



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Selección de Variantes Estables del VH del
Anticuerpo Murino 1F7 Mediante la
Transferencia de Energía por Resonancia de
Fluorescencias (FRET)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

Etienne Rajchenberg Ceceña



DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Joel Osuna Quintero
2009



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.

La presente Tesis se realizó en las instalaciones del Laboratorio del Dr. Xavier Soberón Mainero en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Agradecimientos:

- A los miembros del laboratorio del Dr. Xavier Soberón
- A los miembros del laboratorio del Dr. Enrique Morett
- A la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM
- A la Unidad de Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM

Índice

	Página
I .- Introducción	1
- Evolución Dirigida	2
• epPCR	4
• Métodos de Monitoreo y Selección	5
- FRET	6
• La familia de GFP	9
- Anticuerpos Catalíticos	12
- 1F7	16
- Corismato Mutasa	19
II .-Objetivos	23
- Objetivos Particulares	23
III .- Método	24
- Esquema Metodológico	27
IV .- Resultados	28
V .-Discusión	32
VI.- Apéndices	35
- Apéndice I .- Construcción de BFP con conector	35
- Apéndice I.- Construcción de BFP sin conector	35
- Apéndice I.- Clonación de las variantes de VH	35
- Apéndice II.- Western Blot	36
VII .- Referencias	39

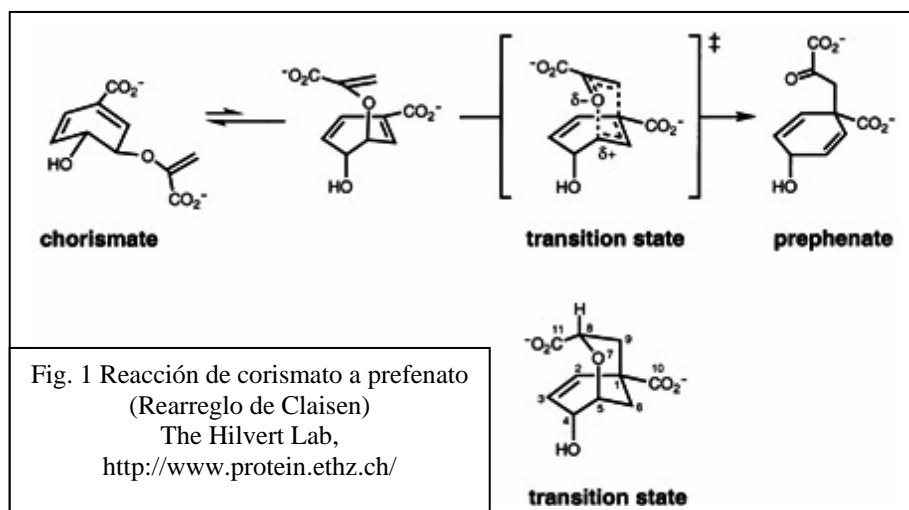
Selección de variantes estables del VH del anticuerpo murino 1F7 mediante transferencia de energía por resonancia de fluorescencias (FRET).

Introducción

En los últimos años, el interés en la aplicación de procesos metabólicos a la síntesis química ha crecido notablemente, al crecer también las herramientas tecnológicas para su manipulación. En este sentido, la catálisis bioquímica *ex vivo* resulta de importancia fundamental, por lo que se han redoblado esfuerzos en la obtención, el estudio y la manipulación de catalizadores biológicos, tanto a nivel protéico como a nivel genético.

Uno de estos enfoques consiste en la generación de anticuerpos catalíticos sobre estados transicionales de reacciones de interés, para la optimización de procesos que no se encuentren representados por la diversidad enzimática.

El anticuerpo murino 1F7 es un anticuerpo catalítico de este tipo, capaz de realizar la reacción de corismato a prephenato, en la vía de síntesis de fenilalanina.



Aunque la fracción activa de 1F7 ha sido efectivamente evolucionada con buenos resultados en modelos como la fusión con cloranfenicol acetil transferasa (CAT), o la fusión C terminal con proteína verde fluorescente (GFP) (Osuna, comunicación personal), ambos sistemas llegaron a un punto de saturación entre el tercer y cuarto ciclos de barajamiento de genes.

No obstante, sin importar el enorme potencial que los protocolos de evolución dirigida han demostrado en la última década, éstos están irremediamente ligados a métodos de selección o monitoreo.

Es en este contexto que resulta relevante la aplicación de métodos como la transferencia de energía por resonancia de fluorescencias (FRET) para determinar nuevas mejoras en la estabilidad de una proteína, que deja de ser responsiva al monitoreo con que se ha tratado hasta el momento.

La profundidad de un enfoque de este tipo radica en que el anticuerpo 1F7 (en particular la cadena pesada de la región variable) es un modelo extrapolable a una gran diversidad de inmunoglobulinas, y su efectivo mejoramiento catalítico representa un paradigma clave para la generación de nuevos catalizadores del mismo tipo.

Más particularmente, el uso de FRET en este asunto, resulta en una poderosa conjunción de metodologías, con una prometedora agudeza para el mejoramiento termodinámico de proteínas en general.

Evolución Dirigida

La evolución de proteínas es uno de los enfoques más importantes de la ciencia actual, que promete grandes avances, tanto en la ciencia básica y la tecnología, como en el desarrollo industrial de procesos de producción.

El interés creciente en aplicar enzimas a los procesos industriales ha apresurado la búsqueda de biocatalizadores con nuevas o mejores propiedades (Eijsink, 2005).

No obstante, la complejidad de las proteínas es tan grande que hasta la fecha resulta imposible realizar un acercamiento predictivo preciso (también llamado “racional”) para la modificación de sus estructuras espaciales o su función, sin un amplio conocimiento previo de los factores y mecanismos que intervienen en su conformación.

Cabe resaltar en este punto los trabajos realizados por el grupo de David Baker en la Universidad de Washington (Baker, 2008): en un primer acercamiento, este grupo ha logrado hacer un plegamiento *de novo* para una proteína llamada Top7, utilizando una simulación computacional con algoritmos de selección *Umbrella*.

A pesar de ser un plegamiento muy limitado a ciertas características durante la simulación, es una verdadera promesa en el entendimiento de las proteínas tan vasta, que no será discutida en este trabajo debido a que el tratamiento que merece nos desviaría del tema principal.

Por esta causa, se han buscado alternativas para el mejoramiento de proteínas que no requieran una investigación profunda de éstas, y es hasta la década de 1970 (Yuan 2005) que comienzan a surgir los brotes de lo que ahora se establece como “evolución dirigida”.

La evolución dirigida reproduce los fenómenos de aparición de variabilidad genética y de selección natural a una velocidad mucho mayor que la natural y permite que se ajusten los factores de selección a las necesidades de la investigación en curso, sin ser necesario siquiera estudiar la estructura de la proteína a la que se dirige.

Así, mediante la inducción de mutaciones en un gen determinado, se puede obtener una gama enorme de variantes con propiedades diferentes en un solo evento de clonación que resulta rápido y económicamente factible.

Utilizando un método de selección o monitoreo adecuado (que simula una presión ambiental selectiva), se puede discernir entre cuáles de dichas variantes tienen la función que se busca.

Más aún, por barajamiento de genes, el análogo natural a la recombinación genética (o la cruce de razas mejoradas de la agricultura), se puede mezclar aquellas mutaciones que hayan sido benéficas para la característica que se busca, obteniendo así una variante refinada de la combinación de las mejores, buscando que aquellas que confieren mejorías acumulativas pequeñas, produzcan un fenotipo combinado mucho más deseable.

Evidentemente, el potencial de la evolución dirigida es enorme y, aunque en principio las estrategias de evolución dirigida pueden ser utilizadas para optimizar cualquier propiedad enzimática que pueda ser monitoreada en una forma económicamente factible, aún si las bases de esa propiedad se desconocen (Eijsink 2005), existen todavía severas dificultades técnicas que tienen que ser salvadas para obtener un pleno rendimiento de estos procedimientos.

Dos de las mayores dificultades, que menciono a continuación por concernir al presente trabajo, son: (1) la generación de diversidad genética *in vitro*, y (2) los métodos de monitoreo y selección sensibles a dicha diversidad.

epPCR

Existen diversos métodos para la obtención de variabilidad sobre una secuencia determinada. Todos ellos deben cubrir la necesidad básica de la automatización, debido a la necesidad de generar enormes bancos que representen la totalidad (que es teórica) o una buena parte de las posibles transformaciones.

Para la generación de diversidad, la técnica más comúnmente utilizada es la PCR propensa a errores o epPCR.

La primera gran limitación de la epPCR es que no es capaz (o es, pero en probabilidades extremadamente bajas) de introducir más de una mutación en el mismo codón o incluso en codones adyacentes, y por ende, de generar el total de sustituciones de residuos en todas las posiciones existentes dentro del gen. La segunda corresponde a la aparición y acumulación de mutaciones que pueden ser neutras para la característica en cuestión, pero ser nocivas para otras funciones que el método de selección no detecte (Zhao H, 1997). Aunque esto último puede

ser controlado por el método de Zhao H, et. al. en bancos de variabilidad pequeños, dificulta el análisis en bancos grandes.

Métodos de monitoreo y selección

La automatización de los métodos de generación de variabilidad, por desgracia, va en desmedro de la precisión, y nos obliga a recurrir a procesos absolutamente azarosos, en que las mutaciones se presentan igualmente en sitios cruciales para la función de la proteína, como en posiciones silenciosas. Es por esto que una parte ineludible del proceso es la utilización de tamices metodológicos que nos permitan discernir entre las variantes "útiles" y aquellas que no corresponden a los intereses del trabajo de investigación.

Aunque actualmente existen muchos métodos de monitoreo y selección, ninguno puede ser considerado como absolutamente mejor que otro (excepto por supuesto las actualizaciones sucesivas que se le hacen a un mismo método), sino que cada uno define ciertas características, perdiendo otras. Por lo anterior, es que hay que elegir una opción congruente con lo que se quiera y lo que no se requiera obtener. La opinión de algunos autores es que los métodos de monitoreo resultan menos eficientes para la generación de actividades catalíticas que aquellos de selección, porque obligan a probar todas las variantes para la reacción investigada; aún las que están mal plegadas o carecen de función (Otten, 2005).

Aún siendo esta afirmación susceptible a críticas, sí es posible objetar que los métodos de monitoreo pueden llegar a producir una cantidad considerable de falsos positivos con respecto a aquellos de selección; dichos falsos positivos se encuentran en diferentes propiedades, dependiendo del método en cuestión, siendo las más comunes aquellas referentes a la estabilidad de la proteína.

