



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTILÁN

**CLONACIÓN Y EXPRESIÓN DE LA REGIÓN AMINO
TERMINAL, AMINOÁCIDOS 1-16 Y EN SU COMBINACIÓN
ALEATORIA, DEL PÉPTIDO BETA AMILOIDE EN
SUPERFICIE DE FAGO M13**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA:

CARLOS JORGE FUENTES MIRANDA

ASESOR: DR. KAREN MANUCHARYAN AIRAPETIEAN

CUAUTILÁN IZCALLI, EDO. DE MÉX.

2005



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Clonación y expresión de la región amino terminal, aminoácidos
1-16 y en su combinación aleatoria, del péptido Beta amiloide
en superficie de fago M13.

que presenta el pasante: Carlos Jorge Fuentes Miranda
con número de cuenta: 9601595-1 para obtener el título de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 25 de Febrero de 2005

PRESIDENTE	<u>Dra. Gilda Flores Rosales</u>	
VOCAL	<u>Dra. Luisa Martínez Aguilar</u>	
SECRETARIO	<u>Dr. Karen Manucharyan Airapetian</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Ma. Esther Revuelta Miranda</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>QFB. Juan Chiu Chan</u>	

Agradecimientos

Primero quiero agradecer a las personas que siempre serán muy importantes en mi vida, mis padres Carlos Fuentes Ramírez y Teresa Miranda Pineda por sus enseñanzas, el apoyo y la gran paciencia que han tenido conmigo a lo largo de mi vida, por ese gran esfuerzo que hicieron en apoyarme en la realización de uno pero el más importante de mis sueños y no por este trabajo si no por lo que significa, porque con esto espero abrirme paso en el mundo esperando jamás defraudarlos y a mis hermanos Fabián, Claudia, Laura y Teresa por ser mis principales amigos incondicionales.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán por darme la oportunidad de adquirir los conocimientos necesarios para convertirme en un profesionista.

Al Dr. Karen Manucharyan por permitirme participar en un proyecto de investigación y poder desarrollar mi tesis, a la M. en C. Maria Elena Munguia por el tiempo que dedico en enseñarme las técnicas experimentales para el desarrollo de este trabajo, Al Dr. Gonzalo por las muchas veces que me asesoro cuando lo necesitaba y a mis compañeros de laboratorio Rodrigo, Jessica, Gilda, Marcia, Jorge, Claudia, Carmen, Alejandra, Carlos y Cesar por el ambiente de trabajo tan agradable que lograron.

A la M. en C. Andrea Becerril Osnaya y a los sinodales, a la Dra. Luisa Martínez Aguilar, y al QFB. Juan Chiu Chan por su tiempo en revisar este trabajo, a la QFB. Maria Ester Revuelta Miranda por ser una luz cuando sólo veía en el camino oscuridad y en especial mi más sincero agradecimiento a la Dra. Gilda Flores Rosales por dedicar su tiempo a revisar, corregir este trabajo y rechazar el anterior porque de esta experiencia aprendí más de lo que hubiera imaginado.

A mis amigos(as) de la Universidad autodenominados la prángana Edgardo, Fernando, Dante, Alfonso, Gilberto, Luis, Teresa, Ángeles, José Luis, Nora, Claudia y en especial a mis más apreciados amigos(as) Daniel, Eduardo, Andrea, Aidé y Karla por brindar su amistad, apoyo y comprensión, además por los ratos tan agradables y algunas cuantas horas dedicadas sólo ha estudiar, y porque gracia a ustedes adquirí experiencias, conocimiento y humildad que lograron mejorar y enriquecer mi vida.

Finalmente me gustaría agradecer a todos compartiendo un pensamiento:

Si ya todos fuésemos "casi" perfectos, entonces cuáles serían la motivación y las razones para estudiar, leer, investigar, analizar, ejercitarnos, profundizar y esforzarnos en la búsqueda de procesos de mejoramiento, superación, crecimiento espiritual y similares.

(Nelson Tobon López)

Índice

Lista de abreviaturas	i
Índice de tablas y figuras	ii
Resumen	iii
Introducción	1
1. Enfermedad de alzheimer	2
1.1. Genes y Proteínas relacionadas con la EA	3
1.1.1. Proteína precursora de la amiloide	3
1.1.1.1. Procesamiento de la PPA	4
1.1.1.2. Péptido βA	5
1.1.2. Proteína tau	6
1.1.3. Apolipoproteína E	7
1.1.4. Presenilinas 1 y 2	8
1.2. Factores que intervienen en la agregación del péptido βA	9
1.3. Mecanismos que originan las lesiones en el cerebro	10
1.4. Tratamientos para la EA	12
1.5. Estrategias consideradas para el tratamiento de la EA	13
1.6. Métodos alternativos de vacunación	15
2. Tecnología de despliegue en fagos	15
2.1. Bacteriófagos filamentosos empleados en la tecnología de despliegue en fagos	16
2.2. Estructura de los bacteriófagos filamentosos	16

2.3. Genoma de los bacteriófagos filamentosos -----	17
2.4 Replicación de los bacteriófagos filamentosos -----	18
2.5. Método de despliegue en fagos -----	20
2.6. Vectores genéticos -----	22
2.7. Fago ayudante -----	26
2.8. Clasificación de los vectores utilizados en la tecnología de despliegue en fagos -----	27
2.9. Ventajas y desventajas de la tecnología de despliegue en fagos ---	28
2.10. Usos de la tecnología de despliegue en fagos -----	29
3. Justificación -----	31
4. Objetivo general -----	32
4.1 Objetivos particulares -----	32
5. Esquema experimental -----	33
6. Materiales -----	34
7. Métodos -----	36
7.1. Diseño de los oligonucleótidos para la secuenciación de DNA que codifica los péptidos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc -----	36
7.2. Obtención del DNA de doble cadena que codifica para los péptidos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc -----	36
7.3. Reacción de ligación de los DNAs exógenos al vector pCANTAB 5E -----	37
7.4. Obtención de las transformantes βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc -----	37
7.5. Confirmación de la clonación correcta de los insertos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc por PCR -----	38

7.6. Confirmación de la clonación correcta mediante la secuenciación de los insertos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc -----	40
7.7. Obtención de los fagos recombinantes βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc -----	42
7.8. Determinación de la especificidad de los péptidos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc expresados en fagos recombinantes M13 hacia Anticuerpos anti βA_{1-42} -----	43
8. Resultados -----	45
8.1. Confirmación de la clonación correcta de los insertos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc -----	46
8.2. Confirmación de la expresión de los péptidos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc y deterrminación de la capacidad de unión hacia anticuerpos anti βA_{1-42} presentes en suero de ratón hiperimmune ----	48
9. Discusión -----	50
10. Conclusiones -----	54
11. Bibliografía -----	55
Glosario -----	60
Apéndice -----	62
Mapa de restricción del vector pCANTAB 5 E -----	62
Ligación de los DNAs exógenos -----	63
Determinación de la especificidad de unión de los péptidos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc hacia anticuerpos anti βA_{1-42} mediante el empleo de la técnica de ELISA -----	64
Eventos que participan en la cascada amiloide -----	65
Enzimas de restricción -----	66
PCR (fundamento) -----	68
Método de secuenciación basada en el uso de terminadores (fundamento) -----	68
ELISA (fundamento) -----	69

Lista de Abreviaturas

APP	Proteína precursora del amiloide
ABTS	[2,2-azino-di (3-etil-benzo-tiazolina-6-sulfonato)]
BSA	Albúmina de suero de bovino (del ingles bovine surum albumin)
cDNA	DNA complementario
cols	colaboradores
dATP	Desoxi adenosina trifosfato
ddATP	Didesoxi adenosina trifosfato
ddCTP	Didesoxi citidina trifosfato
ddGTP	Didesoxi guanosina trifosfato
ddTTP	Didesoxi timidina trifosfato
dNTPs	Desoxi nucleotido trifosfato
DO	Densidad optica
EA	Enfermedad de alzheimer
ELISA	Análisis Inmunsorbente Ligado a la enzima(del ingles Enzyme-Linked Inmunsorbente Assay)
EpoE	Apolipoproteína E
fβA	Fago que expresa el péptido beta amiloide 1-16
fSc	Fago que expresa el péptido beta amiloide 1-16 en su combinación aleatoria
fβAEFRH	Fago que expresa la región beta amiloide 3-6 del péptido βA.
HRP	peroxidasa de rábano
kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
Lb	Medio luria
Ori	Origen de replicación
pb	pares de bases
PBS	Solución buffer de fosfatos
PS1	Presenilina 1
PS2	presenilina 2
PS	Señal de empaquetamiento
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PHF	Filamentos helicoidales emparejados de proteína tau
rpm	revoluciones por minuto
Sc	Scrambled
Rf	Forma replicativa
UV	Luz ultravioleta
nm	nanómetros
μg	microgramo
μl	microlitro
βA	Péptido beta amiloide de 40-42 aminoácidos
βA ₁₋₄₂	Péptido beta amiloide de 42 aminoácidos
Sc	Combinación aleatoria (scrambled)
MD	Milidalton

Índice de tablas y figuras

pag.

Tabla 1	Lista de medios de cultivo y sus componentes utilizados -----	34
Tabla 2	Lista de reactivos y sus componentes utilizados -----	35
Tabla 3	Secuencia de los insertos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc-----	48
Grafico 1	Determinación de la capacidad de unión de los péptidos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc hacia anticuerpos anti βA_{1-42} presentes en suero de ratón hiperinmune -----	49
Figura 1	Procesamiento de la proteína precursora del amiloide -----	5
Figura 2	Representación de la estructura del fago M13 ampliamente utilizado como vehículo en la tecnología de despliegue en fagos -----	17
Figura 3	Genoma de los bacteriófagos filamentosos -----	18
Figura 4	Pasos para la obtención de fagos recombinantes -----	21
Figura 5	Representación del genoma del fagómido pCANTAB 5 E-----	25
Figura 6	DNAs obtenidos de la hibridación de los oligonucleótidos -----	46
Figura 7	Migración por electroforesis en gel de TBE 1%- agarosa 1.5% de los DNAs βA_{1-16} (βA) y βA_{1-16} Sc amplificados por PCR y teñidos con bromuro de etidio e iluminación UV -----	47

Resumen

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a millones de personas en edades superiores a los 65 años y para la cual no existe un tratamiento que lleve a su recuperación.

A pesar de los avances que se tienen en el estudio de la EA todavía no se tiene una explicación de sus inicios, aun cuando se conocen los mecanismos que intervienen en la enfermedad, ya que en la mayoría de los casos se presenta de forma esporádica. Sin embargo se ha establecido que la formación de placas neuríticas debido a la agregación del péptido βA , un componente que se encuentra libre en el plasma y el líquido cefalorraquídeo, constituye una de las primeras causas que conducen a la degeneración neuronal.

Se ha propuesto que la inmunoterapia representa una estrategia que puede ser usada para prevenir y/o tratar la EA, para esto se ha considerado la selección cuidadosa de antígenos, ya sea para ser usados como inmunogenos en la vacunación o para la búsqueda de anticuerpos que tengan una alta afinidad a sitios esenciales en el mecanismo de la agregación del péptido βA y evitar la formación de las fibrillas amiloides.

En el presente trabajo reportamos la construcción de dos fagos recombinantes que expresan en su proteína de superficie proteína pIII, la región amino terminal del péptido βA_{1-42} considerada como una de las regiones que contienen sitios que participan en la agregación y la formación de fibrillas. Los péptidos de la región amino terminal expresados en la superficie del fago están formados por los aminoácidos, DAEFRHDSGYEVHHQK (βA_{1-16}) y una versión en combinación aleatoria del fragmento βA_{1-16} (ARSDEVDFQHGHYKEH) que denominamos βA_{1-16} Sc.

La expresión de los péptidos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc en superficie de fago M13, se realizó mediante la inserción de los fragmentos de DNA que codifican para los

péptidos ya mencionados, en el vector pCANTAB 5 E, y su posterior recuperación en fagos recombinantes mediante la infección de las transformantes con fago ayudante M13K07. Los fagos recombinantes purificados f β A1y fSc1 se probaron con ELISA y se encontró que el fago f β A1 tiene una alta capacidad de unión a anticuerpos anti β A₁₋₄₂ presentes en el suero de ratón hiperinmune, mientras que el fago fSc1 resultó negativo a la prueba.

Los fagos recombinantes que expresaron la región β A₁₋₁₆ y que resultaron positivas en la prueba de ELISA, pueden ser usados en el desarrollo de vacunas o búsqueda de anticuerpos que puedan ser usados en la inmunoterapia de EA.

Introducción

Se estima que en todo el mundo existen más de 18 000 000 de personas que presentan algún tipo de demencia (Menéndez, 2002) de las cuales 12 millones están afectadas por la enfermedad de Alzheimer (Zigmond y cols, 1999). El primer síntoma suele presentarse con la pérdida de memoria de comienzo sutil, seguida por un deterioro mental de progreso lento, desarrollo que se prolonga durante años (Padrón, 2002). Los pacientes afectados al perder el funcionamiento mental pierden la capacidad de cuidarse por sí mismo representando una carga muy grande para sus familias y para el sistema de salud.

En la actualidad la EA se ha convertido en un problema creciente en el orden médico, psiquiátrico, neurológico, epidemiológico, social y económico, particularmente en los países con una alta expectativa de vida (Menéndez y cols, 2002) por lo que con el propósito de entender los procesos implicados se han desarrollado modelos que reproduzcan la enfermedad, como los ratones transgénicos que albergan los transgenes PS1, APP y Tau, ya sea cargando uno, dos APP + PS1 (Arendas y cols, 2001) y PS1 + Tau y recientemente los tres 3XTgAD, APP + PS1 +Tau (Oddo y cols, 2003).

Todos los estudios relacionan a una variedad de factores implicados en lesionar progresivamente las neuronas como: los genéticos, la edad, cambios en las condiciones del entorno celular y la presencia de proteínas entre otros, pero en especial se acepta que la agregación y la formación de placas seniles por los depósitos del péptido β A en las neuronas son la causa de los cambios patológicos observados en el cerebro de los pacientes con la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, la única correlación establecida entre la intensidad de la enfermedad son las lesiones patológicas que se dan con la presencia de los ovillos neurofibrilares localizadas en el citoplasma neuronal y cuyo número está directamente relacionado con la severidad de la demencia (Menéndez y cols,

2002), daño que únicamente puede ser evaluado después de la autopsia (LeVine, 2004).

1. Enfermedad de Alzheimer

La enfermedad de Alzheimer se describió por primera vez en Alemania en 1907, por el profesor Aloir Alzheimer en una mujer de 55 años de edad (Padrón, 2002). La enfermedad puede definirse como un decremento progresivo de las funciones intelectuales, debido a una causa orgánica, que interfiere de modo considerable con las actividades del individuo afectado y que es incurable (Murria y cols, 2001).

La enfermedad de Alzheimer tiende a aumentar de manera directamente proporcional a la longevidad, la edad usual en que se presentan los primeros síntomas es alrededor de los 65 años, afectando al 7-10% (Hamdane y cols, 2003) de individuos en esa edad, y arriba del 40 % a personas mayores de 80 años de edad, pero puede aparecer a la edad de 40 años, donde el índice de sobrevivencia varía de 2 a 20 años después de su inicio (Murria y cols, 2001).

La enfermedad de Alzheimer se caracteriza por producir un proceso neurodegenerativo debido a la pérdida de células nerviosas en regiones del cerebro, por ejemplo, la corteza, el hipotálamo, el lóbulo temporal, el lóbulo parietal y estructuras circundantes, además de la pérdida de núcleos colinérgicos vinculados con el proceso de memoria, tales como hipocampo, partes adyacentes al lóbulo temporal y núcleo basal de Meynert (Brito y cols, 2001). La pérdida de la memoria constituye a menudo el primer signo, luego la enfermedad progresa inexorablemente, acompañándose con la reducción en la capacidad de la persona afectada de controlar sus emociones, coordinar su movimiento, reconocer errores y patrones, por lo que al final el paciente presentan una incapacidad total (Zigmond y cols, 1999; Murria y cols, 2001).

En general los cambios histológicos incluyen la presencia de placas neuríticas ó placas seniles, la acumulación intracelular de conglomerados neurofibrilares generados a partir de una forma hiperfosforilada de la proteína Tau y la pérdida de

células neuronales (Andorfer y cols, 2003). Acompañando estos cambios con la depleción en la funcionalidad de neurotransmitir debido a una reducción muy marcada en el reconocimiento de los neurotransmisores como: colina, noradrenalina y acetilcolina (Mulder y cols, 2000; Sambrook y Russell, 2001).

