



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Identificación de ligandos naturales de la Aminopeptidasa N (CD13)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:
Georgina Ivette López Cortés

TUTOR PRINCIPAL
Dr. Enrique Ortega Soto
Instituto de Investigaciones Biomédicas

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Gohar Gevorgyan Markosian
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Dra. Adela Rodríguez Romero
Instituto de Química

Ciudad de México. Julio, 2017



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.

El presente trabajo se financió con recursos de los proyectos PAPIIT- DGAPA UNAM (IN210314) y CONACYT (Proy CB-252428).

Para realizar mis estudios de Maestría, el CONACYT me otorgó una beca con el fin de dedicarme de tiempo completo al programa.

Con el fin de exponer los resultados de mi trabajo en el congreso Cell Symposia: 100 years of phagocytes, celebrado en Sicilia, Italia en Septiembre del 2016, y en el XL Congreso Nacional de Microbiología celebrado en Guadalajara, Jalisco en Abril del 2017, recibí apoyo por parte del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP) de la UNAM.

Agradecimientos

Al Doctor Enrique Ortega Soto por fungir como tutor principal de mi proyecto y orientarme a lo largo de este proceso. Le agradezco haberme aceptado en su laboratorio y confiar en las capacidades y en el desarrollo de habilidades críticas de sus alumnos.

A las Doctoras Adela Rodríguez Romero y Gohar Gevorgyan Markosian por haber aceptado ser parte del comité tutorial, en el que sugirieron y criticaron constructivamente con el fin de que desarrollara de la mejor manera mi proyecto.

A la Maestra Claudia Garay Canales por su asistencia técnica en diferentes ensayos, en el cultivo celular y proporcionar los anticuerpos purificados.

Al Biólogo Gonzalo Asariel Acero Galindo por la asesoría técnica en el desarrollo del phage display y en técnicas microbiológicas.

A la Maestra Patricia de la Torre por realizar las reacciones de secuenciación.

Al QFB. Carlos Castellanos Barba por su asistencia técnica en el Laboratorio Nacional de Citometría.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) que me facilitó la asistencia al Congreso Nacional de Microbiología celebrado en Guadalajara, Jalisco, México en abril del año 2017, así como al Cell Symposia: 100 years of phagocytes, celebrado en Sicilia, Italia en septiembre del año 2016.

Contenido

Agradecimientos.....	3
Contenido.....	4
Glosario de abreviaciones.....	6
Resumen.....	7
Abstract.....	8
Marco teórico.....	10
AMINOPEPTIDASA N/ CD13.....	10
Caracterización de la aminopeptidasa N (CD13).....	10
Expresión y regulación.....	12
Procesos en los que participa CD13.....	14
Inhibidores de la actividad enzimática de la Aminopeptidasa N.....	18
Anticuerpos específicos para CD13 humano.....	18
Moléculas con afinidad por APN.....	19
Asociación de CD13 con el cáncer.....	20
TECNOLOGÍA DEL DESPLIEGUE EN FAGOS.....	24
Planteamiento del proyecto.....	28
HIPÓTESIS.....	29
OBJETIVOS.....	29
General.....	29
Particulares.....	29
Materiales y métodos.....	30
BIBLIOTECA COMERCIAL.....	30
BIBLIOTECA DE PROTEÍNAS DE CEREBRO.....	30
MATERIAL BIOLÓGICO.....	30
SELECCIÓN DE CLONAS CON AFINIDAD POR CD13.....	31
ANÁLISIS DE CLONAS INDIVIDUALES.....	34
EVALUACIÓN DE LAS CLONAS EN FUNCIONES CELULARES DONDE CD13 ESTÁ INVOLUCRADO.....	36
Resultados.....	38
SELECCIÓN DE CLONAS CON AFINIDAD POR CD13.....	38
ANÁLISIS DE SECUENCIAS CON AFINIDAD POR CD13.....	44
EVALUACIÓN DE LAS CLONAS EN FUNCIONES CELULARES DONDE CD13 ESTÁ INVOLUCRADO.....	49
Discusión.....	54

SOBRE LAS SECUENCIAS SELECCIONAS.....	54
SOBRE LOS ENSAYOS DE FUNCIONES CELULARES.....	62
Conclusiones.....	63
Perspectivas.....	66
Anexos	72
LA BACTERIA HUÉSPED	72
EL BACTERIÓFAGO M13	72
LA UTILIZACIÓN DEL FAGO M13 PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA DE CDNA DE CEREBRO	73
SOLUCIONES UTILIZADAS	75

Glosario de abreviaciones

- APN= Aminopeptidasa N
- bFGF= factor de crecimiento de fibroblastos básico
- BSA= Albúmina de suero bovino
- CD= cúmulo de diferenciación
- cDNA= ADN complementario
- DMSO= dimetilsulfóxido
- FBS= suero Fetal Bovino
- FcγR= Receptor de la fracción cristalizable de inmunoglobulinas G
- Gal3= Galectina 3
- H-Ala- pNA= L-alanine- p-nitroanilide hydrochloride
- HUVEC= Célula endotelial de vena umbilical humana
- IPTG= isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
- LB= Medio Luria Bertani
- MAPK= cinasa activada por mitógeno
- PBS= Solución amortiguadora de fosfatos
- PBSB= PBS con 1% de BSA
- PCR= Reacción en Cadena de la Polimerasa
- PEG= Polietilenglicol 8000
- PFA= Paraformaldehido
- PhD= Phage Display
- PI3K= cinasa de la posición 3 del fosfatidilinositol
- siRNA= ARN pequeño de interferencia
- TBE= Solución amortiguadora de Tris, borato y EDTA
- TBS= Solución salina amortiguadora de tris
- UFP= Unidad Formadoras de Placa
- VEGF= factor de crecimiento endotelial vascular
- X- Gal= 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

Resumen

La aminopeptidasa N (APN/ CD13) es una proteína expresada en membranas citoplasmáticas en una gran variedad de tejidos en el organismo de mamíferos y que tiene distintas funciones en diversos procesos celulares, los cuales ayudan a mantener la homeostasis del organismo. Es una proteína de relevancia médica ya que es marcador en células del sistema inmune de origen mieloide, donde participa activamente en diferentes respuestas efectoras del sistema innato. Aparte, ha sido catalogada como marcador característico de ciertas leucemias, además es sobreexpresada por diversas células cancerosas. Esta sobreexpresión le confiere a células transformadas características que promueven el crecimiento tumoral y la metástasis. De forma tal que la posibilidad de usar al receptor como blanco terapéutico en tratamientos en diferentes padecimientos, es evidente.

Este trabajo muestra un acercamiento a la identificación de un posible ligando de la APN humana. La principal estrategia empleada fue la selección de secuencias peptídicas desplegadas en fagos, a partir de dos bibliotecas diferentes: una de cDNA codificante a transcritos en el cerebro humano y otra biblioteca comercial que despliega 12 aminoácidos al azar en su cápside. Se ensayaron distintas alternativas para llevar a cabo el proceso de selección. Varias clonas obtenidas como resultado de estas selecciones fueron secuenciadas para definir las secuencias peptídicas que mostraron afinidad por la Aminopeptidasa N. A partir de estas secuencias, se identificaron en bases de datos, proteínas que potencialmente podrían interactuar con la APN en un ambiente fisiológico. Se obtuvieron siete secuencias de interés que se deben seguir investigando para comprobar cómo interacciona con CD13.

A pesar de que hasta ahora no se ha llegado a la identificación del ligando natural, estos péptidos son un acercamiento para cumplir tal objetivo. Es posible que alguna proteína identificada sea ligando, sin embargo también es posible que haya interacciones que permitan diversas funciones. Por lo que estas secuencias

identificadas representan un avance en materia no sólo del conocimiento de la biología de la molécula sino que también podría abrir una nueva ruta de desarrollo farmacéutico para el empleo de la APN como un blanco terapéutico contra células cancerosas sobreexpresando CD13 en sus membranas. Aunado a ello, se podrían conectar conocimientos de la respuesta inmunitaria durante la inflamación.

Abstract

The Aminopeptidase N (APN/ CD13) is a membrane protein expressed by a large diverse mammal's tissues. It has been reported that it participates in various cellular processes, which are implicated in maintaining the global homeostasis. CD13 is a protein with medical relevance because it is expressed by different myeloid cells of the immune system where participates in important innate process. Besides. It has been cataloged as a cell marker of specific leukemias. Not only that, but also it is overexpressed by many different cancer cells which enables the tumor growth and promotes tumoral invasion through metastasis. Therefore, the possibility of using the membrane protein CD13 as a therapeutic target for different malignancies is evident.

This project shows a preliminary approach to the identification of a possible natural ligand of the human Aminopeptidase N. The main strategy used for screening among thousands of possibilities, was by developing phage display biopannings from two different libraries. Different protocols were used in order to have a population enriched of clones with peptides displayed with high affinity to CD13. Consequently some of these were tested by its specific binding to CD13 positive cells and finally theirs genetic material were sequenced for discovering the amino acidic sequence responsible for the binding to CD13. At the end, the sequenced were aligned to a database of translated peptides in human systems. We came up with seven proteins

that could interact with CD13, but it is true that there must be done more experiments to confirm that what we found is the ligand.

Although until now I have not identified a natural ligand of the APN of human, these oncoming results enable the accomplishment of the project's objective. It is possible that a protein may be a ligand but it is possible too that some proteins interact with CD13 in another way. This advancement is of interest not only for understanding the physiological characteristics of CD13, but also it opens a window for developing an anticancer drug with high affinity to the CD13 expressed by cancer cells.

Marco teórico

AMINOPEPTIDASA N/ CD13

La aminopeptidasa N es una glicoproteína que inicialmente fue descrita como marcador de diferenciación expresado en la membrana citoplasmática de células mieloides, y que también es expresada en células tumorales de pacientes con leucemia mieloide (Griffin, Ritz et al. 1981 y Griffin, Ritz. et al. 1983). Se le describió con varios nombres, entre ellos MY7, SJ1D1 y L138 (Firat, Favier et al. 2001). La presencia de dicho antígeno de superficie en células de origen mieloide despertó el interés por caracterizarlo y entender sus funciones. Con el tiempo se detectó que CD13 es expresado también en otros tipos celulares.

De manera independiente, se caracterizó una proteína con actividad enzimática que catalizaba la hidrólisis de los enlaces peptídicos de residuos preferentemente neutros del extremo amino terminal de una cadena aminoacídica (de ahí su nombre Aminopeptidasa N). Por su estructura y función se le clasificó como aminopeptidasa, es altamente conservada aunque se encuentra en diferentes loci en los genomas de mamíferos. Finalmente, Thomas Look y colaboradores, en 1989, identificaron que tanto la Aminopeptidasa N como el antígeno CD13, eran exactamente iguales en su secuencia de cDNA (Look, Ashmun et al. 1989).

Caracterización de la aminopeptidasa N (CD13)

La aminopeptidasa N (EC 3.4.11.2, llamada también CD13, APN, gp150, ANPEP, alanin-aminopeptidasa, peptidasa neutra) es una metaloproteína transmembranal de tipo II, es decir su extremo carboxilo es extracelular mientras que el extremo amino es citoplasmático. El CD13 humano está constituido por 967 aminoácidos, con una gran porción extracelular, un solo cruce transmembranal y una pequeña porción citoplasmática de únicamente 8 aminoácidos (Mina-Osorio 2008). Aparte de la gran masa proteica (109.5 kDa), alrededor del 40% de su peso (total 150 kDa) está conferido por sus diferentes glicosilaciones, que son agregadas post y co-

traduccionalmente. Actualmente se conocen 5 diferentes isoformas debido a diferencias en glicosilación (glicofomas) en células endoteliales y monocitos humanos (O'Connell, Gerkis et al. 1991). La Figura 1 muestra la estructura cristalográfica de un dímero de moléculas de CD13 expresado en la membrana. Se muestran los residuos transmembranales, seguido por un tallo rico en Serina y Treonina, y finalmente los cuatro dominios característicos de las metalopeptidasas M1: I, II, III y IV. El sitio activo y el motivo de unión al ión Zinc, se encuentran en el dominio II. Mientras que la dimerización ocurre gracias a las interacciones hidrofóbicas y un puente de hidrógeno generados entre los dominios IV de ambas moléculas. A los dominios I y III se les ha atribuido únicamente funciones estructurales (Wong, Zhou et al. 2012).

Existe también una forma soluble de CD13 (sCD13) que está presente como monómero en el suero sanguíneo, que es capaz de realizar su característica actividad enzimática (Favaloro, Browning et al. 1993). Cuando es expresado en su forma transmembranal, se puede encontrar tanto formando dímeros como monómeros (Xu, Wellner et al. 1997).

CD13 pertenece al grupo de las zincinas que se caracterizan por poseer la secuencia consenso de unión a Zinc $N'-VBXHEBXHXWFG...LWLNEGB-C'$; donde B representa cualquier aminoácido apolar y X cualquier residuo. Los residuos de histidinas (H) y ácidos glutámicos (E) resaltados en negritas, son los residuos de unión al ion (Hooper 1994). Por su dependencia del ión metálico, la actividad enzimática de la APN es susceptible a agentes quelantes. Esta enzima hidroliza enlaces peptídicos conformados por aminoácidos neutros principalmente en el extremo amino terminal de oligopéptidos. La preferencia de hidrólisis ordenada de mayor a menor preferencia de los residuos es la siguiente: Ala > Phe > Tyr > Leu > Arg > Thr > Trp > Lys > Ser > Asp > His > Val > Pro > Glu.

Se sugiere que una de las razones por las cuales esta proteasa tiene tantos sustratos y consecuentemente participa en funciones tan diversas, es porque el surco de entrada al sitio catalítico puede albergar hasta 13 aminoácidos del péptido (Chen, Lun et al. 2012). Por otra parte, ésta proteína también presenta dos conformaciones: la abierta y la cerrada, y se sabe que la conformación afecta la actividad enzimática (Pascual, García et al. 2015).

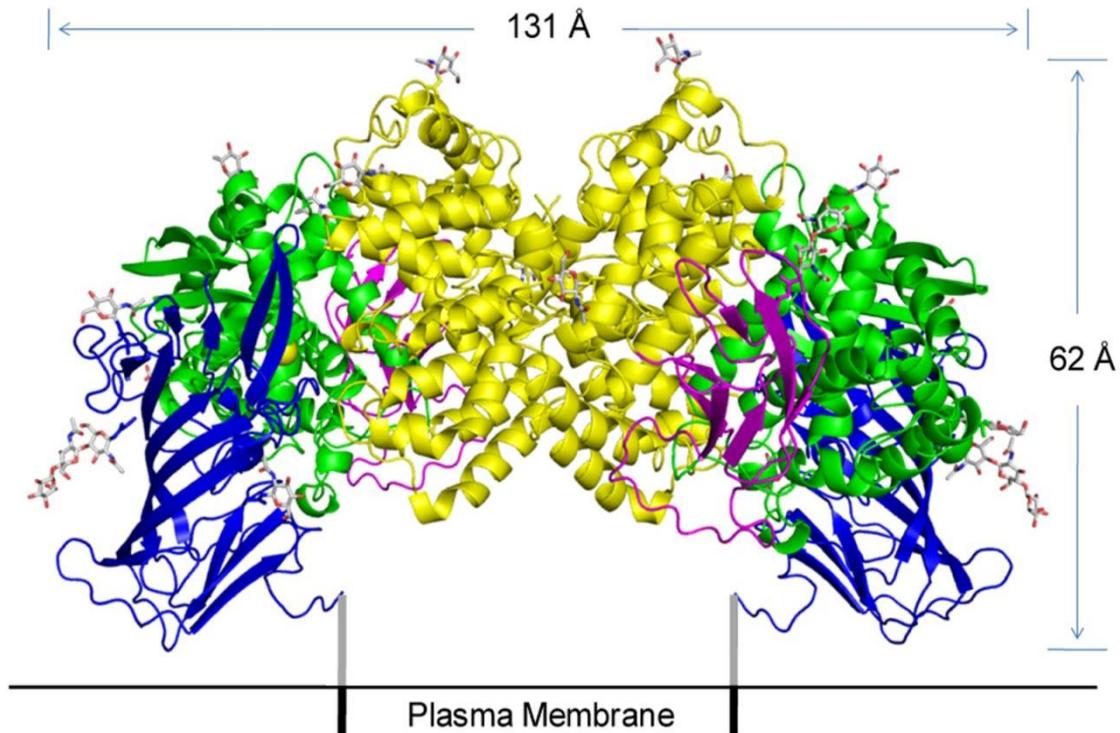


Figura 1- Estructura cristalográfica de dos moléculas de CD13 formando un homodímero. En negro se muestran los residuos correspondientes al pase transmembranal, seguido por un tallo (gris) un cuerpo compuesto por cuatro dominios I, II, III y IV (azul, verde, morado y amarillo respectivamente). Tanto el sitio activo como el motivo de unión a Zinc²⁺ se encuentran en el dominio II. Se indican también los posibles enlaces a oligosacáridos en modelo de barras(Wong, Zhou et al. 2012).

Expresión y regulación

CD13 está expresada en diferentes tipos de células humanas, entre ellas células endoteliales, de los epitelios intestinal y renal, fibroblastos, en las membranas sinápticas de células del sistema nervioso central y dentro de las células hematopoyéticas su expresión está restringida a células del linaje mielomonocítico:

precursores mieloides, monocitos, macrófagos, células dendríticas, eosinófilos y neutrófilos. En el caso de linfocitos, a pesar de que se expresa en los primeros estados de diferenciación, su expresión se pierde por completo en linfocitos maduros (Mina-Osorio 2008), e interesantemente, CD13 es altamente expresada en varios tipos de células tumorales (Ashmun and Look 1990).

El gen que codifica para la APN se encuentra en el cromosoma 15 (Watt 1990) y su transcripción está regulada por un elemento distal y otro proximal. En las células comprometidas al linaje mieloides y los fibroblastos, la expresión es regulada por el elemento distal, a ocho kilobases río arriba, mientras que en células endoteliales, epiteliales de riñón, hígado e intestino, la regulación es ejercida por un elemento inmediatamente anterior al inicio de la transcripción. La transcripción a partir de estos promotores genera transcritos de 3.7 y 3.4 kilobases respectivamente, aunque el producto de la traducción es exactamente igual (Bhagwat, Lahdenranta et al. 2001). La expresión de CD13 es constitutiva en las células antes mencionadas, aunque hay factores que pueden aumentar su expresión. Por ejemplo, el entrecruzamiento de CD13 no aumenta su expresión en membrana, sin embargo Imamura y Kimura reportan que la incubación de las células HL-60 (promieloblastos) con el inhibidor bestatina, sí aumenta los niveles de expresión de CD13 después de una hora (Imamura and Kimura 2000).

