



Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Anticuerpos recombinantes anti-proteínas P de *Trypanosoma cruzi* como modelo
para el estudio de la Cardiomiopatía Chagásica Crónica y diseño de drogas
antiparasitarias

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la
Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

Cristián Roberto Smulski

Director de tesis: Dr. Mariano Jorge Levin

Consejero de estudios: Dr. Alejandro Mentaberry

Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas, Instituto de Investigaciones en
Ingeniería Genética y Biología Molecular, CONICET, FCEyN, UBA

Ciudad de Buenos Aires 2008

Anticuerpos recombinantes anti-proteínas P de *Trypanosoma cruzi* como modelo para el estudio de la Cardiomiopatía Chagásica Crónica y diseño de drogas antiparasitarias

Los pacientes con Cardiomiopatía Chagásica Crónica, presentan niveles elevados de anticuerpos dirigidos contra el extremo C-terminal de las proteínas ribosomales P de *Trypanosoma cruzi*. Partiendo de un anticuerpo monoclonal murino que reconoce los últimos 13 aminoácidos del extremo C-terminal de la proteína TcP2 β , se construyeron anticuerpos recombinantes de cadena única (scFv) en sentido VH-VL o VL-VH con péptidos de unión cortos o largos. Estas variaciones generaron en el scFv la propiedad de dimerizar o permanecer como monómero. Diversos estudios sobre el receptor beta 1 adrenérgico (β 1-AR) (Inmunohistoquímica, producción de cAMP, cronotropismo de cardiomiocitos en cultivo y ECG *in vivo*) demostraron que existe reactividad cruzada y que los scFvs diméricos activan al receptor mientras que los monoméricos actúan como antagonistas. Ensayos *in vivo* reproducen la patología cardíaca y revelaron nuevos blancos para estos anticuerpos. Por otro lado, se ha descrito en mamíferos la capacidad de anticuerpos dirigidos contra la región C terminal de las proteínas P y no contra otras regiones para inhibir la síntesis de proteínas en sistemas *in vitro*. Por lo tanto, se analizó funcionalmente la acción de estos anticuerpos recombinantes demostrando que se inhibe la síntesis de proteínas *in vitro* e *in vivo* por ribosomas de *T. cruzi*, pero no afecta el ribosoma de mamíferos. La especificidad está dada por la modificación de un solo aminoácido en el extremo C-terminal de las proteínas P del parásito. Dado que el ribosoma de *T. cruzi* presenta características estructurales únicas que lo diferencian del ribosoma de mamíferos realizamos un mapa de interacciones entre las proteínas P (stalk) y con el factor de elongación 2. Juntos estos resultados sugieren que la región del *stalk* del ribosoma de *T. cruzi* (y probablemente de otros tripanosomátidos) sería un adecuado blanco para el desarrollo de drogas antiparasitarias específicas.

Palabras Clave: Cardiopatía Chagásica Crónica, *Trypanosoma cruzi*, Anticuerpos Recombinantes, scFv, Stalk, Traducción

Recombinant antibodies anti *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins as a model of Chronic Chagas Heart Disease and anti parasitic drug development

Serum from patients with Chronic Chagas Heart Disease posses high levels of antibodies against the C-terminal region of *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins. Starting from a murin monoclonal antibody that recognized the last C-terminal 13 amino acids of one of these proteins (TcP2 β), we derived 4 different single chain recombinant antibodies (scFv), switching the sense of variable genes (V_H-V_L or V_L-V_H) and the linker length. These differences generate different avidities and affinities on each one. Different studies on the beta 1 adrenergic receptor (β 1-AR) (including Immunocytochemistry, cAMP production, neonatal rat cardiomyocyte cultures cronotropism and *in vivo* ECG recordings) demonstrated the cross reactive properties of these antibodies and showed that dimeric scFvs activate the receptor while monomeric scFv block it. Passive transfer to mice reproduced the cardiac pathology and exposed new targets for these antibodies. On the other hand, it has been previously described in mammals the ability of antibodies against the C-terminal region of ribosomal P proteins, and not against other regions, to inhibit *in vitro* protein synthesis. Thus, we analyzed there functional effect of these recombinant antibodies, demonstrating that they can inhibit *in vitro* and *in vivo* protein synthesis in *T. cruzi* ribosome but they have not effect in mammals ribosome. This specificity is due to a single modification in the C-terminal region of parasitic P proteins. Due to the many different structural features founded in *T. cruzi* ribosome we build an interaction map within the ribosomal P complex (stalk) and with the elongation factor 2. All these results suggest that the *T. cruzi* stalk region (and may be other trypanosomatids) could be an excellent target for developing specific antiparasitic drugs.

Key words: Chronic Chagas Heart Disease, *Trypanosoma cruzi*, Recombinant antibodies, scFv, Stalk, Translation

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas aquellas personas que de diversas maneras facilitaron y alentaron la realización de este trabajo, entre ellas:

A todos mis compañeros del CUM por su apoyo a lo largo de todo este tiempo, muy especialmente a Lidia por confiar en mí y darme la posibilidad de educar con total libertad; a Beba por compartir y transmitir una pasión especial por la docencia, a Juli por la compañía, los mates y el café en el eterno turno noche y al Guille gran compañero que me ha ayudado en infinitas oportunidades y me ha puesto valor agregado en cada diálogo con los alumnos.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas: a Leandro Simonetti por su interés y su ayuda incondicional; a Vivian Labovski por su predisposición constante a los trabajos en equipo y por haber compartido años de mesada; a Joaquín Basile por su buen humor y producción de proteínas a gran escala; a Vanina Grippio por su ejemplo de dedicación y trabajo en los momentos difíciles; a Leticia Niborsky ex alumna devenida en flamante becaria doctoral; a la Dra. Karina Gómez por alentarme a terminar con este trabajo; a Gabriela Levy por su colaboración con los no tan queridos cultivos de cardiomiocitos y su buena predisposición para la discusión de ideas; a la Dra. Silvia Longhi por compartir charlas, mates y parte de este trabajo; al Dr. Alejandro Schijman por ser un cable a tierra en los momentos de mayor tensión; a Juan Burgos porque fue gracias a El que comencé en este laboratorio cuando compartíamos las ayudantías de Biología Molecular; a Tomás Duffy por sus asados, buen humor y pasión por la música y por la ciencia; a Margarita Bisio por su siempre agradable compañía; a Amy Curto por su ayuda con los cultivos de parásitos y los mates siempre listos; a Sonia Lafon por su ayuda y complicidad con las cremonas en los momentos de gula. También a los más nuevos o que estuvieron menos tiempo en el laboratorio, quienes también colaboraron para que este trabajo se llevara a cabo en un clima agradable; Toti, Leonardo, Larisa, Natasha, Estela.

