso M13. -----  | 23 |
| <b>FIGURA 2.7.</b><br>Ciclo de vida del fago filamentoso M13.-----  | 25 |
| <b>FIGURA 6.1.</b><br>Corrimiento electroforético del ADN de colonias.-----   | 47 |
| <b>FIGURA 6.2.</b><br>Digestión del vector fagémido pG8SAET. -----  | 48 |
| <b>FIGURA 6.3.</b><br>PCR de colonias transformadas ( $\beta$ A 12-28, SCR12-28). -----   | 50 |
| <b>FIGURA 6.4.</b><br>PCR de colonias transformadas ( $\beta$ A 1-16, SCR1-16). -----   | 51 |
| <b>FIGURA 6.5.</b><br>Unión del anticuerpo monoclonal 6E10 al $\beta$ A <sub>1-16</sub> fusionado a la proteína P8 del fago M13. ---- | 53 |
| <b>FIGURA 6.6</b><br>Unión del anticuerpo monoclonal BAM 10 al $\beta$ A <sub>1-16</sub> fusionado a la proteína P8 del fago M13.-    | 54 |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>FIGURA 6.7</b><br>Unión del anticuerpo monoclonal 6F/3D al $\beta A_{1-16}$ fusionado a la proteína P8 del fago M13.----- | <b>55</b> |
|--|-----------|

|  |           |
|--|-----------|
| <b>FIGURA 6.8.</b><br>Interacción del suero de ratón BALB/c anti $\beta A_{1-42}$ fibrilar con el $\beta A_{1-16}$ fusionado a la proteína P8 del fago M13.----- | <b>57</b> |
|--|-----------|

|  |           |
|--|-----------|
| <b>FIGURA 6.9.</b><br>Unión del anticuerpo monoclonal BAM 9.0 al $\beta A_{12-28}$ fusionado a la proteína P8 del fago M13.- | <b>58</b> |
|--|-----------|

|  |           |
|--|-----------|
| <b>FIGURA 6.10.</b><br>Ensayo inmunoenzimático de tipo Western.----- | <b>59</b> |
|--|-----------|

|  |           |
|--|-----------|
| <b>FIGURA 6.11.</b><br>Tinción con Plata.----- | <b>60</b> |
|--|-----------|

## **TABLAS**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>TABLA 1.</b><br>Inducción de una respuesta inmune después de la inmunización con fagos recombinantes.----- | <b>28</b> |
|---|-----------|

|                                      |           |
|--------------------------------------|-----------|
| <b>TABLA 2.</b><br>Anticuerpos ----- | <b>42</b> |
|--------------------------------------|-----------|

## ABREVIATURAS

|                       |   |
|-----------------------|---|
| <b>ABTS</b>           | Sustrato revelador de la enzima Peroxidasa de rábano HRP. |
| <b>ADN</b>            | Ácido desoxirribonucleico.                                |
| <b>APP</b>            | Proteína precursora del amiloide.                         |
| <b>APOE</b>           | Apolipoproteína E.  |
| <b>ATP</b>            | Adenosin Trifosfato.                                      |
| <b>βA</b>             | El péptido beta amiloide.                                 |
| <b>dNTP</b>           | Desoxinucleótidos.  |
| <b>DO</b>             | Densidad óptica.  |
| <b>EA</b>             | Enfermedad de Alzheimer.                                  |
| <b>ELISA</b>          | Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima.                |
| <b>Ff</b>             | Fago filamentoso.   |
| <b>H<sub>2</sub>O</b> | Agua.   |
| <b>IgG</b>            | Inmunoglobulina G.  |
| <b>kDa</b>            | Kilodaltones.   |
| <b>M</b>              | Molar   |
| <b>min</b>            | Minutos.  |
| <b>ml</b>             | Mililitros.   |
| <b>ng</b>             | Nanogramos  |
| <b>pb</b>             | Pares de bases.   |
| <b>PCR</b>            | Reacción en cadena de la polimerasa.                      |
| <b>PEG</b>            | Polietilenglicol.   |
| <b>pH</b>             | Potencial de hidrógeno.                                   |

|                         |                               |
|-------------------------|-------------------------------|
| <b>pmol</b>             | Picomol.                      |
| <b>rpm</b>              | Revoluciones por minuto.      |
| <b>seg</b>              | Segundos                      |
| <b>UFP</b>              | Unidades formadores de placa. |
| <b>AgNO<sub>3</sub></b> | Nitrato de plata.             |
| <b>MgCl<sub>2</sub></b> | Cloruro de Magnesio.          |
| <b>NaCl</b>             | Cloruro de sodio              |
| <b>µg</b>               | Microgramos.                  |
| <b>µl</b>               | Microlitros.                  |
| <b>° C</b>              | Grados Celsius.               |
| <b>%</b>                | Porcentaje.                   |

## 1. RESUMEN

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia y se ha convertido en uno de los problemas de salud más importantes debido a sus repercusiones para la sociedad. La hipótesis amiloide establece que el péptido beta amiloide ( $\beta$ A) es fundamental para el inicio y el desarrollo de la EA. El  $\beta$ A, es el producto del procesamiento de la proteína precursora amiloide (APP) a través de la acción de las enzimas  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas. Es un péptido de 38-43 aminoácidos que presenta una estructura secundaria  $\beta$  – plegada. Actualmente no existe una cura para la enfermedad, por lo que se están realizando estudios para desarrollar de tratamientos que puedan modificar las características patológicas de la enfermedad y para el desarrollo de una vacuna. En la actualidad se utiliza la tecnología de despliegue en fago como una alternativa para la producción de vacunas recombinantes, para enfermedades como el Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), Hepatitis B y la EA. Los fagos filamentosos son utilizados como acarreadores de péptidos sintéticos o recombinantes ya que son altamente inmunogénicos capaces de activar células T ayudadoras sin necesidad de adyuvantes.

En este trabajo se expresaron fragmentos del extremo amino y de la región media del  $\beta$ A<sub>1-42</sub> en el dominio N-terminal de la proteína P8 del fago filamentosos M13, mediante el uso del vector fagémido pG8SAET. Las construcciones se caracterizaron a través de técnicas de biología molecular, así como por ensayos inmunológicos. La expresión de los fragmentos 1-16 y 12-28 del  $\beta$ A<sub>1-42</sub> se confirmó por medio de ensayos inmunoenzimáticos de inmunoadsorción ligados a enzima (ELISA). Los fragmentos expresados en P8 presentaron propiedades antigénicas. Las proteínas de fusión se detectaron a través de ensayos inmunoenzimáticos de tipo Western.

Estas construcciones tendrán aplicación directa como blanco para ensayos inmunológicos para el estudio de la EA, permitiendo tener grandes cantidades de fagos recombinantes en pocas semanas, así como para el desarrollo de una vacuna recombinante contra esta enfermedad.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 ENFERMEDAD DE ALZHEIMER.

En 1906 Alois Alzheimer describió por primera vez las características clínicas y anatomopatológicas de la enfermedad en una paciente de 51 años August D., quien presentaba deficiencia en la memoria, desorientación, alucinaciones y un comportamiento agresivo. Después de cuatro años y medio, en los que sufrió un rápido deterioro mental, August D. murió en un completo estado de demencia (Hooper, 2000).

En la actualidad la enfermedad de Alzheimer (EA) es la causa más común de demencia y se ha convertido en uno de los problemas de salud más importantes debido a sus repercusiones para la sociedad (Alberca, *et al.*, 2002). De acuerdo a la Organización Mundial de la Salud más de 20 millones de personas en el mundo presentan demencia del tipo Alzheimer. En México más de 500 mil personas son afectadas por esta enfermedad y se espera que el número de personas que estén afectadas con la EA se incremente dentro de los próximos años ( [www.who.int/es/](http://www.who.int/es/) ).

La enfermedad de Alzheimer es multifactorial, en su patogénesis intervienen factores genéticos y ambientales, siendo la edad avanzada el factor de riesgo más importante. La enfermedad afecta acerca del 10 % de los individuos mayores de 65 años y aproximadamente 40 % de individuos mayores de 80 años (Ritcher *et al.*, 2004).

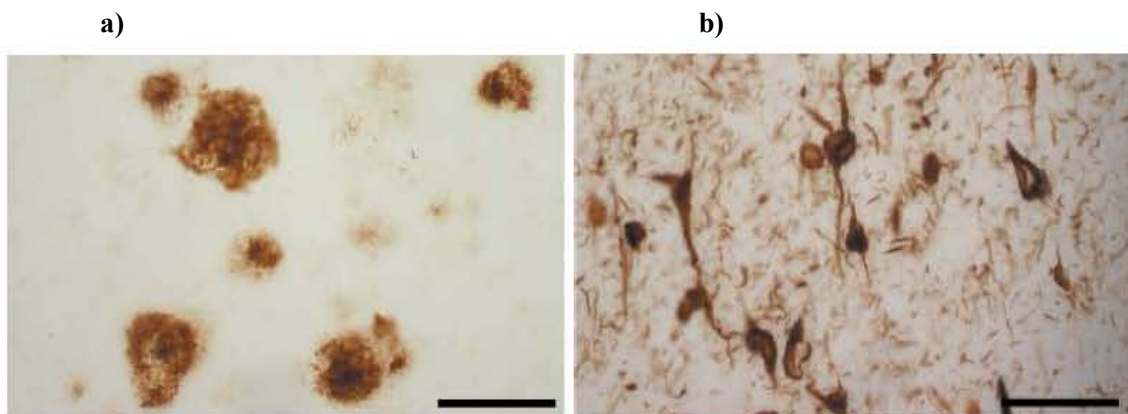
### 2.2 DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS DE LA ENFERMEDAD.

La enfermedad de Alzheimer se define como un síndrome neurodegenerativo, que es resultado de la degeneración de sinapsis y muerte de neuronas principalmente en la corteza cerebral, hipocampo, complejo amigdalino, tálamo y en los núcleos del prosencéfalo anterior, particularmente en el núcleo basal de Meynert que compromete a neuronas colinérgicas. Ésta pérdida neuronal da lugar a una disminución gradual de las funciones cognitivas. (Arango *et al.*, 2003).

Los síntomas clínicos de la enfermedad se inician con trastornos en la memoria y progresan con la afectación de otras habilidades como son el aprendizaje, el lenguaje, la orientación, la percepción, la atención y en un estado avanzado el paciente evoluciona a un deterioro de sus capacidades motrices, siendo incapaz de controlar sus funciones fisiológicas más simples (Alberca, *et al.*, 2002).

La neuropatología de la enfermedad se caracteriza por la presencia de placas neuríticas, marañas neurofibrilares (NFT), pérdida de neuronas y sinapsis que originan atrofia cerebral, déficit neuroquímico principalmente de acetilcolina, degeneración granulovacuolar y cuerpos de Hirano (Alberca, *et al.*, 2002).

Las marañas neurofibrilares están formadas por depósitos intracelulares de una proteína hiperfosforilada asociada a microtúbulos conocida como Tau (Weiner *et al.*, 2006). Las placas neuríticas son depósitos extracelulares, con una estructura esférica de 50-200 nm de diámetro, el centro de la placa está formado principalmente por el péptido beta amiloide fibrilar ( $\beta$ A) rodeado por neuritas distróficas frecuentemente conteniendo filamentos pareados de manera helicoidal, junto con astrocitos y células de microglia. El  $\beta$ A es producto del procesamiento de la proteína precursora del amiloide (APP) (**Figura 2.1**) (Morgan *et al.*, 2004).

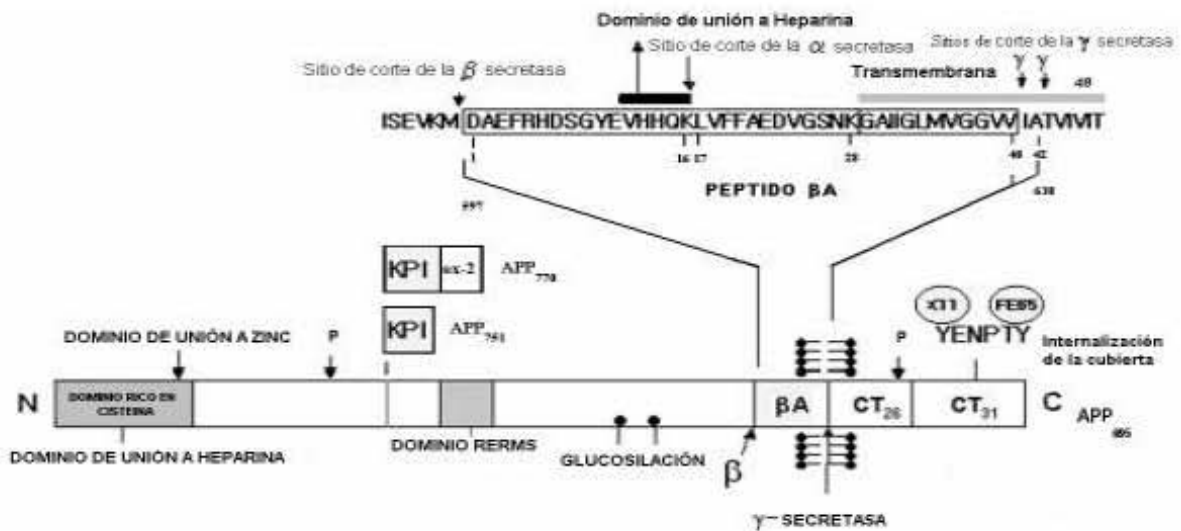


**Figura 2.1. Placas neuríticas y marañas neurofibrilares en el cerebro con la enfermedad de Alzheimer.**  
a) Placas neuríticas en el cerebro humano con la EA, fueron visualizadas con una inmunotinción utilizando un anticuerpo específico anti- $A\beta_{1-42}$ . Escala, la línea representa 125  $\mu$ m b) Marañas neurofibrilares en el cerebro humano con la EA, fueron visualizadas con una inmunotinción utilizando el anticuerpo específico anti - filamentos pareados de manera helicoidal - 1 (PHF-1). Escala, la línea representa 62.5  $\mu$ m. (Tomado de LaFerla *et al.*, 2005).

### 2.3 PROTEÍNA PRECURSORA DEL AMILOIDE (APP).

La APP es una glicoproteína de membrana de tipo I, que se expresa en numerosas células y tejidos del organismo, incluidas las neuronas, astrocitos, oligodendrocitos, células microgliales, células vasculares lisas y plaquetas (**Fig. 2.2**). Más de 10 isoformas de la APP pueden ser generadas por corte y empalme (*splicing*) alternativo del transcrito del gen de la APP, localizado en 21q 21.3 (Gardy et al., 2000; Morgan *et al.*, 2004).

Las isoformas más comunes expresadas son las de 695, 751 y 770 aminoácidos. La APP<sub>695</sub> es la isoforma predominantemente expresada en neuronas, mientras que en células no neuronales las formas de APP<sub>770</sub>, APP<sub>751</sub> son las más abundantes (**Fig. 2.2**) (Gardy et al., 2000; Morgan *et al.*, 2004).



**Fig. 2.2. Estructura de la APP humana.**

La APP está formada por un gran dominio extracelular, un dominio transmembranal hidrofóbico y un dominio citoplasmático. Las isoformas APP<sub>751</sub>, APP<sub>770</sub>, contienen el dominio KPI (inhibidor de proteasas de serina de tipo Kunitz) en el dominio extracelular, mientras que el dominio antigénico OX-2 sólo se encuentra en la isoforma APP<sub>770</sub>. Se muestran dominios de unión a heparina y Zinc, sitios para fosforilación en el dominio extracelular e intracelular (P). La región de glucosilación se encuentra en la región N-terminal adyacente a la secuencia del  $\beta A_{1-42}$ . La secuencia del  $\beta A_{1-42}$  comprende los aminoácidos 597-639 del APP<sub>695</sub>, los aminoácidos 1-28 se encuentran fuera de la membrana, mientras que los aminoácidos 29-40/42 se encuentran transmembranales. Un dominio de unión a heparina se encuentra dentro de la región amino de la secuencia del  $\beta A_{1-42}$  (VHHQK); en la secuencia YENPTY se unen las familias Fe 65, X11 (modificado de Annaert et al., 2002; Suh *et al.*, 2002)



La función normal de la APP no está completamente clara, pero se ha sugerido que tiene un papel importante en la regulación y supervivencia neuronal, en la plasticidad sináptica y en la adhesión celular, además se ha propuesto que la APP es un receptor de superficie celular que envía señales dentro de la célula en respuesta a un ligando extracelular (Reinhard *et al.*, 2005).

La APP se sintetiza en el retículo endoplásmico rugoso, posteriormente pasa por el aparato de Golgi, donde sufre glucosilación, sulfatación y fosforilación del dominio extracelular e intracelular, se empaqueta en vesículas de transporte, atraviesa el citoplasma y se inserta en la membrana celular donde sufre procesamiento por secretasas (Alberca, *et al.*, 2002).

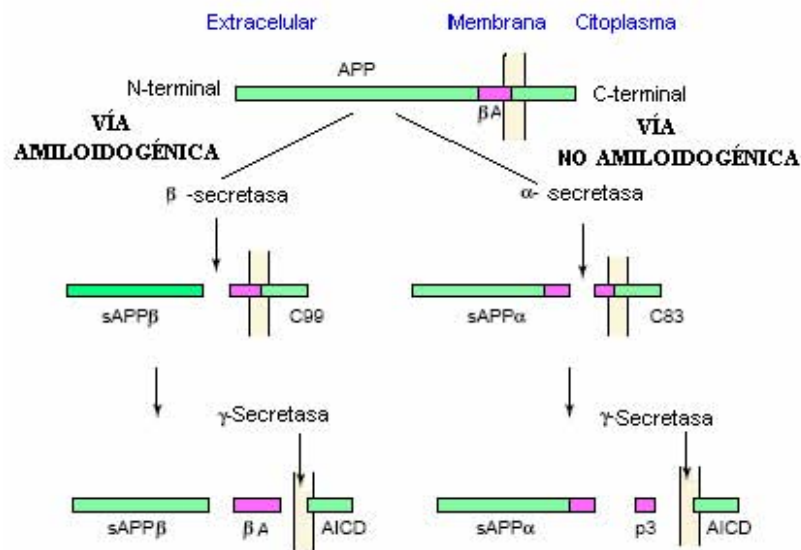
#### **2.4 PROCESAMIENTO DE LA APP.**

La APP sufre procesamiento por dos vías: la vía no amiloidogénica (que involucra a las enzimas  $\alpha$  y  $\gamma$  secretasas) y la vía amiloidogénica que permite la producción del péptido  $\beta A_{1-42}$  (implicando a las enzimas  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas) (Blennow *et al.*, 2006).

En la vía no amiloidogénica, la  $\alpha$  secretasa corta dentro del dominio del  $\beta A$  entre los residuos Lys16- Leu17 liberando un fragmento del APP soluble (sAPP $\alpha$ ) al medio y dejando el fragmento C-terminal denominado  $\alpha$ -CTF ó C83 que es cortado posteriormente por la  $\gamma$ -secretasa, lo cual libera al péptido p3 de 17 a 42 aminoácidos; el APP restante del dominio intracelular (AICD) es metabolizado en el citoplasma (Blennow *et al.*, 2006) (**Fig. 2.3**).

En la vía amiloidogénica la  $\beta$  secretasa corta antes del dominio del  $\beta A$ , liberando al sAPP $\beta$ ; el fragmento C-terminal que queda en la membrana, denominado b-CTF o C99 es cortado posteriormente por la  $\gamma$ -secretasa, liberando al  $\beta A_{1-42}$ ; el fragmento AICD restante es metabolizado en el citoplasma (Blennow *et al.*, 2006) (**Fig. 2.3**).

Se ha propuesto que la  $\alpha$  secretasa es miembro de una familia de desintegrinas /metaloproteasas denominadas ADAM 9, 10 y 17. En 1999, fue identificada la enzima responsable del corte del APP en el sitio de la  $\beta$  secretasa que fue denominada BACE, la cual es un miembro de la familia de pepsinas de proteasas aspárticas. La  $\gamma$ -secretasa es un complejo formado por cuatro componentes: presenilina, nicastrina, intensificador 2 de presenilina (PEN-2) y APH-1, con la presenilina constituyendo el sitio activo de la enzima y los otros componentes como cofactores (Suh et al., 2002).



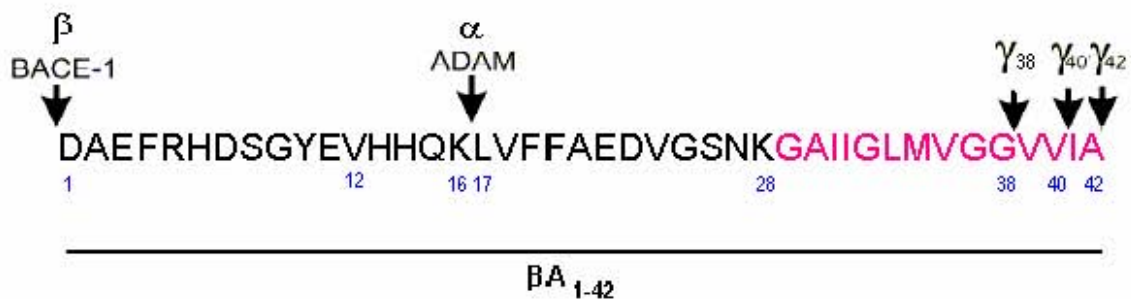
**Fig. 2. 3. Procesamiento de la APP.** Se muestran la vía amiloidogénica y no amiloidogénica. (Tomado de Vardy *et al.*, 2005).

## 2.5 EL PÉPTIDO BETA AMILOIDE ( $\beta$ A)

El  $\beta$ A es producto del procesamiento de la APP, es un péptido de 38-43 aminoácidos con peso molecular de aprox. 4kDa. El  $\beta$ A<sub>1-42</sub> es el principal componente proteico de placas neuríticas, mientras  $\beta$ A<sub>1-40</sub> se asocia principalmente con la angiopatía amiloidea cerebral

(Weiner *et al.*, 2006), además de ser la principal especie secretada en cultivos celulares y en el fluido cerebroespinal (Suh *et al.*, 2002).

La secuencia primaria del  $\beta A_{1-42}$ , fue determinada tras aislarlo de depósitos cerebrovasculares por Glender y Wong en 1984 (Morgan *et al.*, 2004) (**Fig. 2.4**).