1.1. Genes y proteínas relacionadas con la enfermedad del Alzheimer

En etapas tempranas de la EA se ha identificado una base familiar que se hereda como un desorden autosómico dominante conectado a mutaciones en los genes que codifican para algunas proteínas, como la proteína precursora del amiloide (APP) localizada en el cromosoma 21 o en los genes que codifican para las proteínas presenilinas PS1 y PS2 localizadas en el cromosomas 14 y 1 respectivamente (Mulder y cols, 2000), mutaciones que en general resultan en un incremento del péptido amiloidogénico β A de 42 aminoácidos sobre el péptido de 40 aminoácidos (Sergeant y cols, 2003; LeVine, 2004). También se ha demostrado que el gen que codifica la Apolipoproteína E localizada en el cromosoma 19 es un gen propenso a mutaciones que puede retarda el inicio de la enfermedad (Murria y cols, 2001).

A pesar de las fuertes bases genéticas que intervienen en el desarrollo de la EA, debida a la acumulación del péptido β A, la forma más predominante en un 95% es la esporádica (LeVine, 2004; Sergeant, 2003).

1.1.1 Proteína precursora del amiloide

La proteína precursora del amiloide (PPA) es la principal proteína asociada con la enfermedad de Alzheimer, el primer hecho que involucró a la PPA y al cromosoma 21 partió de que los individuos con trisomía 21 (síndrome de Down) desarrollan rasgos clinicopatológicos de la enfermedad de Alzheimer, si estos vivían por encima de los 30 años. Estudios posteriores de las placas seniles encontradas en

estos individuos, demostraron que su principal constituyente era el péptido β A, el cual es un producto del metabolismo de la PPA (Menéndez y cols, 2002).

La PPA es una glicoproteína de membrana expresada en numerosas células y tejidos del organismo como son las plaquetas, células de endotelio vascular y esencialmente en todas las neuronas y en algunas astroglia y microglia, es codificada por un gen localizado en el cromosoma 21 el cual genera 8 isoformas (Menéndez y cols, 2002; Bayer y cols, 2001), pero las isoformas con 695, 751 y 770 aminoácidos son las más amiloidogénicas y liberan mucho más péptido β A₁₋₄₂. A pesar del tiempo que se lleva estudiando, aún se desconoce la función de la PPA en la célula, pero debido a que posee una estructura con rasgos similares a algunos receptores de la superficie celular se piensa que interviene como un receptor ligado a proteínas G, por medio de las cuales envía señales químicas al interior de la célula (Menéndez y cols, 2002).

También se sabe que la expresión de la PPA se ve aumentada durante fenómenos de estrés celular, incrementando la producción del péptido β A, aunque se desconocen los mecanismos que inducen este aumento o su relación con el desarrollo de la enfermedad (Hamdane y cols, 2003).

1.1.1.1. Procesamiento de la PPA

Una vez sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso, la PPA pasa por el aparato de Golgi donde se glicosila y empaqueta en vesículas de transporte, atraviesa el citoplasma y por último, se inserta en la membrana celular, allí es procesada mediante la acción de diversas proteasas, siguiendo 2 procesos. En lo que es la vía más común, una proteasa, conocida como α -secretasa, corta la PPA de manera que libera un fragmento extracelular soluble y grande (α -PPA); la parte que quedaria integrada en la membrana es un fragmento de 83 aminoácidos que es procesada después mediante la acción de una segunda enzima, γ -secretasa, que libera la parte carboxilo terminal de la proteína, posiblemente dentro de vesículas lisosomales para su posterior degradación, esta vía es conocida como

vía no amiloidogénica, porque la acción de la α -secretasa previene la formación del péptido β A de 40 aminoácidos y en especial el péptido de 42 aminoácidos, con lo que se impide la formación de depósitos. Sin embargo, una parte de la PPA es procesada de manera diferente, la vía amiloidogénica en la que otra secretasa, denominada β -secretasa, corta la PPA liberando un fragmento soluble (β -PPA) y dejando anclado a la membrana un segundo fragmento de 99 aminoácidos, que tras ser procesado por la γ -secretasa, libera el péptido β A de 40 o 42 aminoácidos. Este péptido tiene una solubilidad limitada y aparece fuera de la neurona, en el parénquima o espacio intersticial de la corteza cerebral, primero en moléculas sueltas, luego formando oligómeros, y más tarde en forma de fibrillas que se unen unas a otras formando las placas neuríticas (Mulder y cols, 2000; Menéndez y cols, 2002).

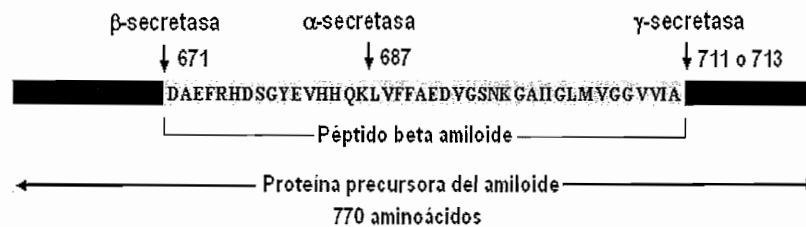


Figura 1. Procesamiento de la proteína precursora del amiloide.
(Modificación de Mulder C, Scheltens P, J Visser J, Kamp G y Schutgens R. 2000).

1.1.1.2. Péptido β A

Las placas seniles que se encuentran en el cerebro de los pacientes con enfermedad de Alzheimer, están formadas por depósitos extracelulares de filamentos del péptido β A asociados a células neuronales (Menéndez y cols, 2002).

El péptido β A es una molécula hidrofóbica presente en plasma y el líquido cefalorraquídeo, puede variar en cuanto a longitud desde 39 a 42 aminoácidos y un peso molecular de 4 a 6 kDa (Menéndez, 2002), cuya función en el organismo se desconoce. Inicialmente se asumió que el péptido β A únicamente se producía en situaciones patológicas, pero se ha demostrado que su producción y secreción es normal, ya que no se ha encontrado diferencias significativas en la concentración, entre pacientes con la EA y personas sanas (Horikoshi y cols, 2004), en la medición total del β A (β A₁₋₄₀ + β A₁₋₄₂), siendo difícil el diagnóstico de la EA (Mulder y cols, 2000).

Se señala que el aumento progresivo en la producción y el depósito del péptido β A, en especial el de 42 aminoácidos por ser más amiloidogénico ponen en marcha una serie de eventos que producen pérdida de tejido cerebral.

Los depósitos de péptido β A inicialmente corresponden mayoritariamente a la forma β A de 42 aminoácidos, aunque también se ha expuesto que más del 60% de todas las especies β A corresponde a especies trunca (Sergeant y cols, 2003) pero a medida que la enfermedad avanza, también se deposita β A de 40 aminoácidos. Recientemente se ha sugerido que las diferentes formas del péptido β A, monómeros, oligómeros y protofibrillas son las especies reactivas que causan la baja sináptica y la demencia asociada a la enfermedad. *In vitro* se demostraron que los oligómeros β A y protofibrillas son tóxicos para las células neuronales (Klein y cols, 2004).

1.1.2. Proteína Tau

Los ovillos neurofibrilares constituyen una de las características histológicas más importantes de la EA pero se considera que son resultado del daño infligido a la neurona por el péptido β A (Menéndez y cols, 2002), ya que no ha sido encontradas mutaciones en el gen que codifica para la proteína Tau en pacientes con EA (Andorfer y cols, 2003).

Los ovillos neurofibrilares son cúmulos de filamentos helicoidales emparejados encontrados en el citoplasma de las neuronas degeneradas, fundamentalmente constituidos de una proteína anormalmente fosforilada llamada Tau.

El gen que codifica para la proteína Tau se encuentra en el cromosoma 17 y produce un ARNm que al procesarse da lugar a hasta 6 isoformas diferentes (Menéndez y cols, 2002; Andorfer y cols, 2003). La proteína Tau tiene como función el facilitar la polimerización de la tubulina en la célula, de manera que se formen los microtúbulos. En los ovillos neurofibrilares la agregación de Tau se produce porque ésta sufre una fosforilación irreversible, que impide su función normal a la vez que facilita su autoagregación en fibrillas. El efecto de estos eventos es la alteración de la estructura de los microtúbulos, que junto con el empaquetamiento de la proteína Tau provoca afectaciones en el mecanismo de transporte neuronal. Como consecuencia de esto, la neurona no puede transmitir señales eléctricas (Menéndez y cols, 2002).

1.1.3. Apolipoproteína E

La Apolipoproteína E (Apo E) es una proteína plasmática formada por 299 aminoácidos y con un peso molecular de 35 kDa, presenta 2 dominios estructurales diferentes: 1) el amino terminal, es una estructura globular estable que contiene el receptor de unión a las células diana y 2) el carboxilo terminal, helicoidal, menos estable que contiene el sitio de unión a las lipoproteínas (Padrón y cols, 2002).

La Apolipoproteína E es sintetizada por el hígado y el cerebro, su principal función incluye la movilización y redistribución del colesterol y otros lípidos en los tejidos. Además tiene participación en la regeneración nerviosa, inmunorregulación y la activación de enzimas lipolíticas (Padrón y cols, 2002).

El gen de la Apolipoproteína E se localiza en el brazo largo del cromosoma 19, el cual codifica la síntesis en la población humana de una de las tres isoformas; ApoE2 que contiene cisteína en las posiciones 112 y 158, ApoE3 que contiene el

aminoácido cisterna en la posición 112 y arginina en la posición 158 y ApoE4 que contiene arginina en las posiciones 112 y 158 (Jordán y cols, 1998; Padrón y cols, 2002; Bentley y cols, 2002).

Se ha demostrado que el gen que codifica la Apolipoproteína es un gen propenso a mutaciones para el comienzo tardío de la enfermedad de Alzheimer; retarda el inicio de esta condición hasta por 20 años. Además se ha encontrado que aproximadamente un 40 - 50 % de todos los pacientes con EA cargan el alelo que codifica para la síntesis de la ApoE4 (Mulder y cols, 2000). Una posibilidad en relación a la enfermedad es la siguiente: algunos estudios han probado que las isoformas ApoE3 y ApoE2 forman complejos estables con el péptido β A (Bentley y cols, 2002), unión que sugiere puede jugar un rol protector contra la formación de agregados amiloides y/o contra su interacción a la membrana celular y su posterior eliminación, en tanto que con la isoforma ApoE4 no se forma tal complejo (Jordán y cols, 1998; Kourie y Henry, 2001). De esta manera se piensa que cuando la isoforma ApoE4 está presente, el péptido β A se encuentra libre para interactuar con otras moléculas lo que lleva a la formación de placas amiloides. También se ha sugerido que ApoE4 puede tener un efecto tóxico sobre las neuronas, ya que ha sido asociada con los microtúbulos, sugiriendo que puede promover la desestabilización neuronal, aunque no esta claro si induce apoptosis (Jordán, 1998).

1.1.4. Presenilinas 1 y 2

Las dos son proteínas que poseen ocho segmentos transmembranales (Song y cols, 1999) y presentan una homología entre ellas del 67%. El gen de la presenilina 1 (PS1) se encuentra en el cromosoma 14 y el gen de la presenilina 2 (PS2) se encuentra en el cromosoma 1. La PS1 contiene 467 aminoácidos y se expresa en diferentes regiones del cerebro, el músculo esquelético, el riñón, el páncreas, la placenta, el corazón y en las neuronas (Padrón y cols, 2001). La PS2 se localiza en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi (Mulder y cols. 2000) con los dominios hidrofílicos orientados hacia el citoplasma (Padrón y cols, 2001).

En las familias con la enfermedad de Alzheimer y que presentan mutaciones en el gen PS1, se ha encontrado que la edad media de comienzo es mucho más temprana (45 años, rango 29 y 62 años) y que las familias con mutaciones en el gen PS2 (52 años, rango entre 40 y 88 años).

Experimentos *in vivo* han sugerido que PS1 mutado altera el procesamiento proteolítico del la PPA favoreciendo la deposición del péptido β A de 42 aminoácidos y que PS2 mutado provoca también la misma situación, a través de un mecanismo común ha PS1 (Padrón y cols, 2002).

Se desconoce el mecanismo por el que las presenilinas ejercen su efecto en la EA, pero se considera que puedan estar involucradas de una forma indirecta en el transporte de proteínas solubles y proteínas unidas a membrana (Padrón y cols, 2001; Murria y cols, 2001). Además se ha llegado a especular que las presenilinas son requeridas como cofactores de la γ -secretasa y por tanto participan indirectamente en el procesamiento de la APP (Bayer y cols, 2001).

1.2. Factores que intervienen en la agregación del péptido β A

Existen algunos factores que pueden generar modificaciones en la estructura conformacional de las especies amiloides involucradas en la enfermedad de Alzheimer y ocasionar un aumento en su capacidad de agregación y formación de fibrillas, por lo que a continuación mencionaremos las que consideramos importantes.

Cambios de pH

El pH afecta la carga iónica de los aminoácidos en los péptidos, alterando la configuración de la molécula con aumento de la agregación y la formación de placas como por ejemplo, se ha reportado que la agregación del péptido β A₁₋₄₂ y la formación de placas ocurren más eficientemente a pH ácido que a pH neutro. Con

respecto a esto se ha observado que la formación de agregados de β A ocurre mucho más rápido en rangos de pH de 5 a 6 que a pH de 7.4 (Kourier y Henry, 2001).

Metales

También se han asociado metales en la enfermedad de Alzheimer como: Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Al^{3+} , ya que se ha comprobado que el péptido β A, tiene una alta afinidad por estos metales induciendo la precipitación. Por ejemplo, *in vitro* se ha demostrado que el Zn^{2+} a concentraciones fisiológicas induce una rápida precipitación del péptido β A (Kourier y Henry, 2001). También se ha encontrado que las placas seniles y los ovillos neurofibrilares obtenidas de pacientes con EA a menudo contienen grandes cantidades de Al^{3+} (Murria y cols, 2001).

Mutaciones

Se han encontrado que mutaciones en el péptido β A induce la formación de agregados y placas amiloide, por ejemplo cuando la posición 35 del péptido βA_{1-42} es ocupada por glutamina, serina, leucina o ácido glutámico en vez de metionina se reduce la tendencia a formar fibrillas amiloides (Kourier y Henry, 2001).

1.3. Mecanismos que originan las lesiones en el cerebro

Numerosas evidencias sugieren que el acúmulo gradual del péptido β A, βA_{1-42} en primer lugar, y más tarde βA_{1-40} (Mulder y cols, 2000), ponen en marcha una cadena compleja de eventos que desencadenan en la muerte de células neuronales y que en conjunto participan en la llamada la hipótesis de la cascada amiloide, ver apéndice, estos incluyen:

Respuesta inflamatoria

Se ha demostrado que los depósitos de β A desencadenan la reacción inflamatoria en el cerebro de pacientes con EA mediante: a) la producción de anticuerpos circulantes que se producen en respuesta a los acúmulos del péptido β A (Sergeant y cols, 2003), b) activación de la cascada del complemento que provoca la opsonización y el aumento de la permeabilidad de la membrana celular (Broytman y Malter, 2004), c) la activación de las microglías y astrocitos que resulta en la secreción de prostaglandinas, proteasas, proteínas de la fase aguda y diversas citóquinas proinflamatorias como el interferón gama ($\text{IFN-}\gamma$), factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$) y diversas interleucinas, entre las que se encuentran: IL-1, IL-2, IL-3 y L6 (Menéndez y cols, 2002; Sergeant y cols, 2003; Broytman y Malter, 2004) y d) la excesiva generación de radicales libres, especies de oxígeno reactivas y óxido nítrico (Broytman y Malter, 2004), en conjunto ocasionan el aumento del daño y la muerte de las células neuronales.