A los ex-integrantes del Laboratorio de Biología Molecular de la Enfermedad de Chagas: a Martín Edreira por los muy buenos momentos compartidos dentro y fuera del

laboratorio y por transformarse en un gran amigo a pesar de las distancias; a Germán Robledo, por su alegría, su sencillez y constante ayuda a los demás; a Verónica dos Santos por los desayunos con criollitos y las charlas sobre las vicisitudes de la vida; a Benson Nyambega por su ayuda y participación con los cultivos de *Trypanosoma brucei*.

Al Dr. Maximiliano Juri Ayub por su interés constante tanto en el trabajo como en las ideas, por haber compartido parte de este trabajo y por su compañía ante las decisiones difíciles de este último período.

Al Dr. Johan Hoebeke por ser un referente en mi carrera científica. Gracias por tu capacidad y devoción para transmitir el conocimiento, por la sabiduría y la humildad.

A todo el personal del [INGEB] en general.

Al Dr. Mariano Levín por darme la posibilidad de incorporarme a su laboratorio, por la dirección de este trabajo y por el continuo estímulo a la realización de nuevas ideas y proyectos.

Al Dr. Hector Torres, por permitirme llevar a cabo el presente trabajo en el Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI).

Gracias a todos porque de distintas maneras han permitido que a lo largo de estos años disfrute de la hermosa tarea de ser docente y científico... o tratar!

A Soledad, por ser mi sosten y mi
compañera de viaje en esta vida

A mis padres Adriana y Bebe y a mis hermanas
Maru y Nadi por apoyarme siempre

A mis ahijadas Valentina y Renata
garantía de amor en envase chico

A mis abuelos por todo su cariño

A toda mi familia, Tíos y Primos

A todos mis amigos, por tantos momentos
compartidos a través de años de amistad

Índice

CAPÍTULO 1

1.1.	Introducción	1
1.1.1.	La enfermedad de Chagas	2
1.1.2.	El parásito <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
1.1.3.	Desarrollo clínico de la enfermedad	10
1.1.4.	Tratamiento y control	11
1.1.5.	La Cardiomiopatía Chagásica Crónica	13
1.1.6.	Los anticuerpos	18
1.1.7.	Anticuerpos recombinantes de cadena única	20
1.2.	Antecedentes	24
1.3.	Hipótesis y Objetivos	
1.4.	Resultados	25
1.4.1.	Construcción y selección de anticuerpos recombinantes	28
1.4.2.	Expresión y renaturalización	30
1.4.3.	Caracterización de los scFv	36
1.4.4.	Activación del receptor beta 1 adrenérgico	41
1.4.5.	Modelo del paratope del anticuerpo	44
1.4.6.	Otros blancos	47
1.4.7.	Activación del receptor colinérgico muscarínico ²	50
1.4.8.	Nuevos efectos fisiológicos	53
1.4.9.	Inmunohistoquímica en cortes de retina	55
1.4.10.	Biodistribución del scFv C5	56
1.4.11.	Cristalografía de los anticuerpos	60
1.4.12.	Expresión en sistemas eucariontes	64
1.5.	Discusión	

CAPÍTULO 2

2.1.	Introducción	71
2.1.1.	El ribosoma y la traducción	75
2.1.2.	Iniciación	77
2.1.3.	Elongación	79
2.1.4.	Terminación	81
2.1.5.	La estructura del stalk ribosomal	82
2.1.6.	Las proteínas ribosomales P	85
2.1.7.	El complejo ribosomal P	89

2.1.8.	Las proteínas ribosomales P de <i>T. cruzi</i>	91
2.2.	Antecedentes	95
2.3.	Hipótesis y Objetivos	
2.4.	Resultados	96
2.4.1.	Comparación del complejo P en protozoarios	101
2.4.2.	Interacción entre las proteínas P	109
2.4.3.	Formación del complejo P (stalk)	114
2.4.4.	El centro GTPasa asociado	121
2.4.5.	Especificidad de epítopes	123
2.4.6.	Inhibición de la traducción	124
2.4.7.	Intrabodies	127
2.4.8.	Tasa de crecimiento	128
2.4.9.	Diseño de péptidos derivados del scFv C5	130
2.5.	Discusión	
3.	Materiales y Métodos	138
3.1.	Medios de cultivo	139
3.2.	Cepas de bacterias	139
3.3.	Cepas de levaduras	139
3.4.	Cepas de parásitos	139
3.5.	Líneas celulares	140
3.6.	Vectores	147
3.7.	Soluciones y buffers	150
3.8.	Marcadores de peso molecular	151
3.9.	Enzimas y anticuerpos	151
3.10.	Construcción de los scFvs	155
3.11.	Purificación de fragmentos de ADN	156
3.12.	Digestión enzimática de plásmidos e insertos	156
3.13.	Ligación	156
3.14.	Transformación	157
3.15.	Expresión de los scFv en la cápside del fago	158
3.16.	Infección con fagos	159
3.17.	Minipreps	160
3.18.	Inmunoensayo enzimático (ELISA)	161
3.19.	Expresión en <i>E. coli</i> de anticuerpos a pequeña escala	161
3.20.	Expresión en <i>E. coli</i> de anticuerpos a gran escala	162
3.21.	Expresión de proteínas en <i>P. pastoris</i>	162