El grupo liderado por L.H. Shapiro reportó en 2003 que la estimulación de células endoteliales con bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos) activa una cascada de señalización mediada por Ras y que activa tanto la vía de MAPK como la de PI3K, que a su vez activan el factor de transcripción Ets-2, el cual actúa sobre el promotor proximal del gen *ANPEP* e induce su transcripción. Más adelante en el 2013, investigaciones del mismo grupo demostraron que la aminopeptidasa tiene una tirosina fosforilable en su porción citoplasmática, y que CD13 interacciona con la proteína de andamiaje parecida a proteínas activadoras de la GTPasa Ras (Ras-GTPase activating-like protein, IQGAP1/ p195), la cual a su vez recluta a Src y FAK,

que por un lado inducen la polimerización de la α - actina y por otro lado transmiten la señal mencionada anteriormente (Navarrete Santos, Langner et al. 2000, Subramani 2013).

Se ha demostrado que el entrecruzamiento de CD13 con anticuerpos monoclonales induce un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular en monocitos, e induce la activación de las proteínas Src, PI3K, FAK, y RAS/ MAPK (Navarrete Santos, Langner et al. 2000, Licona-Limón, Garay- Canales et al. 2015). En el 2005, nuestro laboratorio demostró que el co- entrecruzamiento de CD13 junto con los Fc γ RI en la línea monocítica U-937, es capaz de causar la fosforilación de la cinasa de tirosina Syk a niveles más altos que cuando se entrecruza los receptores Fc γ RI solos (Mina Osorio and Ortega 2005). Y no solo eso, sino que más adelante, el grupo comprobó que el entrecruzamiento de CD13 también induce la fosforilación de Syk, pero a tiempos cortos (45 segundos) en macrófagos derivados de monocitos humanos (Licona-Limón, Garay- Canales et al. 2015).

Procesos en los que participa CD13

Varios estudios han documentado la participación de la aminopeptidasa N participa en diversos procesos y respuestas celulares, por lo cual se le considera una enzima multifuncional (moonlighting enzyme) (Mina-Osorio 2008). La función enzimática de CD13 es de peptidasa, que cataliza la hidrólisis de residuos neutros en el extremo amino de distintos oligopéptidos, regulando así diversos procesos fisiológicos. Por ejemplo, en el epitelio intestinal, la enzima actúa degradando péptidos en los últimos pasos de la digestión. Por otro lado, se propone que la APN tiene un papel crucial en inducir la movilidad de los espermatozoides en los prostasomas, lo cual está directamente relacionado con la fertilidad (Irazusta, Valdivia et al. 2004). También se sabe que la aminopeptidasa N se encuentra en las membranas sinápticas de neuronas del sistema nervioso central, en donde hidroliza la unión de Thr¹- Gly², permitiendo una segunda hidrólisis por otra aminopeptidasa (CD10) en los siguientes aminoácidos Gly³- Phe⁴. Dichas secuencias son comunes en la familia

de endorfinas y encefalinas, por lo que la actividad de ambas aminopeptidasas contribuye a la generación de la señal de dichos neurotransmisores (Ashmun and Look 1990).

Como muchas peptidasas, CD13 degrada proteínas de la matriz extracelular para permitir el crecimiento de vasos sanguíneos nacientes, además de que también puede modular la actividad de péptidos angiogénicos. En cuanto a procesos angiogénicos, se ha reportado que la expresión de CD13 en células endoteliales es inducida por hipoxia y por factores angiogénicos como bFGF y VEGF (Bhagwat, Lahdenranta et al. 2001, Mina-Osorio 2008). También se sabe que la presencia de antagonistas y de RNAi de CD13 afecta negativamente la formación de nuevos vasos capilares, aunque sin afectar la capacidad proliferativa de las células.

CD13 también es un receptor viral en células de mamíferos (Soderberg, Giugni et al. 1993) y no sólo eso sino que Wentworth y Holmes en 2001, identificaron la importancia de las glicosilaciones de CD13 en el reconocimiento especie- específico del coronavirus para la internalización e infección de una célula. Tres años más tarde se demostró que el coronavirus humano 229E (HCoV- 229E), agrupa moléculas de CD13 para inducir la formación de caveolas y lograr su internalización a la célula (Nomura, Kiyota et al. 2004). Otro virus que utiliza a la APN como receptor para infectar a las células, es el citomegalovirus humano (Soderberg, Giugni et al. 1993).

La participación de la aminopeptidasa N en la proliferación y la apoptosis sigue estando en duda. Hay reportes que indican una relación entre una mayor resistencia a la apoptosis de diferentes líneas tumorales cuando sobre expresan CD13 y que al inhibir la actividad enzimática con bestatina, la resistencia a la muerte celular por apoptosis, disminuye (Sekine, Fujii et al. 1999). Además, el bloqueo de la actividad enzimática con anticuerpos específicos retarda el crecimiento del tumor en cáncer de hígado (Haraguchi, Ishii et al. 2010). Otro reporte indica que la

incubación de células de la línea mielode humana HL-60 con bestatina provoca una disminución de la proliferación (Imamura and Kimura 2000). Sin embargo, cabe mencionar que la bestatina es un inhibidor general de aminopeptidasas, y que la incubación de las células con el anticuerpo monoclonal WM15, que es específico para el sitio activo de CD13 e inhibe la actividad enzimática, no induce el mismo efecto, pudiendo ser otra molécula inhibida por la bestatina la que esté involucrada en la proliferación.

En células de origen mielode, las funciones en las que participa CD13 también son diversas. Por un lado, está involucrado en la adhesión celular dependiente de cinasas de tirosina (Mina-Osorio, Winnicka et al. 2008). También se ha demostrado que es necesaria la expresión de CD13 tanto en monocitos como en los endotelios, para que haya infiltrado celular de monocitos, células dendríticas y células F4/80+ en el infiltrado inflamatorio peritoneal inducido por tioglicolato, en un modelo murino (Ghosh, Gerber et al. 2014). Se ha demostrado que la agregación de CD13 con anticuerpos monoclonales, induce la agregación homotípica de la línea celular humana monocítica U-937, que es independiente de integrinas y que la polimerización de los microtúbulos inhibe la agregación celular y el CD13 se relocaliza alrededor de las zonas de contacto entre las células. Finalmente se comprobó que este fenómeno es independiente de la actividad enzimática de CD13 (Mina-Osorio, Shapiro et al. 2006).

CD13 también participa en procesos fagocíticos llevados a cabo por monocitos, macrófagos y células dendríticas. En 2005, nuestro grupo demostró que durante la fagocitosis mediada por receptores para IgG (FcγRs), CD13 se redistribuye a la copa fagocítica y es internalizado en el fagosoma, en monocitos y macrófagos. Además, cuando una partícula se une a la célula simultáneamente a través del FcγR y CD13, es fagocitada más eficientemente que cuando se une sólo a través del FcγR (Mina Osorio and Ortega 2005). Después demostramos que CD13 puede modular procesos fagocíticos mediados por otros receptores en macrófagos y

células dendríticas(Villaseñor Cardoso, Frausto del Río et al. 2013). Y más recientemente, demostramos que CD13 por sí solo es un receptor fagocítico primario en monocitos de la línea celular THP-1 y macrófagos derivados de monocitos humanos (Licona-Limón, Garay- Canales et al. 2015). Esta fagocitosis depende del re arreglo del citoesqueleto de actina y es inhibida por inhibidores de la cinasa Syk y de PI3K.

La participación de la APN en el sistema inmune también incluye la regulación de otras moléculas como quimiocinas (CXCL12 y CXCL11) y citocinas (IL- 1 α , IL- 1 β e IL- 2), ya que cataliza la hidrólisis de estos sustratos. Aunado a esto, la estimulación de CD13 modula la expresión del factor 1 derivado de células estromales (SDF-1) y disminuye la expresión de CXCR4 en células HEK transfectadas para expresar CD13 (Wulfaenger, Niedling et al. 2009). Además la citocina anti inflamatoria IL-4 induce una mayor expresión de la APN, sugiriendo que CD13 podría modular otras citocinas para reducir la inflamación. La APN también hidroliza el fMLP, un quimio atrayente de neutrófilos, y la tufstina, produciendo un antagonista que bloquea el sitio activo de la enzima, consecuentemente se afectan los procesos regulados por la tufstina, como la fagocitosis (Ashmun and Look 1990, Barclay, Brown et al. 1997, Yu-Wen, Shu-Chuan et al. 2005).

Otra molécula sobre la que CD13 actúa regulando su vida media, así como sus efectos fisiológicos, es la angiotensina III, de la cual hidroliza la Arg N-terminal produciendo angiotensina IV, que es un segundo sustrato para la enzima. La hidrólisis de este último puede ser inhibida por hemorfinas, que compiten por el sitio activo de la APN. De forma tal que la APN tiene participación en la regulación de la presión arterial.

Tabla 1- Procesos fisiológicos y celulares en los que participa CD13.	
Dependientes de la actividad enzimática	Independientes de la actividad enzimática

Quimiotaxis	Motilidad	Sensación	Agregación celular	Adhesión celular	Fagocitosis
Invasión tumoral	Resistencia a la apoptosis	Proliferación	Diferenciación celular	Receptor de virus	Angiogénesis
Presión arterial	Inmuno- modulación				

Inhibidores de la actividad enzimática de la Aminopeptidasa N

Hay inhibidores naturales de la actividad enzimática de CD13, como lo son la sustancia P y la bradiquinina, aunque también se han desarrollado inhibidores sintéticos derivados de bestatina, que es un inhibidor general de aminopeptidasas. Otros factores que pueden afectar la capacidad catalítica de la APN son la temperatura, el pH, y otros factores como las concentraciones elevadas de algunos aminoácidos (ej. L- leucina, L- prolina, L- alanina) o de iones divalentes (ej. Co^{2+} , Zn^{2+}). La Tabla 2 enlista inhibidores de la actividad enzimática de la APN.

Tabla 2- inhibidores de la actividad enzimática de CD13(Ashmun and Look 1990, Mina-Osorio 2008, Chen, Lun et al. 2012, Pascual, García et al. 2015).		
Bestatina	Substancia P	Leuhistina
1, 10- fenantrolina	Actinonina	MR387A
2.2'- dipiridil	Curcumina	MR387B
Bradiquinina	Puromicina	AHPA- Val
Chelitrina	Ezetimibe	Ácido betulínico
Ácido Betulínico	Probestina	β - amino tiol
Psammaplina A	Amastatina	α - aminofosfonatos
2- tiolbestatina	Febestina	Tioamida- bestatina
Derivados de ácido flavone 8- acético (FAA)		

Anticuerpos específicos para CD13 humano

Se han desarrollado diferentes anticuerpos monoclonales que tienen especificidad por diferentes sitios de CD13, enlistados en la Tabla 3. Entre ellos, están

anticuerpos como el mAb 452, que se une cerca del sitio de unión a Zinc, aunque no se conoce el epítipo exacto. Otro ejemplo es el mAb WM15, que se une cerca del sitio catalítico e inhibe la actividad enzimática, por lo que se utiliza como inhibidor de la enzima. Cabe mencionar que la inhibición de la actividad enzimática mediada por los anticuerpos que reconocen sitios esenciales para realizar dicha función, no provoca un cambio en el nivel de expresión de CD13 a nivel de membrana (Ashmun and Look 1990).

Tabla 3- Anticuerpos monoclonales con afinidad por CD13 (Ashmun and Look 1990, Xu, Wellner et al. 1997, Corti, Curnis et al. 2008, Mina-Osorio 2008).			
F23	Mou48	22A5	CLB/ Mon/ Gran- 2
MY7	Mou28	RMAG6	
452	MCS2	72a	WM15
13c03	SJ1D1	WM47	

Moléculas con afinidad por APN

Debido a las evidencias de que varias de las funciones de CD13 no están relacionadas con su actividad enzimática sino con su activación por anticuerpos monoclonales, desde hace varios años se han realizado estudios buscando identificar ligandos endógenos de CD13. En este contexto, varios reportes han señalado la asociación de la Galectina 3 (Gal3) con la molécula de CD13. En uno de ellos, se reporta que Gal3 es co-inmunoprecipitada con CD13 cuando se rompe la agregación homotípica de monocitos humanos inducida por anticuerpos anti-CD13 (Mina Osorio and Soto Cruz 2007). En otro estudio, se propone a la Gal3 como un factor pro angiogénico ya que la presencia de Gal3 en cultivos de células HUVEC induce la angiogénesis mediante la participación de CD13. También se reportó que Gal3 y CD13 son co- expresados durante la angiogénesis asociada al desarrollo del prosencéfalo de ratón en un estudio *in vivo* (Yang, Shim et al. 2007). Por otro lado se sugiere que Gal3 pudiera actuar como opsonina, reconociendo

sacáridos de microorganismos, y que posteriormente se asocia con el CD13 de macrófagos (Villaseñor Cardoso, Frausto del Río et al. 2013).

Por otra parte, se ha demostrado que Galectina 4 (Gal4) co- inmunoprecipita con la APN a partir de microvellosidades del epitelio intestinal. A pesar de que no está asociada a la membrana, la participación de Gal4 en el metabolismo de oligosacáridos involucra la formación de complejos con ectoenzimas, incluidas la aminopeptidasa N (Danielsen and van Deurs 1997). Se ha identificado que CD13 también co- inmunoprecipita con las moléculas adaptadoras Grb2 y Sos en células U-937, con RECK (reversion- inducing cysteine- rich protein with Kazal motifs), y con el antígeno asociado a tumor L6 (Mina-Osorio 2008).

Más recientemente, se identificó que la citocina pro inflamatoria s14-3-3ε se une a CD13 en células de cartílago y que la interacción no afecta la actividad enzimática. Se sugiere que la citocina pudiera ser detectada por la APN para inducir la expresión de las metaloproteinasas de la matriz 3 y 13, típicas en un fenotipo de osteoartritis. Se propuso el sitio de reconocimiento de CD13 como E₅₇₉FNYVW₅₈₄, pero no se determinó si la unión directa de la citocina provocaba alguna transducción de señal (Nefla, Sudre et al. 2015).

Asociación de CD13 con el cáncer

Desde los primeros estudios de la glicoproteína, se determinó que CD13 es un marcador útil para distinguir células tumorales y además, que el nivel de expresión de la molécula resulta ser un factor pronóstico en diferentes tipos de cáncer. Por ejemplo, la concentración de la APN sérica podría ser utilizada como un marcador diagnóstico de cáncer de mama, de pulmón o de tiroides, pues se correlaciona positivamente con la tasa de supervivencia y el estado de la enfermedad. Sin embargo, el incremento en la concentración sérica de CD13 probablemente depende del tipo de cáncer, pues en otro estudio se demostró que en pacientes con

cáncer gástrico, el grado de metástasis y la concentración de CD13 en suero, estaban negativamente correlacionados (Wickstro, Larsson et al. 2011).

Entre las leucemias, la alta expresión de CD13 es característica de las leucemias mieloides agudas, mientras que solo en el 5% de pacientes con leucemia linfoide, las células leucémicas sobre expresan CD13 (Griffin, Ritz et al. 1981). Con el tiempo se ha ido demostrado que las células de cáncer de piel, ovario, tiroides, pulmón, estómago, colon, riñón, hueso y próstata, también presentan alta expresión de CD13. Además, en estas células anormales existe una alta correlación entre la actividad enzimática de CD13 y el potencial de invasividad, puesto que CD13 degrada proteínas de la matriz extracelular, como el colágeno tipo IV y entactina, facilitando la movilidad de la célula tumoral (Fujii, Nakajima et al. 1995, Mina-Osorio 2008).

El grupo de Mori reveló en 2010 que CD13 no solo se expresa en células cancerosas sino que de manera especial CD13 resultó ser un marcador de células madre de tumor (CSC) de hígado. En un modelo murino con cáncer de hígado, se comprobó que la APN se expresa en la pequeña población con menor tasa de recambio y con habilidad de formar otros tumores al ser trasplantado en otros animales (Haraguchi, Ishii et al. 2010). En ese mismo reporte se evidenció la expresión de esta molécula a lo largo del ciclo celular de las CSC de hígado: durante las fases G0 y G1 son CD13+ CD90- , mientras que en el resto de las fases mantienen la expresión de CD13 y ganan la expresión de CD90. También demuestran que la sobreexpresión en este modelo, estaba dada por células con significativamente menor tasa de proliferación que el resto de las células del tumor.

Varias investigaciones sobre la movilidad de células tumorales, resaltan el papel de las peptidasas para facilitar el desprendimiento de la célula de la matriz extracelular. Y más aún, se ha reportado que el entrecruzamiento de CD13 transmembranal, así como la incubación de células tumorales con sCD13 aumenta la capacidad

migratoria de la célula. Este efecto puede ser abatido con el uso de siRNA's y con inhibidores de la actividad catalítica de CD13 (Fukasawa, Fujii et al. 2006) aunque aparentemente éstos no afectaban la proliferación ni la adhesión a colágeno I. Se sugiere que la capacidad de invasión de las líneas HT1080 (fibrosarcoma), la A375 (melanoma) y la SN12M (carcinoma renal), se reduce al bloquear a CD13 con el anticuerpo WM15 debido a la reducción de la capacidad enzimática de CD13, que no le permite degradar el colágeno tipo IV (Saiki, Fujii et al. 1993).

Por otra parte, se ha reportado que pequeñas diferencias en la secuencia de CD13 debido a polimorfismos y/o a ediciones del ARN mensajero (ARNm), tienen implicaciones en el desarrollo o no de leucemias mieloides (Dybkaer, Kristensen et al. 2001). También se reportó que en un estudio de cáncer de colón, había varios genes con pérdida de heterocigocidad, entre ellos el gen *ANPEP*. A esto se le correlacionó con un decremento en la regulación transcripcional del gen (Birkenkamp-Demtroder, Christensen et al. 2002). Y como se mencionó anteriormente, existen distintas isoformas de CD13 y se ha propuesto que la o las isoformas de CD13 expresadas por células normales son diferentes de las expresadas por células tumorales, por lo que se propone que debe ser posible obtener anticuerpos que reconozcan únicamente al CD13 expresado en células tumorales, que serían herramientas útiles para dirigir compuestos citotóxicos específicamente a estas células (Guzman-Rojas, Rangel et al. 2012).

Debido a la presencia de CD13 en células tumorales y a la relación fuertemente argumentada del nivel de expresión de CD13 con el cáncer y el desarrollo de tumores, se han empleado distintas estrategias buscando utilizar a la APN como blanco terapéutico contra el cáncer. La propuesta inmediata fue la inhibición directa de la APN, sin embargo esta como muchas peptidasas, comparten inhibidores y tratar con inhibidores específicos al sitio catalítico (ej. anticuerpo WM15), resulta poco viable. Se han utilizado diferentes inhibidores como la bestatina, el CHR 2797 y la curcumina, o bien moléculas que pudieran acarrear medicamentos

antitumorales directamente a los tejidos involucrados (Wickstro, Larsson et al. 2011).