Alteración de la homeostasis neuronal y fosforilación anormal de Tau

Se sugieren que los elevados niveles de péptido β A extracelular en la EA alteran la homeostasis iónica neuronal (Brito y cols, 2001). En concordancia con esto se ha demostrado que a pH fisiológico algunas especies amiloides presentan la propiedad de formar distintos canales iónicos través de la membrana plasmática, dentro de los que se incluyen: el péptido βA_{1-40} , que forma canales de Ca^{2+} y grandes canales catiónicos multivalentes, el péptido βA_{1-42} forma canales catiónicos poco selectivos y al igual que el péptido βA_{25-35} (Kourie y Henry, 2001). Esta entrada desregulada de cationes en especial de Ca^{2+} puede conducir a una alteración en la actividad de cinasas/fosfatasa. Algunas proteínas cinasas, incluyendo aquéllas que participan en la fosforilación de la proteína Tau, son reguladas por los valores de Ca^{2+} ; así, el aumento de Ca^{2+} puede ocasionar una

hiperfosforilación de Tau y la formación de los filamentos helicoidales apareados, presentes en los conglomerados neurofibrilares (Murria y cols, 2001).

Apoptosis

Numerosos grupos han encontrado evidencia de que el proceso de apoptosis también influye en la neuropatología de EA. Al menos dos hipótesis han sido propuestas, la muerte celular por fragmentación de DNA y la aparición de señales tempranas apoptóticas. En la primera hipótesis la fragmentación de DNA puede ser causada por el daño oxidativo o autólisis postmortem.

La segunda hipótesis puede ser de particular interés, porque propone que la apoptosis no es absoluta y que únicamente son observadas señales tempranas apoptóticas en la EA. En numerosos estudios han reportado un incremento de la expresión de proteínas relacionadas con el ciclo celular. Esta reactivación del ciclo celular (salir de G_0 a G_1 con la expresión de ciclina D1) es uno de los pasos tempranos que conducen a la apoptosis. En la EA, este proceso apoptótico puede ser suspendido y en neuronas puede conducir a la fosforilación anormal de la proteína Tau, su agregación y la formación de ovillos neurofibrilares (Hamdane y cols, 2003).

1.4. Tratamientos para la EA

El tratamiento dirigido a los enfermos de Alzheimer a menudo permite la estabilización y la mejoría del funcionamiento cognitivo, e incluso la recuperación de las habilidades funcionales del paciente, cuando estos tratamientos se inician en las fases tempranas de la enfermedad (Llibre y Guerra, 1999).

Existen actualmente dos terapias farmacológicas ampliamente utilizadas para reducir el deterioro mental, éstas son:(a) el tratamientos con altas dosis de agentes antiinflamatorios, y (b) el uso de inhibidores de la acetilcolinesterasa, pero hasta hoy estos tratamientos tienen un beneficio limitado (Citron, 2004).

Inhibidote de la acetilcolinesterasa

Los inhibidores de la acetilcolinesterasa son en la actualidad las drogas más utilizadas en el tratamiento sintomático de la enfermedad de Alzheimer. La acetilcolina es sintetizada en neuronas presinápticas de su precursor colina, por la enzima colina acetiltransferasa.

El tratamiento colinérgico deriva de la demostración de que en la enfermedad existe una destrucción de neuronas colinérgicas, reducción de la actividad de la colina acetiltransferasa (Hume y Duchon, 1992) y de la síntesis de acetilcolina, y por tal un fuerte deterioro cognitivo del paciente. Por tal compensar el déficit colinérgico, inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa permite incrementar la concentración y duración de la acetilcolina en la sinapsis neuronal (Llibre y Guerra, 1999).

Antiinflamatorios

El tratamiento con medicamentos antiinflamatorios se basa en la propiedad de estos fármacos en interferir con la activación de las microglías y liberación de las citóquinas que resulta en la disminución de la inflamación causada por la respuesta de la fase aguda que ocurre durante la agregación y la formación de la placa seniles.

1.5. Estrategias consideradas para el tratamiento de la EA

Dentro de las estrategias en el tratamiento de la EA es la de promover la protección o reparación de las neuronas que son afectadas. Un mecanismo basado en la enfermedad pueden ser aprovechado, el cual han sido bien estudiado por más de 10 años, y se basa en la intervención del péptido βA . Dentro de las estrategias consideradas se tiene: el bloqueo de la agregación del péptido βA mediante el uso de fármacos que interfiera con la interacción βA - βA , la

modulación de la producción del péptido β A mediante la estimulación de la α -secretasa, la inhibición de γ -secretasa y la Inhibición de la β -secretasa, y la inmunoterapia anti β A, mediante inmunizaciones activas o pasivas (Citron 2004).

Pero hasta el momento la inmunoterapia que consiste en promover la respuesta inmune frente a un organismo o antígeno dañino al organismo, mediante la generación de anticuerpo, ha mostrado ser la mejor alternativa para prevenir y aclarar los depósitos del péptido β A en el cerebro y disminuir las manifestaciones clínicas en pacientes con EA, como por ejemplo; En estudios *in vitro* se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales son capaces de unirse al péptido β A humano y que no únicamente previenen la agregación del péptido β A, también resolubilizan las formas agregantes (Arendash y cols, 2001), y estudios *in vivo* han demostrado que las vacunaciones a largo plazo con péptido β A previene o reduce y revierte los depósitos de β A en cerebros de ratones transgénicos modelos de la EA. Además de la vacunación con el péptido β A humano, la administración de anticuerpos anti β A muestra una efectiva reducción de depósitos β A principalmente a través del aclaramiento de los depósitos β A por la activación de las microglías (Arendash, 2001; LeVine, 2004; Koller y cols, 2004; Citron, 2004).

También se ha demostrado que las inmunizaciones con el péptido β A pueden producir efectos adversos en el tratamiento en pacientes con la AE (Citron, 2004), ya que vacunaciones contra el péptido β A puede producir una excesiva estimulación del complemento, así como una reacción autoinmune contra APP, introduciendo el peligro de una extensión mayor del desorden. Una típica reacción autoinmune puede afectar cualquier órgano, pero en particular al cerebro produciendo meningitis, encefalitis y derrame cerebral (McGeer, P. y McGeer, A., 2003).

1.6. Métodos alternativos de vacunación

Han sido propuestos métodos alternativos de vacunación, estos incluyen la administración pasiva de anticuerpos o la vacunación con formas modificadas del péptido β A (McGeer, P. y McGeer, A., 2003).

Administración pasiva de anticuerpos

Dentro de esta propuesta se tiene el desarrollo de anticuerpos anti β A dirigidos a sitios esenciales en el mecanismo de la agregación y la formación de fibrillas amiloides, como los anticuerpos monoclonales el AMY-33, 6F/3D y 6C6 que reconocen epítopes entre los residuos 1-28, 8-17(Kourie y Henry, 2001) y 1-16 respectivamente, del péptido β A y que son capaces de prevenir la agregación (Sólomon y cols, 1997).

Vacunación con formas modificadas del péptido β A

Esta alternativa propone el desarrollo de formas modificadas del péptido β A que generen una gran respuesta inmunogénica. Como formas modificadas incluyen péptidos de β A truncados, β A unido a ligandos, oligómeros solubles de β A o DNA desnudo que codifique para la secuencia β A (McGeer, P. y McGeer A., 2003), como por ejemplo: las vacunas con las secuencias 3-6 (EFRH) (Frenkel y cols, 2000), 4-10 (FRHDSGY) y región central (Sergeant y cols, 2003), regiones que han demostrado remover los agregados de β A en cerebros de ratones transgénicos (Sergeant y cols, 2003).

2. Tecnología de despliegue en fagos

La tecnología de despliegue en fagos fue descrita por George P. Smith de la Universidad de Missouri en 1985, al emplear el fago filamentosos f1 (Manoutcharia y cols, 2001).

La tecnología de despliegue en fagos permite la clonación y expresión de un fragmento de DNA que codifique para algún péptido o proteína ajena al fago filamentoso, y que estará fusionada a una de las proteínas de superficie, donde en la mayoría de los casos, la exhibición no afectará la funcionalidad de las moléculas o la infectividad, aun cuando está expresadas en la región N-terminal de algunas de las proteínas de la cápside, esto resulta en el despliegue del péptido o proteína en el exterior del fago mientras que el DNA que codifica para la fusión reside dentro del mismo fago (Santamaría, 2003).

2.1. Bacteriófagos filamentosos empleados en la tecnología de despliegue en fagos

Entre los principales bacteriófagos filamentosos (Ff) usados, está el M13, fd y f1, los cuales infectan *Escherichia coli* a través del pili y a diferencia de los fagos líticos los Ff son virus que no matan a su anfitrión durante el proceso de infección (Sambrook y Russell, 2001; Bradbury y Marks, 2004), pero reduce su ritmo de crecimiento a la mitad (Perera y cols, 2002). Se sabe que hay una salida de aproximadamente 1000 partículas virales producidas en la primera generación después de la infección, y luego la bacteria produce cerca de 100 - 200 partículas por ml. Esto ocurre por muchas generaciones, resultando un título de 10^{11} a 10^{12} partículas por ml, proceso que la bacteria es capaz de tolerar bastante bien, continuando por lo tanto su desarrollo y su división (Barbas III y cols, 2000; Santamaría, 2003).

2.2. Estructura de los bacteriófagos filamentosos

Los bacteriófagos filamentosos del genero *inivirus* son un grupo de virus que contienen DNA circular de cadena sencilla envuelta en una cápside proteica con forma cilíndrica y larga. La partícula de Ff mide aproximadamente 6.5 nm de diámetro y 930 nm de largo, la masa de la partícula es aproximadamente de 16.3

MD, del cual el 87% está constituido por proteína. El genoma es una cadena sencilla de DNA covalentemente cerrada, con cerca de 6400 nucleótidos.

El DNA del Ff se encuentra empaquetado en un cilindro flexible de proteínas, que han sido denominadas: Proteína pVIII que es la principal proteína de la cápside con 2,700 copias por partícula de bacteriófago, las proteínas pVII y pIX, con cinco copias en uno de los dos extremos del bacteriófago y la proteína pIII y pVI con 4 o 5 copias, cada una expresadas en un extremo del bacteriófago (Barbas III y cols, 2000), figura 2.

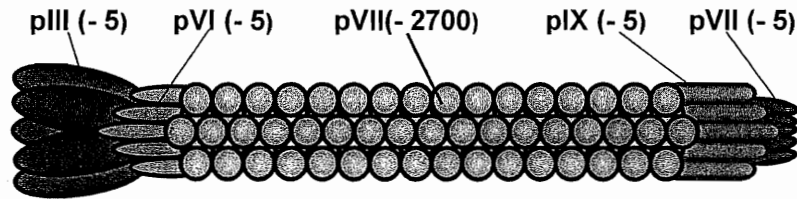


Figura 2. Representación de la estructura del fago M13, ampliamente utilizado como vehículo en la tecnología de despliegue en fago (William, W. 2002).

2.3. Genoma de los bacteriófagos filamentoso

El genoma de los 3 Ff más utilizados comparte una homología del 98%. Cada genoma codifica 11 genes, los genes II, V y X codifican las proteínas requeridas para la replicación del genoma del fago, los genes VIII, III, VI, VII y IX codifican las proteínas pVII, pIX, pVIII, pIII y pVI que forma la cápside, los genes I, IV y XI codifican las proteínas involucradas en la asociación a la membrana durante el ensamblaje del bacteriófago. También se encuentra una secuencia corta llamada región intergénica que no codifica para proteínas, ésta contiene los sitios de origen para la síntesis del DNA viral (+) y el DNA complementario (-). El DNA se encuentra orientado dentro del fago por una región de 78 nucleótidos conocida

como señal de empaquetamiento (PS), la cual siempre está localizada en el extremo del fago donde se encuentran las proteínas pVII y pIX , figura 3 (Barbas III y cols, 2000; Santamaría, 2003).

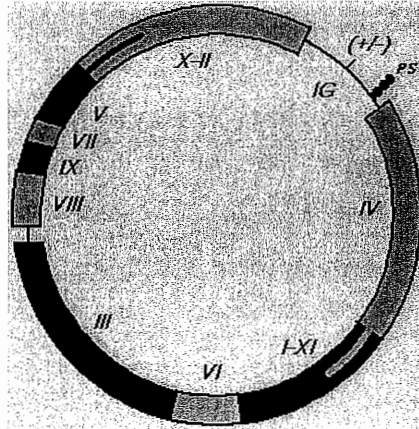


Figura 3. Genoma de los bacteriófagos filamentoso. (Barbas III C, Burton D, Scout J y Silverman G. 2001).

2.4. Replicación de los bacteriófagos filamentoso

Comienza por una etapa infectiva que requiere la presencia del pili en la célula receptora. El contacto con el pili y la absorción de la partícula viral son dirigidos por la proteína pIII. Durante el proceso de entrada, el genoma se separa de las proteínas de la cápside, ya en el interior celular, el genoma monocatenario hebra viral (+) es convertido en DNA de doble cadena mediante la síntesis de la hebra complementaria (-), esta síntesis tiene lugar a partir de una señal particular [ori (-)] presente en la región intergénica y es llevada a cabo por las enzimas replicativas de la bacteria (Perera y col, 2002). El producto final es un DNA de doble cadena superenrollado conocido como forma replicativa (RF) del fago. La transcripción se produce utilizando las enzimas del hospedador, donde la cadena (-) es el

templado para la síntesis del mRNA que produce todas las proteínas del fago (Perera y col, 2002; Barbas III y cols, 2000).

Una vez que el mRNA es traducido, la replicación del genoma viral tiene lugar a partir de la forma replicativa y comienza cuando una proteína codificada por el gen II introduce un corte en un sitio específico de la hebra (+) en el RF, conocido como ori (+) y localizado en la región intergénica, junto al ori (-). Posteriormente se cataliza la incorporación de nucleótidos al extremo 3'OH libre del corte, cuya elongación va acompañada del desplazamiento de la región 5' de la propia hebra (+) original, esta elongación continúa alrededor de toda la hebra (-), que actúa como molde del proceso de síntesis, hasta que se completa el círculo (círculo rodante), momento en el que el producto del gen II vuelve a cortar la cadena polinucleotídica y el complejo replicativo libera una copia monocatenaria y circular de la hebra (+), es decir, una molécula de DNA genómico del fago (Barbas III y cols, 2000; Perera y col, 2002).

La nueva copia de la hebra (+) es convertida en RF, con lo que durante los primeros 15 o 20 minutos después de la infección la amplificación del genoma viral se dispara exponencialmente; coincidiendo con la presencia de unas 100 o 200 copias de formas RF (Perera y col, 2002).

La síntesis del RF continúa hasta que la expresión simultánea de los genes virales han producido niveles suficientes de la proteína pV, para que, por un lado, inhiba la traducción del mRNA del gen II y, por otro los dímeros de pV se unan a las hebra (+) recientemente sintetizadas y prevenir su conversión a RF. Por lo tanto, la concentración adecuada de pV esencialmente da lugar al cambio de la replicación de DNA a la síntesis del DNA de cadena sencilla viral (+). El resultado de esta interacción es la formación de dímeros pV-DNA. El rol de PX en la replicación no está claro pero parece que funciona como un inhibidor de pII (Barbas III y cols, 2000).

Las únicas proteínas que residen en el citoplasma son pII, pX, y pV, que son las encargadas de la replicación del DNA, las demás proteínas se asocian a la

membrana. En la última fase del ciclo, el complejo formado por la hebra (+) y las copias de proteína pV asociadas, se mueven hasta la membrana celular, donde el orden del ensamblaje comienza con la incorporación de pXI, pVII y pVIII al reconocer el PS del genoma del fago en interacción directa con la proteína pl. Después el DNA del fago es recubierto en una progresiva reacción que sustituye al dímero pV por miles de copias de la proteína pVIII, proceso que termina con la adición de pIV y pIII.

Serie de pasos que ocurren cuando el DNA del fago filamentoso pasa a través del poro formado por las proteínas pl, pIV y pXI. La partícula viral así formada atraviesa la membrana y abandona la célula infectada sin alterar su morfología (Barbas III y cols, 2000; Perera y col, 2002).

2.5. Método de despliegue en fagos

El método consiste en incorporar un fragmento de DNA exógeno, el cual codifica el péptido o la proteína a ser exhibida, como un elemento adicional del genoma del vector, generalmente se inserta dentro de un gen que codifica para una de las proteínas de superficie del fago filamentoso, se inserta entre la secuencia señal de la proteína y la zona que codifica la región amino terminal de la proteína de superficie. Todas las proteínas de la envoltura del fago filamentoso pueden ser fusionadas a proteínas y péptidos extraños con diferente grado de éxito, pero las más utilizadas son pIII y pVIII.