3.22.	Purificación de anticuerpos recombinantes	162
3.23.	Electroforesis en geles de poliacrilamida	163
3.24.	Tinción de geles con azul de coomasie	163
3.25.	Inmunotransferencia (Western blot)	163
3.26.	Determinación de la concentración de proteínas	164
3.27.	Renaturalización (refolding)	165
3.28.	Cromatografía de exclusión	165
3.29.	Surface plasmon resonance (SPR)	166
3.30.	Inmunofluorescencia indirecta sobre células CHO	167
3.31.	Inmunofluorescencia indirecta sobre parásitos	168
3.32.	Producción de AMPc en células establemente transfectadas	169
3.33.	Cultivo de cardiomiocitos de ratas neonatas	170
3.34.	Ensayo de actividad funcional	171
3.35.	Transferencia pasiva	171
3.36.	Modelado molecular	172
3.37.	Construcción de los intrabodies	173
3.38.	Cultivo de parásitos y transfección	174
3.39.	RT-PCR	174
3.40.	Purificación de ribosomas de hígado de rata	175
3.41.	Purificación de ribosomas de <i>T. cruzi</i> y <i>C. fasciculata</i>	176
3.42.	Síntesis de proteínas <i>in vitro</i>	176
3.43.	Péptidos	178

4. Referencias

5.	Anexo	193
5.1.	Secuencia completa del scFv C5	194
5.2.	Péptidos derivados de los CDRs y sus características	195
5.3.	Secuencia del receptor beta 1 adrenérgico humano	196
5.4.	Secuencia del receptor colinérgico muscarínico 2 humano	197
5.5.	Proteínas P de <i>Trypanosoma cruzi</i>	198
5.6.	Secuencia de la región C-terminal de distintos protozoarios	199
5.7.	Esquema de las proteínas P recombinantes utilizadas en SPR	200
5.8.	Resumen de los resultados de SPR	201
5.9.	Sistema de expresión condicional en <i>T. brucei</i>	

Introducción

Capítulo 1

1.1.1 LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

La enfermedad de Chagas o mal de Chagas-Mazza, también denominada tripanosomiasis americana, es una infección ocasionada por el parásito protozoario *Trypanosoma cruzi*. Se transmite por medio de insectos hematófagos de la subfamilia *Triatominae* (orden: *Hemiptera*, familia: *Reduviidae*), comúnmente conocidos en nuestro país como “Vinchucas”, los cuales transmiten el parásito cuando defecan sobre la picadura que ellos mismos han realizado para alimentarse. La enfermedad es endémica en América del Sur y Central (Figura 1-1) y recientemente se han encontrado casos en los Estados Unidos, debido al uso de sangre contaminada. Actualmente esta enfermedad afecta a más de 24 millones de personas en todo el mundo y se calcula que casi 100 millones de personas se encuentran en riesgo de infección por vivir en áreas endémicas (World Health Organization, 2002). Se estima también que en América Latina mueren a causa de esta enfermedad 50.000 personas por año. En la Argentina, según datos oficiales, existen alrededor de 2.3 millones de personas infectadas, de las cuales alrededor del 20 % se encontrarían enfermas.



Figura 1-1. Mapa de Distribución de la enfermedad de Chagas en relación con su vector y sus huéspedes mamíferos.

Se encuentra en una región delimitada por el paralelo 42° Norte (México) y 46° Sur (centro de Argentina y Chile). Su distribución coincide con la de los insectos transmisores de hábitos domiciliarios. El riesgo de infección está directamente relacionado con el nivel de vivienda y por ello se reconoce que esta enfermedad está directamente asociada a la pobreza.

1.1.2 EL PARÁSITO *Trypanosoma cruzi*.

La clasificación filogenética de *T. cruzi* es la siguiente:

Reino: Protista
Phylum: Sarcomastigophora
Sub-phylum: Mastigophora
Clase: Zoomastigophorea
Orden: Kinetoplastida
Sub-orden: Trypanosomatina
Familia: Trypanosomatidae
Género: Trypanosoma
Sub-género: Schizotrypanum
Especie: cruzi

Trypanosoma cruzi pertenece al orden de los kinetoplástidos, un grupo ampliamente distribuido de protozoos flagelados, que incluye otros patógenos del hombre como *Trypanosoma brucei* y diversos géneros de *Leishmania*. Los kinetoplástidos son un grupo monofilético que divergió tempranamente de la rama común a los organismos eucariotas (Figura 1-2). La característica morfológica que distingue a este grupo es una estructura subcelular llamada kinetoplasto, que constituye la única mitocondria del parásito (Figura 1-3). La tinción de esta estructura es debida a la presencia de ADN circular, que posee información para un pequeño grupo de proteínas citoplasmáticas entre otras.

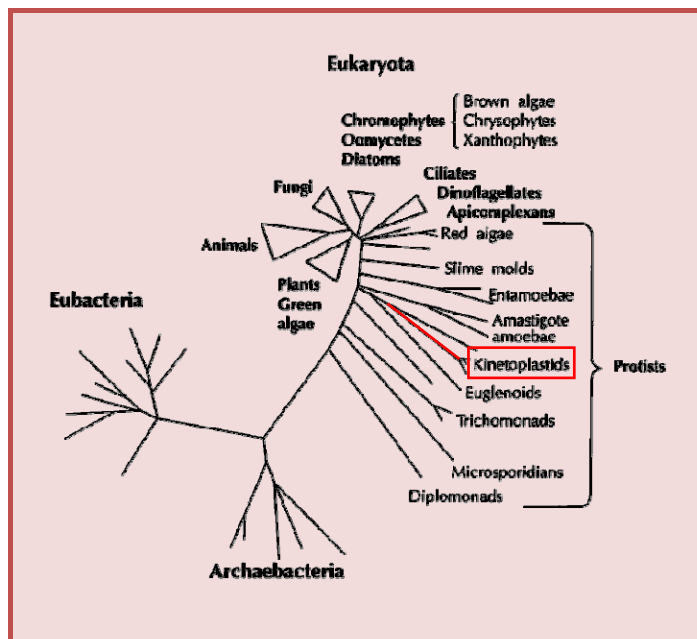


Figura 1-2. Árbol filogenético construido en base a datos de secuencias de ARN ribosomal 16S (Sogin, 1991). Nótese que el linaje correspondiente a los kinetoplástidos (rojo) diverge del tronco común de los eucariotas mucho más tempranamente que hongos o mamíferos.