Se han reportado ensayos clínicos donde utilizaron la bestatina en cánceres de vejiga, estómago, esófago y piel, donde han resultado favorables, aunque no se encontraron diferencias significativas en pacientes con cáncer escamoso de pulmón. En cuanto a la coadministración de bestatina junto con otro medicamento antitumoral, hay resultados variados. Por ejemplo la coadministración de mitomicina C y bestatina no ocasionó cambios significativos con respecto a la administración de la mitomicina C sola, en pacientes con cánceres de estómago (Wickstro, Larsson et al. 2011). En contraste, en un ensayo clínico hubo una menor tasa de recaída en pacientes a quienes se les había intervenido quirúrgicamente para remover el cáncer de vejiga, y se les coadministró bestatina junto con UFT (5-fluor-1-[2-tetrahidrofuril]-2,4 [1H,3H]-pirimidinediona) durante un año, en comparación con pacientes a quienes solo se les administró la UFT (Wickstro, Larsson et al. 2011).

En un estudio, utilizando la técnica de PhD, se buscaron secuencias con afinidad a moléculas en las membranas de células endoteliales en procesos angiogénicos relacionados a tumores. Se identificaron varios péptidos que se unían a integrinas, fibronectina III, y a otras proteínas de interés, entre ellas a CD13. Las secuencias con los residuos RGD (Arginina- Glicina- Ácido aspártico) se unieron a más de 25 integrinas, aunque su afinidad era mayor por las integrinas $\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$, mientras que las secuencias con afinidad a CD13 contenían tres residuos consenso: Asparagina- Glicina- Arginina (NGR) (Pasqualini, Koivunen et al. 2000). No sólo eso, sino se ha reportado que la secuencia NGR tiene alta afinidad por la APN expresada en células tumorales y células endoteliales de procesos angiogénicos asociados a tumores, y que el tripéptido no tiene esa misma afinidad por el CD13 expresado en células mieloides ni en células del epitelio renal (Curnis, Arrigoni et al. 2002). A partir de entonces se han generado múltiples ensayos para usar la secuencia NGR como acarreadora de medicamentos citotóxicos dirigidos a células tumorales (Arap,

Pasqualini et al. 1998). Además, se ha encontrado que ciertas modificaciones podrían mejorar la afinidad por CD13 expresado por células en procesos angiogénicos. Así, se descubrió que la secuencia NGR modificada para expresarse de forma de anillo CNGRC- tenía una mayor afinidad por CD13. De esta manera se podían conjugar medicamentos pro- apoptóticos de forma selectiva a estos endotelios y bloquear la angiogénesis relacionada a tumores (ELLERBY, ARAP et al. 1999, Pasqualini, Koivunen et al. 2000).

Recientemente se ha descrito una estrategia basada en el uso de moléculas con afinidad por CD13 para dirigir compuestos citotóxicos en la cercanía de células cancerosas. Estos compuestos utilizan secuencias CNGRC conjugadas con medicamentos antitumorales a través de enlaces que puedan ser hidrolizados por la APN. A estos conjugados se les llama pre-medicamento. Algunos de estos tratamientos reportados en las primeras fases de ensayos clínicos son el melfalan-J1, donde la molécula con afinidad por CD13 que es hidrolizada por APN es la J1, liberando el melfalan en la vecindad de la célula tumoral. Los pre medicamentos a base de Flúor- 2'- deoxiuridina (5FdUrd) también han resultado prometedores ya que la toxicidad generada por los medicamentos que carga han generado más daño en células que tienen CD13, que en células que no lo expresan (Wickstro, Larsson et al. 2011).

TECNOLOGÍA DEL DESPLIEGUE EN FAGOS

El uso de bacteriófagos en biología molecular, ha generado un gran avance en muchas áreas del conocimiento, desde el uso de estos como diagnóstico de ecosistemas, como bactericidas en la industria alimentaria, como tratamiento de múltiples enfermedades, el desarrollo de enzimas y proteínas de interés biotecnológico, hasta la investigación de los mecanismos moleculares de infección de los mismos (Drulis-Kawa, Majkowska-Skrobek et al. 2015). Aunque el uso de bacteriófagos genéticamente modificados plantea preocupaciones por el posible impacto que tendrían si llegasen a ser liberados al medio ambiente, Gladstone y sus

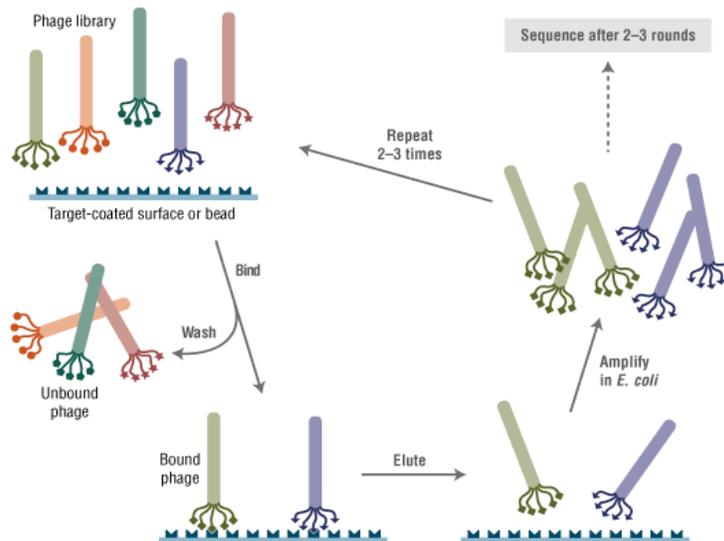
colaboradores demostraron en el 2012, que bacteriófagos T7 modificados por ingeniería genética para expresar una enzima que degrada la cápsula de su hospedero, son menos eficientes infectando y propagándose en la naturaleza. Concluyendo que de manera evolutiva, estos bacteriófagos resultarían desplazados por los bacteriófagos T7 silvestres. Por lo tanto, el riesgo de dispersión en la naturaleza de bacteriófagos modificados, es altamente reducido. En base a ello y las ventajas que proveen los virus como vectores, se han desarrollado diferentes tecnologías.

El despliegue en fagos (Phage display, PhD) es una combinación de varias técnicas de ingeniería genética, pues se generan bibliotecas de vectores fagémidos que codifican para péptidos de interés fusionados al gen de alguna proteína estructural de un virus. De esta manera los péptidos en cuestión quedan expuestos y pueden ser seleccionados entre una biblioteca y consecuentemente identificar el gen correspondiente. Desde 1985, que fue descrita por primera vez la tecnología del despliegue en fagos por G.P. Smith, se ha empleado en varias aplicaciones, entre ellas la producción y el diseño de anticuerpos específicos para un antígeno, el estudio de anticuerpos auto- reactivos, la selección de proteínas que tienen interacción con otras o bien la búsqueda de ligandos o receptores (Hammers and Stanley 2014). Y aún más, pues el diseño de bibliotecas de cDNA de proteínas expresadas por diferentes sistemas, o la introducción de dominios de proteínas, han potenciado el estudio funcional y estructural de algunas proteínas.

El objetivo principal del PhD es identificar secuencias peptídicas con afinidad por una molécula blanco, que puede estar fijada en una superficie, en suspensión o en una membrana celular. Para seleccionar clones de estas bibliotecas, se realizan de 3 a 5 rondas de: selección de clones con afinidad por la molécula blanco, seguido de la elución de dichas clones y su amplificación para posteriormente utilizarla en la siguiente ronda de selección. En teoría, la población eluída en la última ronda de selección debe estar conformada por un enriquecimiento de clones con alta afinidad

por la molécula blanco (Hammers and Stanley 2014). La Figura 2 muestra un esquema del procedimiento de bio- selección de fagos con afinidad a una molécula inmovilizada en una superficie.

Figura 2- esquema del proceso de bio- selección de una biblioteca de Ph.D. (BioLabs 2014)



Se han desarrollado diferentes construcciones de plásmidos para desplegarlos sobre el fago filamentosos M13. La característica que lo hace ideal para trabajarlo, es que no ocasiona lisis en las bacterias infectadas, por lo que es posible mantener bacterias con los vectores de interés. M13 cuenta con dos proteínas estructurales de importancia para dicha tecnología: la proteína estructural pIII y la pVIII. Los fagémidos construidos para desplegar las proteínas de la biblioteca fusionada a pIII, tienen la característica de ser expresadas en baja cantidad (de una a tres copias por partícula viral) mientras que las diseñadas para desplegarse junto a la pVIII son expresadas en gran cantidad (alrededor de 2700 copias por partícula viral). La mayoría de estas construcciones a base de fagémidos, aprovechan las características de plásmidos y las del bacteriófago. El inconveniente con los fagémidos es que estos no poseen la información para codificar el resto de las proteínas de M13. Es por ello que es necesario realizar una doble infección con el fago ayudador M13KO7 que además de codificar el resto de las proteínas del fago,

permite el empaquetamiento correcto. Otra característica de este fago ayudador, es que carga el gen *Tn903*, cuya expresión confiere resistencia a kanamicina a las bacterias transformadas por lo que se pueden seleccionar aquellas que cargan con la información del vector y con la del fago ayudador, produciéndose así partículas virales que se liberan al medio extracelular (Ganten 2006). Al final se obtienen partículas virales con proteínas de ambos vectores.

Planteamiento del proyecto

Se ha demostrado que en monocitos y macrófagos humanos, el entrecruzamiento de CD13 con anticuerpos monoclonales induce respuestas biológicas como la adhesión celular y la fagocitosis, las cuales son dependientes de la activación de vías de transducción de señales. Por lo tanto, es adecuado considerar a CD13 como un receptor. Bajo esta premisa, debe existir uno o varios ligandos naturales que al interactuar con CD13 induzcan estas respuestas celulares en mamíferos. Hasta ahora, los procesos en que se ha involucrado a CD13, han sido observados *in vitro* mediante: a) el entrecruzamiento de CD13 con anticuerpos monoclonales, b) con el uso de inhibidores de la actividad enzimática, o c) sobre expresando o suprimiendo la expresión de CD13 en diferentes tipos celulares; y de manera *in vivo* en animales deficientes de CD13. Desde este punto de vista podemos considerar a CD13 como un receptor huérfano. Sin duda, un paso importante para entender la relevancia de la participación de CD13 en estas funciones a nivel fisiológico, será identificar ligandos naturales de CD13 capaces de inducir su activación para estas funciones. Este proyecto está enfocado a identificar ligandos de CD13 que induzcan o inhiban su actividad en estos procesos, para posteriormente estudiar la cascada de señalización generada al estimular CD13, las moléculas involucradas y los posibles efectos en un contexto fisiológico.

HIPÓTESIS

En el cuerpo humano, existe uno o varios ligandos naturales del CD13 capaces de inducir cascadas de señalización que promuevan los procesos celulares, mismos que son inducidos por el entrecruzamiento de CD13 con anticuerpos monoclonales.

OBJETIVOS

General

Proponer uno o varios ligandos naturales de la Aminopeptidasa N humana que sean capaces de inducir los procesos celulares en los que se ha descrito su participación.

Particulares

- Identificar secuencias de oligopéptidos con afinidad por CD13 humano mediante la selección fagos de una biblioteca de fagos M13 que expresan secuencias de 12 aminoácidos dispuestos al azar.
- Identificar péptidos con afinidad por CD13 mediante la selección de bacteriófagos de una biblioteca de fagémidos con la información de proteínas expresadas en un cerebro humano.
- Secuenciar el ADN de las clonas seleccionadas para determinar las secuencias de aminoácidos responsables de la afinidad por CD13.
- Determinar si hay similitud entre las secuencias de aminoácidos y/o motivos consenso, entre las secuencias de las clonas provenientes de la biblioteca de proteínas de cerebro.
- Identificar proteínas que compartan identidad con las que las secuencias de aminoácidos de las clonas seleccionadas.
- Proponer péptidos con afinidad a CD13 que potencialmente pudieran ser ligandos naturales del CD13 humano.

Materiales y métodos

BIBLIOTECA COMERCIAL

Se utilizó una biblioteca de péptidos de 12 aminoácidos al azar, insertados en la proteína pIII de bacteriófagos M13 (New England BioLabs E8110S). La diversidad de la biblioteca es de 10^9 diferentes clonas que cuentan con el gen reportero *lacZ* que codifica la enzima β -galactosidasa. Esta enzima hidroliza el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal o también BCIG) del medio, produciendo galactosa y 5-bromo-4-cloro-3-hidroindol, este último se oxida y forma un compuesto azul insoluble, el cual se utiliza como indicador de las bacterias infectadas.

BIBLIOTECA DE PROTEÍNAS DE CEREBRO

Se utilizó una biblioteca de cDNA que codifica para diferentes péptidos expresados en cerebro humano, desplegada en Bacteriófagos M13, descrita previamente (Munguia, et al., 2005). La diversidad de dicha biblioteca es de 2×10^5 clonas distintas y se construyó con un plásmido pCANTAB 5E que contiene un gen de resistencia a ampicilina, por lo que se utilizó medio 2x YT (Sigma, Y2377) con ampicilina $100 \mu\text{g/mL}$ (Sigma, A0166) para la propagación selectiva de las bacterias transformadas.

MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizaron células de la línea HEK-293 (células epiteliales de riñón de un embrión humano, ATCC) y células HEK-293 que fueron transfectadas con el gen *GFP-ANPEP* (CD13) (Licona Limón, 2015), las cuales serán referidas como HEK-ANPEP. También se usaron células monocíticas humanas de la línea U-937 (ATCC). Todos los tipos celulares fueron cultivados en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (Bioproducts) inactivado, 1 mM de piruvato de sodio, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 0.1 mM de L-glutamina y

100 unidades/ mL de penicilina y 100 µg/ mL de estreptomina (todos los suplementos menos el suero son de Gibco). Todos los cultivos celulares se mantuvieron en una atmósfera húmeda, con 5% de CO₂ y a 37°C.

Se utilizó el anticuerpo monoclonal anti CD13 humano 452, hecho en ratón, de la subclase IgG1, el cual fue purificado del sobrenadante del hibridoma proporcionado por el Dr. Meenhard Herlyn (Wistar Institute of Anatomy and Biology, Philadelphia, PA, USA). También se usó suero de conejo inmunizado con el fago silvestre M13, el cual fue proporcionado por la Dra. Gohar Gevorgyan Markosian. Como anticuerpos secundarios, se utilizaron anti- IgG de conejo hecho en cabra acoplado a Alexa Flúor 647 (Abcam), y anti IgG de ratón hecho en cabra acoplado a Alexa Flúor 647 (Abcam). Tanto el bacteriófago silvestre M13 como la cepa *Escherichia coli* TG1 también fueron proporcionados por la Dra. Gohar Gevorgyan Markosian.

Se trabajó con *Escherichia coli* TG1 ya que presenta características importantes para la infección con bacteriófagos M13, una de ellas es que presenta pili, lo cual es fundamental ya que el M13 infecta a la célula a través de un pilus. Por otro lado, esta cepa tiene una deleción parcial del gen *lacZ*, lo que permite la complementación de la expresión génica cuando un plásmido contiene el fragmento faltante. De esta forma, las bacterias transformadas expresan una enzima funcional que servirá para distinguirlas de las no transformadas. También es importante la deleción del operón *lac* en los genes de la biosíntesis de prolina, por lo que la bacteria necesita una fuente primaria de carbono distinta a la lactosa y aparte necesita prolina en el medio. La cepa debe sobre expresar el gen *lacI*, de manera que se regule fuertemente el operón *lac*. Y por último, en esta cepa no se detiene la traducción en los codones de paro UAA y UAG, insertándose un ácido glutámico en su posición, por lo que la traducción es continua.

SELECCIÓN DE CLONAS CON AFINIDAD POR CD13

A continuación se describe el proceso que se siguió para la selección de clonas de cada biblioteca. Para la primera ronda de selección, se bloquearon 10x10⁶ células

HEK- 293 con 5 mL de PBS pH 7.4, BSA 1% (PBSB) y en otro tubo 10×10^6 células HEK- ANPEP con 5 mL de PBSB, durante una hora a 4°C con agitación moderada. Al mismo tiempo se pre- incubaron $10 \mu\text{L}$ de cada una de las bibliotecas en 1 mL de PBSB (1×10^{11} UFP de la biblioteca comercial y 2×10^7 UFP de la biblioteca de cerebro) en las mismas condiciones. Posteriormente se lavaron las células con 5 mL PBS pH 7.4 y se re- suspendieron las células HEK- 293 con el mililitro de la suspensión de los fagos. Se incubó por 2 horas a temperatura ambiente con agitación moderada, con el objeto de adsorber clonas con secuencias con afinidad por alguna molécula superficial de las células HEK. Pasado ese tiempo, se centrifugaron las células y el sobrenadante (con los fagos que no se unieron a células HEK) se transfirió al tubo con las células HEK- ANPEP, a fin de seleccionar los fagos con afinidad para CD13. Se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente y agitación moderada. En seguida se volvieron a centrifugar y se guardó el sobrenadante (*f (-) R1*), y las células se lavaron con 1 mL de PBS por 5 veces. Se eluyeron los fagos unidos a las células (*El R1*) con $200 \mu\text{L}$ de glicina ácida a 0.2 M, pH 2.8, en una incubación de 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó a 1000 rpm por 1 minuto para recuperar el sobrenadante en otro vial con $40 \mu\text{L}$ de Tris 2M, pH 8.

Para las infecciones y amplificaciones se utilizó la cepa *E. coli* TG1 (TG1) crecida en medio líquido 2x YT, en su fase de crecimiento exponencial. Para amplificar las clonas eluidas provenientes de la biblioteca comercial, se hizo una dilución 1:100 de un cultivo bacteriano en crecimiento exponencial en un matraz de 250 mL con 50 mL de medio fresco 2x YT. Se añadieron $150 \mu\text{L}$ del *El R1* y se incubó por 15 minutos a 37°C sin agitación para la infección de las bacterias. Posteriormente se incubó por 4.5 horas a 37°C con agitación (250 rpm). La metodología para la amplificación de las clonas eluidas provenientes de la biblioteca de proteínas de cerebro, fue distinta. Se tomaron 10 mL de un cultivo de TG1 en medio 2x YT de toda la noche a 37°C y se le añadieron $150 \mu\text{L}$ del *El R1* junto con 1 mL de glucosa al 20%, $10 \mu\text{L}$ de ampicilina 100 mg/ mL y 1×10^6 partículas de fago ayudador M13KO7 (ThermoFisher 18311019). Se incubó por 30 minutos a 37°C sin agitación

y después 30 minutos a 37°C a 250 rpm. Pasado el tiempo, se centrifugó para transferir las células transformadas con ambas partículas a un matraz de 250 mL con 50 mL de medio fresco 2x YT con 50 µL de ampicilina a 100mg/ mL y 50 µL de kanamicina a 70 mg/ mL. Finalmente se incubó por 18 horas a 30°C a 200 rpm de agitación.

Después del tiempo requerido de incubación para cada biblioteca, se procedió con una doble precipitación con PEG para la purificación de los fagos. Para esto, se centrifugó el medio de cultivo a 4500 rpm por 10 minutos a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo de ultracentrífuga estéril con 1/5 del volumen de una solución de PEG al 20%, NaCl 2.5 M (PEG/NaCl). Se incubó toda la noche a 4°C y posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 1 mL de TBS pH 7.2. Se transfirió a un micro tubo estéril de 1.5 mL y se centrifugó por 10 minutos a 4°C y a 13,000 rpm. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo estéril, al que se le añadió 1/5 del volumen de PEG/NaCl y se volvió a incubar una hora a 4°C. Después se volvió a centrifugar por 10 minutos a 4°C a 13,000 rpm y finalmente la pastilla se re suspendió en 200 µL de TBS (*Am R1*).