Después de incorporar el DNA exógeno al vector, se introduce al hospedero bacteriano receptor, mediante un proceso denominado transformación. Este proceso permite que el vector lleve a cabo su replicación en función de la división celular de la célula bacteriana y obtener una gran cantidad de células portadoras del DNA recombinante. Finalmente el hospedero se infecta con un fago denominado fago ayudante (si es que se usó como vector un fagómido) que da lugar a la síntesis de todas las enzimas y proteínas necesarias para la replicación y encapsulación del genoma de fago. Al final se liberan los fagos

recombinantes que llevan el genoma del fagómido o del fago infectante y el péptido o proteína exhibida en una de las proteínas de superficie del mismo fago, figura 4.

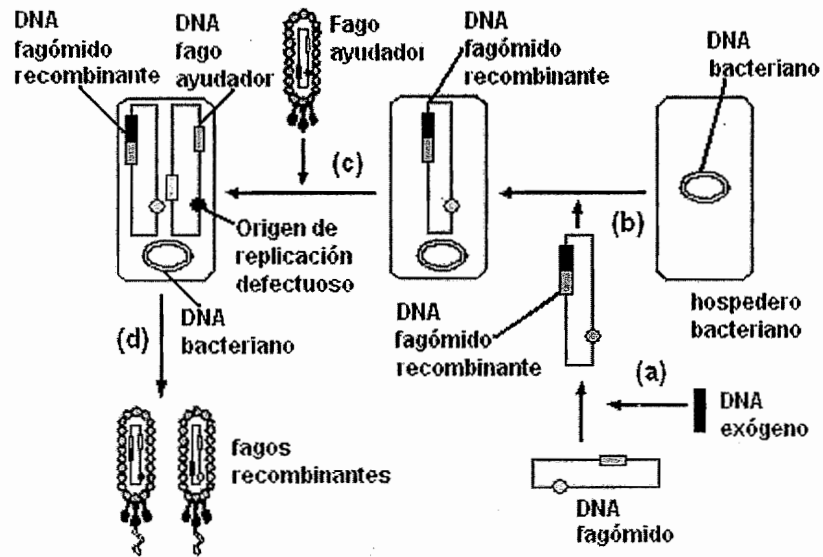


Figura 4. Pasos para la obtención de fagos recombinantes. Comienza con la inserción del DNA exógeno a un vector (DNA fagómido) (a), Después el DNA fagómido recombinante se introduce al interior de una célula bacteriana receptora (b), proceso que permite obtener un gran número de células bacterianas portadoras del vector recombinante. Luego se realiza el rescate de los fagómidos recombinantes infectando a la célula portadora del vector recombinante con fago ayudante (c) y finalmente son purificados los fagos (d).

2.6. Vectores genéticos

Un vector genético es una molécula de DNA con un origen de replicación autónomo del DNA cromosomal y que posee zonas de su genoma que no son esenciales para su multiplicación, donde pueden introducirse fragmentos de DNA exógeno. Estos vectores actúan como portadores de DNA, permitiendo la replicación del mismo en forma de una molécula híbrida vector-DNA exógeno, dentro de la célula hospedadora del vector.

DNA de fago

El genoma del bacteriófago λ es un DNA de doble cadena, con un tamaño aproximado de 50 Kb, que se extrae de la cápside viral como una molécula circular, debido a la existencia en sus extremos 5' de 12 nucleótidos protuberantes de cadena sencilla, complementarios, cuya hibridación permite la circularización de la molécula.

Si consideramos al DNA del fago como una molécula lineal, los genes requeridos para la síntesis de las proteínas estructurales del virus están localizados en la parte izquierda de la molécula, mientras que los genes requeridos para la replicación están confinados en la parte derecha, junto con los genes implicados en la lisis de la bacteria hospedadora. En la parte central se encuentran localizados aquellos genes que controlan funciones tales como recombinación o lisogenización que no son esenciales para el crecimiento lítico del fago.

La región central ha sido utilizada para remplazar el DNA correspondiente a esta zona por fragmentos exógenos de DNA que se pretenden clonar o para insertar dichos fragmentos. Estos fragmentos de DNA, una vez que se unen al DNA del fago, pueden ser introducidos en la cápside viral mediante un sistema de empaquetamiento *in vitro*. Se obtiene de esta manera un virus portador de algún fragmento exógeno de DNA. Estos vectores tienen la capacidad para insertos de hasta 20-25kb.

Plásmido

Los plásmidos son moléculas de DNA de doble cadena, circulares y covalentemente cerradas, que están presentes en algunas bacterias como elementos extracromosomales. El tamaño del plásmido es variable. El tamaño de los insertos que se pueden introducir oscila entre 5 y 10 Kb.

Un plásmido óptimo para ser utilizado como vector es aquel que:

- Confiere a la célula hospedadora resistencia a determinado antibiótico, lo que permite identificar fácilmente aquellas bacterias que no lo contienen.
- Posee secuencias de DNA con unas características tales que se pueden eliminar fragmentos de DNA para sustituirlos por insertos de DNA exógeno, sin que dicha sustitución afecte a sus características de replicación
- Posee un amplio espectro de secuencias de reconocimiento para enzimas de restricción.
- Los sitios de restricción se encuentran en el plásmido de tal manera que la inserción del DNA exógeno en cualquiera de ellos exprese un marcador fenotípico útil para su selección (Pellón, 1986).

Cósmidos

Es un tipo de vector genético que puede considerarse mezcla de los dos anteriores. Estos vectores poseen una molécula de DNA con los siguientes componentes: genes que confieren resistencia contra antibióticos, el origen de replicación de un plásmido, los extremos cohesivos del DNA del fago λ y secuencias de restricción donde pueden unirse los fragmentos de DNA exógeno que se pretenden clonar. La ventaja principal de estos vectores es que pueden ser de un tamaño tan pequeño como 5 kb, con lo cual tienen una capacidad para portar fragmentos de DNA exógeno de hasta 45 kb (Pellón, 1986).

Fagómidos

Los fagómidos, son simplemente pequeños plásmido que tienen una alta eficiencia de transformación (Sambrook y Russell, 2001). Su estructura básica comprende un origen de replicación plasmídico (ColE 1 ori), un origen de replicación derivado de fago filamentoso también llamado región intergénica (M13 ori), un marcador genético útil para su selección y propagación [genes de resistencia para algún antibiótico (Amp r)], uno o varios sitios únicos de clonaje. Aunado a esto muchos fagómidos utilizan el promotor lacZ (P lac) para controlar la expresión del DNA exógeno, expresión conseguida a través de la represión catabólica mediante la adición de glucosa (O'Brien y Ken, 2002). Su tamaño pequeño les otorga capacidad para transportar DNA exógeno de hasta 10 kb (Perera y cols, 2002).

Funcionalmente, los fagómidos son entidades complejas. En el interior de una célula, el vector y su recombinante funcionan como plásmidos normales, que se replican y reparten en el momento de la división celular de forma controlada, alcanzando un número de copias por célula que depende del replicón que contenga. Pero si la célula que lo alberga es infectada por un fago filamentoso adecuado (denominado fago ayudante), el modo de replicación del fagómido cambia como resultado de la presencia en la célula del producto de expresión del gen II (Proteína pII): esta proteína reconoce la secuencia ori (+) presente en la región intergénica del fagómido, produce un corte en el DNA y se inicia la replicación de éste según el modo de círculo rodante, de manera idéntica a la seguida, simultáneamente, por las moléculas bicatenarias de la RF del Ff M13. Finalmente, la célula exportará dos tipos de partículas de fago, de idéntica morfología externa pero que empaquetan distintas moléculas monohebra: el DNA genómico del fago ayudante o de la hebra del fagómido. Las moléculas que portan al fagómido son perfectamente infectivas y pueden infectar células susceptibles, donde vuelven a aparecer y a comportarse como plásmidos bacterianos (Perera y cols, 2002).

Fagómido pCANTAB 5E

Es un vector que incluye la región intergénica del fago M13 (ver apéndice). Utiliza como fago ayudante al mutante M13K07. Sus detalles más característicos son:

- Un tamaño de 4522pb.
- Un origen de replicación derivado de fago M13.
- Un gen que le confiere resistencia a ampicilina como marcador.
- Una región para controlar la expresión del DNA exógeno: promotor lacZ .
- La secuencia señal del gen que codifica para la proteína pIII seguida de un polilynker en la región inicial.
- El gen que codifica para la proteína pIII (fd gene 3), figura 5.

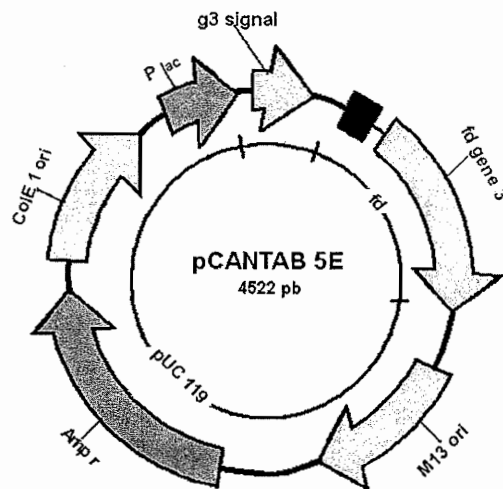


Figura 5. Representación del genoma del fagómido pCANTAB 5 E.

2.7. Fago ayudante

El fago ayudante, es un fago que tiene un origen de replicación defectuoso por lo que no es capaz de replicarse por si mismo (Barbas III y cols, 2000), pero si tiene todos los genes requeridos para proporcionar, tras su infección a la célula que alberga al fágomido, los componentes proteicos que permitan la replicación y ensamblaje de este último como fago filamentoso (Perera y cols, 2002).

Fago ayudante M13K07

Este fago ayudante tiene un tamaño de 8.7 kb y lleva una región intergénica muy poco activa (a causa de la inserción de un segmento de DNA en su interior) y, por tanto, deficientemente reconocida por la proteína del pII, por lo que el fago replica mal; tiene además el gen que confiere resistencia a kanamicina, como marcador y un origen de replicación plasmídico (derivado de p15A y, por tanto, compatible con ColE1 y con pMB1).

Cuando el genoma monocatenario de este fago aparece en la bacteria, primero es convertido a doble cadena de la RF, pero luego su replicación es mayoritariamente conducida por el origen plasmídico, mucho más eficaz que el viral. Este mecanismo no produce moléculas de DNA monocatenario y además es independiente de la proteína pII, cuyas copias atenderán preferentemente a la replicación del fágomido residente, por lo que la mayoría de las hebras (+) producidas derivarán del DNA del fágomido y no del fago ayudante en ocasiones, la relación será de 50 a 1.

El uso de este fago ayudante en la infección de bacterias portadoras de fágomido, reduce mucho los problemas derivados de la interferencia entre los mecanismos replicativos de ambas moléculas y produce una progenie de partículas que contienen el DNA del plásmido con un rendimiento muy satisfactorio de 1 a 5×10^{11} partículas por ml (Perera y cols, 2002).

2.8. Clasificación de los vectores utilizados en la tecnología de despliegue en fagos

Un problema que se puede presentar al expresar un péptido o proteína, en cada copia de pIII o pVIII, es la reducción de la infectividad o la reducción en la eficiencia de empaquetamiento del fago filamentoso, esto limita la capacidad de seleccionar la partícula viral en particular; este problema puede ser superado con la producción de fagos híbridos, los cuales expresen la proteína de interés en algunas de las copias de pIII o pVIII.

George Smith hizo una clasificación de los diferentes vectores utilizados en la técnica de despliegue en fagos, para lo que ha considerado: a) La proteína de superficie usada para la expresión de la proteína de interés, b) Si la proteína de interés va a ser expresada en todas las copias de pIII o pVIII, o únicamente en fracciones de ellas, y c) Si el gen para el péptido o proteína de interés estará codificada en el genoma del fago o en un genoma separado (en un vector fagómico).

En base a estas consideraciones, los vectores utilizados en la tecnología de despliegue en fagos se clasifican como de tipo: 3, 3+3, 33 cuando la proteína pIII va a ser usada para expresar la proteína o péptido de interés y de tipo, 8, 8+8, 88, cuando se usa la proteína pVIII.

Los vectores 3+3 y 8+8 son DNA fagómico que poseen los genes para la proteínas pIII o pVIII y el DNA exógeno que codifica la proteína o péptido de interés, donde el fago recombinante es recuperado al infectar con fago ayudante a bacterias transformadas con el vector fagómico. Como el fago ayudante tiene los genes de pIII y pVIII sin DNA exógeno, se obtienen fagos recombinantes que expresan la proteína o péptido exógeno en algunas copias de las proteínas pIII o pVIII según sea el caso.

Los vectores 33 y 88 son genomas de fagos que poseen los genes para las proteínas pIII o pVIII y genes para las proteínas pIII o pVIII junto con el DNA exógeno. Así expresan la proteína o péptido de interés en algunas copias de las proteínas pIII o pVIII.

Los vectores 3, 8 son genoma de fagos que poseen sólo los genes para las proteínas pIII y pVIII junto con el DNA exógeno, por lo que todas las copias que se expresan en el fago recombinante son de las proteínas pIII y pVIII que expresan la proteína o péptido de interés (Barbas III y cols, 2000).

2.9. Ventajas y desventajas de la tecnología de despliegue en fagos

El tamaño de los péptidos expresados en cada copia de pVIII está limitado de 6 a 8 aminoácidos, aunque algunas veces tiene fusionados péptidos mayores a 12 aminoácidos, pero se puede reducir la eficiencia de empaquetamiento del fago. Su ventaja radica en que las partículas de fago pueden presentar una gran cantidad de moléculas (Barbas III y cols, 2000; Manoucharia y cols, 2001).

El uso de la proteína pIII tiene la ventaja de poder presentar proteínas o péptidos largos. Su desventaja radica en que las partículas de fago sólo pueden presentar no más de 5 moléculas (Barbas III y cols, 2000; Manoucharia y cols, 2001).

Dentro de sus ventajas del uso de la tecnología de despliegue en fagos es que su manipulación *in vitro* o *in vivo*, permiten una rápida generación de péptidos exógenos expresadas en los fagos filamentosos con alta afinidad de unión a muy bajo costo y en poco tiempo de dos a tres semanas (Barbas III y cols, 2000).

La tecnología de despliegue en fagos permite expresar eficientemente en la superficie de un bacteriófago una gran variedad de moléculas (anticuerpos, enzimas, receptores de la superficie celular, etc.), las cuales además de conservar su capacidad de unión; se ha demostrado que algunas proteínas exhibidas en

fago también conservan sus actividades catalíticas, permitiendo explorar las relaciones de la estructura, el plegamiento y la función de las proteínas conduciendo a la oportunidad de diseñarlas y alterarlas para darles propiedades deseadas (Willats, 2002).

Las bibliotecas de péptidos y de fragmentos de anticuerpos (Fab y scFv) expresados al azar y ambas expresados en Ff puede llegar a tener una complejidad de hasta 10^{10} (Santamaría, 2003; Willats, 2002).

2.10. Uso de la tecnología de despliegue en fagos

Aunque el método en un principio se utilizó para exhibir anticuerpos (Bradbury y Marks, 2004), la tecnología ha sido utilizada para la generación de librerías de expresión de genes, para fragmentos DNA geonómicos y cDNAs, y exitosamente utilizados para mapeo de epitopes (Barbas III y cols, 2001), para optimizar la afinidad a algunas hormonas (Bradbury y Marks, 2004) y también para conocer la interacción proteína-proteína, proteína-DNA, enzima-sustrato y anticuerpo-antígeno (Barbas III y cols, 2001).

La tecnología ha mostrado tener un gran alcance para la selección de péptidos en base a la afinidad del reconocimiento molecular, por lo que su utilidad principal está en la generación rápida de bibliotecas de proteínas o de péptidos, principalmente para la selección de fragmentos de anticuerpos con alta afinidad y especificidad a los ligandos (Sambrook y Russell, 2001).

También mediante el uso de la tecnología de despliegue en fagos han sido aisladas algunas moléculas como: receptores de la superficie celular, proteínas de choque térmico, integrinas, factor de crecimiento del endotelio vascular, proteínas virales, proteínas de la superficie celular de protozoarios (Kay y cols, 2001) y de bacterias, entre otros (Melo y Mello, 2003).

En años recientes se ha utilizado el despliegue en fagos para la identificación de antígenos inmunogénicos que puedan ser aprovechados para el desarrollo de

vacunas (Hansen y cols, 2001). Además la técnica se ha utilizado para la identificación de epitopes de receptores bacterianos que puedan ser usados para el desarrollo y producción de anticuerpos (Jacobsson y cols, 2003; Hamdane y cols, 2003).