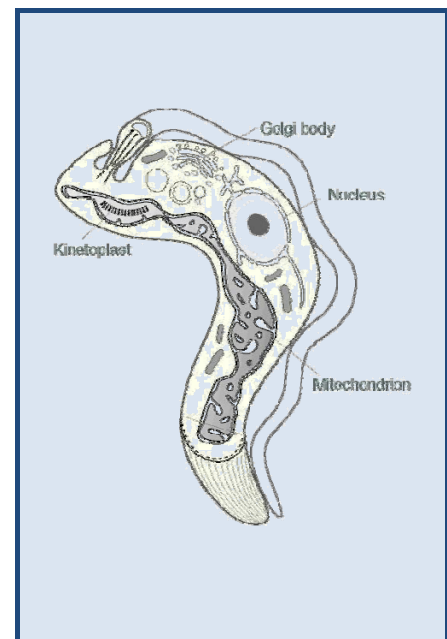


Figura 1-3. Esquema de un kinetoplastido. Se destaca la estructura del kinetoplasto y su ADN, formado por mini y máxí-círculos concatenados.

Morfología y Ciclo de vida

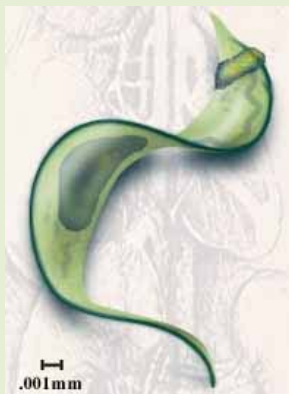
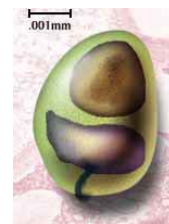
El ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi* se desarrolla en dos tipos de vectores, un hospedador vertebrado y un hospedador invertebrado. Este último está representado por insectos hematófagos de la Familia *Reduviidae*, principalmente de las especies *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* y *Panstrongylus megistus*. Más de cien especies de mamíferos, incluyendo animales domésticos y reservorios silvestres se comportan como hospedadores vertebrados (Brener, 1979). A lo largo de su ciclo de vida *Trypanosoma cruzi* presenta tres morfologías diferentes (Tabla 1-1) en función de su forma general, la posición relativa entre el núcleo y el Kinetoplasto, y el sitio de salida del flagelo:

Tabla 1-1. Morfología de *Trypanosoma cruzi*



Epimastigote: forma alargada en la que el flagelo se origina próximo y por delante del núcleo, y emerge por un costado del cuerpo arrastrando la membrana citoplasmática en un corto trayecto dando la imagen de una membrana ondulante corta que se libera por el extremo anterior. Este estadio se desarrolla en el vector y en cultivo y constituye una de las formas proliferativas.

Amastigote: forma esférica u ovalada que carece de flagelo libre. Corresponde al estadio de localización intracelular y replicativo en el mamífero.



Trípomastigote: forma alargada con el kinetoplasto situado por detrás del núcleo; el flagelo nace en su proximidad y emerge por un costado del cuerpo, se libera por el extremo anterior creando la imagen de una membrana ondulante de importante extensión. Este estadio está presente en el torrente sanguíneo del mamífero (circular) y en la ampolla rectal del insecto vector (metacíclico). Carece de capacidad replicativa.

Dentro de la vía de **transmisión vectorial** se pueden distinguir tres ciclos:

En el **ciclo silvestre** o primitivo el parásito circula entre vectores y reservorios silvestres. Este ciclo es de naturaleza eminentemente zoonótica, y se trata de un estado de equilibrio desarrollado a través de una larga adaptación que se traduce en la baja o ninguna acción patogénica del protozoario sobre sus hospederos naturales.

En el **ciclo doméstico** el hombre sobresale como principal reservorio de la infección, llevando al parásito hacia las zonas urbanas y hacia nuevas regiones y/o países no endémicos, mientras que insectos adaptados al ámbito doméstico son los responsables de actuar como vectores (**Figura 1-4**).

Como nexo entre los ciclos silvestre y doméstico, existe el **ciclo peridoméstico**, en el cual intervienen mamíferos (roedores domésticos, marsupiales, gatos, perros) que libremente entran y salen de las residencias, y los triatóminos silvestres que son atraídos por la luz de las casas y por el alimento.

Además de la transmisión vectorial (que representa del 80-90 % de los casos), existen otras formas de transmisión como la transfusional (5-20 %), principal forma de infección en zonas no endémicas y la congénita (0.5-8 %), que parece depender de factores ligados a la interacción parásito-hospedador. Otras vías de transmisión son excepcionales (accidental, transplante de órganos, otros vectores, lactogénica, etc.) y no representan una importancia significativa en términos de salud pública.