Para obtener los títulos tanto del eluido como del amplificado de las clonas con afinidad por CD13 de la biblioteca comercial, se hicieron varias diluciones del EI R1 y del Am R1 para calcular la concentración. Para cada dilución se tomaron 200 µL de un cultivo de TG1 en fase exponencial en medio 2x YT y se infectó con 10 µL de la dilución correspondiente. Se incubó por 10 minutos a 37°C y se le añadieron 10 µL de una solución de IPTG (Sigma, IPTG- RO) a 0.05 g/mL y X- gal (Sigma, XGAL- RO) a 0.04 g/mL. Después se transfirió a tubos con 4 mL de Top agar de LB, se homogenizó y se vertió en placas de Petri con LB agar. Las cajas fueron incubadas por 18 horas a 37°C y se contaron las colonias para calcular el número de partículas por mL. Para obtener el título de las clonas eluidas o amplificadas de la biblioteca de proteínas de cerebro, se realizó un procedimiento parecido pero con la diferencia

que el medio de selección en vez de ser IPTG/ X- gal, fue ampicilina, por lo que se utilizaron placas LB agar con 100 µg/ mL de ampicilina.

Para cada biblioteca, se repitió todo el procedimiento de esta sección 2 veces más para enriquecer a las clonas afines a CD13. Las selecciones de la segunda ronda fueron con 5×10^6 células HEK y 5×10^6 células HEK- ANPEP y en la tercera ronda la mitad de cada tipo celular. Cabe mencionar que cada selección se realizó con del amplificado de la ronda anterior.

ANÁLISIS DE CLONAS INDIVIDUALES

Del eluido de la última ronda de selección (*EI R3*) de cada biblioteca, se aislaron clonas individuales para analizar su especificidad y afinidad por CD13. De una caja de Petri con clonas del *EI R3* se recolectaron clonas al azar y se amplificaron en medio 2x YT siguiendo el método de amplificación y purificación anteriormente mencionado, según la proveniencia de la clona.

Posteriormente se comprobó la unión específica de cada clona a CD13, para lo cual se comparó la unión de cada clona a células HEK y células HEK- ANPEP, mediante citometría de flujo. Se colocaron 2×10^5 células por pozo (ya sea HEK o HEK- ANPEP) en placas de 96 pozos y se bloquearon con 100 µL de PBSB. Se lavaron las células con PBS pH 7.4 y se incubaron con 50µL de PBSB con 1×10^{10} partículas virales de cada clona. Se incubó la placa durante 1 hora a 37°C y se lavó con PBS. Posteriormente se agregaron 100 µL por pozo de suero de conejo anti M13 (1:500), se incubó la placa por 1 hora a 37°C y seguido de una centrifugación, se decantó para re suspender las células de cada pozo en 100 µL de solución del anticuerpo anti IgG de conejo acoplado a Alexa Flúor 647 (1:2000). Se incubó la placa nuevamente 1 hora a 37°C y finalmente se lavaron las células 3 veces con PBS pH 7.4. Se fijaron las células con una solución de PFA al 1%. Las muestras se leyeron por medio de un equipo de citometría de flujo, Attune Flow Cytometer (Thermofisher)

y se analizaron con el software del mismo. Se calculó el índice de unión específica de los fagos a las células HEK- ANPEP de acuerdo a la siguiente fórmula:

Índice de unión específica =	$(IMF * \% \text{ de células HEK ANPEP}) - (IMF' * \% \text{ de células HEK})$
------------------------------	--

Siendo

IMF la mediana de la intensidad de fluorescencia del área positiva dada por una mayor fluorescencia que la causada por la unión del fago silvestre a las células HEK- ANPEP.

IMF' mediana de la intensidad de fluorescencia del área positiva dada por una mayor fluorescencia que la causada por la unión del fago silvestre a las células HEK.

De las clonas positivas, es decir con índice de unión específico positivo, se procedió a extraer el material genético para secuenciarlo. De las clonas provenientes de la biblioteca comercial, se extrajo ssDNA de las partículas virales siguiendo el protocolo sugerido por el kit de la biblioteca de New England BioLabs, mientras que de las clonas que venían de la biblioteca de proteínas de cerebro, se extrajo dsDNA a partir de bacterias transformadas con cada una de las clonas. Para ello se utilizó el kit de Invitrogen PureLink Genomic DNA (k182001).

En todos los casos, se cuantificó la concentración de ADN en ng/ μ L por la absorbancia a 260nm. Por otro lado también se corrió cada muestra en un gel de agarosa para visualizar la integridad del ADN. Posteriormente, para las muestras provenientes de la biblioteca de proteínas de cerebro, se realizaron reacciones en cadena de la polimerasa (PCRs) para amplificar el fragmento insertado de la

biblioteca y se visualizó en un gel de agarosa. Las muestras se prepararon en 20 μ L y las condiciones del termociclador fueron las siguientes:

- 1) 1 ciclo de 5 minutos a 95°C
- 2) 40 ciclos de
 - a) 30 segundos a 95°C
 - b) 30 segundos a 61°C
 - c) 45 segundos a 72°C
- 3) 1 ciclo de 5 minutos a 72°C

Las muestras que mostraron un amplicón fueron seleccionadas para su secuenciación. En seguida se hizo un alineamiento (BALST NCBI) de cada secuencia obtenida en bases de datos de proteínas humanas, para determinar cuáles son las proteínas con afinidad por CD13 y estudiar sus características, funciones, localización e interacciones con otras proteínas, con el fin de proponer un ligando endógeno de la aminopeptidasa N.

EVALUACIÓN DE LAS CLONAS EN FUNCIONES CELULARES DONDE CD13 ESTÁ INVOLUCRADO

Se evaluó la capacidad de las clonas positivas de inducir la agregación celular de la línea celular U 937. En estos experimentos, en una placa de 96 pozos se incubaron partículas virales de cada clona (1×10^9 partículas) con 5×10^4 células por pozo, en 200 μ L de medio RPMI 1640 con 10% de FBS. Se monitoreó por cuatro días para evaluar si inducían agregación celular mediante el microscopio óptico. Como control positivo se incubaron células con el anticuerpo monoclonal 452 a 0.5 μ g/ mL, condiciones en que induce la agregación de las células. De manera paralela, se corrieron experimentos donde la misma cantidad de partículas virales de cada clona fueron pre- incubadas con 5×10^4 células por pozo en 100 μ L de medio RPMI con 10% de FBS, durante 1 hora a 37°C. Posteriormente se les añadió el anticuerpo 452 a 0.5 μ g/ mL, con el fin de evaluar si las clonas afectaban la agregación celular

inducida por el anticuerpo anti-CD13. De igual manera se monitoreó durante las siguientes 72 horas. Las placas de ambos experimentos se mantuvieron toda la cinética en una atmósfera húmeda, con 5% de CO₂ a 37°C.

Por otro lado también se realizaron ensayos de inhibición enzimática para evaluar si las secuencias de las clonas afectan la capacidad catalítica. Para ello, en una placa de 96 pozos se sembraron 5x10⁴ células HEK- ANPEP por pozo en 100 µL de PBS pH 7.4 y 10% de FBS, posteriormente se añadieron 1x10¹⁰ partículas virales. Uno de los pozos con células se reservó para incubarlo con el inhibidor bestatina (Santa Cruz Biotech, sc202975) 0.04 mg/mL como control positivo de la inhibición de la actividad enzimática, otro pozo con las células se mantuvo intacto como control negativo y en un último pozo se sembraron 5x10⁴ células HEK para descartar la actividad de cualquier otra peptidasa. Se incubó durante una hora a 37°C y pasado el tiempo, se agregaron 15µL del sustrato H-Ala- pNA (Sigma, A-9325) a 60mM y se incubó por 30 minutos a 37°C. Finalmente, se leyó la absorbancia a 405 nm en un espectrofotómetro, ya que el producto de la hidrólisis del sustrato muestra un color amarillo.

Resultados

SELECCIÓN DE CLONAS CON AFINIDAD POR CD13

Las rondas de selección con células permitieron aislar clonas con afinidad por células HEK ANPEP a partir de cada una de las bibliotecas. La tabla 4 muestra los títulos de las eluciones en cada una de las rondas de selección así como de su amplificación, para cada biblioteca. Para obtener las secuencias específicas con afinidad por CD13 de las clonas seleccionadas, se infectó la bacteria *Escherichia coli* TG1 con una alícuota de las clonas eluidas de la tercera ronda y se sembraron en una caja de Petri con LB agar con los suplementos necesarios para su crecimiento. Se tomaron colonias al azar para expandirlas por separado en medio de cultivo y poder obtener un mayor título de partículas virales de cada una.

Tabla 4 – Títulos reportados en Unidades Formadoras de Placa (UFP) por mililitro, de cada una de las rondas de selección utilizando tanto la biblioteca comercial como la de cDNA codificante del cerebro.

		Biblioteca comercial	Biblioteca de cDNA
Inicial		1×10^{11}	1×10^9
1 R	Eluido	1.2×10^6	4.7×10^4
	Amplificado	4.67×10^{13}	2×10^{13}
2 R	Eluido	2.7×10^7	4.8×10^3
	Amplificado	1.26×10^{14}	1.5×10^{14}
3 R	Eluido	1.2×10^7	5.22×10^5

A los amplificados de cada una de las clonas, se les hizo una prueba de unión tanto a células HEK-ANPEP como células HEK, visualizando la unión por citometría de flujo. Para la cuantificación, se tomó en cuenta la unión del fago silvestre M13 a las células como control negativo. El área positiva fue todo aquello con valores de intensidad de fluorescencia mayores a los que presenta el 90% de las células cuando son incubadas con el fago silvestre. Para tener una medida objetiva del

grado de unión específica de cada una de las clonas a CD13, se calculó el índice de unión específica y se normalizó a 1, siendo 1 la unión del fago silvestre.

De todas las clonas, se seleccionaron aquellas con resultados de índices de unión positivos en tres réplicas, es decir las clonas con mayor unión a células HEK ANPEP que a células HEK. En la Figura 3 se muestran los histogramas de una de la clonas de la biblioteca de cerebro (A) y de una clona de la biblioteca comercial (B) que presentaron mayor unión a las células HEK- ANPEP que a las células HEK.

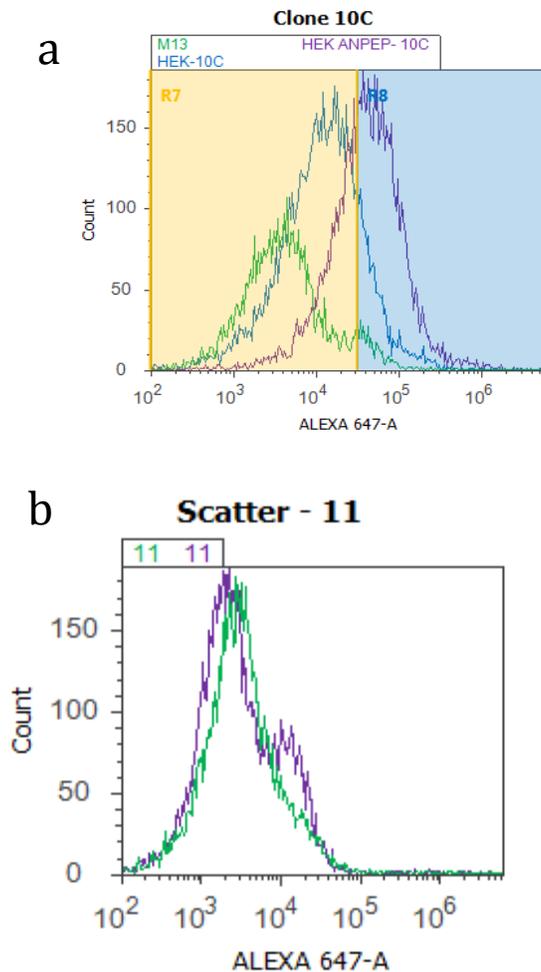


Figura 3- Histogramas representativos de un experimento donde se muestra a) la unión de la clona 10c (proveniente de la biblioteca de cDNA) incubada con células HEK (línea azul) comparada con la incubación con células HEK ANPEP (línea morada). El histograma verde representa la unión inespecífica del fago silvestre M13 a las células HEK ANPEP. En b) se muestra la unión de la clona 11 (proveniente de la biblioteca comercial) a células HEK (línea verde) comparado con la unión a células HEK ANPEP (morado). En ambos casos se utilizó un anticuerpo policlonal anti fago M13 y un anticuerpo secundario marcado con Alexa 647.

De este análisis, resultaron 31 clonas positivas de la biblioteca de cDNA y 12 de la biblioteca comercial, las cuales fueron amplificadas en *E. coli* TG1 con el fin de extraer su material genético. A las clonas que originalmente venían de la biblioteca de proteínas de cerebro, se les extrajo dsDNA con un kit comercial de extracción de ADN y a las que eran de la biblioteca comercial, se les extrajo ssDNA directamente de los fagos. Posteriormente se cuantificó la concentración de cada muestra por absorbancia a 260nm. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1% para verificar la integridad del ADN.

Para las muestras provenientes de la biblioteca de cDNA de cerebro, se realizó una PCR de punto final para amplificar el inserto de la biblioteca y corroborar que aún estuviera presente. Se utilizaron los cebadores S1 como delantero y S6 como reverso, debido a la utilización del vector pCantab 5E para la construcción de la biblioteca. Se corrieron geles de agarosa al 1% para visualizar la presencia de los amplicones. En la Figura 4 se muestra uno de los geles en donde el primer carril contiene el marcador de peso molecular y los siguientes 13 carriles corresponden a las amplificaciones de los insertos de 13 clonas distintas; en el último carril se muestra el control negativo. En la mayoría de las clonas visualizadas, el amplicón fue entre 100pb y 500pb, mientras que en otras clonas no se observó presencia de un amplicón.

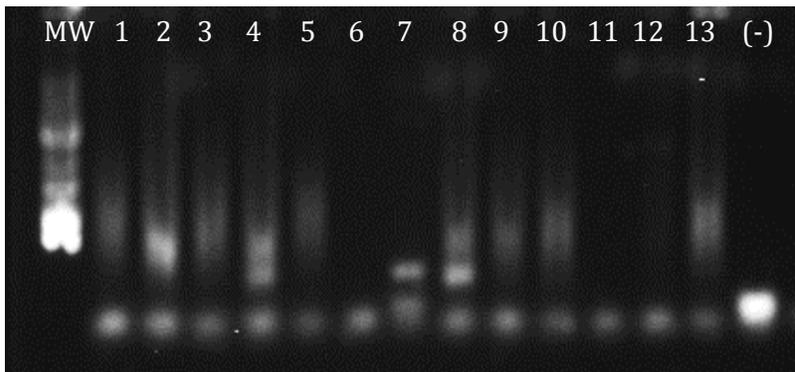


Figura 4- Gel de agarosa al 1% que muestra los amplicones de la PCR de 13 clonas positivas de la biblioteca de cDNA. Carril 1: marcador de peso molecular; carriles 2 a 13: clonas; carril 14: control negativo.

Las clonas en las que se detectó una banda correspondiente al inserto de las clonas provenientes de la biblioteca de cDNA, se mandaron secuenciar junto con las clonas seleccionadas provenientes de la biblioteca comercial (Genetic Analyzer Applied Biosystems)

Se utilizó un cebador (el reverso) para secuenciar las clonas comerciales, llamado -28 gIII, ya que se obtuvo ADN de una sola cadena, este cebador formaba parte del kit comercial de la biblioteca. Los cebadores utilizados para la secuenciación de las clonas provenientes de la biblioteca de cDNA fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Se utilizaron tanto el reverso como delantero para la PCR y la secuenciación, ya que se trabajó con dsDNA. La Tabla 5 indica las secuencias de cada uno de los cebadores.

Tabla 5 – Cebadores utilizados para la secuenciación de las clonas seleccionadas.

Nombre del cebador	Biblioteca con la que se alinea el cebador	Secuencia
-28 gIII	PhD libraries de New England BioLabs	5'- GTA TGG GAT TTT GCT AAA CAA C- 3'
S1 pCantab 5e	Construidas con el plásmido pCantab 5e	5'- CAA CGT GAA AAA ATT ATTATT CGC -3'
S6 pCantab 5e		5'- GTA AAT GAA TTT TCT GTA TGA GG -3'

De las clonas secuenciadas de la biblioteca de proteínas de cerebro, 10 revelaron contener secuencias con alto grado de similitud. Hubo secuencias más largas, sin embargo, poseían residuos en la misma secuencia que el resto de las clonas. A continuación se muestran las secuencias obtenidas (Tabla 6).

Tabla 6- Secuencias de nucleótidos de las clonas seleccionadas de cada biblioteca. En azul se resaltan los nucleótidos correspondientes a la secuencia específica de la clona en cuestión, en rojo se resaltan los cambios de nucleótidos por sustitución, el símbolo * indica deleciones puntuales mientras que los símbolos <> indican deleción de una secuencia.

Biblioteca	Clona	Secuencia peptídica
De proteínas de cerebro humano	2E, 10C, BH, C4, 10E, 9F	5' ATGCTGGGGGATCCGAATTCAAGC<>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTT 3'
	9D	5' ATGCTGGGGGATCCGAATTCAAGC<>AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA CCT ACTT 3'
	5H	5'ATGCTCGGGGATCCGAATTC GAA *C/AGCATACCCCGATTCCGCTACGACCAACTCATACACCT CCTATGAAAAAACTTCCTACCACTCACCTAGCATTACTTATATGATATGTCTCCATACCCATTACA ATCTCCAGCATTCCCCCTCAAACCT/AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTT3'
	BF	5'ATGCT G GGGGATCCGAG T TTCAAGC/ACTGAACTCCTCCCCCCAATTGGACCAATCTATCCCCCT ATAGAAGAATAATGTTAGTATAAGTAACATGAAAACATTTTCTCCGCATAAGCCTGGGTCAGATT AAAACCCTGAACTGACAATTAACAGCCCAATA/AAAAAAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA AAAAAAAGCTT3'
	Z	5'ATGCTCGGG*AT G CGAATTCAAGC/TCACAAGGATCCCCAAGATCCACTTTTAGAAGCCATTCTCA TCCAGCAGTGAGAAGCTTCCAGGTAGGACAGAAAAAAGATCCAGCTTCAGCTGCACACCTCTGTC CCCTTGGATGGGGAATAAGGGAAAACGTCTGTTGTATCACTGAAGTTTTTTGTTTTGTTTTTATAC GTGTCTGAATAAAAATGCCAAAGTT/AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTT3'
	Negativa 1	5'ATGCTCGGGG* T CCGAATTCA**/TGAATGAACAAATGAGTGGATGAATGAATGGTAATGGATAATG GGCTATGAAGTCATATTTAAAGGCCCTATTTCAATTTAAAAACAATTTAAATAAATAACTCCCATGGTT/ AAGCTT 3'

	Negativa 2	5'ATGCTCGGGGATCCGAATTCAAGC/CCACTGCACTCCAGCCTGGGCGACAGAGCGAGACTCTGT CTC/AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGCTA 3'
Comercial	54, 21	5' ACTGCGAAGTATCTGCCTATGCGTCCTGGGCCGCTT3'
	51, 14, 8, 4	5' GATTATCATGATCCGAGTCTGCCTACGCTGCGGAAG 3'

ANÁLISIS DE SECUENCIAS CON AFINIDAD POR CD13

Se realizó una búsqueda utilizando el programa BLAST de NCBI para alinear cada una de las secuencias con secuencias reportadas de otros péptidos. Se tomaron en cuenta alineaciones con más del 60% de identidad para clonas de ambas bibliotecas. Se utilizaron tanto bases de datos de secuencias de aminoácidos como de secuencias de nucleótidos. La tabla 7 muestra la identidad que comparten las secuencias de cada una de las clonas con las de otros péptidos incluidos en las bases de datos consultadas.