Resulta interesante que los falsos positivos obtenidos por la búsqueda de diferentes propiedades (p. ej. estabilidad y afinidad) son en muchos casos diferentes. Por lo tanto, es deseable utilizar una metodología que permita mapear varias características a la vez, de tal modo que puedan desecharse la mayor cantidad de variantes inútiles.

Por contraparte, los métodos de selección se basan en que la función que se pretende seleccionar, confiere a la mutante una ventaja en la adaptación al medio sobre el genoma parental (Otten, 2005); en este sentido, son extremadamente sensibles a los cambios de actividad en casos de complementación de auxotrofia (Morett, 2003) o de resistencia a antibióticos, por ejemplo, pero resultan una evidente mala opción para la búsqueda de optimización de actividades preexistentes en una enzima, o para la búsqueda de funciones no vitales en la célula.

Más aún, estos métodos resultan de difícil aplicación cuando las mejoras buscadas son muy paulatinas, o requieren de un proceso de barajamiento previo adecuado para ser funcionales, debido a que las variantes con las que debería hacerse el barajamiento en primer lugar, son desechadas por este tipo de procedimientos.

FRET

La transferencia de energía por resonancia de fluorescencias (FRET) es un fenómeno que ocurre naturalmente en el interior de la medusa del pacífico norte, *Aequorea victoria*, entre dos de sus proteínas intrínsecas: luciferasa y GFP.

A pesar de lo anterior, que en la actualidad representa el estado del arte en esta metodología, los primeros estudios en este campo se realizaron observando la interacción de las fluorescencias de aminoácidos aromáticos colocados en diferentes puntos dentro de la misma proteína.

Los estudios más antiguos utilizando FRET (ya sea bajo el nombre transferencia de energía por resonancia de fluorescencias o el de transferencia de energía por resonancia de Förster), la técnica homo-FRET, realizados a principios de los sesenta, son una versión rudimentaria de los actualmente utilizados. No obstante, la intención es bastante similar: el registro de la distancia entre dos puntos a nivel nanométrico utilizando los cambios en la longitud de onda del espectro electromagnético, sin requerir métodos invasivos.

Así pues, la FRET pueda ser aplicada como un método de monitoreo para mediciones tanto *in vitro*, como *in vivo*.

Tiene la ventaja de ser capaz de registrar tanto la cercanía de dos proteínas interactuantes, como los cambios estructurales ocurridos en la conformación de una misma proteína (entiéndase, la distancia entre sus extremos N- y -C).

La resolución de esta técnica se encuentra entre los 20 y los 100 Å, por lo que resulta útil para la mayoría de las proteínas (Heyduk 2002).

Aunque existen muchas variantes de FRET actualmente, la mejor caracterizada –y en realidad la más actual- es la llamada hetero-FRET (esto es, la resonancia de fluorescencias entre dos fluoróforos diferentes). Dentro de este último tipo, sin duda la variante más utilizada para casos como el presentado aquí es la que combina proteínas fluorescentes del tipo GFP como fluoróforos.

Una gran ventaja de la metodología, radica en que las proteínas con plegamiento α - β tienen una gran estabilidad intrínseca, lo que permite que funcionen como coadyuvantes del plegamiento de la proteína central, al mismo tiempo que conservan sus capacidades fluorogénicas.

Las únicas condiciones lumínicas restrictivas para elegir a las proteínas que intervendrán en la FRET son, por un lado, que por lo menos una de ellas tenga una fluorescencia cuya variación lumínica sea detectable, y por otro, que los rangos de emisión y absorción de dichas proteínas, se sobrelapen.

Esto permite una gran diversidad de sistemas resonantes que utilizan diferentes fluoróforos con diferentes longitudes de onda.

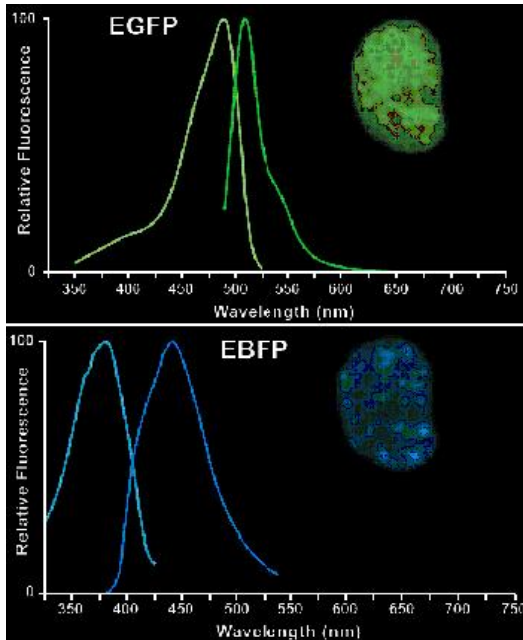


Fig 2. En esta figura están representadas las longitudes de absorción y emisión de las proteínas fluorescentes eGFP (arriba) y eBFP (abajo). Puede observarse que la emisión de BFP y la absorción de GFP tienen un margen de coincidencia o traslapamiento.

(Cortesía de Manuel Rivera, 2006)

Una de las desventajas de esta técnica, proviene de la existencia de autofluorescencia celular (Piehler, 2005), que puede obstaculizar la detección de valores muy pequeños, introduciendo un cierto grado de ruido de fondo y, por la misma razón, introducir también una cierta cantidad de falsos positivos.

Estos problemas han sido ampliamente mencionados en diversos trabajos de medición, utilizando fusiones con proteínas fluorescentes sencillas.

Aunque para el primer problema no existe solución alguna, siendo ésta una característica intrínseca del fluido celular, es posible objetar que la cantidad de datos perdidos es mínima, debido a que el umbral de medición es ciertamente bajo.

Para el segundo caso, por el contrario, la solución proviene del uso de mediciones cruzadas. Esto es: se mide la intensidad de salida, mientras que se mide la de entrada. Así se puede restringir la búsqueda de un pico en la intensidad de salida sólo en la vecindad temporal de lo esperado por el pico de entrada. O, dicho de otro modo, se puede esperar un crecimiento conjunto de las gráficas de absorción

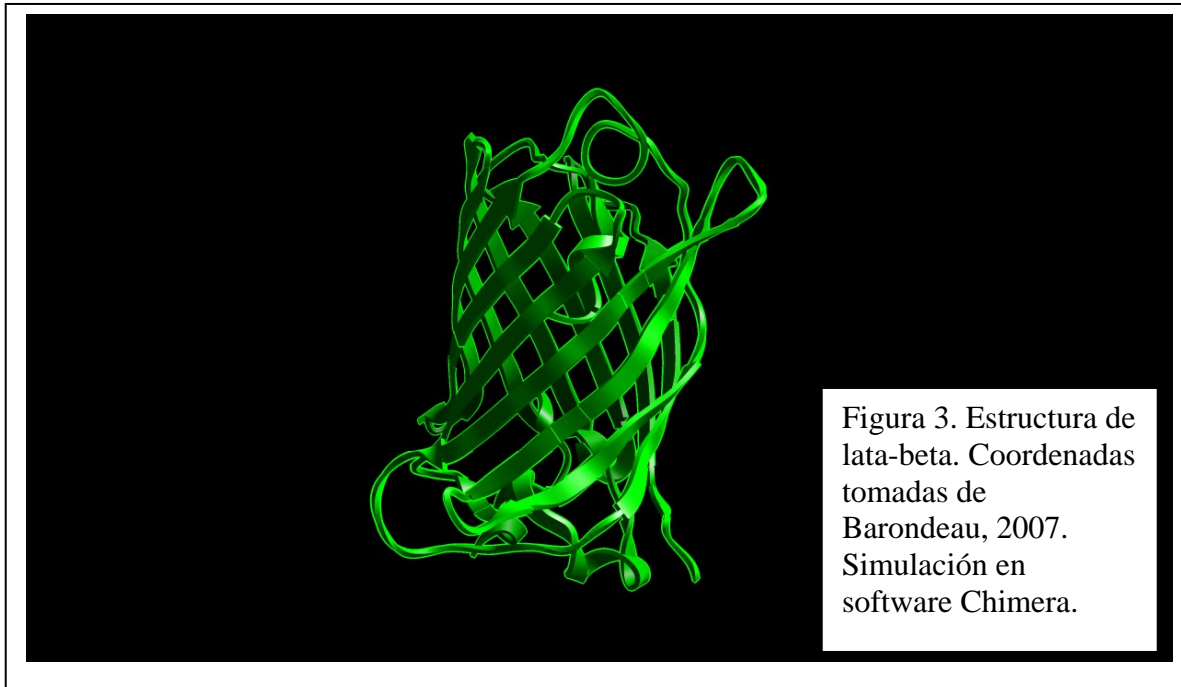
y emisión, teniendo así un método de filtrado de datos aberrantes provenientes de factores externos a las condiciones experimentales.

Más aún, este sistema es en muchos sentidos superior a otros similares, porque puede servir desde para medir cantidades de una proteína de interés producida en la célula hasta en mg/L, hasta para monitorear las variaciones nanométricas en su conformación, siguiendo la metodología de Philipps (2003), la cuál será descrita con mayor amplitud más adelante.

Por otra parte, presenta una ventaja frente al monitoreo por unión de GFP al C-terminal porque permite registrar esencialmente proteínas con poca tendencia a agregarse (Philipps, 2003); recordando que éste no ha mostrado tener el potencial para generar proteínas con estabilidad termodinámica mejorada (Waldo 1999, tomado de Philipps 2003).

La familia de GFP

GFP es una herramienta revolucionaria de la biología molecular debido a la espontánea ciclización de su esqueleto y formación de su cromóforo (Wood, 2005). Las proteínas del tipo GFP se encuentran plegadas en una conformación llamada lata-beta (Fig 3), en la que 11 láminas beta forman una estructura de barril, que encierra a un cromóforo central (Remington 2000). Esta estructura le permite a las proteínas mantener su integridad incluso en condiciones ambientales agrestes, como pH extremos desde 4.0 hasta 11.0 (Remington, 2002), o temperaturas elevadas hasta 60°C.



El cromóforo, la parte responsable de las características lumínicas, está formado por sólo tres residuos, aunque requiere de un equilibrio protónico en el que intervienen algunos otros (fig. 4). Su posición relativa en la proteína le permite permanecer aislado del ambiente, manteniendo la emisión y absorción en toda condición que sea permisiva para la estructura tridimensional nativa del esqueleto protéico.

