

**Centro de Investigación Científica y de  
Educación Superior de Ensenada**



**OBTENCIÓN DE ABZIMAS DE TIBURON CON ACTIVIDAD CORMISMATO  
MUTASA**

**TESIS**

**MAESTRIA EN CIENCIAS**

*Haydée Patricia Lara Castillejos*

Ensenada, Baja California, México, Marzo de 2009.

TESIS DEFENDIDA POR  
Haydée Patricia Lara Castillejos  
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



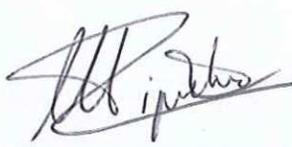
---

Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro  
*Co-Director del Comité*



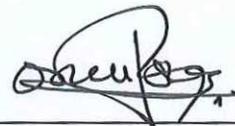
---

Dr. Joel Osuna Quintero  
*Co-Director del Comité*



---

Dra. Meritxell Riquelme Pérez  
*Miembro del Comité*



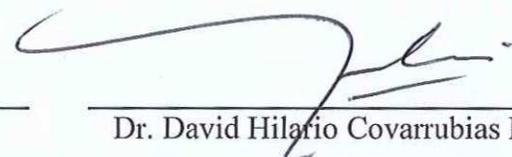
---

Dr. Oscar Sosa Nishizaki  
*Miembro del Comité*



---

Dra. Meritxell Riquelme Pérez  
*Coordinador del programa de Posgrado  
en Ciencias*



---

Dr. David Hilario Covarrubias Rosales  
*Director de Estudios de Posgrado*

3 de Marzo de 2009.

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN SUPERIOR  
DE ENSENADA**



---

**PROGRAMA DE POSGRADO EN CIENCIAS  
CON ORIENTACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA MARINA**

---

**OBTENCIÓN DE ABZIMAS DE TIBURÓN CON ACTIVIDAD CORISMATO  
MUTASA**

**TESIS**

que para cubrir parcialmente los requisitos necesarios para obtener el grado de  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

Presenta:

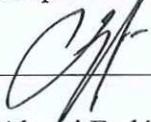
Haydée Patricia Lara Castillejos

Ensenada, Baja California, México, Marzo de 2009.

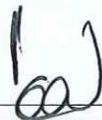
Resumen de la tesis de **Haydée Patricia Lara Castillejos**, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de **Maestro en Ciencias** con Orientación en Biotecnología Marina. Ensenada, Baja California. Marzo de 2009.

### **Obtención de abzimas de tiburón con actividad corismato mutasa**

Resumen aprobado por:



Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro  
Co-Director de Tesis



Dr. Joel Osuna Quintero  
Co-Director de Tesis

En 1986 Schultz y Lerner demostraron que es posible la generación de anticuerpos con actividad catalítica. Debido a la actividad catalítica de estos anticuerpos se les denomina abzimas.

Los tiburones son los organismos más primitivos que poseen anticuerpos como parte de su sistema inmune, entre los que destacan las IgNAR. Las IgNAR poseen la particularidad de unirse al antígeno a través de solamente un dominio variable (vNAR). El vNAR es estable, soluble y presenta un CDR3 largo y variable.

Por otro lado, la corismato mutasa es una enzima esencial para la producción de los aminoácidos aromáticos y solamente se encuentra en bacterias, algas, hongos y plantas. Se ha explorado la actividad corismato mutasa de anticuerpos, pero no se ha logrado superar la actividad de las enzimas naturales.

Debido a las ventajas de usar anticuerpos de tiburón vNAR y apoyados en los estudios previos de abzimas con actividad corismato mutasa, analizamos la actividad corismato mutasa de fragmentos vNAR de una biblioteca no inmune del tiburón *Heterodontus francisci*.

Logramos aislar de la biblioteca de tiburón, 92 clonas con el inserto de vNAR. Dos clonas son capaces de reconocer al antígeno y demostraron actividad catalítica *in vitro*.

**Palabras Clave:** abzima, corismato mutasa, IgNAR

Abstract of the thesis presented by **Haydée Patricia Lara Castillejos** as a partial requirement to obtain the **Master of Science** degree with Orientation in Marine Biotechnology. Ensenada, Baja California, March, 2009.

### **Obtaining abzymes from shark with chorismate mutase activity**

In 1986, Schultz and Lerner demonstrated that it is possible the generation of antibodies with catalytic activity. Due to the enzymatic activity of these antibodies, they have been named abzymes.

Sharks are the most primitive organisms that exhibit antibodies in their immune system, among them IgNAR. IgNAR are remarkable because they join the antigen through a single variable domain (vNAR). The vNAR, is stable, soluble and it shows a long and variable CDR3.

On the other hand, chorismate mutase is an enzyme essential for the production of aromatic amino acids and it is present only in bacteria, algae, fungi and plants. The activity chorismate mutase of antibodies has been explored, but it has been impossible to overcome the activity of natural enzymes.

Due the advantages of using vNAR antibodies from shark and supported with previous studies on abzymes with chorismate mutase activity, we analyzed the chorismate mutase activity of vNAR fragments from a non-immune library from the shark *Heterodontus francisci*.

We managed to isolate 92 clones with the vNAR insert from the shark library. Two clones are able of recognizing the antigen and they show catalytic activity *in vitro*.

**Key Words:** Abzyme, chorismate mutase, IgNAR.

A la persona por quien soy y estoy...mi madre

## AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

Al Dr. Alexei Fedórovish Licea Navarro y al Dr. Joel Osuna Quintero, por aceptarme en su equipo y dirigirme en este trabajo.

A los miembros del comité, la Dra. Meritxell Riquelme Pérez y el Dr. Oscar Sosa Nishizaki, por sus acertados comentarios y correcciones al presente trabajo.

A CONACYT y CICESE por las becas otorgadas para realizar esta tesis.

Al laboratorio de Ingeniería Celular y Biocatálisis del IBT de la UNAM, especialmente a Humberto Flores y Filiberto Sánchez, por las facilidades prestadas durante mi estancia.

A la Unidad de Síntesis y Secuenciación del IBT de la UNAM por la oportuna entrega de los oligonucleótidos y las secuencias para este trabajo.

A la M.C. Tanya Camacho Villegas, por sus enseñanzas en el laboratorio.

Al Laboratorio de Microbiología, al Dr. Jorge Olmos Soto y la M.C. Rosalía Contreras Flores de CICESE por las instalaciones y el equipo prestado amablemente para realizar experimentos de esta tesis.

A la Dra. Idania Valdéz Vázquez por su ayuda en el análisis de datos de cinética enzimática.

Al Dr. José Luis Stephano Hornedo del Laboratorio de Reproducción Animal de UABC, por las facilidades prestadas para realizar experimentos de cinética enzimática.

A las secretarías Dolores Carvajal y Cristina Sánchez, por los procesos administrativos en los que siempre estuvieron dispuestas a ayudarme.

## AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi esposo, por su paciencia y su amor, que me fortalecen cada día.

A mi mamá y mis sobrinos que son la luz de mi vida.

A toda mi familia: los Salgado, los Larita y la Castillejada por el amor que siempre me transmiten.

A mi nueva familia en Ensenada: Familia Rodríguez Green y Familia Aguirre Díaz.

A mis tíos Jesús Arellano y Svetlana Shishkova, por darme un hogar cuando estuve lejos de mi casa.

A los del laboratorio de Inmunología y Biotoxinas de CICESE por aguantarme todos estos años...y los que les faltan.

A mis amigos de Cuernavaca que hicieron más agradable mi estancia: los del CEIB y los chicos del verano científico.

A mis amigas, la parvada de cotorras, por escucharme y acompañarme en mis burradas.

A mis amigos de “afuera” por estar en mis momentos de alegría, de tristeza y de histeria total: Blanca, Lupita, Dulce, Perla, Magui, los de Valle Verde y mi vecina Yuri, que siempre me cuida mi casita.

A mis amigos de UABC, como olvidar tantos años de “formación académica” juntos.

## ÍNDICE

	Página
<b>Resumen español</b> .....	i
<b>Resumen inglés</b> .....	ii
<b>Dedicatoria</b> .....	iii
<b>Agradecimientos</b> .....	iv
<b>Índice</b> .....	vi
<b>Lista de Figuras</b> .....	viii
<b>Lista de Tablas</b> .....	xi
<b>Abreviaturas</b> .....	xii
<b>I. Introducción</b> .....	1
I. 1. Anticuerpos catalíticos.....	2
I. 2. Anticuerpos de tiburón.....	4
I. 3. El método de despliegue en fagos.....	7
I. 4. La corismato mutasa en la ruta del shikimato.....	10
<b>II. Antecedentes</b> .....	13
<b>III. Justificación</b> .....	17
<b>IV. Objetivos</b> .....	18
<b>V. Metodología</b> .....	19
V. 1. Reamplificación de la biblioteca.....	19
V. 2. Bioselección.....	20
V. 3. Expresión de los fragmentos vNAR en la cepa TOP10F' de <i>E. coli</i> .....	22
V. 3. 1. PCR de colonia.....	22
V. 3. 2. Extracción de plásmidos.....	23
V. 3. 3. PCR de plásmidos.....	24
V. 3. 4. Análisis de los fragmentos vNAR mediante la enzima de restricción BstO I.....	24
V. 3. 5. Secuenciación y elección de clones.....	24
V. 3. 6. Preparación de células TOP10F' quimiocompetentes.....	24
V. 3. 7. Transformación de células TOP10F' quimiocompetentes.....	25
V. 3. 8. Infección de células TOP10F'.....	25
V. 3. 9. Expresión del anticuerpo.....	26
V. 3. 10. Extracción periplásmica.....	26
V. 3. 11. ELISA de expresión.....	26
V. 3. 12. ELISA de reconocimiento.....	27
V. 4. Expresión de los fragmentos vNAR en la cepa Fal 14 de <i>E. coli</i> .....	27
V. 4. 1. Extracción de plásmidos.....	27
V. 4. 2. Construcción de oligonucleótidos.....	27
V. 4. 3. PCR de plásmidos pComb3x.....	28

## ÍNDICE (continuación)

	Página
V. 4. 4. Subclonación en el vector pTrc99a.....	29
V. 4. 5. Transformación en células MC1061.....	29
V. 4. 6. PCR de colonia y extracción de plásmidos.....	30
V. 4. 7. Secuenciación y elección de clones.....	30
V. 4. 8. Transformación en células Fa114.....	30
V. 4. 9. Expresión del anticuerpo.....	30
V. 4. 10. ELISA de reconocimiento.....	31
V. 4. 11. Ensayos de actividad de los anticuerpos <i>in vitro</i> .....	31
V. 4. 12. Ensayos de actividad de los anticuerpos <i>in vivo</i> .....	31
<b>VI. Resultados.....</b>	<b>33</b>
VI. 1. Reamplificación de la biblioteca y bioselección.....	33
VI. 2. Expresión de los fragmentos vNAR en la cepa TOP10F' de <i>E. coli</i> .....	35
VI. 2. 1. PCR de colonia.....	35
VI. 2. 2. Extracción y PCR de plásmidos.....	35
VI. 2. 3. Análisis de fragmentos vNAR mediante la enzima BstO I.....	36
VI. 2. 4. Secuenciación y elección de clones.....	37
VI. 2. 5. ELISA de expresión.....	39
VI. 2. 6. ELISA de reconocimiento.....	43
VI. 3. Expresión de los fragmentos vNAR en la cepa Fa114 de <i>E. coli</i> .....	44
VI. 3. 1. Extracción de plásmidos.....	45
VI. 3. 2. Secuenciación y elección de clones.....	46
VI. 3. 3. Construcción de oligonucleótidos y PCR.....	48
VI. 3. 4. Subclonación en el vector pTrc99 y transformación en MC1061.....	49
VI. 3. 5. Expresión en Fa114 y ELISA de reconocimiento.....	51
VI. 3. 6. Ensayos preliminares de actividad <i>in vitro</i> de los anticuerpos...	56
VI. 3. 7. Ensayos de actividad <i>in vivo</i> de los anticuerpos.....	58
<b>VII. Discusión.....</b>	<b>59</b>
<b>VIII. Conclusiones.....</b>	<b>63</b>
<b>IX. Perspectivas.....</b>	<b>64</b>
<b>X. Bibliografía.....</b>	<b>65</b>
<b>XI. Apéndice.....</b>	<b>70</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Progreso de una reacción química. Los reactantes interactúan y pasan por un estado de transición en el cual los enlaces de los reactantes se rompen y se forman enlaces nuevos. Los productos son los que poseen estos nuevos enlaces, los cuales tienen menos energía libre que los reactantes (Copyright © de Pearson Education, Inc.).....	3
2 Representación esquemática de la estructura de los anticuerpos IgG e IgNAR. A) Las IgG están generalmente compuestas por dos cadenas pesadas (H, en azul) y dos cadenas ligeras (L, en amarillo), la región variables la componen dos dominios Ig, uno de la cadena pesada V <sub>H</sub> , y uno de la cadena ligera V <sub>L</sub> . B) Los anticuerpos IgNAR tienen solamente dos cadenas pesadas (H), cada una con 5 dominios constantes C <sub>H</sub> y un dominio variable V <sub>H</sub> , el cual no se dimeriza (Stanfield <i>et al.</i> , 2004).....	5
3 Estructuras superpuestas de vNAR tipo 2 (rojo, PDB: 12Y-2), V $\alpha$ de TCR humano (azul, PDB: 1A07), V <sub>H</sub> (verde) y V <sub>L</sub> (amarillo) de humano (PDB: 1IGM) y V <sub>H</sub> de camello (azul claro, PDB: 1MEL) (Holliger y Hudson, 2005).....	7
4 Despliegue de un fragmento de anticuerpo tipo Fab en la proteína gIII de la superficie del fago (modificada de <a href="http://www.ab-direct.com/custom/hucal_technology-368.html">http://www.ab-direct.com/custom/hucal_technology-368.html</a> ).....	8
5 Esquema del método de selección de fagos mediante rondas subsecuentes de unión, elución y reamplificación (Modificada de <a href="http://www.molgen.mpg.de/~in-vitro/technology.html">http://www.molgen.mpg.de/~in-vitro/technology.html</a> ).....	9
6 Conversión de shikimato a corismato y las rutas subsecuentes para producir aminoácidos aromáticos, menaquinonas y sideróforos (Sasso <i>et al.</i> , 2004).....	11
7 Estructuras cristalográficas de CM de <i>E. coli</i> (PDB: 1ecm) y de levadura (PDB: 2csm) superpuestas mediante Swiss-PDB viewer (Guex, 1997).....	12
8 Monómero de la CM de <i>B. subtilis</i> (PDB: 1com).....	12
9 Valores de titulación de la reamplificación y de las 4 rondas de selección para la dilución 1:100 (D100).....	34

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura	Página	
10	Valores de titulación de la reamplificación y las 4 rondas de selección para la dilución 1:500 (D500).....	34
11	Gel de agarosa al 4% que muestra los fragmentos resultantes de la digestión de plásmidos de la ronda 4 con la enzima BstO I. En los carriles superiores se encuentran los fragmentos de los plásmidos D100, del 1 al 10; en los carriles de la parte inferior están los plásmidos D500 digeridos, del 01 al 012 (excepto 06 y 010). No hubo diferencias en el patrón de corte para los diferentes clones.....	36
12	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la ronda 4. El clon 6 proviene de la selección con D100, mientras que los clones 01, 02, 04, 07 y 011 corresponden a la selección con D500.....	38
13	ELISA de expresión de los fragmentos vNAR de 6 clones de la ronda 4. Las barras representan los datos de absorbancia que obtuvimos de cada clon y las líneas verticales representan la desviación estándar (C-, control negativo; C+, control positivo) .....	39
14	ELISA de expresión de los fragmentos vNAR de las clonas R3-D100. Las barras representan la media de la absorbancia correspondiente a cada clon y las líneas verticales representan la desviación estándar.....	40
15	ELISA de expresión de los fragmentos vNAR de las clonas R3-D100. Las barras representan la media de la absorbancia correspondiente a cada clon y las líneas verticales representan la desviación estándar.....	40
16	ELISA de expresión de los fragmentos vNAR de las clonas R3-D500. Las barras representan la media de la absorbancia correspondiente a cada clon y las líneas verticales representan la desviación estándar.....	42
17	ELISA de expresión de los fragmentos vNAR de las clonas R3-D500. Las barras representan la media de la absorbancia correspondiente a cada clon y las líneas verticales representan la desviación estándar.....	42
18	ELISA de reconocimiento de las clonas de la ronda 3 correspondiente a ambas diluciones. Las barras azules representan la media de la absorbancia correspondiente a los clones D100, las barras anaranjadas representan la media de la absorbancia correspondiente a los clones D500 y las líneas verticales representan la desviación estándar. No se graficaron los valores de reconocimiento a BSA ya que todos eran cero.....	43

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
19	Mapa genético del vector pTrec99a donde con letras azules se indican los sitios de restricción de este vector. Tomada de <a href="http://2008.igem.org/Team:Heidelberg/Notebook/Sensing_Group/Cloning">http://2008.igem.org/Team:Heidelberg/Notebook/Sensing_Group/Cloning</a>	44
20	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de clones de la ronda 3. Los clones 23 y 45 corresponden a la D100, mientras que los clones 023, 029, 040, 042, 043 y 045, son los que corresponden a D500.....	47
21	ELISA de reconocimiento de los clones +HA, -H6. En esta placa aparecen los extractos de los clones 011-4 y 042-2 que mostraron la coloración amarilla (clones positivos), así como el control positivo (C+).....	52
22	ELISA de reconocimiento de clones +HA, +H6. Las barras amarillas representan la media de la absorbancia correspondiente al reconocimiento por BSA, las barras azules representan la media de la absorbancia correspondiente a los fragmentos vNAR y, las líneas verticales representan la desviación estándar.....	53
23	Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del clon 042 y las secuencias obtenidas en las subclonaciones en pTrec99a.....	55
24	Cinética enzimática de los extractos celulares de las clonas 042-2 y 011-23 comparadas con el control positivo y con PBS 1x.....	57

## LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Condiciones de PCR para amplificar fragmentos vNAR de colonias de bacterias.....	23
II	Oligonucleótidos empleados para obtener productos con características específicas para cada ensayo (HA: hemaglutinina; H6: cola de 6 histidinas).....	28
III	Condiciones de la PCR para obtener los diversos productos empleados en los ensayos posteriores. ....	29
IV	Clones analizados mediante PCR para el inserto de vNAR.....	35
V	Plásmidos pComb3x extraídos para subclonación en pTrc99a.....	45
VI	Tipo de oligonucleótidos, productos que se obtienen mediante la PCR con ellos y ensayo en que pueden ser empleados.....	49
VII	Clones obtenidos mediante la PCR de plásmido con los respectivos juegos de oligonucleótidos. En anaranjado, los clones pertenecientes a la R4 y en verde los de la R3 (HA: hemaglutinina, H6: cola de 6 histidinas). No se obtuvieron clones -HA,-H6 para el clon 040 (N).....	50
VIII	Clones secuenciados +HA, +H6.....	53
IX	Velocidad de desaparición del corismato determinada para 2 clonas y el control positivo.....	57

## ABREVIATURAS

C-: control negativo

C+: control positivo

CDR: región determinante de complementariedad (*Complementarity Determining Region*)

CM: corismato mutasa

D100: dilución 1:100

D500: dilución 1:500

ELISA: Inmunoensayo enzimático (*Enzyme Linked Immuno Assay*)

H6: cola de 6 histidinas

HA: Hemaglutinina

NAR: Nuevo receptor de antígeno (*New Antigen Receptor*)

PBS: solución salina amortiguadora de fosfatos (*Phosphate Buffer Saline*)

PCR: reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction*)

PEG polietilenglicol

SDS: duodecil sulfato de sodio (*Sodium Duodecil Sulphate*)

TSA: análogo del estado de transición (*Transition State Analog*)

TSA/CM: análogo del estado de transición de la corismato mutasa

UFC: unidad(es) formadora(s) de colonia

## I. INTRODUCCIÓN.

Los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig), son moléculas del sistema inmunológico que permiten el reconocimiento del antígeno y su destrucción (o la destrucción del portador de este antígeno, por ejemplo si fuera una bacteria). La habilidad de los anticuerpos para complementar al antígeno ha sido explotada exitosamente para producir anticuerpos con actividades catalíticas específicas o dirigidas (Leong *et al.*, 2007). Debido a la actividad enzimática de estos anticuerpos, se sugirió el término “abzima” (Tramontano *et al.*, 1968), ya que frecuentemente se abrevia la palabra anticuerpo como “Ab” y, debido a la función enzimática de estos anticuerpos se agregó “zima”.