Mediante el uso de la tecnología de despliegue en fagos se ha descrito el desarrollo de vectores, que cargan genes terapéuticos, capaces de alcanzar específicamente células cancerosas y transferir los genes sin afectar a las células circundantes, *in vitro* (Mount y cols, 2004).

3. Justificación

Como se mencionó en un principio se acepta que el depósito del péptido β A constituye una de las primeras causas de la EA, y la mejor alternativa propuesta para prevenir o reducir y revertir los agregados, es el desarrollo de vacunas o anticuerpos en especial aquellos que estén dirigidos con una alta afinidad hacia sitios específicos y esenciales en el mecanismo de la agregación y la formación de fibrillas. Para esto se hace necesario el desarrollo de formas modificadas del péptido β A que puedan ser usadas como inmunógenos o para la búsqueda de anticuerpos con alta afinidad.

Una región considerada como un sitio esencial para la agregación y la formación de fibrillas, se encuentra presente entre los aminoácidos 1-16, por lo que es importante contar con una técnica que permita obtener el péptido con la misma reactividad a la molécula natural y principalmente que permita una rápida generación de este péptido en poco tiempo y a bajo costo.

Para cubrir este requisito se empleara una tecnología llamada despliegue en fagos, para lo que planteamos los siguientes objetivos.

4. Objetivo general

Construir fagos recombinantes que expresen en la proteína pIII de superficie, la región amino terminal, aminoácidos 1-16 (βA_{1-16}) y la región amino 1-16 en su combinación aleatoria (βA_{1-16} Sc) del péptido beta amiloide humano de 42 aminoácidos (βA_{1-42}).

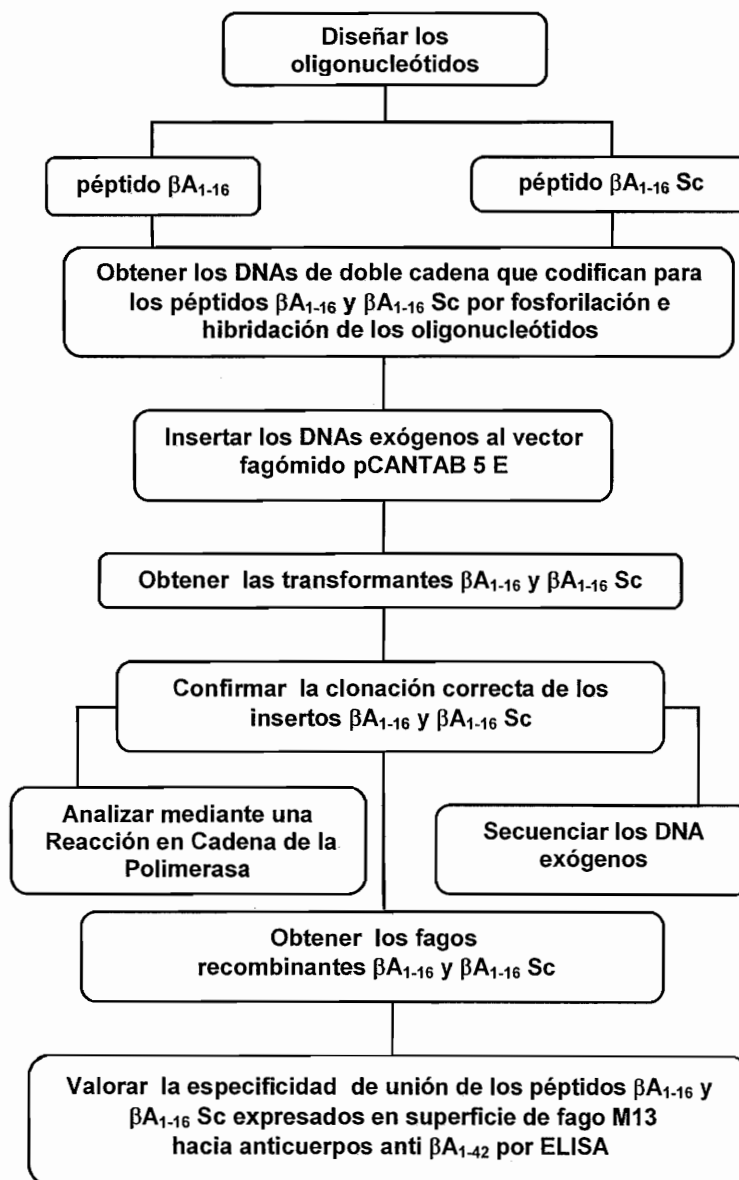
4.1. Objetivos particulares

Diseñar los oligonucleótidos para la secuencia de DNA que codifica la región amino terminal 1-16 (βA_{1-16}) y la región amino terminal 1-16 en su combinación aleatoria (βA_{1-16} Sc) del péptido beta amiloide humano.

Clonar los DNAs en un vector fagómico (pCANTAB 5 E) y expresar los péptidos en la proteína pIII de superficie del fago M13 y caracterizar las construcciones mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación de DNA.

Valorar la especificidad de unión de los péptidos, βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc expresados en superficie de fago M13, hacia anticuerpos anti βA_{1-42} presentes en suero de ratón hiperinmune por ELISA.

5. Esquema experimental



6. Materiales

Materiales

Vector pCANTAB 5 E (New England Biolabs)

T4 polinucleótido Kinasa terminal transferasa dNTPs (Gibco)

T4 DNA ligasa (New England Biolabs)

Taq DNA polimerasa (Alta enzima ibomol)

Fago helper M13K07 (Invitrogen, USA)

Quantum Prep Plasmad Miniprep Kit (Bio-Rad)

Sequenasa Quick-Denature Plasmad Sequencing Kit (USB)

Tabla 1. Lista de medios de cultivo y sus componentes utilizados

Medios	Componentes
LB-Agar	10 g de Bacto-triptona, 5 g de extracto de levadura, 5 g de NaCl y aforar a 1 Lt de agua mQ.
Medio Mínimo	0.3 g de Na ₂ HPO ₄ , 0.15 g de KH ₂ PO ₄ , 0.025 de NaCl, 0.05 g de NH ₄ Cl, 0.75g de select Agar y aforar a 50 ml de agua mQ. Después 80 µl de glucosa, 4 µl de vitamina B ₁₂ , 8 µl de MgSO ₄ 1M.
YT2X	8 g de péptona, 5 g de extracto de levadura.

Tabla 2. Lista de reactivos y sus componentes utilizados

Reactivos	Componentes
Colorante de carga para electroforesis	65%(w/v) sucrosa, 10mM Tris-HCl (pH 7.5), 10mM EDTA, 0.3% (w/v) azul de bromofenol
TBS	50mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl
PEG-NaCl	20% (w/v) polietilenglicol-8000, 2.5 M NaCl
TFB-1: 500 ml	30 mM acetato de calcio, 50 mM MnCl, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl ₂ , 15% glicerol. Ajustar el pH a 5.8 usando ácido acético
2.TFB-II: 500 ml	10 mM MoPS, 75 mM CaCl ₂ , 10 mM RbCl, 15% glicerol. Ajustar a pH a 7.0 con NaOH y esterilizar por filtración
Buffer de soporte 20X	216 g de tris base, 75 g Taurina, 4 g de Na EDTA.2H ₂ O, 1lt H ₂ O
Gel de acrilamida al 8%	7.5 g de archilamida 0.4 g de bisacrilamida, 42 g de urea y 5 ml de buffer de soporte 20x. Para la polimerización del gel adicionar 0.675 ml de persulfato de amonio y 25 µl de TEME

7. Métodos

7.1. Diseño de oligonucleótidos para la secuencia de DNAs que codifican los péptidos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc

- 1) Establecer la secuencia de nucleótidos que forman los oligonucleótidos para la secuencia DNAs que codifican los péptidos βA_{1-16} y βA_{1-16} , e incluir los extremos cohesivos Sfi I y Not I en los extremos finales 5' y 3' respectivamente.

7.2. Obtención del DNA de doble cadena que codifican para los péptidos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc

Fosforilación de los oligonucleótidos

- 2) Colocar en un tubo los oligonucleótidos que forman el fragmento de DNA que codifica el péptido βA_{1-16} (5.1-16 y 3.1-16) y en otro los oligonucleótidos que formaran el fragmento de DNA que codifica el péptido βA_{1-16} Sc, (5.16-1 y 3.16-1N) en una proporción de 1:1.
- 3) A cada una de las mezclas adicionar T4 polinucleótido kinasa terminal transferasa dNTPs y buffer de reacción. El volumen final de reacción será de 10 μ l, para cada mezcla e incubar a 37°C durante 1 hora.

Hibridación de los oligonucleótidos

- 1) Calentar cada mezcla a 94° C durante 5 minutos y transcurrido el tiempo dejar que paulatinamente baje la temperatura hasta llegar a los 30°C.

7.3. Reacción de ligación de los DNAs exógenos al vector fagómico pCANTAB 5 E

- 2) Colocar en un tubo 50 ng del vector fagómico pCANTAB 5 E digerido con Sfi I y Not I y mezclar con el DNA exógeno en una proporción de una molécula del vector por 10 moléculas del DNA exógeno.
- 3) Adicionar T4 DNA ligasa, Buffer de reacción y agua a un volumen final de 10 μ l.
- 4) Incubar la reacción a 16 °C toda la noche.

7.4. Obtención de las transformantes βA_{1-16} y $\beta A_{1-16} Sc$

Para obtener las transformantes, se transfirió el DNA de los vectores al interior de células de *E. coli* cepa TG1 que fueron hechas competentes mediante la técnica con $CaCl_2$ modificada (Casali y Preston, 2003). De acuerdo al siguiente formato:

Preparación de células competentes

- 1) Inocular 10 ml de medio LB con una colonia de bacterias *E. coli* cepa TG1 en una caja con medio mínimo e incubar toda la noche a 37°C con agitación constante de 250rpm.
- 2) Del cultivo obtenido diluir en una proporción de 1/100 en medio LB y dejar crecer a 37°C en agitación, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 a una longitud de onda de 600 nm.
- 3) Después incubar en hielo por 10 minutos y centrifugar durante 10 minutos a 4000 rpm, 4°C
- 4) Resuspender la pastilla obtenida con 30 ml de la solución TFB-I fría e incubar en hielo por 30 minutos.

- 5) Un vez pasado el tiempo de incubación recuperar las células bacterianas por centrifugación de la suspensión a 4000 rpm por 10 minutos y 4°C.
- 6) Finalmente resuspender las células bacterianas en 4 ml de la solución TFB-II y realizar alícuotas de 200 μ l, las cuales se congelan a -70 °C.

Transformación

- 1) Colocar en un tubo estéril pre-enfriado 25 ng del vector recombinante obtenido en la reacción de ligación y disuelto en un volumen final de 10 μ l.
- 2) Mezclar el DNA con 100 μ l de bacterias *E. coli* cepa TG1 competentes y dejar reposar 30 minutos en hielo.
- 3) Posteriormente dar un choque térmico a 42°C durante 1.5 minutos y después de este lapso de tiempo dejar reposar 1 minuto en hielo.
- 4) Finalmente adicionar 900 μ l de medio Sock e incubar durante 40 minutos a 37°C.
- 5) De la transformación tomar 300 y 400 μ l para distribuir en cajas Petri con medio LB que contienen carbinicilina (50 μ l/ml) y glucosa al 2%, e incubar durante toda la noche a 37°C. Las colonias que crecieron son colonias que tiene el vector fagómido recombinante.

7.5. Confirmación de la clonación correcta de los insertos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc por PCR

Amplificación de los insertos por PCR

- 1) Seleccionar al azar colonias individuales de las transformante βA_{1-16} y de las transformante βA_{1-16} Sc e Inocular en una caja Petri con medio LB-agar que contiene carbinicilina (50 μ l/ml) y glucosa al 2%. Incubar a 37°C durante toda la noche y almacenar a -4°C.

- 2) Posteriormente a partir de las células transformadas realizar una amplificación de los insertos por PCR. Primero cada colonia se debe eluir en 20 μ l de agua mQ y calentar a 90°C durante 10 minutos en un termo bloc.
- 3) Después recuperar el DNA centrifugando a 12000 rpm durante 5 minutos, en el sobrenadante se encuentra el DNA.
- 4) Para cada reacción de amplificación, adicionar 5 μ l del sobrenadante, 1 μ l de los oligonucleótidos: S1pCAN (5'CAACGTGAAAAAATTATTATTC-GC3'), S6pCANr (3'GGAGTATGTCTTTTAAGTAAATG 5') que actuaran como cebadores, 2.5 μ l de buffer de reacción, 0.75 μ l de MgCl₂, 0.5 μ l de dNTPs, 0.5 μ l de enzima Taq DNA polimerasa y 11.75 μ l de agua.
- 5) Realizar 27 ciclos de amplificación en un termociclador Perkin Elmer 9600 mediante las siguientes temperaturas y tiempos de reacción: 94°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos.

Electroforesis en gel de agarosa

Realiza una electroforesis a las muestras obtenidas, para lo que se prepara un gel con TBE 1%, agarosa 1.5% con 2% de bromuro de etidio.

- 1) En el gel de agarosa cargar 5 μ l de cada reacción de amplificación, 2 μ l de un marcador de peso molecular de 100 pb y 5 μ l de un DNA control (puc 19). Para todas las muestras se utiliza 1 μ l de colorante de carga y llevar a un volumen final de 8 μ l con agua.
- 2) Fijar un voltaje de 100 volts, correr las muestras hasta que el colorante migra 2/3 de la longitud del gel.
- 3) Observar el gel en un transiluminador de luz UV y comparar visualmente el tamaño de los insertos con las bandas del marcador de peso molecular de 100 pb.

7.6. Confirmación de la clonación correcta mediante la secuenciación de los insertos βA_{1-16} y $\beta A_{1-16} Sc$

Purificación de DNA fagómico

Se purifica el DNA fagómico recombinante de las transformantes seleccionadas empleando el Quantum Prep Plasmad Miniprep Kit (Bio-Rad) según las siguientes instrucciones.

- 1) Inocular las transformantes en 5 ml de medio 2XYT con carbinicilina (50 μ g/ml) y glucosa al 2% y dejar crecer a 37°C en agitación constante hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5-0.6 a la longitud de onda de 595 nm.
- 2) Centrifugar 2 ml de cada cultivo a 12 rpm por 30 segundos y remover el sobrenadante.
- 3) Resuspender la pastilla con 200 μ l del reactivo de resuspensión celular.
- 4) Adicionar 250 μ l de la solución de lisis celular y mezclar suavemente por inversión hasta que se forme una solución viscosa y ligeramente clara.
- 5) Adicionar 250 μ l de solución neutralizadora y mezclar hasta que se forme un precipitado, centrifugar a 12000rpm por 5 minutos, el sobrenadante tiene al DNA.
- 6) Colocar el sobrenadante en una columna de filtración que previamente fue colocada en un tubo de 2 ml.
- 7) Adicionar 200 μ l de la solución Quantum Prep. matriz y mezclar por pipeteo.
- 8) Centrifugar a 12000 rpm por 30 segundos y remover el filtrado del tubo.
- 9) Lavar la columna con 500 μ l de buffer de lavado y centrifugar a 12000 rpm por 30 segundos.

- 10) Nuevamente lavar la columna con 500 μ l de buffer de lavado y centrifugar por 2 minutos a 12000 rpm.
- 11) Remover la columna de filtración y colocarla en un tubo limpio.
- 12) Eluir el DNA de la columna mediante la adición de 100 μ l de agua mQ y centrifugar por 1 minuto, almacenar el DNA a -20°C.

Reacción de secuenciación

Para la secuenciación del DNA de los DNA exógenos, se empleó la Secuencasa Quick-Denature Plasmid Sequencing Kit (USB) según las siguientes instrucciones:

- 1) Realizar una desnaturalización alcalina (con 2 μ l de NaOH 1.0M) al DNA purificado (0.5-3 μ g/8 μ l) mezclado con 1 μ l (2-4 pmol/ μ l) del oligonucleótido S1pCAN e incubar la reacción por 10 minutos a 37°C.
- 2) Neutralizar la reacción con la adición de 2 μ l de HCl 1.0M y adicionar buffer de reacción.
- 3) Incubar la mezcla a 37°C por 10 minutos y después colocar en hielo.
- 4) Adicionar 1 μ l de DTT 0.1M, 2 μ l de Diluted labeling mix, 0.5 μ l de [α -35S], [α -32] dATP (5 μ Ci) y 2 μ l de secuencasa e incubar 2-5 minutos a temperatura ambiente.
- 5) Transferir 4.5 μ l de la mezcla de reacción a tubos que contienen 2.5 μ l de un terminador (ddGTP, ddATP, ddTTP y ddCTP) e incubar la reacción a 37°C por 5 minutos.
- 6) Adicionar 4 μ l de solución de paro y calentar las muestras a 75°C por 2 minutos.