Tabla 7- Péptidos reportados en la base de datos de NCBI que comparten identidad con las secuencias introducidas en la proteína III de cada clona de ambas bibliotecas. La alineación se efectuó tanto en base de datos de péptidos como en bases de datos de nucleótidos transcritos.

Clonas provenientes de la biblioteca de cDNA de cerebro.

Clona BF

Humanina tipo 8 (MTRNR2L8), mRNA

ID: NM_001190702.1		Longitud: 1290	Número de alineamientos: 1	
Puntaje	Esperado	Identicidades	Gaps	Hebra
179 bits(198)	9e-43	123/139(88%)	0/139(0%)	Positiva/ Positiva
Query 1	ACTGAACTCCTcccccccAATTGGACCAATCTATCCCCCTATAGAAGAACTAATGTTAGT	60		
Sbjct 564	ACTGAACTCCTTGACCCCAATTGGACCAATCTATTACCCTATAGAAGAGCTAATGTTAGT	623		
Query 61	ATAAGTAACATGAAAACATTTTCCTCCGCATAAGCCTGGGTCAGATTAAAACCCCTGAACT	120		
Sbjct 624	ATAAGTAACATGAAAACATTTTCCTCCGCATAAGCCTACATCAGACCAAAATATTTAACT	683		
Query 121	GACAATTAACAGCCCAATA	139		
Sbjct 684	GACAATTAACAGCCCAATA	702		

Clona Z

Receptor tironsin- cinasa 3 erb-b2 (ERBB3), mRNA

ID: NM_001982.3		Longitud: 5765	Número de alineamientos: 1	
Puntaje	Esperado	Identicidades	Gaps	Hebra
358 bits(396)	2e-96	198/198(100%)	0/198(0%)	Positiva /Positiva

Query	1	TCACAAGGATCCCCAAGATCCACTTTTAGAAGCCATTCTCATCCAGCAGTGAGAAGCTTC	60
Sbjct	5550	TCACAAGGATCCCCAAGATCCACTTTTAGAAGCCATTCTCATCCAGCAGTGAGAAGCTTC	5609
Query	61	CAGGTAGGACAGAAAAAAGATCCAGCTTCAGCTGCACACCTCTGTCCCCTGGATGGGGA	120
Sbjct	5610	CAGGTAGGACAGAAAAAAGATCCAGCTTCAGCTGCACACCTCTGTCCCCTGGATGGGGA	5669
Query	121	ACTAAGGGAAAACGTCTGTTGTATCACTGAAGttttttgttttgtttttATACGTGTCTG	180
Sbjct	5670	ACTAAGGGAAAACGTCTGTTGTATCACTGAAGTTTTTGTGTTTTTATACGTGTCTG	5729
Query	181	AATAAAAATGCCAAAGTT	198
Sbjct	5730	AATAAAAATGCCAAAGTT	5747

Clonas provenientes de la biblioteca comercial de 12 a.a. al azar

Clonas 21 y 54

Substrato 4 del receptor de insulina (IRS4)

ID: [NP_003595.1](#) Logintud: 1257 Número de alineamientos: 4

Range 1: 700 a 711	Esperado	Identities	Positivos	Gaps
Score				

25.2 bits(52)	3.5	8/12(67%)	8/12(66%)	3/12(25%)
---------------	-----	-----------	-----------	-----------

Query	4	YLPMRPG---PL	12
		Y PMRPG PL	
Sbjct	700	YVPMRPGVATPL	711

Range 2: 828 a 834	Esperado	Identities	Positivos	Gaps
Score				

17.2 bits(33)	2920	5/7(71%)	5/7(71%)	0/7(0%)
---------------	------	----------	----------	---------

Query	4	YLPMRPG	10
		Y PM PG	
Sbjct	828	YVPMPLPG	834

Range 3: 717 a 722	Esperado	Identities	Positivos	Gaps
Score				

16.3 bits(31)	5986	4/6(67%)	5/6(83%)	0/6(0%)
---------------	------	----------	----------	---------

Query	4	YLPMRP	9
		Y+PM P	
Sbjct	717	YMPMAP	722

Range 4: 487 a 490	Esperado	Identities	Positivos	Gaps
Score				

15.9 bits(30)	8579	3/4(75%)	4/4(100%)	0/4(0%)
Query 4	YLPM 7			
	Y+PM			
Sbjct 487	YMPM 490			

Isoforma b de la proteína F-box/LRR (FBXL12)

ID: NP_001303865.1	Longitud: 293	Número de alineamientos: 1		
Range 1: 18 a 23	Esperado	Identidades	Positivos	Gaps
Score				
25.2 bits(52)	3.5	6/6(100%)	6/6(100%)	0/6(0%)
Query 4	YLPMP 9			
	YLPMP			
Sbjct 18	YLPMP 23			

Proteína 3 potenciadora a la unión al VIH (HIVEP3)

ID: EAX07173.1	Longitud: 2406	Número de alineamientos: 2		
Range 1: 124 a 129	Esperado	Identidades	Positivos	Gaps
Score				
24.0 bits(49)	10	6/6(100%)	6/6(100%)	0/6(0%)
Query 6	PMRPGP 11			
	PMRPGP			
Sbjct 124	PMRPGP 129			
Range 2: 966 a 971	Esperado	Identidades	Positivos	Gaps
Score				
18.0 bits(35)	1429	5/6(83%)	5/6(83%)	0/6(0%)
Query 7	MRPGPL 12			
	MRP PL			
Sbjct 966	MRPKPL 971			

Clonas 4, 8, 14 y 51

Proteína precursora a la isoforma expresada en testículos, próstata y placenta (TEPP)

ID: NP_950247.2	Longitud: 298	Número de alineamientos: 2		
Rango 1: 97 a 105	Esperado	Identidades	Positivos	Gaps
Puntaje				
26.1 bits(54)	1.7	8/10(80%)	8/10(80%)	1/10(10%)
Query 2	YHDP LPTLR 11			
	YH P LPTLR			
Sbjct 97	YH-PALPTLR 105			
Range 2: 202 a 207	Esperado	Identidades	Positivos	Gaps
Puntaje				
15.5 bits(29)	12221	5/6(83%)	5/6(83%)	0/6(0%)
Query 7	LPTLRK 12			
	LP LRK			
Sbjct 202	LPCLRK 207			

Isoforma 1 de la subunidad estrumpelina del complejo WASH

ID: NP_055661.3		Longitud: 1159	Número de alineamientos: 2	
Rango 1: 995 a 1001	Esperado	Identities	Positivos	Gaps
Puntaje				
23.5 bits(48)	14	6/7(86%)	7/7(100%)	0/7(0%)
Query 2	YHDPSLP 8			
	Y+DPSLP			
Sbjct 995	YQDPSLP 1001			
Rango 2: 595 a 599	Esperado	Identities	Positivos	Gaps
Puntaje				
12.9 bits(23)	109047	4/5(80%)	4/5(80%)	0/5(0%)
Query 7	LPTLR 11			
	LP LR			
Sbjct 595	LPLLR 599			

A partir de estos resultados, se estudió cada uno de las proteínas alineadas con las secuencias de las clonas seleccionadas en términos de su función biológica, interacciones reportadas con otras proteínas y de su estructura tridimensional, ya que los residuos responsables de la interacción deberían estar expuestos en la estructura tridimensional de la proteína que los contiene.

Paralelamente se analizó la naturaleza química de las secuencias de las clonas, con el fin de identificar una posible secuencia o motivo consenso. En la Tabla 8 se encuentran las secuencias de las clonas seleccionadas, según la naturaleza química de cada aminoácido mostrada en código de colores.

<p>Tabla 8- Secuencias de las clonas seleccionadas en código de colores según la naturaleza química del aminoácido. Siendo azules los polares neutros, amarillos los no polares, verdes los positivos y rojos los negativos. Los codones de paro se encuentran señalados con un asterisco (*).</p>		
Biblioteca proveniente	Clona	Secuencia
Biblioteca de cDNA	C4, 2E, 9D, 9F, 10C, 10E, BH	MLGDPNSSK KKKK SL

	5H	MLGDPSSSTELLPPNWTNLSPYRRTNVSISNM KTFSSA*AWVRLKP*TDN*QPNKKKKKKKKKK KKKKKL
	BF	MLGDPNSNSIPPIPLRPTHTPPMKKTSYHSP*H YKLYDMSPYPLQSPAFPLKPKKKKKKKKSL
	Z	MLGMRIQAHKDPQDPLLEAILIQQ*EASR*DRK KIQLQLHTSVPLDRELRENVCCITEVFCVFIR V*IKMPKLKKKKKKKKKL
Biblioteca comercial	54, 21	TAKYLPMPGPL
	51, 14, 8, 4	DYHDPSLPTLRK

Se observa que los mismos primeros 3 residuos de las secuencias de las clonas de la biblioteca de cDNA, son idénticos (MLG) y que en todas se reportó una cola de lisinas y una leucina. Desde una perspectiva química, no hay una secuencia consenso entre los aminoácidos. Tomando en cuenta las secuencias de la biblioteca comercial, se repite la presencia de dos aminoácidos apolares (LP) en seguida de uno polar sin carga (Y o S).

Finalmente se simuló la estructura terciaria del péptido que se reportó en el mayor número de clonas seleccionadas de la biblioteca de proteínas de cerebro, mediante el software PepFold server 3. El programa reporta 7 modelos en donde todos muestran una hélice correspondiente a las lisinas en el extremo carboxilo, un dobléz y el resto de la secuencia se extiende perpendicularmente.

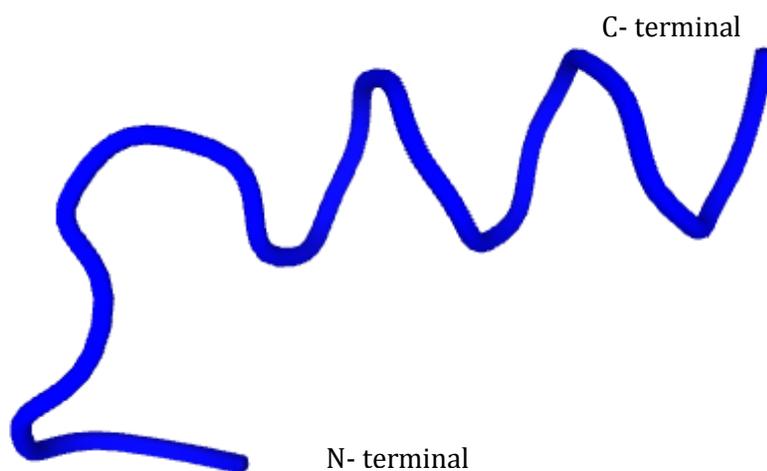


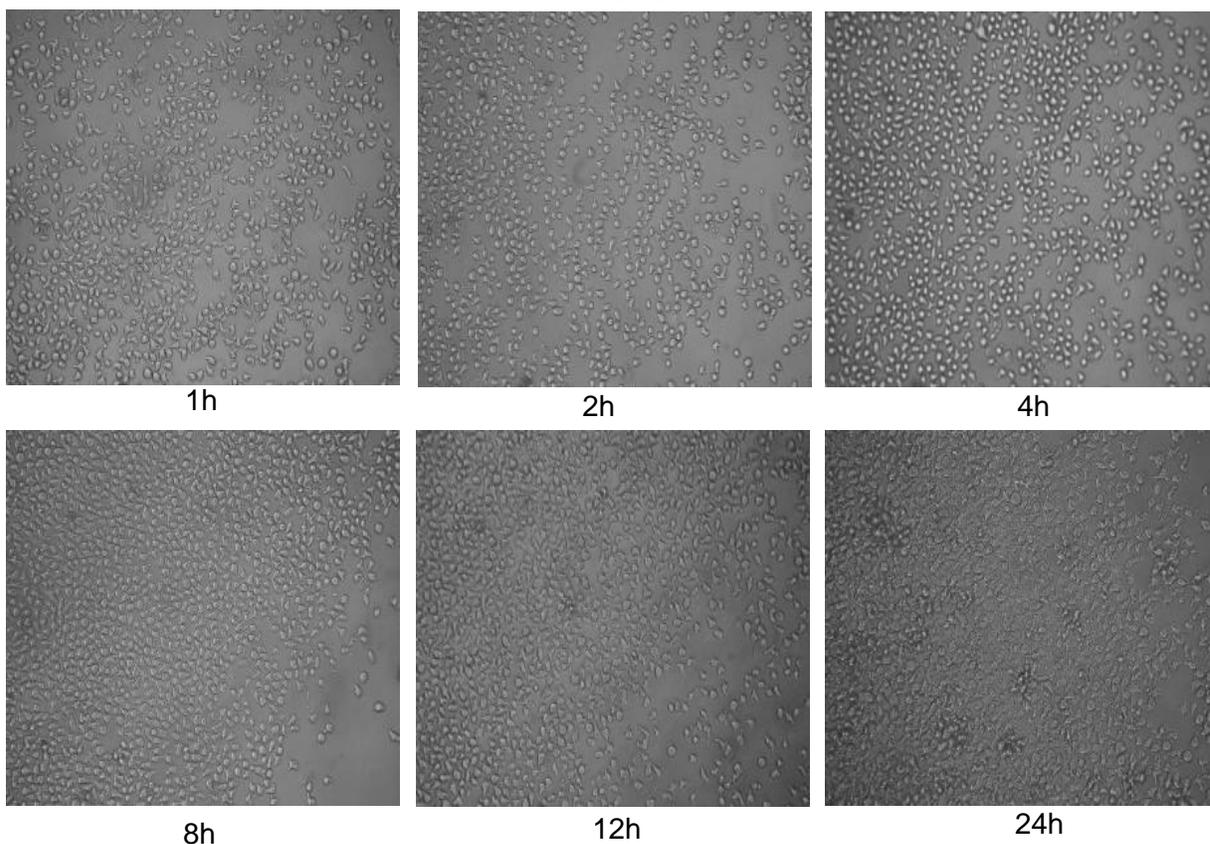
Figura 4- predicción de la estructura tridimensional del péptido más representado entre las clonas de la biblioteca de proteínas de cerebro. Software utilizado: Pep- Fold 3 server.

Se consideró importante secuenciar clonas de la biblioteca de cDNA que no había pasado por ningún proceso de selección, ya que en todas las secuencias, de esta biblioteca, se presentaba una cola de lisinas. Al revelarse la secuencia de dos clonas tomadas al azar, se observó que en efecto no solo la cola de lisinas sino también los primeros aminoácidos formaban parte de la construcción de la biblioteca (Tabla 6, clonas Negativas 1 y 2).

EVALUACIÓN DE LAS CLONAS EN FUNCIONES CELULARES DONDE CD13 ESTÁ INVOLUCRADO

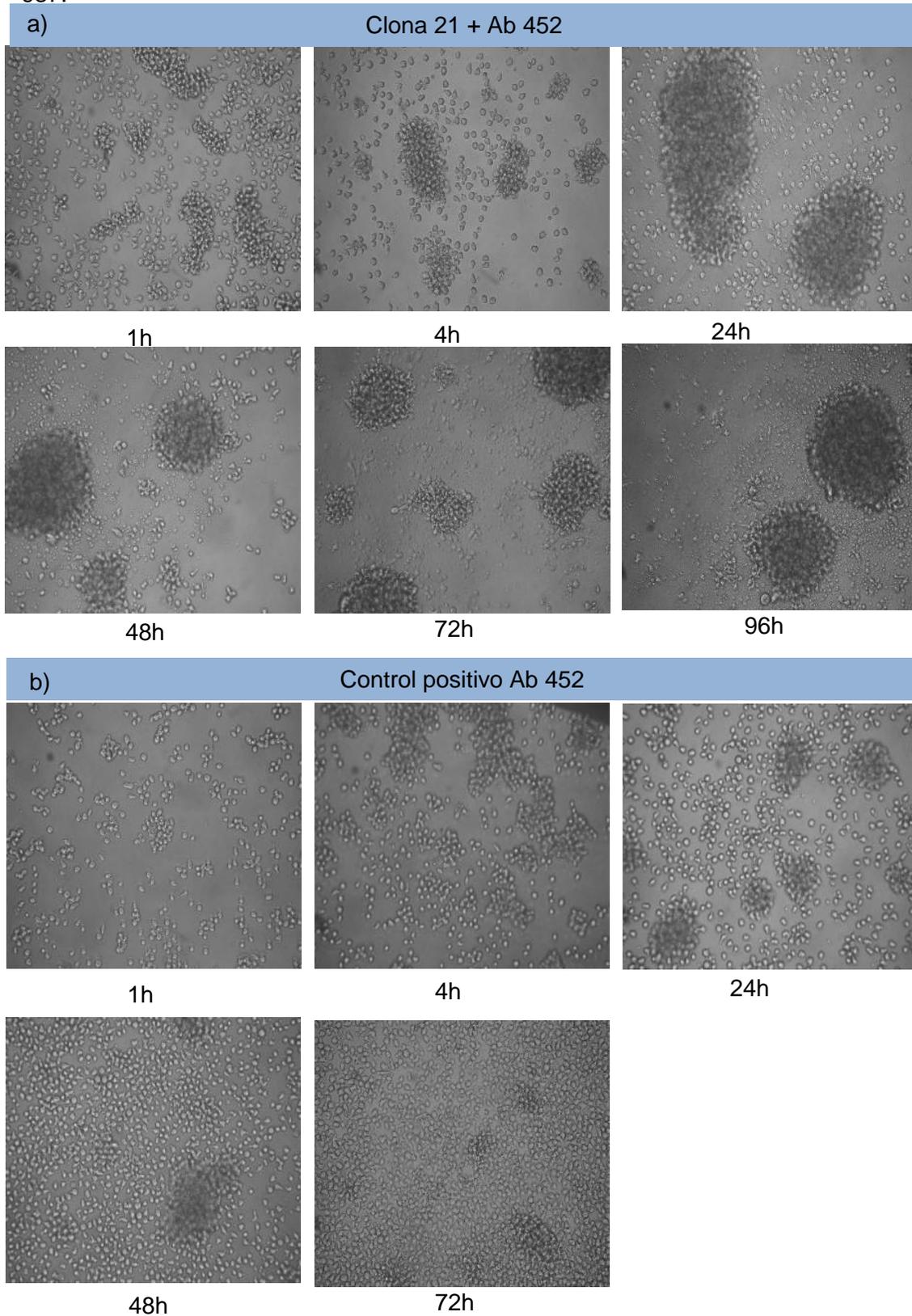
Para determinar si las clonas positivas inducían alguna de las funciones celulares donde se ha reportado la participación de la Aminopeptidasa N, se hicieron ensayos de inducción e inhibición de la agregación. Para ver si inducía la agregación celular de la línea U937, se incubó cada clona con dichas células, y se siguió el comportamiento por 3 días. En la Figura 5, se muestran fotografías con un objetivo 40x de magnificación de una clona representativa (21) únicamente por las primeras 24 horas, ya que después no se mostró ningún cambio. Se observa que no se induce la formación de agregados celulares. El comportamiento de la clona fue similar con todas las clonas positivas, incluso con el control (fago silvestre M13).