**Fig. 2. 4. El péptido  $\beta A$ .** Se muestra la secuencia primaria del  $\beta A_{1-42}$ , así como los sitios de corte de las enzimas  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas. La  $\alpha$  secretasa corta entre los aminoácidos K 16 y L 17, la  $\beta$  secretasa antes del residuo D1 y la  $\gamma$  secretasa después de los aminoácidos G 38, V 40 y A 42 (modificado de Annaert *et al.*, 2002).

El  $\beta A_{1-42}$  puede dividirse en tres regiones, la región N-terminal que comprende los aminoácidos 1-16, la región media que corresponde a los aminoácidos 12-28 y la región C-terminal que comprende los aminoácidos 17-42. La región 1-28 es relativamente hidrófila, mientras que la región 29-42 es muy hidrofóbica, por tal motivo el  $\beta A_{1-42}$  tiende a agregarse a pH neutro (Liu *et al.*, 2004).

Con base en las observaciones que las neuritas rodeadas por depósitos del  $\beta A$  mostraban cambios degenerativos en cerebros de pacientes con la EA, varios investigadores propusieron la hipótesis que el  $\beta A$  no es inerte metabólicamente, sino que posee actividad biológica. Los estudios iniciales propusieron que el  $\beta A$  puede estimular un crecimiento transitorio del proceso neuronal, pero cuando se ensambla hacia pequeños agregados y cambia su conformación hacia una estructura  $\beta$ -plegada, adquiere la característica de activar mecanismos degenerativos, estudios

posteriores demostraron que el  $\beta$ A fibrilar puede inducir apoptosis neuronal. Recientemente se ha dado énfasis en formas más pequeñas del  $\beta$ A tales como monómeros, dímeros, oligómeros, ligandos difusibles derivados del  $\beta$ A (ADDL<sub>s</sub>) ya que se ha demostrado que son neurotóxicos y se incrementan cerca de 70 veces en cerebros de pacientes con la EA, comparados con cerebros de pacientes sanos. Recientemente dos estudios han demostrado que oligómeros pequeños del  $\beta$ A<sub>1-42</sub> secretados naturalmente a partir de una línea celular, pueden ser responsables del déficit en la plasticidad sináptica y alteración de las funciones cognitivas. Además de las formas extracelulares del  $\beta$ A, existe evidencia que formas intracelulares pueden ser patológicas en la EA (Vasilevko *et al.*, 2006).

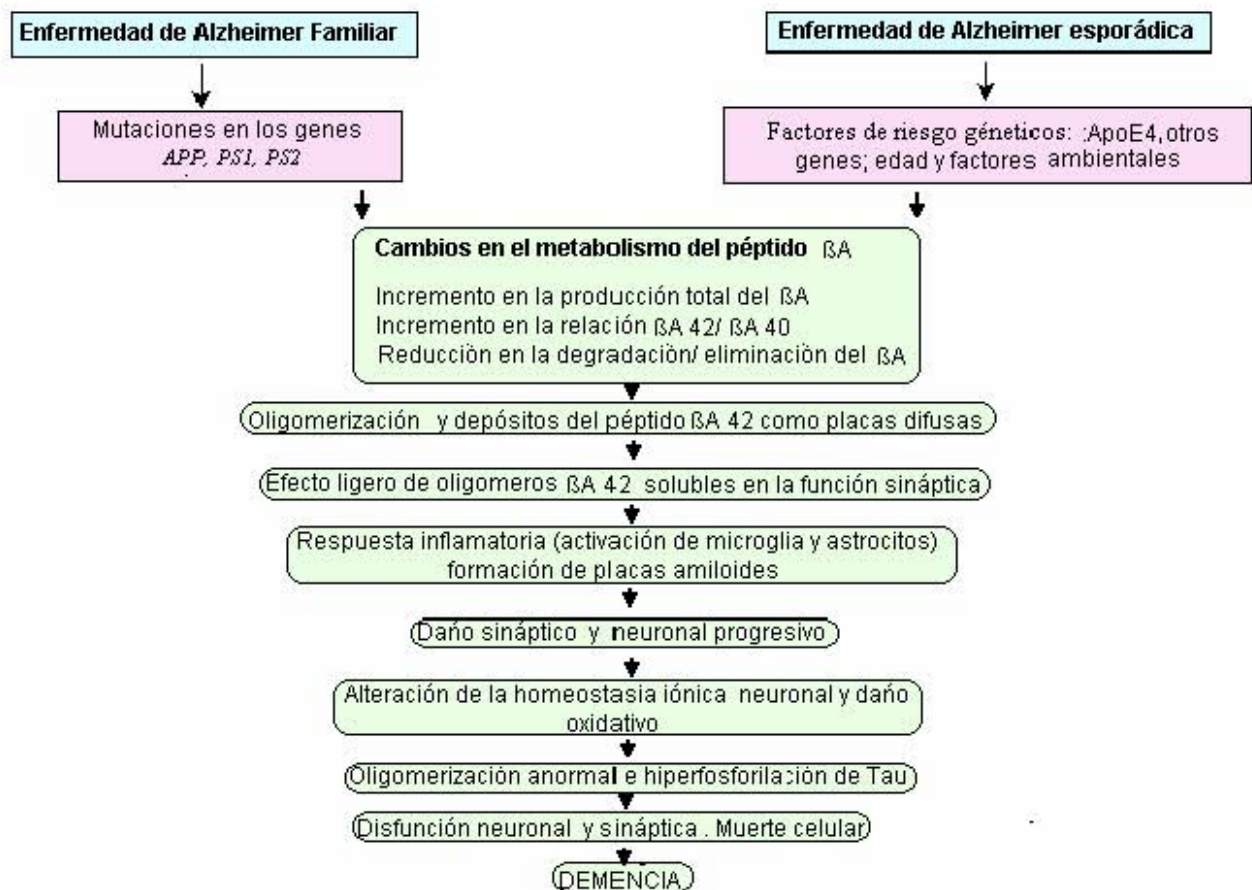
Se ha propuesto que monómeros del  $\beta$ A sufren un cambio conformacional de  $\alpha$ -hélice a  $\beta$ -plegada que promueven la agregación del péptido. La agregación es favorecida por  $\beta$ A<sub>1-42</sub> en comparación con  $\beta$ A<sub>1-40</sub>, así como por modificaciones o deleciones de la región amino terminal del péptido (Liu *et al.*, 2004).

Se han identificado dos regiones críticas para la agregación y propiedades tóxicas del péptido, localizadas en la región media y C-terminal del  $\beta$ A (Liu *et al.*, 2004). La región N-terminal es importante ya que se ha demostrado que la inmunización activa con el péptido  $\beta$ A induce anticuerpos que preferentemente reconocen epítomos dentro de esta región. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra la región N-terminal del  $\beta$ A se unieron a la forma fibrilar permitiendo su disgregación y la inhibición de sus efectos tóxicos (Frenkel *et al.*, 2004).

## **2.6 HIPÓTESIS AMILOIDE.**

El  $\beta$ A<sub>1-42</sub> es importante en la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer ya que se ha propuesto que sus agregados desencadenan una serie de eventos patológicos, los cuales conducen a la muerte celular y finalmente a la demencia, esta secuencia es conocida como la Hipótesis amiloide y es uno de los principales argumentos para dar explicación al desarrollo de la EA (Hardy *et al.*, 2002, Haass *et al.*, 2007).

La hipótesis amiloide establece que la acumulación del péptido  $\beta$ A es la principal influencia que dirige la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer. El resto del proceso de la enfermedad incluyendo la formación de marañas neurofibrilares es resultado de un desequilibrio entre la producción y la eliminación del péptido  $\beta$ A (Haass *et al.*, 2007; Hardy *et al.*, 2002) (**Fig. 2.5**).



**Fig. 2.5. Hipótesis de la cascada amiloide** (modificado de Haass *et al.*, 2007).

Existe controversia acerca de la importancia del  $\beta$ A en el desarrollo de la patología de la EA ya que se ha demostrado que no existe una correlación completa entre la disfunción cognitiva y la presencia de placas neuríticas en cerebros de pacientes con la EA (Le Vine, 2004).

Por largo tiempo se había documentado que sólo el  $\beta$ A fibrilar, era la especie tóxica que contribuía a una pérdida neuronal, sin embargo, se ha demostrado que otras morfologías del  $\beta$ A incluyendo protofibrilares y oligómeros solubles también son neurotóxicos. Los oligómeros del  $\beta$ A<sub>1-42</sub> pueden inducir disfunción neuronal (Le Vine, 2004), dañar directamente la función sináptica y las neuritas cerebrales (Citron, 2004). Los oligómeros son fácilmente difusibles y no pueden ser detectados por los procedimientos empleados para observar las placas neuríticas, esto podría explicar la aparente falta de correlación entre severidad de la demencia y la presencia de placas neuríticas *in vivo* (Le Vine, 2004). Actualmente se piensa que la formación de agregados tóxicos es la primera etapa patológica de la EA (Citron, 2004).

La neurotoxicidad ejercida por el  $\beta$ A puede ser mediado por varios mecanismos, como son la alteración de la homeostasia del calcio, producción de radicales libres, daño oxidativo, respuesta inflamatoria, activación del complemento e inducción de apoptosis (Suh *et al.*, 2002, Mattson, 2004).

Existen pruebas de origen genético y evidencias clínicas que apoyan a la hipótesis amiloide, por ejemplo, mutaciones en tres cromosomas incrementan la producción de  $\beta$ A<sub>1-42</sub> o favorecen su agregación, lo cual se asocia a la enfermedad de Alzheimer familiar (FAD) (Suh *et al.*, 2002), mientras que una disminución en la eliminación de  $\beta$ A<sub>1-42</sub> y factores adicionales que contribuyen a un incremento en la cantidad de oligómeros y agregados de  $\beta$ A<sub>1-42</sub> se han asociado a la enfermedad de Alzheimer esporádica (Citron, 2004; Blennow *et al.*, 2006).

## **2.7 FACTORES DE RIESGO PARA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER**

La enfermedad de Alzheimer de inicio tardío o esporádica es la forma más frecuente de esta enfermedad, la edad promedio del inicio de los síntomas clínicos es de 85 años con un mayor riesgo de desarrollar la EA después de los 65 años. Está relacionada principalmente con el gen de la Apolipoproteína E (APOE) que se encuentra en el cromosoma 19, el ser portados de un alelo E4 ya sea homocigoto (E4/4) o heterocigoto (E4/2, E4/3) es un factor de riesgo importante para el desarrollo de la enfermedad (Arango *et al.*, 2003).

La enfermedad de Alzheimer de inicio temprano o enfermedad de Alzheimer familiar (FAD) está relacionada a mutaciones en el gen APP en el cromosoma 21, el gen de la presenilina 1 (*PS1*) en el cromosoma 14 y el gen de la presenilina 2 (*PS2*) en el cromosoma 1. Los síntomas clínicos se inician en promedio antes de los 65 años de edad y representan del 5 al 10 % de los casos totales. Estas mutaciones se transmiten con un patrón de herencia autosómico dominante (Suh *et al.*, 2002).

Las mutaciones en el gen de la APP que son localizadas cerca de los sitios de corte de la  $\beta$  y  $\gamma$  secretasas incrementan la cantidad total del  $\beta A_{1-40}$  y  $\beta A_{1-42}$ , mientras que aquellas mutaciones cerca del sitio de corte de la  $\gamma$  secretasa incrementan específicamente la producción de  $\beta A_{1-42}$ ; mutaciones dentro de la secuencia del  $\beta A$  incrementan su agregación (Suh *et al.*, 2002).

Mutaciones en los genes de las presenilinas 1 y 2 alteran la actividad de la  $\gamma$  secretasa y originan un incremento en la producción del péptido  $\beta A_{1-42}$ , el componente principal de las placas neuríticas (Mattson, 2004; Blennow *et al.*, 2006).

A pesar de que se han identificado mutaciones en los genes APP, *PS1* y *PS2* que se relacionan con la EA, éstas no explican todos los riesgos genéticos para el desarrollo de ésta enfermedad. Actualmente se ha identificado que el gen de la  $\alpha$ -2 macroglobulina ( $\alpha$ -2M) localizado en el brazo largo del cromosoma 12 y los genes que codifican para la  $\alpha$ -1 antiqumiotripsina, butirilcolinesterasa se asocian con la EA de inicio tardío (Weiner *et al.*, 2006).

Otros factores de riesgo que se han asociados con la EA incluyen: la obesidad, la diabetes, el fumar, enfermedades cardiovasculares incluyendo hipercolesterolemia, hipertensión, aterosclerosis, niveles plasmáticos elevados de homocisteína y traumatismos cerebrales, pero su relación con la enfermedad no está completamente clara (Blennow *et al.*, 2006).

## 2.8 TRATAMIENTOS CONTRA LA ENFERMEDAD DE ALZHEIMER

En la actualidad no existe un tratamiento que pueda curar la EA, por lo que el manejo de los pacientes con esta enfermedad se basa sólo en tratamientos sintomáticos, los cuales incluyen el uso de inhibidores de la acetilcolinesterasa para tratar de mejorar la función cognitiva, Memantina un antagonista no competitivo del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA) y antiinflamatorios, pero éstos sólo tienen efectos limitados en los pacientes, por esta razón se están realizando estudios para desarrollar tratamientos que modifiquen las características patológicas de la EA. Entre los tratamientos que se han propuesto se encuentran, el uso de inhibidores o moduladores de la acción de las enzimas  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$  secretasas, moduladores de la actividad de las enzimas que degradan al  $\beta$ A *in vitro* e *in vivo* como son la nepresinilina, enzima degradadora de insulina (IDE), enzima convertidora de endotelina y plasmina 1 (ECE-1); estos tratamientos se encuentran bajo investigación o en fase de estudios clínicos (Citron, 2004). Actualmente se están proponiendo terapias que tienen como meta reducir los niveles de  $\beta$ A en el cerebro, bloquear ó inhibir su ensamble hacia formas patológicas; una de tales estrategias es la inmunoterapia (Agadjanyan *et al.*, 2005; Blennow *et al.*, 2006).

## 2.9 INMUNOTERAPIA

Un tratamiento para reducir los niveles del  $\beta$ A en el cerebro es la inmunoterapia, donde anticuerpos contra el  $\beta$ A facilitan su eliminación (Agadjanyan *et al.*, 2005), éstos incluyen la inmunización activa con el  $\beta$ A o inmunoconjugados del mismo y la administración pasiva de anticuerpos monoclonales, policlonales contra el  $\beta$ A, así como su Fab o con la cadena sencilla Fv (scFv) (Shenck *et al.*, 2004; Manoutcharian *et al.*, 2004).

La inmunización activa en ratones transgénicos (APP/Tg) con el  $\beta$ A<sub>1-42</sub> fibrilar, así como la transferencia pasiva de anticuerpos anti  $\beta$ A significativamente disminuyeron la deposición de placas amiloides, la distrofia neurítica, la astrogliosis y también el daño cognitivo en ratones APP/Tg, en ambos reportes anticuerpos anti  $\beta$ A permitieron los beneficios observados. Éstos resultados permitieron realizar ensayos clínicos en humanos con el  $\beta$ A<sub>1-42</sub> (Shenck *et al.*, 2004; Weiner *et al.*, 2006).



La inmunización activa en humanos con el  $\beta A_{1-42}$ , conocido como AN1792 formulado con el adyuvante QS-21, fue interrumpida en la fase clínica 2 del estudio, debido a que 6 % de los pacientes tratados desarrollaron meningoencefalitis aséptica. A pesar de que fue interrumpido éste ensayo, se demostró que se generaron anticuerpos anti-  $\beta A$  después de la vacunación y que estos anticuerpos fueron asociados a un menor déficit cognitivo en estos pacientes. Se ha propuesto que la inflamación se debió a una respuesta T celular contra el  $\beta A$  atribuido al protocolo de inmunización. El epítipo reconocido por las células T se localiza en la región media a C-terminal del péptido  $\beta A_{1-42}$  (aminoácidos 15-42). Los estudios iniciales demostraron que anticuerpos monoclonales dirigidos hacia la región N-terminal del péptido, se unían al  $\beta A$  fibrilar permitiendo su disgregación e inhibiendo sus efectos neurotóxicos, además de prevenir la formación fibrilar. Se demostró que estos anticuerpos se unían al epítipo EFRH localizado en las posiciones 3-6 del  $\beta A$  (Solomon, 2005). La región amino terminal del  $\beta A$  es altamente inmunogénica y diferentes grupos han demostrado que la inmunización activa con éste péptido induce anticuerpos que preferentemente reconocen un epítipo dentro de ésta región (Agadjanyan *et al.*, 2005; Maier *et al.*, 2006).

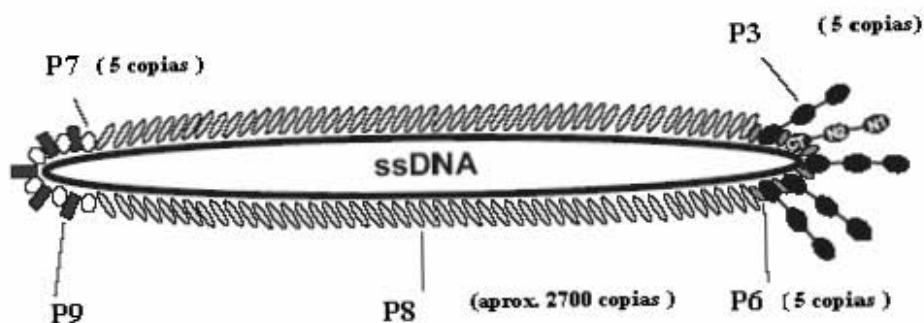
A pesar de que el ensayo clínico en humanos fue interrumpido, éste indicó que la inmunoterapia es una estrategia útil para el tratamiento de la EA, además de proporcionar evidencia clínica de la hipótesis amiloide (Shenck *et al.*, 2004; Weiner *et al.*, 2006). Actualmente se buscan producir inmunógenos los cuales abarquen la región N terminal del péptido y que carezcan de la región C terminal para la inmunización en modelos animales de la EA. Estudios recientes, han demostrado el éxito de conjugar fragmentos cortos de la región amino terminal del  $\beta A$  a acarreadores inmunogénicos, para generar títulos altos de anticuerpos anti-  $\beta A$  en ausencia de una respuesta inmune celular contra el  $\beta A_{1-42}$ , los cuales permitieron la disminución del  $\beta A$  cerebral y el déficit cognitivo en un modelo animal de la EA (Maier *et al.*; 2006).

Una alternativa para la producción de vacunas recombinantes es utilizar fagos filamentosos ya que debido a su potencial inmunogénico pueden ser usados como inmunógenos para conferir una protección mediada por anticuerpos contra muchas enfermedades tales como la EA (Manoutcharian, 2001).

## 2.11 DESPLIEGUE EN FAGO (*PHAGE DISPLAY*)

La tecnología de despliegue en fago (*phage display*) es un método que permite la expresión de péptidos o proteínas fusionadas a algunas de las proteínas de superficie de fagos filamentosos (**Ff**), dando como resultado proteínas de fusión (Manoutcharian, 2001, 2004).

El Ff más comúnmente usado es el fago M13, el cual infecta específicamente a *Escherichia coli*. El fago M13 tiene forma de un tubo flexible con una longitud de 900 nm y un diámetro de aprox. 6.5 nm, su genoma consiste de un ADN circular de cadena sencilla de 6.4 Kb, constituido por 11 genes y una región intergénica. El genoma de M13 se encuentra recubierto por una estructura proteica, formado por las proteínas P3 (406 aminoácidos), P6 (112 aminoácidos), P7 (33 aminoácidos), P9 (32 aminoácidos) que se encuentran en aproximadamente 5 copias y P8 la cual es la principal proteína de cubierta que se encuentra en aprox. 2700 copias en la superficie del fago M13 (Barbas et al., 2001) (**Fig. 2.6**).



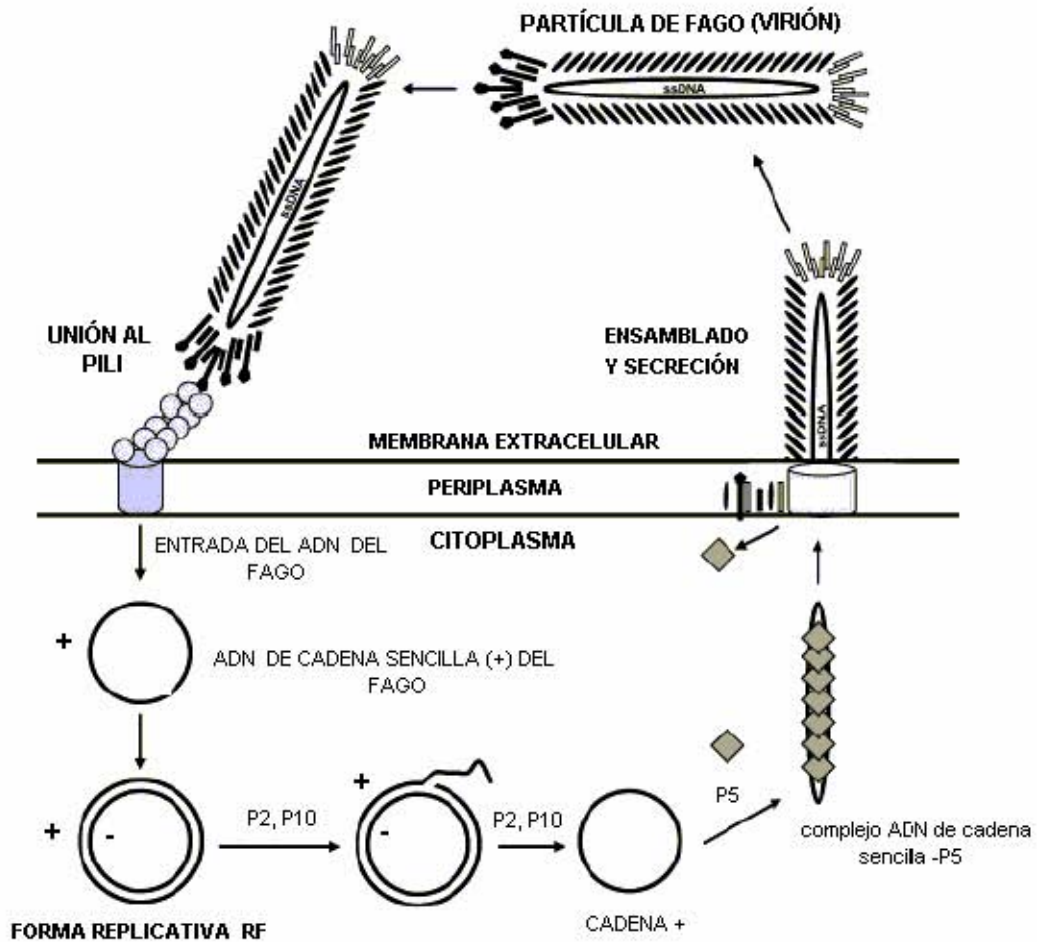
**Fig. 2.6. Representación esquemática del fago filamentososo M13.** Se muestra la localización y el número de copias de cada proteína de la cápside. La proteína P3 está formada por tres dominios N1, N2, CT, los cuales se encuentran unidos por regiones ricas en glicina (Tomado de Paschke, 2006)

La proteína P8 consiste de 50 aminoácidos y posee una estructura secundaria en forma de  $\alpha$ -hélice; P8 se divide en tres segmentos funcionales, el primer segmento comprende los aminoácidos 1-20 y corresponde a la porción amino terminal que se encuentra expuesta en el exterior del fago, el segundo segmento comprende los aminoácidos 21-39 que corresponde a la porción media de la proteína, la tercera porción comprende los aminoácidos 40-50 y corresponde a la porción C-terminal. La proteína P8 tiene un peso molecular de 5.2 kDa. La proteína P3

está involucrada en el proceso de infección del fago a su hospedero y se encuentra formada por tres dominios separados por regiones ricas en glicina, N1 o D1 (dominio N-terminal de 68 aminoácidos), N2 o D2 (aminoácidos 87 a 217) y CT o D3 (dominio C-terminal de 150 aminoácidos) (Barbas *et al.*, 2001).