Electroforesis en gel de acrilamida

A las muestras se les realiza una electroforesis usando una cámara de electroforesis de secuencia (Life technologies Gibco BRL sequencing sistem), para lo que se prepara un gel de acrilamida al 8%.

- 1) De cada tubo que contiene un terminador, cargar 2-4 μl en el gel de acrilamida y fijar un voltaje de 1500 volts
- 2) Correr las muestras hasta que el colorante migre 3/4 de la longitud del gel.
- 3) Someter el gel a un proceso de secado utilizando el equipo Gel Dryer modelo 583 (bio Rad) y finalmente exponer el gel en una placa de rayos X por 5 días.

7.7. Obtención de los fagos recombinantes βA_{1-16} y βA_{1-16}

Sc

Rescate de los fagos recombinantes

- 1) Inocular en 5ml de medio 2X YT con carbinicilina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y glucosa al 2% cada una de las transformantes seleccionadas y dejar crecer a 37°C en agitación constante (250 rpm) hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5-0.6 y a una longitud de onda de 595 nm. De cada cultivo tomar 2.4ml y realizar alícuotas de 1 ml con 1/3 de glicerol las cuales se refrigeran a -70°C.
- 2) De los 2.6 ml restantes, infectar con el fago ayudante M13K07 en una proporción de 5 fagos por célula para esto se considera que a longitud de onda de 595 nm, la fase logarítmica entra en una densidad óptica de 0.5 a 0.6, equivalentes a 4×10^8 células/ml e incubar 1 hora a 37°C en agitación constante (250rpm).

- 3) Posteriormente crecer los fagos y células en 38 ml de medio 2XYT con kanamicina (50 $\mu\text{g/ml}$) y carbinicilina (50 $\mu\text{g/ml}$) e incubar toda la noche a 37°C con agitación.

Purificación de los fagos recombinantes

- 1) Centrifugar el medio de cultivo a 8000 rpm, 4°C durante 20 minutos.
- 2) Colecta el sobrenadante con los fagos recombinantes, y refrigerar durante 2 horas a 4°C con 1/6 PEG-NaCl para luego centrifugar a 10000 rpm, 4°C, durante 10 minutos.
- 3) Resuspender la pastilla por pipeteo con 1.3 ml de TBS a 4°C y después centrifugar a 4000 rpm para eliminar restos de células
- 4) Colocar la solución en un tubo limpio con 1/5 parte de PEG-NaCl en hielo durante 1 hora y nuevamente centrifugar a 14000 rpm, 4°C, 5 minutos.
- 5) Retirar el sobrenadante por pipeteo y resuspender con 200 μl de TBE.
- 6) Titular los fagos recombinantes con bacterias *E. coli* cepa TG1 en medio LB con carbinicilina y glucosa al 2%, almacenar los fagos a -4°C.

7.8. Determinación de la especificidad de unión de los péptidos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc hacia anticuerpos anti βA_{1-42} .

- 1) Sensibilizar 20 pozos de una placa de 96 pozos (Nunc. Dinamarca) con una preparación de anticuerpos anti IgG (gama) de ratón (2 μg / ml por pozo) en buffer de carbonatos, incubar 1 hora a 37°C y realizar 4 lavados con PBS- δ Tween 0.2%.
- 2) Bloquear los pozos con PBS-BSA 2% durante 1 hora a 37°C y realizar 4 lavados con PBS- δ Tween 0.2%.

- 3) A la mitad de los pozos adicionar suero de ratón hiperinmune contra beta amiloide y a la otra mitad adicionar suero de ratón inmunizado contra adyuvante como antígeno no relacionado. Los sueros se utilizan en dilución de 1:500 en PBS-BSA 1%- δ tween 1%. Incubar 100 μ l de la dilución, por pozo durante 1 hora a 37°C y nuevamente realizar 4 lavados con PBS- δ Tween 0.2%.
- 4) Posteriormente agregar los fagos recombinantes (β A1-16 y β A1-16 Sc), y los fagos M13 y β A_{EFRH} como blanco negativo y blanco positivo respectivamente, en una concentración por pozo de 10¹¹ fagos/ml diluidos en PBS-BSA 0.3%-tween 0.2% e incubar toda la noche a 4°C, realizar 4 lavados con PBS- δ Tween 0.2%.
- 5) Adicionar suero de conejo con anticuerpos anti M13 en una dilución de 1-4000 en PBS-BSA 1%- δ tween 0.1% e incubar por 1 hora a 37°C, realizar 4 lavados con PBS- δ Tween 0.2%.
- 6) Adicionar anticuerpos anti IgG de conejo conjugado con la enzima HRP en PBS-BSA 1%- δ Tween 0.1% e incubar por 1 hora a 37°C, realizar 4 lavados con PBS- δ Tween 0.2%.
- 7) Adicionar solución ABTS (Zimed EUA) y registrar a lecturas de densidad óptica de 405-450 nm en el lector de microplacas Opsys MR.

8. Resultados

Los oligonucleótidos sintéticos que forman las secuencias de DNAs que codifican la región amino terminal 1-16 ($\beta_{A_{1-16}}$) y la región 1-16 en su combinación aleatoria ($\beta_{A_{1-16}}$ Sc) del péptido $\beta_{A_{1-42}}$, se diseñaron de manera tal que después de unirse, formarían un DNA de doble cadena que incluyera los extremos cohesivos Sfi I y Not I en los extremos finales 5' y 3'.

Los oligonucleótidos tienen los siguientes nucleótidos:

Para el fragmento de DNA que codifica el péptido $\beta_{A_{1-16}}$:

Secuencia codificante

5.1-16 5'- ATGATGCAGAATTCAGGCATGATTCAGGATACGAAGTACATC
ATCAGAA – 3'

Secuencia complementaria

3.1-16 5'- GGCCTTCTGATGATGTACTIONCGTATCCTGAATCATGCCTGAAT
TCTGCATCATGCT – 3'

Para el fragmento de DNA que codifica el péptido $\beta_{A_{1-16}}$ Sc son:

Secuencia codificante:

5.16-1 5'- CGGCAAGGTCAGATGAAGTAGATTTCCAGCATGGACATTACAA
GGAACATGC – 3'

Secuencia complementaria:

3.16-1N 5'- GGCCGCATGTTCCCTTGT-AATGTCCATGCTGGAAATCTACTTC
ATCTGACCTTGCCGGCT – 3'

La figura 6 muestra los DNAs formados después de la hibridación de los oligonucleótidos sintéticos, donde también se observan los sitios cohesivos Sfi 1 y Not 1 formados y que permitirán la unión al vector pCANTA 5 E.

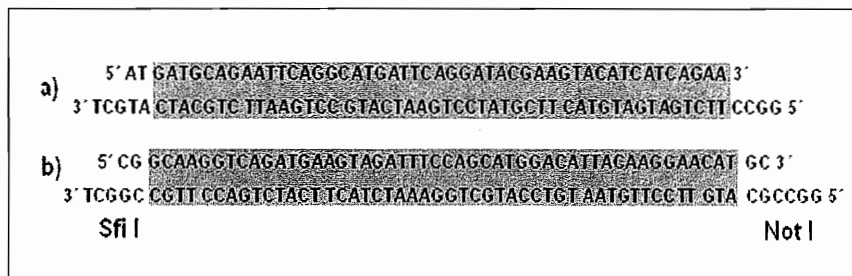


Figura 6. DNAs obtenidos de la hibridación de los oligonucleótidos.

a) corresponde al DNA que codifica el péptido βA_{1-16} . b) Corresponde al DNA que codifica el péptido βA_{1-16} Sc. Los nucleótidos que se encuentran resaltados de color gris corresponden a los nucleótidos que codifican los péptidos ya mencionados, mientras que los que no están resaltados, constituyen los extremos cohesivos que permitirán la unión al vector.

Los DNAs exógenos, se insertaron al vector fagómico pCANTA 5 E (ver apéndice) y se clonaron mediante la transformación de bacterias *E. coli* cepa TG1 como se muestra en el método. La transformación de las bacterias se confirmó con el crecimiento de las células en cajas de agar LB que contienen carbinicilina y glucosa.

8.1. Confirmación de la clonación correcta de los insertos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc

Para confirmar la clonación correcta del DNA que codifica para el péptido βA_{1-16} y el DNA que codifica para el péptido βA_{1-16} Sc, fueron seleccionadas al azar 4 colonias individuales de cada transformación. Se nombraron $\beta A1$, $\beta A2$, $\beta A3$ y $\beta A4$

Posteriormente se purificó de las clonas, el DNA de doble cadena de fagómido pCANTAB E 5 recombinante y se determinó la secuencia de nucleótidos que forman el DNA exógeno que codifican para los péptidos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc como se describe en el método. La tabla 3 muestra que el fragmento de DNA exógeno que codifica para el péptidos βA_{1-16} en la clona f $\beta A1$ y el fragmento de DNA que codifica para el péptido βA_{1-16} Sc de las clonas fSc1 están clonados correctamente.

Tabla 3. Secuencia de los insertos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc

Fragmento de DNA	clonas	Secuencia nucleotídica
βA_{1-16}	$\beta A1$	AT GAT GCA GAA TTC AGG CAT GAT TCA GGA TA C GAA GTA CAT CAT CAG AA
Sc	Sc1	CG GCA AGG TCA GAT GAA GTA GAT TTC CAG CAT GGA CAT TAC AAG GAA CAT GC

8.2. Confirmación de la expresión de los péptidos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc y determinación de la capacidad de unión hacia anticuerpos anti βA_{1-42} presentes en suero de ratón hiperinmune

Se obtuvieron los fagos recombinantes f $\beta A1$ y fSc1 por infección a las clonas $\beta A1$ y Sc1 con el fago ayudador M13K07 como se describe en el método.

Para confirmar la expresión de los péptidos expresados en la proteína pIII de superficie de los fagos recombinantes obtenidos en este trabajo, así como su capacidad de unión hacia anticuerpos anti βA_{1-42} presentes en suero de ratón hiperinmune, los fagos fueron probados utilizando la técnica de ELISA como se describe en el método. El resultado que se observa en el gráfico 1, muestra que sólo el fago recombinante f $\beta A1$ es reconocido por los anticuerpos anti βA_{1-42} .

Además presenta una especificidad de unión mayor que el péptido βA_{3-6} presente en el fago recombinante $f\beta A_{E\text{FRH}}$, usado como control positivo, ya que se encontró una DO de 1.1105 y 0.836 respectivamente. Mientras que el péptido βA_{1-16} Sc presente en la superficie de los fagos recombinantes $f\text{Sc}1$ no mostró alguna especificidad de unión, ya que la DO fue igual o ligeramente mayor al control negativo (fago M13), la DO de $f\text{Sc}1$ y $f\beta A_{E\text{FRH}}$, fue de 0.011 y -0.004 respectivamente.

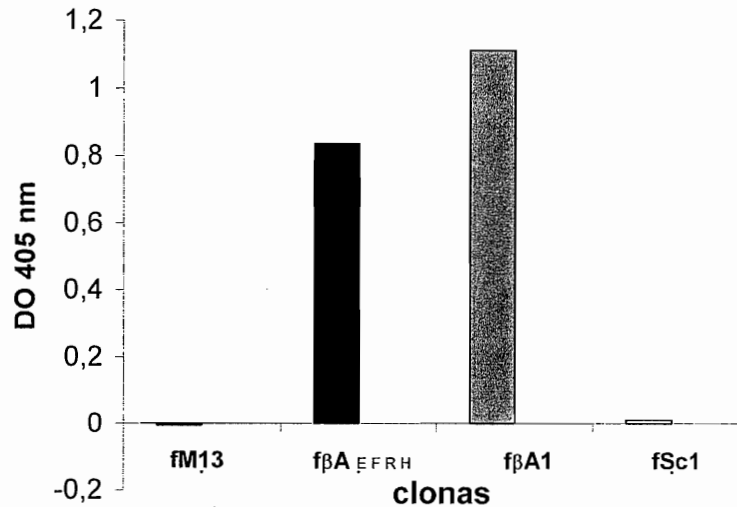


Grafico 1. Determinación de la capacidad de unión de los péptidos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc hacia anticuerpos anti βA_{1-42} presentes en suero de ratón hiperimmune. Los fagos recombinantes se probaron por ELISA. Se uso el fago M13 como control negativo y el fago recombinante $f\beta A_{E\text{FRH}}$ que expresa la región βA_{1-16} de péptido βA_{1-42} como control positivo.

9. Discusión

Como propuesta para poder prevenir y curar la EA, se ha contemplado el uso de formas modificadas del péptido βA que puedan ser utilizadas en el desarrollo de vacunas o búsqueda de anticuerpos que estén dirigidos con alta afinidad hacia sitios específicos y esenciales en la agregación del péptido βA .

Una dificultad de estudiar moléculas de origen biológico es que la mayoría, y en especial aquellas relacionadas a alguna enfermedad, es que se hallan presentes en cantidades muy reducidas, por lo que una de las contribuciones más importantes de la ingeniería genética a la biología molecular, es el desarrollo de moléculas recombinantes que puedan ser usadas como vectores para clonar moléculas de DNA y que a su vez estas moléculas expresen una gran cantidad de proteínas útiles. Una técnica empleada para este fin y que desarrollamos en este trabajo es la tecnología de despliegue en fagos y aunque su mejor aplicación es el análisis y producción de anticuerpos, ha mostrado ser un excelente medio para la obtención de antígenos, ya que los fagos recombinantes presentan una inagotable fuente de ellos, los cuales son obtenidos por incremento de cultivo bacteriano.

Una región considerada como un sitio esencial para la agregación y la formación de fibrillas amiloides, se encuentra presente entre los aminoácidos 1-16 (Salomón y cols, 1997), y en base a esto propusimos la construcción de fagos recombinantes que expresen la región amino terminal 1-16 del péptido βA y la región amino terminal en su combinación aleatoria βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc respectivamente.

Los vectores recombinantes que utilizamos para la construcción de los fagos recombinantes fueron generados a partir del fagómido pCANTAB 5E un vector de tipo 3+3, el cual permite expresar péptidos exógenos fusionados a la proteína pIII y por tal obtener fagos recombinantes que expresen de 3 a 5 copias del péptido exógeno, un rasgo que tiene una importante aplicación para poder seleccionar moléculas con alta capacidad de unión (Barbas III y cols, 2000).

Al vector previamente se le hizo una doble digestión con las enzimas Sfi I y Not I para permitir la clonación direccional de los insertos. Para obtener el vector recombinante que produce el péptido βA_{1-16} , se insertó el DNA que codifica para el péptido exógeno, entre los sitios Sfi I y Not I (ver apéndice) y para obtener el vector recombinante que produce el péptido βA_{1-16} Sc I, de igual manera se inserto el DNA que codifica para el péptido exógeno, entre los sitios Sfi I y Not I, ver apéndice.

El clonaje de los insertos se realizó introduciendo los vectores recombinantes a bacterias *E. coli* cepa TG1 que fueron hechas competentes por el método de cloruro de calcio modificado, para lo que empleamos 25ng/ μ l, obteniendo una eficiencia aproximada a la 10^6 células en la transformaciones.

Una característica que tienen los vectores que empleamos y que consideramos para seleccionar únicamente células que contengan el vector recombinante, es el gen que le confiere resistencia a la carbinicilina, porque aquellas bacterias que crezcan en presencia del antibiótico son células que fueron transformadas. La figura 7, muestra la amplificación de los insertos, donde se observan bandas con un tamaño aproximado de 200 pb en las clonas de células transformadas con los vectores recombinantes y como el tamaño del los DNAs que amplificamos es de 205 pb, el resultado coincide con el tamaño esperado, confirmando la penetración de los vectores en las células bacterianas, la tabla 3 que corresponde al resultado obtenido de la secuenciación nucleotídica de los DNAs exógenos, muestra que la clonación de los insertos se llevó correctamente.

