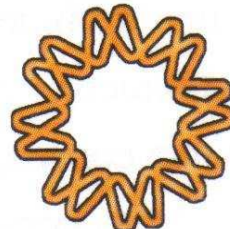




UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA



POSGRADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

**Construcción y caracterización de una biblioteca
de fragmentos variables de anticuerpos de cadena
pesada de *Lama glama* desplegados en fagos**

T E S I S

para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

PRESENTA:

L. C. Itzel Amaro Estrada

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Ernesto Ortiz Suri



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias

A las mujeres que a pesar de sus circunstancias, a cada instante luchan por realizar sus sueños.

A mi padrino P. Otilio Salazar, quien con su vida me enseñó la capacidad de grandeza y fortaleza de un hombre; grande, para brindarse hasta al más pequeño, y fuerte, igual para soportar el dolor más intenso que para disfrutar la calma más serena.

Agradecimientos

A los miembros del comité tutorial:

Dr. Joel Osuna Quintero y Dr. Karen Manoutcharian Airapetian, por el interés en el proyecto y los comentarios realizados para enriquecer el trabajo.

los integrantes del jurado de examen:

Dr. Mario Soberón Chávez, Dr. Jorge Luis Folch Mallol, Dra. Georgina Gurrola Briones y Dra. Liliana Pardo López, por la disposición y el tiempo dedicado a revisar la tesis y principalmente por todas las sugerencias para mejorar el escrito.

A la Dirección General de Zoológicos de la Ciudad de México por las facilidades prestadas en la obtención de la muestra sanguínea de *Lama glama* utilizada en el desarrollo del trabajo.

Al Instituto Bioclón por el apoyo otorgado.

Al CONACYT, por el apoyo económico a través de la beca No. 184793 para estudios de maestría.

Agradecimientos

A mis padres, por el regalo de la vida y por darnos siempre más de lo posible, los amo.

A Iván e Isayuvi, el orgullo y los motivos del esfuerzo diario, gracias por su alegría y su cariño.

A mi cómplice incondicional: Arturo, gracias por todo, y sobretodo por *coincidir*.

A mis familias por estar siempre conmigo.

A Ernesto, mi maestro y amigo, gracias por la confianza, las enseñanzas y por ayudarme a superar momentos difíciles de mi vida, no lo hubiera ni notado.

Al Dr. Baltazar Becerril, por permitirme formar parte de su grupo y hacerme sentir parte del mismo.

Al Dr. Lourival Possani por el gran ejemplo y la oportunidad de aprender un poco más cada día.

A la Dra. Lidia Riaño por compartirme su amplio conocimiento en la construcción de bibliotecas.

A los que brindan apoyo administrativo en el instituto, muy especialmente al Ing. Jalil, Gloria y Maribel por hacernos menos difícil eso de la burocracia.

A los que hacen que la rutina diaria deje de serlo, haciendo del laboratorio un lugar especial, a los integrantes de los grupos Becerril-Possani: Elia, Lidia G, Fernando, Lidia R, Blanca, Christian, Fredy, Gina E, Georgina, Mary, Timo, Omar, Ricardo, Chano, Linda, Pável, Oscar, Verna, Cynthia, Miriam, Rivelino, Citlalli, Vero, Martha, Brenda, Rosalba, Luis, Santos, Carmen, Marisol, Beth, Gerardo, Rita y Polo. A los ex-integrantes: América, Alma, Lucy, Paty, Sergio y María Canela.

A todos ellos, especialmente a lo que compartieron su tiempo y me regalaron su valiosa amistad.

A mis compañeros y amigos de generación: Erika, Sergio, Eugenio, Carmen, Miguel, José Luis, Sabino muy especialmente a los "de siempre", compartir esta aventura con ustedes ha sido por demás grato.

A mis amigos que nada tienen que ver con la ciencia pero que siempre han comprendido cuando

he tenido que cambiar su compañía por un experimento.

A una lista interminable de gente a la que agradezco su granito de arena, y a todos los que a mi paso por el instituto, en los cursos o en los pasillos tuvieron una sonrisa que brindarme.

A todos los que no haya mencionado, pero que saben cuan importantes son para mí.

Aún cuando esta vez decir gracias no sea suficiente, MUCHAS GRACIAS

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y BIOPROCESOS DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA DE LA UNAM, BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. ERNESTO ORTIZ SURI.

Índice general

0.1. Abreviaturas	3
0.2. Resumen	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. Anticuerpos	5
1.2. Anticuerpos de cadena pesada (HCAbs)	8
1.2.1. Origen molecular de los HCAbs	13
1.2.2. Características funcionales de los V_{HH}	14
1.3. Despliegue en fagos filamentosos	16
1.3.1. Fagos filamentosos	16
1.4. Anticuerpos desplegados en fagos	19
2. ANTECEDENTES	22
3. OBJETIVOS	25
3.1. Objetivo general	25
3.2. Objetivos particulares	25
4. MATERIALES Y MÉTODOS	26
4.1. Soluciones y medios de cultivo	26
4.2. Cepas y vectores	27
4.3. Purificación de linfocitos	27
4.4. Obtención de ARN y ADNc	28
4.5. Electroforesis de ARN	29

	2
4.6. Amplificación de V_{HH}	30
4.7. Preparación de células electrocompetentes	30
4.8. Clonación en <i>E. coli</i>	31
4.9. Lisis Alcalina	31
4.10. Rescate de la biblioteca (Producción de fago-anticuerpos)	32
4.11. Titulación de los fago-anticuerpos	33
4.12. Tamizado	33
4.13. ELISA	34
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
5.1. Construcción de la biblioteca	35
5.1.1. Clonación en XL1Blue	37
5.1.2. Caracterización de las bibliotecas	38
5.2. Despliegue de las bibliotecas	41
6. CONCLUSIONES	45
7. PERSPECTIVAS	47
Bibliografía	48

0.2. Resumen

El sistema inmune puede responder a millones de moléculas diversas generando anticuerpos con diferente grado de especificidad y afinidad. Los anticuerpos son glucoproteínas compuestas por dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas. Ambos tipos de cadenas están a su vez formadas por regiones constantes y variables, siendo estas últimas las encargadas del reconocimiento hacia su antígeno. Los camélidos, además de los anticuerpos convencionales, poseen isotipos homodiméricos funcionales de cadena pesada (HCAb) que carecen completamente de cadenas ligeras. Los dominios variables derivados de éstos (V_{HH}) conservan la capacidad de reconocimiento y sufren modificaciones para contrarrestar la ausencia de cadenas ligeras. Por un lado, las V_{HH} presentan sustituciones nucleotídicas en la región que en las VHs convencionales interactúa con el dominio VL. En general, esos cambios le dan un carácter más hidrofílico al dominio. Además, las tres asas de unión al antígeno adoptan conformaciones distintas a las estructuras clásicas y la mayoría presenta un CDR3 relativamente largo comparado con los observados en humano y ratón. Por otra parte, los fragmentos V_{HH} son fácilmente producidos por diversos microorganismos. Su estructura característica y composición naturales les dan importantes ventajas sobre otros fragmentos de anticuerpos ya que provocan poca o ninguna respuesta efectora y tienen mayor solubilidad y estabilidad. Los V_{HH} son moléculas compuestas de dominio único, siendo excelentes candidatos para la generación de agentes terapéuticos. En este trabajo, se obtuvieron dos bibliotecas no inmunes de V_{HH} a partir de sanger periférica de una ejemplar de Llama. Del tamaño y variabilidad obtenidas se propone a las librerías como potenciales fuentes de dominios específicos para diversos antígenos. Ambos repertorios de V_{HH} s fueron desplegados en fagos filamentosos M13, para lograr un vínculo directo entre el fenotipo desplegado y el genotipo correspondiente. Después de tres rondas de tamizado se aislaron dos clones con capacidad de reconocer a la fibrilla de la proteína 6aJL2 (molécula relacionada con la formación de agregados insolubles en la amilodosis AL). La obtención de estos V_{HH} ayudará a la elucidación de los mecanismos de extensión de la fibra, así como también abre la posibilidad de inhibir la formación de los agregados.

Capítulo 1

INTRODUCCIÓN

La generación de ligandos naturales de bajo peso molecular ha sido una constante necesidad en el estudio de campos como el de las interacciones moleculares, la biomedicina y, más recientemente, la proteómica. Dada la importancia que han adquirido los ensayos de unión miniaturizados en la investigación postgenómica, es en este último campo en el que mayor empuje se ha generado. Esta es un área en la que los notables avances en la tecnología de microarreglos han relegado a la generación de los ligandos a ser la etapa limitante [1, 2].

Los ligandos específicos son ampliamente utilizados, entre otros campos, en biomedicina, dirigiéndolos contra blancos celulares y humorales. En el caso de los blancos celulares se incluyen las células tumorales y otros subtipos con funcionamiento inadecuado, deficiente o desregulado. Por otro lado, dentro de blancos humorales se consideran tanto afecciones crónicas como agudas relacionadas con la presencia indeseable de determinadas moléculas en el organismo.

1.1. Anticuerpos

Desde que Köler y Milstein en 1975 desarrollaron la técnica de cultivo de poblaciones de células secretoras de anticuerpos monoclonales (mAb), los anticuerpos se han convertido en los ligandos naturales por excelencia empleándose en una amplia gama de aplicaciones.

Naturalmente, el sistema inmune puede responder específicamente a millones de moléculas diversas, generando anticuerpos con diferente grado de especificidad y afinidad, mismos que le

confieren al organismo la capacidad de contender con moléculas extrañas que pudieran alterar su funcionamiento. Sin embargo, en el uso y manipulación de estas moléculas se presentan tres principales problemas:

- Su producción en cultivos de células eucariotas es costosa, si se pretende obtener un número grande de anticuerpos.
- Su farmacocinética es lenta debido a su tamaño.
- No pueden generarse contra moléculas propias.

En el intento por solucionar estas limitaciones, se ha buscado obtener moléculas con características similares en cuanto a su capacidad de reconocimiento, pero que no presenten las desventajas mencionadas y sean fácilmente manipulables. La mayor aproximación a este comportamiento ha sido lograda con la generación de los fragmentos de anticuerpos: Fab's y scFv's (fig 1.1).

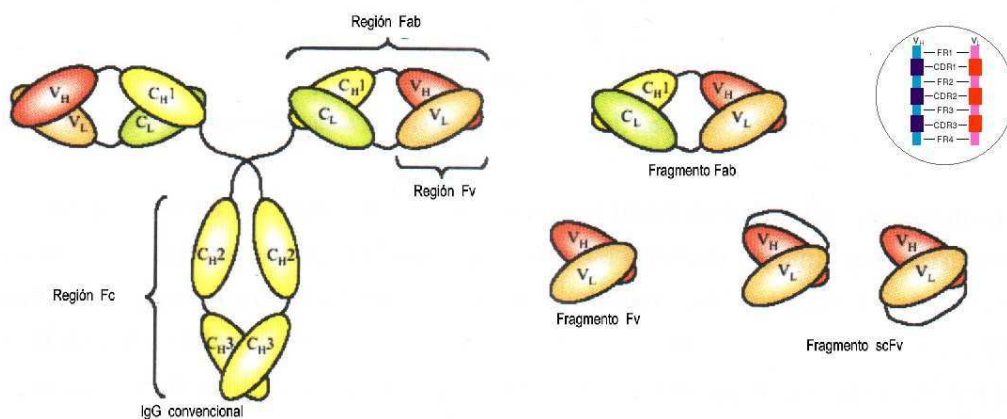


Figura 1.1: Representación de una IgG convencional y de fragmentos generados a partir de la molécula [3].

Estos fragmentos se han obtenido por dos vías, los Fab's mediante digestión enzimática (uso de papaína o pepsina) o empleando tecnologías de biología molecular en ambos casos.

Los fragmentos pueden ser expresados en bacterias y levaduras con relativa facilidad, y al conservar las regiones variables ligera (VL) y pesada (VH) exhiben esencialmente la misma especificidad por el antígeno (Ag) que los anticuerpos originales. Su menor tamaño, (Fab ~ 60kDa, scFv ~

30kDa) permite que tengan mayor acceso a los espacios extravasculares, presenten un menor tiempo de retención y sean eliminados más rápidamente de la sangre, lo cual es importante en tratamientos contra afecciones agudas. Pero lo más relevante, es que provocan muy poca o ninguna respuesta inmune al administrarse a pacientes, debido a que persisten muy poco tiempo en la circulación y a que carecen de las regiones constantes propias de los anticuerpos, las cuales están involucradas con respuestas efectoras. La tercera limitante del uso de los anticuerpos monoclonales ha sido erradicada por una poderosa metodología: el despliegue de bibliotecas de anticuerpos en fagos filamentosos.

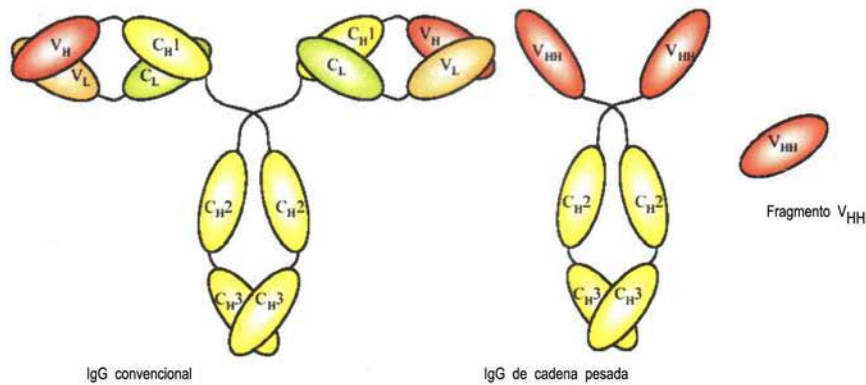


Figura 1.2: Esquema de una IgG convencional, un anticuerpo de cadena pesada (HCAbs), presente en los camélidos y su respectivo fragmento variable (V_{HH}) [3].