Figura 5- Cinética de un cultivo de las células U 937 incubadas con la clona 21. Al igual que el resto de las clonas, esta no indujo la agregación celular.



En la Figura 6 se muestran las cinéticas tanto de la incubación del anticuerpo 452 con las células U937 como de la incubación de la misma clona (21) con las células y el mismo anticuerpo. Se puede apreciar que las células que tienen la clona y el anticuerpo muestran agregados más grandes y visiblemente más densos, aparte la desagregación no ocurre, incluso ni a las 96 horas de haber colocado ambos estímulos. Este efecto se repitió en todas las clonas incluso en el control negativo (fago silvestre M13). En cambio en células con el anticuerpo 452, se generan agregados las primeras 24 horas y posteriormente se deshacen. La Figura 7 muestra una gráfica de la cuantificación cualitativa de la agregación durante las cinéticas. Para cada caso, el experimento se repitió 3 veces y sin mostrar diferencias entre ellos.

Figura 6- Cinética de la incubación de a) la clona 21 y el anticuerpo 452 a 0.5µg/ml sobre células U 937, b) el anticuerpo 452 a la misma concentración sobre células U 937.



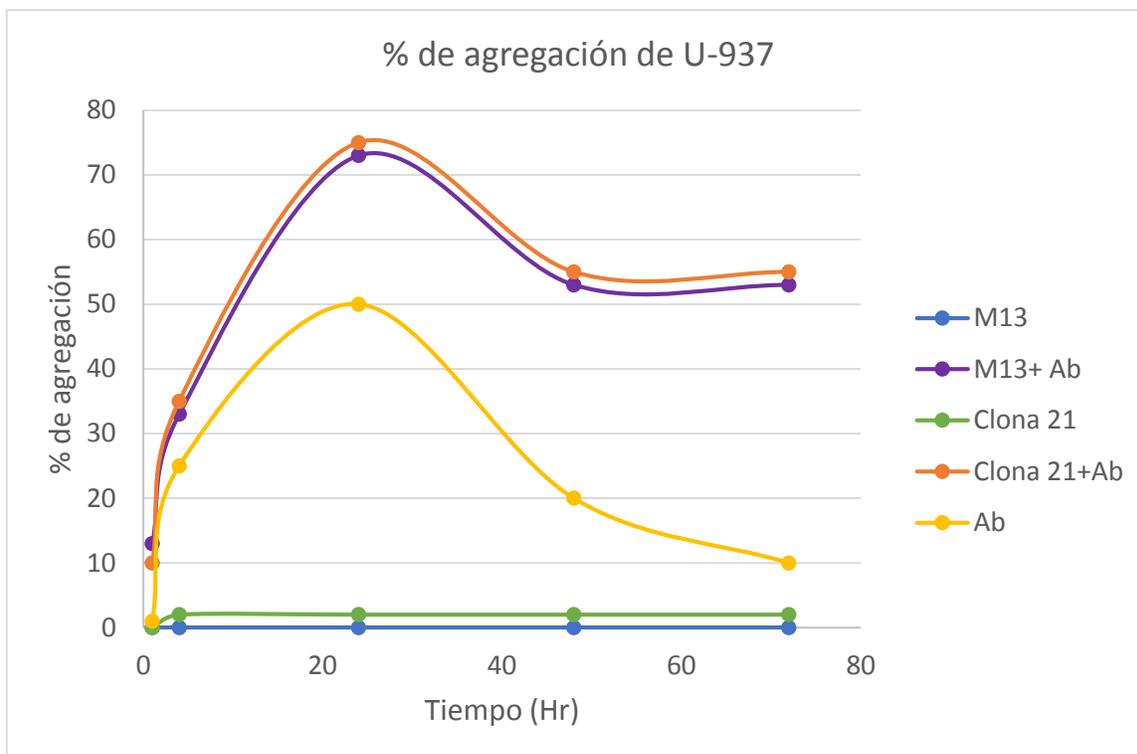


Figura 7- cinética gráfica del porcentaje de agregación de las células U-937 incubadas con diferentes estímulos. El comportamiento de las incubaciones con cada una de las clonas resultó similar al de la clona 21 y al del fago silvestre M13, tanto cuando se incubaron en presencia como en ausencia del anticuerpo 452.

Por otra parte se determinó si las clonas seleccionadas afectaban de alguna manera la actividad enzimática de aminopeptidasa expresada en la membrana de las células HEK- ANPEP. Se utilizó el inhibidor bestatina como control positivo de la inhibición de la actividad enzimática y las células HEK- ANPEP sin ninguna ningún fago ni inhibidor, como control negativo, pues representa la actividad catalítica de la enzima en dicha célula. La Figura 8 muestra una gráfica del porcentaje de inhibición de la actividad en cada caso. En el todos los casos, excepto en la incubación con la clona R, la actividad no se modifica significativamente. La clona R inhibe alrededor de 30% la actividad enzimática de CD13.

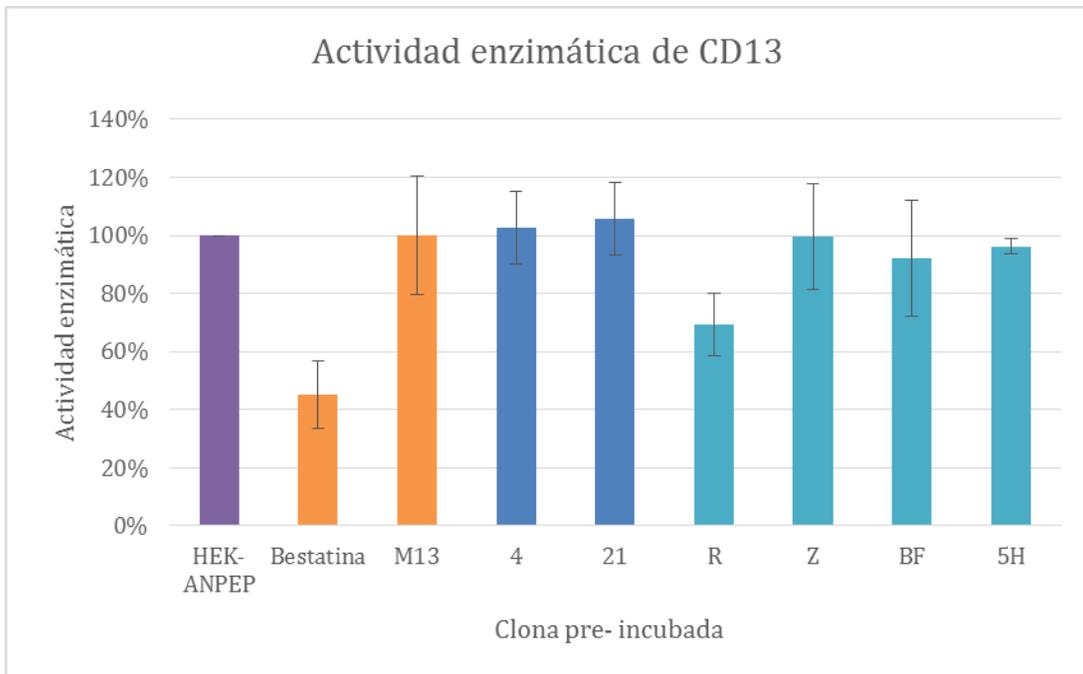


Figura 8- Inhibición de la actividad enzimática de CD13 de células HEK-ANPEP pre- incubadas con una clona seleccionada, relativa al control negativo (células con sustrato).

Discusión

Para la búsqueda de secuencias peptídicas con afinidad por CD13 por la técnica de Phage Display, se emplearon dos distintas bibliotecas de fagos: una biblioteca de fagos M13 que expresan secuencias de 12 aminoácidos dispuestos al azar, y una biblioteca de fagos que expresan proteínas expresadas en cerebro humano. Se decidió utilizar la biblioteca de proteínas expresadas en cerebro ya que la información que nos pueda dar una biblioteca de péptidos expresados en un sistema vivo puede ser mayor y más enriquecedora. Además es importante recordar que la molécula de interés (CD13), también se expresa en el sistema nervioso central, tanto en neuronas como en células de la glía.

Las clonas que fueron secuenciadas se obtuvieron como resultado de tres rondas de selección y de corroborar la unión específica de los fagos respectivos a células HEK- ANPEP. Es por ello que se puede afirmar que dichas secuencias tienen afinidad por CD13. A pesar de que las secuencias provenientes de la biblioteca comercial son cortas, proporcionan información interesante. Probablemente por el corto tamaño de las secuencias, no se puede apreciar una mayor diferencia entre la unión con el CD13 de las células HEK ANPEP y la unión a las células parentales HEK.

SOBRE LAS SECUENCIAS SELECCIONADAS

Para poder considerar la posibilidad de proponer alguna de las proteínas alineadas con las secuencias seleccionadas como un ligando natural de CD13, es necesario tomar en cuenta la identidad con la que se comparten residuos con las secuencias seleccionadas. Además, se investigó para cada proteína: la función, su localización celular y de ser posible, las proteínas con quienes se ha reportado que hay interacción. En conjunto, esa información brinda pistas de cómo podría actuar CD13 en un contexto fisiológico. A continuación se describen algunas de las características de cada proteína, obtenidas de la base de datos de NCBI ((National

Center for Biotechnology Information. , 2017) y de UniProt Consortium (UniProt Consortium, 2017), mientras que las interacciones con otras proteínas se obtuvieron de la base de datos de STRING Consortium (STRING Consortium, 2017).

- El regulador transcripcional (ATRX) o también llamada proteína ligada a X, está involucrada en regular la transcripción, facilitar la replicación, en la reparación del ADN y en la remodelación de la cromatina. La ATRX se une a secuencias repetidas del ADN, incluyendo los telómeros, y esa unión propicia la estabilidad del ADN especialmente en secuencias ricas en Guanina. Esta proteína tiene actividad helicasa de ADN y cuenta con sitios de unión a ATP, al ADN, a iones Zn^{2+} . Funciona como un marcador molecular ya que se posiciona tanto junto a histonas como a histonas metiladas. Aparte, funciona como un reloj en el ciclo celular ya que cuando se acumula ATRX fosforilada en la matriz nuclear, ésta proteína es transportada fuera del núcleo, lo que promueve la división mitótica.
- La HELZ, helicasa con dedos de zinc, es miembro de la superfamilia de helicasas de RNA tipo I. Para realizar su función principal, tiene sitios de unión a ATP, a ARN y al ión Zn^{2+} . Se encuentra cerca de membranas y en el núcleo celular. Establece interacciones con proteínas involucradas en el metabolismo de ácidos nucleicos como la carbamoil fosfato sintasa 2, aspartato transcarbamilasa y dihidroorotasa (CAD), proteínas involucradas en la edición y protección del ARNm como la proteína 22 de unión a ARN (RBM22) y la subunidad 2 de la proteína de unión a la caperuza (NCBP2), también con el receptor alfa del ácido retinoico (RARA) que actúa como regulador en trans de la transcripción y con otras enzimas, como metiltransferasas.

El ATRX y la HELZ se encuentran principalmente en el núcleo celular y además su expresión es constitutiva ya que sus funciones están relacionadas con el metabolismo de ácidos nucleicos. Por lo tanto, es difícil proponer que en condiciones normales se encontraran extracelularmente para activar a CD13.

- Una proteína que pudiera resultar un potencial ligando es la MTRNR2L8 que al igual que otras de su familia, es codificada por la mitocondria pero se encuentra tanto en el citoplasma como en el medio extracelular. Su expresión es ampliamente

distribuida entre los tejidos sin embargo de manera incrementada en el riñón, el corazón y en los testículos. Se considera que es un neuroprotector ya que la MTRNRL8 evita la acumulación del péptido beta amiloide, evitando la fibrosis del tejido. En otro sentido, también se ha mostrado que es un quimioatrayente de monocitos. Se presume que evita la translocación de BAX del citosol a la mitocondria, evitando así la apoptosis. Interacciona con varias proteínas, entre ellas los receptores 2 y 3 de péptidos formilados (FPR2 y FPR3) que son receptores para moléculas quimioatrayentes de neutrófilos, con el precursor del beta amiloide (APP), con el receptor 3 de quimiocinas tipo C-C (CCR3), proteínas reguladoras de las señales inducidas por proteínas acopladas a proteínas G (RGS6), el receptor 3 del ácido hidroxicarboxílico (HCAR3), el receptor 2 de esfingosin 1 fosfato (S1PR2), el receptor 2 de leucotrieno B4 (LTB4R2) que es un quimioatrayente y activador de granulocitos y macrófagos, receptor 68 acoplado a proteínas G (GPR68) y la fosfolipasa C(PLCB4).

La MTRNR2L8 pudiera ser secretada por células dañadas en sitios de inflamación y servir como quimioatrayente y activador de células del sistema inmune.

- La proteína señalizadora 2 del retículo endoplásmico al núcleo (ERN2) es un represor de la traducción ya que se une a la subunidad 28S en respuesta al estrés en el retículo endoplásmico. Además participa en diversos procesos como en la condensación de los cromosomas durante la apoptosis, en el arresto del ciclo celular y en el inicio de la vía intrínseca de la apoptosis. Por otro lado también participa en varias vías de señalización ya que activa la cinasa JUN por su función serin- treonin cinasa y forma un complejo con FRAF2- ASK1. Por otra parte, ERN2 tiene participación en el procesamiento de ARN mensajero por su capacidad de ribonucleasa y de endonucleasa; y participa en la transcripción del ADN. Para realizar sus funciones, tiene un sitio de unión a ATP y otro al ión magnesio. Interacciona con la proteína microsomal que transfiere triglicéridos (MTTP), la inositol 3 fosfato sintasa (ISYNA1), la proteína de respuesta al estrés calórico alfa de 90kDa de clase A (HSP90AA1), de clase B (HSP90AB1) y la de 70kDa (HSPA5), la fosfatasa 2 de proteínas con dominios PH y repeticiones ricas en leucina (PHLPP2), el inhibidor 1 sinovial de la apoptosis (SYVN1), la enzima conjugadora

de ubiquitina E2G 2 (UBE2G2), el motivo 6 del inhibidor transmembranal de BAX y el activador 6 de la transcripción (ATF6). Finalmente ERN2 se encuentra integrado a la membrana principalmente en el estómago, en el colon y en la vesícula biliar.

- El receptor tirosin cinasa 3 erb- b2 (ERBB3) es un miembro de la familia de los receptores de factores de crecimiento epidermal (EGFR). La característica de estos receptores es que no tienen dominio intracelular para la activación de alguna cinasa, por lo que necesitan de la heterodimerización con otros receptores de la misma familia que tienen actividad de cinasa para que se pueda inducir una señal por la unión del ligando. La señal permite la proliferación, la diferenciación celular y la supresión de la apoptosis. Los ligandos más estudiados son la neuregulina 1 y la 2. Estos receptores se expresan en casi todo el cuerpo, pero con una mayor representación en el sistema digestivo, el riñón, la próstata y el pulmón. Cabe mencionar que están sobre expresados en distintas células tumorales.

Estos receptores tienen interacciones con otros receptores de la misma familia (ej. ERBB2, EGFR) como ya se había mencionado, y otras con otras proteínas, como la proteína dedo 41 RING (RING Finger Protein 41, RNF41), proteína asociada a la proliferación 2G4 (PA2G4), receptor del factor de crecimiento unido a la proteína 2 (GRB2), el homólogo del oncogen viral timoma murino v-akt (AKT1), la subunidad reguladora 1 de la cinasa del inositido fosforilado en la posición 3 (PIK3R1), proteína 1 transformadora con dominio SHC (SHC1).

- El substrato 4 del receptor de insulina (IRS4) es una proteína asociada a múltiples receptores de factores de crecimiento con actividad de cinasa de tirosinas, y participa en la generación de señales intracelulares. Forma complejos con dominios SH2 de otras proteínas ya que tiene varios sitios que pueden ser fosforilados. Su activación promueve la activación de las MAPK, y de AKT1. Se encuentra tanto en el citoplasma como en las membranas. Esta proteína interacciona directamente con el receptor de insulina (INSR) y otros receptores relacionados (ej. IGF1R), las subunidades catalíticas de la cinasa de fosfatidil inositol 4, 5 bifosfato (PIK3CA, B, D, G), la subunidad reguladora 1 (PIK3R1), y la MAPK8.
- La isoforma b de la proteína 12 F-box/LRR (FBXL12) tiene una fuerte participación en la ubiquitinación de otras proteínas para distintos fines, entre ellos marcar las proteínas que deben ser degradadas por el proteosoma, ya que forma parte del complejo SCF (SKP1- CUL1- F box). Entre las proteínas que ubiquitina, se

encuentra CAMK1 que está involucrada en mantener el ciclo celular. Interacciona con proteínas que participan en diferentes vías de señalización como STYX, el inhibidor 1 c cinasa ciclina dependiente (CDKN1C), el factor de transcripción JUN y el inhibidor de la transcripción Antígeno Expresado Preferentemente en Melanoma (PRAME). También con la caja tipo anillo 1 (RBX1) y otras proteínas con dominios con cajas F (FBXL6 y FBXO24).

La proteína ERN2 es citoplasmática y tiene interacciones con proteínas de transducción de señales, característica que comparte con el receptor ERBB3, IRS4 y la FBXL12. El segundo y tercero podrían tener interacciones desde la membrana con CD13 ya que ERBB3 debe formar heterodímeros pues no se puede fosforilar e IRS4 interacciona con otros receptores para servir como proteína de andamiaje. Además, al igual que CD13, ERBB3 promueve la proliferación, la diferenciación celular y la supresión de la apoptosis, aparte de ser sobreexpresado en células tumorales. A pesar de ello, durante la transición de células epiteliales a mesenquimales, que es un proceso relacionado con metástasis y formación de tumores, se sobre- regula el gen *ERBB3* por lo que su expresión es disminuida y la proliferación ocasionada por PI3K se ve reducida, posteriormente es restablecida (Salt, et al., 2014)

En diferentes estudios se resalta la sobreexpresión de receptores que al igual que CD13, se sobreexpresan en algunos cánceres. Por ejemplo en leucemias linfoides, IRS4 se encontró en altos niveles, y contribuye en la proliferación (Kang, et al., 2012). Otro reporte publicó que la estimulación en cáncer muscular para la proliferación puede ser mediada tanto por bFGF como por IRS4 y que pueden seguir o no la cascada dependiente o independiente de MAPK (Milasincic, et al., 1996).