Ya que el péptido exógeno puede ser tóxico para las células bacterianas se tomó en cuenta que los vectores que empleamos contienen en su genoma el promotor Lac Z, por lo que suprimimos la expresión de las moléculas mediante la adición de glucosa al medio de cultivo, en selección medio semisólido y en su crecimiento en medio líquido.

A fin de generar los fagos recombinantes f βA_1 y fSc1 que expresan en la proteína pIII de superficie el péptido βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc respectivamente, seleccionamos las

clonas $\beta A1$ y Sc1 que mostraron poseer al vector recombinante, e infectamos con el fago ayudante M13K07 que proporciona las enzimas y proteínas que permiten la replicación y el ensamblaje del fagómido como fago filamentoso y de igual manera la selección de clonas bacterianas transformadas, seleccionamos únicamente fagos recombinantes que contengan DNA del fagómido o DNA del fago ayudante, para lo que consideramos el gen que cada uno tiene como marcador y con base en esto adicionamos al medio de crecimiento carbinicilina y kanamicina.

Para evaluar la capacidad de unión del péptido βA_{1-16} expresado en el fago recombinante f $\beta A1$ y la capacidad de unión del péptido βA_{1-16} Sc expresado en el fago recombinante fSc1, con anticuerpos anti βA_{1-42} presentes en suero de ratón hiperinmune, utilizamos la técnica de ELISA, y empleamos el fago recombinante f βA_{EFRH} que expresa la región 3-6 del péptido βA_{1-42} como control positivo y el fago M13 que no expresa en su superficie alguna forma del péptido βA como control negativo. Los resultados que se muestran en el Grafico 1, nos indica que el péptido expresado en la superficie de los fagos fSc1 no es reconocido por los anticuerpos anti βA_{1-42} , esto indica que la secuencia de aminoácidos (ARSDEVDFQHGHYKEH) no corresponde a alguna forma del péptido βA , por otra parte el péptido βA_{1-16} expresado en la superficie de los fagos recombinantes f $\beta A1$ muestra tener una capacidad de unión por arriba del fago f βA_{EFRH} .

Como reporte reciente, mencionaremos que varios grupos de investigación se han involucrado en la exploración de la inmunogenicidad de los fagos y la contribución más importante de esto, quizás es la introducción de los fagos como vectores de expresión de fragmentos (epitopes específicos) derivados de secuencias proteicas que se encuentran en la superficie de agentes patógenos. Estos estudios sugieren que la aplicación de epitopes expresados en fago como acarreadores es ventajoso comparado con la aplicación de péptidos sintéticos en vacunas, porque los últimos son generalmente poco inmunogénicos y necesitan ser suplementados con un adyuvante, mientras que los fagos son altamente inmunogénicos y no necesitan

adyuvante (Manoucharia y cols, 2001), por lo que la administración de bacteriófagos filamentosos puede inducir una fuerte respuesta inmunológica, como se ha visto en estudios en animales y donde no hay evidencia de efecto tóxico. Por tanto los fagos recombinantes además de ser usados en el desarrollo de vacunas o la búsqueda de anticuerpos, también pueden ser usados como inductores de autoanticuerpos, así la expresión de pequeños fragmentos inmunogenicos fusionados a la superficie de fagos, proporciona otra bases para el tratamiento contra la EA (Frenkel y cols, 2000).

10. Conclusiones

Se pudieron construir fagos recombinantes que expresen los péptidos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc fusionados a la proteína pIII de superficie.

Se clonaron correctamente los DNAs que codifican para los péptido βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc.

La expresión del péptido βA_{1-16} Sc no fue reconocido por los anticuerpo anti βA_{1-42} presentes en suero de ratón hiperinmune

El péptido βA_{1-16} expresado en los fagos recombinantes f βA_1 fue reconocido por los anticuerpo anti βA_{1-42} presentes en suero de ratón hiperinmune, por lo tanto este resultado permiten sugerir que el único fago que puede ser utilizado para el desarrollo de alternativas terapéuticas en el tratamiento de la EA son los fagos recombinantes f βA_1 que expresan el péptido βA_{1-16} .

11. Bibliografía

Andorfer C, Kress Y, Espinoza M, Silva R, Tucker K, Barde Y, Duff K, y Davies P. 2003. Hyperphosphorylation and aggregation of Tau in mice expressing normal human Tau isoformas. *Journal of Neurochemistry* **86**: 582-590.

Arendash G, Gordon M, Diamond D, Austin L, Hatcher J, Jantzen P, Dicarlo G, Wilcock D y Morgan D. 2001. Behavioral assessment of Alzheimer's transgenic mice following long-term $a\beta$ vaccination: task specificit and correlations between $a\beta$ deposition and spatial memory. *DNA and Cell Biology* **29**: 737-744.

Barbas III C, Burton D, Scout J y Silverman G. 2001. Phage display a laboratory manual. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, ASA.

Bayer T, Wirths O, Majtényi K, Hartmann T, Multhaup G, Beyreuther y Czech C. 2001. Key factors in Alzheimer's disease: β -amyloid precursor protein processing, metabolism and intraneuronal transport. *Brain Pathology* **11**: 1-11.

Bradbury, A y Marks, J. 2004. Antibodies from phage antibody libraries. *Journal of Immunological Methodos* **290**: 29-49.

Bentley N, LaDu M, Rajan C, Getz G y Reardon C. 2002. Apolipoprotein E structural requirements for the formation of SDS-stable complexe whith β -amiloid- (1-40): the role of salt bridges. *Biochem. J.* **366**: 273-279.

Brito J, Alarcón J, Sciaraffia C y Rojas E. 2001. En astrocitos humanos, el estrés hipoglicémico facilita la inserción de amiloide beta (abp [1-40] que forma un canal de calcio no regulado. *Revista Hospital Clínico Universidad de Chile* **12**(3): 172-178.

Broytman O y Malter J. 2004. Anti-ab: the good, the bad, and the unforesees. *Journal of Neuroscience Research* **75**:301-306.

Casali N y Preston A. 2003. E. coli plasmid vectors, Methods and application. Ed. Humana Press. New Jersey, USA. pp 50 - 51.

Citron M. 2004. Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nature Reviews Neuroscience* **5**: 677-684.

Frenkel D, Katz O, y Sólomon B. 2000. Inmunización against Alzheimer's β -amyloid plaques via EFRH phage administration. *Proc Natl Acad Sci USA* **22**: 11455-11459.

Hamdane M, Delobel P, Sambo A, Smet C, Bégard S, Violleau A, Landrieu I, Delacourte A, Lippens G, Flament S y Buée L. 2003. Neurofibrillary degeneration of the Alzheimer-type: an alternate pathway to neuronal apoptosis? *Biochemical Pharmacology* **66**: 1619-1625.

Hansen M, Ostenstad B y Stoud M. 2001. Identificación of immunogenic using a phage-displayed cDNA library from an invasive ductal breast carcinoma tumour. *International Journal of Oncology* **19**: 1303-1309.

Horikoshi Y, Sakaguchi G, Becker A, Gray A, Duff K, Aisen Pa, Yumaguchi H, Maeda M, Kinoshita N, y Matsuoka Y. 2004. Development of $a\beta$ terminal end-specific antibodies and sensitive elisa for $a\beta$ variant. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **319**: 733-737.

Hume J. y Duchon L. 1992. Greenfield's Neuropathology. Quinta edición, Oxford University Press. New York, USA. pp 1328- 1329.

Jacobsson K, Rosander A, Bjerketorp J y Frykberg L. 2003. Shotgun phage display- selection for bacterial receptors or other exported proteins. *Biol. Proced. Online* **5**(1): 123-135.

Jordán J, Galindo M, Miller R, Reardon C, Getz G y Jo M. 1998. Isoform-specific effect of apolipoprotein E on cell survival and β -amiloid-induced toxicity in rat

hippocampal pyramidal neuronal cultures. *The Journal of Neuroscience* **18**(1): 195-204.

Kay B, Kasanov J, y Yamabhai M. 2001. Screening phage-displayed combinatorial peptides libraries. *Methods* **24**: 240-246.

Klein W, Stine W, Teplow D. 2004. Small assemblies of unmodified amyloid β -proteins are the proximate neurotoxin in Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* **25**: 569-580.

Koller M, Mohajeri M, Huber M, Wollmer M, Z'graggen B, Sandmeier E, Moritz E, Tracy J, Nitsch R y Cristen P. 2004. Active immunization of mice with an $\alpha\beta$ -hsp 70 vaccine. *Neuro-degenerative Diseases* **1**: 20-28.

Kourie J y Henry C. 2001. Protein aggregation and deposition: implication for ion channel formation and membrane damage. *Croatian Medical Journal Review* **44**(4): 359-374.

LeVine H. 2004. The amyloid hypothesis and the clearance and degradation of Alzheimer's β -peptide. *Journal of Alzheimer's Disease* **6**: 302-314.

Llibre J y Guerra M. 1999. Enfermedad de Alzheimer. Situación actual y estrategias terapéuticas. *Rev Cubana Med* **38**(2): 134-142.

Manoutcharia K, Gevorkian G, Cano G y Almagro. 2001. Phage displayed biomolecules as preventive and therapeutic agents. *Current Pharmaceutical Biotechnology* **2**: 217 - 223.

McGeer P y McGeer A. 2003. Is there a future for vaccination as a treatment for Alzheimer's disease?. *Neurobiology of aging* **24**: 391-395.

Menéndez S, Padrón N y Llibre J. 2002. Peptido beta amiloide y proteína Tau y enfermedad de Alzheimer. *Rev. Cubana Invest Biomed* **21**(4): 253-261.

Melo F, y Mello M. 2003. Use of phage display to select novel cystatins specific for *Acanthoscelides obtectus* cysteine proteinases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1651**: 146 -152.

Mount J, Samoylova T, Morrison N, Cox N, Baker H y Petrenko V. 2004. Cell targeted phagemid rescued by preselected landscape phage. *Gene* **341**: 59-65.

Mulder C, Scheltens P, Visser J, Kamp G y Schutgens R. 2000. Genetic and biochemical markers for Alzheimer's disease: recent developments. *Ann Clin Biochem* **37**: 593-607.

Murria R, Granner D, Mayer P y Rodwell V. 2001. Biogímica de Harper. Decimaquinta edición. Ed. El Manual Moderno, México D.F. pp 964 - 967.

Oddo S, Caccamo A, Jason D, Shepherd, Murphy M, Golde T, Kaye R, Metherate R, Mattson M, Akbari Y y Laferla F. 2003. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular $\alpha\beta$ and synaptic dysfunction. *Neuro* **39**: 409-421.

O'Brien P y Ken R. 2002. Antibody phage display methods and protocols. Ed. Humana Press, New Jersey, USA. pp 1-4.

Padrón N, Menéndez S y Libre J. 2002. Presenilinas, Apo E y enfermedad de Alzheimer. *Rev Cubana Invest Biomed* **21**(4): 262-269.

Pellón J. 1986. Ingeniería Genética y sus aplicaciones. Ed. Acriba. Zaragoza, España. pp 41-44.

Perera J, Tormo A, García J. 2002. Ingeniería Genética. Vol. 1. Ed. Síntesis. España. pp 443-480.

Sambrook J and Russell D. 2001. Molecular cloning a laboratory manual. 3ra ed. Vol. 1, 2 y 3. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA.

Santamaría H. 2003. "Phage display y su aplicación en el diagnóstico clínico". *Revista de Investigación Clínica* **55**: 711-718.

Sergeant N, Bombois S, Ghestem A, Drobecq H, Kostanjevecki V, Missiaen C, Wattez A, David J, Vanmechelen E, Sergheraert C y Delacourte A. 2003. Truncated beta-amiloid peptide species in pre-clinical Alzheimer's disease as new targets for the vaccination approach. *Journal Of Neurochemistry* **85**: 1581-1591.

Sólomon B, Koppel R, Frankel D y Hanan-Aharon E. 1997. Disaggregation of Alzheimer β -amyloid by site-directed mAb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 4109-4112.

Song W, Nadeau P, Yuan M, Yang X, Shen J y Yankner B. 1999. Proteolytic release and nuclear translocation of Notch-1 are induce by presenili-1 y impaired by pathogenic presenilina- mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 6959 -6963.

Zigmond M, Bloom F, Lendis S, Roberts J y Squire L. 1999. Fundamental neuroscience. Academic Press. USA. pp 1333, 1334.

Zou P, Ding Y, Sha Y, Hu B y Nie S. 2003. Humani peptides block calcium influx of rat hippocampal neurons by altering fibrogenesis of $a\beta$ 1-40. *Peptides* **24**: 679-685.

Willats W. 2002. Phage display: practicalities and prospects. *Plant Molecular Biology* **50**: 837-854.

Glosario

Adyuvante: Sustancia distinta a los antígenos, que potencia la activación de células promoviendo la acumulación y la activación de otros leucocitos. Los adyuvantes potencian la expresión de citóquinas y coestimuladores que activan a las células T.

Apoptosis: Proceso de muerte celular caracterizado por la escisión del ADN, la condensación y fragmentación del núcleo y la vesiculación de la membrana plasmática que provoca la fagocitosis de la célula sin inducir una respuesta inflamatoria.

Complemento: Sistema de proteínas del suero que interaccionan entre si y con otras moléculas del sistema inmunitario para generar importantes efectores de la respuesta inmune. Conducen a la formación de un complejo lítico celular común y consisten en una cascada de enzimas proteolíticas que generan mediadores de la inflamación y opsonización.

Fosforilación: Es la transferencia de un grupo fosfato desde una molécula de ATP y catalizada por la cinasas. El fosfato será transferido al extremo 5' de un DNA defosforilado.

Hibridación: Es la unión de dos oligonucleótidos complementarios para formar un DNA de doble cadena .

Ligación: Unión covalente de moléculas de DNA que se basa en una reacción enzimática que favorece la formación de un enlace éster entre un fragmento 5' fosfato y otro fragmento 3'OH. Existen dos requisitos: uno es que los terminales presenten las posiciones 5' fosforiladas y las 3' con grupos OH libres; el otro es que las regiones monocatenarias que sobresalen en el extremo de cada fragmento sean complementarias entre sí a lo largo de toda la longitud, para establecer

puentes de hidrógeno. La enzima que cataliza esta reacción recibe el nombre de DNA-ligasa, y requiere dos cofactores: iones Mg^{2+} y ATP (o NAD^+).

Inflamación: Reacción compleja del sistema inmunitario innato que consiste en la activación de células y de proteínas en un sitio de infección, exposición a toxinas o lesión celular. Aunque la inflamación tiene una función protectora, ya que controla la infección y estimula la reparación de tejidos, también puede producir lesiones crónicas y enfermedad.

Inmunidad activa: Forma de inmunidad que se induce por la exposición a un antígeno extraño y la activación de linfocitos y en el cual el individuo inmunizado desempeña un papel activo en respuesta al antígeno.

Inmunidad pasiva: Forma de inmunidad frente a un antígeno que se establece en un individuo por transferencia de anticuerpos. El receptor de esta transferencia se vuelve inmune al antígeno sin haber sido expuesto a este.

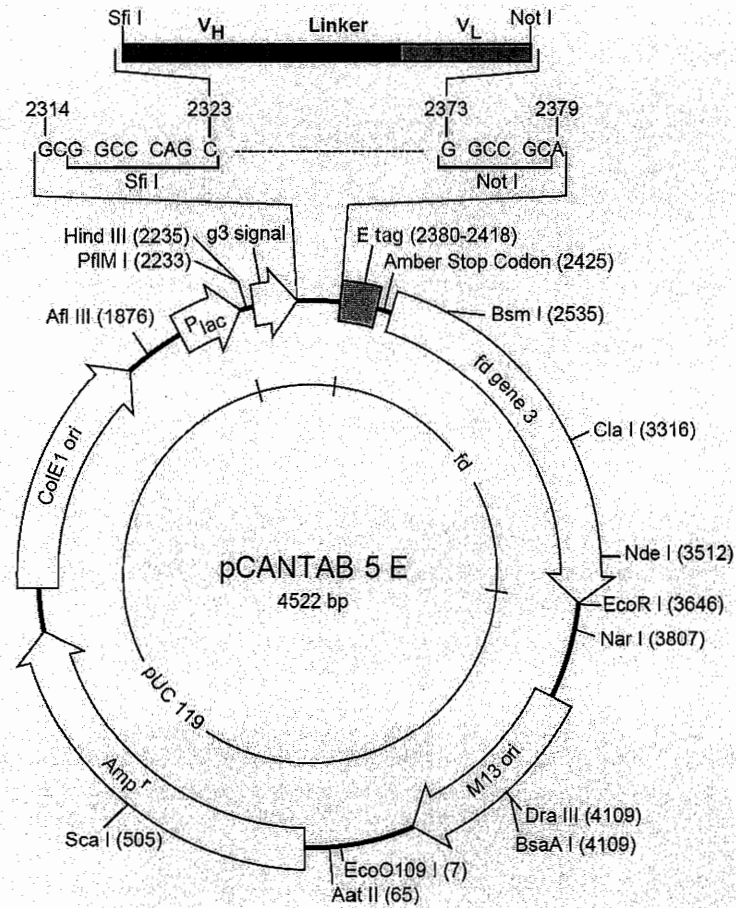
Secuenciación: La secuenciación es una DNA polimerasa extraída de bacterias infectadas por el fago T4. Es útil en la secuenciación por su capacidad de sintetizar numerosos nucleótidos antes de disociarse de la cadena matriz que copia.