Los tiburones son los organismos más primitivos que poseen anticuerpos como parte de su sistema inmune, entre los que destacan las IgNAR (New Antigen Receptor) (Roux *et al.*, 1998). Las IgNAR poseen la particularidad de que se pueden unir al antígeno a través de solamente una región variable (Roux *et al.*, 1998) mientras que los anticuerpos convencionales se unen a través de una cadena variable ligera y una variable pesada (Chothia *et al.*, 1989). Las IgNAR se han encontrado en diversas especies de tiburones (Liu *et al.*, 2007; Nuttall *et al.*, 2001; Magnien, 2003), entre ellos *Heterodontus francisci* o “tiburón cornudo”, cuya distribución abarca los mares bajacalifornianos. *H. francisci* es una especie pequeña (97-120 cm los adultos) y de fácil captura, por lo que se ha elegido en nuestro grupo de trabajo para crear bibliotecas de fragmentos de anticuerpos vNAR.

La producción y selección de anticuerpos puede llevarse a cabo mediante varias tecnologías. Una de las tecnologías más comúnmente usadas para los anticuerpos recombinantes es el despliegue en fagos. Esta estrategia permite seleccionar fragmentos recombinantes de anticuerpos con propiedades de unión específicas para un amplio rango de moléculas como proteínas, glicoproteínas, oligosacáridos, ácidos nucleicos, toxinas o compuestos de bajo peso molecular (haptenos) (Brichta *et al.*, 2005).

Estas ventajas de los fragmentos de anticuerpos vNAR, así como las ventajas de la técnica de despliegue en fagos han sido explotadas para seleccionar anticuerpos contra una gran variedad de antígenos. Sin embargo, aunque la estrategia de despliegue en fagos si ha sido usada para la obtención de abzimas, no se ha explorado la capacidad catalítica de los fragmentos vNAR.

La corismato mutasa es una enzima esencial en la síntesis de los aminoácidos aromáticos y solamente se encuentra en bacterias, algas, hongos y plantas (Sasso *et al.*, 2004). La actividad corismato mutasa se ha explorado ampliamente en la obtención de abzimas (Hilvert *et al.*, 1988; Bowdish *et al.*, 1991), aunque con resultados deficientes, ya que no se han encontrado abzimas con actividad catalítica similar a la de las enzimas silvestres.

En este estudio, analizamos la actividad corismato mutasa de los fragmentos vNAR y la utilidad del uso de bibliotecas del tiburón *H. francisci* en la selección de abzimas con esta actividad.

### **I. 1. Anticuerpos catalíticos.**

Un catalizador es una sustancia que acelera una reacción pero no experimenta un cambio químico neto. El catalizador disminuye la energía de activación de la reacción proveyendo una ruta alternativa que permite que sucedan los pasos lentos de la reacción (Atkins y de Paula, 2002).

Un catalizador homogéneo, es aquel que se encuentra en la misma fase que la mezcla de la reacción. Las enzimas son catalizadores biológicos homogéneos. Estos compuestos ubicuos son ácidos nucleicos o proteínas especiales que contienen un sitio activo, el cual es responsable en la unión al sustrato, los reactantes, y en su procesamiento a productos. Para cualquier catalizador, el sitio activo regresa a su estado original después de que los

productos son liberados. La estructura del sitio activo es específica para la reacción que cataliza (Atkins y de Paula, 2002).

Todas las transformaciones químicas pasan por una estructura inestable denominada estado de transición, el cual se encuentra entre las estructuras químicas de los sustratos y las de los productos (Schramm, 1998) (figura 1).

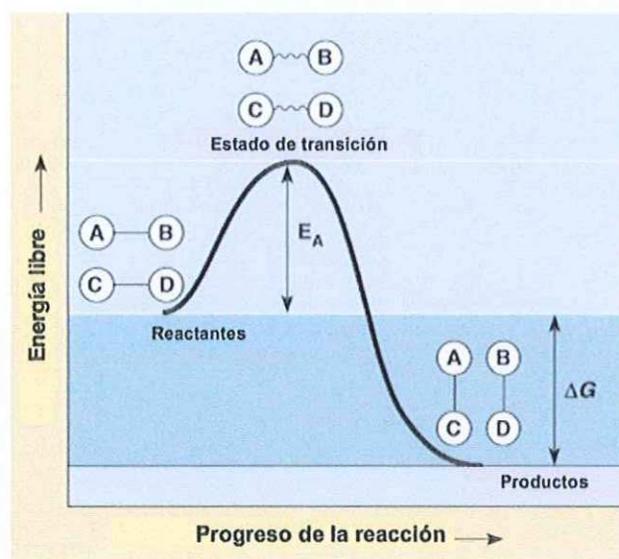


Figura 1. Progreso de una reacción química. Los reactantes interactúan y pasan por un estado de transición en el cual los enlaces de los reactantes se rompen y se forman enlaces nuevos. Los productos son los que poseen estos nuevos enlaces, los cuales tienen menos energía libre que los reactantes (Copyright © de Pearson Education, Inc.).

El TSA (por sus siglas en inglés TSA, *Transition State Analog*) es una molécula estable que mimetiza a los estados transitorios que limitan a la reacción o intermediarios de la transformación química. La mayoría de las abzimas fueron creadas por inmunización con un análogo del estado de transición (Leong *et al.*, 2007).

La teoría del estado de transición explica que el aumento en el índice catalítico se debe más a la afinidad de la enzima por el estado de transición que a la afinidad por el sustrato (Pauling, 1948). Sin embargo, Jencks (1969) predijo que los anticuerpos dirigidos contra un TSA podían contribuir a la estabilización del estado de transición y, por lo tanto, a la catálisis de la reacción correspondiente. Así es como ahora encontramos que el método estándar para preparar anticuerpos catalíticos involucra la inmunización de animales con un TSA para la reacción de interés. Aunque a través de este método se han reportado anticuerpos catalíticos con eficiencia similar a la de las enzimas naturales, generalmente, ha sido difícil encontrar catalizadores altamente efectivos (Baca *et al.*, 1997). Debido a la ineficiencia de las abzymas encontradas hasta ahora, muchos de los esfuerzos se han centrado en la alteración de la especificidad natural de las enzimas mediante modificaciones químicas, mutación dirigida o selecciones genéticas (Shokat y Schultz, 1990).

Varios estudios han demostrado que dentro de una serie de anticuerpos relacionados o mutantes enzimáticos, la eficiencia catalítica usualmente se incrementa como una función del incremento de afinidad por un análogo del estado de transición (Baca *et al.*, 1997). Sin embargo, puede haber variantes obtenidas por evolución dirigida con altas afinidades por el TSA pero menor actividad catalítica que el anticuerpo parental (Arkin y Wells, 1998). Una de las explicaciones es que el TSA no mimetiza correctamente al estado de transición (Fujii *et al.*, 1998), pero existen otras razones que contribuyen a la catálisis además de la estabilización del estado de transición, tales como la catálisis nucleofílica o la catálisis general básica. En estos casos, la evolución dirigida de las abzymas usando TSAs no implica que se seleccionarán las variantes que posean mayor eficiencia catalítica (Takahashi-Ando, *et al.*, 2004).

## **I. 2. Anticuerpos de tiburón.**

Los peces cartilagosos, filogenéticamente son los primeros organismos que presentan receptores antigénicos: al menos tres tipos de inmunoglobulinas (Ig), cuatro isotipos de

receptores de células T (TCR, por sus siglas en inglés, *T cell receptor*) y las IgNAR (del inglés, *new antigen receptor*), las cuales pueden considerarse un intermediario evolutivo de los dos primeros (Roux *et al.*, 1998). Se han identificado tres isotipos de anticuerpos IgNAR, los cuales varían en cuanto al número y configuración de los residuos de cisteína (Roux *et al.*, 1998; Rumfelt *et al.*, 2002). Sin importar el tipo, todas las IgNAR presentan poca variabilidad en el CDR1 y CDR2 y concentran la diversidad en el CDR3 (Roux *et al.*, 1998). En las IgNAR, el CDR3 puede tener de 5 a 23 residuos de longitud, aunque normalmente presenta de 15 a 17 residuos (Nuttal *et al.*, 2003).

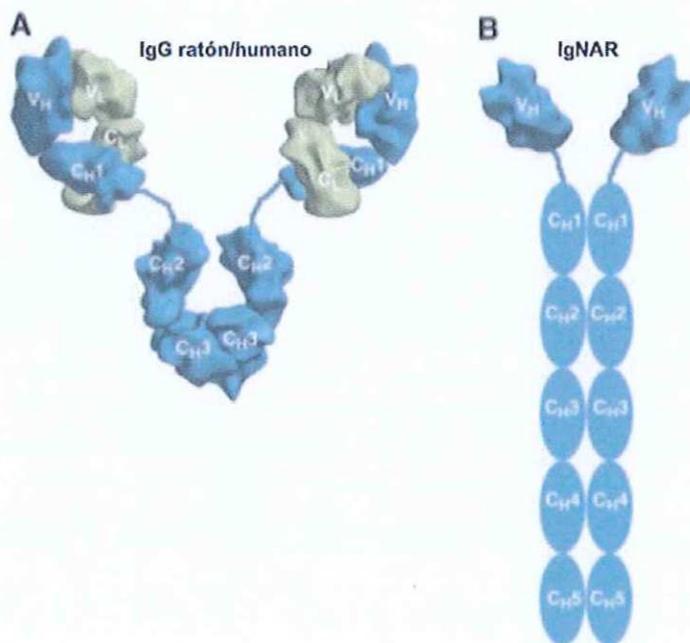


Figura 2. Representación esquemática de la estructura de los anticuerpos IgG e IgNAR. A) Las IgG están generalmente compuestas por dos cadenas pesadas (H, en azul) y dos cadenas ligeras (L, en amarillo), la región variables la componen dos dominios Ig, uno de la cadena pesada  $V_H$ , y uno de la cadena ligera  $V_L$ . B) Los anticuerpos IgNAR tienen solamente dos cadenas pesadas (H), cada una con 5 dominios constantes  $C_H$  y un dominio variable  $V_H$ , el cual no se dimeriza (Stanfield *et al.*, 2004).

Las IgNAR de los tiburones son dímeros unidos por enlaces disulfuro. Cada dímero está compuesto por dos cadenas proteicas, cada una de las cuales contiene un dominio variable y 5 dominios constantes (Greenberg *et al.*, 1995) (Figura 2B). Las IgNAR son bivalentes y se unen al antígeno a través de un solo dominio variable de inmunoglobulina (~13 kDa) (Roux *et al.*, 1998). En contraste, los anticuerpos convencionales se unen a través de una cadena variable ligera ( $V_L$ ) y una variable pesada ( $V_H$ ) (~26 kDa) (Figura 2A) cada una de las cuales hace contacto con el antígeno hasta con seis CDRs (Chothia *et al.*, 1989).

Los dominios variables de los anticuerpos tipo NAR, despliegan asas de superficies muy amplias, frecuentemente más largas que las de los anticuerpos convencionales de ratones y humanos (Figura 3), y estas son capaces de penetrar cavidades en los antígenos (por ejemplo sitios activos de las enzimas) (Holliger y Hudson, 2005). Además, los IgNAR codifican un CDR3 inusualmente largo, complejo y que exhibe un alto grado de variabilidad (Streltsov *et al.*, 2005). A diferencia de los dominios  $V_H$  de ratón, los dominios vNAR, son generalmente solubles y su producción *in vitro* es estable (Holliger y Hudson, 2005).

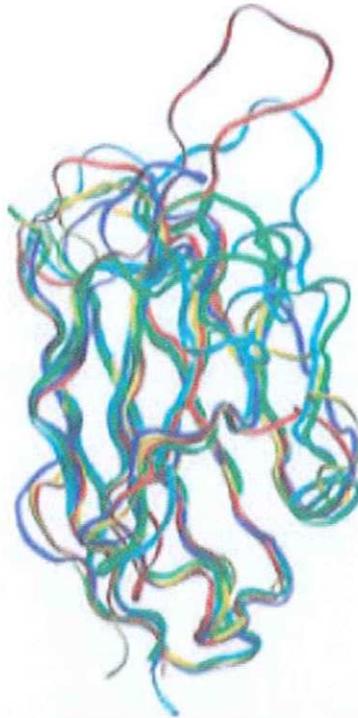


Figura 3. Estructuras superpuestas de vNAR tipo 2 (rojo, PDB: 12Y-2), V $\alpha$  de TCR humano (azul, PDB: 1A07), V<sub>H</sub> (verde) y V<sub>L</sub> (amarillo) de humano (PDB: 1IGM) y V<sub>H</sub> de camello (azul claro, PDB: 1MEL) (Holliger y Hudson, 2005).

### I. 3. El método de despliegue en fagos.

La producción y selección de anticuerpos puede llevarse a cabo mediante varias tecnologías. Una de las tecnologías más comúnmente usadas es el despliegue en fagos. Esta estrategia permite seleccionar fragmentos recombinantes de anticuerpos con propiedades de unión específicas para un amplio rango de moléculas como proteínas, glicoproteínas, oligosacáridos, ácidos nucleicos, toxinas o compuestos de bajo peso molecular (haptenos) (Brichta *et al.*, 2005).

El despliegue en fagos, descrito por vez primera por George P. Smith en 1985, se refiere al despliegue de péptidos foráneos funcionales, proteínas o fragmentos de anticuerpos, sobre la superficie de un bacteriófago. El despliegue se lleva a cabo mediante la fusión del ADN codificante de la proteína de interés en la región del genoma codificante de alguna proteína de superficie del fago (Figura 4).

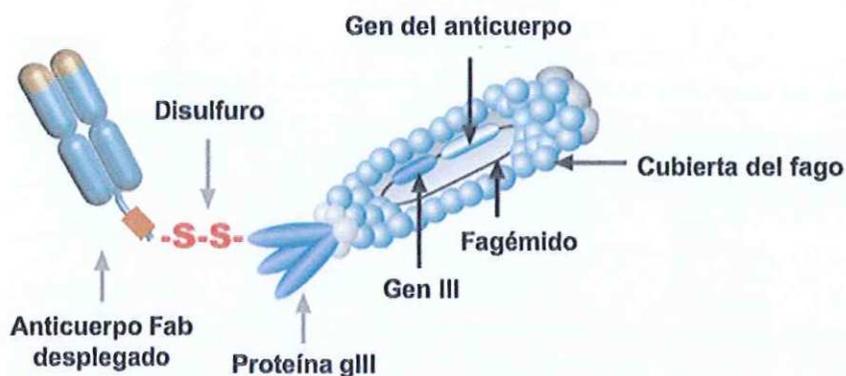


Figura 4. Despliegue de un fragmento de anticuerpo tipo Fab en la proteína gIII de la superficie del fago (modificada de [http://www.ab-direct.com/custom/hucal\\_technology-368.html](http://www.ab-direct.com/custom/hucal_technology-368.html)).

El despliegue de los anticuerpos en la superficie del fago, permite la selección de afinidad por el antígeno *in vitro*. La selección se lleva a cabo exponiendo la biblioteca de fagos a moléculas de antígeno inmobilizadas (Figura 5). Las partículas del fago que se unen al antígeno después se eluyen y se amplifican infectando bacterias y se usan en rondas de selección subsecuentes. Tras la ronda final de selección, las partículas de fago vuelven a amplificarse en bacterias y se usan para caracterizar a la población seleccionada (Brichta *et al.*, 2005).

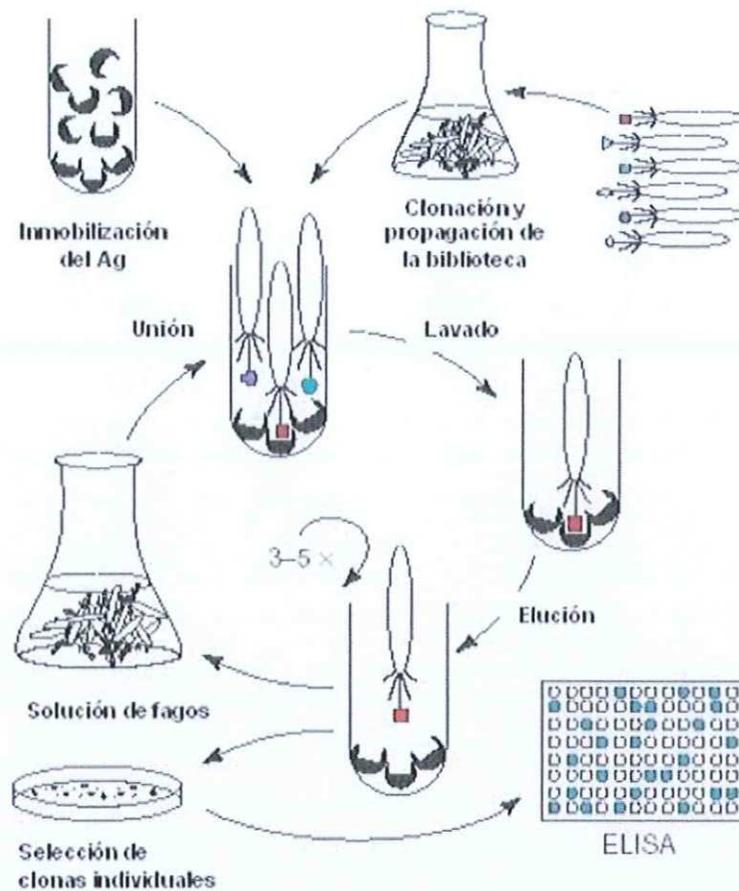


Figura 5. Esquema del método de selección de fagos mediante rondas sucesivas de unión, elución y reamplificación (Modificada de <http://www.molgen.mpg.de/~in-vitro/technology.html>).

Actualmente, se utilizan diferentes tipos de bibliotecas de fagos para la selección de anticuerpos recombinantes específicos: una biblioteca específica obtenida de animales inmunizados, o una biblioteca general creada sin especificidad contra un analito en particular. Más aún, puede construirse una biblioteca mutante secundaria a partir de secuencias de ADN mutadas al azar de una línea de hibridoma monoclonal o de una sola clona del fago, y de ella pueden seleccionarse anticuerpos de mayor afinidad (Brichta *et al.*, 2005).

Además, este método provee una nueva ruta para la maduración de la afinidad *in vitro*. En la naturaleza, las enzimas evolucionaron por un proceso de mutación y selección basado en la eficiencia catalítica. Un proceso similar, denominado maduración de la afinidad, es usado por el sistema inmune para incrementar la afinidad de los anticuerpos. El despliegue en fagos ha sido usado para la selección de regiones variables de los anticuerpos, ya que mimetiza este proceso de maduración de la afinidad (Fujii *et al.*, 1998).

#### **I. 4. La corismato mutasa en la ruta del shikimato.**

La ruta intracelular del shikimato es esencial en bacterias, hongos, algas y plantas para la síntesis de los compuestos aromáticos y no se presenta en los mamíferos (Sasso *et al.*, 2004). El shikimato es convertido a corismato en tres pasos, que incluyen la adición de tres carbonos provenientes de una molécula de fosfoenolpiruvato. A partir del corismato, se derivan dos ramificaciones, una de las cuales producirá triptófano y la otra fenilalanina y tirosina (Lehninger, 2000) (Figura 6). La conversión del corismato en los productos aromáticos subsecuentes está controlada por la actividad de varias enzimas. Una de estas enzimas es la corismato mutasa (CM; EC 5.4.99.5), la cual cataliza el rearreglo de Claisen de corismato a prefenato con un índice catalítico de  $2 \times 10^6$  (Andrews, *et al.*, 1973). El prefenato es precursor de la fenilalanina y la tirosina. La importancia biológica de esta conversión y el valor sintético del rearreglo de Claisen ha conducido a extensas investigaciones experimentales y teóricas (Guo y Cui, 2001). Ahora se encuentran disponibles las estructuras cristalográficas de varias CMs acopladas con un TSA inhibidor: *Bacillus subtilis* (Chook, *et al.*, 1994), *Escherichia coli* (Lee, *et al.*, 1995) y *Saccharomyces cerevisiae* (Strater, *et al.*, 1997); así como la estructura de un anticuerpo catalítico menos activo que estas: 1F7 (Haynes, *et al.*, 1994).