Cabe mencionar que aunque las propiedades de fluorescencia sean mantenidas, los perfiles de absorción y emisión pueden ser ligeramente recorridos hacia ambos lados, por la alteración de las condiciones de flujo protónico del entorno del fluoróforo (McAnaney TB, 2002).

Desde su descubrimiento en la década de 1960 por Shimomura, Johnson y Siga, la proteína verde fluorescente ha sido modificada en una enorme cantidad de variedades, que tienen patrones de emisión y absorción modificados, tanto en intensidad, como en longitud de onda.

Una de las variantes más usadas ha sido la proteína azul fluorescente (BFP), una variante de GFP (Y66H/Y145F) reportada, cristalizada y analizada por James Remington en 1997. Curiosamente, aunque GFP posee una fluorescencia residual azul (Remington 2002), ésta no es visible por la mucho mayor fluorescencia verde, que depende de la activa transferencia de protones en una red alrededor del cromóforo.

Aparentemente, la mutación Y66H evita el flujo activo de protones, y por el contrario, favorece la emisión de fluorescencia azul, de 448 nm, mientras que la mutación Y145F puede tener relación con el aumento en la intensidad de la emisión.

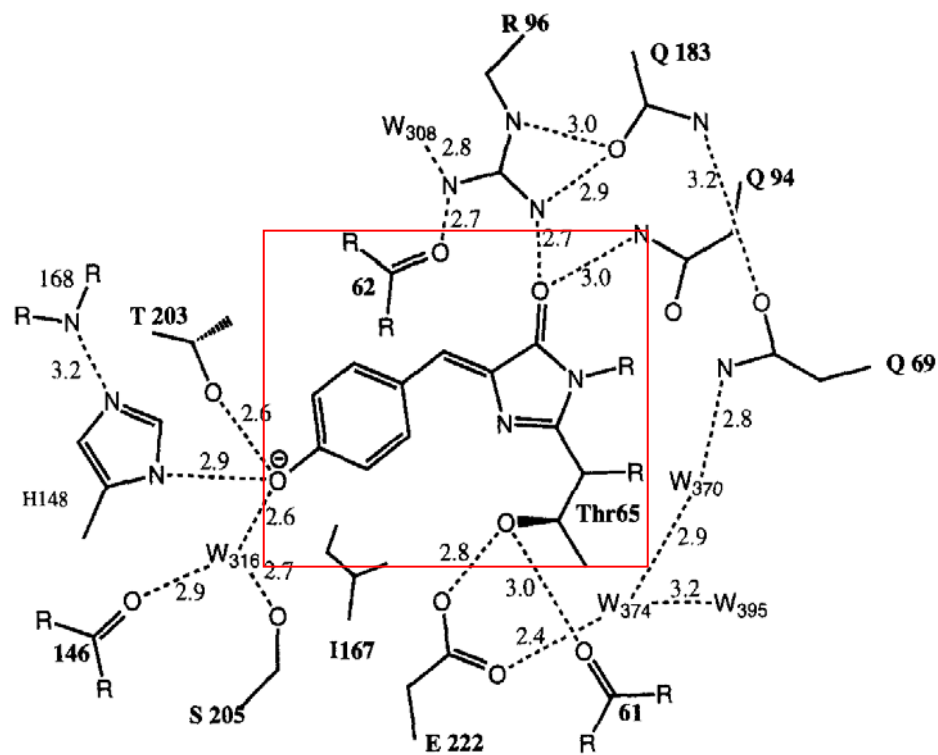


Fig. 4
Entorno del cromóforo (en el recuadro) en GFP.
Tomado de Remington, 2002

En ensayos de FRET, BFP y GFP son una pareja fluorescente muy recomendable, tanto por su estabilidad y su relativa facilidad de manejo, como por tener

espectros de emisión y absorción sobrelapados y por ser las proteínas fluorescentes que más se han estudiado.

Anticuerpos catalíticos

Los anticuerpos catalíticos son un tipo particular de catalizadores naturales, que resultan de una respuesta inmune.

Su estructura, al igual que la de los otros anticuerpos, está conformada por dos cadenas largas unidas parcialmente entre sí, y cada una unida a una de dos cadenas más ligeras idénticas.

Los anticuerpos en general son proteínas conocidas también como inmunoglobulinas porque forman parte de la respuesta inmune en los vertebrados. Más particularmente, son producidos por las células B de la médula ósea. Aunque en una etapa inicial se encuentran unidos por interacciones no covalentes a la membrana de sus células productoras, una vez que éstas son activadas por células colaboradoras T, pueden ser producidos y secretados en forma soluble al torrente sanguíneo, conformando hasta el 20% de la masa protéica total del plasma (Alberts, 1994).

En forma nativa, poseen una estructura tetramérica conformada por dos cadenas pesadas apareadas longitudinalmente, enlazadas a dos cadenas ligeras por uniones tanto covalentes como no covalentes.

Su estructura básica funcional está dividida transversalmente, separando las regiones idénticas con los sitios de unión al antígeno (Fab) y la cola, la cual actúa en la activación del complemento en el sistema inmunológico. Esta separación puede obtenerse experimentalmente mediante la digestión con papaína.

Por su origen (que es un determinante de su precisión) son divididos en dos grupos: monoclonales y policlonales.

Los anticuerpos policlonales son aquellos que presentan afinidad a grupos de sustratos que tengan grandes similitudes entre sí.

Los anticuerpos monoclonales son aquellos que presentan restricciones estéricas, electrostáticas o comúnmente ambas a cualquier sustrato que no sea aquél para el que están diseñados. Así, aunque los anticuerpos monoclonales sólo se unen a un sustrato, y son capaces de ignorar sustratos que sean muy similares, son idénticos en la estructura general a los policlonales.

En un análisis de secuencia en poblaciones de inmunoglobulinas, puede observarse que incluso anticuerpos monoclonales (por ejemplo los provenientes de hibridomas de ratón) poseen regiones sumamente constantes y conservadas, y regiones con una variación muy grande.

Evidentemente, son denominadas regiones constantes y regiones variables del anticuerpo.

Tanto las cadenas pesadas como las ligeras, poseen una estructura tridimensional en pliegues (llamados dominios), que conservan su integridad espacial mediante enlaces covalentes. Dichos dominios variables (sólo hay uno por cadena) se denominan V_H o V_L (fig. 5) dependiendo de si se encuentran en la cadena pesada (H, por heavy) o ligera (L, por light), y están conformados por dos capas, formadas cada una por una serie de láminas β antiparalelas. Esta distribución forma un bolsillo que permite la unión al ligando, así como la especificidad de cada inmunoglobulina.

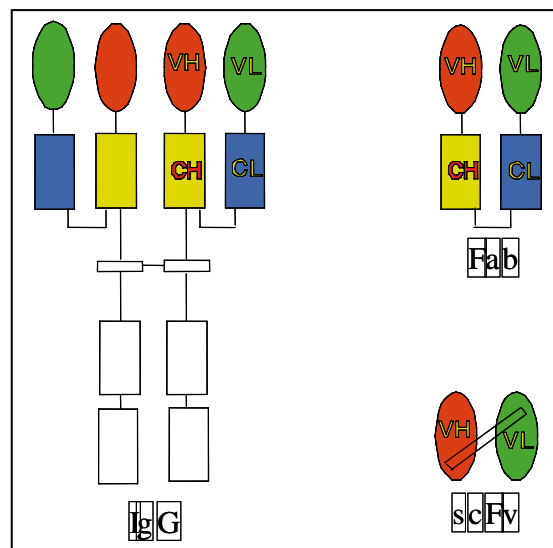


Fig. 5: Estructura básica de una inmunoglobulina, y de construcciones funcionales Fab y scFv (Cortesía de Osuna, J. 2002).

Es importante hacer hincapié en el punto de las características modulares de los anticuerpos, que se retomarán posteriormente en esta misma sección.

Aunque los anticuerpos en el cuerpo de la mayoría de los mamíferos se encuentran en forma de tetrámero, la división funcional transversal es sumamente importante. Así, sólo la sección variable se encarga del reconocimiento del antígeno, mientras que la sección conservada se requiere para la señalización al sistema inmune.

A diferencia de muchas proteínas, la sección variable, la encargada del reconocimiento, tiene la capacidad de ser ampliamente modificada, sin provocar daños al resto de la estructura.

Lo anterior hace de los anticuerpos modelos sumamente deseables para la manipulación molecular del reconocimiento a diversos antígenos.

Hace alrededor de 40 años, Jencks propone que moléculas parecidas a los estados de transición de reacciones determinadas, pueden ser utilizados para la elaboración de anticuerpos tanto específicos como catalíticos, desencadenando una respuesta inmune. Dichas moléculas, llamadas haptenos, mimetizan en una versión estable los estados transicionales de las reacciones que, por definición, son sumamente efímeros.

Como una respuesta a la introducción al cuerpo de estos haptenos, los organismos (en el uso común, ratones) producen una serie de anticuerpos capaces de unirse a ellos. Siendo los haptenos moléculas similares a los estados transicionales de reacciones reales, los anticuerpos tienen la función de promover (o de cierta manera, forzar) el paso a la sección intermedia de la reacción, y así, favorecer la transformación química.

De ahí que: "en esencia, la mejor unión con el análogo del estado de transición se puede traducir directamente en mayor actividad [catalítica]" (Hilvert, 2000).

De esta manera, se puede teorizar que "cualquier transformación química compatible con un entorno biológico, es potencialmente susceptible a la catálisis por anticuerpos, mientras que pueda ser generado un análogo del estado de transición apropiado" (Hilvert, 2000).

Como es evidente, los haptenos generados con estos fines no pueden ser iguales a las moléculas que representan, que son transitorias, por lo que en ellos se resaltan características que sean diferentes en el estado de transición y el estado basal del sustrato que se pretende catalizar, como la carga o algunos grupos funcionales en particular (Hilvert, 2000).

Hasta ahora, sin embargo, los métodos utilizados para la generación de anticuerpos catalíticos, sólo han sido capaces de producir abzymas (entiéndase "anticuerpos catalíticos") pobremente comparables con las enzimas de más bajo rendimiento, y que catalizan sustratos previamente activados (Hilvert, 2000), a pesar de que sus estrategias para disminuir las barreras cinéticas son muy similares a las de sus contrapartes más evolucionadas (fig. 6).

Es importante recalcar que los haptenos no son idénticos a los estados transicionales, por lo que los anticuerpos generados contra éstos no pueden utilizar las características propias de la molécula original que le confieren la inestabilidad, como la carga, lo que los hace catalizadores mucho menos específicos que las enzimas.