El ciclo de vida de M13, se inicia con la infección del fago a *E. coli*, a través de la interacción de la proteína P3 del fago con el pili F (codificado por el plásmido F) y las proteínas de membrana citoplasmática Tol Q, R y A de la bacteria. El dominio N2 de P3 interactúa con el pili F, ocasionando la retracción del pili y conduciendo a P3 al periplasma donde el dominio N1 de P3 interactúa con Tol A, las siguientes etapas del proceso de infección no son completamente claras, pero se conoce que las proteínas P8, P7 y P9 del fago se desensamblan en la membrana citoplasmática de la bacteria, mientras que el ADN del fago de cadena (+) entra en el citoplasma, donde se sintetiza la cadena (-) por enzimas bacterianas, produciéndose un ADN de doble cadena llamado la forma replicativa (RF). La cadena (-) del RF es el templatado para la transcripción, resultando en ARN mensajero el cual es traducido a proteínas de replicación (P2, P5, P10), de cápside (P3, P6, P7, P8, P9) y a proteínas involucradas en el ensamblado del fago (P1, P4, P11). Durante la replicación del ADN del fago filamentoso, la proteína P2 corta la cadena (+) del RF en la región intergénica resultando en un extremo 3'-OH el cual sirve para la síntesis de una cadena (+) por un mecanismo de círculo rodante, una vez sintetizada, la cadena (+) original es desplazada, cortada y recircularizada, posteriormente es convertida a doble cadena RF. Este proceso continua hasta que el ADN forma un complejo con la proteína P5, el cual alcanza una concentración crítica que evita la producción de más RF. Las proteínas de cubierta P3, P8 son sintetizadas con un péptido señal, el cual dirige su inserción espontánea en la membrana citoplásmica, donde ocurre el ensamblado del fago, también son insertadas las proteínas P6, P7, P9, pero no se conoce el mecanismo exacto por el cual ocurre su inserción. El ensamblado del fago se inicia por la interacción de las proteínas P7, P9 y P8 que se encuentran insertadas en la membrana de la célula con el ADN de cadena sencilla del fago, el cual es expulsado a través de la membrana bacteriana por un complejo formado por las proteínas P1, P4, P11 del fago, éste se elonga a través de la incorporación de miles de proteínas

P8 hasta que finalmente se incorporan las proteínas P3 y P6. Finalmente el fago completamente ensamblado es liberado al medio extracelular (**Fig. 2.7**) (Barbas *et al.*, 2001).



**Fig. 2.7.** Ciclo de vida del fago filamentos M13. (Tomado de Kehoe, 2005)

El fago M13 no lisa a su hospedero durante el proceso de infección productiva, ya que los fagos son continuamente expulsados de células infectadas mientras que continúan creciendo y dividiéndose. Se producen aproximadamente 1000 fagos en la primera generación después de la infección y posteriormente de 100 a 200 fagos por generación, este proceso continúa por

muchas generaciones, produciendo títulos de  $10^{11}$  a  $10^{13}$  fagos por ml de medio de cultivo (Barbas *et al.*, 2001).

Las principales proteínas de superficie utilizadas en el despliegue en fago son las proteínas P8 y P3, aunque también se han empleado P4, P7 y P9. Generalmente la expresión de péptidos o proteínas se lleva a cabo como fusiones al extremo N de las proteínas de superficie del fago (Malik *et al.*, 1998).

Los sistemas de expresión de despliegue en fago se pueden clasificar en seis tipos 3, 33 y 3+3 en el caso de fusiones en la proteína P3 y 8, 88 y 8+8 como fusiones en la proteína P8. En el sistema de tipo 8, péptidos fusionados a P8 se expresan en todas las copias de la proteína de superficie, pero sólo se pueden expresar eficientemente de 6 a 8 aminoácidos, ya que la expresión de mayor número afecta el ensamblado y la estabilidad del fago. La expresión de mayor número de aminoácidos o hasta proteínas se puede lograr en el sistema de tipo 8+8 que da lugar a fagos recombinantes, estos fagos expresan sobre su superficie proteínas silvestres y proteínas fusionadas. Los fagos recombinantes se pueden obtener de vectores fagémidos (Manoutcharian, 2001).

Un fagémido es un plásmido, el cual posee un origen de replicación del fago filamentoso (llamado también región intergénica, la cual no codifica para proteínas, pero contiene la secuencia indispensable para la iniciación y terminación de la síntesis del ADN viral y morfogénesis del fago), un origen de replicación de *E. coli*, un gen de resistencia a un antibiótico y una copia de un gen que codifica para una de las proteínas de superficie de fagos filamentosos (Barbas *et al.*, 2001).

El vector fagémido pG8SAET es un plásmido de 3325 pb, que posee una copia del gen VIII (codifica para P8) con sitios de restricción para la introducción de ADN y un gen de resistencia a ampicilina, pero carece de genes estructurales y no estructurales que son requeridos para la generación de un fago completo (ver Anexo 1). Es derivado del vector pG8SPA1, en el que el dominio de unión a albúmina fue cambiado por E-tag (Zhang *et al.*, 1999). El fagémido puede replicarse en *Escherichia coli* como un plásmido de doble cadena, pero la infección de la

bacteria con un fago auxiliar (*helper*) cambia el modo de replicación del fagémido en respuesta a los genes expresados por el ADN del fago auxiliar, resultando en la producción de fagémido de cadena sencilla, el cual es ensamblado dentro de la cápside (Barbas *et al.*, 2001).

El fago auxiliar proveerá todas las proteínas necesarias para la replicación y ensamblado del fago, así como copias silvestres de todas las proteínas de cubierta. El fago auxiliar más comúnmente usado es M13K07 el cual es derivado del bacteriófago M13, posee un origen plasmídico de replicación derivado de p15A, un gen de resistencia a ampicilina del transposón Tn903 y un gen II mutante derivado de M13 mp1 (ver Anexo 3) (Viera *et al.*, 1987).

Cuando M13K07 infecta células que llevan un fagémido como pG8SAET, el ADN del fago auxiliar es convertido a una doble cadena RF que entonces utiliza el origen p15A para replicarse; con el tiempo el genoma de M13K07 expresa todas las proteínas requeridas para generar ADN de cadena sencilla del fago auxiliar, sin embargo, la proteína P2 (producto del gen II mutado) interactúa menos eficientemente con el origen de replicación del fago auxiliar que con el origen de replicación que se encuentra en el vector fagémido; en el vector fagémido la proteína P2 inicia su replicación, generando copias de cadena sencilla del fagémido; éste proceso resulta en la producción de más cadenas (+) del fagémido que de fago auxiliar y asegura que predominantemente se obtengan fagos que contengan ADN de cadena sencilla derivado del fagémido (Sambrook *et al.*, 2001).

El fago recombinante producido contiene en la superficie proteínas silvestres del fago auxiliar y proteínas de fusión provenientes del fagémido. En un sistema recombinante la expresión de péptidos o proteínas fusionados a la proteína P3, comúnmente resulta en una copia de la proteína de fusión por partícula de fago; por el contrario la expresión de péptidos o proteínas fusionados a la proteína P8 resulta en un despliegue multivalente y el número de proteínas fusionadas varía y depende del tamaño, plegamiento y la composición de aminoácidos del inserto (Jacobsson *et al.*, 2003).

Los fagos filamentosos son excelentes vehículos para la expresión y presentación de péptidos o proteínas y son utilizados como una herramienta para el desarrollo de vacunas recombinantes

para enfermedades como el Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), Hepatitis B y la EA. En la tabla 1 se muestran ejemplos del uso de fagos filamentosos como una herramienta para el desarrollo de vacunas recombinantes (Wang *et al*; 2004).

**TABLA 1. INDUCCIÓN DE UNA RESPUESTA INMUNE DESPUÉS DE LA INMUNIZACIÓN CON FAGOS RECOMBINANTES.**

| <b>ANTÍGENOS</b>   | <b>PROTEÍNA UTILIZADA PARA EL DESPLIEGUE EN FAGO</b> | <b>RESULTADOS</b>  |
|--|--|--|
| Antígenos de <i>Plasmodium faciparum</i>   | P8   | La respuesta inmune fue específica contra el epítipo desplegado en fago filamentosos.  |
| Antígenos de superficie del virus de la Hepatitis B.                                     | P3 y P8  | La respuesta de anticuerpos fue semejante a la inducida por el antígeno original. Los mimotopos desplegados en fagos fueron mejores inmunógenos que mimotopos sintéticos.            |
| Mimotopos del virus de la Hepatitis B y C.   | P3 y P8  | La respuesta inmune inducida por la inmunización con mimotopos desplegados en fagos filamentosos, produjo una reacción cruzada con el antígeno original.                             |
| Epítipos de la proteína G del virus sincitial respiratorio.                              | P3   | La inmunización produjo una respuesta humoral, la cual indujo una protección contra la infección con el virus sincitial respiratorio.  |
| Antígenos del péptido $\beta$ A.   | P8   | La inmunización en ratones transgénicos produjo una respuesta de anticuerpos, la cual ocasionó una reducción en el número de placas amiloides en el cerebro de los ratones tratados. |
| Antígenos de la glicoproteína (gp 120) del virus de inmunodeficiencia humana - 1 (VIH-1) | P8   | La inmunización ocasionó títulos altos de anticuerpos, los cuales presentaron reacción cruzada con otras variantes de VIH, capaces de neutralizar a los virus.                       |

Los fagos son altamente inmunogénicos capaces de activar células T ayudadoras sin necesidad de adyuvantes, por lo que fagos desplegando péptidos en su superficie pueden ser utilizados como inmunógenos para la producción de anticuerpos específicos. La inmunización con fagos filamentosos ha inducido una fuerte respuesta inmune a las proteínas del fago en todos los animales probados sin la evidencia de efectos tóxicos (Manoutcharian, 2001, 2004). La inmunogenicidad del fago puede ser resultado del despliegue de péptidos ó proteínas en el contexto del arreglo altamente ordenado de elementos repetidos en la superficie del fago (Manoutcharian, 2004).

Los fagos filamentosos son una fuente de antígeno fácilmente renovable ya que pueden ser obtenidos fácilmente por crecimiento de cultivos bacterianos, por lo que permiten la obtención de grandes cantidades de éstos en pocas semanas y a costos bajos. El uso de fagos filamentosos para la obtención de antígenos peptídicos tiene ventajas sobre la síntesis química ya que muchas veces los niveles de pureza obtenidos son bajos (70-94 %) comparados a los producidos utilizando fagos filamentosos (Frenkel *et al.*, 2000, 2004).

Considerando las ventajas que ofrecen los fagos filamentosos, en este trabajo se expresaron fragmentos del  $\beta A_{1-42}$  en el dominio N-terminal de la proteína P8 del fago filamentosos M13. Estas construcciones tendrán aplicación directa como moléculas para ensayos inmunológicos para el estudio de la enfermedad de Alzheimer.



### 3. JUSTIFICACIÓN

Una alternativa para la producción de una vacuna recombinante contra la enfermedad de Alzheimer es la utilización del fago filamentoso M13, al fusionar fragmentos del  $\beta A_{1-42}$  en la proteína de alto número de copias P8 del fago M13, permitirá que este fago recombinante pueda ser usado como inmunógeno para la producción de anticuerpos específicos, contra las regiones amino terminal y media del péptido  $\beta A_{1-42}$ , los cuales podrían evitar la agregación del péptido y prevenir sus efectos tóxicos. Particularmente, la producción de anticuerpos hacia la región media del péptido ha sido poco estudiada, pero tiene gran importancia ya que es una región crítica para la agregación de péptido completo.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GENERAL:

Expresar fragmentos del extremo amino y de la región media del péptido beta amiloide ( $\beta A_{1-42}$ ) en la proteína de superficie P8 del fago filamentoso M13.

### 4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Expresar los aminoácidos 1-16 y 12-28 del péptido  $\beta A_{1-42}$  en el dominio N-terminal de la proteína de superficie P8 del fago filamentoso M13.
  
- Caracterizar las construcciones a través de técnicas de biología molecular.
  
- Verificar la expresión de las proteínas recombinantes a través de técnicas de inmunodetección de tipo Western y ELISA.

## 5. MATERIAL Y MÉTODOS

La preparación de las soluciones y los medios de cultivo mencionados en esta sección se describen en el Anexo 4.

### 5.1. OLIGONUCLEÓTIDOS

Se diseñaron oligonucleótidos que codifican para los fragmentos 1-16 y 12-28 del  $\beta A_{1-42}$ , para lo cual se determinó la secuencia de aminoácidos de estos fragmentos con base a una revisión bibliográfica (Annaert *et al.*, 2002); las secuencias de aminoácidos fueron las siguientes: **1-16 (D A E F R H D S G Y E V H H Q K)**, **12-28 (V H H Q K L V F F A E D V G S N K)**; estas secuencias se tradujeron a nucleótidos para formar la cadena codificante (+) correspondiente y su cadena complementaria (-); se agregaron a ambas cadenas nucleótidos para producir una fusión al Gen VIII en el vector fagémido pG8SAET sin modificar el marco de lectura y para tener los extremos cohesivos generados por las enzimas de restricción Xho I y Not I.

Sitio de restricción para **Xho I**:



```
5' C           T C G A G 3'
3' G A G C T           ↑ C 5'
```

Sitio de restricción para **Not I**:

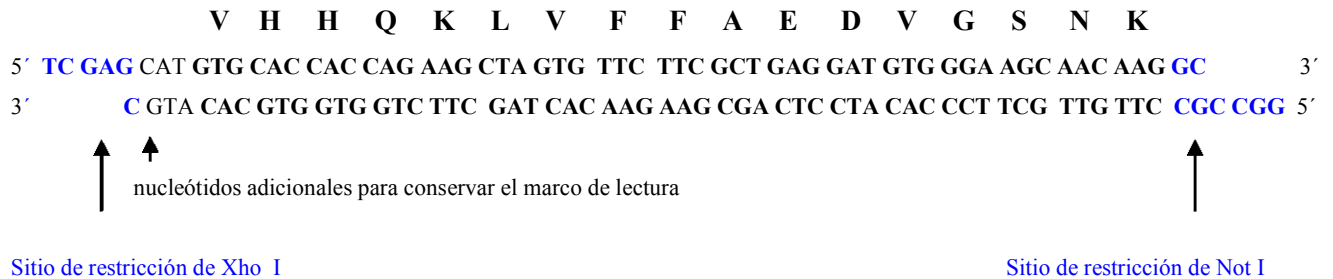


```
5' G C           G G C C G C 3'
3' C G C C G G           ↑ C G 5'
```

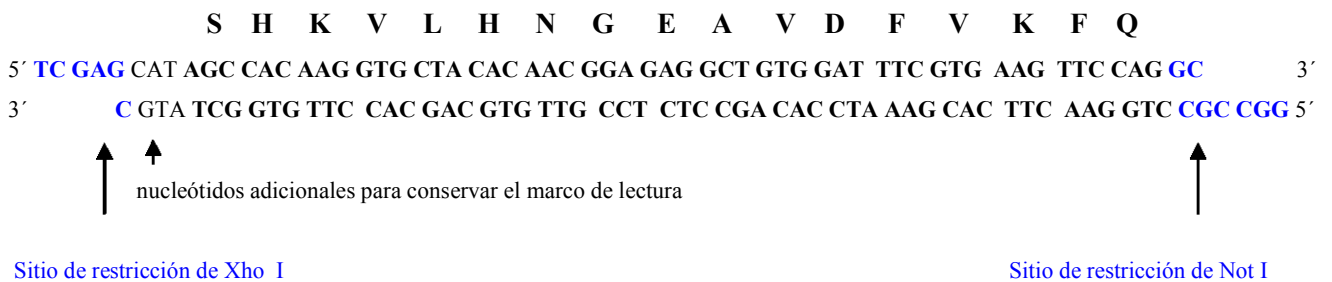
Se diseñaron también oligonucleótidos que codifican para los aminoácidos 1-16 y 12-28 del  $\beta A_{1-42}$ , pero en un orden aleatorio (considerando las características mencionadas anteriormente), a éstos se les denominó SCR 1-16 y SCR 12-28 respectivamente; las secuencias de aminoácidos



- Oligonucleótidos complementarios que codifican para la secuencia de aminoácidos 12-28 del péptido  $\beta A_{1-42}$ , al cual se denominó **AA12-28**



- Oligonucleótidos complementarios que codifican para la secuencia de aminoácidos SCR12-28, al cual se denominó **AA12-28 SCR**.



La síntesis de la cadena codificante y complementaria de los oligonucleótidos se hizo por Invitrogen (USA).

## 5.2. HIBRIDACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS.

Los oligonucleótidos se hidrataron con agua destilada estéril para tener una concentración final de 1  $\mu\text{g} / \mu\text{l}$ , 2  $\mu\text{g}$  de cada oligonucleótido, se analizaron en un gel de agarosa al 2 % para confirmar la presencia de oligonucleótidos y determinar la cantidad de los mismos para hibridar. El corrimiento electroforético en el gel de agarosa, se realizó en una cámara de electroforesis (Biorad), en amortiguador TBE 1X y se aplicó un voltaje de 100 V, posteriormente se tiñó con bromuro de etidio y se fotografió bajo luz UV.

Los oligonucleótidos fueron hibridados a razones masa 1:1 para lo cual, se mezclaron oligonucleótidos complementarios y se agregó agua desionizada para tener un volumen final de reacción de 10 µl, la reacción se llevó a cabo en un baño de agua a una temperatura de incubación inicial de 78.4 °C y lentamente se fue reduciendo la temperatura hasta alcanzar 25 °C.

### **5.3. PREPARACIÓN DEL VECTOR FAGÉMIDO pG8SAET.**

El vector de clonación fagémido pG8SAET [6.5 µg] (donado por Lars Frykberg, Swedish University of Agricultural Science, Uppsala) (ver Anexo 1) fue digerido con la enzima de restricción Xho I (New England, NEB) una hora a 37 °C sin agitación, una alícuota de ADN (100 ng) se analizó en un gel de agarosa al 0.8 %, para comprobar la digestión completa del vector. El corrimiento electroforético en el gel de agarosa se realizó bajo las condiciones descritas en la sección 5.2; comprobada la digestión completa con Xho I, se realizó la digestión del vector con la enzima de restricción Not I (New England, NEB) por 1 hora a 37 °C sin agitación.

El vector pG8SAET cortado con Xho I y Not I se purificó mediante el uso de un estuche comercial (PCR – Up Kit, Invitrogen) según especificaciones del fabricante y se cuantificó en un gel de agarosa al 0.8 % utilizando como referencia un marcador de peso molecular (Invitrogen, USA).

### **5.4. LIGACIÓN.**

El vector fagémido pG8SAET cortado con las enzimas de restricción Xho I y Not I fue ligado con cada uno de los oligonucleótidos hibridados (sección 5.1), para lo cual se mezclaron vector y oligonucleótidos en una relación de masa 1:10 (30 ng vector por cada 300 ng de oligonucleótidos hibridados AA1-16 SCR y AA12-28 SCR) y a una relación de masas 1:5 (30 ng vector por cada 150 ng de oligonucleótidos hibridados AA1-16 y AA12-28), enzima T4 ADN ligasa, amortiguador de reacción que contenía ATP (Promega) y agua desionizada Milli-Q. La reacción se llevó a cabo a una temperatura de incubación de 16 °C durante 12 horas.

30 ng de vector se sometieron al proceso descrito anteriormente, pero no se ligó con ningún oligonucleótido hibridado, éste sirvió como control de la digestión completa del vector.

### **5.5. PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES CON RbCl POR EL MÉTODO DE HANAHAN (*Sambrook et al., 2001*).**

La cepa de *Escherichia coli* TG1 mantenida por resiembra en medio mínimo fue utilizada para la preparación de células competentes, para lo cual se tomó una muestra de esta cepa y se sembró por estría en medio mínimo para obtener colonias aisladas. La caja se incubó a 37 °C durante toda la noche.