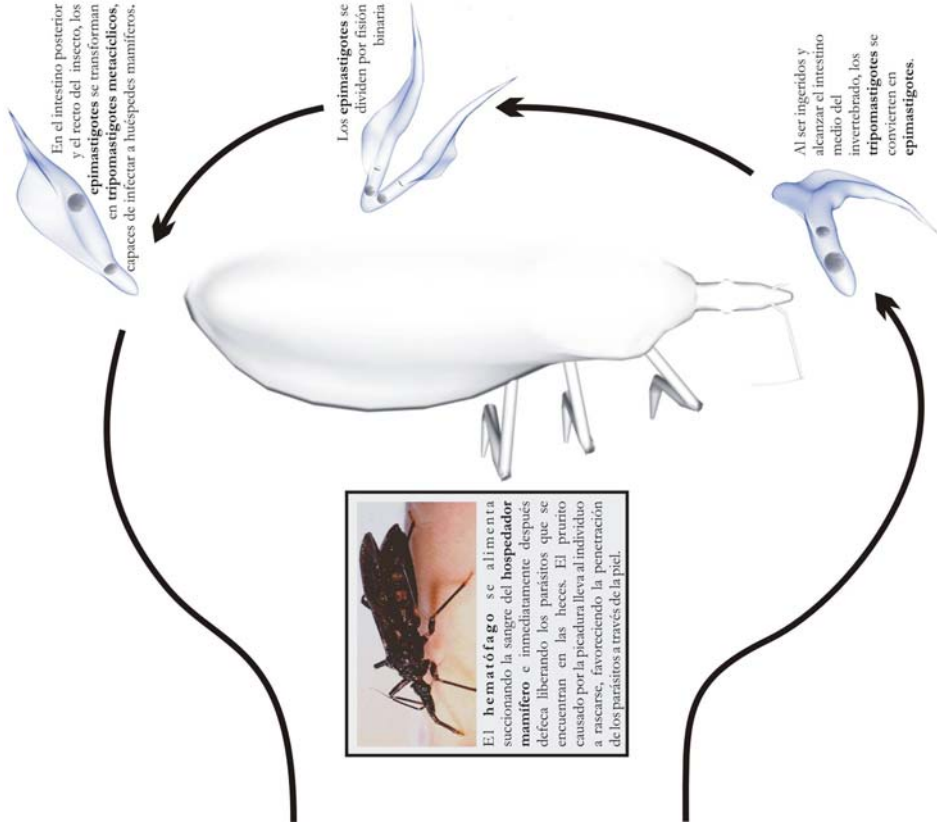
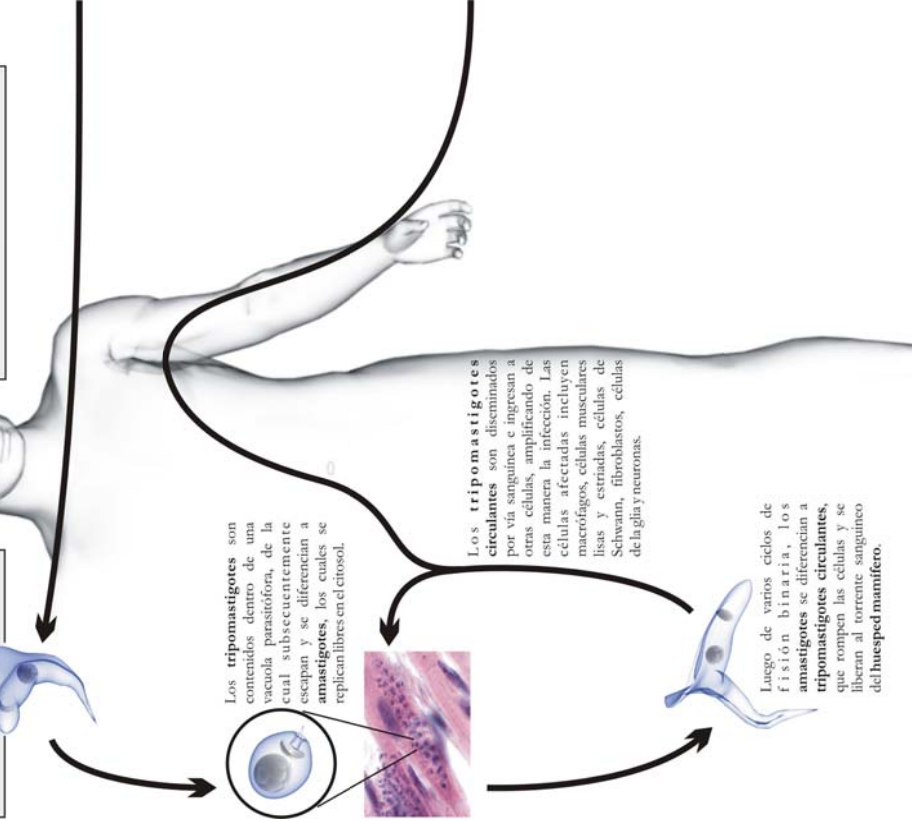


Figura 1-4. Ciclo de Vida Doméstico del *Trypanosoma cruzi*. En el ciclo de vida doméstico el hombre es el huésped mamífero, y distintos insectos de la subfamilia *Triatominae*, adaptadas al ámbito doméstico, actúan como vector. En el humano, el parásito evade al sistema inmune por tener un modo de vida intracelular, y debido a la capacidad de escarpar desde la vacuola parasitófora (en la que es primeramente contenido) al citosol, evitando de esta manera la posterior formación del fagolisosoma. En los insectos, el parásito desarrolla su vida en el tracto digestivo, pasando por dos morfologías distintas, ambas flageladas.

1.1.3 DESARROLLO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD

La etiología de la enfermedad consta de una fase aguda que dura entre 2 y 12 meses, seguida de una fase indeterminada que persiste entre 12 y 20 años, y que en muchos de los casos culmina con una Cardiomiopatía Chagásica Crónica o megasíndromes.

Fase Aguda: El período de incubación, y la consecuente aparición de los primeros síntomas, es de duración variable con un término medio de una semana. Usualmente observada en niños, esta fase está caracterizada por fiebre, hinchazón de las glándulas linfáticas, agrandamiento de hígado y bazo, o inflamación local en el sitio de infección (Tanowitz y col. 1992). Un nódulo cutáneo local llamado “chagoma” puede aparecer en el sitio de inoculación. Cuando este sitio es la membrana mucosa conjuntival, el paciente puede desarrollar edema periorbital unilateral, conjuntivitis y linfadenitis preauricular. Esta constelación de manifestaciones se refiere como signo de Romana. En adultos, la fase aguda suele ser asintomática pero pueden presentarse diferentes grados de parasitemia, síntomas clínicos transitorios como fiebre y miocarditis leve. Los síntomas normalmente desaparecen después de los 12 meses.

Fase Indeterminada: Luego de la fase aguda, entre el 40 y 80% de los pacientes entran en una fase quiescente no muy bien caracterizada, denominada “fase indeterminada”. En esta etapa los pacientes permanecen asintomáticos, sin anomalías radiográficas de tórax ni electrocardiográficas. Aunque es difícil detectar al parásito durante esta etapa, los títulos de anticuerpos contra antígenos de *T. cruzi* son elevados. Exámenes histopatológicos de corazones de pacientes en fase indeterminada, que fallecieron por causas ajenas a la infección con *T. cruzi*, muestran focos ocasionales de inflamación con fibrosis (Lopes y col. 1981). Entre un 60-70% de los individuos infectados permanecen en esta fase, conviviendo con el parásito sin desarrollar daños importantes.