Una explicación posible de lo anterior, es que las diferencias entre el hapteno y el sustrato verdadero favorecen la selección de anticuerpos con estructuras termodinámicamente inestables para unirse al estado transicional natural (Martí S, et al 2007).

Es por eso que se ha buscado combinar la generación de anticuerpos con las estrategias de mejoramiento de actividades catalíticas, entre las que se encuentra, en un lugar privilegiado, la evolución dirigida de proteínas.

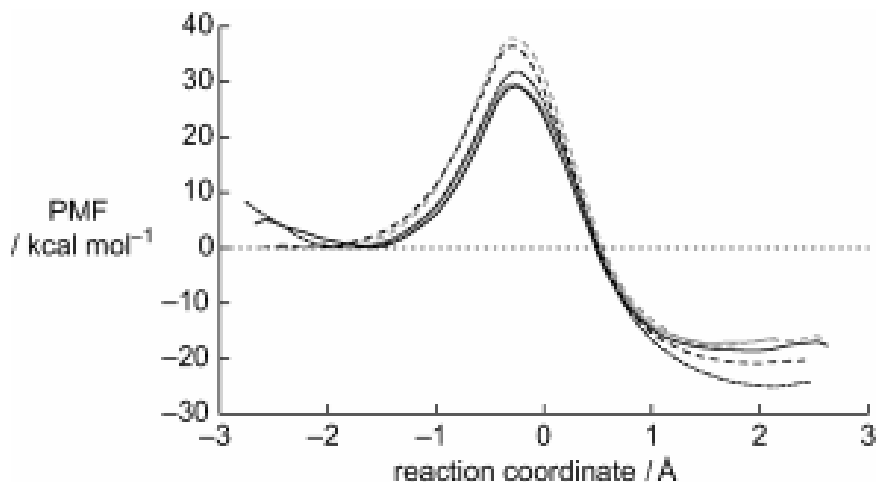


Fig. 6
Perfiles de energía para la conversión de corismato a prefenato.
Líneas sólidas: Corismato mutasa de *Escherichia coli* y *Bacillus subtilis*.
Líneas punteadas: Simulaciones de 1F7.
Tomado de Martí, 2007

1F7

El anticuerpo catalítico 1F7 fue generado en un modelo murino por Donald Hilvert, en 1988, utilizando como hapteno un ácido dicarboxílico (Fig. 7), y cristalizado en 1994 por Haynes *et al.* (Haynes, 1994).

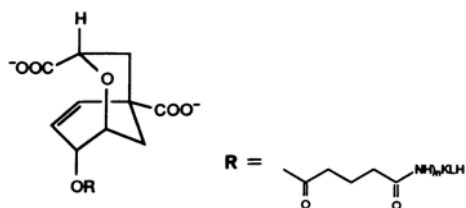


Fig 7.
Hapteno utilizado para inmunizar ratones por Hilvert en 1988

El ácido dicarboxílico mimetiza la conformación diaxial del corismato, debido a que es éste estado el que se teoriza que participa en la reacción enzimática de corismato a prefenato, a pesar de que el corismato en solución acuosa adopta preferentemente la conformación pseudo-diecuatorial.

El análogo del estado de transición fue expuesto al sistema inmune utilizando BSA, Y las células del bazo fueron después fusionadas a células de mieloma, y las que produjeron anticuerpo fueron clonadas.

El anticuerpo producido de este modo mostró afinidad al corismato, y evidentemente, inhibición por el TSA (análogo del estado de transición).

Posteriormente, se observó que una versión truncada del anticuerpo, el Fab (Figura 5) es capaz de complementar la actividad de corismato mutasa en levadura (Hilvert, 1991), aunque la actividad resulta muy baja aún para aplicaciones biotecnológicas, permitiendo una reacción sólo 200 veces más rápida que la reacción no catalizada¹.

En 1994 se obtiene la primera estructura cristalográfica de la proteína, a 3.0 Å, a partir de la cuál se obtienen conclusiones que permiten profundizar en la investigación.

La más importante para el presente trabajo, es que de los ocho residuos que interaccionan directamente con el hapteno, siete de ellos se encuentran en los CDRs de la cadena pesada, y cerca del 90% de la parte del hapteno que se encuentra embebida en el anticuerpo, tiene contactos sólo con la cadena pesada (Haynes, 1994; Fig 8).

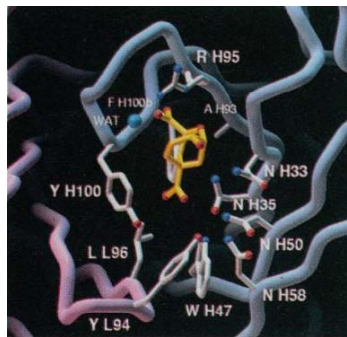


Fig 8.
Representación de la estructura tridimensional de 1F7 en contacto con el TSA. En azul, la cadena pesada. En rosa, la cadena ligera. Tomado de Haynes, 1994.

Resulta de estas observaciones la tendencia a buscar independizar la fracción del VH del resto del anticuerpo.

Siguiendo esta ruta, se llegó a generar una versión en cadena sencilla de únicamente dos secuencias variables truncadas del anticuerpo: el dominio V_L de la

¹ La corismato mutasa de *Escherichia coli* realiza la reacción 10⁶ veces más rápido que la misma reacción en agua.

cadena variable ligera, y el V_H de la cadena variable pesada, unidas por un conector (Tang, 1996), y se inició el proceso para generar un fragmento VH funcional por sí mismo.

Desgraciadamente, aunque partir el anticuerpo en un fragmento tan pequeño sería muy deseable por el aumento de su solubilidad, llevaba a inestabilidades estructurales inactivantes, como la agregación de la proteína, debida a la exposición al medio de residuos hidrofóbicos que originalmente se encontraban ocultos por la estructura general.

Entre los mamíferos, no obstante, el grupo de los camélidos presenta anticuerpos formados únicamente por la cadena pesada sin su complemento. Así, en la sección que equivaldría a aquella de complementación de las cadenas, presentan series de residuos de aminoácido hidrofílicos, en lugar de los hidrofóbicos típicas, confiriéndoles estabilidad en medios acuosos.

Por lo tanto un acercamiento racional que resultaba prometedor para evitar la agregación, era la "camelización" de la cadena hidrofóbica, consistente en mimetizar los anticuerpos de camélidos sustituyendo los residuos hidrofóbicos que quedaran expuestos al medio por sus contrapartes hidrofílicas.

La camelización, sin embargo, no presentó ninguna solución significativa en las propiedades de la proteína (Tang, 1996, de Hilvert, 2000).

De esta forma, el acercamiento no racional, la evolución dirigida, cobra un nuevo valor en el desarrollo de este anticuerpo. Mucho más aún, siendo que 1F7 es una inmunoglobulina del tipo IgG, el discernimiento de los factores que permiten su simplificación en cadenas más pequeñas puede ser de gran utilidad médica en un contexto farmacológico (Hilvert, 2000), para aplicarlo en otros anticuerpos de la misma familia para, por ejemplo, mejorar sus propiedades de solubilización.

Hasta el momento, el dominio V_H ha sido procesado por barajamiento de genes en cuatro ocasiones sucesivas (Osuna, comunicación personal).

Con el avance a este respecto, se ha obtenido una mejoría efectiva en la estabilidad del péptido ante la agregación.

En procesos experimentales previos al desarrollo del presente trabajo, el V_H fue fusionado, primero a GFP en su extremo carboxilo y, en forma independiente en un segundo acercamiento, a cloranfenicol acetil transferasa, con la finalidad de observar, en el primer caso, un aumento en la intensidad de la fluorescencia verde al ser sometida la fusión a luz natural, y en el segundo caso, un aumento en la supervivencia de las colonias en concentraciones periódicamente incrementadas de cloranfenicol.

El aumento en la estabilidad obtenido, se debe a mutaciones que en general han aterrizado en los sitios hidrofóbicos que quedaron expuestos al remover el dominio V_L, siendo aquellos con tendencia a formar agregados inactivados.

La aleatoriedad del método de la evolución dirigida permitió que estos cambios no fueran los mismos que se habían obtenido en el enfoque racional hacia la camelización, aunque se ubican en la misma región: aquellos responsables de la complementariedad entre las cadenas pesada y ligera.

Los ensayos de inhibición realizados sobre el anticuerpo muestran que la disminución en la eficiencia del anticuerpo 1F7 por la presencia de hapteno es similar a la que ocurre en enzimas, lo que demuestra que la reacción ocurre enteramente en el sitio catalítico (Hilvert, 1988).

Por otro lado, la caracterización bioquímica del anticuerpo arroja datos que indican que la catálisis se debe a una significativa disminución de la entalpía de activación, en lugar de deberse a una disminución en la entropía, como ocurre en las enzimas de *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli* (Hilvert, 1988).

A partir de esta fecha, se han hecho diversas modificaciones en el anticuerpo original para mejorar sus propiedades catalíticas.

Corismato mutasa:

La reacción de corismato mutasa es aquella que transforma el corismato, producto metabólico derivado del shikimato, en el siguiente paso en la vía de síntesis de los aminoácidos aromáticos tirosina y fenilalanina: el prefenato.

Químicamente, pertenece al grupo de reacciones conocido como rearrreglo de Claisen, debido a que en ella no ocurre ninguna transferencia de grupos funcionales, sino simplemente una reorganización de enlaces (fig. 1).

El mecanismo de la catálisis depende de dos factores que probablemente actúen en forma armónica:

a) La estabilización o modificación del sustrato.

Curiosamente, el corismato biaxial es el sustrato "activado" de la reacción, a pesar de ser mucho más desfavorable energéticamente que el estado biecuatorial.

En simulaciones por computadora, la enzima es capaz de convertir al corismato biecuatorial a su forma biaxial en 32 ps, para después realizar la reacción de rearrreglo. Esta velocidad se logra por la presencia de una gran cantidad de contactos enzima-sustrato, que se modifican al realizarse el cambio de conformación del sustrato, sin ser necesaria la adaptación de la enzima a la nueva forma (Zhang, 2005).

Al no poseer la misma cantidad de contactos con el sustrato, el anticuerpo realiza una estabilización de la porción del sustrato que posee la conformación biecuatorial, representando éste un porcentaje pequeño (~ 20%) del sustrato en solución acuosa.

En cierta medida, es en esta diferencia de estrategia que radica la poca eficiencia del 1F7, que requiere la presencia del sustrato previamente modificado para realizar la catálisis.

b) La formación de un confórmero de ataque por cercanía.

Algunos autores (Hur, 2003; Zhang, 2005) proponen que la mayor fuerza motriz del rearrreglo de Claisen proviene de la formación de un confórmero en que los carbonos C5 y C16 se encuentren a una corta distancia, con un ángulo determinado entre ellos (Fig 9).