- La proteína HIVEP3 regula la transcripción de los genes promovidos por el Factor Nuclear kappa B (NF-κB). Tiene dominios ácidos y de dedos de zinc, regiones ricas en serinas y treoninas que le permiten unirse a regiones específicas del ADN y a NF-κB. Esta proteína se une a las secuencias señal que facilitan la recombinación de los genes V, D y J de las inmunoglobulinas y receptores de células T (TCR). Por

otro lado promueve la diferenciación celular y el desarrollo del organismo. La HIVEP3 se encuentra tanto en el citoplasma como en el núcleo.

Esta proteína podría estar involucrada con la cascada de señalización promovida por CD13 ya que su localización subcelular es variada e indirectamente regula la expresión de los genes promovidos por NF- κ B necesario para la expresión de genes involucrados con el sistema inmunológico. Por lo que al activar a CD13 en un ambiente inflamatorio podría actuar como retro alimentador positivo de la expresión de genes inflamatorios promovidos por NF- κ B.

- La subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa codificada por la mitocondria es un péptido que participa en el transporte de electrones a través de la membrana interna de la mitocondria. Se expresa de manera ubicua en todas las células con mitocondrias. Forma parte del complejo I, y dentro de este se encuentra en la región transmembranal por su gran hidrofobicidad. Este complejo interacciona con múltiples enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, proteínas involucradas en el transporte de electrones, y proteínas transportadoras, entre otras.

Gracias a su alta hidrofobicidad, es improbable que la subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa se encuentre en un medio acuoso, como lo son el citoplasma o el extracelular; a menos de que sea acarreado por otra proteína o que se encuentre en un ambiente apolar (ej. vesícula).

- La proteína precursora expresada en testículos, próstata y placenta (TEPP) ha sido poco estudiada. Sin embargo, se ha reportado que se encuentra conservada en estos tejidos en los cordados. Se estima que tiene interacciones con el homólogo 10 de la citocromo C oxidasa (COX10), con distintas metaloproteinasas como OMA1 que es dependiente de zinc, proteínas con dominios de unión a ubiquitina (UBXN1), glicoproteína de vesículas sinápticas (ej. SV2A, 2B y 2C) y el factor de coagulación XII.

La proteína TEPP interacciona con distintas proteasas y metaloproteasas. Pudiera ser que entre ellas CD13, sin embargo no como ligando.

- La isoforma 1 de la subunidad estrumpelina del complejo WASH se expresa en todos los tejidos pero mayormente en el músculo esquelético. El complejo se encuentra en membranas de endosomas y promueve la polimerización de actina. Específicamente esta subunidad es una proteína con varios pases transmembranales y con un dominio que contiene repeticiones de espectrina. Aunque el complejo se encuentra ensamblado en membranas, también se le puede encontrar en el citoplasma. Participa en el transporte intracelular, en la maduración de oocitos y en la formación de los husos acromáticos.

La polimerización de actina es necesaria para la fagocitosis a través de CD13. Es posible que haya interacción por parte de esta subunidad con CD13 sin embargo no como un ligando sino como respuesta a la estimulación de CD13.

Es interesante que entre todas las secuencias seleccionadas de la biblioteca de proteínas de cerebro, la más representada no contenía inserto de cDNA de la biblioteca. Esto se comprobó al revelar la secuencia de dos clonas al azar tomadas de la biblioteca que contenían secuencias acotadas por el inicio y el final de la secuencia más representada. Por lo tanto, se concluyó que esas clonas habían perdido el inserto que originalmente codificaba para la proteína de la biblioteca. Esto puede ser ocasionado por la pérdida de fragmentos durante la replicación dado que los fagos de M13 tienen una alta tasa de mutación. El fenómeno puede apreciarse cuando se amplifican los fagos por más de cinco ciclos donde hay depleciones e inserciones al azar de fragmentos, y pueden perder el gen de resistencia a ampicilina o algún otro gen. De igual manera, se puede apreciar que en las secuencias más largas hay codones de paro, y también podrían deberse a posibles mutaciones puntuales.

De cualquier forma, es importante rescatar que esa secuencia específica ha sido seleccionada por su afinidad a las células HEK- ANPEP y no a sus células parentales, y a sabiendas de que la expresión de CD13 en las primeras es la única

diferencia entre los dos tipos celulares, es lógico atribuir esa afinidad al CD13 expresado en las células HEK- ANPEP.

Por otro lado, la conformación tridimensional de la proteína donde el inserto está expuesto es sumamente importante. La simulación de la estructura tridimensional de la secuencia encontrada con mayor frecuencia, reveló que los residuos idénticos (MLG) entre el resto de las secuencias pueden estar expuestos. Por lo tanto es posible que la interacción de esas clonas con CD13 se ejerza con la secuencia insertada o bien que los residuos propios del fago que acotan la secuencia, sean importantes en la interacción con CD13. Por consiguiente sería interesante probar como posible ligando el péptido del inserto aislado del resto de la construcción, y de la misma forma la proteína de fusión pIII con el inserto de las clonas positivas.

El hecho de que se hayan obtenido distintas secuencias con ciertos residuos similares, permite pensar que CD13 tiene varios ligandos. Esta posibilidad es factible por la amplia distribución de la molécula y la gran gama de procesos celulares en los que participa. Hay trabajos parecidos a este donde se muestra la afinidad de distintas moléculas por CD13, por ejemplo se realizó un tamizaje con fagos que desplegaban péptidos de diferentes tejidos sobre CD13; se reveló que el dominio de reconocimiento a carbohidratos (CRD) de la Galectina3 tiene afinidad por la enzima y que al incubarse sobre células HUVEC, se induce la angiogénesis. A pesar de demostrar que hay afinidad entre Galectina 3 y CD13, y que su unión induce un proceso celular, no se demostró que la interacción induzca cascadas de señalización mediadas por CD13 (Yang, et al., 2007).

Dado a que la estructura tridimensional de las proteínas determina en gran medida interacciones proteína – proteína por los enlaces y fuerzas débiles que se generan, es necesario tomar en cuenta las estructuras de las proteínas alineadas. De obtener las estructuras, se podría generar un modelo de acoplamiento molecular para saber si CD13 se une directamente a uno de los péptidos; y más aún, se podría deducir el

sitio de unión y las características químicas de los residuos adyacentes. Por otro lado también se podrían hacer experimentos para deducir los residuos responsables de la interacción. Sin embargo, cabe mencionar que las clonas alineadas provenientes de la biblioteca de proteínas de cerebro, contenían solo una parte de las secuencias peptídicas, por lo que las estructuras pueden estar modificadas a la de las proteínas nativas.

SOBRE LOS ENSAYOS DE FUNCIONES CELULARES

Los resultados de los ensayos de agregación indican que las secuencias peptídicas de interés no causan agregación celular, al menos cuando están expresadas en el contexto de la proteína del virus. Aparte, se detectó que la presencia de las clonas, cuando se induce la agregación con el anticuerpo 452 ocasiona una mayor agregación. Sin embargo, esto seguramente es un efecto del bacteriófago. Algo que puede concluirse es que el sitio de unión del anticuerpo 452 anti CD13 es distinto al sitio de unión de las clonas, ya que la clona no impide la agregación, ni la unión del anticuerpo. Podría ser que la presencia del fago M13 estabilice la unión entre el anticuerpo 452 y el CD13 de las células, de manera que se mantiene la señalización, abriendo la posibilidad de que estén involucrados otros sitios del CD13 u otras moléculas y que generaren comunicación cruzada.

En cuanto a los ensayos de inhibición de la actividad enzimática, es posible que solo la secuencia que carga la clona R disminuya la capacidad catalítica de CD13. En comparación con el control positivo, la bestatina disminuyó al 40% la actividad enzimática y dicha clona al 70%. Sería interesante probar la inhibición ocasionada por el péptido solo, sin el resto del fago y determinar el tipo de inhibidor que pudiera resultar. El resto de las clonas no afectaron significativamente la actividad enzimática. Por lo que se puede asumir que no se unen al sitio activo de la enzima.

Conclusiones

La tecnología del despliegue en fagos fue una herramienta primordial en el desarrollo del proyecto. A pesar de que no se identificó el ligando natural de la Aminopeptidasa N, se seleccionaron 31 clonas con afinidad por CD13 a partir de una biblioteca de cDNA codificante de proteínas de cerebro humano. De igual manera se seleccionaron 12 clonas de la biblioteca de fagos que expresa secuencias de 12 aminoácidos al azar en su proteína pIII. Cabe mencionar que a pesar de hacer las tres rondas de selección para cada biblioteca, múltiples clonas eluidas no mostraron tener afinidad por CD13. Sin embargo, se seleccionaron clonas con mayor unión a células HEK- ANPEP que a las células HEK, pues tienen un índice de unión específico positivo. Por ello, todas las seleccionadas tienen afinidad por el CD13 expresado en células transfectadas con el gen *GFP- ANPEP*.

Se extrajo el material genético de las clonas con índice de unión específico positivo para secuenciarlo y poder determinar las secuencias de aminoácidos responsables de la afinidad por CD13. Únicamente se reportó señal en 10 reacciones de secuenciación de clonas de la biblioteca de cerebro y en 7 reacciones de secuenciación de clonas comerciales. Se tradujeron las secuencias y se encontraron 3 diferentes secuencias entre las clonas provenientes de la biblioteca de cerebro y 2 diferentes secuencias entre las clonas comerciales. Se alinearon para determinar si había similitud entre las secuencias de aminoácidos, sin embargo no se logró identificar una secuencia consenso entre las ellas. De igual forma, se alinearon las secuencias con bases de datos de proteínas humanas, y se determinaron las proteínas humanas de las clonas de la biblioteca de cerebro y péptidos con los que se compartía identidad. Se identificaron la Subunidad 1 de la NADH deshidrogenasa (MT- ND1), varias humaninas como la Humanina tipo 8 (MTRNR2L8), el Receptor tirosin- cinasa 3 erb-b2 (ERBB3) cargadas por clonas de la biblioteca de proteínas de cerebro, también se identificaron secuencias compartidas con las clonas comerciales y el Substrato 4 del receptor de insulina

(IRS4), la isoforma b de la proteína F-box/LRR (FBXL12), la proteína 3 potenciadora de la unión al VIH (HIVEP3), la proteína precursora a la isoforma expresada en testículos, próstata y placenta (TEPP) y la isoforma 1 de la subunidad estrumpelina del complejo WASH.

En seguida se investigaron las características de cada una de las proteínas para en base a este análisis, discriminar entre ellas las que pudiesen ser un potencial ligando natural, que en un ambiente fisiológico pudiera estar presente. Sin embargo, es necesario realizar pruebas con cada uno de los péptidos para así determinar si alguno pudiera fungir como ligando natural de la Aminopeptidasa N. Por lo pronto el péptido MTRNR2L8 se puede proponer como potencial ligando ya que se encuentra en el citoplasma y puede ser secretado al medio extracelular, funcionando como quimio atrayente de células inmunes. Las otras proteínas identificadas, podrían tener interacciones con CD13 desde la membrana como ERBB3 e IRS4, o participación en sus vías de señalización como los son la isoforma 1 de la subunidad estrumpelina del complejo WASH, FBXL12, HIVEP3 y ERN2.

A lo largo del desarrollo de este trabajo, se comprobó la alta tasa de mutación que tienen los fagos M13, pues la secuencia que se repitió con mayor frecuencia (de la biblioteca de proteínas de cerebro), es resultado de la depleción de la secuencia de la biblioteca. Lo secuenciado forma parte de la construcción de la proteína de fusión pIII. Por lo tanto, la secuencia no debe influir en la interacción con CD13 ya que no todas las clonas de la biblioteca resultaron positivas en las rondas de selección. Sin embargo, al haber sido seleccionadas estas clonas, es posible que la estructura tridimensional formada, contribuya en la interacción con CD13. También se mostró que la afinidad de las clonas positivas por CD13, es mucho más evidente entre las clonas positivas de la biblioteca de proteínas de cerebro que las clonas positivas de la biblioteca comercial.

La estrategia de revelar la unión específica de cada clona por medio del citómetro de flujo, enriqueció el análisis y permitió diferenciar los pequeños cambios en la especificidad entre la unión a uno y otro tipo celular, aparte de que se pudo discriminar la unión inespecífica del fago silvestre a las células. Por otro lado, esto permitió cuantificar los resultados, ya que se reportaba el porcentaje de células con mayor Mediana de la Intensidad de Fluorescencia correspondiente a la unión de las clonas que la correspondiente a la unión del fago silvestre a las células.

Conocer el ligando específico de un receptor es una tarea sumamente difícil, ya que se entra en una infinidad de posibilidades. Sin embargo la selección de péptidos a partir de una biblioteca mediante el despliegue de fagos, puede contribuir en el acercamiento a comprender las interacciones que podría tener una proteína con otras. Aunque en este proyecto no se ha llegado a obtener un ligando, gracias a ésta técnica se mostró un acercamiento para encontrar péptidos con afinidad por CD13.

Perspectivas

El presente trabajo generó una ventana que muestra indicios de péptidos con potencial de investigación respecto a su posible interacción con CD13. Para identificar un ligando, es necesario determinar si los péptidos tienen la capacidad de inducir una respuesta celular. Para ello se deben continuar estudiando las secuencias encontradas y probar los posibles efectos que podría causar la unión de los péptidos (ya como péptidos libres, no expresados en la proteína del fago) a CD13, tanto *in vivo* como *in vitro*, en cualquier proceso donde se ha involucrado a CD13.

Se podría probar que los péptidos alineados participan en los procesos celulares ya sea como ligandos o como participantes de las vías de señalización provocadas al entrecruzar CD13. Para ello se podría bloquear la expresión del péptido, como la isoforma 1 de la subunidad estrumpelina del complejo WASH que promueve la polimerización de actina. Esto informaría si el re arreglo del citoesqueleto provocado por el entrecruzamiento de CD13 involucra o requiere de la participación de esta isoforma.

Por otra parte, la sugerencia de que algunos de los péptidos identificados participan en algún punto de las cascadas de reacción: IRS4 y ERBB3 desde la membrana potenciando la señal, o bien FBXL12 y ERN2 como reguladores de la transcripción, requiere ser comprobada. Se ha reportado que estas proteínas están involucradas en las mismas vías de señalización (PI3K) y también pueden provocar procesos celulares iguales (ej. promover la proliferación, la diferenciación celular y suprimir la apoptosis), por lo que sería relevante determinar su posible participación en la activación inducida por CD13.

También sería importante determinar si la acción quimio atrayente de las proteínas de la familia de las humaninas o MTRNR's son mediadas por su interacción con la

Aminopeptidasa N de monocitos, lo que podría provocar su migración hacia un sitio o inducir la activación de moléculas de adhesión. Si se bloqueara CD13 con anticuerpos monoclonales en presencia de MTRNR8, se podría observar si se abaten alguna de las acciones mencionadas.

También sería interesante indagar si el regulador de la transcripción HIVEP3 tiene una participación al entrecruzar CD13 en células del sistema inmune. Se podría suprimir su expresión para evaluar la expresión de citocinas promovidas por el factor de transcripción NF- κ B. De comprobarse la relación entre CD13 y HIVEP3, sería interesante investigar cómo podría regular la translocación del factor de transcripción NF- κ B en un ambiente inflamatorio.

Referencias

- Amersham Biosciences, 2000. *Recombinant Phage Antibody System*. s.l.:s.n.
- Arap, W., Pasqualini, R. & Rouslahti, E., 1998. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model.. *Science*, 279(5349), pp. 377-380.
- Ashmun, R. & Look, A., 1990. Metalloprotease activity of CD13/ aminopeptidase N on the surface of human myeloid cells.. *Blood*, 75(2), pp. 462-469.
- Barclay, A. et al., 1997. *The leucocyte antigen factsbook*. s.l.:Academic Press.
- Bhagwat, S., Petrovic, N., Okamoto, Y. & Shapiro, L., 2003. The angiogenic regulator CD13/APN is a transcriptional target of Ras signaling pathways in endothelial morphogenesis.. *Blood*, 101(5), pp. 1818-1826.
- Bhagwat, S. V. et al., 2001. CD13/ APN is activated by angiogenic signals and is essential for capillary tube formation.. *Blood*, 97(3), pp. 652-659.
- Birkenkamp-Demtroder, K. et al., 2002. Gene Expression in Colorectal Cancer. *Cancer Research*, 62(15), pp. 4352- 4363.
- Casali, N., n.d. Escherichia coli host strains. In: N. Casali & A. Preston, eds. *Methods in molecular biology*. Totowa(New Jersey): Humana Press, pp. 27- 48.
- Chen, L., Lun, Y., Peng, G. & Li, F., 2012. Structural basis for multifunctional roles of mammalian aminopeptidase N.. *PNAS*, 30(44), pp. 17966-17971.
- Colvin, H. & Mori, M., 2017. Getting to the heart of the matter in cancer: Novel approaches to targeting cancer stem cells. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, Volume 93, pp. 146- 154.
- Corti, A., Curnis, F., Arap, W. & Pasqualini, R., 2008. The neovasculature homing motif NGR, more than meets the eye.. *Blood*, 112(7), pp. 2628-2635.
- Curnis, F. et al., 2002. Differential binding of drugs containing th NGR motif to CD13 isoforms in tumor vessels, epithelia and myeloid cells.. *Cancer research*, 62(3), pp. 867-874.
- Danielsen, E. & van Deurs, B., 1997. Galectin 4 and small intestinal brush border enzymes form clusters.. *Molecular Biology of Cell*, 8(11), pp. 2241-2251.
- Drulis-Kawa, Z., Majkowska-Skrobek, G. & Maciejewska, B., 2015. Bacteriophages and Phage-Derived Proteins – Application Approaches. *Current Medical Chemistry*, 22(14), pp. 1757- 1773.
- Dybkaer, K., Kristensen, J. & Pedersen, F., 2001. single site polymorphisms and alternative splicing of the human CD13 gene - different splicing frequencies among patients with acute myeloid leukaemia and healthy individuals.. *British Journal of Haematology*, Volume 112, pp. 691-696.
- ELLERBY, H. et al., 1999. Anti-cancer activity of targeted pro-apoptotic peptides. *Nature medicine*, 5(9), pp. 1032- 1038.
- Favaloro, E., Browning, T. & Facey, D., 1993. CD13 (GP150; aminopeptidase- N): predominant functional activity in blood is localized to plasma and is not cell- surface associated.. *Experimental hematology*, 21(13), pp. 1695-1701.
- Firat, H. et al., 2001. Determination of myeloid antigen expression on childhood acute lymphoblastic leukemia cells: discrepancies using different monoclonal antibody clones.. *Leukocyte lymphoma*.