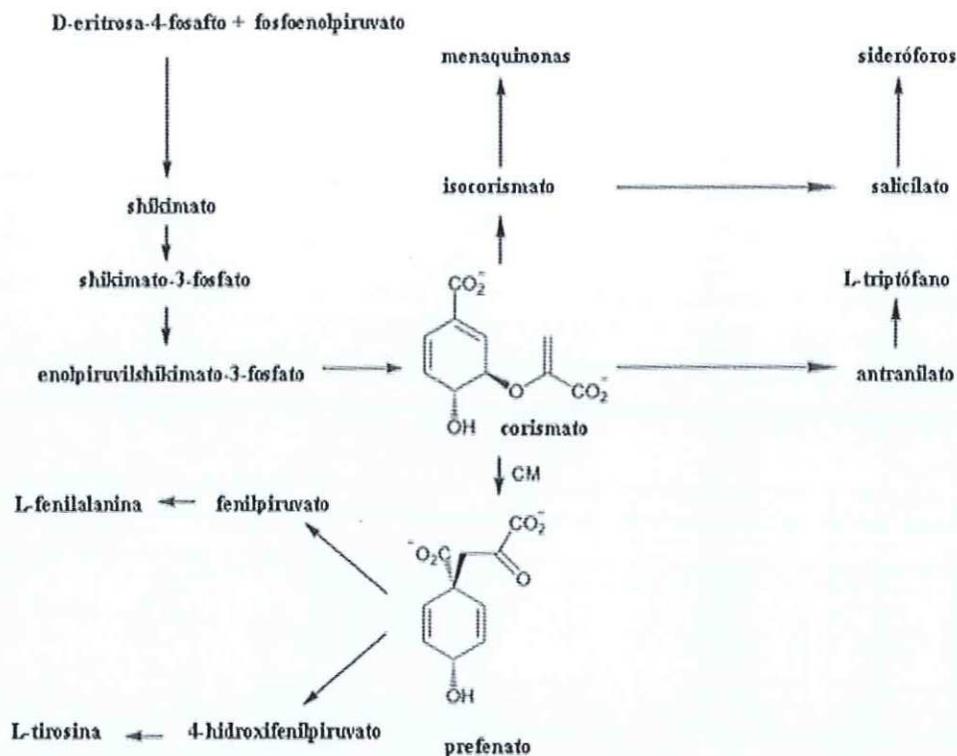


Figura 6. Conversión de shikimato a corismato y las rutas subsecuentes para producir aminoácidos aromáticos, menaquinonas y sideróforos (Sasso *et al.*, 2004).

Las estructuras de las CMs es variable dependiendo del organismo. La CM de *E. coli* (Figura 7) es un homodímero, donde cada subunidad está compuesta de tres  $\alpha$ -hélices, pertenece a la familia AroQ y es bifuncional (AroQp, corismato mutasa-prefenato deshidratasa) (Sasso. *et al.*, 2004). Su tipo de plegamiento, al igual que el de *S. cerevisiae*, se denomina “plegamiento corismato mutasa tipo II” (Murzin, 1995).

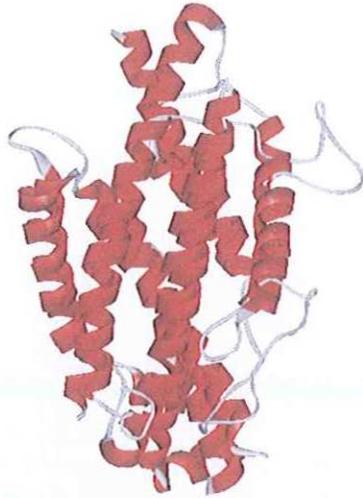


Figura 7. Estructuras cristalográficas de CM de *E. coli* (PDB: 1ecm) y de levadura (PDB: 2csm) superpuestas mediante Swiss-PDB viewer (Guex, 1997).

Por otro lado, la CM de *B. subtilis* (Figura 8) es una proteína trimérica alfa-beta y tipo AroH (Chook, *et al.*, 1994) y su estructura se clasifica bajo el “plegamiento corismato mutasa tipo Bacillus”.



Figura 8. Monómero de la CM de *B. subtilis* (PDB: 1com).

## II. ANTECEDENTES.

Los primeros reportes de anticuerpos catalíticos datan de 1986, en dos trabajos independientes de los laboratorios de Schultz y Lerner, respectivamente. En el primero, Pollack, *et al.* (1986), reportan a la inmunoglobulina MOPC167, la cual se une al TSA p-nitrofenilfosforilcolina con elevada afinidad y cataliza la hidrólisis del carbonato correspondiente. En el otro trabajo, Tramontano *et al.* (1986) lograron obtener anticuerpos monoclonales estereolíticos y demostraron así, que los anticuerpos dirigidos contra un hapteno diseñado, pueden estabilizar al estado de transición y por lo tanto, funcionar como una enzima.

En lo que respecta a la actividad corismato mutasa, ya se han preparado anticuerpos monoclonales contra un estado de transición análogo e inhibidor de esta enzima. Hilvert *et al.* (1988) encontraron una abzima que cataliza la reacción de corismato a pafenato con un índice de aceleración de más de dos órdenes de magnitud comparados con la reacción no catalizada, y le denominaron 1F7. Lo anterior demostró la utilidad de los inmunógenos diseñados para generar anticuerpos que catalizan determinadas reacciones. En experimentos posteriores, se modificó y clonó el ADNc de la abzima 1F7 en otro vector de expresión para transformarlo y expresarlo en *Saccharomyces cerevisiae*. De este experimento se obtuvo la abzima 1F7 Fab, que cataliza la reacción de la corismato mutasa con la misma especificidad que el anticuerpo que fue aislado de un hibridoma por Hilvert en 1988. Este sistema de expresión sentó las bases para la aplicación de la genética clásica y “reversa” en el estudio y mejoramiento de esta abzima (Bowdish *et al.*, 1991).

Las abzimas obtenidas por Pollack, *et al.* (1986), Tramontano *et al.* (1986), Hilvert *et al.* (1988) y Bowdish *et al.*, (1991) fueron aisladas de hibridomas, sin embargo el método de despliegue en fagos es otra alternativa para obtener anticuerpos monoclonales y también ha sido usado para crear bibliotecas en las que se realiza la búsqueda de abzimas y se ha demostrado que es un medio eficiente y conveniente (Leong *et al.*, 2007).

Los resultados de Baca *et al.* (1997) indican que el método de despliegue en fagos puede ser usado para seleccionar los variantes con mayor afinidad por el TSA. Él y sus colaboradores humanizaron un anticuerpo catalítico murino denominado 17E8. Este anticuerpo cataliza la hidrólisis de diferentes aminoácido-fenilésteres. A partir de este anticuerpo quimérico crearon bibliotecas combinatorias, de las cuales pudieron seleccionar variantes que muestran una afinidad por el estado de transición de 2 a 8 veces mayor que el anticuerpo quimérico parental. Leong *et al.*, (2007) también aislaron anticuerpos monoclonales de bibliotecas de fagos. Los fragmentos scFv solubles producto de los clones aislados se expresaron en *E. coli* y corroboraron que estos fragmentos poseen actividad enzimática ya que son capaces de reconocer a un TSA de lipasas/esterasas.

En otra biblioteca combinatoria desplegada en fagos, Fujii *et al.* (1998) lograron encontrar abzimas con una actividad catalítica superior a su construcción inicial. Esta biblioteca se derivó del anticuerpo 17E11, el cual cataliza la desprotección regioselectiva de carbohidratos acilados, y se encontró que la variedad mutante 115 es casi 12 veces más eficiente en la catálisis que la construcción original. Así demostraron que este método es una estrategia de maduración de la afinidad *in vitro* y permite seleccionar variantes más eficientes en el proceso catalítico. En otro estudio, Takahashi-Ando *et al.* (2007) sometieron el anticuerpo catalítico 6D9 a evolución dirigida mediante el sistema de despliegue en fagos para obtener abzimas con una capacidad catalítica superior a la parental. Ellos encontraron que el incremento en la capacidad catalítica de estos anticuerpos se debe a que usaron dos TSA diferentes, uno para inmunizar y otro para seleccionar.

Debido a la importancia de la interacción entre el TSA y la CM para el proceso catalítico, se han estudiado las extensas interacciones de puentes de hidrógeno y electrostáticas que existen entre ellos, pero aún permanecen muchas preguntas respecto a los detalles del proceso catalítico, incluyendo la selección del sustrato, el incremento en el índice de la reacción y el papel que desempeñan los residuos en el sitio activo (Guo y Cui, 2001).

Respecto al mecanismo de la CM en el incremento del índice de la reacción, existen varios estudios que demuestran que la enzima trabaja proveyendo estabilización electrostática al estado de transición (Crespo *et al.*, 2003, Guimarães *et al.*, 2004, Hur y Bruice, 2003, Štrajbl *et al.*, 2003, Ranaghan *et al.*, 2004).

Los anticuerpos IgNAR resultan de especial interés para las aplicaciones biotecnológicas y médicas debido a su tamaño, solubilidad y estabilidad (Holliger y Hudson, 2005). Liu *et al.* (2007) reportan que los anticuerpos convencionales pierden toda la actividad en los primeros 5~10 minutos, mientras que los anticuerpos IgNAR muestran una estabilidad superior al calor y una pérdida de actividad lenta cuando se les mantiene durante una hora a elevadas temperaturas (95°C).

Se ha demostrado que a partir de bibliotecas de tiburones no inmunizados, es posible aislar anticuerpos específicos contra el antígeno con el cual se selecciona. Liu *et al.* (2007) construyeron dos bibliotecas no inmunes de los tiburones *Squalus acanthias* y *Mustelus canis* y usaron la toxina de cólera (CT) para realizar la selección de clones. Lograron aislar tres anticuerpos similares que se unían específicamente a la CT (sin reaccionar de manera cruzada con otros antígenos).

En el 2001, Nuttall *et al.*, construyeron una biblioteca de anticuerpos NAR del tiburón *Orectolobus maculatus* y realizaron la selección contra varios antígenos. Sin embargo, los anticuerpos que poseían mayor afinidad fueron los dirigidos contra la proteasa gingipaina K de *Porphyromonas gingivalis*. También Nuttall *et al.* (2004) aislaron, a partir de una biblioteca de anticuerpos vNAR, dos clones con afinidades en el orden nanomolar por el antígeno de la membrana apical de *Plasmodium falciparum* (AMA-1). A uno de estos clones, 12Y-2, se le maduró *in vitro*, y una de las variantes mostró una mejora en la afinidad aproximadamente de casi 10 veces comparada con 12Y-2.

Liu *et al.* (2007) construyeron una biblioteca semi-sintética de anticuerpos vNAR con una complejidad aproximada de  $1 \times 10^9$ . Esta variedad fue lograda introduciendo variaciones de

tamaño y secuencia en la CDR3. De esta biblioteca, seleccionaron anticuerpos contra tres toxinas: enterotoxina estafilocócica (SEB), ricina y toxina botulínica A (BoNT/A). Sus resultados indican que la diversidad del CDR3 se puede incrementar mediante esta estrategia para obtener una biblioteca menos limitada de la cual se pueden obtener anticuerpos contra una variedad de toxinas.

Shao *et al.* (2007), crearon una biblioteca sintética a partir de variaciones en la longitud y composición de la CDR3 de la clona HEL-5A7. Este clon había sido seleccionada previamente de una biblioteca inmune de IgNAR. De la biblioteca sintética seleccionaron clones contra dos proteínas modelo: lisozima y leptina. Eligieron un clon de cada selección para verificar su funcionalidad y encontraron que ambas eran estables y se unían a sus correspondientes antígenos.

### III. JUSTIFICACIÓN.

Debido a que la interacción antígeno-anticuerpo es similar a la interacción enzima-sustrato y además, a la diversidad encontrada en las bibliotecas de tiburón, es posible seleccionar de ellas anticuerpos contra teóricamente, cualquier análogo del estado de transición, es decir, es posible encontrar abzimas con la capacidad de realizar la catálisis de la reacción de elección.

Las bibliotecas de fagos obtenidas de los anticuerpos vNAR de tiburón, han demostrado ser eficientes en la búsqueda de anticuerpos dirigidos contra cualquier antígeno, sean estas a partir de animales inmunizados o no inmunizados.

Los anticuerpos vNAR son funcionales y de menor tamaño que las abzimas estudiadas hasta el momento. Dado que el tamaño de la abzima pudiera ser un factor que interviene en el proceso catalítico, analizaremos la actividad corismato mutasa de fragmentos de anticuerpos vNAR. Además, existen amplios estudios respecto a las abzimas con actividad corismato mutasa, por lo tanto, utilizaremos un TSA de la reacción que cataliza la CM para dirigir nuestra selección de anticuerpos y demostrar la utilidad del uso de bibliotecas de tiburón en la selección de abzimas con esta actividad.

## **IV. OBJETIVOS.**

### **IV. 1. OBJETIVO GENERAL.**

Obtener fragmentos de anticuerpos vNAR del tiburón *Heterodontus francisci* con actividad corismato mutasa.

### **IV. 2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.**

1. Mediante el método de despliegue en fagos, seleccionar de una biblioteca no inmune del tiburón *H. francisci*, fragmentos vNAR específicos del TSA/CM .
2. Expresar los anticuerpos heterológamente y demostrar que reconocen al antígeno.
3. Verificar su actividad catalítica *in vitro* e *in vivo*.

## V. METODOLOGÍA.

### V. 1. Reamplificación de la biblioteca.

Seguimos el protocolo de Barbas *et al.* (2001) para reamplificar una biblioteca de fragmentos vNAR previamente sintetizada (Quezada-Íñiguez, 2008) a partir de un tiburón *H. francisci* inmunizado con un antígeno diferente al usamos en nuestra bioselección. La metodología fue la siguiente:

1. En un matraz Erlenmeyer de 250 mL, inoculamos 50 mL de medio SB con 50  $\mu$ L de células *E. coli* ER2537 electrocompetentes. Agitamos el cultivo a 250 rpm y 37°C hasta que la densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ) fue de aproximadamente 1.
2. Agregamos 50  $\mu$ L de la biblioteca (porque estaba diluida con PBS 1x) al cultivo e incubamos a temperatura ambiente para que los fagos infectaran a las bacterias por 15 minutos, después de la infección agregamos 10  $\mu$ L de ampicilina 100 mg/mL al cultivo.
3. Para obtener los títulos de bacterias infectadas por fagos, preparamos una dilución  $10^{-4}$  del cultivo infectado, sembramos 1, 10 y 100  $\mu$ L respectivamente, en placas de LB agar con ampicilina (100  $\mu$ g/mL). Incubamos las placas toda la noche a 37°C.
4. Transferimos el cultivo de 50 mL infectado a un frasco de polipropileno de 500 mL y agitamos a 250 rpm y 37°C por una hora, tras la cual agregamos 15  $\mu$ L más de ampicilina 100 mg/mL y agitamos una hora más con las condiciones anteriores.
5. Agregamos 2 mL de fago ayudador VCSM13, 148 mL de SB precalentado a 37°C y 75  $\mu$ L de ampicilina 100 mg/mL. Agitamos este cultivo de ~200 mL a 300 rpm y 37 °C durante una hora y media.
6. Agregamos 280  $\mu$ L de kanamicina 50 mg/mL y agitamos el cultivo toda la noche a 300 rpm y 37 °C.
7. Al día siguiente centrifugamos el cultivo a 3000g durante 15 minutos a 4°C y transferimos el sobrenadante a frascos de polipropileno de 500 mL estériles. Agregamos 8 g de PEG-8000 y 6 g de cloruro de sodio y agitamos a 250 rpm y 37°C durante 5 minutos para disolver los sólidos. Una vez disueltos incubamos a 4°C durante 30 minutos.

8. Centrifugamos a 15,000g durante 15 minutos a 4°C para precipitar los fagos. Descartamos el sobrenadante y eliminamos el exceso de líquido invirtiendo los tubos unos minutos sobre un papel secante.
9. Resuspendimos el precipitado de fagos en 2 mL de BSA 1%-PBS 1x y transferimos esta suspensión a un tubo de microcentrífuga para centrifugar a máxima velocidad por 5 minutos a 4°C. Filtramos el sobrenadante (filtro de 0.2 µm) a un tubo de microcentrífuga estéril y lo conservamos a 4°C. Esta biblioteca de fagos reamplificada es la que usamos para la bioselección, tanto en la dilución 1:100 (D100) como en la dilución 1:500 (D500).

## V. 2. Bioselección.

Realizamos la bioselección de acuerdo con el protocolo de Barbas *et al.* (2001), pero agregando un paso más, el cual es una selección negativa para los fagos que se unen a tiroglobulina, ya que el antígeno es un complejo TSA-proteína acarreadora, en este caso, tiroglobulina. En la bioselección seleccionamos y reamplificamos los fagos específicos para nuestro antígeno a través de cuatro rondas de selección. A la reamplificación se le llama “ronda cero” y las rondas de bioselección empiezan a numerarse consecutivamente empezando de “ronda 1”.

1. Agregamos 50 µL de tiroglobulina bovina 10 µg/mL (en PBS 1x) a 4 pozos (solo 2 pozos para las rondas siguientes) de una placa de ELISA (placa A) e incubamos una hora a 37°C. Eliminamos la solución de tiroglobulina y bloqueamos con 150 µL de BSA 3% a 4°C durante toda la noche.
2. En otra placa de ELISA (placa B) agregamos 50 µL de nuestro antígeno (TSA) preparado. A dos pozos de la placa agregamos antígeno preparado a una dilución 1:100 en PBS 1x, y a otros dos pozos se agregó una dilución 1:500. En las siguientes rondas sólo preparamos un pozo para cada dilución. Incubamos esta placa a 4°C durante toda la noche.

3. Al día siguiente, eliminamos la solución bloqueadora de la placa A y agregamos 50  $\mu\text{L}$  de la solución de fagos reamplificados. Incubamos la placa con esta solución durante 2 horas a 37°C. Por otro lado, eliminamos la solución con el TSA de la placa B y bloqueamos con 150  $\mu\text{L}$  de BSA 3% durante una hora a 37°C.
4. Eliminamos la solución bloqueadora de la placa B y transferimos los 50  $\mu\text{L}$  de la solución de fagos de la placa A hacia la B e incubamos por dos horas a 37°C.
5. Eliminamos la solución de fagos y agregamos 200  $\mu\text{L}$  de TPBS y pipeteamos arriba y abajo 5 veces, dejamos la solución 5 minutos y repetimos este paso de lavado 5 veces para la primera ronda, 10 para la segunda y 15 para la tercera y la cuarta.
6. Una vez eliminada la última solución de lavado, eluimos los fagos de cada pozo con 50  $\mu\text{L}$  de tripsina 10 mg/mL en PBS 1x recién preparada e incubamos la placa durante 30 minutos a 37 °C. Pipeteamos arriba y abajo 10 veces y transferimos los eluidos a 2 mL de un cultivo (juntando los 2 pozos de cada dilución para un cultivo en la primera ronda) de *E. coli* ER2537 con  $\text{DO}_{600} \sim 1$ , e incubamos a temperatura ambiente por 15 minutos.
7. Transferimos este cultivo infectado de 2 mL a un frasco de polipropileno de 500 mL, y agregamos 6 mL de SB precalentado a 37°C y 1.6  $\mu\text{L}$  de ampicilina 100 mg/mL. Para determinar los títulos de la infección de salida, diluimos 2  $\mu\text{L}$  de este cultivo en 200  $\mu\text{L}$  de medio SB y sembramos 10 y 100  $\mu\text{L}$  en placas de LB agar con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Incubamos las placas toda la noche a 37°C.
8. Agitamos el cultivo de 8 mL a 250 rpm por una hora a 37°C y agregamos 2.4  $\mu\text{L}$  de ampicilina 100 mg/mL y agitamos una hora más bajo las condiciones anteriores.
9. Para la titulación de entrada infectamos 50  $\mu\text{L}$  del cultivo de  $\text{OD}_{600} \sim 1$  con 1  $\mu\text{L}$  de una dilución  $10^{-8}$  de la preparación de fagos de la reamplificación o de la ronda de selección anterior, según era el caso. Dejamos esta infección incubando a temperatura ambiente por 15 minutos y después sembramos los 50  $\mu\text{L}$  en una placa de LB agar con ampicilina (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Las placas se dejaron incubando toda la noche a 37°C.