De manera que hasta hace unos años, estos fragmentos (scFv), parecían ser las unidades mínimas capaces de llevar a cabo un reconocimiento antígeno-anticuerpo, y es que las especies de vertebrados estudiadas hasta entonces presentan anticuerpos con una estructura básica común (fig1.1). Las inmunoglobulinas son proteínas conformadas por dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras idénticas; las regiones variables son las involucradas en el proceso de reconocimiento y cada una de ellas está compuesta por regiones de andamiaje (frameworks) y regiones hipervariables (CDR's). En general, la separación de las cadenas ligeras de sus respectivas cadenas pesadas reduce las propiedades de unión al antígeno del anticuerpo, además de propiciarse una baja solubilidad [4, 5]. Una sorprendente excepción presente en la naturaleza son las inmunoglobulinas de los camélidos (fig 1.2). La familia *Camelidae* emergió en el Eoceno, hace aproximadamente 40 millones de años. Estos animales (fig 1.3), además de las IgG heterotetraméricas convencio-

nales, poseen isotipos homodiméricos funcionales de cadena pesada que carecen completamente de cadenas ligeras, pero que sin embargo, no presentan obvias alteraciones en su capacidad de reconocimiento.



Figura 1.3: Representantes de la familia *Camelidae*, en los cuales se ha observado la existencia de HCAs. Arriba: Dromedario y camello (Asia y Africa), abajo: Vicuña, alpaca y llama (Sudamérica).

1.2. Anticuerpos de cadena pesada (HCAs)

La existencia de anticuerpos de cadena pesada ha sido establecida en los camélidos [6]. A partir de estos anticuerpos se han obtenido fragmentos funcionales constituídos de un dominio único, la región variable de la cadena pesada (llamada V_{HH} para distinguirla de las VHs convencionales). La estructura de estas moléculas es cercana a los dominios VH de anticuerpos presentes en vertebrados igualmente formados de hojas β antiparalelas organizadas en un barril β .

En general, no hay diferencias notables entre las regiones variables humanas y de camélidos (V_{HH}) en las zonas interiores del dominio ni en las vueltas de las hojas β . Sin embargo, las regiones variables que componen este tipo de anticuerpos han sufrido modificaciones estructurales para contrarrestar la ausencia de cadenas ligeras, principalmente en las regiones interfase (fig 1.4).

Por un lado, las V_{HHS} presentan sustituciones a nivel aminoácido importantes en la región del segundo framework (FR), que en el caso de las VHs convencionales interactúa con el dominio

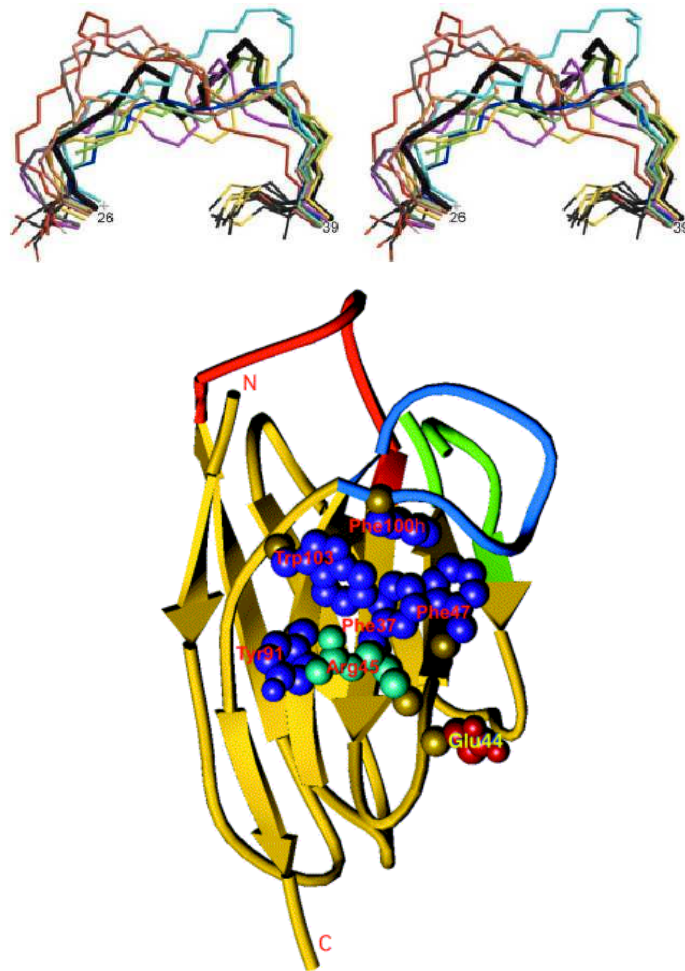


Figura 1.4: Estructura básica de un dominio V_{HH} . En el panel superior se muestra una comparación entre la región correspondiente a un CDR humano (línea negra) y CDR's cámelidos (en colores), en donde se pueden observar las diferencias estructurales y de tamaño. En el panel inferior, se muestra un dominio V_{HH} típico. En amarillo se muestran las hojas β y los CDRs 1, 2 y 3, en rojo, verde y azul respectivamente. Se resaltan los principales residuos del núcleo hidrofóbico (Phe37, Phe47, Tyr91, Trp103 y Phe100h), así como la Arg45 (cian) y Glu44 (rojo), residuos muy involucrados en la interacción teórica VH-VL [43].

VL [7, 8, 9]. Análisis cristalográficos revelaron que Val37, Gly44, Leu45 y Trp47, residuos muy conservados en la VHs, forman un cluster y hacen importantes contactos hidrofóbicos con las VLs [10, 11]. Precisamente, sustituciones que se encuentran muy conservadas en la llama son Val37Phe(Tyr), Gly44Glu(Gln), Leu45Arg, Trp47Gly(Ser, Leu, Phe) [12, 13, 14], las cuales le dan un carácter más hidrofílico a la región, que ahora no tiene contacto con su contraparte ligera.

Los aminoácidos Gln39, Tyr91, Trp103, Gln105 están de igual manera involucrados en la aso-

ciación VH-VL, y aún cuando en la llama, se encuentran casi conservados, en los casos en que han sido modificados, los cambios han sido hacia residuos más hidrofílicos, algunas sustituciones encontradas son Tyr91Ser, Tyr91Thr y Trp103 que comúnmente es sustituido por un residuo más hidrofílico [13]. Estos cambios no se observan en VHs de camélidos, lo cual confirma su asociación con los dominios de la cadena ligera.

Por otra parte, la Leu 11 de las VHs humanas es un posición muy conservada e importante en la movilidad del anticuerpo, éste residuo tiene contacto con Phe149 y Pro150 del dominio CH1 [11]. En dromedarios, en esta posición se encuentra una serina, que es un residuo más pequeño e hidrofílico; aunque en las llamas dicha sustitución no es tan consistente como en dromedarios, sí ocurre en la mayoría de V_{HHS} reportadas.

La presencia de HCAs en el suero de los camélidos ha sido observada en diferentes proporciones de acuerdo a la especie. En camellos y dromedarios representan hasta el 75 % de anticuerpos en sangre periférica, mientras que en las llamas sólo es alrededor del 35 %. Aún cuando los fragmentos V_{HHS} han mostrado tener propiedades similares sin importar la fuente de donde sean aislados, existen ciertas diferencias entre las secuencias aisladas de camellos o llamas (fig 1.5).

Las regiones bisagra (regiones de unión con el dominio CH2) de los anticuerpos de cadena pesada de las llamas presentan diferencias respecto a las de humano, ratón y otros camélidos [13]. En base a las diferencias, en una especie de llama (*L. peruviana*) se identificaron 5 diferentes isotipos: IgG1a, IgG1b, IgG2a, IgG2b e IgG3. En el caso de IgG1a e IgG1b, la VH está seguida del dominio CH1, lo que revela que los elementos de esa familia son derivados de anticuerpos con estructura convencional. En tales casos, el dominio CH1 es similar al presente en humanos, posee una cisteína en la posición 127, la cual forma un enlace disulfuro entre la cadena pesada y la cadena ligera, quedando clara la interacción entre ambos dominios. La bisagra IgG1 comprende 19 (IgG1a) ó 12 (IgG1b) residuos. Los 5 primeros aminoácidos y al menos los 5 últimos de IgG1a de llama son idénticos a la familia IgG3 humana, a excepción de una sustitución Lys/Arg [11]. Para el caso en que la región variable está seguida inmediatamente por la bisagra, se han encontrado dos familias, las que presentan bisagras cortas (IgG3) y la de bisagras largas (IgG2). La familia IgG3 consta de 12 residuos y es idéntica a la reportada para los camellos [6]. La bisagra larga

(35 aa) es igual a la familia IgG2 de dromedario. La más abundante en llamas, de 29 aa no ha sido identificada en otros camélidos. Para el caso de *L. glama*, se confirmó la existencia de los isotipos, a excepción de la IgG2a que no fue identificada. En cambio, se encontró un isotipo de bisagra corta (IgG3) completamente diferente a las reportadas en otros camélidos, ésta, llamada IgG3b contiene 15 residuos, dos de los cuales son cisteínas [12].

I) Secuencias de bisagra larga (IgG2)

<i>L. glama</i>	IgG2b	EPKTPPKPQPKPQPKPQ-----PNPTTESK	--CPKCP	APELLGGP
<i>L. peruviana</i>	IgG2b	EPKTPPKPQPKPQPKPQ-----PNPTTESK	--CPKCP	APELLGGP
<i>C. dromedarius</i>	IgG2	EPKIPQPKPQPKPQPKPQPKPQPKPEPE--	CTCPKCP	APELLGGP
<i>L. peruviana</i>	IgG2a	EPKIPQPKPQPKPQPKPQPKPQPKPEPE--	CTCPKCP	APELLGGP

II) Secuencias de bisagra corta (IgG3)

<i>L. glama</i>	IgG3b	AHSEDP-----	SKCPKCP	GPELLGGP
<i>L. peruviana</i>	IgG3a	GTNEV-----	CKCPKCP	APELPGGP
<i>C. dromedarius</i>	IgG3	GTNEV-----	CKCPKCP	APELPGGP

III) Secuencias de IgG convencional (IgG1)

<i>L. glama</i>	IgG1a	ELKTPQPKPQPE-----	CRCPKCP	APELLGGP
<i>L. peruviana</i>	IgG1a	ELKTPQPKPQPE-----	CRCPKCP	APELLGGP
<i>L. glama</i>	IgG1b	EPHGG-----	CTCPQCP	APELPGGP
<i>L. peruviana</i>	IgG1b	EPHGG-----	CTCPQCP	APELPGGP
Humano	IgG1	EPKSCDKTHT-----	--CPPCP	APELLGGP



Figura 1.6: Comparación de las secuencias de regiones bisagras (*hinge*) identificadas en llamas y dromedarios. También se muestra la región amino-terminal del dominio CH2. [12, 13]

En principio, la ausencia del dominio VL y por tanto sus tres CDRs reduce a la mitad el potencial de unión al antígeno de un HCAb; sin embargo, se ha visto que los CDRs también sufren modificaciones que conllevan a una capacidad de reconocimiento similar e incluso ventajosa de los V_{HHS} . Las tres asas (H1, H2, H3) que se unen al antígeno en los HCABs adoptan conformaciones nuevas, distintas a las estructuras clásicas reportadas para anticuerpos humanos y de ratón (fig1.4, panel superior) [30, 18, 17]. En humano y ratón, las asas de unión al antígeno de los VH pueden tomar un número limitado de conformaciones (estructuras canónicas) dependiendo de su longitud y la presencia de residuos específicos en ciertas posiciones. Adicionalmente, la mayoría

de los V_{HHS} presentan un CDR3 relativamente largo (promedio de 17aa en comparación con 12 y 9 aa que corresponden a humano y ratón). Además la presencia de una cisteína extra en muchos de los casos (especialmente en CDRs muy largos), sugiere que contienen un segundo puente disulfuro que contribuye a la estabilización del CDR3 largo. En el caso de la llama, los V_{HHS} que contienen una cisteína en la asa CDR3, tienen otra en las asas CDR1 o CDR2. Los dominios de bisagra larga (IgG2) presentan la cisteína en la posición 50, mientras que aquellas con bisagra corta (IgG3) en la posición 33. El estudio de estas posiciones indica que las cadenas laterales están orientadas hacia el CDR3, lo que es compatible con la formación de un enlace disulfuro inter-CDRs [13, 7]. En las clonas de las regiones variables que contienen el exón CH1, sólo se observó una cisteína en el CDR3 y ninguna en los otros CDRs, de manera que esos dominios únicamente pueden formar un puente disulfuro si se encuentra la VL y ésta contiene una cisteína.