- Fujii, H. et al., 1995. Human melanoma invasion and metastasis enhancement by high expression of aminopeptidase N/ CD13.. *Clinical Experimental Metastasis*, 13(5), pp. 337-344.
- Fukasawa, K. et al., 2006. Aminopeptidase N (APN/ CD13) is selectively expressed in vascular endothelial cells and plays multiple roles in angiogenesis.. *Cancer letters*, 243(1), pp. 135-143.
- Ganten, D. et al. eds., 2006. Helper Phage. In: *Encyclopedic reference of genomics and proteomics in molecular medicine*. s.l.:Springer Berlin Heidelberg, p. 753.
- Ghosh, M. et al., 2014. Molecular mechanisms regulating CD13-mediated adhesion. *The Journal of cells, molecules, systems and technologies: Immunology*, Volume 142, pp. 636-647.
- Gladstone, E., Molineux, I. & Bullcorresponding, J., 2012. Evolutionary principles and synthetic biology: avoiding a molecular tragedy of the commons with an engineered phage. *Journal of Biological Engineering*, Volume 13, pp. 13- 25.
- Griffin, J. et al., 1983. Expression of MY7 antigen on myeloid precursors cells.. *International Journal of cell cloning*., Volume 1, pp. 33-48.
- Griffin, J., Ritz, J., Nadler, L. & Schloss, S., 1981. Expression of myeloid differentiation antigens on normal and malignant cells.. *Journal of clinical investigation*., Volume 68, pp. 932- 941.
- Guzman-Rojas, L. et al., 2012. Cooperative effects of aminopeptidase N (CD13) expressed by nonmalignant and cancer cells within the tumor microenvironment. *Proceedings of the National Academy of Sciences* , 109(5), pp. 1637- 1642.
- Hammers, C. & Stanley, J., 2014. Antibody Phage Display: Technique and applications. *Journal of Investigation in Dermatology*, 134(2).
- Haraguchi, N. et al., 2010. CD13 is a therapeutic target in human liver cancer stem cells. *The journal of clinical investigation*, 120(9), pp. 3326- 3339.
- Hooper, N., 1994. Families of zinc metalloproteases.. *FEBS Letters*, 354(1), pp. 1-6.
- Huang, J., Bishop- Hurley, S. & Cooper, M., 2012. Development of anti- infectives using phage display: Biological agents against bacteria, viruses and parasites. *Antimicrobial agents chemotherapy*, 56(9), pp. 4569- 4582.
- Imamura, N. & Kimura, A., 2000. Effect of Ubenimex (Bestatin) on the cell growth and phenotype of HL-60 and HL-60R cell lines: up and down regulation of CD13 aminopeptidase N.. *Leukemia and lymphoma*, 37(5-6), pp. 663-667.
- Irazusta, J. et al., 2004. Enkephalin- degrading enzymes in normal and subfertile human semen.. *Journal of Andrology*, 25(5), pp. 733-739.
- Kang, D.-H. et al., 2012. Simultaneous Translocation of Both TCR Loci (14q11) with Rare Partner Loci (Xq22 and 12p13) in a Case of T-lymphoblastic Leukemia. *Annals of laboratory medicine*, 32(3), pp. 220- 224.
- Licona Limón, I. I., 2015. *El papel de Cd13 (aminopeptidasa N) en la fagocitosis en monocitos humanos*. s.l.:UNAM.
- Licona-Limón, I., Garay- Canales, C., Muñoz- Paleta, O. & Ortega- Soto, E., 2015. CD13 mediates phagocytosis in human monocytic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, Volume 98, pp. 85-98.
- Look, A., Ashmun, R., Shapiro, L. & Peiper, S., 1989. Human myeloid plasma membrane glycoprotein CD13 (gp150) is identical to aminopeptidase N.. *Journal of Clinical Investigation*, Volume 83, pp. 1299-1307.

- Mahoney, K., Petrovic, N., Schacke, W. & Shapiro, L., 2007. CD13/ APN transcription is regulated by the proto- oncogene c Maf via an atypical response element.. *Gene*, Volume 403, pp. 178-187.
- Milasincic, D., Calera, M., Farmer, S. & Pilch, P., 1996. Stimulation of C2C12 myoblast growth by basic fibroblast growth factor and insulin-like growth factor 1 can occur via mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent pathways. *Molecular and Cellular Biology*, 16(11), pp. 5964- 5973.
- Mina Osorio, P. & Ortega, E., 2005. Aminopeptidase N CD13 functionally interacts with Fc gamma receptors in human monocytes.. *Journal of Leukocyte Biology.*, Volume 77, pp. 1008-1017.
- Mina-Osorio, P., 2008. The moonlighting enzyme CD13 old and new functions to target.. *Trends in molecular medicine.*, 14(8), pp. 361- 371.
- Mina-Osorio, P., Shapiro, L. & Ortega., E., 2006. CD13 in cell adhesion: aminopeptidase N (CD13) mediates homotypic aggregation of monocytic cells.. *J Leukoc Biol*, Volume 79, pp. 719- 730.
- Mina-Osorio, P. et al., 2008. CD13 is a novel mediator of monocytic/endothelial cell adhesion.. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(2), pp. 448-59. .
- Munguia, M. et al., 2006. Identification of amyloid-beta 1–42 binding protein fragments by screening of a human brain cDNA library. *Neuroscience letters*, Volume 397, pp. 79- 82.
- National Center for Biotechnology Information. , 2017. *NCBI. National Library of Medicine*. [Online]
Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
[Accessed 2016, 2017].
- Navarrete Santos, A., Langner, J., Herrmann, M. & Riemann, D., 2000. Aminopeptidase N/ CD13 is directly linked to signal transduction pathways in monocytes.. *Cellular immunology.* , Volume 201, pp. 22-32.
- Nefla, M. et al., 2015. The pro-inflammatory cytokine s14-3-3ε is a ligand of CD13/Aminopeptidase N in cartilage. *Journal of cell science*, 128(17), pp. 3250- 3262.
- New England BioLabs, 2014. *Ph.D. Phage Display Libraries- Instruction Manual*. E.EU.U: s.n.
- Nomura, R. et al., 2004. Human coronavirus 229E binds to CD13 in rafts and enters the cell through caveolae.. *Journal of virology.*, 78(16), pp. 8701-8789.
- O'Connell, P., Gerkis, V. & d'Apice, A., 1991. Variable O-Glycosylation of CD13 (Aminopeptidase N). *The Journal of Biological Chemistry*, 266(7), pp. 4593-4597.
- Pascual, I. et al., 2015. La aminopeptidasa N de mamíferos, características bioquímicas, funciones fisiológicas y su implicación en procesos fisiopatológicos en humanos.. *Revista cubana de ciencias biológicas*, 4(1), pp. 2-16.
- Pasqualini, R. et al., 2000. Aminopeptidase N Is a Receptor for Tumor-homing Peptides and a Target for Inhibiting Angiogenesis. *Cancer research*, 60(3), pp. 722- 727.
- Rapley, R., 1998. M13 and phagemid - based cloning vectors. In: R. Rapley & J. Walker, eds. *Molecular Biomehtods Handbook*. Totowa(Nj): Humana Press, pp. 181- 191.
- Saiki, I. et al., 1993. Role of aminopeptidase N (CD13) in tumor-cell invasion and extracellular matrix degradation. *International Journal of Cancer*, 54(1), pp. 143- 137.

- Salt, M., Bandyopadhyay, S. & McCormick, F., 2014. Epithelial-to-Mesenchymal Transition Rewires the Molecular Path to PI3K-Dependent Proliferation. *Cancer Discovery*, 4(2).
- Sekine, K., Fujii, H. & Abe, F., 1999. Induction of apoptosis by bestatin (ubenimex) in human leukemic cell lines.. *Leukemia*, Volume 13, pp. 729-734.
- Soderberg, C. et al., 1993. CD13 (Human aminopeptidase N) mediates human cytomegalovirus infection.. *Journal of virology.*, 67(11), pp. 6576- 6585.
- STRING Consortium, 2017. *STRING, protein- protein interaction networks*. [Online] Available at: <http://string-db.org/> [Accessed 01 2017].
- Subramani, J. et al., 2013. Tyrosine Phosphorylation of CD13 Regulates Inflammatory Cell-Cell Adhesion and Monocyte Trafficking.. *Journal of Immunology*, 191(7).
- UniProt Consortium, 2017. *UniProt*. [Online] Available at: <http://www.uniprot.org/> [Accessed 2017].
- Villaseñor Cardoso, M., Frausto del Río, D. & Ortega, E., 2013. Aminopeptidase N (CD13) is involved in phagocytic process in human dendritic cells and macrophages.. *BioMed research international* , Volume 2013, pp. 1-12.
- Watt, V. y. H. F. W., 1990. The human aminopeptidase N gene: isolation, chromosome localization, and DNA polymorphism analysis.. *Human genetics*, 85(6), pp. 651- 654.
- Wentworth, D. & Holmes, K., 2001. Molecular determinants of species specificity in the coronavirus receptor aminopeptidase N (CD13): influence of N- linked glycosilation.. *Journal of virology.*, 75(20), pp. 9741-9752.
- Wickstro, M., Larsson, R., Nygren, P. & Gullbo, J., 2011. Aminopeptidase N (CD13) as a target for cancer chemotherapy. *Cancer science*, 102(3), pp. 501- 508.
- Wong, A., Zhou, D. & Rini, J., 2012. The X ray crystal structure of human aminopeptidase N reveals a novel dimer and the basis for a peptide processing. *Journal of Biological Chemistry*, Volume 287, pp. 36804-36813.
- Wulfaenger, J., Niedling, S., Riemann, D. & Seliger, B., 2009. Aminopeptidase N (APN)/CD13-dependent CXCR4 downregulation is associated with diminished cell migration, proliferation and invasion. *Journal Molecular Membrane Biology*, 25(1), pp. 72-82.
- Xu, Y., Wellner, D. & Scheinberg, D., 1997. Cryptic and regulatory epitopes in CD13/ aminopeptidase N.. *Experimental hematology.*, 25(6), pp. 521-530.
- Yang, E. et al., 2007. Aminopeptidase N/ CD13 induces angiogenesis through interaction with a pro angiogenic protein, galectin 3.. *Biochemical and Biophysical research communication*, 363(2), pp. 336-341.
- Yu-Wen, C. et al., 2005. CD13 (aminopeptidase N) can associate with tumor-associated antigen L6 and enhance the motility of human lung cancer cells. *International Journal of Cancer*, Volume 116, pp. 243- 252.

Anexos

LA BACTERIA HUÉSPED

Se utilizó la bacteria *Escherichia coli* TG1 para la amplificación de los bacteriófagos de cada biblioteca de Phage Display. Las características genéticas de la bacteria se muestran en la siguiente tabla.

F' [*traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15*] *supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5, (r_Km_K)*

Tabla 9- características únicas génicas de la cepa <i>Escherichia coli</i> TG1.	
Mutación	Descripción
proAB	En los genes involucrados en la biosíntesis de prolina, por lo que necesita prolina en el medio.
traD	En factor de transferencia por lo que reduce la conjugación a través del episoma F'
lacI ^q	El represor del operón de <i>lac</i> es constitutivo.
lacZ M15	Depleción parcial del gen de la β- galactosidasa, esto permite la complementación del gen lacZ con la de un plásmido. De esta manera se pueden seleccionar colonias transformadas que se tiñen de azul al colocar X- Gal.
supE	Suprime los codones de paro UAA y UAG, y en su lugar coloca un ácido glutámico (E).
<i>mcrB</i>	Mutación en sistemas de restricción específicos en metil-citosina.
<i>hsdS</i>	Inactivación del sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Eco y de metilaciones.

EL BACTERIÓFAGO M13

El bacteriófago M13 es un virus filamentosos de una sola cadena de DNA cubierto con la proteína pVIII (aproximadamente por 2700 copias), y que expresa en un

extremo de 3 a 5 copias de la proteína pIII. El material genético consiste en una molécula de ADN circular que codifica para 10 genes. No ocasiona la lisis del huésped pero sí reduce las actividades metabólicas propias de la bacteria, debido a la síntesis de viriones. Sin embargo, la sobreproducción de proteínas virales puede ser tóxica y ocasionar la muerte de la bacteria huésped.

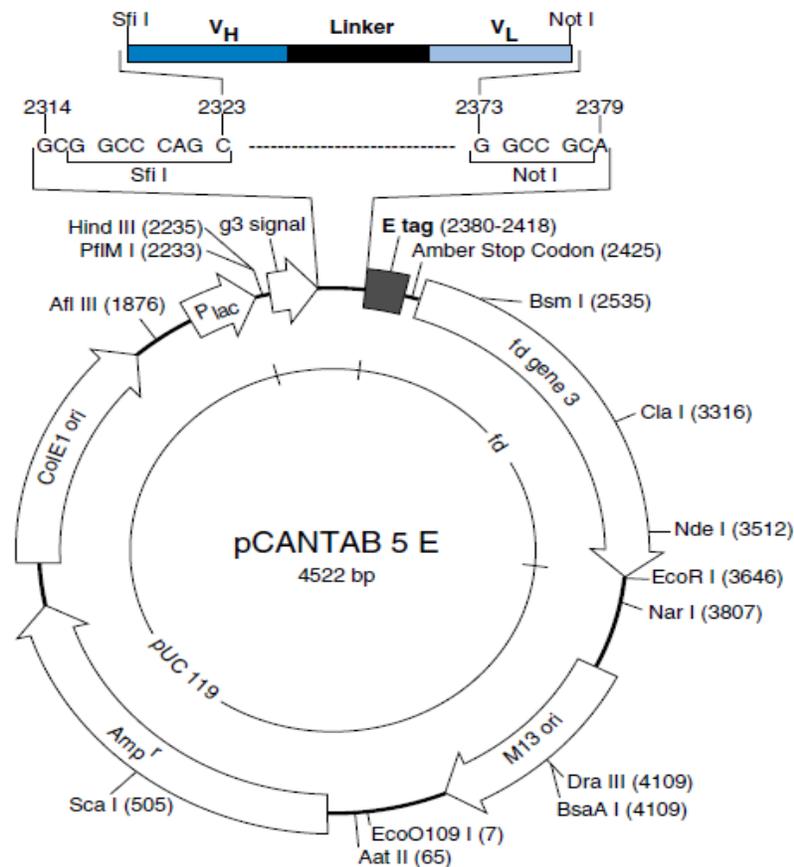
El bacteriófago infecta a través de la proteína pIII que reconoce los pili de bacterias e inicia la introducción de la molécula de ADN mientras la cubierta proteica es retenida por la membrana interna. A la vez que la cadena sencilla de ADN (positiva) se va internalizando, se sintetiza la cadena complementaria (negativa) por la polimerasa de ADN bacteriana, de manera que dentro de la bacteria, se mantiene ADN de doble cadena apto para transcripción y replicación. La forma replicativa (RF) se replica en forma de círculo rodante y de manera retardada se complementan las cadenas recién sintetizadas. A partir de la cadena positiva, se transcriben y traducen las proteínas propias del fago. Las secuencias líderes de las proteínas pIII y pVIII, las dirigen hacia la membrana interna de la bacteria, donde comienza el ensamblaje y empaquetamiento del virión que es extruido a través de las membranas (Biosciences 2000).

LA UTILIZACIÓN DEL FAGO M13 PARA LA CONSTRUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA DE CDNA DE CEREBRO

Se han desarrollado diferentes vectores de clonación utilizando el origen de replicación del fago M13 para insertar diferentes secuencias de plásmidos, llamados fagémidos, y así aprovechar las ventajas del virus. Algunas de ellas son la facilidad de extracción del ADN tanto de una como de dos cadenas, la fácil producción de partículas virales y la replicación de las clonaciones. Además el manejo del ADN de doble cadena facilita la manipulación, restricción y ligado de secuencias para generar construcciones, mientras que la secuenciación del ADN de una cadena da mejores señales (Biosciences 2000). Otra ventaja es que los fagémidos pueden cargar secuencias de mayor longitud que las de un plásmido.

Para el despliegue de proteínas en fagos, se realizan construcciones tanto en la proteína pIII como en la pVIII. La construcción de la biblioteca de proteínas de cerebro se utilizó el plásmido pCANTAB 5E que originalmente se diseñó para la producción de bibliotecas de fragmentos hipervariables de anticuerpos dispuestos en la extremo distal de la proteína pIII. Se digirió el plásmido para sustituir las secuencias correspondientes a los fragmentos hipervariables con cDNA que codifica proteínas de cerebro de una biblioteca. La siguiente figura muestra el mapa del plásmido.

Figura 6- mapa del plásmido pCANTAB 5E utilizado para la construcción de la biblioteca de proteínas expresadas en el cerebro de un paciente con Alzheimer, el cDNA de cada proteína se sustituyó por la secuencia comprendida entre los sitios de reconocimiento de las enzimas de restricción Sfi I y Not I (Amersham Biosciences 2000).



Como en el fago silvestre, la secuencia líder de la proteína pIII dirige la traducción a la membrana interna de la bacteria. Continuando con la traducción se expresan una proteína de fusión iniciando con el péptido señal de pIII seguido por la secuencia de la biblioteca, luego una secuencia denominada E tag, una secuencia amber de paro y finalmente el resto de la proteína pIII. Si la bacteria huésped es una cepa supresora de codones de paro como *E. coli* TG1, la traducción continuará hasta la proteína pIII, mientras que si no es supresora como la cepa *E. coli* HB2151, la traducción es detenida después de la secuencia E tag.

Ahora bien, este plásmido no contiene el resto de las proteínas del fago por lo que es necesario un fago ayudador (helper phage M13KO7) que permita el empaquetamiento de los fagémidos. El fago ayudador contiene de igual forma el origen de replicación del fago M13. También el fago ayudador contiene el gen de la enzima que degrada la kanamicina, por lo que se seleccionan únicamente las bacterias que crecen tanto en ampicilina, como en kanamicina.

SOLUCIONES UTILIZADAS

- Medio LB agar
- Medio LB agar ampicilina 100 µg/mL
- Medio LB top agar (agar al 50%)
- Medio líquido 2x YT
- Medio líquido 2x YT con ampicilina 100 µg/mL
- Medio líquido 2x YT con ampicilina 100 µg/mL y kanamicina 70 µg/mL
- Medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con 10% FBS inactivado, 1 mM de piruvato de sodio, 0.1 mM de aminoácidos no esenciales, 0.1 mM de L-glutamina y 100 unidades/ mL de penicilina y 100 µg/ mL de estreptomicina
- Glucosa al 20%
- IPTG 0.05 g/mL y X- Gal 0.04 g/mL
- PBS 1x pH 7.4

- PBS 1x pH 7.4 con 1% BSA
- Glicina HCl 0.2 M pH 2.8
- Tris 2 M pH 8
- PEG al 20% en solución de NaCl 2.5 M
- TBS 1x pH 7.2
- PFA al 1%
- TBE 1x
- Agarosa 1% en TBE 1x
- Bestatina 0.04 mg/mL en DMSO
- H-Ala- pNA a 60mM en PBS al 1% de BSA