10. A nuestro cultivo infectado de 8 mL, agregamos 1 mL de fago ayudador VCSM13, 91 mL de SB precalentado a 37°C y 46 µL de ampicilina 100 mg/mL. Agitamos este cultivo de ~100 mL a 300 rpm y 37 °C durante una hora y media.
11. Agregamos 140 µL de kanamicina 50 mg/mL y continuamos agitando toda la noche a 300 rpm y 37 °C.
12. Al día siguiente centrifugamos el cultivo a 3000g durante 15 minutos a 4°C. Transferimos el sobrenadante a frascos de polipropileno de 500 mL estériles y agregamos 4 g de PEG-8000 y 3 g de cloruro de sodio. Agitamos a 37°C y 250 rpm durante 5 minutos para disolver los sólidos. Una vez disueltos incubamos a 4°C durante 30 minutos.
13. Centrifugamos a 15,000g durante 15 minutos a 4°C para precipitar los fagos. Descartamos el sobrenadante y dejamos los tubos invertidos unos minutos para eliminar el exceso de líquido.
14. Resuspendimos el precipitado de fagos en 2 mL de BSA 1% en PBS 1x. Transferimos la suspensión a un tubo de microcentrífuga y centrifugamos a máxima velocidad por 5 minutos a 4°C. Tomamos el sobrenadante y lo pasamos a través de un filtro de 0.2 µm a un tubo de microcentrífuga estéril. Guardamos a 4°C. Esta biblioteca es la que usamos para la siguiente ronda de selección.

### **V. 3. Expresión de los fragmentos vNAR en la cepa TOP10F' de *E. coli*.**

#### **V. 3. 1. PCR de colonia.**

Realizamos PCR de las colonias aisladas de la ronda 4 (R4). Usamos los oligonucleótidos *Ompseq* y *Gback*, con los cuales se obtienen fragmentos de ~500pb. Visualizamos los productos de PCR en gel de agarosa al 2% teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/mL). Las condiciones de la reacción se especifican en la tabla I.

Tabla I. Condiciones de PCR para amplificar fragmentos  $\nu$ NAR de colonias de bacterias.

Núm. de ciclos	Temperatura °C	Tiempo
1	94	7 minutos
30	94	30 segundos
	56	30 segundos
	72	1 minuto
1	72	10 minutos

### V. 3. 2. Extracción de plásmidos.

Para la extracción de plásmidos utilizamos el método de lisis alcalina.

1. Inoculamos 1.5 mL de medio SB + ampicilina 100  $\mu$ g/ mL con las clonas positivas para el inserto de  $\nu$ NAR, y dejamos agitando toda la noche a 250 rpm y 37 °C.
2. Centrifugamos este cultivo a 13,200 rpm y resuspendimos el precipitado en 100  $\mu$ L de GTE, dejamos reposar esta solución 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Agregamos 200  $\mu$ L de NaOH-SDS, mezclamos y dejamos reposar 5 minutos más a 4°C.
4. Adicionamos 150  $\mu$ L de acetato de sodio 3M, mezclamos con el vórtex por 2 segundos y dejamos reposar 5 minutos a 4°C.
5. Centrifugamos a 13,200 rpm y transferimos el sobrenadante a un tubo limpio.
6. Agregamos 0.8 mL de etanol 95% y reposamos la mezcla 2 minutos.
7. Centrifugamos a 13,200 rpm y lavamos el precipitado con 1 mL de etanol al 70%. Dejamos secar en la incubadora a 37°C, por aproximadamente 20 minutos.
8. Resuspendimos en 30  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y almacenamos a -20°C.

### **V. 3. 3. PCR de plásmidos.**

Para realizar PCR de los plásmidos utilizamos las mismas condiciones de la reacción y los mismos oligonucleótidos que para PCR de colonia (Tabla I). Agregamos 1  $\mu\text{L}$  de la extracción de plásmido. Visualizamos los productos del PCR en gel de agarosa al 2% con bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

### **V. 3. 4. Análisis de los fragmentos vNAR mediante la enzima de restricción BstO I.**

1. Preparamos una mezcla madre, la cual contenía, para cada reacción: 12.3  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas, 2  $\mu\text{L}$  de buffer de reacción 10x, 0.2  $\mu\text{L}$  de BSA acetilado (10  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) y 5 unidades de enzima BstO I (0.5  $\mu\text{L}$ ).
2. En cada tubo de reacción agregamos 5  $\mu\text{L}$  del producto de PCR de plásmido y 15  $\mu\text{L}$  de la mezcla madre, dando un volumen final de reacción de 20  $\mu\text{L}$ . La duración de la digestión fue de una hora. Visualizamos los productos de la digestión en gel de agarosa al 4% con tinción de bromuro de etidio (0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

### **V. 3. 5. Secuenciación y elección de los clones.**

Secuenciamos 10 clones de la dilución 1:100 y otros 10 de la dilución 1:500 con el oligonucleótido Ompseq. Comparamos las secuencias de aminoácidos de estos clones con el programa MacVector 7.2.2 y de acuerdo a sus diferencias en la secuencias de aminoácidos se eligieron algunos de ellos para los experimentos posteriores.

### **V. 3. 6. Preparación de células TOP10F' quimiocompetentes.**

Para obtener células quimiocompetentes, inoculamos 2 mL de medio SB sin antibiótico con 2  $\mu\text{L}$  de una preparación de células *E. coli* TOP10F' en glicerol 15 % y las dejamos incubando toda la noche a 37°C y 250 rpm. Después diluimos 0.5 mL de este cultivo concentrado en 25 mL de medio SB a temperatura ambiente e incubamos a 37°C y 250 rpm

hasta que la  $DO_{600} \sim 0.3$ . Centrifugamos el cultivo a 3,000 g por 15 minutos, descartamos el sobrenadante y resuspendimos el precipitado de células en 1/2 volumen de  $CaCl_2$  100 mM a 4°C. Incubamos en hielo por 20 minutos y centrifugamos a 3,000 g por 15 minutos, resuspendimos en 1/10 de volumen de  $CaCl_2$  100 mM a 4°C. Incubamos en hielo durante 1 hora. Se emplearon 50  $\mu$ L de estas células para transformar por choque térmico y el remanente de células, se conservó a -75°C agregando un volumen de glicerol al 30% y haciendo alícuotas de 200  $\mu$ L. Sembramos 50  $\mu$ L de células quimiocompetentes en una placa de LB agar con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) para cerciorarnos de que no estuvieran contaminadas con otras células.

### **V. 3. 7. Transformación de células TOP10F' quimiocompetentes.**

Tomamos 1.5  $\mu$ L de la solución de plásmido correspondiente a las clonas seleccionadas tras la secuenciación y lo transferimos a un tubo estéril de 1.5 mL, dejamos los tubos 2 minutos en hielo, agregamos 50  $\mu$ L de células TOP10F' quimiocompetentes y homogeneizamos con la pipeta suavemente. Después incubamos los tubos durante un minuto en un baño maría a 42°C e inmediatamente los transferimos al hielo donde los incubamos por 5 minutos. Agregamos 950  $\mu$ L de medio SOC. Incubamos durante una hora y media a 150 rpm y 37°C. Sembramos 50  $\mu$ L de este cultivo en cajas de LB agar con ampicilina (100  $\mu$ g/mL). Incubamos las placas toda la noche a 37°C y realizamos la PCR de colonia para verificar que las colonias poseían el inserto.

### **V. 3. 8. Infección de células TOP10F'.**

Inoculamos 50 mL de medio SB con células TOP10F' hasta  $DO_{600} \sim 1$ . Agregamos 20  $\mu$ L de la solución de fagos de la ronda 3, e incubamos por 15 minutos a temperatura ambiente, para permitir que los fagos infectaran a las bacterias. Después inoculamos 10 y 100  $\mu$ L en placas de LB con ampicilina (100  $\mu$ g/mL) para aislar colonias. Se realizó PCR de colonia a las colonias aisladas y se preservaron en glicerol las que fueron positivas al inserto de vNAR para experimentos posteriores (expresión y ELISA de los extractos).

### **V. 3. 9. Expresión del anticuerpo.**

Inoculamos 3 mL de SB con las colonias transformadas (de la ronda 4) o infectadas (de la ronda 3) e incubamos toda la noche a 37°C y 250 rpm. De este preinóculo tomamos 5 µL e inoculamos 5 mL de SB fresco. Incubamos estos cultivos a 37°C y 250 rpm hasta que la  $DO_{600} = 0.7-0.9$ . Una vez alcanzada esta densidad, agregamos IPTG a una concentración final de 0.6 µM e incubamos toda la noche a 30°C y 250 rpm. Centrifugamos los tubos a 10,000 rpm durante 15 minutos y extrajimos la proteína de la pastilla mediante el método de extracción periplásmica.

### **V. 3. 10. Extracción periplásmica.**

Resuspendimos el precipitado de bacterias en 100 µL de solución amortiguadora spheroplast 1x e incubamos en hielo durante 20 minutos. Centrifugamos la suspensión a 14,000 rpm durante 15 minutos y colectamos el sobrenadante en otro tubo limpio. Resuspendimos el precipitado remanente en 100 µL de  $MgSO_4$  5mM e incubamos en hielo por 20 minutos, inmediatamente después centrifugamos a 14,000 rpm durante 15 minutos. Colectamos este sobrenadante y mezclamos con el sobrenadante anterior. Utilizamos esta solución para realizar pruebas de ELISA inmediatamente o almacenamos a -20°C.

### **V. 3. 11. ELISA de expresión.**

En una placa de ELISA agregamos 50 µL de los extractos de proteína por triplicado para cada muestra. Incubamos la placa durante una hora a 37°C, vaciamos la placa y lavamos tres veces los pozos con TPBS. Bloqueamos agregando 150 µL de BSA 3% e incubando por una hora a 37°C. Enseguida eliminamos de la placa la solución de bloqueo y repetimos el lavado 3 veces, luego agregamos 50 µL el anticuerpo anti-HA peroxidasa en una dilución 1:1000 en BSA 1%-PBS 1x e incubamos una hora a 37°C. Después eliminamos esta solución, volvimos a lavar y agregamos 50 µL de la solución de revelado de ABTS,

con la cual incubamos durante 20 minutos a 37°C para enseguida leer su absorbancia a 405 nm.

### **V. 3. 12. ELISA de reconocimiento.**

En una placa de ELISA agregamos 50 µL de una solución de TSA/CM en PBS 1x en una dilución 1:200. En otra placa, la cual representaba el control negativo, agregamos 50 µL de BSA 3%. Dejamos incubando las placas durante una hora a 37°C o toda la noche a 4°C, descartamos la solución y bloqueamos con 150 µL de BSA 3% e incubamos por una hora a 37°C. Descartamos la solución y lavamos tres veces con TPBS. Agregamos 50 µL de los extractos de proteína por triplicado para cada muestra e incubamos una hora a 37°C. Enseguida descartamos las muestras, lavamos y agregamos 50 µL del anticuerpo anti-HA peroxidasa en dilución 1:1000 en BSA 1%-PBS 1x e incubamos una hora a 37°C. Eliminamos el anticuerpo de la placa, volvimos a lavar y agregamos 50 µL de la solución de revelado de ABTS, con la cual incubamos durante 20 minutos a 37°C para enseguida leer su absorbancia a 405 nm.

## **V. 4. Expresión de los fragmentos vNAR en la cepa Fa114 de *E. coli*.**

### **V. 4. 1. Extracción de plásmidos.**

Inoculamos 5 mL de medio LB con ampicilina (200 µg/mL) con los clones aislados de ronda 3 (R3) y ronda 4 (R4), incubamos los cultivos a 30°C y 300 rpm hasta que la DO<sub>600</sub>~1. Obtuvimos ADN plasmídico con el kit para aislar plásmido de Roche.

### **V. 4. 2. Construcción de oligonucleótidos.**

Utilizamos varios juegos de oligonucleótidos para obtener productos distintos de acuerdo al ensayo en el que se utilizaron (Tabla II). Para obtener productos para los ensayos de cinética y complementación sintetizamos los oligonucleótidos 2832-F y 2833-R (sin

hemaglutinina, HA; sin cola de histidinas, H6), para los ensayos de reconocimiento 2832-F y 2954-R (con HA sin H6), para sacar el gen de pComb3x con HA y con H6 usamos 2832-F y 3443-R. Posteriormente construimos los oligonucleótidos 4164-R y 4165-R para agregar cola de histidinas a otros productos que demostraron reconocimiento.

Tabla II. Oligonucleótidos empleados para obtener productos con características específicas para cada ensayo (HA: hemaglutinina; H6: cola de 6 histidinas).

-HA/-H6	+HA/-H6	+HA/+H6	+HA/+H6
2832-F GCC CCG GCC ATG GAC CAA ACA CCA AGA ACG	2832-F GCC CCG GCC ATG GAC CAA ACA CCA AGA ACG	2832-F GCC CCG GCC ATG GAC CAA ACA CCA AGA ACG	2832-F GCC CCG GCC ATG GAC CAA ACA CCA AGA ACG
2833-R GCC CCG GAA GCT TTT ATT AGT TCA CAG TCA GCA CCG	2954-R GCC CCG GAA GCT TTT AAG AAG CGT AGT CCG GAA CGT CGT ACG GGT AGT TCA CAG TCA GCA CGG	3443-R ACC CTC AAG CTT TTA CTA AGA AGC GTA GTC CGG	4164-R CCG GAA CGT CGT ACG GGT AAT GGT GAT GGT GAT GGT GGT TCA CAG TCA GCA CCG 4165-R GCC CCG GAA GCT TTT ATT AAG AAG CGT AGT CCG GAA CGT CGT ACG GGT

#### V. 4. 3. PCR de plásmidos pComb3x.

Realizamos PCR de los plásmidos pComb3x con los distintos juegos de oligonucleótidos. Las condiciones de la PCR se especifican en la tabla III.

Tabla III. Condiciones de la PCR para obtener los diversos productos empleados en los ensayos posteriores.

Núm. de ciclos	Temperatura °C	Tiempo
1	94	3 minutos
5	94	30 segundos
	40	30 segundos
	72	30 segundos
15	94	30 segundos
	55	30 segundos
	72	30 segundos
1	72	5 minutos

#### V. 4. 4. Subclonación en el vector pTrec99a.

Digerimos los productos de PCR purificados y el vector pTrec99a con las enzimas Nco I y Hind III (New England BioLabs) y los purificamos de nuevo (kit Roche) para ligarlos con ligasa y solución amortiguadora para ligasa (Fermentas).

#### V. 4. 5. Transformación en células MC1061.

Electroporamos los productos de la ligación en *E. coli* MC1061 a 1.6 kV, permitimos que las células se recuperaran en 1 mL de medio LB líquido sin antibióticos durante 1 hora a 30°C y 300 rpm. Sembramos 100 µL en placas de LB agar con ampicilina (200 µg/mL) y las incubamos toda la noche a 30°C.

#### **V. 4. 6. PCR de colonia y extracción de plásmidos.**

Realizamos PCR de colonia (mismas condiciones de tabla III) para aislar las clonas con inserto. Inoculamos las colonias con inserto en 5 mL de medio LB líquido con ampicilina (200 µg/mL) crecimos los cultivos a saturación para extraer el plásmido (kit Roche).

#### **V. 4. 7. Secuenciación y elección de clones.**

Secuenciamos los plásmidos producto de la ligación y se alinearon las secuencias de aminoácidos con el programa MacVector versión 7.2.2 para descartar los clones que fueran idénticos.

#### **V. 4. 8. Transformación en células Fa114.**

Electroporamos los plásmidos en la cepa Fa114 de *E. coli* a 1.6 kV y permitimos que se recuperaran las células en 1 mL de LB líquido. Para aislar colonias, sembramos 10-20 µL de una dilución 1:100 en placas de LB agar con ampicilina (200 µg/mL) y kanamicina (25 µg/mL), las cuales se incubaron toda la noche a 30°C. Transformamos este mismo plásmido en células Fa114-TyrA para los ensayos de complementación en medio mínimo.

#### **V. 4. 9. Expresión del anticuerpo.**

Para producir proteína, inoculamos las colonias aisladas en medio líquido LB con ampicilina (200 µg/mL), kanamicina (25 µg/mL) e IPTG (0.1-0.2 mM). Incubamos estos cultivos durante 20-24 horas a 30°C y 300 rpm. Extrajimos la proteína de la pastilla resuspendida en PBS 1x mediante sonicación.

#### **V. 4. 10. ELISA de reconocimiento.**

Para esta prueba utilizamos TSA unido a BSA (en vez de tiroglobulina) como antígeno. Diluimos el antígeno 1:200 en PBS 1x y cubrimos los pozos de una placa de ELISA con 50  $\mu$ L. En otra placa agregamos 50  $\mu$ L de BSA 3% para usarla como control negativo. Incubamos las placas por una hora a 37°C o toda la noche a 4°C. Posteriormente eliminamos el antígeno de la placa y lavamos 3 veces con TPBS. Para bloquear la placa, cubrimos todos los pozos con 150  $\mu$ L de BSA 3% e incubamos toda la noche a 4°C. Lavamos las placas y aplicamos las muestras más 50  $\mu$ L de BSA 1%-PBS 1x, las incubamos toda la noche a 4°C. Lavamos la placa 3 veces e incubamos con 50  $\mu$ L de anti-HA durante una hora a 37°C, después volvimos a lavar y aplicamos un segundo anticuerpo anti-ratón fosfatasa alcalina (Sigma, A-3562). El lavado más importante es el que se hace antes de revelar, por lo que lavamos la placa al menos 4 veces. Revelamos con 50  $\mu$ L de p-nitrofenilfosfato (N2765, sigma) 1 mg/mL en buffer DEA (ICN, 980831). Leímos la absorbancia a 405 nm a los 20 minutos de incubación a 37°C.

#### **V. 4. 11. Ensayos de actividad de los anticuerpos *in vitro*.**

Realizamos el ensayo de cinética enzimática para actividad corismato mutasa basados en los ensayos previos de Hilvert *et al.* (1988) con algunas modificaciones. Colocamos 30  $\mu$ L del extracto crudo de proteína, 10  $\mu$ L de una solución de corismato en PBS1x y 10  $\mu$ L de PBS 1x (por triplicado para cada muestra). Verificamos la desaparición del corismato a 275 nm durante aproximadamente 60 minutos a intervalos de 5 segundos.

#### **V. 4. 12. Ensayos de actividad de los anticuerpos *in vivo*.**

Tomamos colonias aisladas producto de la transformación en la cepa Fa114-TyrA de *E. coli*. e inoculamos 3 mL de LB líquido con ampicilina (200  $\mu$ g/mL) y (kanamicina 25  $\mu$ g/mL), incubamos toda la noche a 30°C y 300 rpm. Tomamos 0.5 mL de este cultivo y precipitamos las células a 13,000 rpm por 10 minutos. Lavamos el paquete celular 3 veces

con 0.5 mL de medio mínimo 1x. Tomamos 20  $\mu$ L de la última resuspensión para inocular 2 mL de medio mínimo 10x e incubamos a 30°C y 300 rpm de 7 a 10 días. Verificamos el crecimiento celular mediante absorbancia ( $DO_{600}$ ) de una a dos veces al día.

## VI. RESULTADOS .

### VI. 1. Reamplificación de la biblioteca y bioselección.

Obtuvimos un título de reamplificación de la biblioteca de  $2.92 \times 10^5$  UFC y está graficado en la figuras 9 y 10 como ronda "0" (R0), para compararlos con las rondas de selección subsecuentes.

Debido a que no se sabía la concentración en la que se encontraba el antígeno (TSA + tiroglobulina), usamos dos diluciones de éste en la selección: 1:100 y 1:500 (TSA en PBS1X). Los fagos obtenidos de la reamplificación son los que se usaron en las rondas de selección subsecuentes para ambas diluciones. Realizamos cuatro rondas de selección de fagos específicos para el TSA (R1, R2, R3 y R4). En la figura 9 se muestran los títulos obtenidos para la D100, donde puede observarse que los títulos descienden drásticamente en la R1 como es de esperarse al someter los fagos a un proceso de selección específico mediante lavados astringentes. En la R2 observamos que el título desciende aún más por el mismo proceso de selección y astringencia, y ya en R3 observamos un incremento debido a que los fagos específicos para el TSA se han reamplificado. En la figura 10 se muestran los títulos obtenidos en las rondas de selección para la D500. Los títulos obtenidos son similares a los de D100, disminuyeron en la R1 y R2, e incrementaron en la R3. Los títulos que se obtuvieron en la R4 para ambas diluciones se encuentran en el mismo orden:  $5.04 \times 10^4$  para D100 y  $4.89 \times 10^4$  para D500.