1.2.1. Origen molecular de los HCAbs

Los V_{HHS} son codificados por un grupo de genes de línea germinal diferente al codificante de las VHs, a la fecha se han identificado alrededor de 40 genes de V_{HHS} , los cuales parecen ser duplicaciones recientes de los VHs dirigidos por dos vías:

- Selección positiva en las regiones de unión antígeno-anticuerpo debido a la necesidad de unir a un cierto espectro de epítopes.
- Influencia de selección positiva o selección de purificación en cada codón de V_{HH} en comparación con los de un VH.

Los cambios evolutivos de los V_{HHS} no son exactamente los mismos que en los VHs, hay tres principales diferencias respecto a la selección positiva [16]:

Los genes de los FRs de V_{HHS} parecen haber experimentado proporciones más grandes de cambios no sinónimos que los VHs, el FR2 mostró las mayores diferencias entre V_{HH} y VH. En el FR2 de VH, la mayoría de sustituciones fueron sinónimas, contrario a los V_{HHS} en donde hubo más cambios no-sinónimos, especialmente en las posiciones 40, 41, 44, 47 y 48. Lo anterior puede explicarse considerando que los FR2 de VHs contienen sitios importantes de contacto con las

VLs; tomando en cuenta que en los V_{HH} no hay tales restricciones funcionales, estas posiciones pueden cambiar a otras y lo hacen a residuos hidrofílicos.

Otra diferencia fue observada en la región que precede al FR2, incluyendo el inicio del CDR1 (posiciones 24-32). Hubo más cambios no-sinónimos en V_{HHS} que en VHs. Dicha región corresponde al asa H1. Estudios cristalográficos de V_{HH} -antígenos muestran que los aminoácidos de esta región interactúan con los antígenos [8, 20, 21]. Estos cambios pueden reflejar una expansión del repertorio de unión al antígeno de los HCAb para compensar la pérdida de los tres CDR's de la VL.

En tercer lugar, hay una diferencia observada en la posición 14, la cual está bien conservada en los genes VH y ha sido objeto de selección positiva en los V_{HHS} . Se encontró que la mayoría de sustituciones no-sinónimas en este sitio son más bien conservativas, probablemente la prolina es el residuo ancestral en esta posición, dado que se encuentra en la gran mayoría de miembros de la familia VH3 humana y en los VH de camello. En los V_{HHS} , los aminoácidos que reemplazan a la prolina son pequeños y neutros (Ala, Ser, Thr). Este sitio parece estar localizado en la región opuesta al sitio de reconocimiento y muy cercano a una región hidrofóbica que tiene contacto con la región CH1 que no se encuentra en los HCAs.

A pesar de la ausencia del dominio C_{H1} en los anticuerpos de cadena pesada, la determinación de la secuencia nucleotídica completa del gen de la región constante de la cadena pesada $2\gamma_a$ indicó que el dominio C_{H1} está presente en el gen, pero con una mutación en la frontera 5' del intrón que le sigue, lo que hace que el aparato de splicing elimine totalmente el dominio C_{H1} en el mRNA de la cadena pesada $2\gamma_a$ de los camélidos [22, 23].

1.2.2. Características funcionales de los V_{HH}

Debido a los cambios presentes en secuencia y estructura, los fragmentos variables derivados de anticuerpos de cadena pesada (V_{HH}) han sido fácilmente producidos como proteínas recombinantes en microorganismos como *E. coli*, *P. pastori* y *S. cerevisiae*, obteniendo rendimientos de hasta $\sim 100\text{mg/L}$ [24, 3, 25]. Una característica de estas proteínas que ha llamado poderosamente la atención debido a la naturaleza de los anticuerpos y sus potenciales usos, es su mayor solubilidad

y menor tendencia a la agregación, además tienen mayor estabilidad y capacidad para recuperar su actividad después de sufrir desnaturalización por calor o agentes químicos [26, 42, 28].

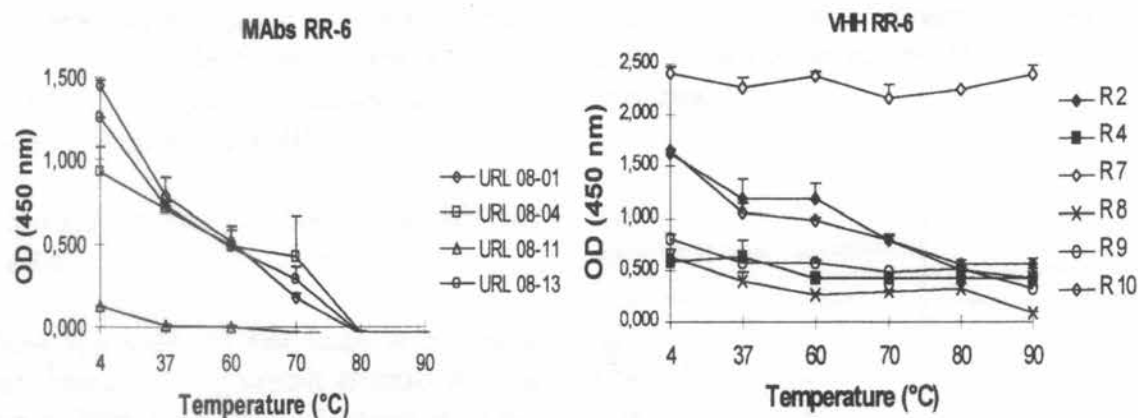


Figura 1.7: Desnaturalización por calor. Se muestra el comportamiento de anticuerpos monoclonales (izquierda) y V_{HHS} de llama (derecha), al someterlos a diferentes temperaturas se observa que los V_{HHS} son más resistentes al aumento de temperatura, conservando su actividad aún a valores cercanos a 90°C [42].

Los fragmentos producidos son resistentes a desnaturalización por calor a temperaturas de hasta 90°C (fig1.7), además de exhibir un proceso de desplegamiento de dos estados y completamente reversible. Ensayos hasta con 10M de urea y 7M de cloruro de guanidinio, muestran que desnaturalización por agentes químicos es también un proceso reversible.

Sin embargo, los cambios estructurales que confieren estas propiedades, parecen no afectar su capacidad de reconocimiento, a diferencia de los VH humanos, los cuales si bien pueden retener una porción significativa de la afinidad original por un cierto antígeno [29], han mostrado problemas críticos, tales como:

- a) Baja producción por bacterias
- b) Dificultades en la purificación
- c) Baja solubilidad que impide su producción en gran escala

La mayoría de esos problemas fueron probablemente debidos a la exposición al solvente de regiones hidrofóbicas localizadas en los VH, que originalmente estarían en contacto con la VL. A diferencia de estos casos, se han obtenido V_{HH} de bibliotecas inmunes o no inmunes altamente específicos para una variedad de antígenos [21].

En resumen, las regiones variables son los fragmentos más pequeños de su tipo (12-16kDa) y son los V_{HH} los que ofrecen especiales ventajas sobre otros fragmentos de anticuerpos en cuanto a niveles de expresión, tamaño y estabilidad, así como en la oportunidad de generar construcciones bivalentes o inmunoconjugados [25, 34], dado que de manera natural no interactúan con la cadena ligera, lo que les confiere mayor estabilidad y solubilidad intrínsecas, que sin duda representa una ventaja para su obtención como proteínas solubles. Además, debido a su tamaño y la longitud de los CDRs, es posible el reconocimiento de epítopes pobremente inmunogénicos y menos accesibles para anticuerpos convencionales. Un ejemplo importante ha sido la obtención de ligandos contra enzimas, los cuales en su mayoría actúan como potentes inhibidores [31, 32, 33]. Este comportamiento parece deberse a la estructura adoptada por el CDR3 que sobresale del resto de la superficie de unión al antígeno, el cual penetra en el sitio activo de la enzima mimetizando al sustrato original.

1.3. Despliegue en fagos filamentosos

La técnica de despliegue en fagos, comienza en 1985, cuando Smith [35] demostró que el genoma de los fagos filamentosos podía ser manipulado para obtener partículas que llevaran fusionados a sus proteínas superficiales, péptidos que podían ser reconocidos por un anticuerpo. Gracias a las técnicas que utilizan el despliegue de péptidos y proteínas en la superficie de bacteriófagos se ha logrado tanto la construcción de bibliotecas de una enorme diversidad molecular, como la selección de moléculas con propiedades predeterminadas. Utilizando la tecnología de ADN recombinante se pueden generar bancos de cientos de millones de péptidos, en los que cada fago despliega una única variante. La principal ventaja de esta técnica es que proporciona un vínculo directo entre el fenotipo y el genotipo, ya que cada fago porta en su genoma el ADN codificante para la proteína desplegada.

1.3.1. Fagos filamentosos

Los fagos filamentosos están constituidos por una envoltura proteica tubular que envuelve a la molécula de ADN circular de cadena sencilla de 6.4 kb. Son fagos no líticos. Un ejemplo es el

fago M13, cuyo genoma codifica para 10 proteínas. La partícula viral mide 900 nm de largo y 6.5 nm de diámetro y está constituida por cinco proteínas pIII, pVI, pVII, pVIII y pIX. Las dos primeras se encuentran en la región proximal, pVII y pIX en el otro extremo y pVIII es la proteína más abundante en la cubierta.

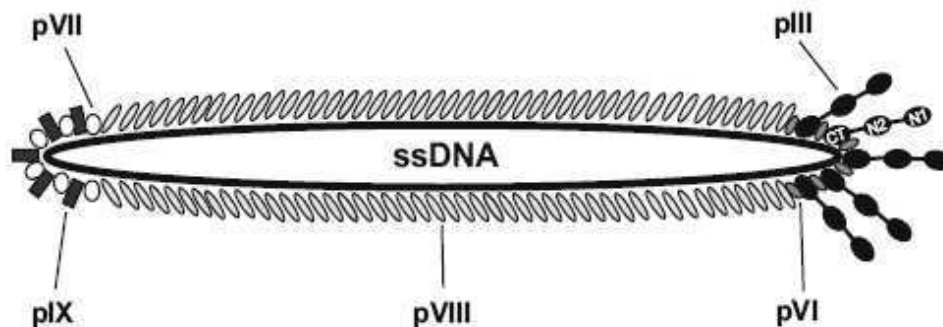


Figura 1.8: Esquema de un fago filamentoso. El genoma de la partícula viral está encapsulado en una forma cilíndrica de aproximadamente 930 nm y a lo largo de la cubierta se encuentran alrededor de 2,700 copias de pVIII. En uno de los extremos se observan de tres a cinco copias de las proteínas pVII y pIX. En el otro extremo se encuentran cinco copias de pIII y pVI [39].

Estos virus son capaces de infectar únicamente a bacterias que expresan pilus, codificado por el factor F', a través de la unión de pIII con esta estructura. Debido a la existencia de sólo unas pocas moléculas de pilus por célula y a la pequeña área de contacto con el pilus, la eficiencia de infección de un cultivo se mejora al utilizar altas multiplicidades de fago por célula y en altas densidades celulares. Sin embargo, la infección debe realizarse antes de que el cultivo alcance la fase estacionaria, debido a que en dicho estado de crecimiento la expresión del pilus disminuye y por lo tanto, la infectividad decae significativamente. La proteína pIII del fago consta de 406 residuos y tres dominios: N1, N2 y CT (fig.1.8 unidos por conectores flexibles. La infección comienza cuando el dominio N2 de pIII se une al extremo del pilus. Enseguida del contacto, se lleva a cabo la disociación de N1 y N2, el pilus se retrae y el genoma viral se trasloca al citoplasma de la bacteria, en donde la cadena de ADN con la misma polaridad que el mRNA es llevada a una forma superenrollada de doble cadena (forma replicativa), proceso a cargo de las RNA, DNA polimerasas y topoisomerasas de la bacteria. La forma replicativa sirve como templado para la expresión de los genes del fago y así da lugar a las proteínas de ensamble de nuevas partículas

virales (fig1.9).