Se tomó una colonia aislada y se incubó en medio líquido 2x YT a 37 °C, durante toda la noche con agitación a 250 rpm. El cultivo se diluyó 1:100 con medio líquido 2x YT y se incubó a 37 °C con agitación a 250 rpm, durante 2.5 a 3 horas, se monitoreó el crecimiento del cultivo bacteriano hasta obtener una lectura de absorbancia de 0.5 a una densidad óptica de 600 nm. El cultivo se transfirió a tubos de polipropileno y se incubó en hielo durante 10 min., se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. a 4 °C para separar las células del medio de cultivo. Las células se resuspendieron en 30 ml de solución TFB-I fría, se incubó en hielo por 30 min. y se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. a 4 °C. Las células se resuspendieron en 4 ml de solución TFB –II. Se realizaron alícuotas de 100 µl de las células competentes (aprox.  $1.2 \times 10^8$  células / 100 µl) y se guardaron a –70 °C.

### **5.6. TRANSFORMACIÓN POR METODO QUÍMICO.**

Se mezclaron 15 ng de cada reacción de ligación (vector – inserto) y 100 µl de células competentes por RbCl (aprox.  $1.2 \times 10^8$  células/100 µl) y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Las células fueron sometidas a un choque térmico a una temperatura de 42 °C por 90 seg. Inmediatamente se colocaron en hielo por 3 minutos. Se agregó 900 µl de medio SOC

para un volumen final de 1 ml y se incubó 40 min. a 37 °C sin agitación; transcurrido este tiempo la totalidad de las células transformadas se dispersaron en cajas petri con medio Luria Bertani (LB) con Carbenicilina [50 µg / ml] y se incubaron toda la noche a 37 °C.

Durante la transformación se establecieron controles positivos y negativos.

Control positivo. Para determinar la eficiencia de transformación de las células competentes, se transformaron 100 µl de células competentes (aprox.  $1.2 \times 10^8$  células / 100 µl) con 1 ng de ADN plasmídico PUC 19 (New England, NEB), según el método descrito anteriormente, después de la transformación se tomaron 50 µl y 100 µl de células transformadas que fueron resuspendidas en 1 ml de medio SOC y se dispersaron por separado en cajas petri con medio LB con Carbenicilina [50 µg / ml]; las cajas se incubaron toda la noche a 37 °C. Se contó el número de colonias obtenidas en 50 µl y 100 µl dispersados y se determinó la eficiencia de transformación como el número de colonias transformantes / µg de ADN plasmídico.

Control negativo. 100 µl de células competentes (aprox.  $1.2 \times 10^8$  células / 100 µl) fueron sometidas al procedimiento descrito inicialmente, pero no se utilizó ADN para su transformación; estas células fueron dispersadas en una caja petri con medio LB con Carbenicilina [50 µg / ml]; este control tuvo la finalidad de identificar una posible contaminación microbiana.

100 µl de células competentes (aprox.  $1.2 \times 10^8$  células / 100 µl) fueron sometidas al procedimiento descrito inicialmente, pero no se utilizó ADN para su transformación, la totalidad de las células se transfirieron a un tubo que contenía 5 ml de agar de superficie LB, previamente fundido y el contenido se vertió en una caja petri con medio Luria sin antibiótico; este control tuvo la finalidad de identificar una posible contaminación por fagos.

100 µl de células competentes (aprox.  $1.2 \times 10^8$  células / 100 µl) fueron transformadas con 15 ng del vector pG8SAET, el cual fue digerido con las enzimas Xho I y Not I y ligado sobre sí mismo; este control permitió determinar el número de colonias transformantes que se obtuvieron



debido al vector. Se dispersó la totalidad de las células transformadas en una caja petri con medio LB con Carbenicilina [50 µg / ml].

### **5.7. SELECCIÓN DE COLONIAS RECOMBINANTES.**

Se realizaron dos ensayos de transformación y se seleccionaron 3 colonias aisladas de cada ensayo. Se tomó una parte de cada colonia para realizar una reacción en cadena de la Polimerasa (PCR) y el resto se resembró en una caja petri con medio LB con Carbenicilina [50 µg / ml]. La caja se incubó toda la noche a 37 °C.

### **5.8. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).**

Se tomó una pequeña muestra de cada colonia aislada y se resuspendió en 20 µl de agua desionizada (Milli-Q), la muestra se incubó 5 minutos a 85 °C y se centrifugó 10 min. a 10,000 rpm. Se tomaron 5 µl del sobrenadante para realizar un PCR, para lo cual se utilizaron los oligonucleótidos 5YSAET [25 pmol / µl] 5' GGA AAA ACA TTT ATT CAA TTC GTA AAC TAG 3' (Invitrogen, USA) y F8OLI [25 pmol / µl] 3' ATA CGC ACC CGC TAC CAA CAA CAG TAA CAG 5' (Invitrogen, USA) (Anexo I), dNTP, Taq ADN polimerasa, MgCl<sub>2</sub> (New England, NEB) a un volumen final de 25 µl; las muestras se colocaron en un termociclador y se sometieron a 20 ciclos de 90-60-72 ° C. Como control se utilizó 1ng del vector pG8SAET, el cual se amplificó con los oligonucleótidos 5YSAET [25 pmol / µl] y F8OLI [25 pmol / µl]; 2µl de cada amplificación se analizaron en un gel de agarosa al 2 % y se utilizó como referencia un marcador de peso molecular de 100 pb (100 pb DNA ladder, Promega) para determinar el tamaño del vector-inserto con el que se transformó cada colonia seleccionada. El corrimiento electroforético en el gel de agarosa se realizó como se describió en la sección 5.2.

Las colonias cuyo ADN se amplificó por PCR, y que tenían el tamaño esperado para cada clonación con la secuencia vector-inserto, fueron seleccionadas.

### **5.9. RESCATE CON FAGO AUXILIAR M13K07.**

Una muestra de cada una de las colonias seleccionadas en la etapa anterior, se resuspendió en 2 ml de medio líquido 2x YT con Carbenicilina [50 µg / ml] y se incubó a 37 °C aprox. 3 horas con agitación a 250 rpm hasta obtener una OD<sub>600nm</sub> de 0.7-1 (aprox. 1 x 10<sup>8</sup> células / ml); como control se utilizó medio líquido 2x YT sin antibiótico, el cual se incubó bajo las mismas condiciones. Se tomaron 500 µl de cada cultivo y se adicionaron 5 µl de fago auxiliar M13K07 (New England, NEB) [1.0 x 10<sup>11</sup> UFP / ml] para infectar a una multiplicidad de infección (MOI) de 10; se incubó 30 minutos sin agitación a 37 °C y posteriormente 30 minutos a 37 °C con agitación a 250 rpm. Se adicionaron 5 ml de medio 2x YT, 5 µl de Carbenicilina [50 µg / ml] y 5 µl de Kanamicina [50 µg / ml]. Se incubó toda la noche a 30 °C con agitación a 250 rpm. Por otra parte se prepararon alícuotas de 1ml de cada cultivo con 30 % de glicerol estéril y se guardaron a -70 °C.

### **5.10. PURIFICACIÓN DE FAGOS.**

El cultivo se centrifugó a una velocidad de 6000 rpm, durante 20 min. a una temperatura de 4 °C (para bajar las células), se tomó el sobrenadante (en donde se encontraban los fagos) y se agregó 1/6 del volumen de PEG / NaCl (Polietilenglicol -8000, 20 %; NaCl, 2.5 M), se mezcló y se incubó en hielo por dos horas. Se centrifugó a una velocidad de 14,000 rpm a una temperatura de 4 °C durante 10 min., se desechó el sobrenadante y la pastilla (fagos) se resuspendió en solución TBS, se agregó 1/5 parte del volumen de PEG / NaCl y se incubó en hielo por una hora. Se centrifugó a una velocidad de 14,000 rpm a una temperatura de 4° C durante 10 min., para bajar los fagos; el sobrenadante se desechó.

### **5.11. EXTRACCIÓN DE ADN DE CADENA SENCILLA DE LOS FAGOS.**

Los fagos obtenidos en el procedimiento anterior se resuspendieron en 100 µl de NaI 4 M (para romper la cubierta proteica del fago y liberar el ADN de cadena sencilla), se agregaron 250 µl de etanol absoluto (para precipitar el ADN de cadena sencilla) y se dejó reposar a temperatura ambiente por 10 min., transcurrido este tiempo se centrifugó a 12,000 rpm a temperatura

ambiente por 10 min., se eliminó el sobrenadante y el ADN de cadena sencilla se lavó en 250 µl de etanol al 70 % frío. Se decantó el etanol y se dejó evaporar el resto a temperatura ambiente y el precipitado (ADN de cadena sencilla) se resuspendió en agua desionizada. Se tomaron 2 µl de la muestra anterior y se analizaron en un gel de agarosa al 0.8 % para verificar la presencia de ADN de cadena sencilla y determinar la cantidad necesaria para su secuenciación.

### **5.12. SECUENCIACIÓN DE ADN DE CADENA SENCILLA.**

La determinación de la secuencia del ADN de cadena sencilla de los fagos recombinantes se determinó, empleando el estuche *Sequenase Quick – Denature Plasmid Sequencing Kit* (Amersham, UK) según especificaciones del fabricante. Se utilizó ADN de cadena sencilla, el oligonucleótido F8OLI [4 pmol] **3' ATA CGC ACC CGC TAC CAA CAA CAG TAA CAG 5'**, el cual es complementario a 30 nucleótidos dentro de la secuencia de la proteína P8, Sequenasa versión 2.0 DNA polimerasa (Sequencing Kit, Amersham, UK) y <sup>35</sup>S d ATP (Invitrogen, USA).

Aquellos fagos en los cuales la secuencia nucleotídica de los insertos fusionados a la secuencia de la proteína P8 fue la esperada, fueron seleccionados para las siguientes etapas.

### **5.13. RESCATE CON FAGO M13K07 DE LAS COLONIAS SELECCIONADAS.**

Se tomó una alícuota de las colonias que se conservaron en glicerol correspondiente para cada fago cuya secuencia fue confirmada y se sembraron por estría en cajas petri con medio LB con Carbenicilina [50 µg / ml] para obtener colonias aisladas. Las cajas se incubaron toda la noche a 37 °C. Se tomó una colonia aislada de cada clona y se resuspendieron en medio líquido 2x YT con Carbenicilina [50 µg / ml], se incubaron a 37 °C con agitación a 250 rpm hasta obtener una OD<sub>600nm</sub>: 0.7-1.0 (aprox. 1 x 10<sup>8</sup> células / ml); como control se utilizó medio líquido 2x YT sin antibiótico el cual se incubó bajo las mismas condiciones. Se tomaron 2 ml de cada cultivo y se les adicionó 20 µl de fago auxiliar M13K07 (New England, NEB) [1.0 x 10<sup>11</sup> UFP / ml]. Se incubaron 30 minutos sin agitación a 37 °C y posteriormente 30 minutos con agitación a 37 °C a 250 rpm. Los cultivos se vertieron en matraces con 40 ml de medio 2x YT,

40 µl de Carbenicilina [50 µg / ml] y 40 µl de Kanamicina [50 µg / ml]. Se incubaron durante 18 horas a 30 °C con agitación a 250 rpm.

#### **5.14. PURIFICACIÓN DE FAGOS**

Los fagos fueron purificados por doble precipitación con PEG / NaCl (Polietilenglicol –8000, 20 %; NaCl, 2.5 M) como fue descrito en el apartado 5.10; después de la doble precipitación, los fagos híbridos fueron resuspendidos en un volumen final de 400 µl con TBS.

Para determinar el título de los fagos híbridos (dado en unidades formadoras de placas UFP /ml), 200 µl de células *E. coli* TG1 fueron infectadas con diluciones seriadas de los fagos hechas en medio LB; las células se dispersaron en cajas petri con medio LB con Carbenicilina [50 µg / ml] y se incubaron toda la noche a 37 °C; se utilizó como control 200 µl de células sin infectar con fagos, las cuales se dispersaron en cajas petri con medio LB con Carbenicilina [50 µg / ml] y 200 µl de células se transfirieron a un tubo que contenía 5 ml de agar de superficie, a 45 °C, el contenido se vertió en una caja petri con medio LB sin antibiótico.

#### **5.15 ENSAYOS INMUNOLÓGICOS**

##### **5.15.1. Confirmación de la expresión de los aminoácidos 1-16 del péptido βA<sub>1-42</sub> y del péptido SCR 1-16 fusionados a la proteína de superficie P8 del fago filamentoso M13.**

El ELISA se llevó a cabo en placas de poliestireno (Costar Corning Incorporated, USA), las cuales fueron cubiertas con un anticuerpo anti-IgG<sub>1</sub> de ratón (Zymed, CA, USA) a una concentración de [5 µg / ml] (100 µl / pozo) en solución amortiguadora de carbonatos pH = 9.6. Las placas se incubaron durante una hora a 37 °C y posteriormente se realizaron cuatro lavados con PBS-Tween 80 al 0.2 %. Las placas fueron bloqueadas con PBS-leche 2 % (200 µl / pozo) durante una hora a temperatura ambiente. Se realizaron cuatro lavados con PBS-Tween 80 al 0.2 %. Se utilizaron como anticuerpos de captura, anticuerpos específicos contra diferentes fragmentos del péptido βA (**Tabla 1**); se utilizó el anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo

IgG<sub>1</sub> (Zymed, CA, USA) (que fue el isotipo de los anticuerpos monoclonales) y suero de ratón antiadyuvante (**Tabla 1**), como controles negativos. Los anticuerpos se diluyeron en PBS 1X conteniendo leche al 2 % y Tritón al 0.2 % y se agregaron 100 µl / pozo de cada dilución. Los anticuerpos y los sueros se incubaron una hora a 37 °C y posteriormente se realizaron cuatro lavados con PBS-Tween 80 al 0.2 %.

**TABLA 2. Anticuerpos.**

| ANTICUERPO  | ESPECIFICIDAD                  | DILUCIÓN            |
|---|--------------------------------|---------------------|
| <b>6E10</b> , anticuerpo monoclonal de ratón, isotipo IgG <sub>1</sub> (Sigma-Aldrich, USA)       | Anti βA <sub>1-17</sub> humano | 1: 1000 (1 µg / ml) |
| <b>BAM 10</b> , anticuerpo monoclonal de ratón, isotipo IgG <sub>1</sub> (Sigma-Aldrich, USA)     | Anti βA <sub>1-12</sub>        | 1: 1000 (1 µg / ml) |
| <b>6F/3D</b> , anticuerpo monoclonal de ratón, isotipo IgG <sub>1</sub> (DakoCytomation, Denmark) | Anti βA <sub>8-17</sub> humano | 1: 400 (1 µg / ml)  |
| Suero de ratón BALB/c   | Anti βA <sub>1-42</sub>        | 1: 200 (1 µg / ml)  |
| Anticuerpo de ratón, isotipo IgG <sub>1</sub> (Zymed, CA, USA)                                    | Anti IgA humano                | 1: 50 (1 µg / ml)   |
| Suero de ratón antiadyuvante  |                                | 1:200 (1 µg / ml)   |

Se agregó una suspensión de fagos 10<sup>12</sup> PFU / ml en PBS 1X - Leche 2 % - Tritón 0.2 % (100 µl / pozo) y se incubaron durante toda la noche a 4 °C, los fagos fueron previamente incubados 30 minutos a temperatura ambiente antes de agregarlos a cada pozo; después del tiempo de incubación los fagos que no se unieron a los anticuerpos o a los sueros fueron eliminados a través de cuatro lavados con PBS - Tween 80 al 0.2 %; se utilizaron los fagos con los aminoácidos 1-16 del péptido βA<sub>1-42</sub> y el péptido SCR 1-16 ambas fusionadas a la proteína

de superficie P8, así como al fago filamentoso M13 silvestre, este último como control negativo de fago. Se utilizó un anticuerpo policlonal anti M13 obtenido en conejo a una dilución 1:2500 en PBS 1X - Leche 2 % - Tritón 0.2 % (para determinar los fagos que se unieron a los anticuerpos monoclonales y a los sueros), se agregaron 100 µl / pozo de la dilución y se incubó durante una hora a temperatura ambiente. El anticuerpo policlonal fue preparado previamente en el laboratorio inmunizando conejos con dosis mensuales de  $10^{11}$  PFU de fago M13 en TBS (Gevorkian, 2004); se realizaron cuatro lavados con PBS-Tween al 0.2 % y posteriormente se agregó un anticuerpo anti IgG de conejo conjugado a HRP (Peroxidasa de rábano) a una dilución 1: 2500 en PBS 1X - Leche 2 % -Tritón 0.2 % se agregó 100 µl / pozo, se incubó una hora a 37 °C y se realizaron cuatro lavados con PBS-Tween al 0.2 %. Se agregó 100 µl / pozo de solución de ABTS (2,2' -azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) (Zymed, San Francisco, CA, USA). Las placas fueron analizadas espectrofotométricamente a una OD<sub>405 nm</sub> usando un lector de microplacas para ELISA (DYNEX Technologies, Inc., Chantilly, VA, USA). Se realizaron tres repeticiones del ensayo por duplicado.

#### **5.15.2. Confirmación de la expresión de los aminoácidos 12-28 del péptido βA y del péptido SCR 12-28 fusionados a la proteína de superficie P8 del fago filamentoso M13.**

El ELISA se llevó a cabo como se describió en el apartado 5.15.1, pero en este caso se utilizó el anticuerpo monoclonal 9.0 para evaluar a los fagos híbridos con los aminoácidos 12-28 del βA<sub>1-42</sub> y al péptido SCR 12-28, ambos fusionados a la proteína de superficie P8, así como al fago filamentoso M13 silvestre como control negativo de fago. El anticuerpo monoclonal de ratón BAM 9.0, isotipo IgG<sub>1</sub> (Sigma – Aldrich, USA), se utilizó a una dilución 1:100 en PBS 1X - Leche 2 % - Tritón 0.2 % y se agregaron 100 µl / pozo de la dilución; como control de isotipo se utilizó el anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub> (Zymed, CA, USA) a una dilución 1:50 en PBS 1X - Leche 2 % - Tritón 0.2 %, se agregaron 100 µl / pozo de la dilución. Las siguientes etapas se realizaron como se describió en el apartado 5.15.1.

### **5.15.3 ENSAYO INMUNOENZIMATICO DE TIPO WESTERN.**

#### **5.15.3.1. PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y ELECTROFORESIS.**

$10^{11}$  UFP (aprox. 1  $\mu\text{g}$  de proteína) de los fagos con los fragmentos 1-16, 12-28 del  $\beta\text{A}$ , los péptidos SCR 1-16 y 12-28, así como el fago filamentoso M13 silvestre fueron mezclados con  $\beta$ -mercaptoetanol y  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada para un volumen final de 16  $\mu\text{l}$ ; las muestras hirvieron 3 min. en baño maría e inmediatamente se colocaron en hielo. Las proteínas de los fagos fueron separadas en un gel de gradiente NuPAGE Bis / tris 4-12 % (Invitrogen, CA, USA) por duplicado, se utilizó un marcador de peso molecular como referencia. El corrimiento electroforético del gel se realizó en un equipo para electroforesis X Cell sure look Mini cell. (Invitrogen, CA, USA) aplicando un voltaje de 200 V, aproximadamente 45 min.

#### **5.15.3.2 TRANSFERENCIA**

El gel se equilibró en amortiguador de transferencia durante 30 min. Las muestras separadas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa utilizando una cámara de transferencia semiseca (Biorad, USA) aplicando 5.5 A. por  $\text{cm}^2$  de membrana, durante 40 min.

#### **5.15.3.3 REACCIÓN INMUNOENZIMÁTICA (INMUNOBLOT)**

Se realizaron tres lavados a la membrana de nitrocelulosa, con PBS 1X durante 5 min. cada uno para eliminar el exceso de amortiguador de transferencia. La membrana se bloqueó con PBS - leche 2 % durante toda la noche a 4 °C con agitación continua. Se eliminó el exceso de solución de bloqueo por decantación y se realizaron 3 lavados con PBS - Tween 80 al 0.2 % de 5 min. cada uno con agitación continua. Se cortó un segmento de la membrana de nitrocelulosa correspondiente a la separación de las proteínas de los fagos que expresaron los aminoácidos 1-16 del  $\beta\text{A}_{1-42}$ , el péptido SCR 1-16 y del fago filamentoso M13 silvestre y se incubó durante

una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal 6F/3D isotipo IgG<sub>1</sub> (DakoCytomation, Denmark) a una dilución 1:500 (según recomendaciones del fabricante) en PBS 1X - Leche 2 % - Tritón 0.2 % ; por otra parte, otro segmento de membrana de nitrocelulosa con las mismas muestras descritas anteriormente se cortó y se incubó durante una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo de ratón anti IgA humano (Isotipo IgG<sub>1</sub>) (Zymed, CA, USA) a una dilución 1:500 (según recomendaciones del fabricante) en PBS 1X - Leche 2 % - Tritón 0.2 % como control de isotipo del anticuerpo 6F/3D, transcurrido el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados con PBS-Tween 80 al 0.2 %. La membrana de nitrocelulosa se incubó con anti IgG<sub>1</sub> de ratón conjugado a HRP (Zymed, CA, USA) a una dilución 1: 2500 en PBS 1X - Leche 2 % - Tritón 0.2 % durante una hora a temperatura ambiente; transcurrido el tiempo de incubación se realizaron tres lavados con PBS-Tween 80 al 0.2 %; se reveló con PBS / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.1 % y diaminobencidina, la reacción se detuvo con agua.

Se realizó el mismo procedimiento descrito anteriormente, para la membrana de nitrocelulosa correspondiente a la separación de las proteínas de los fagos híbridos que expresaron los aminoácidos 12-28 del  $\beta$ A<sub>1-42</sub>, el péptido SCR 12-28 y el fago filamentoso M13 silvestre, la membrana se incubó una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal BAM 9.0 isotipo IgG<sub>1</sub> (Sigma – Aldrich, USA) a una dilución 1:500 (según recomendaciones del fabricante) en PBS 1X - Leche 2 % - Tritón 0.2 %; se utilizó como anticuerpo secundario anti IgG<sub>1</sub> de ratón conjugado a HRP (Zymed, CA, USA) bajo las condiciones descritas anteriormente, de igual manera otro segmento de membrana de nitrocelulosa fue incubado una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo de ratón anti IgA humano (isotipo IgG<sub>1</sub>) (Zymed, CA, USA), el cual se utilizó como control de isotipo y como anticuerpo secundario anti IgG<sub>1</sub> de ratón conjugado a HRP (Zymed, CA, USA).