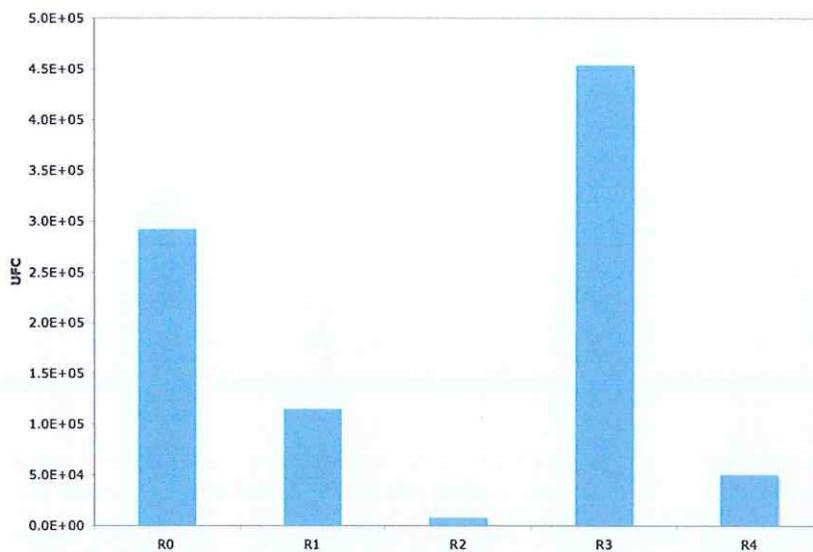


Figura 9. Valores de titulación de la reamplificación y de las 4 rondas de selección para la dilución 1:100 (D100).

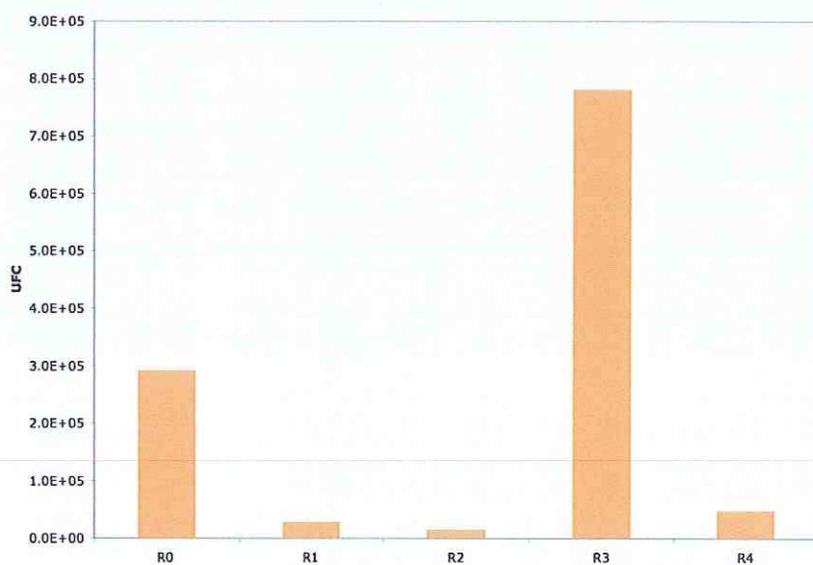


Figura 10. Valores de titulación de la reamplificación y las 4 rondas de selección para la dilución 1:500 (D500).

## VI. 2. Expresión de los fragmentos vNAR en la cepa TOP10F' de *E. coli*.

### VI. 2. 1. PCR de colonia.

En la PCR los oligonucleótidos Ompseq y Gback producen fragmentos de ~500 pb aunque la región vNAR es de ~450 pb, la razón es que estos oligonucleótidos tienen un tamaño de 22 y 24 pb respectivamente, y en pComb3x se unen en las regiones laterales donde se inserta el fragmento vNAR.

Analizamos 48 colonias de la D100 (R3 y R4) y todas poseían el inserto de ~500 pb. De los 46 clones analizados de la D500 (R3 y R4), 44 contenían el inserto. Los dos clones de la D500 que resultaron negativas al inserto, son los clones 06 y 010, correspondientes a la ronda 4 (Tabla IV) y se descartaron para experimentos posteriores. El nombre de los clones correspondientes a la D500 tiene un cero a la izquierda.

Tabla IV. Clones analizados mediante PCR para al inserto de vNAR.

	D100	D500
Ronda 4	20 (+) 0 (-)	18 (+) 2 (-)
Ronda 3	28 (+) 0 (-)	26 (+) 0 (-)
TOTAL	48(+)	44(+)

### VI. 2. 2. Extracción y PCR de plásmidos.

Logramos obtener el plásmido de los clones con inserto vNAR: 48 plásmidos D100 y 44 plásmidos D500. El producto de la extracción de plásmido se usó para la PCR. Al reamplificar los fragmentos vNAR, obtuvimos suficiente ADN para la secuenciación y los

experimentos de digestión con la enzima BstO I. Las variaciones en los fragmentos obtenidos mediante los cortes en las secuencias de ADN por esta enzima nos permitiría identificar fácilmente clones con secuencias diferentes.

### VI. 2. 3. Análisis de los fragmentos vNAR mediante la enzima BstO I.

Digerimos 20 productos de PCR con la enzima BstO I. Elegimos 10 clones D100 y 10 clones D500, todos correspondientes a la ronda 4. Se visualizaron los productos de la digestión en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

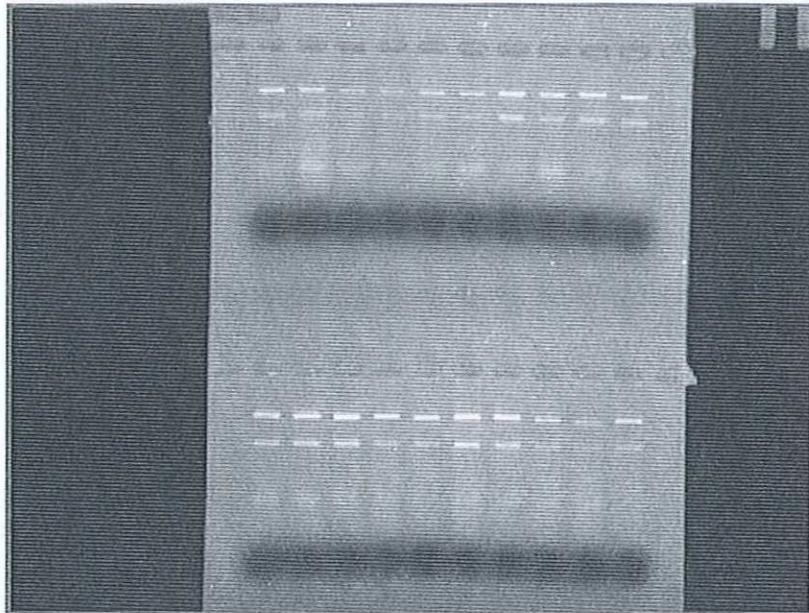


Figura 11. Gel de agarosa al 4% que muestra los fragmentos resultantes de la digestión de plásmidos de la ronda 4 con la enzima BstO I. En los carriles superiores se encuentran los fragmentos de los plásmidos D100, del 1 al 10; en los carriles de la parte inferior están los plásmidos D500 digeridos, del 01 al 012 (excepto 06 y 010). No hubo diferencias en el patrón de corte para los diferentes clones.

En la figura 11 observamos que no hay variación en el patrón de corte de la enzima para los plásmidos de los clones. Esta diferencia nula en el patrón de corte, se debe a que existe poca o ninguna diferencia entre las secuencias de las diversas muestras, por lo tanto procedimos a diferenciarlas mediante secuenciación.

#### **VI. 2. 4. Secuenciación y elección de clones.**

Secuenciamos 20 clones de la ronda 4 (10 clones D100 y 10 clones D500). En los clones D100 encontramos poca diversidad. De los 10 clones analizadas D100, solamente el clon 6 posee una secuencia distinta al clon G4. El clon G4 fue aislado de un trabajo previo (Beltrán-López, 2006) en el cual se seleccionaba contra un antígeno diferente al que usamos en el presente trabajo y su secuencia fue usada en los alineamientos con nuestros clones para verificar que se trataba de un fragmento vNAR.

De los 10 clones D500 secuenciados, seleccionamos a 01, 02, 04 y 07, ya que los demás también mostraron similitud con G4. Conservamos el clon 011 (cuya secuencia sólo difiere en un aminoácido de G4) para verificar si reconocía a nuestro antígeno. En la figura 12 se muestran las diferencias en las secuencias de aminoácidos de estos cinco clones y el clon 6-D100.

El protocolo general es buscar clones con afinidad por el antígeno en la última ronda de selección, y muchas veces, cuando se encuentra poca variación, se procede a analizar los clones de rondas inferiores. En este caso, encontramos pocos clones diferentes en la ronda 4 de ambas diluciones, por lo que se procedió a realizar la búsqueda en la ronda 3.

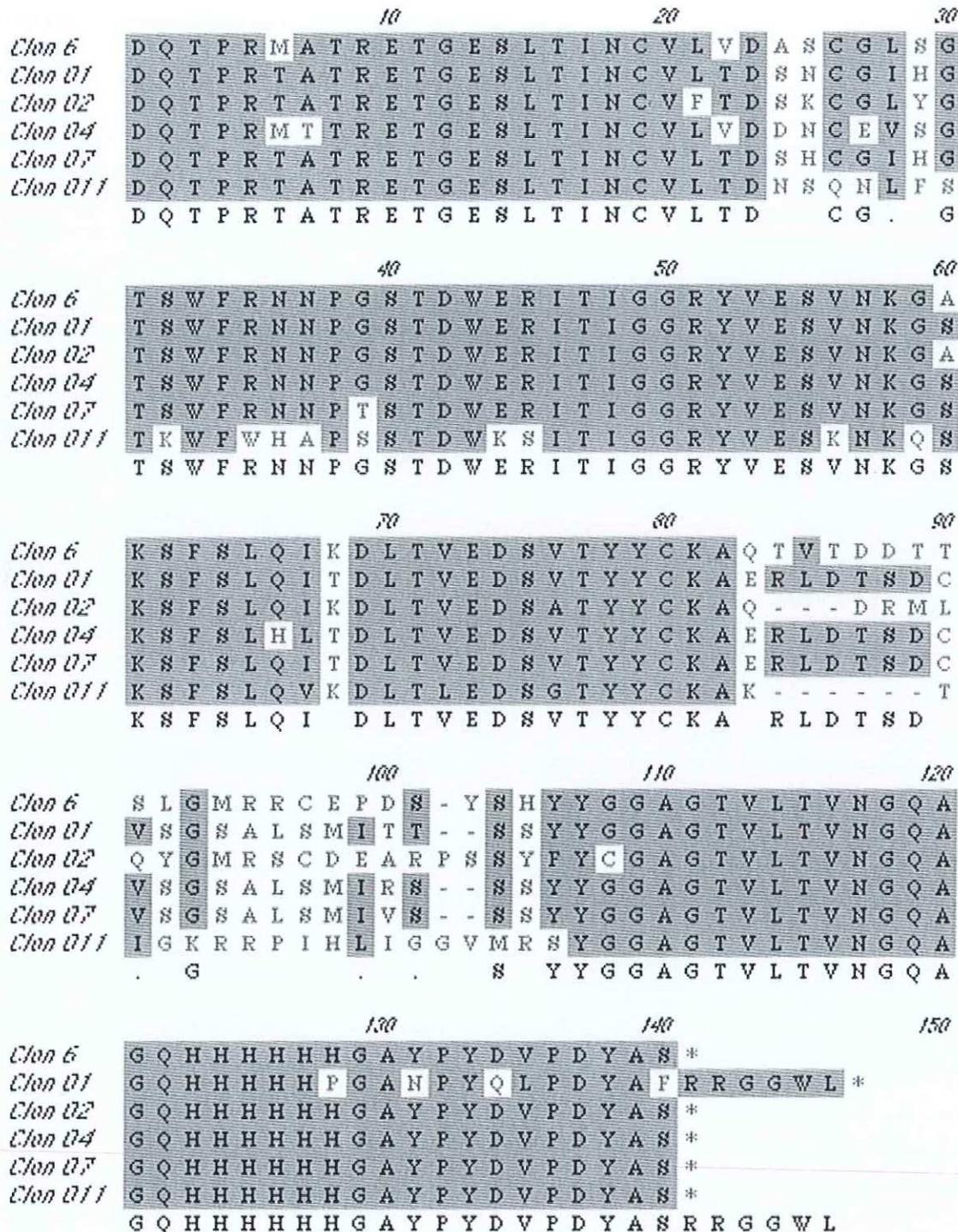


Figura 12. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la ronda 4. El clon 6 proviene de la selección con D100, mientras que los clones 01, 02, 04, 07 y 011 corresponden a la selección con D500.

## VI. 2. 5. ELISA de expresión.

Para producir proteína y analizar el nivel de expresión mediante ELISA, elegimos 6 clones de la ronda 4 basados en las secuencias (figura 12). De los clones analizados de la ronda 4, solamente los clones 6 y 011 sobrepasan el nivel de expresión del control negativo (figura 13). Para las pruebas de ELISA de expresión el control negativo es el extracto periplásmico de células TOP10F' sin inserto, mientras que el control positivo es el extracto periplásmico de un clon aislada en un trabajo previo, el cual expresa adecuadamente el anticuerpo.

Debido a la poca variabilidad que observamos en las secuencias de esta ronda y a los bajos niveles de expresión de sus clones, analizamos la expresión en clones de la ronda 3, de los cuales no conocíamos las secuencia, pero sabíamos que tenían el inserto de vNAR. Analizamos los niveles de expresión de 28 clones D100 (figuras 14 y 15) y 26 clones D500 (figuras 16 y 17).

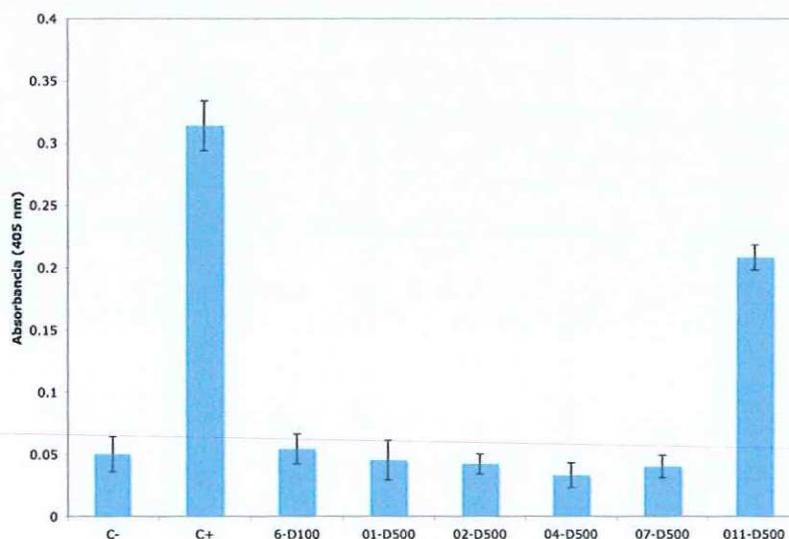


Figura 13. ELISA de expresión de los fragmentos vNAR de 6 clones de la ronda 4. Las barras representan los datos de absorbancia que obtuvimos de cada clon y las líneas verticales representan la desviación estándar (C-, control negativo; C+, control positivo).

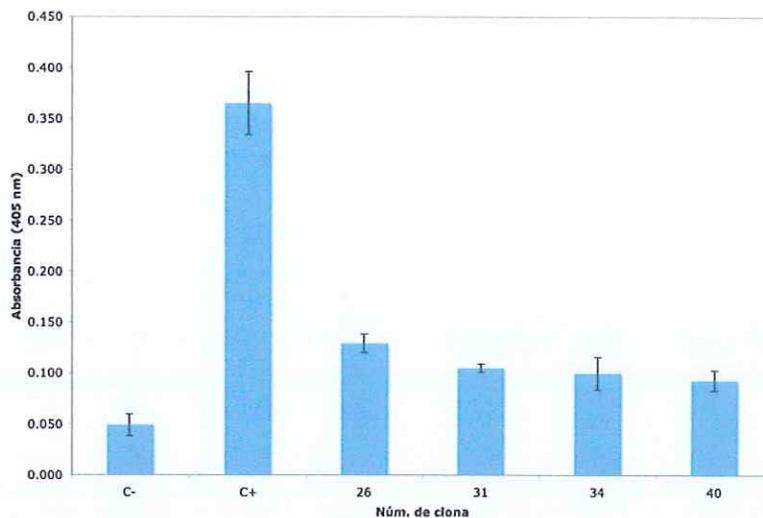


Figura 14. ELISA de expresión de los fragmentos vNAR de las clonas R3-D100. Las barras representan la media de la absorbancia correspondiente a cada clon y las líneas verticales representan la desviación estándar.

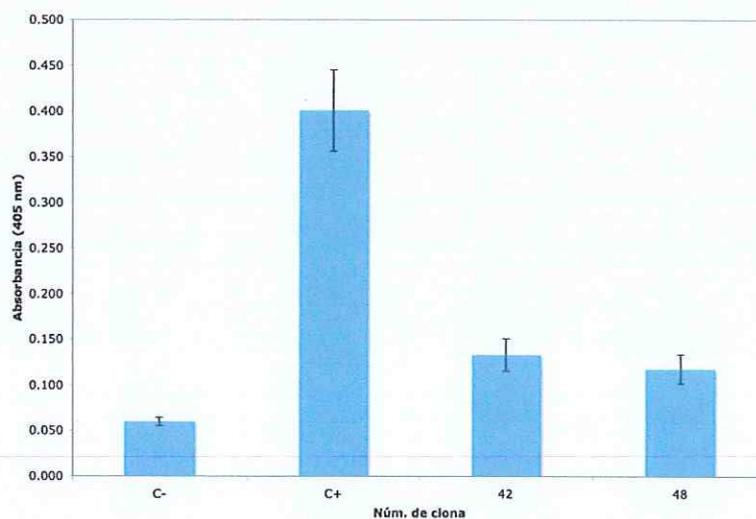


Figura 15. ELISA de expresión de los fragmentos vNAR de las clonas R3-D100. Las barras representan la media de la absorbancia correspondiente a cada clon y las líneas verticales representan la desviación estándar.

De los 28 clones D100, solamente 6 mostraban niveles superiores al control negativo y fueron incluidos en las gráficas (figuras 14 y 15). Están en dos gráficas ya que se realizaron en placas de ELISA diferentes, y por lo tanto, los controles y las condiciones del experimento pueden variar. De acuerdo a estos resultados, elegimos solamente a los clones: 26, 31, 34, 40, 42 y 48 para experimentos posteriores.

De la D500, analizamos los extractos proteicos de 26 clones con el inserto vNAR (figura 16 y 17). La razón de que aparezcan en dos gráficas, es la misma que para las D100: son dos experimentos. Solamente incluimos en la gráfica 13 clones, los cuales exhiben un nivel de expresión mayor al control negativo: 029, 031, 032, 033, 034, 037, 038, 039, 040, 041, 042, 043 y 045. Estos clones, son también los que conservamos para experimentos posteriores.

Comprobamos, mediante el ELISA de expresión, los bajos niveles de expresión de nuestros clones, comparados con el control positivo. Lo más recomendable era continuar la búsqueda de otros clones que expresaran mejor el fragmento vNAR o buscar otro sistema de expresión.

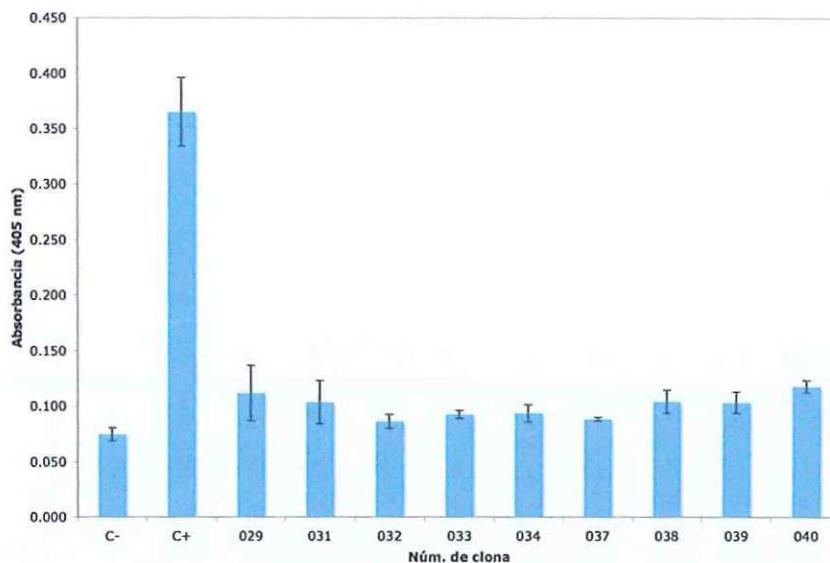


Figura 16. ELISA de expresión de los fragmentos vNAR de las clonas R3-D500. Las barras representan la media de la absorbancia correspondiente a cada clon y las líneas verticales representan la desviación estándar.