Fase Crónica: La fase crónica se desarrolla tras un período asintomático de varios años (entre 10 y 20), presentando distintas patologías en proporciones características. La manifestación clínica más severa e importante de la enfermedad de Chagas-Mazza Crónica es la Cardiomiopatía Chagásica Crónica, que afecta a un 30-40% de los individuos infectados. Otras manifestaciones clínicas menos frecuentes en Argentina son los desordenes neurológicos (3%) o los megasíndromes (6%), caracterizados por el agrandamiento del colon (megacolon) o el esófago (megaesófago) ambos atribuidos a la destrucción de células del sistema nervioso vegetativo. En contraste con la etapa aguda, la presencia del *T. cruzi*, tanto en sangre como en células de tejidos blanco, es muy difícil de establecer.

1.1.4 TRATAMIENTO Y CONTROL

La única medida de control efectiva es el uso de insecticidas para romper el ciclo de transmisión (Días, 1993).

Para el tratamiento de la enfermedad de Chagas existen actualmente dos drogas aprobadas; nifurtímox (Lampit) y benznidazol (Rochagan) (Rodríguez Coura y De Castro, 2002; Raether y Hanel, 2003). Ambas actúan principalmente sobre los tripomastigotes circulantes y eliminan o disminuyen la parasitemia, aparentemente a través de la generación de iones superóxido altamente reactivos que dañan los ácidos nucleicos del parásito, y la inhibición de la “trypanothione reductase”, una enzima específica del parásito que participa en la defensa contra compuestos oxidantes. Estas drogas tienen éxito en un 60% de los pacientes agudos, quienes requieren de un tratamiento diario por 60 días o más, generalmente necesitando hospitalización por los efectos adversos (Levi y col, 1996). Recientemente se ha publicado que la Amiodarona, un compuesto antiaritmico que se utiliza en distintas patologías cardíacas incluyendo el Chagas, posee actividad triponocida y actúa sinérgicamente con el anti fúngico Posaconazole (Benaím y col, 2006). La Amiodarona ejerce su efecto alterando la homeostasis de calcio y bloqueando la síntesis de ergosterol, mientras que el Posaconazole solo afecta la homeostasis de calcio. Este tipo de estudio abre la posibilidad a nuevos tratamientos combinados con resultados más efectivos.

Por todo esto se hace necesario el desarrollo de nuevos agentes quimioterapéuticos y para esto, la búsqueda de blancos altamente específicos es imprescindible.

1.1.5 LA CARDIOMIOPATÍA CHAGÁSICA CRÓNICA

La manifestación más severa de la infección con *Trypanosoma cruzi*, es la Cardiomiopatía Chagásica Crónica. Los estados avanzados de esta enfermedad resultan en cardiopatías dilatadas que conducen a fallas cardíacas y muerte súbita. La evolución lenta de este fenómeno junto con la baja presencia de parásitos en el sitio de la lesión, sugieren un componente autoinmune en su patogénesis (Elizari y Chiale, 1993). Algunas evidencias que apoyan esta hipótesis son la presencia, en pacientes con Cardiomiopatía Chagásica Crónica, de anticuerpos circulantes dirigidos contra el parásito que tienen la capacidad de actuar como agonistas de receptores cardíacos (reactividad cruzada) (Rosenbaum y col, 1994; Elies y col, 1996; Kaplan y col, 1997).

Estudios previos con grupos de pacientes con Cardiomiopatía Chagásica Crónica demostraron una correlación entre la presencia de anticuerpos con actividad agonista del receptor beta 1 adrenérgico (β_1 -AR) y la incidencia de arritmias ventriculares, como así también la presencia de anticuerpos con actividad agonista del receptor colinérgico muscarínico tipo 2 (M_2 -AChR) y la incidencia de la disfunción de nódulo sinusal (Chiale y col, 2001; Mahler y col, 2004). Nosotros creemos que estos anticuerpos con actividad estimulante de distintos receptores cardíacos son, al menos en parte, generados contra el parásito y que tienen la propiedad de reaccionar de manera cruzada con dichos receptores. Esta idea tiene su origen en el hecho de que anticuerpos dirigidos contra la región C-terminal de la proteína ribosomal P28 de *T. cruzi* (TcP28) tienen la capacidad de reaccionar de manera cruzada con el β_1 -AR. Este efecto podría ser producto de un epítopo ácido, altamente reactivo, presente en la región C-terminal de TcP28, llamado R13, EEEDDDMGFGLFD, el cual tiene similitud con el motiva ácido presente en el segundo bucle extracelular del β_1 -AR, AESDE (Lopez-Bergami y col, 2001; 2005).

La inmunización de ratones con la proteína recombinante TcP28 genera una respuesta variada contra distintas zonas de la proteína, pero en los casos en que la respuesta es contra el epítipo R13 los ratones desarrollan taquicardias supraventriculares letales. Esto sugiere que altos títulos de anticuerpo anti-R13 son los responsables de la estimulación sostenida del β_1 -AR en el corazón. Estos resultados fueron confirmados luego mediante la creación de un anticuerpo monoclonal anti-R13 (mAb 17.2) que posee una gran actividad estimuladora del β_1 -AR (Mahler y col, 2001).

1.1.6 LOS ANTICUERPOS

Los anticuerpos son moléculas de un peso molecular aproximado de 150 kDa, pertenecientes al grupo de las inmunoglobulinas (Ig). La capacidad de reconocimiento de un anticuerpo radica en las secuencias variables de sus cadenas proteicas, generadas por recombinación génica en el proceso de maduración de los linfocitos B. La combinatoria de estas secuencias puede producir más de un billón de secuencias diferentes (Figura 1-5).