## **5.16. TINCIÓN CON PLATA**

10<sup>11</sup> UFP de los fagos híbridos con los aminoácidos 1-16, 12-28 del  $\beta$ A<sub>1-42</sub>, los péptidos SCR 1-16 y 12-28 y del fago filamentoso M13 fueron separados en un gel de gradiente como fue descrito en el apartado 4.15.3.1, posteriormente el gel se colocó en solución fijadora y se dejó



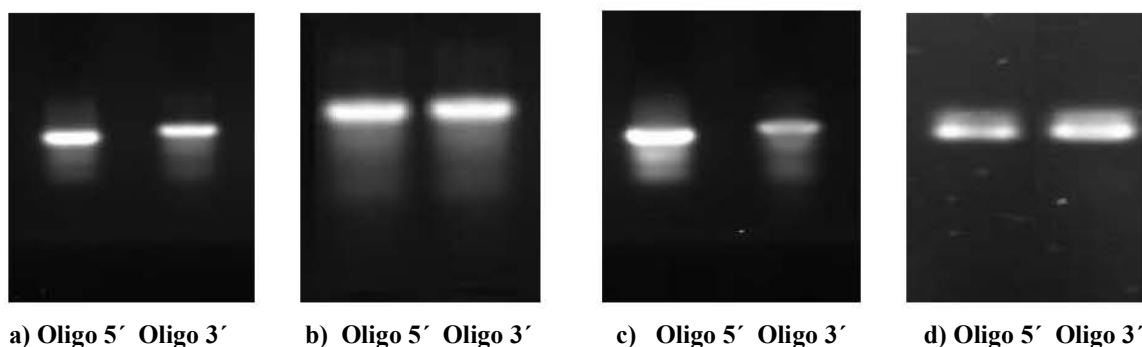
incubando en éste toda la noche a 4 °C con agitación continua; transcurrido el tiempo de incubación se eliminó el exceso de solución fijadora por decantación y se realizaron tres lavados con solución de lavado por 20 min. cada uno con agitación continua, se eliminó el exceso de solución de lavado por decantación y se incubó el gel 1 min. en solución de pretratamiento ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 0.02 %), se eliminó el exceso de solución por decantación y se realizaron tres lavados de 20 segundos cada uno con agua. El gel se incubó durante 40 min. con solución de  $\text{AgNO}_3$  al 1 % protegido de la luz y con agitación continua; se eliminó el exceso de solución por decantación y se realizaron tres lavados de 20 segundo cada uno con agua. Se agregó solución reveladora al gel y se mantuvo en éste hasta observar la aparición de bandas, posteriormente se eliminó el exceso de solución reveladora por decantación y se realizó un lavado con agua durante 1 min. El gel se colocó durante 10 min. en solución fijadora y se secó durante 30 min. con vacío.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 DISEÑO E HIBRIDACIÓN DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Se diseñaron oligonucleótidos complementarios que codificaran para los aminoácidos 1-16 y 12-28 del  $\beta A_{1-42}$  y para los péptidos SCR 1-16 y SCR 12-28 (sección 5.1) para ser fusionados y posteriormente clonados en el vector fagémido pG8SAET. Los péptidos SCR 1-16 y SCR 12-28 se diseñaron con los mismos aminoácidos de los fragmentos del  $\beta A_{1-42}$ , pero en un orden aleatorio y se utilizaron como controles negativos en los ensayos inmunológicos.

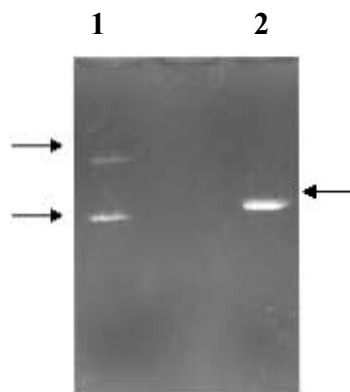
Los oligonucleótidos complementarios (5' y 3') fueron hibridados para tener ADN de doble cadena lo que permitió ligarlos al vector de expresión fagémido pG8SAET; antes de la hibridación cada oligonucleótido fue analizado en un gel de agarosa al 2 % para confirmar su presencia y determinar la cantidad de los mismos, para hibridarlos a una relación masa 1:1. (Fig. 6.1).



**Fig. 6.1 Resultados del corrimiento electroforético de los oligonucleótidos.** Se muestran los oligonucleótidos 5' y 3' que al ser hibridados codifican para fragmentos del péptido  $\beta A_{1-42}$  (a, b) y para los péptidos SCR 1-16 y SCR 12-28 respectivamente (c, d); a) Los oligonucleótidos 5' y 3' que codifican para los aminoácidos 1-16 del péptido  $\beta A_{1-42}$  presentaron una relación masa 2:1, por lo que para su hibridación se utilizó el doble de la cantidad del oligonucleótidos 3' que de 5' para tener una relación final de masa entre ellos 1:1. b) Los oligonucleótidos 5' y 3' que codifican para el péptido SCR 1-16 presentaron una relación 1:1 por lo que se utilizó la misma cantidad de cada oligonucleótido para hibridarlos. c) Los oligonucleótidos 5' y 3' que codifican para los aminoácidos 12-28 del péptido  $\beta A_{1-42}$ , presentaron una relación 3:1, por lo que se utilizó tres veces la cantidad del oligonucleótido 3' que de 5' para hibridarlos. d) Los oligonucleótidos 5' y 3' que codifican para el péptido SCR 12-28 presentaron una relación 1:2 por lo que se utilizó el doble de la cantidad del oligonucleótido 5' que de 3' para hibridarlos.

## 6.2 DIGESTIÓN DEL VECTOR FAGÉMIDO pG8SAET

El vector fagémido pG8SAET fue previamente modificado para generar los sitios de restricción de las enzimas Xho I y Not I. El vector fue digerido con la enzima de restricción Xho I (**Fig. 6.2**) y comprobada la digestión completa con esta enzima, se realizó la digestión con la enzima Not I; estos sitios de restricción permitieron unir los híbridos que codifican para los aminoácidos 1-16 y 12-28  $\beta A_{1-42}$  a una relación 1:5 vector - inserto y los híbridos que codifican para los péptidos SCR 1-16 y SCR 12-28 a una relación 1:10 vector - inserto.



**Fig. 6.2 Digestión del vector fagémido pG8SAET.** Se colocó en cada carril 100 ng de ADN y se analizó en un gel de agarosa al 0.8 % 1) Vector fagémido pG8SAET sin digerir 2) Vector fagémido pG8SAET digerido con la enzima de restricción Xho I, se observó una sola banda lo que nos indicó la digestión completa del vector.

## 6.3 TRANSFORMACIÓN BACTERIANA

Las mezclas de ligación generadas en la etapa anterior fueron utilizadas para transformar bacterias *Escherichia coli* TG1 por método químico, según el método descrito por Hanahan (Sambrook *et al.*, 2001).

Durante la transformación de *Escherichia coli* TG1, se estableció un control positivo para determinar la eficiencia de transformación; según el método de Hanahan se esperaba obtener  $5 \times 10^8$  colonias transformadas /  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico. La eficiencia de transformación obtenida fue de  $10^6$  colonias transformadas /  $\mu\text{g}$  de ADN plasmídico; se establecieron controles negativos lo que nos permitió asegurarnos que no existió una contaminación bacteriana o por fagos.

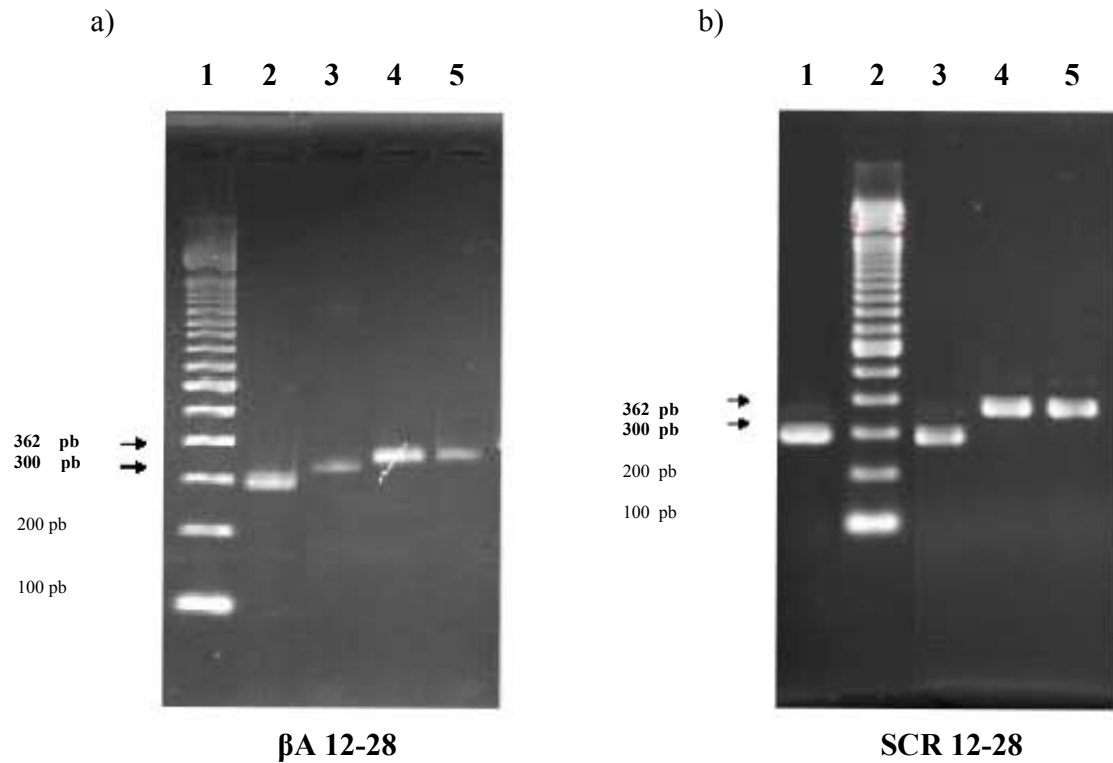
#### **6.4 COLONIAS RECOMBINANTES**

El vector pG8SAET contiene un gen de resistencia a ampicilina que permitió que aquellas bacterias que incorporaron el genoma del vector pG8SAET durante la transformación, se multiplicaran y dieran lugar a la formación de colonias en medio LB con Carbenicilina.

#### **6.5 CARACTERIZACIÓN DE COLONIAS.**

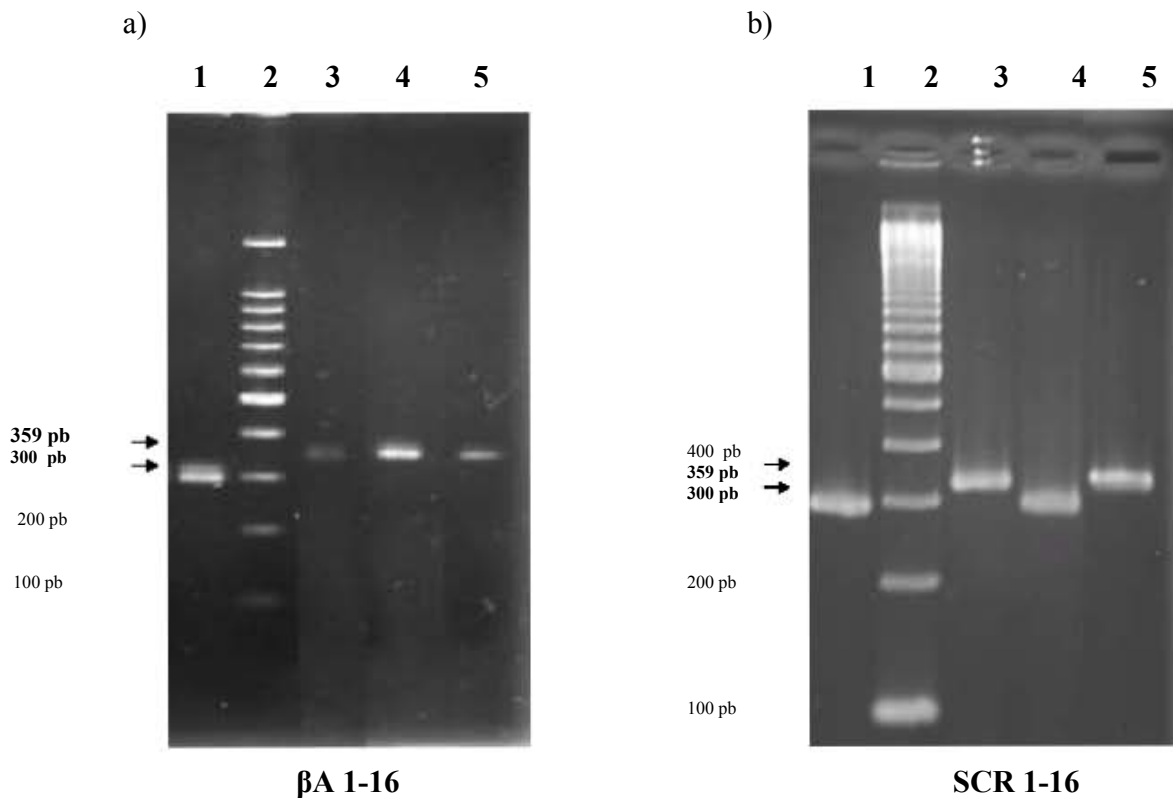
El ADN que transformó a las colonias seleccionadas fue amplificado por PCR, para lo cual se utilizaron los oligonucleótidos 5YSAET y F8OLI (Invitrogen, USA) los cuales son complementarios a secuencias del vector pG8SAET cercanos al sitio de unión de los insertos (descritos en 5.1); el ADN amplificado de cada colonia se analizó en un gel de agarosa al 2 %. El PCR se realizó para corroborar el tamaño del ADN con que fue transformada cada colonia seleccionada.

Los oligonucleótidos que codificaron para los aminoácidos 12-28 del  $\beta\text{A}_{1-42}$  y para el péptido SCR 12-28 tienen una longitud de 62 pb (apartado 5.1); el ADN de colonias transformadas sólo con el vector pG8SAET presentaron un tamaño característico de 300 pb, mientras que el ADN de colonias transformadas con el vector pG8SAET unidas con los insertos presentaron un tamaño de 362 pb (**Fig. 6. 3 a**).



**Fig. 6.3. El ADN de colonias recombinantes amplificadas por PCR.** El ADN se analizó en un gel de agarosa al 2 % **a)** PCR de colonias transformadas con el vector pG8SAET unido a los oligonucleótidos que codifican para los aminoácidos 12-28 del  $\beta A_{1-42}$ . Línea 1, marcador de ADN de 100 pb. Línea 2, el vector fagémido pG8SAET fue utilizado como referencia ya que presenta una banda característica de 300 pb. Línea 3 – 5 ADN de colonias; se observa que dos de tres colonias seleccionadas presentaron un tamaño de 362 pb (Carriles 4 y 5). **b)** PCR de colonias transformadas con el vector pG8SAET unido a los oligonucleótidos que codificaron para el péptido SCR 12-28. Línea 1, el vector fagémido pG8SAET. Línea 2 marcador de ADN de 100 pb. Carriles 3 a 5 ADN de colonias; se muestra que dos de tres colonias seleccionadas tuvieron un tamaño de 362 pb (Carriles 4 y 5). Las bandas fueron detectadas colocando el gel en bromuro de etidio y posteriormente se fotografió bajo luz UV.

Los oligonucleótidos que codifican para los aminoácidos 1-16 del  $\beta A_{1-42}$  y para el péptido SCR 1-16 tienen una longitud de 59 pb (apartado 5.1); el ADN de colonias transformadas sólo con el vector pG8SAET presentaron un tamaño característico de 300 pb, mientras que el ADN de colonias transformadas con el vector pG8SAET unido estos oligonucleótidos presentaron un tamaño de 359 pb (**Fig. 6.4 a, b**).



**Fig. 6.4 El ADN de colonias recombinante amplificadas por PCR.** El ADN se analizó en un gel de agarosa al 2 % **a)** PCR de colonias transformadas con el vector pG8SAET unido a los oligonucleótidos que codifican para los aminoácidos 1-16 del  $\beta A_{1-42}$ . Línea 1, el vector fagémido pG8SAET. Línea 2 marcador de ADN de 100 pb. Línea 3 – 5 ADN de colonias; se muestra que dos de tres colonias seleccionadas tuvieron un tamaño de 359 pb (Líneas 3 y 4). **b)** PCR de colonias transformadas con el vector pG8SAET unido a los oligonucleótidos que codifican para el péptido SCR 1-16. Línea 1, el vector fagémido pG8SAET. Línea 2 marcador de ADN de 100 pb. Línea 3 – 5 ADN de colonias; se muestra que dos de tres colonias seleccionadas tuvieron un tamaño de 359 pb. (Líneas 3 y 5). Las bandas fueron detectadas colocando el gel en bromuro de etidio y posteriormente se fotografió bajo luz UV.

Las colonias en las que las construcciones tenían un tamaño de 359 pb o 362 pb fueron seleccionados para producir fagos recombinantes.

## **6.6 PRODUCCIÓN DE FAGOS RECOMBINANTES Y SECUENCIACIÓN DE SU ADN**

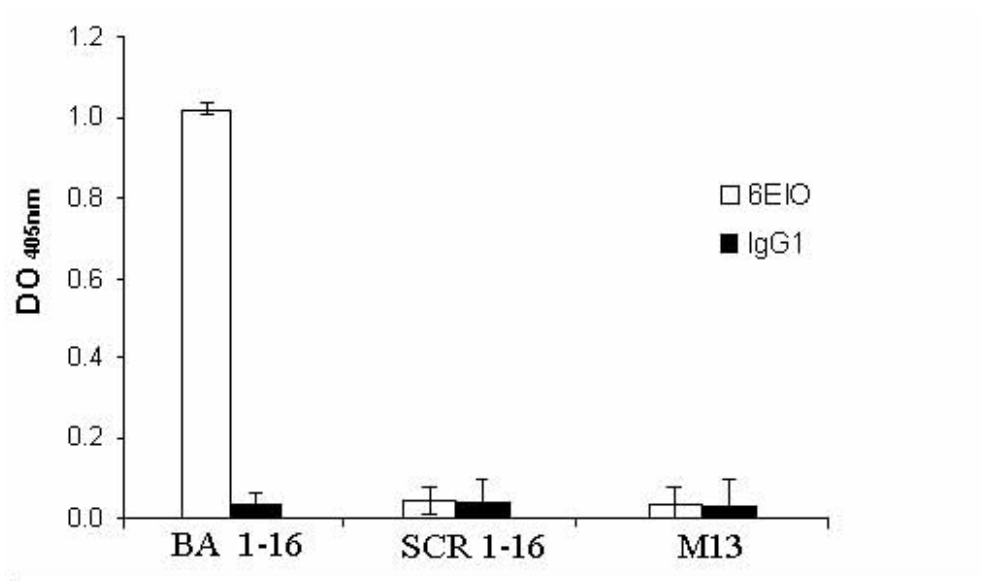
Se produjeron fagos recombinantes al infectar las colonias seleccionadas con el fago M13KO7. Se extrajo su ADN de cadena sencilla para corroborar su secuencia nucleotídica. Se seleccionaron los fagos recombinantes en los que se comprobó que el vector pG8SAET estaba unido a los híbridos que codificaron para los aminoácidos 1-16 y 12-28 del  $\beta A_{1-42}$  y para los péptidos SCR 1-16 y SCR 12-28 y que en las secuencias nucleotídicas de los insertos no existían mutaciones o deleciones, así como que se encontraran en el marco de lectura correcto con P8. Los fagos recombinantes seleccionados se multiplicaron; la producción obtenida fue de  $10^{12}$  -  $10^{13}$  UFP/ml de medio de cultivo.

## **6.7 ENSAYO DE INMUNOADSORCIÓN LIGADO A ENZIMA (ELISA)**

La expresión de los fragmentos del extremo amino y de la región media del  $\beta A_{1-42}$  en la proteína P8 del fago M13 fue confirmada a través de ELISA y por ensayos inmunoenzimáticos de tipo Western; en los ensayos se utilizaron anticuerpos monoclonales específicos para estos fragmentos.

La expresión de los aminoácidos 1-16 del péptido  $\beta A_{1-42}$  fue confirmada a través de la unión de este péptido fusionado al dominio N-terminal de la proteína P8 del fago M13 con el anticuerpo monoclonal 6E10 (Sigma-Aldrich, USA), el cual es un anticuerpo de ratón anti beta amiloide humano isotipo IgG<sub>1</sub> que se une específicamente a los aminoácidos 1-17 del péptido  $\beta A$ ; el anticuerpo es derivado de hibridomas producidos por la fusión de células de mieloma de ratón y esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con un péptido sintético correspondiente a los aminoácidos 1-17 del péptido  $\beta A$  conjugado a un acarreador KLH.

Se utilizó como control negativo al fago M13 silvestre, al fago recombinante en el que el péptido SCR 1-16 estaba fusionado a la proteína P8 y un anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub> (Zymed, CA, USA) que fue el isotipo del anticuerpo monoclonal 6E10.



**Fig. 6.5** Unión del anticuerpo monoclonal 6E10 y del anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub> con los aminoácidos 1-16 del péptido amiloide 1-42 ( $\beta$ A<sub>1-16</sub>) y SCR 1-16, ambos fusionados al dominio N-terminal de la proteína P8 del fago M13, así como al fago M13 silvestre.