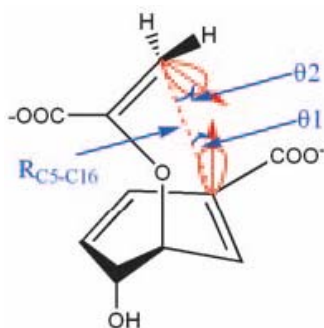


Fig. 9
El conformero
de ataque por
cercañía.
Tomado de
Zhang, 2005

La enzima o, en nuestro caso, el anticuerpo, tiene como finalidad colocar los átomos determinados en un ángulo que permita el sobrelapamiento de sus ángulos π .

Una vez logrado lo anterior, la reacción resulta energéticamente favorable, y ocurre espontáneamente.

Los residuos hidrofóbicos en el sitio catalítico de la enzima, según este modelo, tienen la función de mantener inmóvil al sustrato durante la reacción, para evitar su desplazamiento lateral, que provocaría la pérdida de la conformación obtenida.

Aunque existe polémica entre algunos grupos (por ejemplo el de William Lipscomb y el de Thomas Bruice) sobre cuál de los mecanismos posee la mayor contribución energética relativa en la reacción, nuestro interés radica únicamente en comprender que ambos tienen lugar durante el proceso de catálisis.

Resulta importante mencionar que la posibilidad de una estabilización electrostática ha sido contemplada por diversos autores, debido a que existe una pequeña variación en la carga neta entre el estado basal y el estado transicional del sustrato.

Han calculado, sin embargo, que sólo representa el 10% del $\Delta\Delta G$ de la reacción (Strajbl, 2003; Zhang, 2005).

Como en los anticuerpos catalíticos es difícil encontrar secciones funcionales muy desarrolladas (con gran cantidad de grupos funcionales), hacen de este tipo de reacciones un blanco deseable: en primer lugar porque son relativamente fáciles de cuantificar, en segundo porque siendo reacciones indispensables del

metabolismo, pueden establecerse sistemas de selección sensibles a pequeños cambios en la eficiencia de la proteína, y en tercero porque su catálisis requiere aquellas propiedades que los anticuerpos pueden más fácilmente brindar: tensión y proximidad inducidas (Hilvert, 1988).

Profundizando sobre el primer punto, el ensayo que fue originalmente utilizado para la caracterización del anticuerpo, fue la conversión de piruvato a fenilpiruvato en presencia de ácido, para la posterior cuantificación de la molécula enólica en solución alcalina a 320 nm, el cuál ha mostrado ser preciso al ser comparado con resultados análogos de HPLC (Hilvert, 1988). Sin embargo, en la actualidad un método mucho más efectivo, tanto por su fácil aplicación como por ser una medición directa, es la cuantificación de la desaparición de corismato con respecto al tiempo, medida a 275 nm.

Objetivos:

Objetivo general: Generar un sistema que permita evaluar las mejoras realizadas en la evolución dirigida del dominio VH del anticuerpo catalítico artificial 1F7.

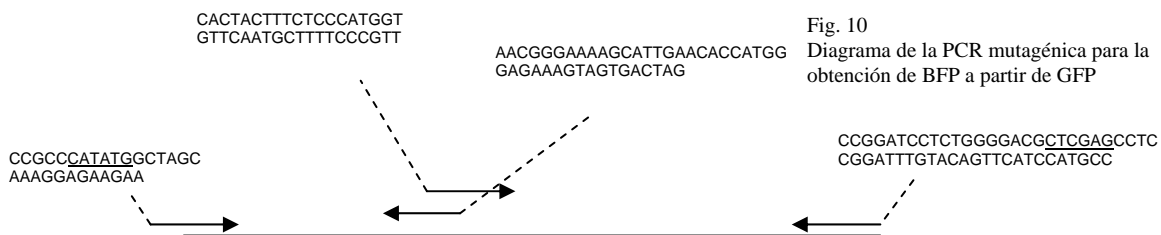
Objetivos particulares:

- Mutagenizar la proteína verde fluorescente para generar una variante con un espectro recorrido hacia el violeta (BFP).
- Obtener un vector conteniendo tanto a GFP como a BFP, que permita la introducción de las variantes de V_H.
- Evaluar fluorométricamente la evolución dirigida de V_H.

Método:

Para obtener un sistema triple, esto es, el dominio de VH flanqueado por BFP (en el extremo amino) y GFP (en el extremo carboxilo), requerimos primero de la construcción de BFP a partir de GFP wt. Para lo anterior, diseñamos dos oligos mutagénicos (BFPback y BFPfwd), que introdujeran la mutación Y66H, necesaria y suficiente para generar el cambio en el espectro de la proteína.

Se realizaron dos reacciones en cadena de la polimerasa (PCR), correspondientes a los fragmentos desde los extremos hasta el sitio donde se incluyó la mutación.



Las cadenas generadas fueron consideradas megaprimers, y se unieron entre sí, previa purificación en gel de agarosa, en una nueva PCR hibridante, utilizando únicamente los oligos extremos (BFP Nde y BFP Xho). Estos últimos introdujeron, por un lado, el conector en el extremo 3', y por otro, los sitios de restricción para las enzimas Nde I y Xho I, que fueron utilizadas posteriormente para la subclonación del fragmento correspondiente a BFP en un oligo pTHIOc, controlado por un promotor de lactosa, inducible por IPTG (Fig. 10).

El vector fue introducido a células electrocompetentes de *Escherichia coli* XL1-blue por electroporación, y las células fueron inoculadas en medio LB líquido para su recuperación y después sembradas en cajas Petri con agar LB, con ampicilina 20mg/mL.

Posteriormente, clonamos GFP por PCR, utilizando los oligos GFP Nsi, del lado 5' y EndSal His, del lado 3' y lo purificamos por gel de agarosa. Con el producto de

PCR obtenido, se realizó una segunda PCR para agregar el sitio de restricción Xho, utilizando los oligos EndSal His y GFP link.

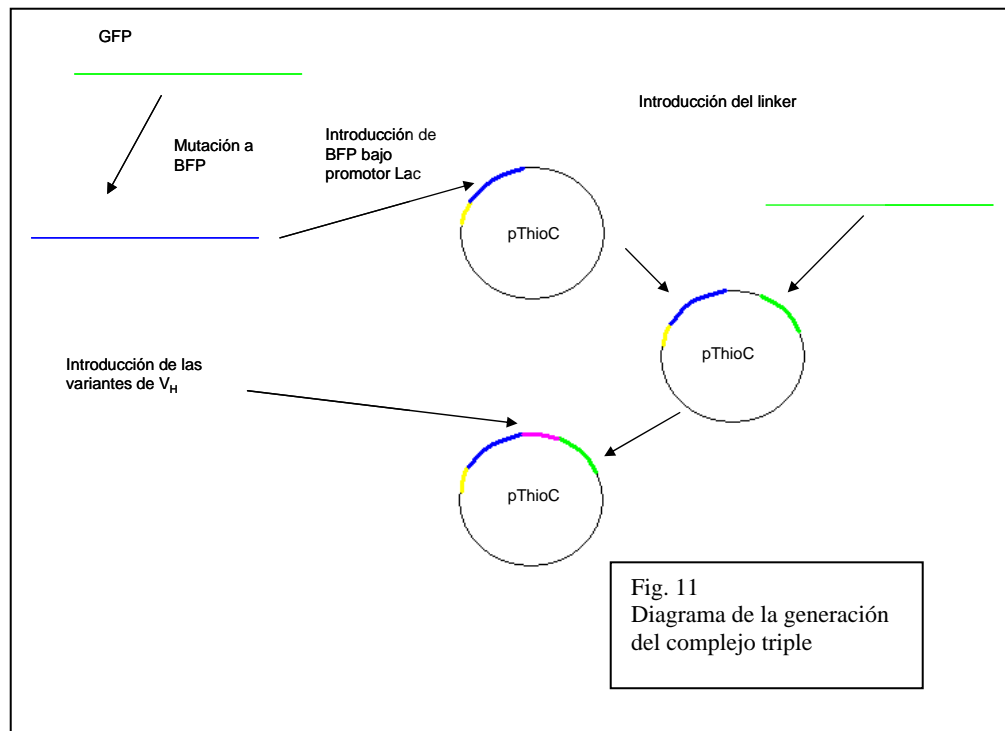
Después de una nueva purificación, fue introducido al vector donde se encontraba ya BFP, utilizando las enzimas Xho I y Sal I.

El vector se volvió a introducir a *Escherichia Coli* XL1-Blue en las mismas condiciones del caso anterior.

Este vector fue considerado el control positivo.

Los dominios VH de los diferentes ciclos de evolución dirigida fueron clonados por PCR, utilizando los oligos VH Xho y VH Nsi, y posteriormente clonados en el sistema doble BFP-conector-GFP, utilizando las enzimas Xho I y Nsi I.

El vector se volvió a introducir a *Escherichia Coli* XL1-Blue en las mismas condiciones (Fig. 11).



Paralelamente, se realizó una nueva PCR del fragmento de BFP, utilizando los oligos BFP Nde y BFP stop, con la finalidad de agregar un codón de paro en el conector.

De la misma manera, se realizó una PCR independiente de GFP, utilizando los oligos GFP Rbs y EndSal His, para introducir un nuevo sitio Shine Dalgarno cercano al extremo 5´ de este gen.

Estos dos fragmentos fueron introducidos secuencialmente en un vector pTHIOc, electroporados a *Escherichia coli* XL1-Blue, y sembrados en cajas Petri con ampicilina.