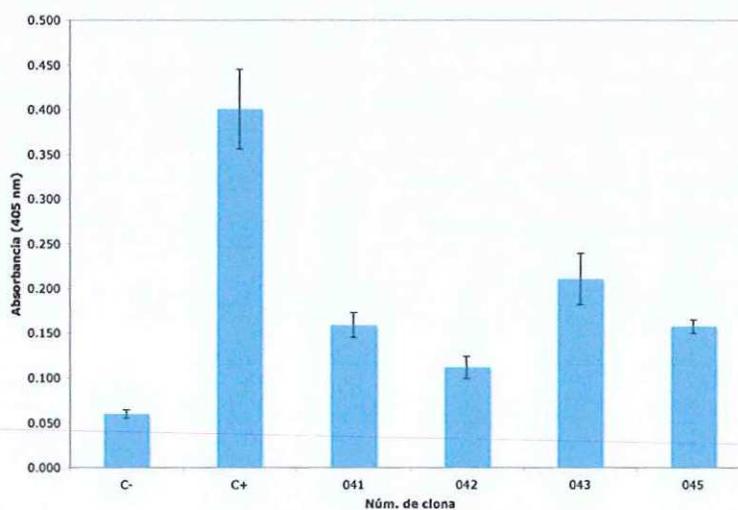


Figura 17. ELISA de expresión de los fragmentos vNAR de las clonas R3-D500. Las barras representan la media de la absorbancia correspondiente a cada clon y las líneas verticales representan la desviación estándar.

## VI. 2. 6. ELISA de reconocimiento.

A pesar de los bajos niveles de expresión obtenidos, realizamos el ELISA de reconocimiento, para observar si era posible que el anticuerpo, de escasa expresión, era capaz de reconocer al antígeno. En la figura 18 graficamos los datos del reconocimiento, pero no graficamos los valores de reconocimiento a BSA ya que todos eran cero. De acuerdo a experiencias previas en nuestro laboratorio con otros anticuerpos vNAR, podemos decir que el reconocimiento de nuestros clones por el antígeno no es adecuado para seguirlos utilizando.

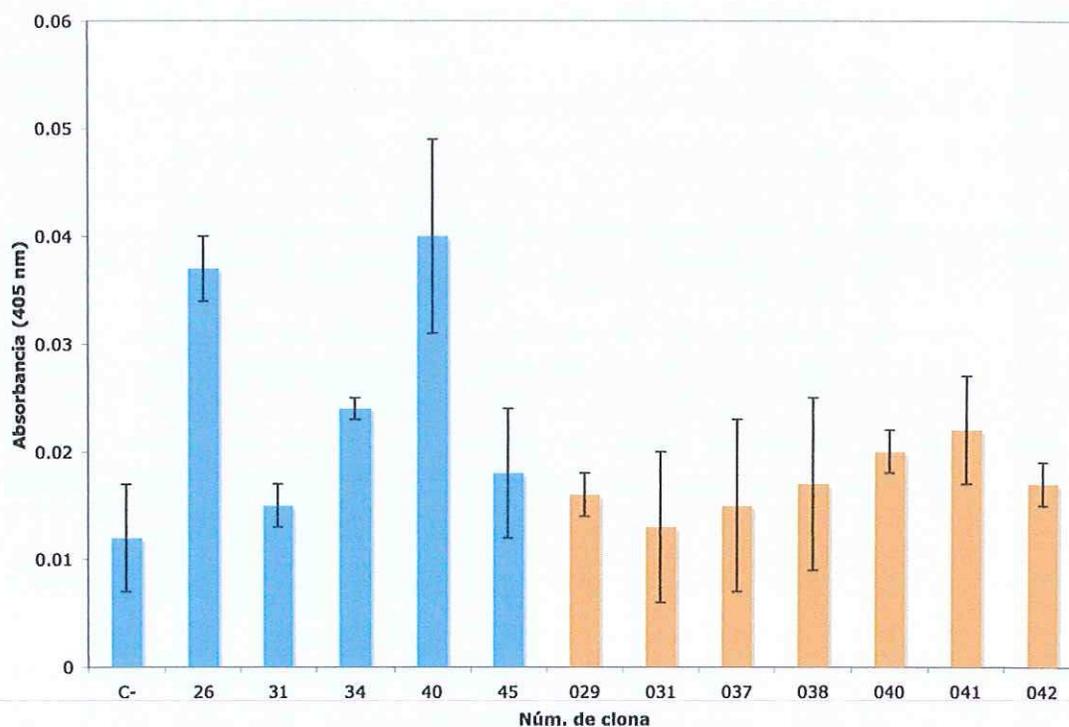


Figura 18. ELISA de reconocimiento de las clonas de la ronda 3 correspondiente a ambas diluciones. Las barras azules representan la media de la absorbancia correspondiente a los clones D100, las barras anaranjadas representan la media de la absorbancia correspondiente a los clones D500 y las líneas verticales representan la desviación estándar. No se graficaron los valores de reconocimiento a BSA ya que todos eran cero.

### VI. 3. Expresión de los fragmentos vNAR en la cepa Fa114 de *E. coli*.

Los niveles de expresión y el reconocimiento por el antígeno de los fragmentos vNAR expresados en la cepa TOP10F' no fueron eficientes, por lo que determinamos seguir otra estrategia para expresar nuestros anticuerpos. Por otro lado, el plásmido pTrc99a (figura 19) (Amann *et al.*, 1988) y la cepa Fa113 (Bessette *et al.*, 1999) son útiles en la expresión citoplásmica de fragmentos de anticuerpos en *E. coli* y se usan comúnmente con estos propósitos. En esta segunda estrategia de expresión, usamos la cepa Fa114 que es un derivado de Fa113 para expresar los fragmentos vNAR. A diferencia de Fa113, la cepa Fa114 no produce la enzima corismato mutasa ni preferato deshidrogenasa.

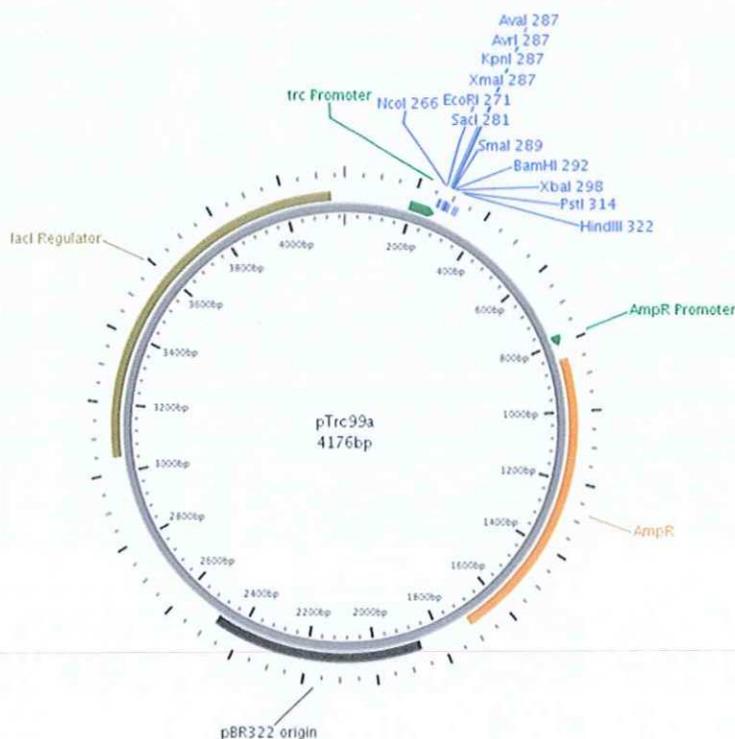


Figura 19. Mapa genético del vector pTrc99a donde con letras azules se indican los sitios de restricción de este vector. Tomada de

[http://2008.igem.org/Team:Heidelberg/Notebook/Sensing\\_Group/Cloning](http://2008.igem.org/Team:Heidelberg/Notebook/Sensing_Group/Cloning)

### VI. 3. 1. Extracción de plásmidos.

Extrajimos exitosamente los plásmidos pComb3x de la cepa de expresión TOP10F', se corroboró, mediante gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio (0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), la pureza y cantidad aproximada de ADN. De la ronda 4, extrajimos los plásmidos de los clones 6, 01, 02, 04, 07 y 011, de acuerdo a los resultados de la secuenciación. De la ronda 3, extrajimos plásmidos de 10 clones D100 y 20 clones D500. Ya hemos observado en los alineamientos de secuencias que la variabilidad en los clones de la ronda 4 es baja, y por esta razón no se analizaron más clones de esa ronda. Además, sabemos que en la D100, también es menor la variabilidad que en la D500, por lo cual sólo se extrajeron los plásmidos de la mitad de clones D100 que D500.

Tabla V. Plásmidos pComb3x extraídos para subclonación en pTrec99a.

	D100	D500
R4	6	01
		02
		04
		07
		011
R3	23	023
	40	028
	41	029
	42	030
	43	031
	44	032
	45	033
	46	034
	47	035
	48	036
		037
		038
		039
		040
		041
		042
		043
		044
		045
		046

### **VI. 3. 2. Secuenciación y elección de clones.**

Analizamos las secuencias de 10 clones D100 y 20 clones D500. De las 10 clonas D100 analizadas, solamente 2 de ellas (clonas 23 y 45) presentan el vNAR correctamente. Las otras 8 clonas se descartaron ya que en sus secuencias, algunas de ellas presentaban codones de terminación, el gen de vNAR estaba incompleto o eran mezclas. Las secuencias de los aminoácidos de los clones 23 y 45 pueden observarse en la figura 20.

De los clones D500, elegimos 6 clones D500 del total de 20 analizadas. Solamente estos 6 clones presentan el vNAR correctamente, y son: 023, 029, 040, 042, 043 y 045 (Figura 20).

De acuerdo a los resultados de la secuenciación, elegimos las secuencias de 2 clones D100 y 6 clones D500. Estos 8 clones y los 6 previamente seleccionados de los experimentos de TOP10F' fueron usados para los ensayos de reconocimiento.

		10	20	30																										
<i>Clon 23</i>	D	Q	T	P	R	M	A	T	R	E	T	G	E	S	L	T	I	N	C	V	L	V	D	A	S	C	G	L	S	G
<i>Clon 45</i>	D	Q	T	P	R	M	A	T	R	E	T	G	E	S	L	T	I	N	C	V	L	V	D	A	S	C	G	L	S	G
<i>Clon 023</i>	D	Q	T	P	R	T	A	T	R	D	P	G	E	S	L	T	I	T	C	V	L	L	H	S	S	C	G	L	Y	G
<i>Clon 029</i>	D	Q	T	P	R	M	A	T	R	A	T	G	E	S	L	T	I	S	C	V	F	L	D	P	V	C	E	F	T	G
<i>Clon 040</i>	D	Q	T	P	R	T	A	T	R	D	P	G	E	S	L	T	I	T	C	V	L	L	H	S	S	C	G	L	Y	G
<i>Clon 042</i>	E	Q	T	P	R	M	A	A	R	G	T	G	E	S	L	T	I	N	C	V	L	S	D	A	S	C	G	L	S	G
<i>Clon 043</i>	D	Q	T	P	R	T	A	T	R	E	T	G	E	S	L	T	I	N	C	V	F	T	D	S	H	C	G	I	H	G
<i>Clon 045</i>	D	Q	T	P	R	T	A	T	R	E	T	G	E	S	L	T	I	N	C	V	F	T	D	S	H	C	G	L	S	G
	D	Q	T	P	R	A	T	R	.	T	G	E	S	L	T	I	N	C	V	L	.	D	S	C	G	L	.	G		
		40	50	60																										
<i>Clon 23</i>	T	S	W	F	R	N	N	P	G	S	T	D	W	E	R	I	T	I	G	G	R	Y	V	E	S	V	N	K	G	A
<i>Clon 45</i>	T	S	W	F	R	N	N	P	G	S	T	D	W	E	R	I	T	I	G	G	R	Y	V	E	S	V	N	K	G	A
<i>Clon 023</i>	T	S	W	F	R	K	K	A	G	S	T	E	W	E	R	M	T	I	G	G	R	Y	V	E	S	V	K	K	G	A
<i>Clon 029</i>	T	R	W	F	R	S	N	P	G	S	P	D	W	E	R	I	T	I	G	G	R	Y	V	E	S	V	N	K	G	A
<i>Clon 040</i>	T	S	W	F	R	T	T	P	G	S	T	E	W	E	R	I	T	I	G	G	R	Y	V	E	S	V	K	K	G	A
<i>Clon 042</i>	T	S	W	F	R	N	N	P	G	S	T	D	W	E	R	I	T	V	A	G	R	Y	V	E	S	V	N	K	G	A
<i>Clon 043</i>	T	S	W	F	R	N	N	P	G	S	T	D	W	E	R	I	T	I	G	G	R	Y	V	E	S	V	N	K	G	A
<i>Clon 045</i>	T	S	W	F	R	N	N	P	G	E	T	K	W	E	R	I	R	I	D	G	R	Y	F	Q	S	V	N	Q	D	A
	T	S	W	F	R	N	N	P	G	S	T	D	W	E	R	I	T	I	G	G	R	Y	V	E	S	V	N	K	G	A
		70	80	90																										
<i>Clon 23</i>	K	S	F	S	L	Q	I	K	N	L	T	V	E	D	S	V	P	Y	Y	C	K	A	Q	T	G	Y	Y	S	T	G
<i>Clon 45</i>	K	S	F	S	L	Q	I	K	D	L	T	V	E	D	S	V	T	Y	Y	C	K	A	Q	T	G	P	D	T	T	G
<i>Clon 023</i>	N	S	F	S	L	Q	I	K	D	L	T	V	E	D	S	V	T	F	Y	C	K	A	Q	G	R	I	D	N	-	-
<i>Clon 029</i>	K	S	F	S	L	Q	I	K	D	L	T	V	E	D	S	V	T	F	Y	C	K	A	Q	T	G	L	A	R	-	-
<i>Clon 040</i>	N	S	F	S	L	Q	I	K	D	L	T	V	E	N	S	V	T	F	Y	C	K	A	Q	G	R	I	D	N	-	-
<i>Clon 042</i>	K	S	F	S	L	Q	I	K	D	L	T	V	E	D	S	V	T	Y	Y	C	K	T	Q	G	A	Y	L	T	A	Y
<i>Clon 043</i>	K	S	F	S	L	Q	I	T	D	L	T	V	E	D	S	V	T	Y	Y	C	K	A	E	R	L	D	T	S	D	C
<i>Clon 045</i>	K	S	F	S	L	Q	I	K	D	L	T	V	E	G	S	V	T	Y	Y	C	K	A	Q	G	I	R	R	-	-	-
	K	S	F	S	L	Q	I	K	D	L	T	V	E	D	S	V	T	Y	Y	C	K	A	Q	.						
		100	110	120																										
<i>Clon 23</i>	L	G	F	G	S	C	D	D	P	F	Y	S	H	Y	Y	G	G	A	G	T	V	L	T	V	N	G	Q	A	G	Q
<i>Clon 45</i>	L	V	F	G	-	G	D	D	R	S	Y	S	H	Y	Y	D	G	A	G	T	V	L	T	V	N	G	Q	A	G	Q
<i>Clon 023</i>	C	D	C	K	C	D	D	P	V	R	S	K	T	Y	Y	D	G	A	G	T	V	L	T	V	N	G	Q	A	G	Q
<i>Clon 029</i>	-	-	R	E	N	P	Y	N	C	D	G	S	H	Y	Y	G	G	A	G	T	V	L	T	V	N	G	Q	A	G	Q
<i>Clon 040</i>	C	D	C	K	C	D	D	P	V	R	S	K	T	Y	Y	D	G	A	G	T	V	L	T	V	N	G	Q	A	G	Q
<i>Clon 042</i>	P	G	S	C	D	P	G	P	Y	S	S	S	S	Y	Y	D	G	A	G	T	V	L	T	V	N	G	Q	P	G	Q
<i>Clon 043</i>	I	S	G	S	A	L	S	M	I	T	T	S	S	Y	Y	G	G	A	G	T	V	L	T	V	N	G	Q	A	G	Q
<i>Clon 045</i>	-	-	-	-	-	-	-	C	E	E	G	F	S	Y	G	G	A	G	T	V	L	T	V	N	G	Q	A	G	Q	
		D	S	Y	Y	G	A	G	T	V	L	T	V	N	G	Q	A	G	Q											
		130	140	150																										
<i>Clon 23</i>	H	H	H	H	H	H	G	A	Y	P	Y	D	V	P	D	Y	A	S	*											
<i>Clon 45</i>	H	H	H	H	H	H	G	A	Y	P	Y	D	V	P	D	Y	A	S	*											
<i>Clon 023</i>	H	H	H	H	H	H	G	A	Y	P	Y	D	V	P	D	Y	A	S	*											
<i>Clon 029</i>	H	H	H	H	H	H	G	A	Y	P	Y	D	V	P	D	Y	A	S	*											
<i>Clon 040</i>	H	H	H	H	H	H	G	A	Y	P	Y	D	V	P	D	Y	A	S	*											
<i>Clon 042</i>	H	H	R	H	H	H	G	P	Y	P	Y	H	L	P	D	Y	A	S	*											
<i>Clon 043</i>	H	H	H	H	H	H	G	A	Y	P	Y	D	V	P	D	Y	A	S	*											
<i>Clon 045</i>	H	H	H	H	H	H	G	A	Y	P	Y	D	V	P	D	Y	A	S	*											
	H	H	H	H	H	H	G	A	Y	P	Y	D	V	P	D	Y	A	S												

Figura 20. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de clones de la ronda 3. Los clones 23 y 45 corresponden a la D100, mientras que los clones 023, 029, 040, 042, 043 y 045, son los que corresponden a D500.

### VI. 3. 3. Construcción de oligonucleótidos y PCR.

Realizamos PCR de plásmidos pComb3x con los distintos juegos de oligonucleótidos. Estos oligonucleótidos, insertan sitios de restricción Nco I y Hind III para ligarlos al plásmido pTrc99a. Además, dependiendo del juego de oligonucleótidos utilizados, estos oligonucleótidos insertan en el producto una etiqueta de HA para los ensayos de ELISA, cola de 6 histidinas (H6) para la purificación o ambas características (Tabla VI). La intención de ligarlos al plásmido pTrc99a, es que este posee un promotor fuerte y esperábamos lograr un nivel de expresión mayor.

Los productos H6 y sin HA, se realizaron con la intención de usarlos en las pruebas de cinética y complementación, para que no existiera interferencia en la función debido a la estructura de los anticuerpos. Los productos con HA, pero sin H6 se realizaron para verificar su actividad mediante ELISA de reconocimiento. Debido a los resultados obtenidos del ELISA de reconocimiento (presentados más adelante), fue necesario elaborar otro oligonucleótido para agregar cola de histidinas a estos productos, además de HA, para purificar y concentrar los anticuerpos.

Con estos oligonucleótidos, reamplificamos los plásmidos de los clones que se eligieron mediante la secuenciación: 6 clones R4 (figura 12) y 8 clones R3 (figura 20). Verificamos que el ADN se había amplificado y que el tamaño correspondía a los productos esperados, mediante la visualización de los productos en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio (0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

Tabla VI. Tipo de oligonucleótidos, productos que se obtienen mediante la PCR con ellos y ensayo en que pueden ser empleados.

Tipo de oligonucleótido	Producto obtenido	Ensayo en que se emplean
-HA, -H6	vNAR	Cinética enzimática y complementación
+HA, -H6	vNAR GAYPYDVDPDYAS	Reconocimiento
+HA, +H6	vNAR GAYPYDVDPDYAS HHHHHH	Reconocimiento y purificación

#### VI. 3. 4. Subclonación en el vector pTrc99a y transformación en MC1061.

Verificamos mediante el tamaño de las bandas en un gel de agarosa la digestión de los productos de PCR y el vector, así como la ligación de estos productos en el plásmido pTrc99a. Este producto fue transformado en la cepa MC1061. Es necesario transformar a la cepa MC1061 antes que a Fa114 debido a que en esta última el sistema de restricción-modificación de cepas silvestre se encuentra funcionando, por lo que los plásmidos necesitan primero protegerse con metilación para que la cepa no lo reconozca como ADN exógeno y active el sistema de degradación.