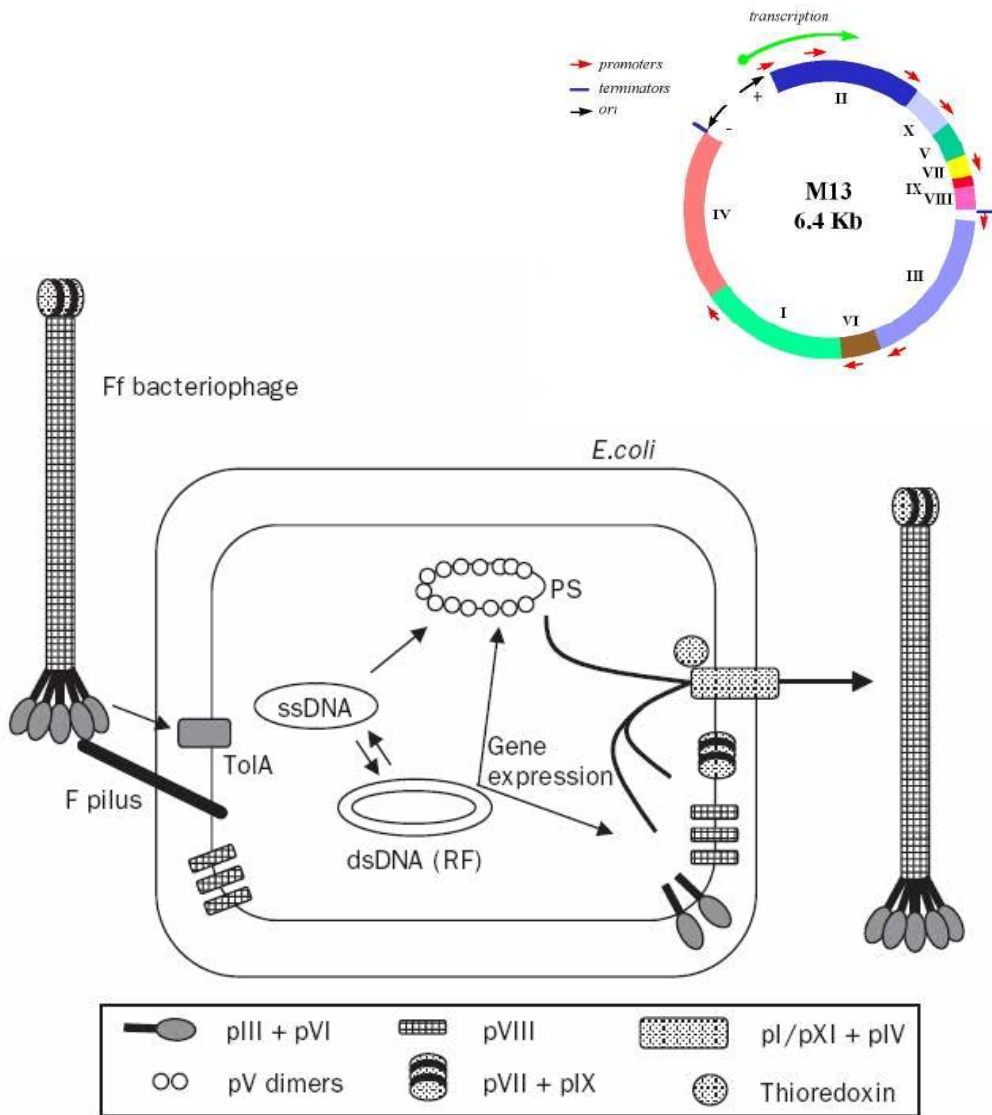


Figura 1.9: Ciclo de vida del fago M13 posterior a la infección de *E. coli*. En la parte superior se muestra el mapa del fago M13 [36].

Todas las proteínas son sintetizadas simultáneamente, pero diversos mecanismos aseguran que se produzcan en la proporción adecuada. El ensamble del fago ocurre en la membrana citoplásmica y los fagos son secretados de las células en cuanto se ensamblan. La primera progenie de partículas virales aparece en el sobrenadante en los 10 minutos posteriores a la infección (a 37°C). El número de fagos incrementa exponencialmente por alrededor de 40 minutos, de manera que

una célula produce aproximadamente 1000 partículas durante la primera hora después de la infección; pasado ese tiempo, la tasa de crecimiento tiene un comportamiento lineal. De hecho, en condiciones óptimas de cultivo, las células infectadas pueden producir fagos indefinidamente.

1.4. Anticuerpos desplegados en fagos

Existen dos vías por las cuales llevar a cabo el despliegue de péptidos y proteínas, la primera en que el ADN deseado es clonado directamente en el genoma viral (en el extremo amino de las proteínas del fago). La segunda vía consiste en utilizar un plásmido modificado (fagémido) que contiene además del origen de replicación bacteriano (para la producción del plásmido), un origen del fago (que permite la replicación viral), también tiene el gen de la proteína utilizada para el despliegue, un promotor y un gen de resistencia hacia un antibiótico para su fácil selección.

Las cinco proteínas de la cápside del fago han sido utilizadas para el despliegue de péptidos o proteínas (cuadro 1.1). Generalmente, el uso de una u otra depende del tipo de molécula a desplegar y pIII y pVIII son las comúnmente utilizadas para estos fines. pIII es la proteína que más se usa para el despliegue debido a que permite inserciones de mayor tamaño, da la posibilidad de despliegue monovalente y por la amplia disponibilidad de vectores compatibles con esta proteína.

Cuando se utilizan vectores virales, la secuencia de interés es insertada directamente en la secuencia que codifica para pIII u otra proteína de la cápside. Cuando el genoma es introducido en *E. coli*, los fagos se producirán de tal manera que todas las copias de la proteína con la que se realizó la fusión desplegarán la proteína heteróloga, lo cual significa un despliegue polivalente. En el uso de un fagémido, el material a desplegar será clonado en el plásmido bajo un promotor débil. Una vez que las bacterias son transformadas con el fagémido, son infectadas con un fago ayudador (el cual contiene la maquinaria para expresar las proteínas de empaquetamiento, pero con replicación menos eficiente que el fagémido). Las células infectadas expresan todas las proteínas del fago silvestre, codificadas en el genoma del fago ayudador, así como la proteína de fusión codificada

Gen	Proteína	Tamaño (aa)	Función	Localización	¿Utilizada para despliegue?
I	I	348	Ensamble	Membrana interna	
	XI	108	Ensamble	Membrana interna	
II	II	409	Replicación (nicasa)	Citoplasma	
	X	111	Replicación	Citoplasma	
III	III	406	Componente del virión	Virión (extremo terminal)	SI (N-terminal)
IV	IV	405	Ensamble	Membrana externa	
V	V	87	Replicación (ssDNA)	Membrana externa	
VI	VI	112	Componente del virión	Virión (extremo terminal)	SI (C-terminal)
VII	VII	33	Componente del virión	Virión (extremo inicial)	SI (N-terminal)
VIII	VIII	50	Componente del virión	Filamento	SI (N- y C-terminal)
IX	IX	32	Componente del virión	Virión (extremo inicial)	SI (N-terminal)

Cuadro 1.1: Tabla de proteínas de la cápside del fago [36]

por el fagémido. Debido a que la información del fago ayudador es pobremente empaquetada, se puede considerar que casi todas las partículas producidas contienen la información del fagémido. Las ventajas de este sistema son, el tamaño y la fácil manipulación del vector comparado con la dificultad de clonar el material en los vectores virales sin alterar la compleja estructura de su genoma. Por otro lado, si se requiere realizar una selección que refleje afinidad real por un cierto ligando, se debe obtener un despliegue monovalente, como el logrado con el fagémido y pIII.

Una de las aplicaciones más poderosas del despliegue en fagos se ha visto reflejada en la ingeniería de anticuerpos, ejemplo de ello son fragmentos Fab y scFv que han sido expresados en la superficie de partículas virales M13 sin pérdida aparente de la afinidad o la especificidad del anticuerpo. Ha sido posible aislar moléculas con afinidades equiparables a las obtenidas mediante uso de hibridomas, a partir de bibliotecas inmunes o no inmunes. Las regiones codificantes para las cadenas VH y/o VL pueden ser obtenidas a partir de ADNc de animales inmunizados o no inmunizados, o incluso de los genes de línea germinal. Los genes codificantes para las cadenas variables (en nuestro caso V_{HH}), son clonados en el amino terminal del gen III, logrando así el despliegue de estas proteínas. Después, el repertorio desplegado es sometido varias rondas de tamizado, en el cual se inmoviliza un antígeno y se pone en contacto con la población de fagos, por

medio de lavados se eliminan aquellos que portan las proteínas sin capacidad de reconocimiento por el antígeno. Los que resultan con una cierta afinidad son seleccionados, y dado que se tiene una relación directa entre el fenotipo y el genotipo, los fagos aislados contienen el gen que codifica para el fragmento de anticuerpo desplegado. Además, se ha logrado incrementar los valores de la afinidad al utilizar al anticuerpo seleccionado como templado para la construcción de una nueva biblioteca, en estos casos se introducen mutaciones que generen variabilidad, el nuevo repertorio es desplegado en fagos y se vuelve a proceder con las rondas de selección. En muchos aspectos la respuesta inmune natural puede ser simulada por el despliegue de anticuerpos realizada por los fagos manipulados. Por ejemplo, la producción de anticuerpos dirigida por antígenos se puede equiparar a la selección de ligandos de alta afinidad de los bancos de fagos, así como los fenómenos de mutación somática que conllevan al incremento en la afinidad por el epítipo pueden simularse con la introducción de mutaciones en las regiones determinantes de complemento de los anticuerpos desplegados [36, 37], lo cual puede modificar o mejorar la capacidad de reconocimiento de la molécula.

Capítulo 2

ANTECEDENTES

Los anticuerpos son las moléculas más ampliamente involucradas en procesos de reconocimiento, de la misma manera como se observado con los fragmentos derivados de éstos. Además, se ha observado que péptidos derivados de anticuerpos pueden también ser funcionales. A partir de un fragmento scFv específico para el péptido A β 42 (involucrado en la formación de placas amiloides presentes en la enfermedad de Alzheimer) se realizó la síntesis de un péptido de 15 residuos basado en el CDR3 del fragmento. En dicho estudio se demostró que el péptido tiene el mismo patrón de reconocimiento que el scFv [38], lo que representa una gran ventaja en el uso médico si se toma en cuenta que un péptido de este tamaño no generaría respuesta alguna en el paciente. La obtención de unidades pequeñas capaces de reconocer una molécula específicamente representa la posibilidad de manipularlas y utilizarlas en diversos campos. De manera que la obtención de repertorios de V_{HHS} (inmunes o no inmunes), abre la posibilidad de contar con moléculas que específicamente reconocen un gran espectro de epítopes (proteínas extra e intracelulares, haptenos, e incluso sitios catalíticos), y no presentan las desventajas propias de un anticuerpo convencional. Además se puede pensar en obtener péptidos que al ser derivados de éstos reconozcan y funcionen de la misma manera.

Moléculas como los V_{HHS} son ejemplo de ello y entre sus principales características que pueden ser explotadas para fines de uso biotecnológico, se encuentran:

- a) Menor tamaño que otros fragmentos Fv.

- b) Solubles en medios acuosos.
- c) Facilidad y bajos costos de expresión y purificación.
- d) Funcionales a y después de ser expuestos a altas temperaturas.
- e) Resistencia a condiciones químicas que desestabilizarían a otro anticuerpo.
- f) Capacidad de reconocimiento y afinidad por un antígeno determinado tan alta como la de un anticuerpo monoclonal.
- g) Posibilidad de obtener diversidad de dominios sin la necesidad de contar con bibliotecas muy grandes.

Tales propiedades, promueven a estos dominios como valiosas herramientas para numerosas aplicaciones [41, 42, 43, 44], entre otras:

- Como reactivos en técnicas de inmunodiagnóstico.
- En la purificación de proteínas.
- Como inhibidores y reguladores enzimáticos.
- Por ser resistentes a procesos de pasteurización, pueden agregarse a leches suplementadas con V_{HH} para protección contra enfermedades gastrointestinales infecciosas.
- En terapia antitumoral, como transportadores específicos de drogas al tumor.

Aún cuando las llamas y dromedarios están geográficamente separados y han evolucionado independientemente, se ha observado que el suero de todas las especies contienen anticuerpos de cadena pesada. Si embargo, han sido las llamas las más atractivas para los potenciales usos, debido a que son animales de menor tamaño, más fáciles de inmunizar y criar en diferentes condiciones climáticas.

.

Capítulo 3

OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Construir y caracterizar una biblioteca multipróposito de regiones variables de anticuerpos de cadena pesada de llama desplegados en fagos filamentosos.

3.2. Objetivos particulares

1. Aislar linfocitos de sangre periférica de llama (*Lama glama*).
2. Purificar ARN total a partir de los linfocitos y amplificar por RT-PCR el repertorio de V_{HHS} .
3. Clonar el ADNc de las V_{HHS} en el vector para despliegue en fagos.
4. Transformar las bacterias y recuperar los fagos.
5. Caracterizar el banco en cuanto a diversidad y tamaño.
6. Realizar rondas de tamizado contra algún antígeno.

Capítulo 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Soluciones y medios de cultivo

LB (1L: 10g bacto-triptona, 5 g extracto de levadura, 5g NaCl, pH 7.0)

2xYT (1L: 16g bacto-triptona, 10g extracto de levadura, 5g NaCl, pH 7.0)

SB (1L: 35g bacto-triptona, 20g extracto de levadura, 5g NaCl, pH 7.5)

SOB (1L: 5g bacto-triptona, 1.25g extracto de levadura, 0.125 g NaCl, 2.5 ml KCl 0.25 M, pH 7.0)

SOC (10.2 ml: 10 ml SOB, 0.1 ml glucosa 2M, 0.1 ml MgCl₂ 1M)

PBS 10X (1 L: 14.4g Na₂HPO₄, 2.4g KH₂PO₄, 80g NaCl, 2g KCl, pH 7.4)

Amortiguador MOPS 10X (0.02M MOPS, 0.05M acetato de sodio, 0.005M EDTA, pH 7)

Mezcla desnaturalizante (100 μ l: 64.6 μ l formamida, 22.6 μ l formaldehído, 13 μ l Amortiguador MOPS 10X)

Mezcla de corrida de ARN: (50 % de glicerol, 0.3 % azul de bromofenol). Agregar 5 μ l de bromuro de etidio (5 μ g/ml) por cada 100 μ l de la mezcla anterior.