Taq Polimerasa: Es una DNA polimerasa aislada de bacterias que viven en fuentes de aguas termales. Actúa a una temperatura cercana a los 65 °C. Esta propiedad es útil en las reacciones en las que es necesario utilizar una DNA polimerasa termoestable, como, por ejemplo, en la técnica de amplificación del DNA llamado PCR.

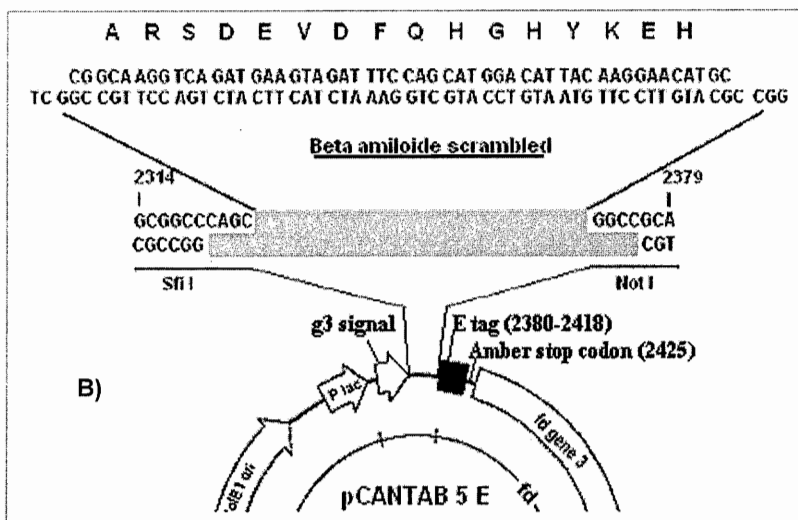
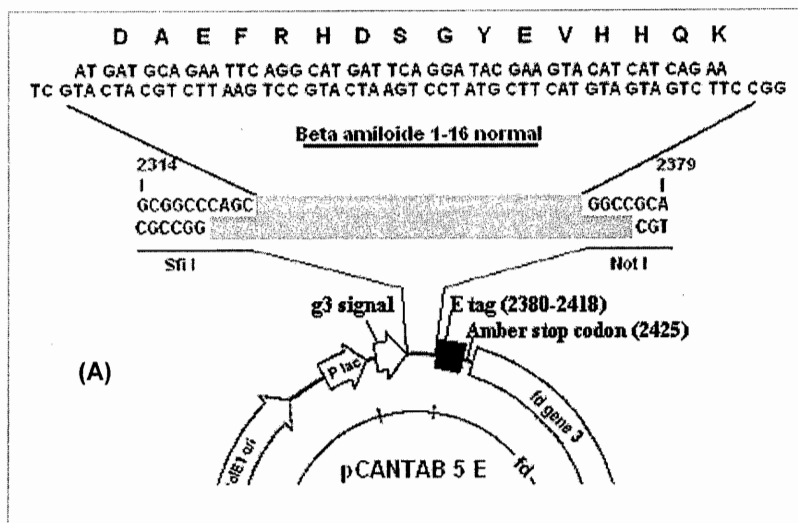
Promotor: Secuencia de ADN inmediatamente al inicio de la transcripción de un gen al que se une a las proteínas que inician la transcripción. El término se utiliza para designar la región reguladora de un gen completo.

Polylinker: Región de una molécula de DNA que es rico en sitios de restricción.

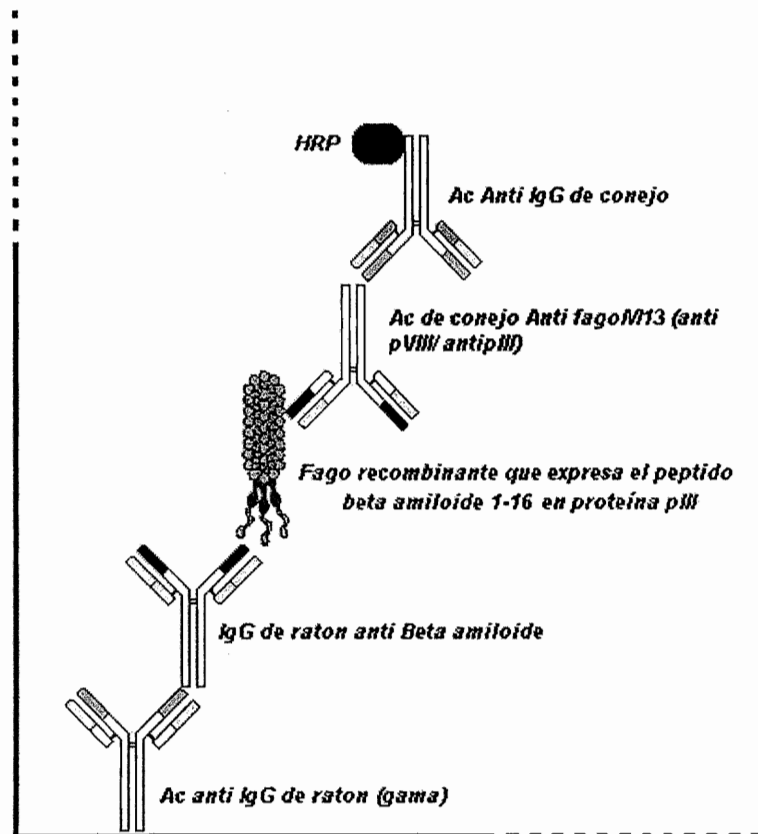
Apéndice



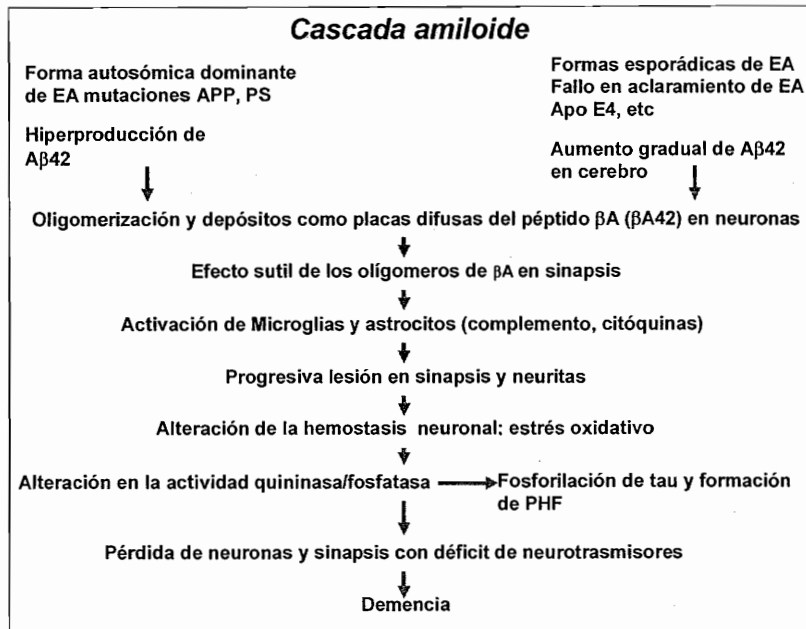
Mapa de restricción del vector pCANTAB 5 E. Se muestran las enzimas y su lugar de corte, todas tienen un sólo sitio de corte.



Ligación de los DNAs exógenos. El vector pCANTAB 5 E, se trató con las enzimas de restricción Sfi I y Not I, posteriormente se insertaron los DNA exógenos. (A) Inserción del fragmento de DNA que codifican para el péptido βA_{1-16} e (B) inserción del fragmento de DNA que codifica para el péptido β_{1-16} Sc.



Determinación de la especificidad de unión de los péptidos βA_{1-16} y βA_{1-16} Sc hacia anticuerpos anti βA_{1-42} mediante el empleo de la técnica de ELISA. En este esquema se muestra los anticuerpos utilizados y el orden en que se adicionaron para determinar la especificidad de los péptidos fusionados a la proteína pIII del fago recombinante.



Eventos que participan en la cascada amiloide (Alzheimer research forum (2003) [http://: www. Alsforum org/home.asp](http://www.alsforum.org/home.asp)).

de la secuencia palindromica. Estos cortes no generan extremos cohesivos debido a que no pueden formar puentes de hidrogeno porque no tienen secuencias complementarias.

<u>Extremos cohesivos</u>		
Enzima	Organismo	Sitio de restricci3n
EcoRI	Escherichia coli	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' -G-A-A-T-T-C- \\ -C-T-T-A-A-G- 5' \\ \uparrow \end{array}$
HindIII	H. Influenzae	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' -A-A-G-C-T-T- \\ -T-T-C-G-A-A- 5' \\ \uparrow \end{array}$
<u>Extremos romos</u>		
Enzima	Organismo	Sitio de restricci3n
SmaI	Serratia marcescens	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' -C-C-C-G-G-G- \\ -G-G-G-C-C-C- 5' \\ \uparrow \\ \downarrow \end{array}$
HaeIII	H. Aegyptius	$\begin{array}{c} \downarrow \\ 5' -G-G-C-C- \\ -C-C-G-G- 5' \\ \uparrow \end{array}$

Ejemplos de enzimas de restricci3n que producen extremos cohesivos y extremos romos.

PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Es una forma de clonaje de DNA que se realiza en un sistema libre de células y amplifica secuencias de ADN específicas hasta una longitud aproximada de 1Kb, utilizando una DNA polimerasa termoestable purificada. Se utiliza como técnica de preparación y de análisis en todas las ramas de la Biología Molecular porque permite amplificar más de mil millones de veces un DNA obtenido a partir de una región seleccionada de un genoma. Este tipo de amplificación de DNA supone un conocimiento previo de la secuencia génica pues son necesarios dos oligonucleótidos sintéticos que se usen como cebadores cortos y complementarios de la secuencia de los extremos del DNA que se pretende amplificar, que corresponden a sitios opuestos de la región amplificada. La reacción es un proceso que consiste en la realización de ciclos repetidos de separación, asociación y síntesis de DNA:

- La molécula de ADN que va copiarse se calienta para que se desnaturalice y se separen las dos hebras.
- Cada una de las hebras es copiada por la DNA polimerasa
- Las cadenas recién formadas son separadas de nuevo por el calor y comienza otro nuevo ciclo de copias. Estos ciclos se repiten hasta que se obtiene el número de copias deseado

Método de secuenciación basada en el uso de terminadores de cadena

Fundamento

El procedimiento se basa en una actividad enzimática (de una DNA polimerasa) capaz de alargar un cebador asociado a la molécula de DNA cuya secuencia se quiere conocer, y unos nucleótidos análogos a los sustratos de dNTPs normales. La clave de ese método radica en la utilización de dideoxinucleósido trifosfatos (ddATP, ddGTP, ddCTP y ddTTP), que carecen del grupo desoxirribosa 3'OH ,

para las clonas de las transformantes βA_{1-16} y Sc1, Sc2, Sc3 y Sc4 para las clonas de las transformantes βA_{1-16} Sc.

Primero se amplificaron los insertos por PCR como se describe en el método y posteriormente se analizaron las muestras mediante una electroforesis en gel de agarosa. Como muestra en la figura 7, se observa claramente que los tamaños de los fragmentos de DNAs amplificados son cercanos a 200 pb, confirmando que todas las clonas tienen el inserto en tamaño correcto y por lo tanto al vector recombinante.

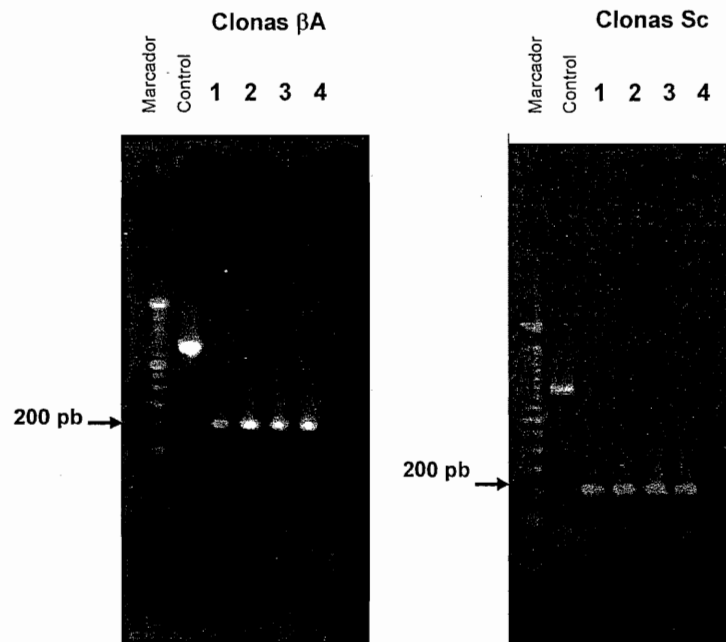


Figura 7. Migración por electroforesis en gel de TBE 1%-agarosa 1.5% de los DNAs βA_{1-16} (βA) y βA_{1-16} Sc (Sc) amplificados por PCR y teñidos con bromuro de etidio e iluminación UV.

presente en los nucleótidos normales; cuando un nucleótido modificado se incorpora a la cadena en crecimiento impide la adición del nucleótido siguiente, deteniendo el proceso al azar y liberando un producto acabado prematuramente. Esta reacción genera por lo tanto, una escalera de fragmentos; estos fragmentos se detectan gracias a un marcaje (radiactivo) que incorpora o bien el oligonucleótido o uno de los desoxirribonucleótido trifosfatos usados para extender la cadena.

Para determinar la secuencia completa, se utiliza cuatro nucleósido trifosfatos terminadores de cadena diferentes en cuatro reacciones se analizan en cuatro carriles paralelos en un gel de poliacrilamida.

ELISA (Análisis Inmunsorbente Ligado a la enzima)

Fundamento

Método para cuantificar un antígeno inmovilizado en una superficie sólida utilizando un anticuerpo específico con una enzima unida covalentemente. La cantidad de anticuerpo que se une al anticuerpo es proporcional a la cantidad de antígeno presente, y se establece mediante la determinación espectrofotométrica de la conversión de un sustrato transparente en un producto coloreado por la enzima unida, para ello hay cuatro etapas básicas:

Unión del inmunorreactivo (antígeno o anticuerpo) a la fase sólida. El método que más se utiliza para fijar proteínas es la absorción física directa de la proteína a la fase sólida; las fases sólidas más usadas son el poliestireno y el cloruro de polivinilo entre otros.

Reacción del inmunorreactivo en fase sólida. Esta es una reacción antígeno-anticuerpo y por lo tanto, la condiciones experimentales óptimas son pH, temperatura y concentración salina similares a los valores fisiológicos. También es necesario añadir al medio de reacción un detergente no iónico (Tween 20) como forma de evitar también la unión inespecífica, porque aunque no queda fijado a la fase sólida, impide que macromoléculas se unan a ella de forma inespecífica. Los

lavados son de gran importancia ya que si no se realizan correctamente puede disminuir enormemente la especificidad y la reproductividad de la técnica.

Reacción del conjugado enzimático con el inmunorreactivo en fase sólida o con el inmunocomplejo en fase sólida. El conjugado enzimático se prepara, por unión covalente de una enzima con un anticuerpo o un antígeno, la enzima más usada ha sido la peroxidasa de rábano (HRP).

Determinación de la actividad enzimática. Una vez elegida la enzima es necesario elegir el sustrato más adecuado para determinar la actividad enzimática. En el caso de la peroxidasa uno de los reactivos que puede ser utilizado es el ABTS [2,2-azino-di (3-etil-benzo-tiazolina-6-sulfonato)].