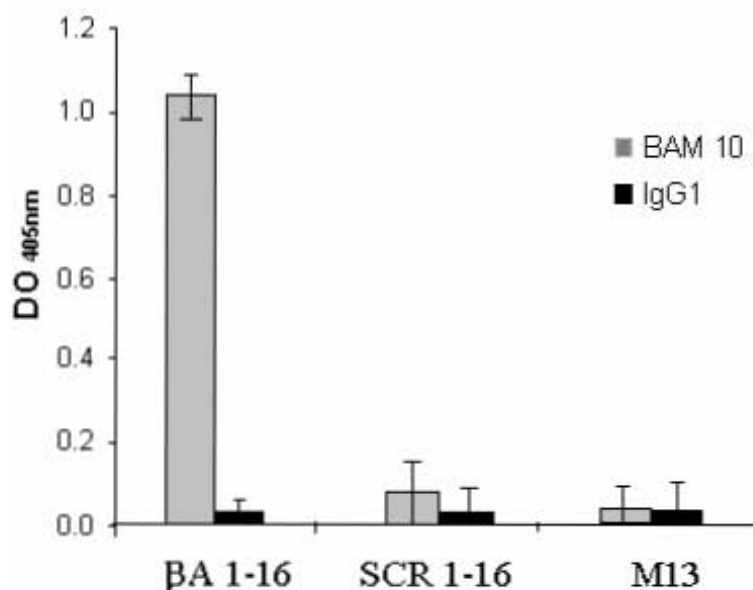
La Figura 6.5 nos muestra la interacción del anticuerpo monoclonal 6E10 (Sigma-Aldrich, USA) y del anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub> con los aminoácidos 1-16 del péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub> y al péptido SCR 1-16 ambos fusionados al dominio N-terminal de la proteína P8 del fago M13, así como al fago M13 silvestre. Los resultados se muestran como la media de las lecturas de absorbancia a 405 nm  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. Existió una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) entre la unión del anticuerpo 6E10 con el  $\beta$ A<sub>1-16</sub> fusionado al dominio N-terminal de la proteína P8 de M13 ( $1.090 \pm 0.009$ ) y la unión de este mismo anticuerpo con el péptido SCR 1-16 también fusionado a ésta misma región de la proteína P8 de M13 ( $0.062 \pm 0.010$ ), así como a las proteínas P8 silvestres ( $0.058 \pm 0.011$ ). Existió una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) entre la unión del anticuerpo 6E10 con el  $\beta$ A<sub>1-16</sub> fusionado al dominio N-terminal de la proteína P8 de M13 y la unión del anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub> con los mismos fagos, pero no existió una diferencia significativa entre la unión del anticuerpo 6E10 con el péptido SCR 1-16 fusionado al dominio N-terminal de la proteína P8 de M13 y la unión del anticuerpo de ratón



anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub> con los mismos fago, resultados semejantes fueron obtenidos con el fago M13 silvestre.

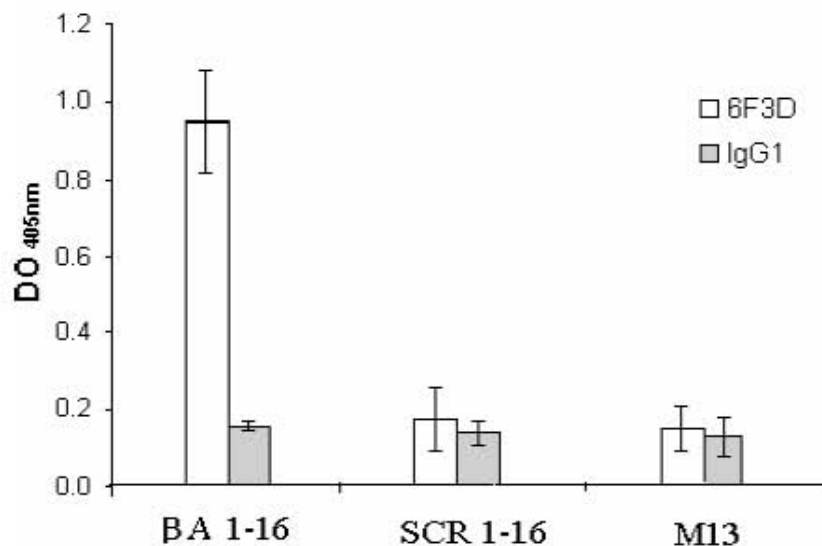
El anticuerpo BAM 10 (Sigma-Aldrich, USA) se une específicamente a los aminoácidos 1-12 de la proteína  $\beta A_{1-42}$ , es un anticuerpo de ratón isotipo IgG<sub>1</sub> derivado del Hibridoma BAM-10 producido por la fusión de células de mieloma de ratón y esplenocitos de un ratón inmunizado BALB/c con un péptido  $\beta A_{1-40}$  sintético conjugado a KLM, mientras que 6F/3D (DakoCytomation, Denmark) es un anticuerpo monoclonal de ratón isotipo IgG<sub>1</sub> anti beta amiloide 8-17 humano.

Se utilizó como control negativo al fago M13 silvestre, al fago recombinante en el que el péptido SCR 1-16 estaba fusionado a la proteína P8 y un anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub> (Zymed, CA, USA) que fue el isotipo de los anticuerpos monoclonales BAM 10 y 6F/3D.



**Fig. 6.6** Unión del anticuerpo monoclonal BAM 10 y del anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub> con los aminoácidos 1-16 del péptido beta amiloide 1-42 ( $\beta A_{1-16}$ ) y SCR 1-16, ambos fusionados al dominio N-terminal de la proteína P8 del fago M13, así como al fago filamentoso M13 silvestre.

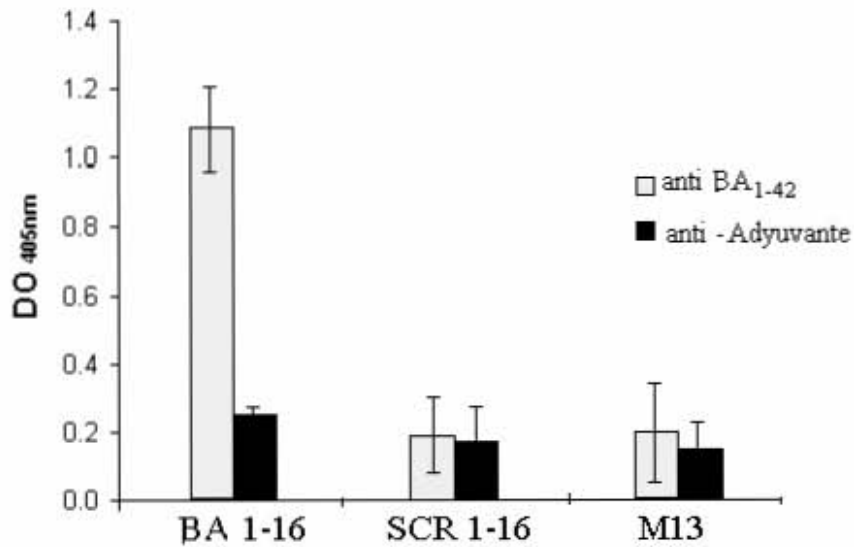
La figura 6.6 nos muestra la interacción del anticuerpo monoclonal BAM 10 (Sigma-Aldrich, USA) y del anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub>, con los aminoácidos 1-16 del péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub> y al péptido SCR 1-16 ambos fusionados al dominio N-terminal de la proteína P8 del fago M13, así como al fago M13 silvestre. Los datos se muestran como la media de las lecturas de absorbancia a 405 nm  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. Existió una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) entre la unión del anticuerpo BAM 10 con el  $\beta$ A<sub>1-16</sub> fusionado al dominio N-terminal de la proteína P8 de M13 ( $1.108 \pm 0.089$ ) y la unión de este mismo anticuerpo con el péptido SCR 1-16 fusionado a esta misma región de la proteína P8 de M13 ( $0.082 \pm 0.009$ ), así como a las proteínas P8 silvestres ( $0.048 \pm 0.011$ ). Existió una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) entre la unión del anticuerpo BAM 10 con el  $\beta$ A<sub>1-16</sub> fusionado al dominio N-terminal de la proteína P8 de M13 y la unión del anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub> con los mismos fagos, pero no existió una diferencia significativa entre la unión del anticuerpo BAM 10 con el péptido SCR 1-16 fusionado al dominio N-terminal de la proteína P8 de M13 y la unión del anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub> con los mismos fagos, resultados semejantes fueron obtenidos con el fago M13 silvestre.



**Fig. 6.7.** Unión del anticuerpo monoclonal 6F/3D y del anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub> con los aminoácidos 1-16 del péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub> ( $\beta$ A<sub>1-16</sub>) y SCR 1-16, ambos fusionados al dominio N-terminal de la proteína P8 del fago M13, así como al fago filamentoso M13 silvestre.

En la figura 6.7 se muestra la interacción del anticuerpo monoclonal 6F/3D (DakoCytomation, Denmark) y del anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub> con los aminoácidos 1-16 del péptido  $\beta A_{1-42}$  ( $\beta A_{1-16}$ ) y SCR 1-16, ambos fusionados al dominio N-terminal de la proteína P8 del fago M13, así como al fago filamentoso M13 silvestre. Los datos se muestran como la media de las lecturas de absorbancia a 405 nm + desviación estándar de tres experimentos independientes. Existió una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) entre la unión del anticuerpo 6F/3D con el  $\beta A_{1-16}$  fusionado al dominio N-terminal de la proteína P8 de M13 ( $0.967 \pm 0.154$ ) y la unión de este mismo anticuerpo con el péptido SCR 1-16 también fusionado al dominio N-terminal de la proteína P8 de M13 ( $0.207 \pm 0.097$ ), así como a las proteínas P8 silvestres ( $0.171 \pm 0.066$ ). Existió una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) entre la unión del anticuerpo 6F/3D con el  $\beta A_{1-16}$  fusionado al dominio N-terminal de la proteína P8 de M13 y la unión del anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub> con los mismos fagos, pero no existió una diferencia significativa entre la unión del anticuerpo 6F/3D con el péptido SCR 1-16 fusionado al dominio N-terminal de la proteína P8 de M13 y la unión del anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub> con los mismos fagos, resultados semejantes fueron obtenidos con el fago M13 silvestre.

Se utilizó el suero de ratón BALB / c anti  $\beta A_{1-42}$  fibrilar para evaluar la expresión de los aminoácidos 1-16 del péptido  $\beta A_{1-42}$  y del péptido SCR 1-16 ambos fusionados al dominio N-terminal de la proteína P8 del fago M13, así como la interacción del suero de ratón al fago M13 silvestre. Se utilizó como control negativo suero antiadyuvante, ya que éste se utilizó durante la inmunización de ratones con el  $\beta A_{1-42}$  fibrilar (**Fig. 6.8**).

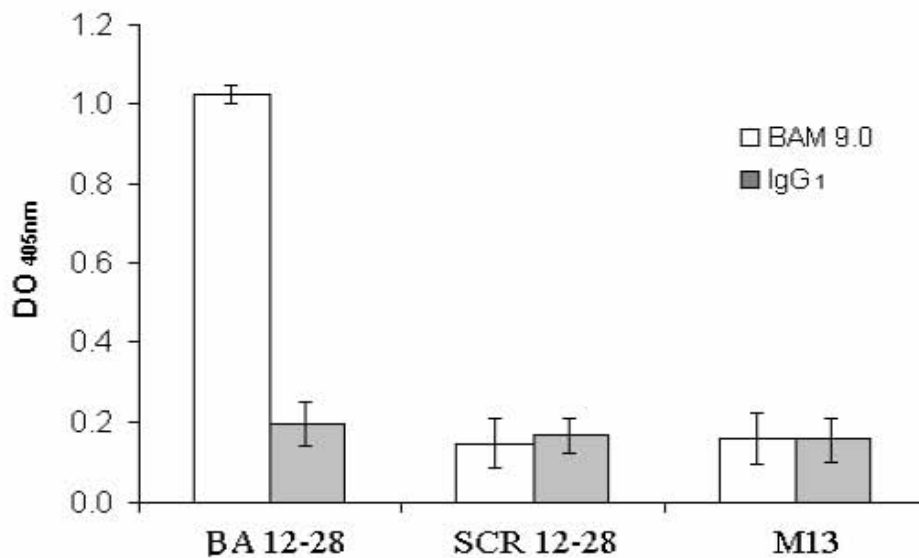


**Fig. 6.8** Interacción del suero de ratón BALB/ c anti  $\beta A_{1-42}$  fibrilar y del suero antiadyuvante con el fragmento amino terminal del péptido beta amiloide 1-42 ( $\beta A_{1-16}$ ) y SCR 1-16 ambos fusionados al dominio N-terminal de la proteína P8 del fago M13, así como al fago filamentoso M13 silvestre.

La figura 6.8 nos muestra la interacción del suero de ratón BALB/c anti  $\beta A_{1-42}$  fibrilar y del suero antiadyuvante con el fragmento amino terminal del péptido beta amiloide 1-42 ( $\beta A_{1-16}$ ) y SCR 1-16 ambos fusionados al dominio N-terminal de la proteína P8 del fago M13, así como al fago filamentoso M13 silvestre. Los datos se muestran como la media de las lecturas de absorbancia a 405 nm  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. Existió una diferencia estadísticamente significativas ( $p < 0.01$ ) entre la unión del suero anti  $\beta A_{1-42}$  fibrilar con la región amino terminal del péptido  $\beta A$  fusionado a la proteínas P8 de M13 ( $1.080 \pm 0.070$ ) y la unión de este suero al péptido SCR 1-16, también fusionado al dominio N-terminal de la proteína P8 de M13 ( $0.189 \pm 0.070$ ), así como al fago M13 silvestre ( $0.191 \pm 0.063$ ). Existió una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) entre la unión del suero de anti  $\beta A_{1-42}$  fibrilar con la región amino terminal del péptido  $\beta A$  fusionado a P8 del fago M13 y la unión del suero antiadyuvante con estos mismos fagos, pero no existió una diferencia significativa entre la unión del suero anti  $\beta A_{1-42}$  fibrilar con el péptido SCR 1-16 fusionado al dominio N-terminal de la proteína P8 del fago M13 y la unión del suero

antiadyuvante con los mismos fagos, resultados semejantes fueron obtenidos con el fago M13 silvestre.

La expresión de los aminoácidos 12-28 del péptido  $\beta A_{1-42}$  fue confirmada utilizando el anticuerpo monoclonal de ratón BAM 9.0 isotipo IgG<sub>1</sub> (Sigma – Aldrich, USA) el cual es un anticuerpo anti beta amiloide 13-28; como control negativo se utilizó al fago M13 silvestre, al fago recombinante en el que el péptido SCR 12-28 estaba fusionado a la proteína P8 y un anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub> (Zymed, CA, USA) que fue el isotipo del anticuerpo monoclonal BAM 9.0.



**Fig. 6.9.** Unión del anticuerpo monoclonal BAM 9.0 y del anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub> con los aminoácidos 12-28 del péptido beta amiloide 1-42 ( $\beta A_{12-28}$ ) y SCR 12-28, ambos fusionados al dominio N-terminal de la proteína P8 del fago M13, así como al fago filamentoso M13 silvestre.

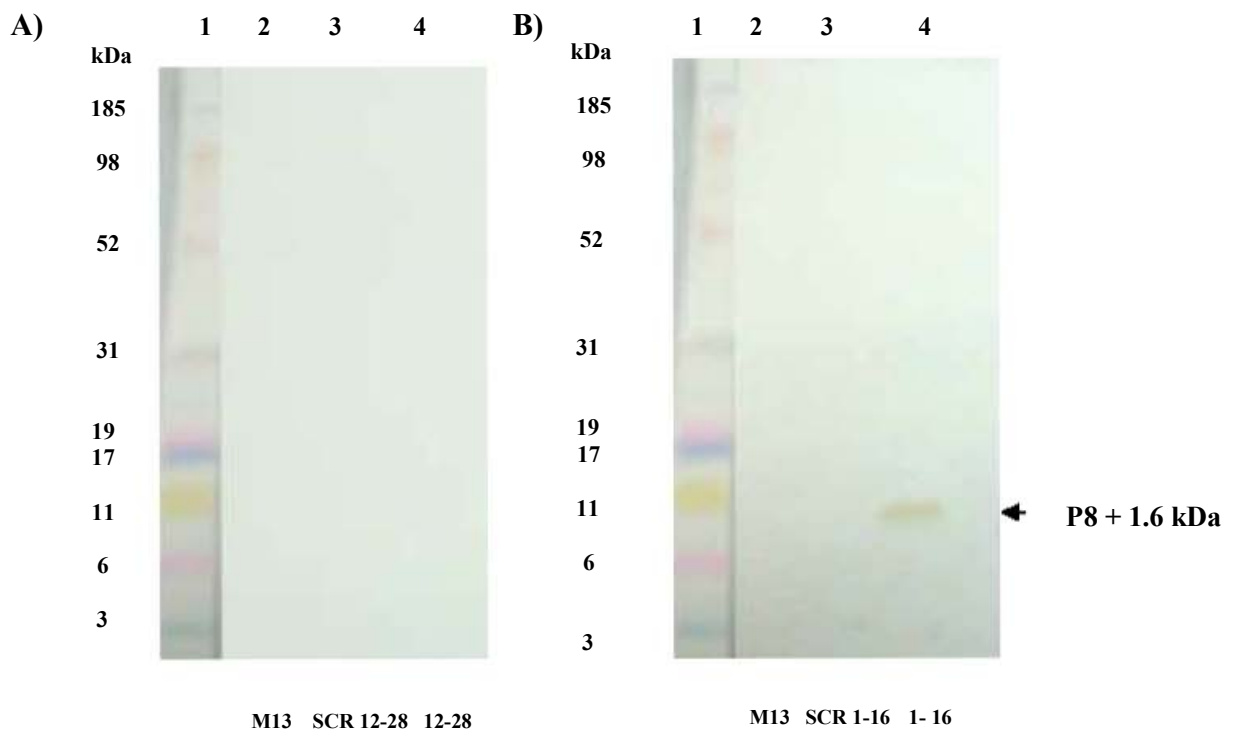
La figura 6.9 nos muestra la interacción del anticuerpo monoclonal BAM 9.0 y del anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub> con los aminoácidos 12-28 del péptido beta amiloide 1-42 ( $\beta A_{12-28}$ ) y SCR 12-28, ambos fusionados al dominio N-terminal de la proteína P8 del

fago M13, así como al fago filamentoso M13 silvestre. Los datos se muestran como la media de las lecturas de absorbancia a 405 nm  $\pm$  desviación estándar de tres experimentos independientes. Existió una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) entre la unión del anticuerpo monoclonal BAM 9.0 con el  $\beta A_{12-28}$  fusionado a la proteína P8 de M13 ( $1.025 \pm 0.014$ ) y la unión de este mismo anticuerpo monoclonal al péptido SCR 12-28 fusionado a la proteína P8 de M13 ( $0.148 \pm 0.034$ ), así como a las proteínas P8 silvestres ( $0.159 \pm 0.036$ ). Existió una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.01$ ) entre la unión del anticuerpo BAM 9.0 con el  $\beta A_{12-28}$  fusionado a la proteína P8 de M13 ( $1.025 \pm 0.014$ ) y la unión del anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub> con los mismos fagos ( $0.195 \pm 0.030$ ), pero no existió una diferencia significativa entre la unión del anticuerpo BAM 9.0 con el péptido SCR 12-28 fusionado a la proteína P8 de M13 y la unión del anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub> con los mismos fagos, resultados semejantes fueron obtenidos con el fago M13 silvestre.

## 6.8 ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO DE TIPO WESTERN.

Se detectó la proteína de fusión (P8 fusionada al fragmento 1-16 del  $\beta A_{1-42}$ ) utilizando el anticuerpo monoclonal 6F/3D (DakoCytomation, Denmark) anti  $\beta A_{8-17}$  humano; en la figura 6.10B se muestra la proteína de fusión con un peso molecular aproximado a 11 kDa.

Se utilizó el anticuerpo monoclonal BAM 9.0 anti  $\beta A_{13-28}$  (Sigma- Aldrich, USA) para detectar las proteínas de fusión (P8 fusionada al fragmento 12-28 del  $\beta A_{1-42}$ ) de fagos recombinantes. El anticuerpo BAM 9.0 no se unió a las proteínas del fago M13 silvestre, al péptido SCR 12-28 fusionado a P8, pero también este anticuerpo no se unió a los aminoácidos 12-28 del péptido  $\beta A$  fusionados a P8 (Fig.6.10 A); ya que no logró detectar a las proteínas de fusión de los fagos que expresaron los aminoácidos 12-28 del péptido  $\beta A$  en éste ensayo, se decidió realizar una tinción con plata de estos fagos.

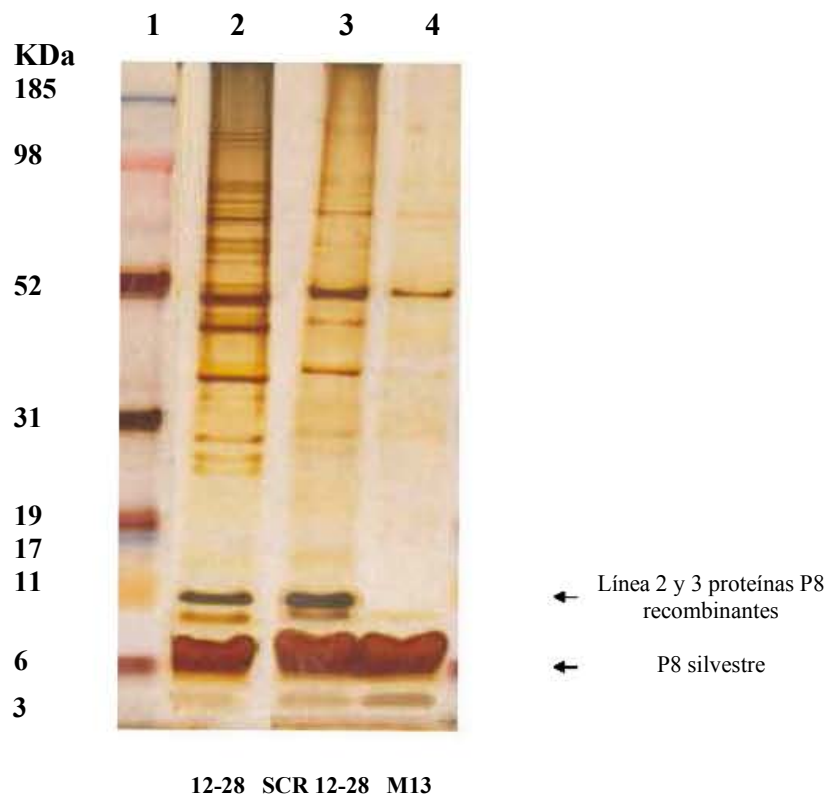


**6.10 Ensayo de inmunodetección de tipo Western.** A) La membrana fue incubada con el anticuerpo monoclonal BAM 9.0 anti  $\beta A_{13-28}$  (Sigma – Aldrich, USA), se utilizó como anticuerpo secundario anti IgG<sub>1</sub> de ratón conjugado a HRP. Línea 1 marcador de peso molecular. Línea 2 Fago M13 silvestre. Línea 3 fagos recombinantes los cuales expresaron el péptido SCR 12-28 fusionados a P8. Línea 4 fagos recombinantes los cuales expresaron los aminoácidos 12-28 del péptido  $\beta A$  fusionados a P8. B) La membrana de nitrocelulosa fue incubada con el anticuerpo 6F/3D isotipo IgG<sub>1</sub> (DakoCytomation, Denmark) anti  $\beta A_{8-17}$  humano, se utilizó como anticuerpo secundario anti IgG<sub>1</sub> de ratón conjugado a HRP. Existió un reconocimiento entre el anticuerpo 6F/3D y los aminoácidos 1-16 del péptido  $\beta A$  fusionados a P8 (Línea 4). El anticuerpo no reconoció al péptido SCR 1-16 fusionado a P8 (Línea 3), ni a las proteínas P8 del fago M13 silvestre (Línea 2).