Amortiguador de carbonatos (250 ml: 1.32g Na₂CO₃, NaHCO₃, pH 9.6)

Lisis alcalina:

Solución I (100 ml: 0.9g dextrosa, 2 ml EDTA 0.5M pH 8, 1.25 ml Tris 2M pH 8)

Solución II (10 ml: 1 ml SDS 10%, 0.2 ml NaOH 10N)

Solución III(100 ml: 60 ml acetato de potasio 5M, 40 ml ácido acético)

4.2. Cepas y vectores

- *Escherichia coli*

XL1-Blue: *recA1 endA1 gyrA96 thi – 1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F'proAB lacI^qZDM15 Tn10 (Tet^r)]*

- pSyn2: Fagémido que presenta un sitio de clonación flanqueado por los sitios de restricción de las enzimas SfiI y NotI seguido de secuencia c-myc que permite el reconocimiento de la molécula mediante ensayos de ELISA. En seguida se encuentra un codón de paro ámbar al que sigue la proteína III del fago filamentosos. Esta disposición permite que el fragmento clonado pueda ser expresado como fago-anticuerpo asociado a la proteína III del fago. Posee un gen que le confiere resistencia a ampicilina y un péptido señal que permite el paso de la fusión del citoplasma al periplasma celular. Además presenta un origen de replicación para *E. coli* y otro para el fago M13 (fig 4.1).

- Fago Ayudador M13K07 (New England Biolabs): Derivado del fago M13. Presenta resistencia a kanamicina.

4.3. Purificación de linfocitos

Se colectaron 250 ml de sangre periférica de llama.

La población de células mononucleadas, entre ellas los linfocitos se separaron de los demás componentes por gradiente de centrifugación. Por cada 10 ml de sangre diluidos 1:1 con PBS 1X (pH 7.4), se agregaron 3 ml de Ficoll-Paque (Amersham Biosciences) en el fondo del tubo. La muestra se centrifugó a 1300 rpm, sin freno durante 25 min, a temperatura ambiente. Se recuperó la interfase, en donde se encuentra la población de células mononucleadas. A esta fracción se agregó PBS 1X hasta un volumen de 40 ml, centrifugando a 1300 rpm durante 10 minutos, se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 2 ml de PBS, realizando dos

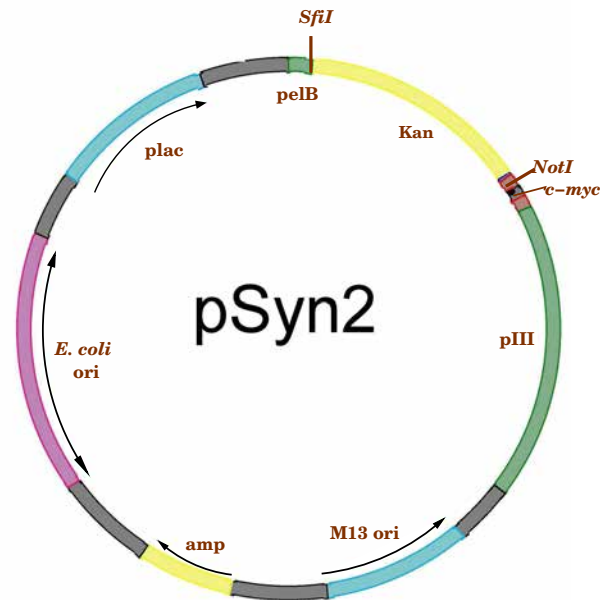


Figura 4.1: Fagémido pSyn2 utilizado para la clonación y el despliegue del repertorio obtenido.

lavados por centrifugación a 2000 rpm durante 5 minutos. A las células obtenidas se le agregó solución desnaturalizante, previo a la extracción de ARN.

4.4. Obtención de ARN y ADNc

El ARN se aisló de acuerdo al protocolo del Kit RNAgents Total RNA Isolation System (Promega). A partir del ARN purificado, se obtuvo el ADNc por medio de una reacción de transcriptasa reversa (1st Strand cDNA synthesis Kit, Roche):

Reactivo	Volumen (μ l)	Concentración final
Buffer 10X	2	1X
MgCl ₂ 25 mM	4	5mM
dNTPs	2	1mM
Oligo (hexámeros aleatorios)	2	0.2 μ g/ μ l
Inhibidor de RNAsa	1	50 unidades
Reverso transcriptasa AMV	0.8	20 unidades
Agua	Variable	—
ARN total	Variable* ($\leq 1\mu$ g)	—
(*)El volumen de ARN utilizado depende de la concentración.		

La reacción se llevó a cabo en un termociclador en las siguientes condiciones:

Temperatura ($^{\circ}$ C)	Tiempo (min)
25	10
42	60
99	5
4	5

4.5. Electroforesis de ARN

Para un gel de 30 ml: se disolvieron 0.3 g de agarosa en 24 ml de agua. Cuando la mezcla estuvo a 60 $^{\circ}$ C se adicionaron 3 ml de MOPS 10X y 3 ml de formadehído. Para la muestra: se ajustó el volumen de ARN a 4 μ l, se agregaron 1.5 μ l de mezcla desnaturizante (recién preparada), se incubó a 65 $^{\circ}$ C durante 2 minutos e inmediatamente se dejó en hielo, pasados dos minutos se adicionaron 1.5 μ l de mezcla de corrida. El gel se corrió en MOPS 1X a 100V durante 10 minutos, después a 65V por aproximadamente 40 minutos o hasta que el azul de bromofenol haya migrado a la mitad del gel. Al final de la corrida se colocó el gel en agua durante 5 minutos para eliminar el exceso de bromuro de etidio

4.6. Amplificación de V_{HH}

El repertorio de V_{HHS} fue amplificado por PCR con Vent polimerasa (New England Biolabs), utilizando el oligo VH1Back 5'-AGG TSM ARC TGC AGS AGT CWG G-3' (S \equiv C o G, M \equiv A o C, R \equiv A o G, W \equiv A o T) [45] y uno de los dos oligos específicos para la bisagra de HCabs, Lam07(5'-AAC AGT TAA GCT TCC GCT TGC GGC CGC GGA GCT GGG GTC TTC GCT GTG GTG CG-3') y Lam08(5'-AAC AGT TAA GCT TCC GCT TGC GGC CGC TGG TTG TGG TTT TGG TGT CTT GGG TT-3') [12] (Sitio NotI subrayado), en las siguientes condiciones:

Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
94	5 minutos	1
94 - 50 - 72	30seg - 40seg - 40seg	30
72	5 minutos	1

Posteriormente, se realizó otra reacción de PCR para introducir el sitio de restricción de SfiI (subrayado), usando el oligo Lam01(5'-GAG AGA GAG AGA GAG GCC CAG CCG GCC ATG GCC GAT GTS CAG CTG CAG SMR TCD GG-3'). Las condiciones de PCR, fueron las mismas que la primera amplificación, excepto para la temperatura de apareamiento, que fue de 55°C. Los fragmentos de \sim 450pb, se purificaron con el kit QIAquick Gel extraction, QIAGEN y se digirieron con la enzimas de restricción SfiI y NotI (New England Biolabs) secuencialmente. El fagémido pSyn2, fue digerido con las mismas enzimas.

4.7. Preparación de células electrocompetentes

Se inocularon 10 μ l de células XL1Blue en 20 ml de medio LB suplementado con Tetraciclina(15 μ g/ml), se incubó a 37°C, 250 rpm, durante toda la noche. Al día siguiente, 5 ml de ese cultivo fueron inoculados en 500 ml de medio SB, incubando a 37°C, 250 rpm, hasta obtener una D.O.₆₀₀ de 0.6-0.8. Los cultivos fueron centrifugados a 3500 rpm durante 15 min. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron cuidadosamente en 150 ml de HEPES 1 mM. Se centrifugó a 4500 rpm , 15 min. Al final se desechó el sobrenadante y el pellet fue recuperado en 100 ml

de glicerol 10%. Se llevó a cabo un tercer paso de centrifugación, 4500 rpm. 15 min, después de eliminar el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en 20 ml de glicerol al 10%. En tubos Oak Ridge se centrifugaron a 4700 rpm, 15 min. Se eliminó el sobrenadante y las células recuperadas se resuspendieron en 1 ml de glicerol al 10%. La suspensión fue alicuotada en volúmenes de 100 μ l, los cuales fueron almacenados a -70°C . Una alícuota fue electroporada con 10 μ l de pUC19 (1ng/ μ l) para determinar la eficiencia de transformación de las células.

4.8. Clonación en *E. coli*

Se realizó la ligación del vector digerido en relación molar 1:3 (vector:inserto) con las V_{HHS} durante 12 horas a 16°C utilizando T4 DNA Ligase (New England Biolabs). Se hizo una extracción con un volumen de fenol/cloroformo, el ADN fue precipitado con etanol 100% y lavado con etanol 70%. Se realizaron las electroporaciones en XL1Blue electrocompetentes a 2500V, las células fueron recuperadas en 1 ml de medio SOC por 1 hr a 37°C con agitación de 250 rpm. Los cultivos fueron mezclados y de ahí se plateó 1 μ l de una dilución 1:10 en 2xYT-Amp (200 μ g/ml)-Tc (15 μ g/ml)-Glu 1%, para calcular el tamaño del banco, el resto fue llevado a un volumen de 100 ml de medio 2xYT-Amp (200 μ g/ml)-Tc (15 μ g/ml)-Glu 1% y se dejó incubando toda la noche a 37°C , 250 rpm. Al día siguiente, 80 ml del cultivo se centrifugaron a 3000 rpm, se eliminó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas cuidadosamente en 2xYT-Amp (200 μ g/ml)-Tc (15 μ g/ml) mismas que fueron utilizadas para el despliegue en fagos. El resto del cultivo fue utilizado para purificar plásmido.

4.9. Lisis Alcalina

Se inocularon 5 ml de LB-Amp (200 μ g/ml) con la colonia adecuada, incubando durante toda la noche a 37°C . Al día siguiente se centrifugó el cultivo, a 9000 rpm, durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 200 μ l de la solución I (ver Soluciones y medios). Se agregaron 200 μ l de la solución II (fresca). Se mezcló por inversión e incubó en hielo. Después de 5 minutos se agregaron 200 μ l de la Solución III (fría). Se mezcló

por inversión e incubó en hielo durante 10 minutos. Se centrifugó 10 minutos a 12000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se adicionaron 800 μ l de Etanol 100 %, se mezcló por inversión y después de incubarlo 2 minutos a temperatura ambiente se centrifugó durante 10 minutos a 12000rpm. Se decantó y se adicionaron 500 μ l de etanol 70 %, la mezcla fué centrifugada a 12000 rpm por 1 minuto, se eliminó el sobrenadante y el ADN fue incubado a 37°C para secarlo y eliminar el etanol. Una vez seco, se resuspendió en 50 μ l de agua tetradestilada y se adicionó 1 μ l de RNAsa-A (4mg/ml).

4.10. Rescate de la biblioteca (Producción de fago-anticuerpos)

Volúmenes de 100ml de 2xYT-Amp (200 μ g/ml)-Tc (15 μ g/ml)-Glu1 % fueron inoculados con el banco obtenido, incubando a 37°C, 250 rpm hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0.7. Se adicionó el fago ayudador en una multiplicidad 1:10 (bacterias:fagos), se incubó a 37°C sin agitación durante 45 min. Durante los siguientes 45 min se mantuvo a 37°C en agitación. El total del cultivo fue centrifugado a 4000rpm durante 10 min a 4°C, el sobrenadante se eliminó y las células se resuspendieron en 200 ml de 2xYT-Amp (200 μ g/ml)-Tc (15 μ g/ml)-Km (70 μ g/ml) y separadas en dos matraces con 100 μ l cada uno, los cultivos se incubaron toda la noche a 30°C, 250 rpm. Al día siguiente se centrifugaron los cultivos 10 minutos a 5000 rpm, 4°C. El sobrenadante se transfirió a tubos limpios y se centrifugó por 10 min a 8000 rpm, 4°C, el sobrenadante fue recuperado y se le agregó 1/5 del volumen recuperado de la mezcla de PEG 8000 al 20 %/NaCl 2.5M, se incubó a 4°C toda la noche para precipitar los fagos. Al día siguiente, la mezcla se centrifugó a 8000 rpm durante 40 min a 4°C. Se retiró completamente el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en PBS 1X (un volumen igual al 30 % de la mezcla de PEG/NaCl añadida inicialmente), se agregó PEG/NaCl (15 % del volumen total obtenido), se incubó durante 4 horas a 4°C , pasado este tiempo, se volvió a centrifugar a 8000 rpm durante 40 min a 4°C. Se eliminó completamente el sobrenadante y se agregaron 10 ml de PBS 1X y la pastilla fue resuspendida completamente para incubar a 70°C. Después de 20 minutos de incubación, la solución se centrifugó 10 min a 10 000 rpm, 4°C , el sobrenadante se filtró en membrana de 0.42 μ m. Al filtrado se adicionó glicerol al 80 % en volumen tal que la concentración final del glicerol sea del 15 %. Las alícuotas

se almacenaron a -30°C , tomando $10\mu\text{l}$ para titular.