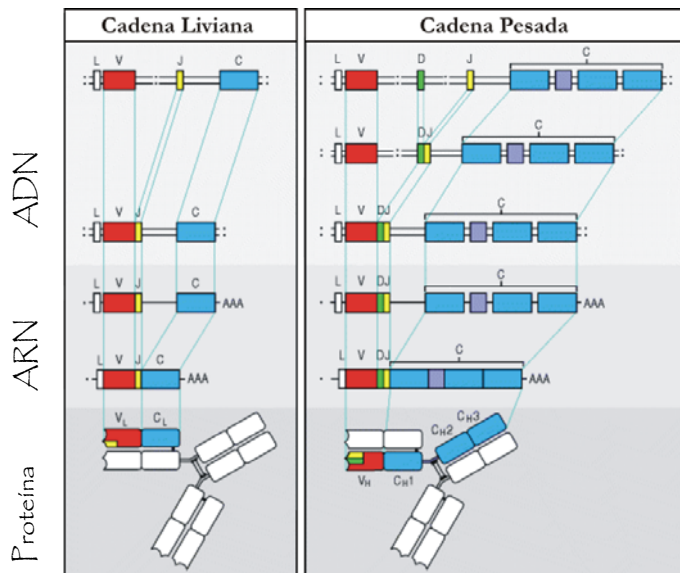


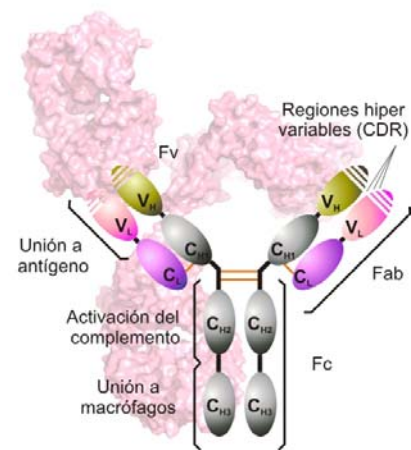
Figura 1-5. Generación de un anticuerpo. Esquema de los eventos de recombinación somática y splicing que culminan en el ensamble de dos cadenas pesadas (100 KDa) y dos cadenas livianas (50 KDa), unidas por puentes disulfuro.

A nivel genético, los genes estructurales que codifican las Ig se organizan en forma de exones discretos, los cuales corresponden a dominios completos en la proteína (Figura 1-5), encontrándose separados por regiones intrónicas. De igual manera, a nivel proteico, la organización estructural-funcional de las Ig es en forma de módulos discretos, llamados dominios, en donde se encuentra almacenada la información necesaria para realizar una función específica.

Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgM, IgG, IgA, IgE e IgD, formadas por una unidad básica compuesta de dos cadenas polipeptídicas globulares pesadas (H) y dos cadenas livianas (L) unidas entre sí por puentes disulfuro. Ambas cadenas presentan una zona constante (C) y una zona variable (V). En esta última, se encuentra una región hipervariable formada por 10 a 15 aminoácidos que conforman el paratope del anticuerpo, responsable de la unión con el epítipo presente en el antígeno (Figura 1-6).

Figura 1-6. Estructura básica de un anticuerpo.

Los componentes de la cadena pesada (V_H y C_H) junto con los de la cadena liviana (V_L y C_L) son esquematizados, junto con los puentes disulfuro que ensamblan las cadenas (líneas naranjas) y las características de cada dominio.



Al ser sometida a digestión por papaína, esta molécula genera dos fragmentos, el fragmento Fab responsable de la unión con antígeno y el fragmento Fc que determina diversas funciones biológicas en las diferentes Ig. El fragmento Fab está formado por una región constante y una región variable de una cadena pesada (V_H-C_H) y de una cadena liviana (V_L-C_L). El fragmento Fc está formado sólo por regiones constantes de cadenas pesadas.

Las clases de inmunoglobulinas están determinadas por los diferentes isotipos de las cadenas pesadas. Estas pueden ser mu, gamma, alfa, delta o epsilon. Las cadenas livianas pueden ser kappa o bien lambda. Las distintas clases de inmunoglobulinas presentan diversas funciones biológicas.

Por lo tanto, es posible clonar una pareja de regiones V_H y V_L responsables de una especificidad de interés, y ensamblarla en la forma de un anticuerpo funcional de diversas maneras (Morrison, 1992). Existe un número considerable de sistemas de expresión que están actualmente disponibles para este fin (Coloma y col, 1992), entre ellos, líneas celulares eucariotas soportan apropiadamente los procesos asociados a la expresión, síntesis, ensamblaje y modificaciones post-traduccionales de los anticuerpos recombinantes (Trill y col, 1995). En organismos procariotas, el conocimiento detallado del genoma, arquitectura y ciclo de vida de bacteriófagos filamentosos y del fago lambda han permitido el desarrollo de la técnica de "phage display" la cual permite la expresión, en estos fagos, de grandes repertorios de Ac (Rader y Barbas, 1997; Vaughan y col, 1996) y con ello, la posibilidad de seleccionar los anticuerpos mas reactivos a gran escala.

Los anticuerpos recombinantes constituyen, un conjunto bastante heterogéneo de proteínas artificiales en el que se pueden distinguir dos grandes grupos. El primero incluye moléculas completas de anticuerpo, similares a las conseguidas en forma natural, en las cuales están presentes los dos elementos estructurales, permitiendo así la funcionalidad de la molécula; esto es, las porciones F_{ab} y F_c (Figura 1-7). Los anticuerpos quiméricos y humanizados son ejemplos representativos de este grupo. El otro grupo está formado por un conjunto más heterogéneo de proteínas, basadas en la estructura de las Ig. Éstas pueden encontrarse en la forma de entidades recombinantes autónomas (fragmentos tipo F_{ab} , F_v de cadena única -sc F_v -, "diabodies", "triabodies", etc.), o como proteínas de fusión (moléculas en las que se combina la porción F_c o F_{ab} con propiedades nuevas provistas por una toxina, una enzima, un receptor celular, una citoquina, etc.).