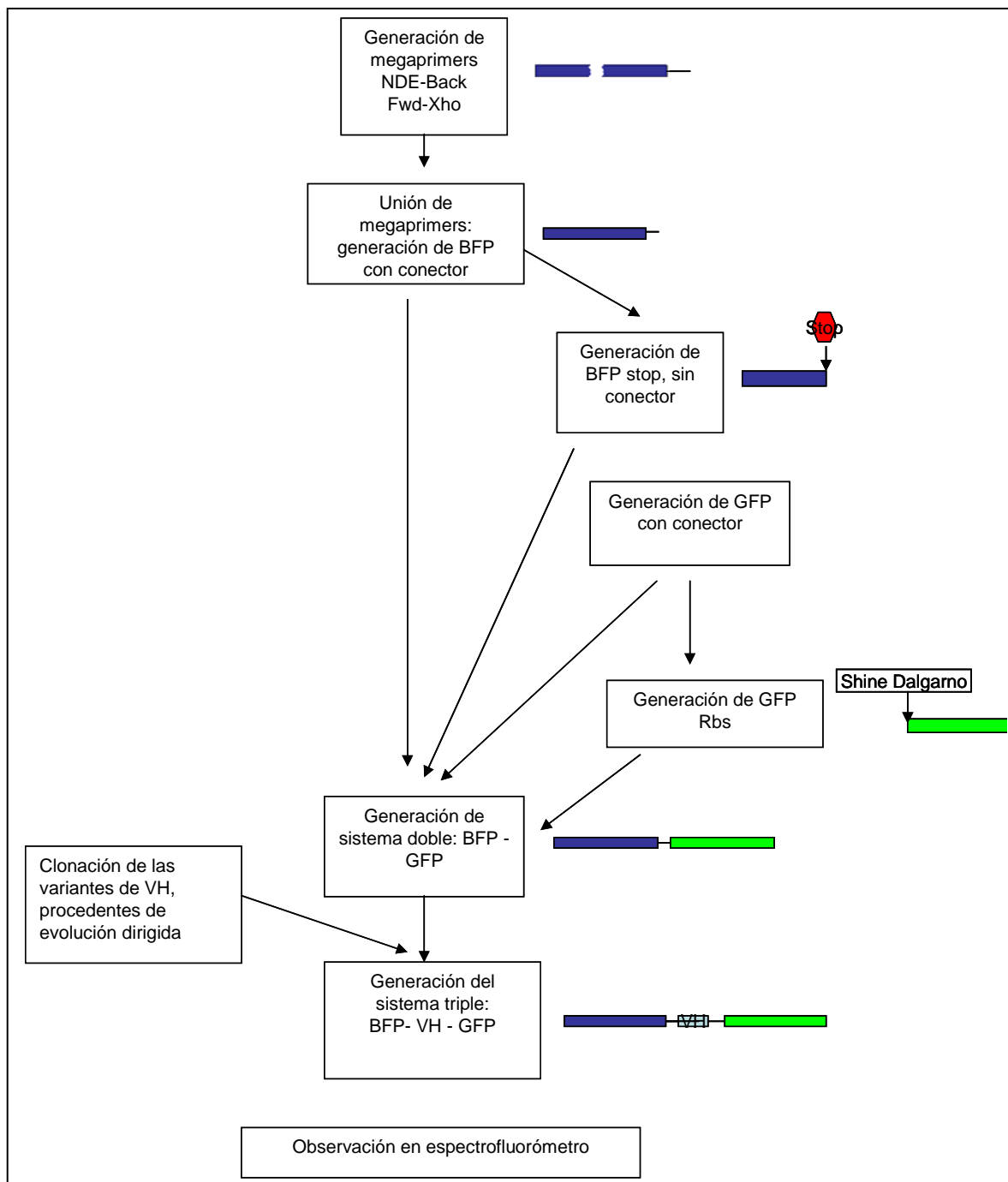
Esta construcción fue considerada como control negativo.

Una vez completas todas las construcciones, se dejaron crecer las células correspondientes a cada una en cajas Petri a temperatura ambiente por tres días, y se almacenaron a 4°C.

Una colonia de cada caja fue sembrada en cajas de ELISA de 96 pozos con medio LB, donde fueron irradiadas con luz de 387 nm.

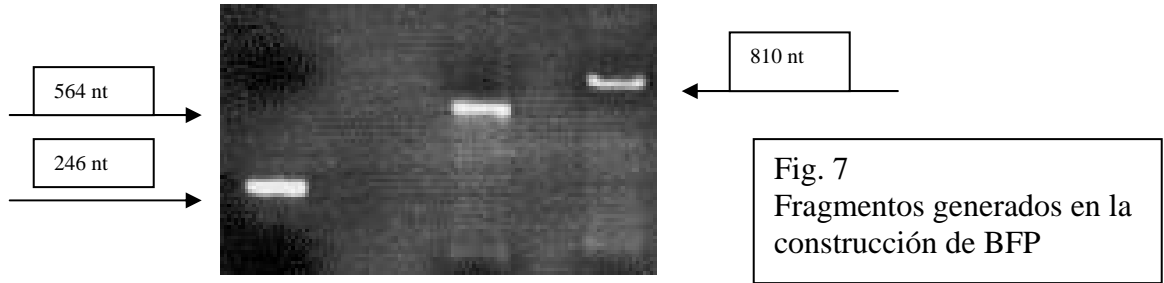
Se realizó una lectura de emisiones a longitudes de onda de 509 y 448 nm, correspondientes a los espectros de emisión de GFP y BFP, respectivamente.

Esquema metodológico

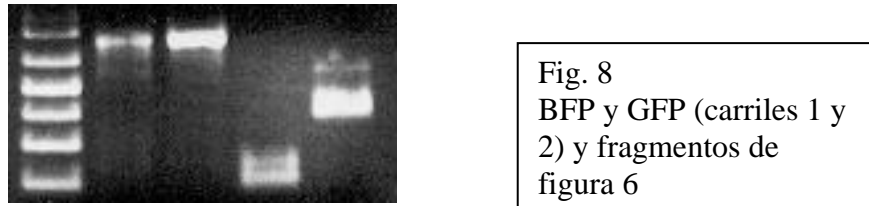


Resultados:

Los fragmentos obtenidos de la primera PCR, correspondientes a los oligos BFP Nde-BFP back, y BFP Fwd-EndSal His, fueron medidos por electroforésis en gel de agarosa, mostrando los respectivos tamaños de 246 y 564 nucleótidos.



De ahí, su ensamblaje, realizado por PCR utilizando los fragmentos anteriores como megaprimers, generó un producto de ~800 nucleótidos, como lo demostró la electroforésis, donde la recién sintetizada BFP, y GFP, se encuentran a la misma distancia del origen de corrimiento.



BFP fue después secuenciada. De las secuencias obtenidas, se desecharon aquellas que tuvieran modificaciones sobre el producto esperado, resultando una población homogénea de BFP con la secuencia que se muestra:

```
>BFP
CTCTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTGAATTAGATGGTGATGTTAACGGCCACAAG
TTCTCGTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGAAAACTTACCCTGAAGTT
CATCTGCACTACTGGCAAAGTGCCTGTTCCCGTGGCCAACCCTAGTCACTACTGTTCTCCC
ATGGTGTTC AATGCTTTTCCCGTTACCCGGATCACATGAAACGCCATGACTTTTTCAAGA
GTGCCATGCCC GAAGTTATGTACAGGAACGCACCATCTCCTTCAAAGATGACGGCAACT
ACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACCCTTGTTAATCGTATCGAGTTAA
AAGGTATTGACTTCAAGGAAGATGGCAACATTCTGGGACACAAATGGAATACAAC TATA
ACTCACACAATGTATACATCATGGCAGGACAAACAAAAGAATGGAATCAAAGTGA ACTTC
AAGACCCGCCACAACATTTGAAGATGGAAGCGTTCAACTAGCAGACCATTATCAACAAAAT
```



```
ACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTCCTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCT
GCCCTTTCGAAAGATCCCAACGAAAAGAGAGACCACATGGTCTTCTTGAGTTTGTAACA
GCTGCTGGGGATTACACATGGCATGGATGAACTGTACAAATCCGGGAGGCTCGACCTGCA
GTAATCGTACAGGGTAGTACAAATAAAAAAGGCACGTCNNATGACGTGCCTTTTTTCTTG
TGAGCAGTAAGCTTGGCACTGGCCGTCGTTTTNAAACGTCGTGACTGGGAAAACCTGGC
NGTTACCCAACCTTAATCGCNTTGCAGCACATNCCCCTTT
```

GFP fue exitosamente clonada, y se logró efectivamente introducirle el sitio Xho I.

Los plásmidos conteniendo a BFP y a GFP que fueron obtenidos, fueron probados para su sensibilidad a la digestión con NdeI, XhoI, NsiI y Sall. Aquí presento únicamente la digestión conjunta de NdeI y XhoI. Entiéndase que el resultado de la digestión por NsiI y Sall, dio un patrón muy similar en el gel de agarosa.



Fig. 12
Plásmidos de diferentes
ciclos de evolución
digeridos en NdeI y Sall,
liberando BFP

De la misma manera, fueron obtenidos los fragmentos GFP Rbs y BFP stop, e introducidos exitosamente al vector pTHIOc.

Los diferentes fragmentos de V_H fueron clonados e introducidos al vector, que posteriormente se digirió en los sitios XhoI y NsiI, para probar una introducción exitosa, y después secuenciados.

Aunque se obtuvo el total de construcciones, sólo se hicieron pruebas preliminares de fluorescencia, para comprobar la funcionalidad del sistema. Se realizaron tres análisis por separado: la medición de BFP y GFP independientemente, para comprobar que tuvieran las mismas propiedades luminosas en todos los casos, y la medición de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencias, para probar el sistema completo. Los resultados se presentan a continuación, donde KIII es el V_H wt, los números enteros corresponden al ciclo de barajamiento, y los decimales a diferentes versiones en un mismo ciclo:

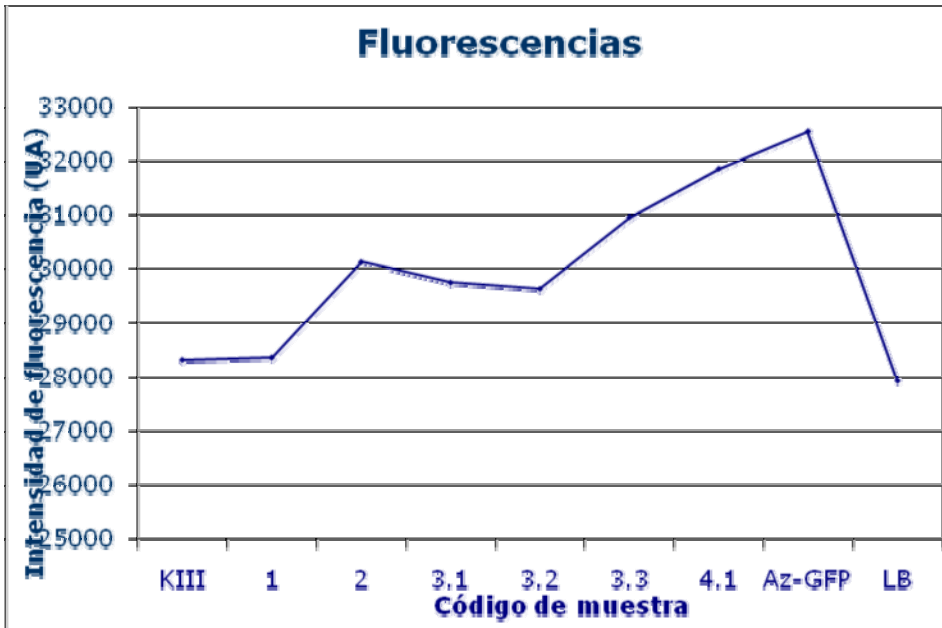


Fig 12: Medición de FRET con irradiación a 387 nm, y lectura a 509 nm. Los datos se encuentran en valores relativos.