4.11. Titulación de los fago-anticuerpos

Se realizaron diluciones del fago en 1ml de medio 2xYT. A $10\mu\text{l}$ de fagos se adicionaron $990\mu\text{l}$ de 2xYT (10^2) (se pasó por vortex y se cambió de punta en cada dilución). Se tomaron $10\mu\text{l}$ de la dilución anterior y se mezclaron con $990\mu\text{l}$ de 2xYT (10^4). El procedimiento se repitió hasta obtener una dilución de 10^{10} . De las 3 últimas diluciones se tomaron $10\mu\text{l}$ de fagos y se agregaron $990\mu\text{l}$ de un cultivo de células XL1Blue crecidas a D.O_{600} de 0.7-1 en 2xYT (para el cálculo también se tomó en cuenta esta dilución; por ejemplo, la dilución 10^{10} es 10^{12}). Las células se incubaron a 37°C sin agitación por 30 min y 30 min con agitación. Después de la incubación se sembraron $100\mu\text{l}$ en cajas con 2xYT-Km($50\mu\text{g}/\text{ml}$) y dejaron crecer toda la noche a 37°C . Al día siguiente se contaron las colonias (el número de transformantes se multiplicó para obtener el total por cada mililitro) para conocer el título de los fagos mediante la siguiente relación:

$$\text{ufc}/\text{ml} = \left(\frac{\text{No. colonias}}{\text{ml}} \right) (\text{Factor de dilución})$$

4.12. Tamizado

En un inmunotubo Nunc maxisorp, se colocó 1 ml de la proteína ($100\mu\text{g}/\text{ml}$ en amortiguador de carbonatos) contra la que se realizó la selección, incubándose 12 horas, 4°C . Al día siguiente se retiró el excedente, realizando tres lavados con PBS 1X. El inmunotubo se saturó con BSA 1% o leche descremada 1%, dejando incubar por 2 horas a 37°C . Después de ese tiempo se lavó el tubo tres veces con PBS 1X, se agregó 1 ml de fago-anticuerpos (1×10^{11} - 1×10^{13}) y 3 ml de la solución saturante. La incubación fue a temperatura ambiente, 30 min con agitación y 90 min sin agitación. El sobrenadante se descartó y al tubo se le realizaron veinte lavados con PBS-Tween20 0.1% y enseguida veinte con PBS 1X, en ambos casos invirtiendo el tubo rápidamente. Se agregó 1 ml de células XL1Blue crecidas a D.O_{600} de 0.7-1. El inmunotubo conteniendo las células se incubó a 37°C sin agitación por 30 min y 30 min con agitación. Para conocer el título de salida se plateó $1\mu\text{l}$ del cultivo y de una dilución 1:100 en cajas 2xYT-Amp ($200\mu\text{g}/\text{ml}$)-Tc

(15 μ g/ml)-Glu1 %. El resto del cultivo se sembró en cajas grandes 2xYT-Amp (200 μ g/ml)-Tc (15 μ g/ml)-Glu1 % para al día siguiente recuperarlas y hacer gliceroles.

4.13. ELISA

En una placa de 96 pozos se agregaron 100 μ l de antígeno (5 μ g/ml) a cada pozo. Se descartó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con PBS-Tween 0.1 %. Se agregaron 200 μ l del saturante por pozo y se incubó durante 2 horas a 37°C, se eliminó el sobrenadante y el tubo se lavó tres veces con PBS-Tween 0.1 %. En cada pozo, se agregaron 50 μ l del sobrenadante de cada cultivo y 50 μ l de PBS. Pasado el tiempo de incubación (1 h, 37°C) se realizaron tres lavados con PBS-Tween. Del anticuerpo conjugado anti-M13 (1:2000 en PBS) se agregaron 100 μ l dejando la reacción durante 1 h a 37°C. Después de realizar tres lavados con PBS-Tween, se adicionaron 100 μ l del sustrato (OPD), la reacción se desarrolló en oscuridad a temperatura ambiente hasta obtener una coloración amarilla (10-15 minutos). Para detener la reacción se utilizaron 50 μ l de HCl 6N en cada pozo, la intensidad de la señal se cuantificó en un lector de ELISA a 492 nm.

Capítulo 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Construcción de la biblioteca

Se obtuvieron 250 ml de sangre periférica de una llama hembra no inmunizada. Para aislar las células mononucleadas, entre ellas las productoras de anticuerpos (linfocitos B), se realizó un gradiente de centrifugación utilizando Ficoll. Después del primer paso de centrifugación se observaron cuatro fases, se recuperó la porción entre el suero y la solución de Ficoll.

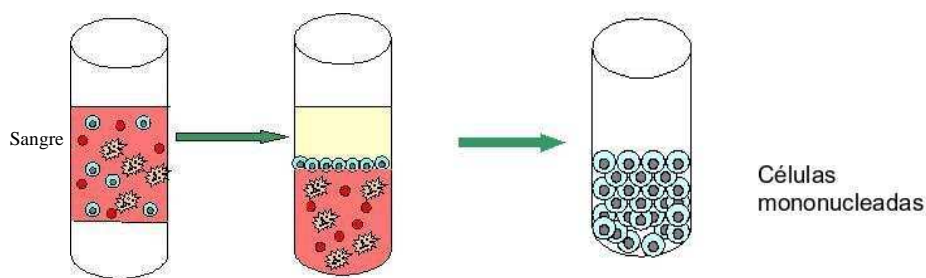


Figura 5.1: Gradiente de Ficoll. Esquema de un gradiente de centrifugación para la separación de los paquetes celulares. Al término de la centrifugación se recupera la capa formada entre el suero y el Ficoll.

Los monocitos fueron almacenados en solución desnaturalizante provista en el kit de extracción de RNA. Se prepararon alícuotas de células provenientes de aproximadamente 45 ml de sangre. Se aisló el ARN total y la integridad de las muestras obtenidas se verificó mediante electroforesis. En el gel se observó claramente la relación 2:1 entre la intensidad de las subunidades 28S y 18S (fig

5.2) , lo cual indica que el ARN no se encuentra degradado y puede ser utilizado como templado para la síntesis del ADNc.

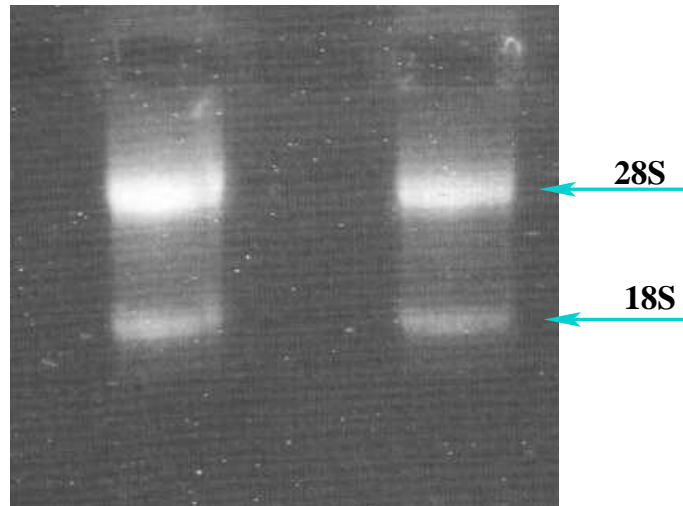


Figura 5.2: ARN total. Electroforesis de $2\mu\text{l}$ (de $10\mu\text{l}$ totales) del ARN de monócitos de llama, en el que se observan las subunidades ribosomales 28S y 18S.

Una vez obtenido el ARN, se sintetizó la cadena complementaria del ADN, reacción llevada a cabo por la transcriptasa reversa. El producto de este paso, se usó como templado para la reacción de PCR y la obtención de el ADN de doble cadena. El total del ADNc obtenido se sometió al proceso, ahora ya utilizando oligos específicos para la amplificación de las V_{HHS} . En la región 5', se utilizó el oligo VH1Back, el cual ha sido reportado como adecuado para la obtención de regiones variables. Para la región correspondiente al C-terminal se utilizaron oligos que sobrelapan con las regiones bisagra de los anticuerpos de cadena pesada. Dichas regiones difieren de las encontradas en regiones variables adyacentes a un dominio CH1. Lo anterior permite la exclusión de dominios VH, de manera que los oligos utilizados en este trabajo, Lam07 y Lam08 amplifican específicamente para secuencias de V_{HHS} de bisagra corta y larga respectivamente, en la fig 1.6 en negritas se indican las regiones de sobrelape de los oligonucleótidos usados para la amplificación de las V_{HHS} .

Una parte del ADN obtenido se clonó en el vector pKSBluescript, tres de estas clonas fueron secuenciadas y sometidas a una comparación con la base de datos BLASTn. Las identidades fueron de alrededor del 80% con V_{HHS} ya reportadas, lo que se aseguró que el repertorio contenía

secuencias propias de regiones variables de HCAs (datos no mostrados).

5.1.1. Clonación en XL1Blue

El material obtenido con los oligos VH1Back y Lam07 ó Lam08 fue purificado utilizando el kit de QIAGEN y sometido a un segundo ciclo de PCR con la finalidad de introducir el sitio de restricción para SfiI en el extremo 5'; en esta reacción el oligo Lam01Up substituyó a VH1Back. Los productos de PCR fueron verificados mediante electroforesis (fig 5.3).

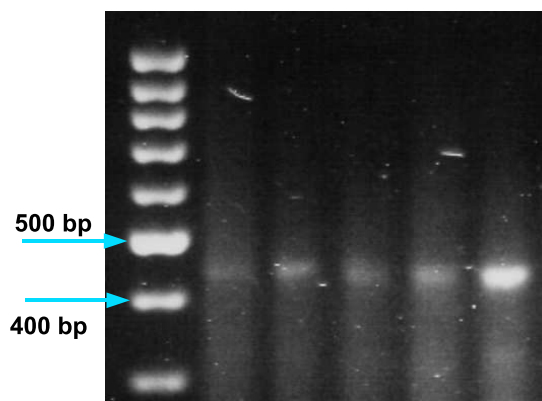


Figura 5.3: Electroforesis del ADN amplificado. Carril 1: marcador de peso molecular, carril 2-6: productos de PCR utilizando diferentes cantidades de ADNc como templado (0.5, 1, 1.5, 2, 4 μ l respectivamente).

El ADN se corrió en un gel de agarosa al 1.2% del cual se cortó la banda del tamaño de las V_{HHS} (400-500 pb) para su purificación.

Paralelamente, el banco de regiones variables y el fagémido pSyn2 fueron digeridos con la enzima NotI durante 3 hr a 37°C, pasado ese tiempo se precipitó el ADN agregando 3 volúmenes de etanol al 100% y centrifugando a 12000 rpm para posteriormente lavar con etanol al 70%. Tanto el ADN de las V_{HHS} como el pSyn2 fueron digeridos también con SfiI durante 5 hr a 50°C, el progreso de ambas digestiones fue monitoreado por electroforesis. Una vez digeridas completamente, ambas muestras fueron purificadas. En la figura 5.4 se muestran los productos finales, el vector y las regiones variables, ambos doblemente digeridos y purificados.

Se construyeron dos bibliotecas, una con ADN de bisagra corta y la otra con una mezcla equimolar de ambas (corta y larga). En los dos casos, 1 μ g de vector digerido se ligó con 250 ng de productos de PCR digeridos. Después de limpiar la reacción, el ADN se resuspendió en 50 y 100 μ l de

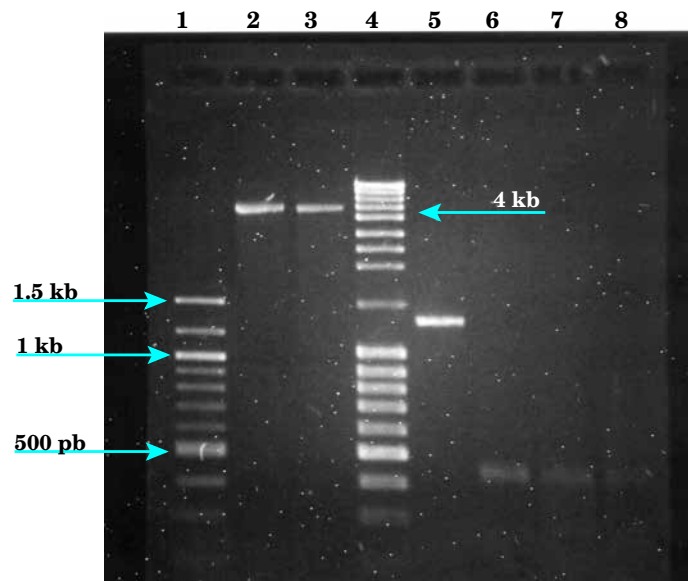


Figura 5.4: Electroforesis del material utilizado. Carril 1,4: marcadores de peso molecular; carril 2,3: pSyn2 digerido; carril 5: gen de kanamicina que fue eliminado del vector; carril 6-8: ADN de V_{HH} digerido

agua y fue electroporado en la cepa XL1Blue, en volúmenes de $10 \mu\text{l}$ por cada $100 \mu\text{l}$ de células, después del tiempo de recuperación todas las células se mezclaron. La eficiencia máxima de las células electrocompetentes utilizadas fue de 1×10^9 y 6×10^9 para cada una de las bibliotecas. De las diluciones plateadas de cada transformación, se dedujo la obtención de dos repertorios:

- * Bisagra corta $\equiv 9 \times 10^5$ transformantes.
- * Bisagra corta y larga $\equiv 4 \times 10^7$ transformantes.