## 6.9 TINCION CON PLATA

Las proteínas de los fagos recombinantes que expresaron los aminoácidos 12-28 del péptido  $\beta A_{1-42}$ , SCR 12-28 y el fago M13 silvestre fueron separadas en un gel NuPAGE Bis/tris 4-12 %

y posteriormente fueron sometidas a una tinción con  $\text{AgNO}_3$  al 1 %; la separación de las proteínas se realizó bajo condiciones reductoras para permitir que la migración de las proteínas dependiera del peso molecular y no de la configuración de las proteínas. La proteína P8 silvestre tiene un peso molecular de 5.2 KDa, esta proteína se observó en el gel con un peso molecular próximo a 6 KDa (**Fig. 6.11**); se determinó la presencia de las proteínas P8 del fago M13 fusionadas a los aminoácidos 12-28 y al péptido SCR 12-28 con un peso molecular próximo a 11 kDa (**Fig. 6.11**).



**Fig. 6.11 Tinción con plata.** Se muestra las proteínas de fagos recombinantes y de M13 silvestre que fueron separados en un gel NuPAGE Bis/tris 4-12 % en condiciones reductoras y que posteriormente fueron sometidas a una tinción con  $\text{AgNO}_3$  al 1 %. Línea 1. Marcador de peso molecular. Línea 2. Fagos recombinantes los cuales expresaron los aminoácidos 12-28 del péptido  $\beta A_{1-42}$  fusionados a P8. Línea 3 fagos recombinantes los cuales expresaron el péptido SCR 12-28 fusionados a P8. Línea 4 fago silvestre M13. Se utilizaron  $10^{11}$  fagos recombinantes en cada separación.



## 7. DISCUSIÓN

En este trabajo se expresaron fragmentos del péptido beta amiloide ( $\beta A_{1-42}$ ) en la proteína P8 del fago filamentoso M13, debido a que este péptido es fundamental para el inicio y la progresión de la enfermedad de Alzheimer (EA), lo cual se establece en la hipótesis amiloide. La hipótesis amiloide es uno de los principales argumentos para dar una explicación al desarrollo de la EA y se apoya en múltiples pruebas de origen genético, molecular, bioquímico, estudios neuropatológicos y evidencias clínicas (Haass *et al.*, 2002; Hardy *et al.*, 2007).

Actualmente no existe una cura para la EA, por lo que se están realizando estudios para desarrollar tratamientos que puedan modificar las características neuropatológicas de la enfermedad y para el desarrollo de una vacuna.

En la actualidad se utiliza la tecnología de despliegue en fago como una alternativa para la producción de vacunas recombinantes y existen en la literatura reportados muchos ejemplos del uso de fagos como vacunas, inmunógenos o agentes terapéuticos en modelos de animales y en medicina veterinaria. Recientemente se ha demostrado que la vacunación con fagos filamentosos en un pequeño grupo de pacientes con mieloma múltiple indujo efectos benéficos en estos (Wang *et al.*; 2004; Manoutcharian, 2005). Los fagos filamentosos son utilizados como acarreadores de péptidos sintéticos o recombinantes ya que son altamente inmunogénicos capaces de activar células T ayudadoras sin necesidad de adyuvantes (Houten *et al.*; 2006).

Péptidos inmunogénicos que son epítomos de células B, deben ser químicamente conjugados a péptidos o proteínas que estimulen a células T ayudadoras CD4 para la producción de anticuerpos y el desarrollo de una respuesta inmunológica de memoria, tales como la ovoalbúmina, toxina tetánica, albúmina sérica bovina (BSA), sin embargo, estos tipos de acarreadores producen una respuesta fuerte de anticuerpos contra el acarreador de manera que se puede abatir la respuesta de anticuerpos contra el péptido conjugado a éste, específicamente

si el péptido es menos inmunógeno que el acarreador. La vacunación con péptidos inmunogénicos desplegados en fago tiene ventaja sobre estos acarreadores, ya que a diferencia de éstos que contienen muchos epítomos de células B, la respuesta de anticuerpos contra el fago es restringida de 9 a 12 de los aminoácidos más externos del dominio N-terminal de la proteína de superficie P8 y los aminoácidos más externos de la proteína P3 (Hauten *et al*; 2006).

Los fagos filamentosos tienen otras ventajas sobre acarreadores inmunogénicos; por ejemplo pueden ser obtenidos en grandes cantidades por crecimiento de cultivos bacterianos en pocas semanas. Además se ha demostrado que la inmunización con fagos filamentosos induce una respuesta inmunológica fuerte a las proteínas del fago en todos los animales probados, sin evidencia de efectos tóxicos y títulos altos de anticuerpos específicos contra epítomos que son fusionados a las proteínas de superficie (Frenkel, 2004; Marzo *et al.*, 1994; Manoutcharian, 2001).

Con base en las ventajas que ofrecen los fagos filamentosos, discutidos anteriormente y la importancia que tiene el péptido  $\beta A_{1-42}$  en la EA, en este trabajo se utilizó la tecnología de despliegue en fago para expresar fragmentos del extremo amino (aminoácidos 1-16) y de la región media (aminoácidos 12- 28) del péptido  $\beta A_{1-42}$  en la región N-terminal de la proteína de superficie P8 del fago M13.

Específicamente se expresó el extremo amino terminal del péptido  $\beta A_{1-42}$  (aminoácidos 1-16) ya que la mayoría de los anticuerpos generados en ratones, monos y humanos después de la inmunización activa con el péptido  $\beta A_{1-42}$ , reconocen un epítomo localizado dentro de la región amino terminal de este péptido (aminoácidos 1-5, 1-7, 1-8, 1-11, 1-15, 1-16, 3-6, 4-10) por lo que se ha sugerido utilizar a los aminoácidos 1-16 del péptido  $\beta A_{1-42}$  como inmunógeno ya que se ha demostrado que éste es suficiente para la producción de títulos altos de anticuerpos anti  $\beta A$ , los cuales han permitido la reducción de placas amiloides cerebrales y déficit cognitivo en modelos animales de la EA en ausencia de una respuesta inmune celular contra el péptido completo; el epítomo reconocido por las células T, se localiza en la región media a C-terminal del péptido  $\beta A_{1-42}$  (aminoácidos 16-42) (Maier *et al*; 2006).

En la actualidad se ha propuesto que las vacunas contra la EA deben de generar una respuesta efectiva y específica mediada por anticuerpos anti- $\beta$ A y minimizar la respuesta celular T contra el  $\beta$ A<sub>1-42</sub> (Chackerian *et al.*, 2006; Maier *et al.*; 2006), por lo que nosotros proponemos utilizar el  $\beta$ A<sub>1-15</sub> conjugado al fago filamentoso M13 para el desarrollo de una vacuna recombinante contra la EA, ya que este inmunógeno abarca el epítipo reconocido por células B capaz de producir una respuesta inmune humoral y carece del epítipo de células T contra el  $\beta$ A<sub>1-42</sub>. Además existe evidencia de que fragmentos cortos del péptido beta amiloide ( $\beta$ A<sub>1-15</sub> y  $\beta$ A<sub>1-30</sub>) cuando fueron conjugados a un acarreador inmunogénico generaron títulos altos de anticuerpos anti- $\beta$ A, los cuales disminuyeron significativamente las placas amiloides y los niveles del  $\beta$ A cerebrales en modelos de ratones transgénicos de la EA (Agadjanyan *et al.*, 2005; Maier *et al.*, 2006; Frenkel, 2007).

Se eligió a la secuencia 12-28 del péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub> para ser expresada en el fago filamentoso M13, ya que este fragmento contiene los residuos considerados importantes para la transición a una estructura secundaria  $\beta$  - plegada del péptido, esencial para la agregación y para la formación fibrilar del péptido (Liu *et al.*, 2004).

El uso de fagos filamentosos para desplegar fragmentos del  $\beta$ A fue descrito por primera vez por Dan Frenkel y colaboradores en el año 2000, ellos utilizaron al fago filamentoso f88 para desplegar los aminoácidos EFRH localizados en las posiciones 3-6 de la región N-terminal del  $\beta$ A, el cual fue previamente identificado como el epítipo al que se unían anticuerpos monoclonales en el  $\beta$ A fibrilar, los cuales permitían su disgregación y la inhibición de sus efectos neurotóxicos (Frenkel *et al.*, 2000). La inmunización con estos fagos produjo títulos altos de anticuerpos IgG en un período corto de tiempo sin necesidad de adyuvantes; estos anticuerpos al unirse al  $\beta$ A afectaron la dinámica de toda la molécula, previniendo su autoagregación y permitiendo su disgregación. Recientemente en modelos de ratones transgénicos se ha demostrado que la inmunización con estos fagos disminuyó considerablemente el  $\beta$ A cerebral y mejoró las funciones cognitivas en los ratones tratados (Frenkel, 2007). Con base en estos antecedentes proponemos que se pueden obtener resultados semejantes usando nuestras construcciones para la inmunización en modelos animales de la EA.

Para lograr la expresión de los aminoácidos 1-16 y 12-28 del péptido  $\beta A_{1-42}$  en la superficie del fago M13 se utilizó el vector de expresión fagémido pG8SAET (Anexo 1); el vector tiene una copia del gen VIII que codifica para la proteína P8 del fago M13 con sitios de restricción para las enzimas Xho I y Not I, entre la secuencia que codifica el péptido señal de P8 y la región codificante amino terminal de P8 (Anexo 1). Estos sitios de restricción permitieron ligar los oligonucleótidos que codifican para fragmentos del péptido  $\beta A_{1-42}$  y permitió que fueran clonados unidos al vector pG8SAET. El tamaño de los insertos clonados fue verificado a través de PCR, aquellas colonias que habían sido transformadas con un ADN que tenía un tamaño de 359 pb, que era el tamaño esperado para el vector- oligonucleótidos 1-16 y SCR 1-16 (**Fig.6.3**) o 362 pb para el vector- oligonucleótidos 12-28 y SCR 12-28 (**Fig. 6.4**) fueron seleccionadas para producir fagos recombinantes, para lo cual se utilizó al fago M13KO7.

Los fagos producidos fueron caracterizados verificando la secuencia nucleotídica de los insertos que fueron ligados a P8, los fagos en los que en estas secuencias no existían mutaciones o deleciones y que se encontraban en el marco de lectura correcto fueron seleccionados para confirmar la expresión del extremo amino y de la región media del péptido  $\beta A_{1-42}$ .

Con el fin de confirmar la expresión de los fragmentos del péptido  $\beta A_{1-42}$  en la región N-terminal de la proteína P8 del fago M13, se realizaron inmunoensayos enzimáticos ELISA de doble sándwich, utilizando los anticuerpos monoclonales 6F/3D (DakoCytomation, Denmark), 6E10 (Sigma –Aldrich, USA), BAM 10 (Sigma – Aldrich, USA), BAM 9.0 (Sigma –Aldrich, USA) que son específicos para estos fragmentos y el suero policlonal de ratón BALB/c anti  $\beta A_{1-42}$  fibrilar. En cada ensayo se utilizaron como controles negativos al fago M13 silvestre y a los fagos recombinantes en los que los péptidos SCR 1-16 o SCR 12-28 estaban fusionados a P8 silvestres, para medir interacciones no específicas entre las proteínas P8 de éstos fagos y los anticuerpos monoclonales mencionados anteriormente y al anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub> (Zymed, CA, USA) (que fue el isotipo de los anticuerpos monoclonales) para determinar interacciones no específicas entre los fagos y anticuerpos de isotipo IgG<sub>1</sub> que no sean específicos para los fragmentos 1-16 o 12-28 del péptido  $\beta A_{1-42}$ .

La figura 6.5 nos muestra que el anticuerpo monoclonal 6E10 (Sigma – Aldrich, USA) específico para los aminoácidos 1-17 del  $\beta A_{1-42}$  interactuó con el  $\beta A_{1-16}$  fusionado a la proteína P8 del fago M13, pero no reconoció a los aminoácidos SCR 1-16 (que tenían los mismos aminoácidos del  $\beta A_{1-16}$  pero en un orden aleatorio) fusionados a P8, ni a las proteínas P8 silvestres, estos resultados nos indicaron que el epítipo al que se unió el anticuerpo 6E10 (Sigma – Aldrich, USA) en la proteína P8 recombinante corresponde a la secuencia 1-16 del  $\beta A_{1-42}$  y que este reconocimiento fue específico. Interesantemente el anticuerpo monoclonal BAM 10 (Sigma – Aldrich, USA) que se une a los aminoácidos 1-12 del  $\beta A$  y que se utiliza para localizar placas amiloides dentro de la corteza cerebral y depósitos amiloides en vasos sanguíneos de secciones de cerebro con la EA, reconoció a su epítipo expresado en la proteína P8 del fago M13, éste reconocimiento fue específico ya que el anticuerpo no reconoció a los aminoácidos SCR 1-16 fusionados a P8, ni a las proteínas P8 silvestres (**Fig. 6.6**), de igual manera el anticuerpo monoclonal 6F/3D (DakoCytomation, Denmark) específico para los aminoácidos 8-17 del  $\beta A$  reconoció a su epítipo de manera específica cuando fue expresado en P8 del fago M13 (**Fig. 6.7**).

El suero policlonal anti  $\beta A_{1-42}$  fibrilar de ratón BALB/c reconoce un epítipo lineal correspondiente a la secuencia EFRH en las posiciones 3-6 dentro de la región amino terminal del  $\beta A_{1-42}$  (Gevorgian *et al.*, 2004). La **Fig. 6.8** nos muestra que el anticuerpo policlonal de ratón reconoció a su epítipo de manera específica cuando el extremo amino terminal del péptido  $\beta A_{1-42}$  fue expresado en la proteína P8 del fago M13, mientras que el suero antiadyuvante no reconoció a los aminoácidos 1-16 del péptido  $\beta A_{1-42}$ .

La **Figura 6.9** nos muestra que el anticuerpo monoclonal BAM 9.0 (Sigma – Aldrich, USA) específico para los aminoácidos 12-28 del  $\beta A_{1-42}$  interactuó con el fago recombinante en el que el fragmento de la región media del  $\beta A_{1-42}$  fue fusionado a P8, pero no con los fagos en los cuales el péptido SCR 12-28 estaba fusionado a P8, ni con las proteínas P8 silvestres y que el anticuerpo de ratón anti IgA humano isotipo IgG<sub>1</sub> (Zymed, CA, USA) no reconoció a los

aminoácidos 12-28 del péptido  $\beta$ A fusionados a P8 en el fago M13, estos resultados nos indicaron que el epítipo al que se unió el anticuerpo BAM 9.0 (Sigma – Aldrich, USA) corresponde a la secuencia 12-28 del péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub> y que esta unión fue específica.

Estos resultados nos confirmaron que se produjeron fagos recombinantes que expresaron 16 aminoácidos en el caso del fragmento  $\beta$ A<sub>1-16</sub> y 17 aminoácidos en el caso del fragmento  $\beta$ A<sub>12-28</sub> fusionados en la región N-terminal de P8 de M13 y nos indicaron que los fragmentos son antigénicos cuando son expresados en la proteína P8 del fago M13. Resultados semejantes se han obtenido en trabajos en los cuales, al expresar antígenos peptídicos fusionados a proteínas de fagos filamentosos conservaron sus características antigénicas (Marzo *et al.*, 1994; Deroo *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2004; Tan *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos por ELISA fueron apoyados por la identificación de las proteínas de fusión por ensayos inmunoenzimáticos de tipo Western y tinción con plata.

El anticuerpo 6F/3D (DakoCytomation, Denmark) anti  $\beta$ A<sub>8-17</sub> humano fue utilizado para detectar las proteínas de fusión del fago M13 (proteínas P8 fusionadas al fragmento 1-16 del  $\beta$ A) por ensayos inmunoenzimáticos de tipo Western, las proteínas del fago fueron separadas bajo condiciones reductoras para determinar la importancia de la conformación del fragmento expresado en el contexto del fago para la interacción con el anticuerpo monoclonal (Deroo *et al.*, 2001). Aunque las proteínas del fago fueron desnaturalizadas y perdieron su conformación, el anticuerpo siguió reconociendo a su epítipo fusionado a P8, por lo que consideramos que el anticuerpo reconoció un epítipo lineal. La unión del anticuerpo a su epítipo fue específica ya que se demostró que no existió un reconocimiento del anticuerpo hacia la proteína SCR 1-16 fusionada a P8, ni tampoco a la proteína P8 del fago M13. La proteína de fusión fue identificada con un peso molecular aproximado a 11 kDa (**Fig. 6.10B**).

En el ensayo inmunoenzimático (ELISA) el anticuerpo BAM 9.0 (Sigma – Aldrich, USA) que se une a los aminoácidos 13-28 del  $\beta$ A, reconoció a su epítipo de manera específica cuando fue fusionado a P8 del fago M13, pero no pudo reconocer a su epítipo en los ensayos inmunoenzimáticos de tipo Western, ya que se perdió la conformación de la proteína de fusión cuando éstas fueron separadas bajo condiciones reductoras, por lo que consideramos que el anticuerpo BAM 9.0 reconoce un epítipo conformacional de la secuencia 12-28 (**Fig. 6.10 A**). Estos resultados nos indicaron que probablemente los fragmentos expresados en la proteína P8 del fago M13 pueden adoptar una conformación que puede actuar como imitador estructural del epítipo natural. Estudios de difracción de rayos X sugieren que algunos péptidos pueden ser capaces de adoptar conformaciones plegadas en la superficie del fago, lo cual fue consistente con las propiedades antigénicas que presentaron estos péptidos cuando fueron desplegados en fagos filamentosos (Marzo *et al.*, 1994; Malik *et al.*, 1998; Deroo *et al.*, 2001).

No se logró detectar a las proteínas P8 fusionadas al fragmento 12-28 del  $\beta$ A<sub>1-42</sub> en los ensayos inmunoenzimáticos de tipo Western, sin embargo, la tinción con plata nos mostró la presencia de estas proteínas de fusión, las cuales se detectaron con un peso molecular próximo a 11 kDa (**Fig. 6.11**), aunque se esperaba que se detectaran con un peso molecular aproximado a 7 kDa, lo anterior se puede explicar por la composición de aminoácidos de la región media del  $\beta$ A<sub>1-42</sub> que al ser hidrófobos ocasionaron que migraran menos de lo esperado en el gel y que por lo tanto se observaran con un peso molecular aparentemente mayor.

La expresión de los fragmentos 1-16 y 12-28 del péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub> en la proteína P8 permite tenerlos en alto número de copias sobre la superficie del fago M13, lo que tiene ventajas sobre el despliegue monovalente de estos fragmentos en M13 ya que al ser comparada la inmunogenicidad de los dos sistemas de despliegue, se ha demostrado que el despliegue polivalente es más efectivo para producir una respuesta inmune más eficiente (Wang *et al.*, 2004; Frenkel, 2007).

Los fragmentos 1-16 y 12-28 del péptido  $\beta$ A<sub>1-42</sub> cuando son expresados en la proteína P8 del fago M13 pueden adoptar una conformación que puede actuar como imitador estructural del

epítipo natural, por lo que estas construcciones tienen ventajas sobre los péptidos sintéticos ya que éstos producen secuencias lineales; la secuencia así como la conformación del epítipo que se utilice para la inmunización es importante para la inducción de anticuerpos que puedan reconocer al antígeno natural (Deroo *et al.*, 2001).

Estas construcciones permitirán la producción de una posible vacuna recombinante contra la EA ya que el fago filamentoso M13 puede ser usado como acarreador inmunogénico para fragmentos del péptido  $\beta A_{1-42}$ . Estos fagos híbridos pueden ser utilizados como inmunógenos para la producción de anticuerpos específicos contra el péptido  $\beta A$  sin necesidad de adyuvantes. Utilizar fragmentos del extremo amino y de la región media del péptido  $\beta A_{1-42}$  fusionados a la proteína P8 del fago M13 como inmunógenos, permitirá la producción de anticuerpos que puedan evitar la agregación del péptido  $\beta A_{1-42}$ .



## 8. CONCLUSIONES

Se construyeron fagos recombinantes los cuales expresan en su superficie los fragmentos 1-16 o 12-28 del péptido  $\beta A_{1-42}$  fusionados al dominio N-terminal de la proteína P8 del fago filamentoso M13; la expresión se confirmó a través de ensayos inmunoenzimáticos (ELISA) y por la detección de las proteínas de fusión por ensayos inmunoenzimáticos de tipo Western y tinción con plata.

Los fagos recombinantes se caracterizaron verificando la secuencia nucleotídica de estas construcciones y se comprobó que no existen mutaciones puntuales o deleciones en los nucleótidos que codifican para los fragmentos del  $\beta A_{1-42}$ .

Los fragmentos 1-16 y 12-28 del péptido  $\beta A_{1-42}$  son antigénicos cuando son expresados en la proteína de superficie P8 del fago M13 y mantienen la estructura natural de estos fragmentos en el contexto del  $\beta A_{1-42}$ .

## 9. PERSPECTIVAS

Los fagos recombinantes que expresan los fragmentos 1-16 o 12-28 del péptido  $\beta A_{1-42}$  al ser obtenidos fácilmente por crecimiento de cultivos bacterianos, permitirá la obtención de grandes cantidades de estos fragmentos en pocas semanas y a bajo costo. Estas construcciones tendrán aplicación directa como moléculas para ensayos inmunológicos para el estudio de la enfermedad de Alzheimer, así como para el desarrollo de una vacuna recombinante efectiva y segura contra ésta enfermedad.