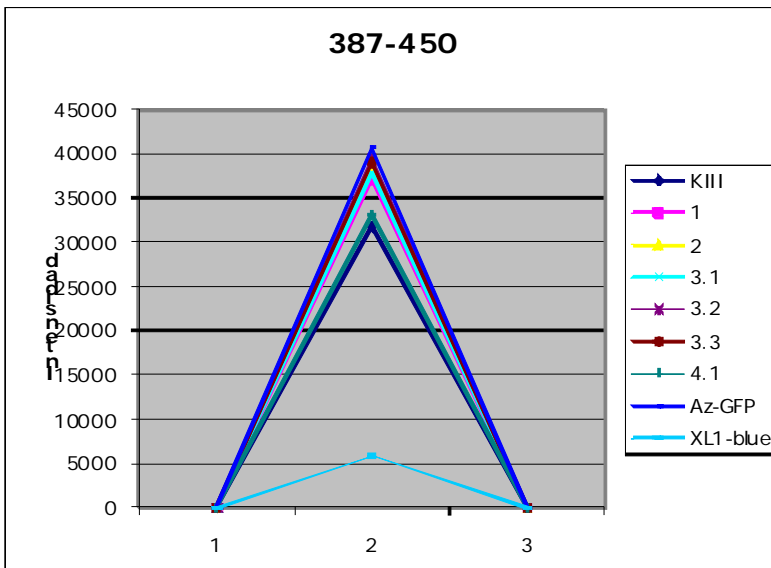


Fig 13: Medición de emisión de BFP, irradiada a 387 nm y leída a 450 nm. Los datos están en valores relativos.

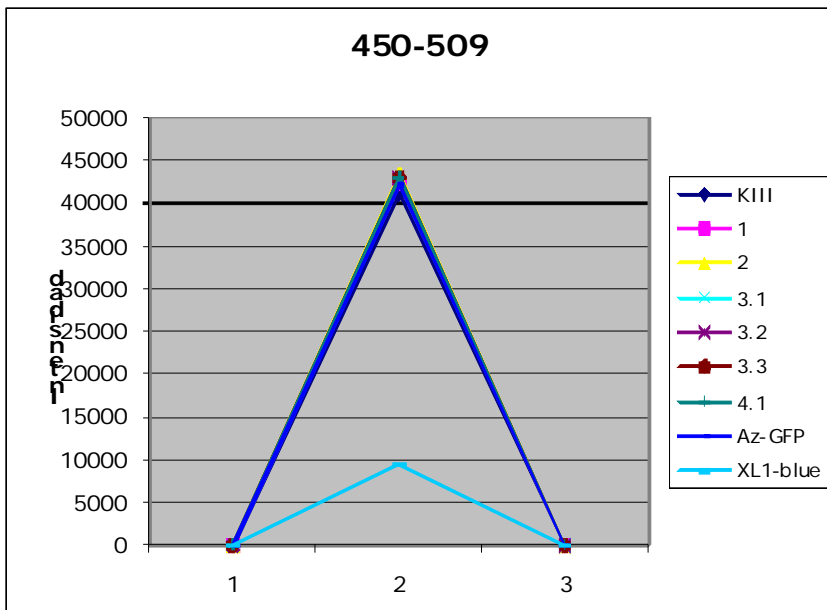


Fig 14: Medición de emisión de GFP, irradiada a 450 nm y leída a 509 nm. Los datos están en valores relativos.

Todas las gráficas están calibradas a la lectura de LB como 0.

Discusión:

Es muy tentador el desarrollo de anticuerpos para el estudio más profundo de los mecanismos de catálisis enzimática, a pesar de su difícil obtención.

Los fragmentos generados de los ciclos de evolución no resultan aún eficientes para la catálisis, aunque son capaces de reconocer el sustrato en condiciones experimentales favorables.

Nuestro enfoque propone que la falta de estabilidad en los fragmentos VH es la causante de que no se pueda observar una efectiva transformación del sustrato, debido a la formación de agregados hidrofóbicos en forma de cuerpos de inclusión. Sin embargo, la obtención de una fracción protéica tan pequeña que sea capaz de catalizar una reacción, aunque sea pobremente, promete una herramienta invaluable para la disección de los procesos de reacción.

Resulta de gran interés la posibilidad de arrojar luz sobre los mecanismos de conformeros de ataque por cercanía, propuestos por Bruice, para ponderar experimentalmente su importancia.

A pesar de esto, es también interesante destacar que la posición del hapteno en el anticuerpo es diametralmente opuesta a la análoga en la enzima, por lo que, si las suposiciones teóricas de Bruice son correctas, se podría llegar a mostrar un conformero capaz de forzar los ángulos π desde otra posición, utilizando únicamente la modesta intervención energética de sus escasos puentes de hidrógeno.

Por otra parte, el papel análogo al de los residuos hidrofóbicos en la enzima –evitar el corrimiento lateral del sustrato- es realizado en el anticuerpo por una tapa móvil, por lo que es esperada la pérdida de eficiencia de nuestro catalizador truncado, a pesar de las modificaciones realizadas.

Más aún, el hecho de que el anticuerpo deba ser generado contra una molécula similar, mas no idéntica, al estado de transición de la reacción, agrega una cierta laxitud en el contacto con la molécula real, culpable probablemente de la incapacidad del anticuerpo para aprovechar la posición de las cargas parciales para

disminuir las barreras energéticas, y obligándolo a valerse, únicamente, de fuerzas mecánicas para la obtención del confórmero deseado.

En el presente trabajo no hemos simplemente cuantificado el efecto de las mutaciones realizadas sobre un fragmento del anticuerpo catalítico 1F7, sino que hemos validado el método de la transferencia de energía por resonancia de fluorescencias para su uso en sucesivos esfuerzos por mejorar su actividad y estabilidad ante agregación y proteólisis, así como para conseguir los mismos fines en estudios relacionados.

Aunque existen pruebas más finas para la medición, que será necesario realizar en el futuro, los resultados obtenidos del presente análisis de los datos de fluorimetría resultan prometedores, en tanto que cumplen la hipótesis inicial del aumento de estabilidad en los sucesivos ciclos de evolución.

Aún así, resulta indispensable la realización de un análisis fluorimétrico más fino en proteína pura, que nos permita de forma dinámica rastrear los picos de absorción y emisión de energía, para evidenciar de manera más clara el proceso de resonancia entre las dos proteínas implicadas.

De otra manera, se hace necesaria la realización de experimentos para garantizar la equivalente expresión de las variantes en las distintas cepas (como el Western Blot), de tal modo que se tenga una medida también equivalente en los niveles de emisión de fluorescencia.

Para los efectos de este trabajo, me resulta tentador aventurar que los resultados serán, aunque más claros, muy similares en magnitudes relativas a los observados utilizando este sistema.

A pesar de la mejoría observada en los diferentes ciclos de evolución, es importante destacar que la eficiencia catalítica del dominio V_H del anticuerpo 1F7 es aún tan baja que resulta indetectable, o efectivamente nula. La única recuperación lograda hasta ahora, corresponde a las propiedades termodinámicas, muy probablemente dependientes de la cadena hidrofóbica expuesta, que originalmente se encontraba ligada al correspondiente dominio en la cadena ligera.

Según la localización de los residuos mutados se confirma lo anterior, encontrándose las variaciones en dichos residuos en los ciclos de evolución más avanzados.

Curiosamente, los cambios en estos sitios no coinciden con aquellos que permiten la independencia de las cadenas de inmunoglobulinas en la naturaleza, representadas en los camélidos.

Por otra parte, parece que la exposición de residuos básicos en sitios clave de la proteína, le permiten una mayor capacidad termodinámica, recordando que estas mutaciones se obtuvieron en un entorno oxidante.

Por todo lo anterior, es claro que sigue siendo necesario un tremendo avance en el desarrollo de los diferentes V_H o, en determinado caso, un replanteamiento de los alcances de continuar por esta vía, ponderando la posibilidad de haber llegado a un punto de quiebre en la estabilidad termodinámica en el hecho mismo de la partición de las moléculas de scFv.

Una posible solución al problema de la actividad se encuentra en la utilización de fragmentos más grandes del anticuerpo, en los que la actividad es detectable (en sentido de la capacidad de unirse al hapteno; Tang 1996), y complementar un análisis similar al presentado en este trabajo con ensayos de cinética enzimática que muestren la actividad en función del aumento en la estabilidad.

Es probable que obteniendo un scFv de 1F7 más eficiente que los observados hasta ahora, se puedan salvar los problemas de la actividad y la estabilidad, sin incurrir en aquellos debidos al tamaño de la inmunoglobulina completa. Siendo este el caso, la búsqueda sería claramente paralela a la de Tang (1996), para el mejoramiento de los conectores entre V_H y V_L , aunque quizá resultaría mucho más vasta si se le conjuntara con la evolución dirigida del producto, o de cada una de las cadenas por separado.

En un análisis como este, el uso de FRET podría resultar igualmente de gran utilidad.

Apéndices

Apéndice I

Construcción de BFP con conector:

Para la construcción de BFP se utilizó mutagénesis dirigida sobre el templado de GFP utilizando los oligos extremos BFP Nde (CCGCCCATATGGCTAGCAAAGGAGAAGAA) y BFP Xho (CCGGATCCTCTGGGGACGCTCGAGCCTCCGGATTTGTACAGTTCATCCATGCC) y los oligos interiores mutagénicos BFP back (AACGGGAAAAGCATTGAACACCATGGGAGAAAGTAGTACTAG) y BFP fwd (CACTACTTTCTCCCATGGTGTTCATGCTTTTCCCGTT).

El sitio de restricción Nde I se agregó en el oligo BFP Nde.

Se realizaron cinco ciclos de PCR utilizando 50° C como temperatura de hibridación; una temperatura de hibridación de 55° C y un tiempo de elongación de un minuto por 25 ciclos. Se dio un tiempo final de elongación de 10 minutos.