5.1.2. Caracterización de las bibliotecas

De cada biblioteca, se seleccionaron al azar 10 colonias aisladas, material con el que se realizó PCR de colonia para verificar que las transformantes contenían el plásmido y éste las V_{HHS} clonadas. La electroforesis de los productos de PCR mostraron que todas las colonias de la biblioteca mixta tenían el tamaño esperado. En el caso del banco de bisagra corta, en la primera muestra (fig 5.5) no se observó producto de PCR, sin embargo, al secuenciar esa clona (VHH-001), se obtuvo la secuencia de ADN característica de una V_{HH} .

Del total de clonas utilizadas para el PCR anterior se purificó plásmido mediante lisis alcalina, el

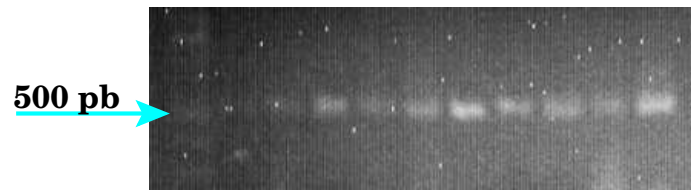


Figura 5.5: PCR de diez colonias aisladas al azar de la biblioteca de bisagra corta.

ADN fue utilizado para obtener la secuencia nucleotídica de cada una de ellas. En la figura 5.6 se muestra el alineamiento de aminoácidos correspondiente a cada variante secuenciada, en donde se muestran las regiones de los dominios variables (FRs y CDRs) según el servidor IMGT® [46]. También se incluye una secuencia consenso para las regiones variables humanas VH3 y una para las secuencias de V_{HH} llama, ambas basadas en las depositadas en la base de datos.

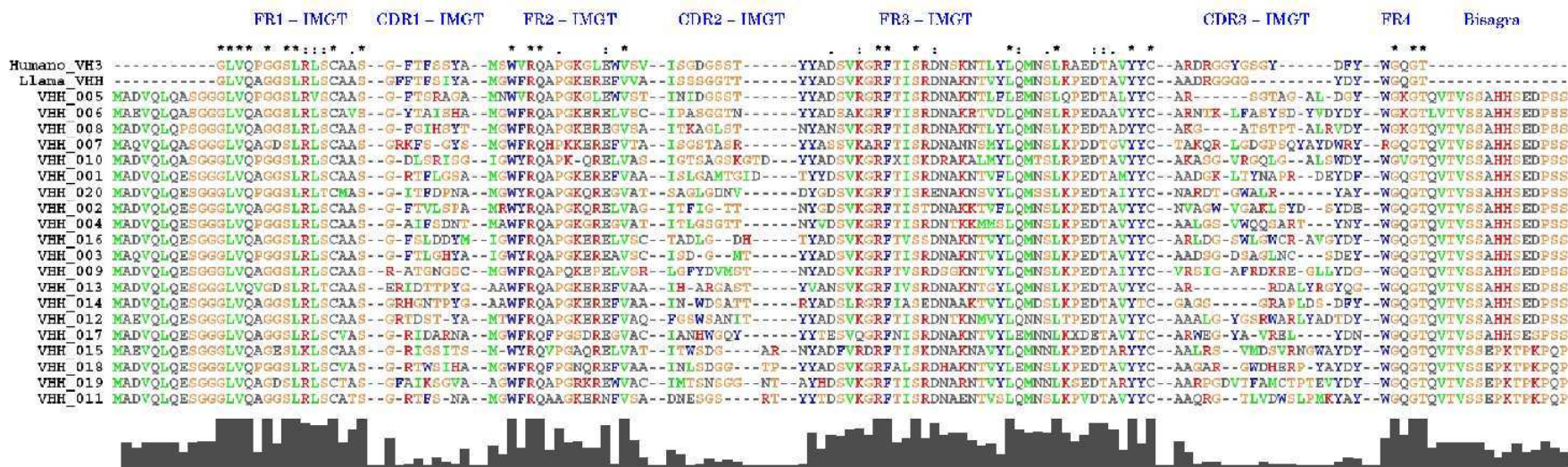


Figura 5.6: Secuencias de aminoácidos de veinte clonas aisladas de las bibliotecas comparadas con una VH3 humana y una VHH de llama. (*) Indica identidad entre los residuos, (:) Fuerte similitud.

Del análisis de las secuencias es posible decir que todas las secuencias obtenidas tienen alta similitud con los fragmentos humanos VH3, principalmente en aquellas regiones que llevan a cabo funciones estructurales antes que de reconocimiento al antígeno.

Sin embargo, como se ha descrito, existen ciertos cambios incluso en los FRs. Sustituciones muy conservadas en las llamas (posiciones 37,44, 45 y 47) son las más caracterizadas. Las cuatro sustituciones se encuentran presentes significativamente en las secuencias aisladas de las bibliotecas. En cuanto a la cisteína en el CDR3, sólo tres secuencias la presentan (VHH_003, 16 y 19). Las clonas 1-10 fueron aisladas de la biblioteca de dominios de bisagra corta (IgG3) y las clonas 11-20 aisladas de la biblioteca mixta (IgG2 e IgG3).

5.2. Despliegue de las bibliotecas

Los repertorios obtenidos fueron mezclados y desplegados, mediante el rescate con el fago ayudador M13K07, obteniéndose un título de 7×10^{12} ufc/ml, los cuales fueron almacenados a -70°C para futuros usos.

Utilizando estos fago-anticuerpos se realizaron rondas de tamizado en aras de probar la utilidad y potencial de aplicación de los bancos. De manera preliminar se realizó la búsqueda de ligandos para un dominio variable tipo $\lambda 6$ cuya secuencia corresponde a la línea germinal 6a. Esta proteína recombinante, 6aJL2 ha mostrado *in vitro* capacidad de formación de fibras cuando es sometida a periodos de agitación. Su tendencia a formar agregados y la relación de las cadenas $\lambda 6$ en padecimientos por deposición amiloide, han sido motivos para el extenso estudio de estas proteínas. Los esfuerzos tienen dos vertientes principales: conocer y entender el proceso de formación de la fibra y evitar el almacenamiento de ésta. Sin duda, una útil herramienta para este tipo de análisis son los anticuerpos; a la fecha se cuenta con al menos un anticuerpo monoclonal capaz de eliminar parcialmente los depósitos amiloides.

Con el objetivo de obtener un anticuerpo específico para la fibra formada por r6aJL2, se realizaron ciclos de selección de la biblioteca contra las fibras. En el cuadro 5.1 se muestra de manera simplificada las condiciones en las que se realizaron los tamizados y los resultados de cada una.

Ronda	saturante	Fibra (r6aJL2) inmovilizada	Título de entrada (ufc/ml)	Título de salida (ufc/ml)
Primera	BSA 1%	100 μ g	7×10^{12}	6×10^5
Segunda	Leche 1%	50 μ g	6×10^{11}	1×10^6
Tercera	BSA 1%	10 μ g	4×10^{12}	7×10^6

Cuadro 5.1: Resumen de las rondas de tamizado de la biblioteca contra la fibra de r6aJL2.

Cabe mencionar que en cada ronda, antes del contacto de los fago-anticuerpos con la proteína inmovilizada, los fagos fueron incubados durante dos horas en un inmunotubo que contenga el agente bloqueador a utilizarse (BSA o leche), con el fin de eliminar clonas inespecíficas. Después de tres rondas, se eligieron al azar 88 clonas que fueron utilizadas para una prueba de ELISA.

Las variantes seleccionadas fueron rescatadas con el fago ayudador para recuperar los fago-anticuerpos, que fueron utilizados en el ensayo de reconocimiento hacia la fibra r6aJL2. De los anticuerpos utilizados, aproximadamente el 70% (fig 5.7) presentaron valores de absorbancia >0.4 ; aquellos en los que se observaron las lecturas más altas, fueron seleccionados para realizar un ensayo de especificidad.

Las clonas 3C, 4C, 5A, 10G, 11B, 12A Y 12F (etiquetadas según su ubicación en la placa) fueron las candidatas a probar, sin embargo, al realizar un PCR de colonia de esas clonas, 3C, 5A y 10G tuvieron un inserto de menor tamaño (~ 300 bp) por lo que fueron descartadas.

Aquellas clonas con el inserto completo fueron nuevamente expresadas como fago-anticuerpos para la prueba de ELISA en la que se utilizó además de la fibra, los bloqueadores (BSA y leche) y r6aJL2 en su forma soluble. Las absorbancias leídas reflejan una capacidad de reconocimiento de los fragmentos V_{HHS} hacia sus antígenos. En el caso de 4C y 12F, no se observa diferencia significativa entre la fibra y las otras proteínas, lo que indica la inespecificidad en el reconocimiento; sin embargo, en 12A, hay una marcada diferencia con respecto a las soluciones bloqueadoras. Aún cuando 11B muestra una señal menor, es posible ver cierta especificidad hacia r6aJL2 y su

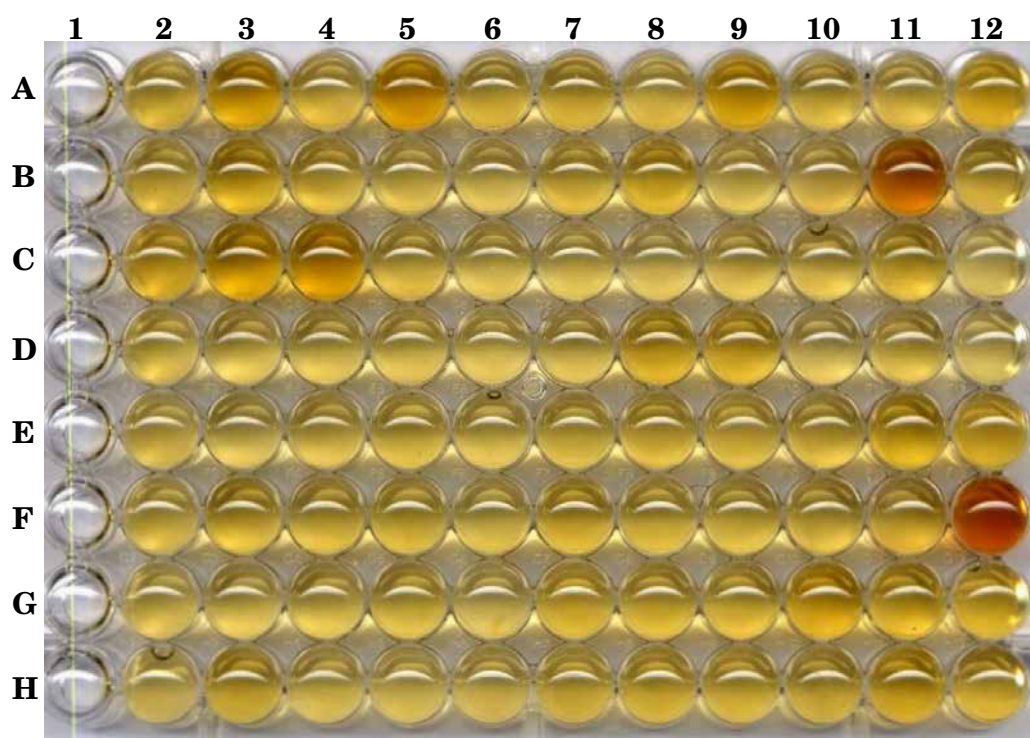


Figura 5.7: ELISA de fago-anticuerpos. La fibra de 6aJL2 fue utilizada como antígeno para probar las variantes obtenidas después de tres rondas de tamizado. Una coloración más intensa indica mejor reconocimiento antígeno-anticuerpo.

fibra, y más bien la baja lectura puede deberse a una baja producción del fago-anticuerpo, ya que se utilizó un mismo volumen de sobrenadante para todas las clonas, no teniendo en cuenta la cantidad de partículas presentes, lo cual pudo haber influido en los niveles de reconocimiento. En resumen, y como conclusión preliminar, se puede decir que se tienen al menos dos V_{HH} candidatas (clonas 11B y 12A) a poseer la capacidad de reconocer específicamente a la fibra formada por r6aJL2. Este hecho confirma que a partir de una biblioteca no inmune es posible obtener anticuerpos, en este caso, dominios V_{HH} que pueden reconocer un cierto epítipo de interés.