La inmunogenicidad de los fagos recombinantes se deberá de comprobar en modelos de ratones transgénicos de la EA, conejos y cobayos; la respuesta inmune celular y humoral así como la seguridad del uso de los fagos se deberá de estudiar, lo cual permitirá realizar estudios de inmunización activa en humanos sin necesidad de adyuvantes.

Aunque ya se han identificado epítopos en la región amino terminal del péptido  $\beta A_{1-42}$  al que se unen anticuerpos que previenen la agregación y la toxicidad del péptido, estas construcciones permitirán la identificación de otros epítopos que presenten estas mismas propiedades dentro de esta secuencia, así como en la región media del péptido  $\beta A_{1-42}$ .

## 10. BIBLIOGRAFÍA

1. Agadjanyan, M. G., Ghochikyan, A., Petrushina, I., Vasilevko, V., Movsesyan, N., Mkrtichyan, M., Saing, T., Cribbs, D. H. Prototype Alzheimer's disease vaccine using the immunodominant B cell epitope from  $\beta$ -amyloid and promiscuous T cell epitope pan HLA DR-binding peptide. *J Immunol.* 2005. 174, 1580-6.
2. Alberca, R., López, S. 2002. Enfermedad de Alzheimer y otras demencias. Ed. Médica panamericana. Madrid, España, pp. 147-148, 157-163, 179-197, 169-175.
3. Annaert, W., Strooper, B. A cell biological perspective on Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 2002. 18, 25-51.
4. Arango, J., Fernández, S., Ardilla, A. 2003. Las demencias. Aspectos clínicos neuropsicológicos y tratamiento. Ed. El manual moderno. México, pp. 45-55, 191- 202.
5. Barbas III, C. F., Burton, D. R., Scott, J. 2001. Phage display: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, pp 1.1-1.19, 2.7-2.8.
6. Bennet, J. C. 1997. Tratado de Medicina Interna Vol. II. Mc Graw – Hill Interamericana. México, pp. 2302.
7. Blennow, K., León, M., Zetterberg, H. Alzheimer's disease. *Lancet.* 2006. 368, 387-403.
8. Chackerian, B., Rangel, M., Hunter, Z., Paebody, D. S. Virus and virus-like particle – based immunogens for Alzheimer's disease induce antibody responses against amyloid –  $\beta$  without concomitant T cell responses. *Vaccine.* 2006. 24, 6321-31.

9. Citron, M. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci.* 2004. 5, 677-85.
10. Clark, J. R., March J. B. Bacterial viruses as human vaccines?. *Expert Rev. Vaccines.* 2004. 3(4), 463-476.
11. Deroo, S., Muller C. P. Antigenic and immunogenic phage display mimotopes as substitute antigens: Applications and limitations. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2001. 4, 75-110.
12. Festy, F., Lins, L., Péranzi, G., Octave, J. N., Brasseur, R., Thomas, A. Is aggregation of  $\beta$ -amyloid peptides a mis-functioning of a current interaction process?. *Biochim Biophys Acta.* 2001. 1546, 356-64.
13. Frenkel, D., Dori, M., Solomon, B. Generation of anti- $\beta$ -amyloid antibodies via phage display technology. *Vaccine.* 2004. 22, 2505-8.
14. Frenkel, D., Katz, O., Solomon, B. Immunization against Alzheimer's  $\beta$ -amyloid plaques via EFRH phage administration. *Proc Natl Acad Sci.* 2000. 97, 11455-9.
15. Gandy, S., Petanceska, S. Regulation of Alzheimer  $\beta$ -amyloid precursor trafficking and metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2000. 1502, 44-52.
16. Gelinas, D. S., DaSilva, K., Fenili, D., George, P. S., McLauren, J. Immunotherapy for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 2004. 101, suppl 2, 14657-14662.
17. Gevorkian, G., Petrushina, I., Manoutcharian, K., Ghochikyan, A., Acero, G., Vasilevko, V., Cribbs, D. H., Agadjanyan, M. G. Mimotopes of conformational epitopes in fibrillar  $\beta$ -amyloid. *J Neuroimmunol.* 2004. 156, 10-20.

18. Haass, C., Selkoe, D. J. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide. *Mol. Cell. Biol.* 2007. 8, 101-110.
19. Hardy, J., Selkoe, J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease progress and problems on the road to therapeutics. *Science.* 2002. 297, 353-365.
20. Hooper, N. M. 2000. Alzheimer's disease. Methods and protocols. Humana Press Inc, Totowa, NJ, USA. pp.1-15, 23- 35.
21. Houten, N. E., Zwick, M. B., Menendez, A., Scott, J. K. Filamentous phage as an immunogenic carrier to elicit focused antibody responses against a synthetic peptide. *Vaccine.* 2006. 24, 4188-4200.
22. Jacobsson, K., Rosander, A., Bjerketorp, J., Frykberg, L. Shotgun phage display – selection for bacterial receptors or other exported proteins. *Biol proced online.* 2003. 5, 123-135.
23. Kehoe, J. K., Kay, B. K. Filamentous phage display in the new millennium. *Chem. Rev.* 2005, 105, 4056 - 4072.
24. Lacor, P. N., Buriel, M. C., Furlow, P. W., Clemente, A. S., Velasco, P. T., Wood, M., Viola, K. L., Klein, W. L. A $\beta$  oligomer - induced aberrations in synapse composition shape, and density provide a molecular basis for loss of connectivity in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis.* 2007. 27, 796-807.
25. LaFerla, F. M., Oddo, S. Alzheimer's disease: Ab, tau and synaptic dysfunction. *Trend Mol Med.* 2005. 11, 171-176.
26. Lemere, C. A., Spooner, E. T., Leverone, J. F., Mori, C., Iglesias, M., Bloom, J. K., Seabrook, T. J. Amyloid – beta immunization in Alzheimer's disease transgenic mouse and wildtype mice. *Neurochem Res.* 2003. 28, 1017-27.

27. Leverone, J. F., Spooner, E. T., Lehmaan, H. K., Clements, J. D., Lemere, C. A. A $\beta$  1-15 is less immunogenic than A $\beta$  1-40/42 for intranasal immunization of wild – type mice but may be effective for “boosting”. *Vaccine*. 2003. 21, 2197-2206.
28. Le Vine H. The amyloid hypothesis and the clearance and degradation of Alzheimer’s  $\beta$ -peptide. *J Alzheimers Dis*. 2004. 6, 303-14.
29. Liu, R., McAllister, C., Lyubchencko, Y., Sierks, M. R. Residues 17-20 and 30-35 of beta – amyloid play critical roles in aggregation. *J Neurosci Res*. 2004. 75, 162-71.
30. Maier, M., Seabrook, T. J., Lazo, N. D., Das, P., Janus, C., Lemere, C. A. Short amyloid –  $\beta$  (A $\beta$ ) immunogens reduce cerebral A $\beta$  load and learning deficits in a Alzheimer’s disease mouse model in the absence of an A $\beta$ -specific cellular immune response. *Neurobiology of Disease*. 2006. 26 (18), 4717-4728.
31. Malik, P., Terry, T. D., Bellintani, F., Perham, R. N. Factors limiting display of foreign peptides on the major coat protein of filamentous bacteriophage capsids and a potential role for leader peptidase. *FEBS Lett*. 1998. 436, 263-6.
32. Manoutcharian, K., Gevorgian, G., Cano, A., Almagro, C. Phage display biomolecules as preventive and therapeutic agents. *Curr Pharm Biotechnol*. 2001. 2, 217-23.
33. Manoutcharian, K., Díaz, A., Gevorkian, G., Fragoso, G., Gonzalo, A, Gonzalez, E., Aluja, A., Villalobos, N., Gomez-Conde, E., Sciutto, E. Recombinant bacteriophage – based multiepitope vaccine against *Taenia solium* pig cisticercosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2004. 99, 11-24.
34. Manoutcharian, K. Bacteriophages as tools for vaccine and drug development. *Expert Rev Vaccines*. 2005. 4(1), 5-7.

35. Marzo, F. D., Willis, A. E., Boyer - Thompso, C., Apella, E., Perham, R. N. Structural mimicry and enhanced immunogenicity of peptide epitopes displayed on filamentous bacteriophage. The V3 loop of HIV-1 gp120. *J Mol Biol.* 1994. 243, 167-172.
36. Mattson, M. P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature.* 2004. 430, 631-9.
37. McLaurin, J., Cecal, R., Kierstend, M. E., Tian, X., Phinney, A. L., Manea, M., French, J. E., Lambermon, M. H. L., Darabie, A. A., Brown, M. E., Janus, C., Chishti, M. A., Horne, P., Westaway, D., Fraser, P. E., Mounti, H. T. J., Przybylski, M., Hyslop, G. Therapeutically effective antibodies against amyloid –  $\beta$  peptide target amyloid –  $\beta$  residues 4-10 and inhibit cytotoxicity and fibrillogenesis. *Nat Med.* 2002. 8, 1263-9.
38. McLaurin, J., Kierstead, M. E., Brown, M. E., Hawkes, C. A., Lambermon, M. H. L., Phinney, A. L. Cyclohexanehexol inhibitors of A $\beta$  aggregation prevent and reverse Alzheimer phenotype in a mouse model. *Nat Med.* 2006. 12, 801-8.
39. Morgan, C., Colombres, M., Núñez, M. T., Inestrosa. N. C. Structure and function of amyloid in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol.* 2004. 74, 323-49.
40. Paschke, M. A. Phage display systems and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2006. 70, 2–11.
41. Reinhard, C., Hébert, S. S., Strooper, B. The amyloid –  $\beta$  precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J.* 2005. 24, 3996 - 4006.
42. Ritcher, R. W., Zoeller, B. 2004. Alzheimer's disease a physician's guide to practical management. Humana press, New Jersey. USA. pp. 21-31, 65. 103-105.

43. Sambrook, J., Rusell, D. W. 2001. Molecular cloning. A laboratory manual. Vol. I. Cold spring Harbor Laboratory Press. N. Y. 1. 105- 1.111.
44. Schenk, D., Hagen, M., Seubert, P. Current progress in beta – amyloid immunotherapy. *Curr opin Immunol.* 2004. 16, 599- 606.
45. Solomon, B. Active immunization against Alzheimer's  $\beta$ -amyloid peptide using phage display technology. *Vaccine.* 2007. Jan 22.
46. Solomon, B. Generation of anti –  $\beta$  - amyloid antibodies via phage display technology towards Alzheimer's disease vaccination. *Vaccine.* 2005. 23, 2327-30.
47. Suh, Y. H., Checler, F. Amyloid precursor protein, presenilins and – Synuclein: molecular pathogenesis and pharmacological applications in Alzheimer's disease. *Pharmacol Rev.* 2002. 54, 469-525.
48. Tan, G. H., Yusoff, K., Seow, H. F., Tan, W. S. Antigenicity and immunogenicity of the immunodominant region of hepatitis B surface antigen displayed on bacteriophage T7. *J. Med. Virol.* 2005. 77, 475-80.
49. Terry, R. D., Katzman, R., Bick, K. L., Sisodia, S. S., 1999. Alzheimer's disease. Lippincott Williams Wilkins. USA. pp. 293-298.
50. Vardy, E. R. L., Catto, A. J., Hooper, N. M. Proteolytic mechanisms in amyloid- $\beta$  metabolism: therapeutic implications for Alzheimer's disease. *Trends Mol Med.* 2005. 11, 464-72.
51. Vardy, E. R. L., Hussain I., Hooper, N. M. Emerging therapeutics for Alzheimer's disease. *Expert Rev Neurother.* 2006. 6, 695-704.



52. Vasilevko, V., Cribbs, D. H. Novel approaches for immunotherapeutic intervention in Alzheimer's disease. *Neurochem Inter.* 2006. 49, 113-126.
53. Viera, J., Messing, J. Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods in Enzymology.* 1987. 153, 3-11.
54. Wang, L. F., Yu, M. Epitope identification and discovery using phage display libraries: Applications in vaccine development and diagnostics. *Curr Drug Target.* 2004. 5, 1-15.
55. Weiner, H. L., Frenkel, D. Immunology and immunotherapy of Alzheimer's disease. *Nat Rev Immunol.* 2006. 6, 404-416.
56. Wilquet, V., Strooper, B. Amyloid – beta precursor protein processing in neurodegeneration. *Curr Opin Neurobiol.* 2004. 14, 582-8.
57. Zameer, A., Schulz, P., Wang, S., Sierks, M. R. Single chain Fv antibodies against the 25-35 A $\beta$  fragment inhibit aggregation and toxicity of A $\beta$  42. *Biochemistry.* 2006. 45, 11532-9.
58. Zhang, L., Jacobsson, K., Strom, K., Lindberg, M., Frykberg, L. *Staphylococcus aureus* expresses a cell surface protein that binds both IgG and  $\beta_2$  –glycoprotein 1. *Microbiology.* 1999. 145, 177-183.

## ANEXOS

### 1. VECTOR pG8SAET

Secuencia señal

#### Secuencia del oligo 5YSAET

TTGAAAAGGAAAAACATTTATTCAATTCGTAAACTAGGTGTAGGTATTGCATCTGTAAC

TTAGGTACATTACTTATATCTGGTGGCGTAACACCTGCTGCAAATGCTGCGCAACACGATGAC

Nco I   **Xho I**   Hind III   **Not I**   E-tag

CATGGTCTCGAGAAGCTTGCGGCCGCTGGTGCCGCCGGTGCCGTATCCGGACCCACTGGAAACCG  
GTACCAGAGCTCTTCGAACGCCGGCG

Bam HI   **Gen VIII**

CGTG CCTAGGGATCCGAGGGTGACGATCCCGCAAAGCGGCCTTTGACTCCCTGCAAGCCTC

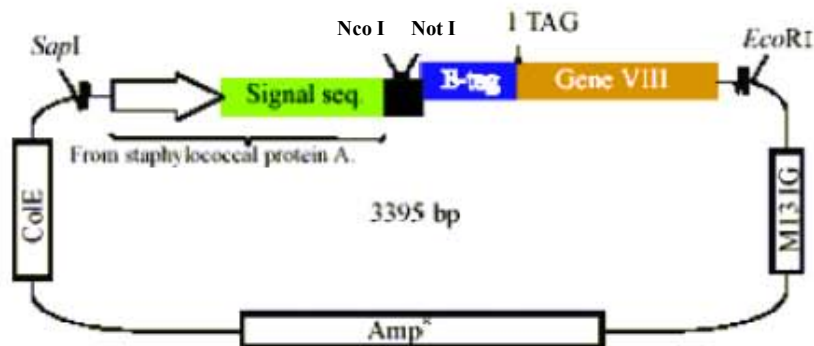
AGCGACCGAATATATCGGTTATGCGTGGGCGATGGTTGTTGTCATTGTCGGCGCAACTATCG

**ATACGCACCCGCT ACCAACAACAGTAACAG**

#### Secuencia del oligo F80LI

EcoRI

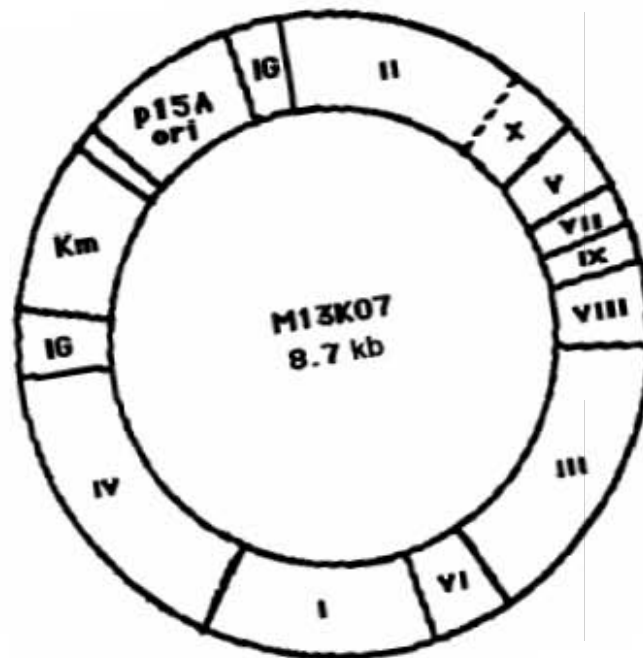
GTATCAAGCTGTTTAAGAAATTCACCTCGAAAGCAAGCTGATAAACCGATGAATTCA







### 3. ESTRUCTURA DEL FAGO AUXILIAR M13K07



El genoma del fago auxiliar consiste de ADN circular de 8.7 Kb, está formado por 10 genes, el gen II es derivado de M13mp1, posee un origen de replicación de p15A que le permite replicarse independientemente de la proteína P2 del fago y mantener niveles del genoma adecuados para la expresión de las proteínas necesarias para la producción de ADN de cadena sencilla cuando está en presencia de un fagémido. El origen de replicación de p15A y el gen de resistencia a Kanamicina se encuentran insertados entre el dominio A y B del origen de replicación del fago auxiliar, creando un origen que es menos eficiente para la función de la proteína P2 codificada por el gen de este vector que el origen del fago silvestre (Viera *et al.*, 1987).

#### 4. PREPARACIÓN DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO.

##### ➤ MEDIOS DE CULTIVO

###### MEDIO MÍNIMO

|                                  |       |
|----------------------------------|-------|
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 40 mM |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 20 mM |
| NaCl                             | 8 mM  |
| NH <sub>4</sub> Cl               | 19 mM |
| Bacto Agar                       | 2 %   |

Aforar a 100 ml con H<sub>2</sub>O desionizada.

Esterilizar en autoclave y posteriormente agregar glucosa al 20 %, vitamina B<sub>1</sub> al 1 % y MgCl<sub>2</sub> 1M.

###### 2x YT

|                      |       |
|----------------------|-------|
| Triptona             | 16 g  |
| Extracto de levadura | 10 g  |
| NaCl                 | 5 g   |
| KPO <sub>4</sub>     | 10 mM |

Aforar a 1L con H<sub>2</sub>O desionizada pH = 7.5

### **AGAR LURIA BERTANI (LB)**

|                      |      |
|----------------------|------|
| Triptona             | 10 g |
| Extracto de levadura | 5 g  |
| NaCl                 | 5 g  |
| Agar                 | 15 g |

Aforar a 1L con H<sub>2</sub>O desionizada pH =7.5

### **SOB**

|                      |        |
|----------------------|--------|
| Triptona             | 20g    |
| Extracto de levadura | 5g     |
| NaCl                 | 10 mM  |
| KCL                  | 2.5 Mm |

Aforar a 1L con H<sub>2</sub>O desionizada.

### **SOC**

|                  |       |
|------------------|-------|
| Medio SOB        | 98 ml |
| Mg <sup>2+</sup> | 2 mM  |
| Glucosa          | 2 mM  |

Aforar a 100 ml con H<sub>2</sub>O desionizada.

### **AGAR DE SUPERFICIE LURIA BERTANI (LB)**

|                      |      |
|----------------------|------|
| Triptona             | 10 g |
| Extracto de levadura | 5g   |
| NaCl                 | 5g   |
| MgCl <sub>2</sub>    | 1g   |
| Agarosa              | 7g   |

Aforar a 1L con H<sub>2</sub>O desionizada pH =7.5

➤ **AMORTIGUADORES**

**TFB-I**

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Acetato de calcio | 30 mM  |
| MnCl <sub>2</sub> | 50 mM  |
| RbCl              | 100 mM |
| CaCl <sub>2</sub> | 10 mM  |
| Glicerol          | 15 %   |

Aforar a 100 ml con H<sub>2</sub>O desionizada pH =5.8

**TFB-II**

|                   |       |
|-------------------|-------|
| MOPS              | 10 mM |
| CaCl <sub>2</sub> | 75 mM |
| RbCl              | 10 mM |
| Glicerol          | 15 %  |

Aforar a 100 ml con H<sub>2</sub>O desionizada pH =7.5

**TBE 10 X**

|            |        |
|------------|--------|
| Tris-Base  | 10.8 g |
| Ac. bórico | 5.5 g  |
| EDTA 0.5 M | 4 ml   |

Aforar a 1L con H<sub>2</sub>O desionizada.



## ➤ SOLUCIONES

### PEG /NaCl

|                       |            |
|-----------------------|------------|
| Polietilenglicol 8000 | 20 % (w/v) |
| NaCl                  | 2.5 M      |

### TBS

|           |        |
|-----------|--------|
| Tris -HCL | 50 mM  |
| NaCl      | 150 mM |
| pH =7.5   |        |

### NaI

|          |       |
|----------|-------|
| Tris-HCl | 10 Mm |
| EDTA     | 1 mm  |
| NaI      | 4 M   |

### PBS 10X

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 0.01 M  |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0.1 M   |
| NaCl                             | 1.37 M  |
| KCl <sub>2</sub>                 | 0.027 M |

pH = 7.4 PBS 1X

## TINCIÓN CON PLATA

### SOLUCIÓN FIJADORA

|                  |        |
|------------------|--------|
| MetOH            | 50 %   |
| AcOH             | 12 %   |
| H <sub>2</sub> O | 38 %   |
| Formaldehído     | 0.03 % |

### SOLUCIÓN DE LAVADO

|                  |     |
|------------------|-----|
| EtOH Absoluto    | 30% |
| H <sub>2</sub> O | 70% |

### SOLUCIÓN DE PRETRATAMIENTO

|  |        |
|--|--------|
| Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O | 0.02 % |
| H <sub>2</sub> O   | 50 ml  |

### SOLUCIÓN DE PARO

|                  |      |
|------------------|------|
| Metanol          | 50 % |
| Ácido acético    | 12 % |
| H <sub>2</sub> O | 38 % |

### **SOLUCIÓN DE PLATA**

|                   |        |
|-------------------|--------|
| AgNO <sub>3</sub> | 0.33 % |
| Formaldehído      | 0.02 % |
| H <sub>2</sub> O  | 30 ml  |

### **SOLUCIÓN REVELADORA**

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> | 3.6 g  |
| Formaldehído                    | 0.03 % |
| H <sub>2</sub> O                | 60 ml  |