Por lo anterior, primero transformamos el plásmido ligado en MC1061, y una vez que obtuvimos colonias aisladas producto de la transformación, realizamos PCR de colonia para verificar la inserción del gen (con las mismas condiciones de reacción de la tabla III y con los oligonucleótidos correspondientes). Una vez verificada la existencia del inserto, extrajimos los plásmidos y los conservamos a 4°C para su posterior transformación en Fa114. En la tabla VII, se enlistan las clonas obtenidas mediante los diversos juegos de oligonucleótidos, así como la ronda de selección y dilución a la que pertenecen.

Tabla VII. Clones obtenidos mediante el PCR de plásmido con los respectivos juegos de oligonucleótidos. En anaranjado, los clones pertenecientes a la R4 y en verde los de la R3 (HA: hemaglutinina, H6: cola de 6 histidinas). No se obtuvieron clones -HA,-H6 para el clon 040 (N).

	-HA, -H6	+HA, -H6	+HA, +H6
<b>D100</b>	6C	6-1	
		6-3	
<b>D500</b>	01B	6-4	
		6-5	
		01-1	
		01-2	
	02A	01-3	
		01-4	
		02-1	
		02-2	
		02-3	
	04A	02-4	
		02-5	
		04-1	
		04-2	
		04-3	
	07A 07B 07C	04-4	
04-5			
07-1			
07-2			
07-3			
011C	07-4		
	07-5		
	011-1	011-23	
	011-2	011-25	
	011-3	011-27	
<b>D100</b>	011-4		
	011-5		
	23-1	23	23-23
	23-2		23-27
	45-1	45-1	23-28
	45-2	45-2	
<b>D500</b>	023-3	023-1	
	029-2	023-3	
		029-1	
	N	029-3	
		040-1	
	042-1	040-2	
		042-1	042-12
042-2		042-23	
		042-31	
043-1			
043-2			
045-1 045-3	043-3		
	045-1		
	045-2		
	045-3		

### **VI. 3. 5. Expresión en Fa114 y ELISA de reconocimiento.**

Para obtener las proteínas, transformamos los plásmidos correspondientes a los clones +HA, -H6 en la cepa Fa114 y realizamos el ELISA de reconocimiento de los extractos proteicos. Tal como se esperaba, la placa cubierta con BSA en vez de antígeno como primer paso, no experimentó coloración alguna en el revelado.

Analizamos mediante ELISA de reconocimiento, todos los extractos de los clones +HA, -H6 de la tabla VI. Los resultados fueron cualitativos, basándonos solamente en la coloración amarilla que debe producir un resultado positivo revelado con fosfatasa.

Como control positivo, utilizamos un anticuerpo murino (extracto celular), que previamente había reconocido el TSA/CM en pruebas de ELISA. El control negativo es el extracto de un clon que no tiene HA, y por lo tanto no debe ser reconocido por el anticuerpo anti-HA.

De los clones analizados, solamente los clones 011-2, 011-4, 011-5 y 042-2, dieron resultados positivos en las pruebas preliminares de reconocimiento. En la figura 21 observamos una placa de ELISA donde se revelaron los extractos de los clones 011-4 y 042-2, las cuales mostraron una coloración más intensa que las demás, así como el control positivo. El clon 23 se mantuvo como control negativo en los experimentos.

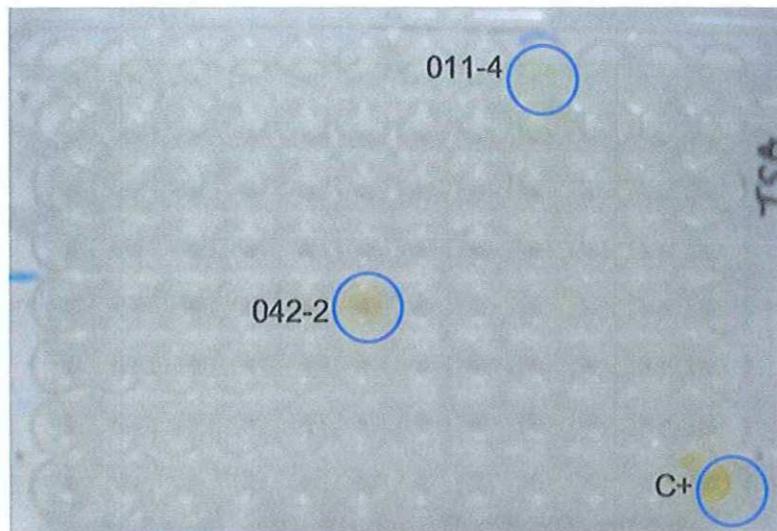


Figura 21. ELISA de reconocimiento de los clones +HA, -H6. En esta placa aparecen los extractos de los clones 011-4 y 042-2 que mostraron la coloración amarilla (clones positivos), así como el control positivo (C+).

Debido a la débil coloración positiva de estos clones, decidimos hacer el oligonucleótido reverso para agregar cola de histidinas y purificar el anticuerpo. Obtuvimos los clones +HA, +H6, que se observan en la tabla VII. Realizamos el ELISA de reconocimiento de los extractos proteicos de los clones 011-23, 042-23 y 23-23, así como del control positivo. Solamente el clon 011-23 dio resultados positivos en esta prueba (figura 22), mientras que el clon 042-23 no reconoce adecuadamente al antígeno. Entonces, sospechamos que el resultado negativo del clon 042-23 se debía a que el fragmento de vNAR no se había insertado correctamente, por lo que secuenciamos los plásmidos de los clones +HA, +H6 que se enlistan en la tabla VIII.

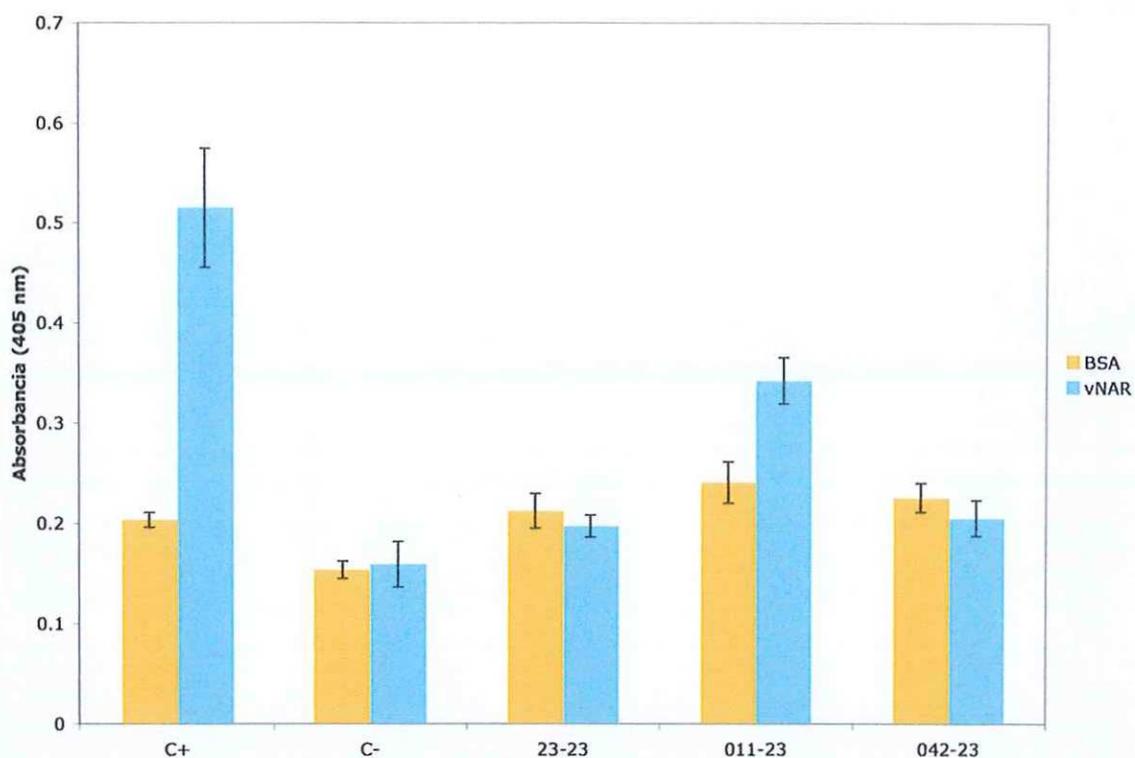


Figura 22. ELISA de reconocimiento de clones +HA, +H6. Las barras amarillas representan la media de la absorbancia correspondiente al reconocimiento por BSA, las barras azules representan la media de la absorbancia correspondiente a los fragmentos vNAR y, las líneas verticales representan la desviación estándar.

Tabla VIII. Clones secuenciados +HA, +H6.

Clones 011	Clones 042	Clones 23
011-23	042-1 042-2 042-12 042-23 042-31	23-23 23-28

Alineamos las secuencias de los clones 23, 011 y 042 de la tabla VIII con la secuencia original (la que obtuvimos cuando se extrajeron los plásmidos pComb3x). En estos alineamientos, pudimos observar que las secuencias de los clones derivadas (+HA, +H6) 011 y 23, son idénticas a las originales (salvo las modificaciones HA o H6 que pudieran tener). Mientras que en el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los clones 042 (figura 23), observamos que el clon 042-2 posee una secuencia diferente a los demás y este es precisamente el clon que mostró reconocimiento en las pruebas preliminares de ELISA. Esta diferencia en la secuencia del clon 042-2 es evidentemente, la responsable del reconocimiento por el antígeno, ya que los clones con la secuencia original de pComb3x no muestran resultados positivos en ELISA.

El siguiente paso era la purificación de los extractos celulares de los clones 23-23, 011-23 y 042-2. Ya que el clon 042-2 es resultado de una construcción que no posee cola de histidinas, construimos dos oligonucleótidos reversos (4164 y 4165, ver tabla II) para agregar cola de histidinas a este clon. Mientras tanto, tratamos de purificar los extractos correspondientes a las otras clonas mediante columnas de níquel (los resultados no se muestran), aunque no fue posible, a pesar de varias modificaciones al protocolo. Así como tampoco fue posible agregar la cola de histidinas a la clona 042-2.

	10	20	30
<i>Clon 042</i>	E Q T P R M A A R G T G E S L T I N C V L S D A S C G L S G		
<i>Clon 042-1</i>	D Q T P R T A T R G T G E S L T I N C V L V D A S C G L S G		
<i>Clon 042-2</i>	D Q T P R T A T R E T G E S L T I N C V L T D N S Q N L F S		
<i>Clon 042-12</i>	D Q T P R T A T R G T G E S L T I N C V L V D A S C G L S G		
<i>Clon 042-23</i>	D Q T P R T A T R G T G E S L T I N C V L V D A S C G L S G		
<i>Clon 042-31</i>	D Q T P R T A T R G T G E S L T I N C V L V D A S C G L S G		
	40	50	60
<i>Clon 042</i>	T S W F R N N P G S T D W E R I T V A G R Y V E S V N K G A		
<i>Clon 042-1</i>	T S W F R N N P G S T D W E R I T I G G R Y V E S V N K G A		
<i>Clon 042-2</i>	T K W F W H A P S S T D W K S I T I G G R Y V E S K N K Q S		
<i>Clon 042-12</i>	T S W F R N N P G S T D W E R I T I G G R Y V E S V N K G A		
<i>Clon 042-23</i>	T S W F R N N P G S T D W E R I T I G G R Y V E S V N K G A		
<i>Clon 042-31</i>	T S W F R N N P G S T D W E R I T I G G R Y V E S V N K G A		
	70	80	90
<i>Clon 042</i>	K S F S L Q I K D L T V E D S V T Y Y C K T Q G A Y L T A Y		
<i>Clon 042-1</i>	K S F S L Q I K D L T V E D S V T Y Y C K A Q G A Y L T A Y		
<i>Clon 042-2</i>	K S F S L Q V K D L T L E D S G T Y Y C K A K T I G K - R R		
<i>Clon 042-12</i>	K S F S L Q I K D L T V E D S V T Y Y C K A Q G A Y L T A Y		
<i>Clon 042-23</i>	K S F S L Q I K D L T V E D S V T Y Y C K A Q G A Y L T A Y		
<i>Clon 042-31</i>	K S F S L Q I K D L T V E D S V T Y Y C K A Q G A Y L T A Y		
	100	110	120
<i>Clon 042</i>	P G S C D P G P Y S S S S Y Y D G A G T V L T V N G Q P G Q		
<i>Clon 042-1</i>	P G S C D P G P Y S S S S Y Y D G A G T V L T V N Y P - - -		
<i>Clon 042-2</i>	P I H L I G G V M R S - - - Y S G A G T V L T V N Y P - - -		
<i>Clon 042-12</i>	P G S C D P G P Y S S S S Y Y D G A G T V L T V N G Q A G Q		
<i>Clon 042-23</i>	P G S C D P G P Y S S S S Y Y D G A G T V L T V N G Q A G Q		
<i>Clon 042-31</i>	P G S C D P G P Y S S S S Y Y D G A G T V L T V N G Q A G Q		
	130	140	150
<i>Clon 042</i>	H H R H H H G P Y P - - - - - Y H L P D Y A S *		
<i>Clon 042-1</i>	- - - - - Y - - - - - D V P D Y A S *		
<i>Clon 042-2</i>	- - - - - Y - - - - - D V P D Y A S *		
<i>Clon 042-12</i>	H H H H H H G P N T K N G N E R D R R I P Y Y *		
<i>Clon 042-23</i>	H H H H H H G A Y P - - - - - Y D V P D Y A S *		
<i>Clon 042-31</i>	H H H H H H G A Y P - - - - - Y D V P D Y A S **		
	H H H H H H G Y K N G N E R D Y D V P D Y A S		

Figura 23. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos del clon 042 y las secuencias obtenidas en las subclonaciones en pTrc99a.

### VI. 3. 6. Ensayos preliminares de actividad *in vitro* de los anticuerpos.

Verificamos la desaparición del corismato a una longitud de onda de 275 nm durante aproximadamente 60 minutos a intervalos de aproximadamente 5 segundos. Los datos de absorbancia obtenidos para la desaparición de corismato, nos permiten estimar la concentración molar de este sustrato, mediante el coeficiente de extinción molar del corismato ( $2,630 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ )(Kast *et al.*, 2000). Adicionalmente, verificamos que no hay desaparición del corismato al adicionar PBS 1x (figura 24). El extracto celular está resuspendido en este amortiguador de fosfatos, por lo que era necesario verificar que la concentración del corismato no descendía al agregar este componente. A pesar de que los clones 011 y 042-2 mostraban poco reconocimiento por el antígeno, si mostraron actividad catalítica (figura 24). También probamos la actividad catalítica de un extracto de células transformadas con el plásmido, pero sin inserto (resultados no mostrados). Al igual que sucede con PBS, el extracto celular es inerte al ponerse en contacto con el corismato.

Notamos que la velocidad de desaparición del corismato con el control positivo, como la velocidad de desaparición con nuestros clones están en el mismo orden (tabla IX) . El control positivo es un clon con especificidad elevada por el antígeno de acuerdo a trabajos previos (tesis de Maestría en proceso) y es el mismo que usamos en las pruebas de reconocimiento. De acuerdo a estos resultados, los clones 042-2 y 011-23, tienen mayor capacidad catalítica que el control positivo, a pesar de mostrar poco reconocimiento por el antígeno en pruebas de ELISA.

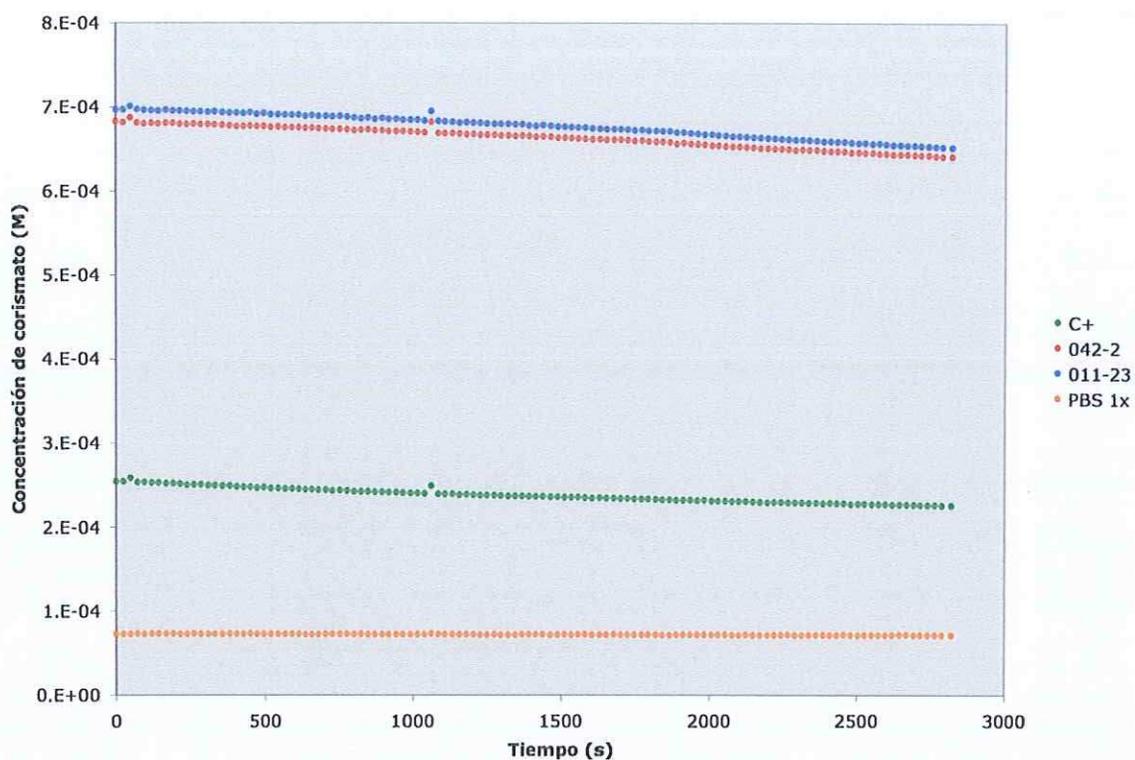


Figura 24. Cinética enzimática de los extractos celulares de las clonas 042-2 y 011-23 comparadas con el control positivo y con PBS 1x.

Tabla IX. Velocidad de desaparición del corismato determinada para 2 clonas y el control positivo.

	Velocidad (moles/s)
Control positivo	$1.0133 \times 10^{-8}$
Clona 042-2	$1.5199 \times 10^{-8}$
Clona 011-23	$1.6890 \times 10^{-8}$

### **VI. 3. 7. Ensayos de actividad *in vivo* de los anticuerpos.**

Los clones 042-2 y 011-23 se dejaron complementando durante 7 días durante los cuales obtuvimos lecturas OD<sub>600</sub> de cero. No hubo crecimiento bacteriano. La cepa Fa114-TyrA en que se transformó para complementar, posee el gen pfeBato deshidrogenada más no el de la corismato mutasa. Los fragmentos vNAR que producen las células transformadas deberían de proveer a las células la actividad corismato mutasa, sin embargo las células no sobrevivieron.

## VII. DISCUSIÓN.

Desde que Schultz y Lerner reportaron las primeras abzymas se han creado abzymas con las más diversas actividades catalíticas (Tramontano *et al.* 1989; Pollack *et al.*, 1986; Hilvert *et al.*, 1988; Baca *et al.*, 1997; Leong *et al.*, 2007). Sin embargo, como ya se ha mencionado, las abzymas encontradas hasta el momento no superan la capacidad catalítica de las enzimas naturales, y aunque se ha tratado de mejorarlas mediante diversas técnicas (humanización y evolución dirigida, por ejemplo), suponemos que el tamaño y la estabilidad de los fragmentos vNAR es una ventaja, aunque aún no existan reportes del uso de estos fragmentos con este propósito.

En este trabajo, intentamos demostrar las ventajas de los vNAR como abzymas y mediante la bioselección de clones de una biblioteca de fagos que despliegan los fragmentos vNAR, aislamos dos clones cuyos vNAR reconocen al TSA/CM y muestran actividad catalítica.

El bajo porcentaje de clones que reconocen al antígeno puede deberse a la calidad de la biblioteca. Esta biblioteca de fagos que se reamplificó tenía un tamaño de  $7.9 \times 10^7$  UFC (Quezada-Íñiguez, 2008) en comparación con otras que presentan títulos de  $\sim 1 \times 10^{9-11}$  (Fujii, *et al.* 1998; Leong, *et al.*, 2007; Takahashi-Ando, *et al.*, 2004). Al seleccionar de bibliotecas de mayor tamaño, se incrementan las posibilidades de encontrar clonas específicas para el antígeno de interés.