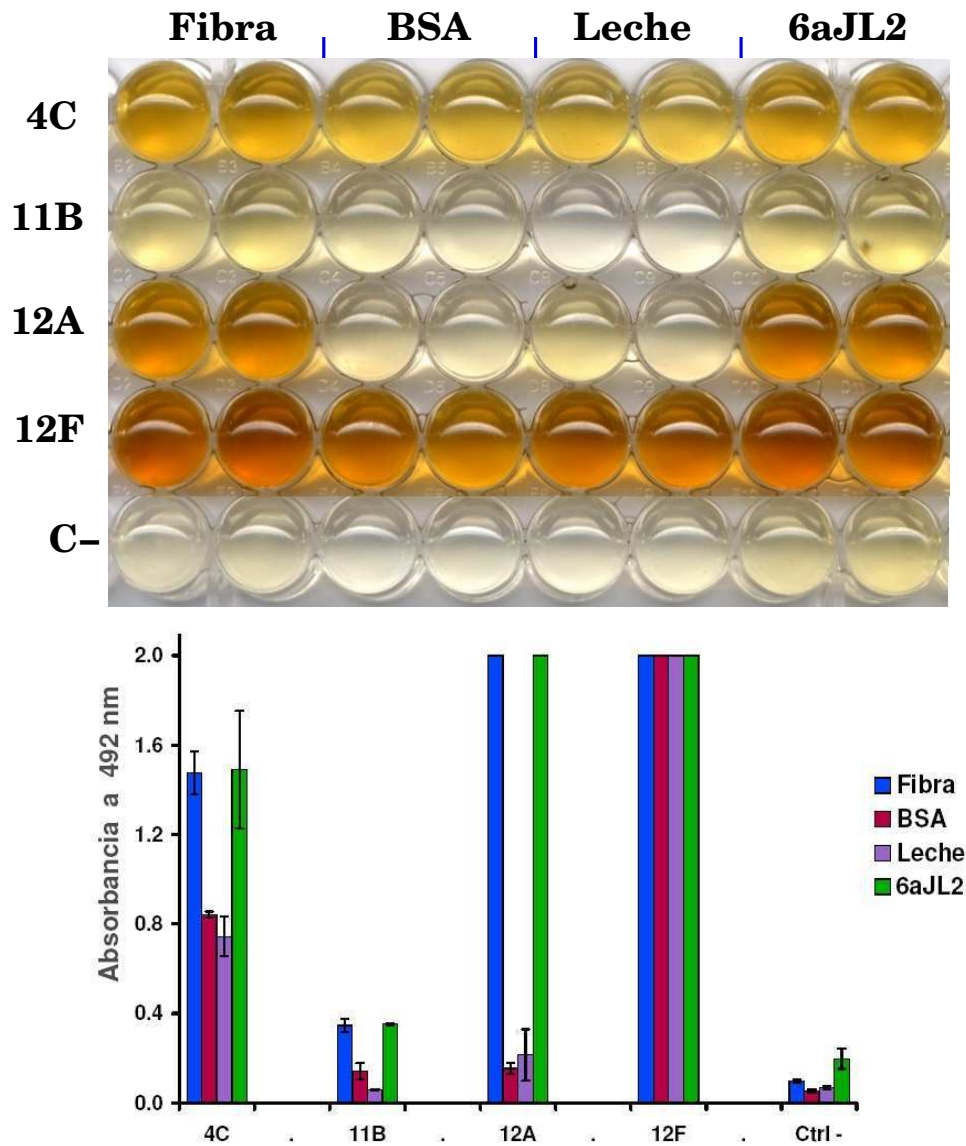


Figura 5.8: ELISA de especificidad de V_{HH} seleccionadas. En la gráfica se muestran las lecturas de absorbancia del ensayo, el cual se realizó por duplicado, utilizando como control negativo el fago silvestre (M13). Para la donas 12A y 12F hubo lecturas mayores que el límite de sensibilidad del lector, por lo que no fue posible el cálculo de la desviación estándar.

Capítulo 6

CONCLUSIONES

Los anticuerpos como poderosas herramientas para usos biotecnológicos, clínicos y de investigación son blanco de numerosos y detallados estudios. Como se ha mencionado, con el objetivo de obtener anticuerpos eficientes y costeables, se han generado los fragmentos de anticuerpos, entre ellos los VHs. Aunado al trabajo de ingeniería genética, gracias a la naturaleza se cuenta con los fragmentos variables de anticuerpos de cadena pesada presentes en los camélidos. En base a las grandes ventajas en uso y manipulación que estos presentan se ha realizado el presente trabajo con la finalidad de contar con una colección de estos fragmentos derivados de un ejemplar de *L. glama*. Como resultado de ésto se puede concluir que:

1. Se logró la obtención del ADN codificante para fragmentos de anticuerpos tipo V_{HH} (de subtipo IgG2 e IgG3).
2. Ambos repertorios fueron clonados en un fagémido resultando dos bibliotecas de tamaño aceptable tomando en cuenta que se trata de dominios no combinatorios.
3. Las clonas aisladas de las bibliotecas contienen ADN correspondiente a dominios V_{HH} , presentando identidades de $\sim 80\%$ con las ya reportadas.
4. El total de las clonas secuenciadas tienen diferencias entre sí, sugiriendo que se tiene un repertorio diverso y por tanto capaz de reconocer un amplio espectro de antígenos, dadas las capacidades descritas de estos dominios variables.

5. Como primer intento, se logró el aislamiento de dos clones que parecen tener reconocimiento específico hacia la fibrilla formada por la proteína amiloidogénica r6aJL2.

Capítulo 7

PERSPECTIVAS

- * Expresar como proteína soluble las clonas seleccionadas y determinar si reconocen r6aJL2 y algunas de sus variantes relevantes.
- * Caracterizar las clonas que tengan mejor reconocimiento hacia la fibra de 6aJL2.
- * Explorar la capacidad de las V_{HHS} ganadoras de impedir la formación de las estructuras fibrilares de r6aJL2.
- * Realizar selecciones (tamizados) de la biblioteca contra otras proteínas.
- * Generar cambios en las bibliotecas obtenidas para lograr un repertorio más diverso y por tanto ampliar el espectro epítopes que pueden ser reconocidos.

Bibliografía

- [1] Templin MF, Stoll D, Schwenk JM, Potz O, Kramer S, Joos TO., Protein microarrays: promising tools for proteomic research. *Proteomics*. 3(11):2155-66 (2003).
- [2] Uttamchandani M, Wang J, Yao SQ., Protein and small molecule microarrays: powerful tools for high-throughput proteomics. *Mol Biosyst*. 2(1):58-68 (2006).
- [3] Joosten V, Lokman C, Van Den Hondel CA, Punt PJ., The production of antibody fragments and antibody fusion proteins by yeasts and filamentous fungi. *Microb Cell Fact*. 2(1):1 (2003).
- [4] Ward ES, Gussow D, Griffiths AD, Jane PT, Winter G. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *E. coli*., *Nature* 341:544-546 (1989).
- [5] Borrebaeck CAK, Malmborg AC, Furebring C, Michaelson A, Ward S, Danielsson L, Ohri M., Kinetic analysis of recombinant antibody-antigen interactions: relations between structural domains and antigen binding., *Biol. Technology* 10:697-698 (1992).
- [6] Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363(6428):446-8 (1993).
- [7] Riechmann L., Rearrangement of the former VL interface in the solution structure of a camelised, single antibody VH domain. *J Mol Biol*. 259(5):957-69 (1996).
- [8] Desmyter A, Transue TR, Ghahroudi MA, Thi MH, Poortmans F, Hamers R, Muyldermans S, Wyns L., Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat Struct Biol*. 3(9):803-11 (1996).

- [9] Spinelli S, Frenken L, Bourgeois D, de Ron L, Bos W, Verrips T, Anguille C, Cambillau C, Tegoni M., The crystal structure of a llama heavy chain variable domain. *Nat Struct Biol.* 3(9):752-7 (1996).
- [10] Chothia C, Novotny J, Brucoleri R, Karplus M., Domain association in immunoglobulin molecules, the packing of variable domains., *J. Mol. Biol.*, 186:651-663 (1985).
- [11] Padlan EA., Anatomy of the antibody molecule., *Mol. Immun.* 31:169-217 (1994).
- [12] Van der Linden R, de Geus B, Stok W, Bos W, van Wassenaar D, Frenken L. Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. *J Immunol Methods* 240:185-195 (2000).
- [13] Vu KB, Ghahroudi MA, Wyns L, Muyldermans S., Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol.* 34(16-17):1121-31 (1997).
- [14] Harmsen MM, Ruuls RC, Nijman IJ, Niewold TA, Frenken LG, de Geus B., Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features. *Mol Immunol.* 37(10):579-90 (2000).
- [15] De Genst E, Saerens D, Muyldermans S, Conrath K., Antibody repertoire development in camelids. *Dev Comp Immunol.* 30(1-2):187-98 (2006).
- [16] Su C, Nguyen VK, Nei M., Adaptive evolution of variable region genes encoding an unusual type of immunoglobulin in camelids. *Mol Biol Evol.* 19(3):205-15 (2002).
- [17] Chothia C, Lesk AM, Tramontano A, Levitt M, Smith-Gill SJ, Air G, Sheriff S, Padlan EA, Davies D, Tulip WR., Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 342(6252):877-83 (1989).
- [18] Chothia C, Lesk AM., Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 196, 901-917.
- [19] Al-Lazikani B, Lesk AM, Chothia C., Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol.* 273(4):927-48 (1997).

- [20] Decanniere K, Desmyter A, Lauwereys M, Ghahroudi MA, Muyldermans S, Wyns L., A single-domain antibody fragment in complex with RNase A: non-canonical loop structures and nanomolar affinity using two CDR loops. *Structure* 7(4):361-70 (1999).
- [21] Spinelli S, Frenken LG, Hermans P, Verrips T, Brown K, Tegoni M, Cambillau C. Camelid heavy-chain variable domains provide efficient combining sites to haptens. *Biochemistry* 39(6):1217-22 (2000).
- [22] Nguyen VK, Hamers R, Wyns L, Muyldermans S., Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire C(H)1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies. *Mol Immunol.* 36(8):515-24 (1999).
- [23] Woolven BP, Frenken LG, van der Logt P, Nicholls PJ., The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy-chain antibody formation. *Immunogenetics.* 50(1-2):98-101 (1999).
- [24] Frenken LG, van der Linden RH, Hermans PW, Bos JW, Ruuls RC, de Geus B, Verrips CT., Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biotechnol.*78(1):11-21 (2000).
- [25] Joosten V, Gouka RJ, van den Hondel CA, Verrips CT, Lokman BC., Expression and production of llama variable heavy-chain antibody fragments (V_{HHS}) by *Aspergillus awamori*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 66(4):384-92 (2005).
- [26] Perez JM, Renisio JG, Prompers JJ, van Platerink CJ, Cambillau C, Darbon H, Frenken LG., Thermal unfolding of a llama antibody fragment: a two-state reversible process. *Biochemistry* 9;40(1):74-83 (2001).
- [27] van der Linden RH, Frenken LG, de Geus B, Harmsen MM, Ruuls RC, Stok W, de Ron L, Wilson S, Davis P, Verrips CT., Comparison of physical chemical properties of llama V_{HH} antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta.* 1431(1):37-46 (1999).

- [28] Dumoulin M, Conrath K, Van Meirhaeghe A, Meersman F, Heremans K, Frenken LG, Muyldermans S, Wyns L, Matagne A., Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci.* 11(3):500-15 (2002).
- [29] Givol D., The minimal antigen-binding fragments of antibody Fv fragment., *Mol. Immunol.* 28:1379-1386 (1991).
- [30] Chothia C, Lesk AM, Gherardi E, Tomlinson IM, Walter G, Mark JD, Llewelyn MB, Winter G. Structure repertoire of the human VH segments. *J. Mol. Biol.* 227:799-817.
- [31] Lauwereys M, Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Kinne J, Holzer W, De Genst E, Wyns L, Muyldermans S., Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J.* 17(13):3512-20 (1998)
- [32] Conrath KE, Lauwereys M, Galleni M, Matagne A, Frere JM, Kinne J, Wyns L, Muyldermans S., β -lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the camelidae. *Antimicrob Agents Chemother.* 45(10):2807-12 (2001).
- [33] Transue TR, De Genst E, Ghahroudi MA, Wyns L, Muyldermans S., Camel single-domain antibody inhibits enzyme by mimicking carbohydrate substrate. *Proteins* 32(4):515-22 (1998).
- [34] Szynol A, de Soet JJ, Sieben-van Tuyl E, Bos JW, Frenken LG., Bactericidal effects of a fusion protein of llama heavy-chain antibodies coupled to glucose oxidase on oral bacteria. *Antimicrob Agents Chemother.* 48(9):3390-5 (2004).
- [35] Smith GP., Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* Jun 14;228(4705):1315-7 (1985).
- [36] Clackson T, Lowman HB., Phage Display: A Practical Approach (The Practical Approach Series, 266). *Oxford University Press*, USA (2004).
- [37] Kay BK, Winter J, McCafferty J., Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual. *Academic Press* (1996).

- [38] Manoutcharian K, Acero G, Munguia ME, Becerril B, Massieu L, Govezensky T, Ortiz E, Marks JD, Cao C, Ugen K, Gevorkian G., Human single chain Fv antibodies and a complementarity determining region-derived peptide binding to amyloid-beta 1-42. *Neurobiol Dis.* Oct;17(1):114-21 (2004).
- [39] Paschke M., Phage display systems and their applications. *Appl Microbiol Biotechnol.* 70(1):2-11(2006).
- [40] Frenken LG, van der Linden RH., Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevesiae.*, *J Biotechnol.* 78:11-21 (2000)
- [41] Arbabi Ghahroudi M., Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies., *FEBS Lett*, 414:521-526 (1997).
- [42] Van der Linden R, Frenken L, De Geus B, Harmsen M, Ruuulus R, Stok W, De Ron, Wilson S, davis P, Verrips T., Comparison of physical chemical prperties of llama V_{HH} antibody fragments and mouse monoclonal antibodies., *Biochim Biophys Acta* 1431.37-46, (1999).
- [43] Muyldermans S. Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains. *Trends in Biochem Sci*, 26(4):230-235 (2001).
- [44] Jobling Stephen A. Immunomodulation of enzyme functions in plats by single-domain antibody fragments. *Nature Biotech* 21:77-80 (2003).
- [45] Orlandi R, GÃ¼ssow DH, Jones PT, Winter G., Cloning immunoglobulin variable domains for expression by the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci* May;86(10):3833-7 (1989).
- [46] The International immunogenetics information system, <http://imgt.cines.fr/>