Construcción de BFP sin conector:

Se utilizó como templado la BFP con conector generada previamente. Se sometió a PCR en las mismas condiciones anteriormente mencionadas, con el oligo BFPNde y un oligo modificado de BFP Xho, BFPstop (CTGTTTCCTGTGTGACTCGAGTTATTTGTACAGTTCATCCATGCC), que introduce un codón de paro en el conector.

Clonación de las variantes de VH:

Se diseñaron oligos que funcionaran para todas las variantes obtenidas de la evolución dirigida del VH del anticuerpo catalítico 1F7 (Osuna J, comunicación personal). Los oligos fueron llamados VH Xho (TCCGGAGCCTCGAGAGCCATGGACGTCAGCTCCAGCAGTCTGGA) y VH Nsi (TCCTTTGGATGCATTTCCGCCTGATCCTCCCTTACTAGTGGCCGTGACCAGAG).

GFPXHO:

CGAGCGTCCCCAGAGGATCCGGAAGTGGTACCAATGCATCCAAAGGAGAAGAAGTCTTC

Apéndice II (Western Blot)

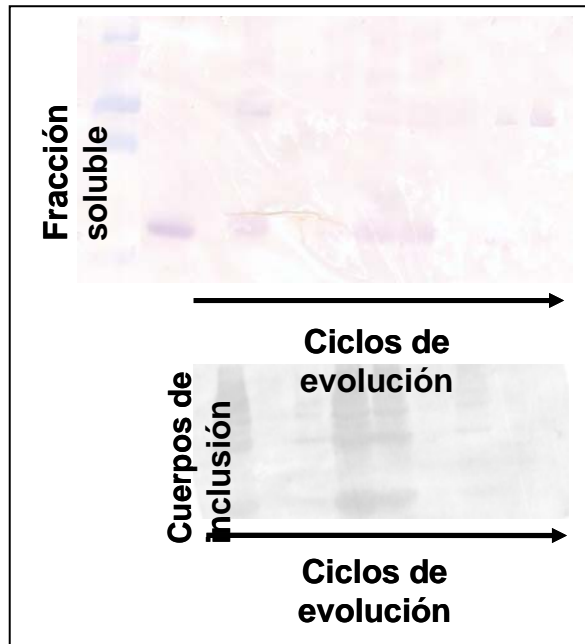
En vista de los resultados obtenidos, y en fechas cercanas al término de este trabajo, decidimos realizar una prueba que nos permitiera comparar los niveles de expresión de las construcciones que habíamos obtenido previamente, y más aún, si la presencia del fragmento VH en la construcción triple era causante de la probable agregación de la poliproteína.

Con esto en mente, condujimos un breve ensayo de Western Blot, utilizando como antígeno primario a las proteínas fluorescentes.

Los anticuerpos primarios no fueron dirigidos contra los fragmentos VH porque éstos podían encontrarse proteolisados o desnaturalizados, y sería imposible discernir entre estas dos condiciones al obtener un resultado negativo. Las proteínas fluorescentes, por el contrario, al ser mucho más estables, tienen una mayor probabilidad de encontrarse en configuración nativa, y el discernimiento entre las dos condiciones del VH (en caso de que no resultara estable) sería evidenciado por el tamaño del fragmento en la membrana.

Fueron separados, además, las fracciones soluble y no soluble del extracto, de tal modo que cubriéramos también la posibilidad de una agregación de la construcción completa.

Aunque los resultados, presentados a continuación, no son perfectamente concluyentes, nos permiten discernir un patrón de estabilidad correspondiente a nuestra hipótesis original.



Lo que se presenta en las fotos son las membranas obtenidas del Inmunoblot tanto de la fracción soluble como de los cuerpos de inclusión. Es importante aclarar, que en el extremo derecho de la membrana se encuentran dos variantes, llamadas arbitrariamente 4.2 y EQVR3 (siendo esta última la de la extrema derecha) que no fueron contempladas para el análisis por FRET, pero que corresponden, la primera al cuarto ciclo de barajeo de genes, y la segunda a un acercamiento racional realizado sobre la variante 3.3 mencionada anteriormente.

Aunque, como ya se mencionó, las imágenes no resultan muy claras, es evidente que las dos columnas de la extrema derecha presentan una señal mucho mayor en el peso molecular deseado de la fracción soluble, y mucha menor señal en cuerpos de inclusión.

Variantes menos evolucionadas se encuentran representadas, en algunos casos, en el peso molecular de GFP y BFP, lo que significa una proteólisis del VH. Es también claro que la señal en cuerpos de inclusión aumenta discontinuamente con la cercanía a la versión wt.

Con la evidencia obtenida por este enfoque, suponemos que la evolución permite un efectivo aumento en la estabilidad de los VHs, indicando que el acercamiento no racional al mejoramiento de estas proteínas es acertado.

Referencias:

Barondeau, DP, Kassmann, CJ, Tainer, JA, Getzoff, ED. THE CASE OF THE MISSING RING: RADICAL CLEAVAGE OF A CARBON-CARBON BOND AND IMPLICATIONS FOR GFP CHROMOPHORE BIOSYNTHESIS *J.Am.Chem.Soc.* 2007. 129(11):3118-26.

Bruce Alberts, Dennis Bray, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, James D. Watson. *MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL*. Garland Pub, 3rd edition. 1994

Eijsink VGH, Gåseidnes S, Borchert TV, van den Burg B. DIRECTED EVOLUTION OF ENZYME STABILITY. *Biomol. Eng.* 2005. 22 (1-3): 21-30

George T. Hanson, Tim McAnaney, Eun Sun Park, Marla E. P. Rendell, Daniel K. Yarbrough, Shaoyou Chu, Lixuan Xi, Steven G. Boxer, Marshall H. Montrose, and S. James Remington. GREEN FLUORESCENT PROTEIN VARIANTS AS RATIO-METRIC DUAL EMISSION PH SENSORS. 1. STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND PRELIMINARY APPLICATION. *Biochemistry.* 2002. 41, 15477-15488

H Zhao and F H Arnold. OPTIMIZATION OF DNA SHUFFLING FOR HIGH FIDELITY RECOMBINATION. *Nucleic Acids Res.* 1997. 25(6): 1307-1308

Haynes MR, Stura EA, Hilvert D, Wilson IA. ROUTES TO CATALYSIS: STRUCTURE OF A CATALYTIC ANTIBODY AND COMPARISON WITH ITS NATURAL COUNTERPART. *Science.* 1994. 263(5147):646-52.

Heyduk T. MEASURING PROTEIN CONFORMATIONAL CHANGES BY FRET/LRET. *Curr Opin Biotechnol.* 2002. 13(4):292-6.

Hilvert D, Carpenter SH, Nared KD, Auditor MT. CATALYSIS OF CONCERTED REACTIONS BY ANTIBODIES: THE CLAISEN REARRANGEMENT. *PNAS.* 1988. 85(14).

Hilvert, D. CRITICAL ANALYSIS OF ANTIBODY CATALYSIS. *Annu. Rev. Biochem.* 2000. 69:751-93.

Jiang L, Althoff EA, Clemente FR, Doyle L, Röthlisberger D, Zanghellini A, Gallaher JL, Betker JL, Tanaka F, Barbas CF 3rd, Hilvert D, Houk KN, Stoddard BL, Baker D. DE NOVO COMPUTATIONAL DESIGN OF RETRO-ALDOL ENZYMES. *Science.* 2008. 319(5868).

McAnaney TB, Park ES, Hanson GT, Remington SJ, Boxer SG. GREEN FLUORESCENT PROTEIN VARIANTS AS RATIOMETRIC DUAL EMISSION PH SENSORS. 2. EXCITED-STATE DYNAMICS. *Biochemistry*. 2002. 41(52):15489-94.

Morett E, Korbelt JO, Rajan E, Saab-Rincon G, Olvera L, Olvera M, Schmidt S, Snel B, Bork P. SYSTEMATIC DISCOVERY OF ANALOGOUS ENZYMES IN THIAMIN BIOSYNTHESIS. *Nat Biotechnol*. 2003. 21(7):790-5.

Otten LG, Quax WJ. DIRECTED EVOLUTION: SELECTING TODAY'S BIOCATALYSTS. *Biomol Eng*. 2005. 22(1-3):1-9

Philipps B, Hennecke J, Glockshuber R. FRET-BASED IN VIVO SCREENING FOR PROTEIN FOLDING AND INCREASED PROTEIN STABILITY; *J Mol Biol*. 2003. 14;327(1):239-49.

Piehler J. NEW METHODOLOGIES FOR MEASURING PROTEIN INTERACTIONS IN VIVO AND IN VITRO. *Curr Op Struc Biol*. 2005. 15:4-14.

Remington SJ. STRUCTURAL BASIS FOR UNDERSTANDING SPECTRAL VARIATIONS IN GREEN FLUORESCENT PROTEIN. *Methods Enzymol*. 2000; 305:196-211.

S. Marti, J. Andres, E. Silla, V. Moliner, I. Tunon, J. Bertran. COMPUTER-AIDED RATIONAL DESIGN OF CATALYTIC ANTIBODIES: THE 1F7 CASE. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2007. 46(1-2):286-90.

Strajbl, M., Shurki, A., Kato, M. & Warshel, A. APPARENT NAC EFFECT IN CHORISMATE MUTASE REFLECTS ELECTROSTATIC TRANSITION STATE STABILIZATION. *J. Am. Chem. Soc*. 2003. 125(34):10228-37.

Tang Y, Jiang N, Parakh C, Hilvert D. SELECTION OF LINKERS FOR A CATALYTIC SINGLE-CHAIN ANTIBODY USING PHAGE DISPLAY TECHNOLOGY. *J Biol Chem*. 1996. 271(26):15682-6.

Waldo GS, Standish BM, Berendzen J, Terwilliger, TC RAPID PROTEIN-FOLDING ASSAY USING GREEN FLUORESCENT PROTEIN. *Nature Biotechnol*. 1999. 17, 691-695.

Wood TI, Barondeau DP, Hitomi C, Kassmann CJ, Tainer JA, Getzoff ED. DEFINING THE ROLE OF ARGININE 96 IN GREEN FLUORESCENT PROTEIN FLUOROPHORE BIOSYNTHESIS. *Biochemistry*. 2005. 44(49):16211-20.

Yuan L, Kurek I, English J, Keenan R. LABORATORY-DIRECTED PROTEIN EVOLUTION. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005. 69(3): 373-392.

Zhang X, Bruice T. THE PROFICIENCY OF A THERMOPHILIC CHORISMATE MUTASE ENZYME IS SOLELY THROUGH AN ENTROPIC ADVANTAGE IN THE ENZYME REACTION; *PNAS* 2005. 102(51): 18356-18360