Además, la biblioteca que se reamplificó era inmune, lo que implica que el tiburón fue inmunizado con un antígeno distinto al nuestro. Sin embargo, al no estar inmunizado con el antígeno TSA/CM, para el propósito de este estudio es una biblioteca no inmune. Dentro del repertorio inmunológico podemos encontrar, virtualmente, anticuerpos contra cualquier antígeno, pero para que el linfocito que presenta ese anticuerpo experimente expansión clonal, debe reconocer al antígeno. Esto es lo que se logra mediante la inmunización de los animales con el antígeno de interés. Entonces podría considerarse que al usar en la bioselección una biblioteca de un tiburón inmunizado con otro antígeno, disminuyeron aún

más las probabilidades de encontrar anticuerpos específicos para el TSA/CM, ya que el repertorio inmunológico se ha comprometido durante su maduración con los antígenos con que se inmunizaba.

La concentración del antígeno al hacer la bioselección también es importante y se recomienda que la placa donde se realiza se cubra con 0.1-1 $\mu$ g de antígeno (Barbas *et al.*, 2001). Sin embargo, nosotros no sabíamos la calidad del antígeno que se nos proporcionó, así que decidimos usar dos diluciones (D100 y D500) de nuestro TSA/CM para la selección. Esta estrategia nos reveló la poca especificidad de los antígenos al usar la D100, ya que al seleccionar con esta dilución encontramos poca variabilidad en las secuencias de los clones obtenidos (figuras 12 y 20), mientras que al usar la D500 en la selección, se incrementó la variabilidad de los clones. Lo anterior se debe a que cuando hay pocas moléculas de antígeno, la mayoría son ocupadas por los fagos más específicos.

La concentración del antígeno también influyó en los títulos de la R1, donde observamos que D500 tiene título menor que D100 (figuras 9 y 10). Al hacer la bioselección con D500, hay menos moléculas de antígeno que en D100 y por lo tanto son menos fagos los que se unen y también menos los fagos que se reamplifican.

Una vez aislados los clones producto de la bioselección, tratamos de diferenciarlos mediante la enzima BstO I. Las variaciones en los patrones del sitio de reconocimiento de la enzima BstO I, se deben a las diferencias entre las secuencias de ADN, y pueden ser usadas para analizar rápida y económicamente la diversidad en un número relativamente grande de clonas que expresan fragmentos de anticuerpos (Barbas, *et al.*, 2001). En nuestro caso, el uso de BstO I no resultó útil para diferenciar clones de R4 (figura 11), pues digerimos 20 plásmidos con esta enzima y los fragmentos obtenidos de la digestión eran del mismo tamaño, lo que nos indica que los clones tienen los mismos sitios de reconocimiento para esta enzima. Entonces para diferenciar estos clones obtuvimos sus secuencias, entre las cuales se pueden observar pocas diferencias (figura 12), existiendo éstas principalmente en CDR3 (a partir del aminoácido 80).

En el análisis de secuencias de R4 pudimos observar que la mayoría de los clones que se aislaron tenían casi la misma secuencia que el clon G4 reportado por Beltrán-López (2006), particularmente los correspondientes a D100. De 20 clones D100 analizados de R4, solamente 5 tenían una secuencia muy distinta a G4 (figura 12). Al principio pensamos que la presencia frecuente de este clon era producto de una contaminación durante la bioselección, sin embargo, la clona 011 (cuya secuencia sólo difiere en un aminoácido de G4) reconoce al antígeno en los experimentos de ELISA y realiza catálisis, mientras que ninguno de los otros 5 clones de R4 mostraba estas características.

Los clones de R3 presentan más variabilidad que los clones de R4, ya que las 8 secuencias que se obtuvieron eran diferentes y además ningún clon era igual al clon 011. Pero mientras que los clones de R3 son más variables, los clones de R4 son más específicos, ya que aunque muchos de ellos eran iguales a 011, este clon reconoce al antígeno en pruebas de ELISA (figuras 21 y 22).

En otros estudios, se ha encontrado que la afinidad del anticuerpo no es directamente proporcional a su actividad catalítica (Baca *et al.*, 1997; Fujii *et al.*, 1998). En este estudio encontramos que al parecer, la medida en que un clon es capaz de reconocer al antígeno no es indicativo de su potencial catalítico. Cuando expresamos en Fa114, el control positivo mostraba mayor reconocimiento por el antígeno que el clon 011-23 (figura 22), no obstante este clon mostró mejor actividad catalítica que el control positivo en las pruebas de desaparición del corismato (figura 24 y tabla IX ). Sin embargo, también es probable que el control positivo se haya expresado mejor en la cepa Fa114 y que al haber más anticuerpo expresado, el reconocimiento haya sido mejor que con nuestros clones.

En la expresión en TOP10F' encontramos que el nivel de expresión es muy bajo y los clones no reconocen al antígeno eficientemente (figuras 13-18), pero al expresar en Fa114 si encontramos dos clonas que reconocen al antígeno eficientemente (figuras 21 y 22). Habrían de hacerse los experimentos pertinentes para determinar el nivel de expresión de los fragmentos vNAR en Fa114, debido a que la concentración del anticuerpo es un factor

importante en las pruebas de reconocimiento. Debido a los bajos niveles de expresión obtenidos en TOP10F' y a que es probable que los fragmentos vNAR tampoco se expresen eficientemente en Fa114, se sugiere buscar otra estrategia de expresión. En trabajos anteriores, no se han encontrado muchos clones con niveles de expresión elevados de vNAR en TOP10F' (Camacho-Villegas, 2007; Quezada-Íñiguez, 2008; Mendoza-Porras, 2008), pero esperábamos que al subclonarlos en pTrc99a y expresarlos en Fa114, los niveles de expresión serían mayores debido a las características del plásmido y la cepa.

Otro factor importante es la pureza del anticuerpo, ya que otras proteínas celulares pueden estar interfiriendo en los procesos de reconocimiento y catálisis, así que lo más recomendable sería hacer estas pruebas con las proteínas vNAR purificadas y cuantificadas. Como consecuencia de lo anterior, los experimentos de actividad catalítica *in vitro* se consideran preliminares.

Respecto a la complementación fallida, tenemos dos hipótesis: 1) el vNAR se expresa en niveles tan bajos que es insuficiente para complementar las necesidades de las células, ó 2) estos clones producen anticuerpos simplemente ineficientes. Para corroborar la primera hipótesis habrían que medirse los niveles de expresión de vNAR en distintas cepas y su capacidad de complementación. Para corroborar la segunda habríamos de repetir los ensayos de actividad catalítica *in vitro* en otras condiciones (con la proteína purificada y cuantificada, más controles).

Con los oligonucleótidos 2832-F y 2833-R diseñados para subclonar en pTrc99a pretendíamos que la etiqueta y la cola de histidinas no interfirieran con el plegamiento de la proteína, y por lo tanto en su eficiencia en la catálisis y en la complementación. Los fragmentos vNAR que probamos en estos experimentos eran de los clones 011-23 (+HA,+H6) y 042-2 (+HA,-H6). Aunque obtuvimos plásmidos -HA,-H6, estos no fueron transformados en Fa114 y Fa114-TyrA, y no sabemos si los fragmentos vNAR con estas características hubieran tenido una mejor función en dichos ensayos.

## VIII. CONCLUSIONES.

1. Logramos seleccionar fragmentos vNAR contra el TSA/CM de una biblioteca no inmune del tiburón *Heterodontus francisci*. Aislamos 92 clonas positivas por PCR al inserto de vNAR.
2. Expresamos los anticuerpos vNAR en las cepas TOP10F' y Fa114, y mediante ensayos de reconocimiento detectamos 2 clones con la capacidad de reconocer al antígeno: 011-23 y 042-2.
3. Verificamos la actividad catalítica de los fragmentos vNAR de estos dos clones capaces de reconocer al antígeno y ambos demostraron actividad catalítica *in vitro*, más no sobrevivieron en los ensayos de complementación.

## **IX. PERSPECTIVAS.**

1. Generar una biblioteca inmune de tiburón y buscar en ella abzymas con actividad CM.
2. Estandarizar la expresión y purificación de los fragmentos vNAR.
3. Generar bibliotecas mutagénicas a partir de las clonas con actividad catalítica encontradas en este trabajo.
4. Probar el reconocimiento de la clona G4 por nuestro antígeno, así como su actividad catalítica CM.

## X. BIBLIOGRAFÍA.

- Amann, E., Ochs, B. y K. Abel. 1988. Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene*. 69 (2): 301-315.
- Andrews, P., Smith, G. e I. Young. 1973. *Biochemistry*. 18: 3492-3498.
- Atkins, P. y J. de Paula. 2002. *Physical Chemistry*. Oxford University Press. Séptima edición. Nueva York. 1149 pp.
- Baca, M., Scanlant, T., Stephenson, R. y J. Wells. 1997. Phage display of a catalytic antibody to optimize affinity for transition-state analog binding. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 10063-10068.
- Barbas, C., Burton, D., Scott, J. y G. Silverman. 2001. *Phage Display: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Primera edición. Nueva York. 736 pp.
- Beltrán-López, S. 2006. Obtención de un vehículo de vacunación a partir de una biblioteca de anticuerpos de tiburón. Tesis de Doctorado. CICESE. México. 115 p.
- Bessette, P., Aslund, F., Beckwith, J. y G. Georgiou. 1999. Efficient folding of proteins with multiple disulfide bonds in the *Escherichia coli* cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96 (24): 13703-13708.
- Bowdish, K., Tang, Y., Hicks, J. y D. Hilvert. 1991. Yeast expression of a catalytic antibody with chorismate mutase activity. *The Journal of Biological Chemistry*. 266: 11901-11908.
- Brichta, J., Hnilova, M. y T. Viskovic. 2005. Generation of hapten-specific recombinant antibodies: antibody phage display technology: a review. *Vet. Med.* 50: 231-252.
- Camacho-Villegas, T. 2007. Obtención de fragmentos de anticuerpos de dominio sencillo V<sub>H</sub>NAR del tiburón *Heterodontus francisci* neutralizantes de las citocinas TNF- $\alpha$  y VEGF<sub>165</sub>. Tesis de Maestría. CICESE. México. 86 pp.

- Crespo, A., Scherlis, D., Martí, M., Ordejón, P., Roitberg, A. y D. Estrin. 2003. A DFT-Based QM-MM approach designed for the treatment of large molecular systems: application to chorismate mutase. *J. Phys. Chem. B.* 107 (49): 13728-13736.
- Chook, Y., Gray, J., Ke, H. y W. Lipscomb. 1994. The monofunctional chorismate mutase from *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 240: 476-500.
- Fujii, I., Fukuyama, S., Iwabuchi, Y. y R. Tanimura. 1998. Evolving catalytic antibodies in a phage-displayed combinatorial library. *Nature biotechnology.* 16: 463-467.
- Guex, N. y M. Peitsch. 1997. Swiss-Model and the Swiss-Pdb Viewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis.* 18: 2714-2723.
- Guimarães, C., Repasky, M., Chandrasekhar, J., Tirado-Reyes, J. Y W. Jorgensen. 2003. Contributions of conformational compression and preferential transition state stabilization to the rate enhancement by chorismate mutase. *Journal of the American Chemical Society.* 125 (23): 6892-6899.
- Guo, H., Cui, Q., Lipscomb, W. y M. Karplus. 2001. Substrate conformational transitions in the active site of chorismate mutase: Their role in the catalytic mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 (16): 9032-9037.
- Greenberg, A., Ávila, D., Hughes, M., Hughes, A., McKinney, E. y M. Flajnik. 1995. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversifications in sharks. *Nature.* 374 (6518): 168-173.
- Haynes, M., Stura, E., Hilvert, D. e I. Wilson. 1994. Routes to catalysis: structure of a catalytic antibody and comparison with its natural counterpart. *Science.* 263 (5147): 646-652.
- Hilvert, D., Carpenter, S., Nared, K. y M. Auditor. 1988. Catalysis of concerted reactions by antibodies: The Claisen rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85: 4953-4955.
- Holliger, P. y P. Hudson. 2005. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology.* 23: 1126-1136.

- Hur, S. y T. Bruice. 2003. The near attack conformation approach to the study of the chorismate to prephenate reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (21): 12015-12020.
- Kast, P., Grisostomi, C., Chen, I., Li, S., Kregel, U., Xue, Y. y D. Hilvert. 2000. A strategically positioned cation is crucial for efficient catalysis by chorismate mutase. *The Journal of Biological Chemistry.* 275 (47): 36832-36838.
- Lee, A., Karplus, P., Ganem, B. y J. Clardy. 1995. Atomic structure of the buried catalytic pocket of *Escherichia coli* chorismate mutase. *J. Am. Chem. Soc.* 117: 3627-3628.
- Leong, M., Chen, Ch., Shar, K. y D. Shiuan. 2007. Selection and characterization of lipase abzyme from phage displayed antibody libraries. *Biochemical and Biophysical Reserch Communications.* 361: 567-573.
- Liu, J., Anderson, G., Delehanty, J., Baumann, R., Hayhurst, A. y E. Goldman. 2007. Selection of cholera toxin specific IgNAR single domain antibodies from a naive shark library. *Molecular Immunology.* 44 (7): 1775-1783.
- Liu, J., Anderson, G. y E. Goldman. 2007. Isolation of anti-toxin single domain antibodies from a semi-synthetic spiny dogfish shark display library. *BMC Biotechnology.* 7:78.
- Magnien, L. 2003. Obtención de fragmentos tipo NAR de tiburón neutralizantes del veneno de abeja. Tesis de Maestría. Universidad de París. Francia. 110 pp.
- Mendoza-Porras, O. 2008. Obtención de anticuerpos del tipo vNAR del tiburón *Heterodontus francisci* no inmune capaces de reconocer a la proteína PA de *Bacillus anthracis*. Tesis de Maestría. CICESE. México. 71 pp.
- Murzin, A., Brenner, S., Hubbard, T. y C. Chothia. 1995. SCOP: a structural classification of proteins database for the investigation of sequences and structures. *Journal of Molecular Biology.* 247 (4): 536-540.
- Nelson, D. y M. Cox. 2000. *Lehninger, Principles of Biochemistry.* Worth Publishers. Tercera edición. Nueva York. 1200 pp.
- Nuttall, S., Krishnan, U., Doughty, L., Pearson, K., Ryan, M., Hoogenraad, N., Hattarki, M., Carmichael, J., Irving, R., y P. Hudson. 2003. Isolation and

characterization of an IgNAR variable domain specific for the human mitochondrial translocase receptor Tom70. *European Journal of Biochemistry*. 270: 3543-3554.

- Pollack, S., Jacobs, J. y P. Schultz. 1986. Selective chemical catalysis by an antibody. *Science*. 234: 1570.
- Quezada-Íñiguez, R. 2008. Obtención de anticuerpos de dominio sencillo tipo vNAR del tiburón *Heterodontus francisci* con capacidad de unión al complejo HLA-B7/péptidos de la telomerasa. Tesis de Maestría, CICESE. México. 93 p.
- Ranaghan, K., Ridder, L., Szeftczyk, B., Sokalski, A., Hermann, J. Y A. Mulholland. 2004. Transition State Stabilization and substrate strain in enzyme catalysis: ab initio QM/MM modelling of the chorismate mutase reaction. *Org. Biomol. Chem*. 2: 968-980.
- Roux, K., Greenberg, A., Greene, L., Strelets, L. Avila, D., McKinney, E. y M. Flajnik. 1998. Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): Molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 95: 11804-11809.
- Rumfelt, L., McKinney, E., Taylor, E. y M. Flajnik. 2002. The development of primary and secondary lymphoid tissues in the nurse shark *Ginglymostoma cirratum*: B-cell zones precede dendritic cell immigration and T-cell zone formation during ontogeny of the spleen. *Scandinavian Journal of Immunology*. 56: 130-148.
- Sambrook, J., Fritsch E. y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Segunda edición. 1659 pp.
- Sasso, S., Ramakrishnan, C., Gamper, M., Hilvert, D. y P. Kast. 2004. Characterization of the secreted chorismate mutase from the pathogen *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS Journal*. 272: 375-389.
- Schramm, V. 1998. Enzymatic transition states and transition state analog design. *Annu. Rev. Biochem*. 67: 693-720.
- Shao, C., Secombes, C. y A. Porter. 2007. Rapid isolation of IgNAR variable single-domain antibody fragments from a shark synthetic library. *Molecular Immunology*. 44(4): 656-665.

- Shokat, K. y P. Schultz. 1990. Catalytic Antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 8: 335-363.
- Štrajbl, M., Shurki, A., Kato, M. y A. Warshel. 2003. Apparent NAC effect in chorismate mutase reflects electrostatic transition state stabilization. *Journal Am. Chem. Soc.* 125 (34): 10228-1023.
- Streltsov, V., Carmichael, J. y S. Nuttall. 2005. Structure of a shark IgNAR antibody variable domain and modeling of an early developmental isotype. *Protein Science.* 14: 2901-2909.
- Strater, N., Schnappauf, G., Braus, G. y W. Lipscomb. 1997. Mechanisms of catalysis and allosteric regulation of yeast chorismate mutase from crystal structures. *Structure.* 5 (11): 1437-1452.
- Takahashi-Ando, N., Kakinuma, H., Fujii, I. y Y. Nishi. 2004. Directed evolution governed by controlling the molecular recognition between an abzyme and his haptenic transition-state analog. *Journal of Immunological Methods.* 294: 1-14.
- Tang, Y., Hicks, J. y D. Hilvert. 1991. In vivo catalysis of a metabolically essential reaction by an antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 8784-8786.
- Tang, Y., Jiang, N., Parakh, C. y D. Hilvert. 1996. Selection of linkers for a catalytic single-chain antibody using phage display technology. *The Journal of Biological Chemistry.* 271: 15682-86.
- Tramontano, A., Janda, K. y R. Lerner. 1986. Catalytic antibodies. *Science.* 234: 1566-1570.

Páginas electrónicas:

[http://www.ab-direct.com/custom/hucal\\_technology-368.html](http://www.ab-direct.com/custom/hucal_technology-368.html) (10-Jul-07)

<http://www.molgen.mpg.de/~in-vitro/technology.html> (10-Jul-07)

[http://2008.igem.org/Team:Heidelberg/Notebook/Sensing\\_Group/Cloning](http://2008.igem.org/Team:Heidelberg/Notebook/Sensing_Group/Cloning) (21-Feb-09)

**XI. APÉNDICE.**

## MEDIOS DE CULTIVO:

**Medio LB**

Triptona	10g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5g
NaOH 1N	1 mL
Aforar con agua destilada a 1 L y esterilizar	

**Medio SB**

Triptona	32g
Extracto de levadura	20 g
NaCl	5g
NaOH 1N	5 mL
Aforar con agua destilada a 1 L y esterilizar	

**Medio SOC**

Triptona	20g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	0.5g
KCl	186 mg ó 10 mL 250 mM

Ajustar el pH a 7.0, aforar con agua destilada a 1 L y esterilizar. Una vez que se enfría, agregar 10 mL de MgCl<sub>2</sub> 1M (filtrado) y glucosa 20 mM.

**Medio mínimo (1L, 10x)**

Sales M9 10x	100 mL
Glucosa 20%	10 mL
MgSO <sub>4</sub> 1M	1 mL
CaCl <sub>2</sub> 100 mM	1 mL
Tiamina-HCl 5 mg/mL	1 mL
1000x aro mix	1 mL
L-triptófano 10 mg/mL	2 mL
L-leucina 10 mg/mL	2 mL
L-isoleucina 10 mg/mL	2 mL
L-fenilalanina 10 mg/mL	2 mL
Ampicilina 100 mg/mL	1 mL
Kanamicina 25 mg/mL	1 mL

**SOLUCIONES PARA MINIPREP DE PLÁSMIDO:****GTE (glucosa-Tris-EDTA)**

50 mM glucosa  
25 mM Tris-Cl pH8  
10 mM EDTA

**NaOH-SDS**

0.2 mM NaOH  
1% SDS

**Acetato de sodio 3M**

408 g de acetato de sodio  
Disolver, ajustar el pH a 5.2 con ácido acético 3M y aforar con agua destilada a 1L.

**Solución amortiguadora TE**

10 mM Tris-Cl, pH 7.4, 7.5 u 8  
10 mM EDTA pH8

**SOLUCIONES PARA PRUEBAS DE ELISA:****Solución de revelado ABTS (1 mL)**

Buffer de citratos 10x	100 $\mu$ L
ABTS 50x	20 $\mu$ L
Peróxido 30%	1 $\mu$ L
Agua destilada	879 $\mu$ L

**PBS1x**

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g

Ajustar pH a 7.2, esterilizar y aforar con agua destilada estéril a 1 L

**TPBS**

Tween 20 0.05% en PBS 1x.