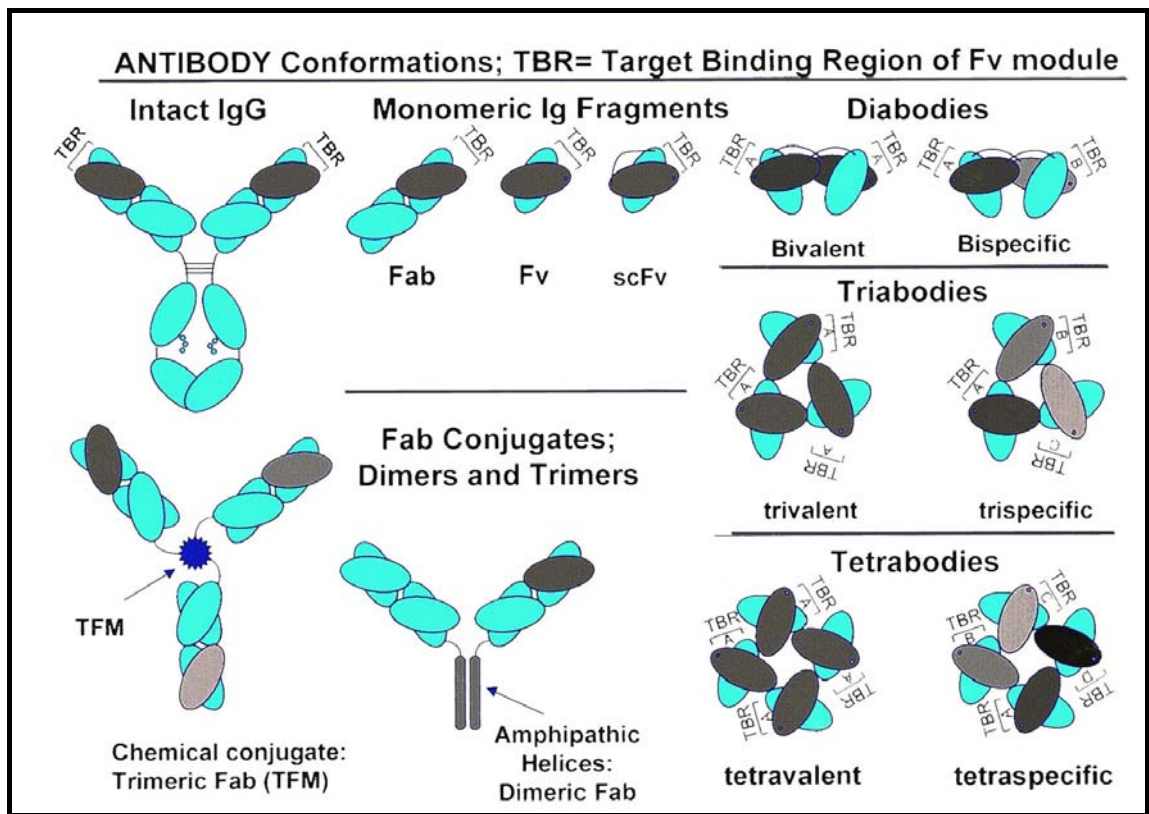


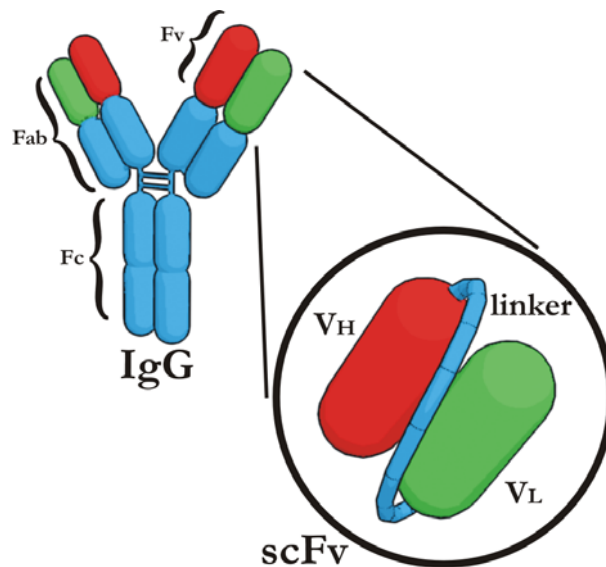
Figura 1-7. Esquemas de la estructura de distintos anticuerpos recombinantes. Representación de una Ig (bivalente), fragmentos monoméricos derivados de la Ig (Fab, Fv, scFv), distintos grados de oligomerización de los scFv (diabodies, triabodies y tetrabodies) y anticuerpos conjugados (Hudson y Kortt, 1999).

Existen diversos sistemas de expresión de anticuerpos recombinantes. En procariotas, la expresión se dirige al periplasma ya que en este espacio se pueden formar con mayor eficiencia los enlaces disulfuro esenciales para la actividad del anticuerpo. Los sistemas de expresión eucariotas, como la levadura *P. pastoris* (Luo y col, 1997), hongos filamentosos (Frenken y col, 1998), células de insecto (Holvoet y col, 1991) y células de mamífero (Rode y col, 1999) son, por lo general, más eficientes pero también más costosos.

1.1.7 ANTICUERPOS RECOMBINANTES DE CADENA ÚNICA

El sitio de reconocimiento del antígeno en un anticuerpo está formado por los dominios variables de la cadena pesada (V_H) y de la cadena liviana (V_L), y es el menor fragmento que mantiene de forma consistente la especificidad y afinidad de todo el anticuerpo. La construcción de anticuerpos de cadena única (scFv) consiste en combinar una V_H con una V_L mediante una secuencia polipeptídica (linker) que actúa como región bisagra (Figura 1-8).

Figura 1-8. scFv. Los anticuerpos de cadena única se construyen uniendo los dominios variables mediante un polipéptido (linker) flexible de longitud variable.



Estudios de Resonancia Magnética Nuclear comparando el paratope de distintos scFv y los anticuerpos monoclonales de los que provienen, demostraron que la estructura del scFv es similar a la de su monoclonal, y que el linker es un péptido altamente flexible y móvil con una estructura enrollada aleatoria (Freund y col, 1994).

Los linkers más utilizados tienen secuencias formadas por filas de glicinas y serinas (que aportan flexibilidad), intercalados con residuos cargados, como Lisinas y ácido glutámico (que aumentan la solubilidad del linker). Cambiando la longitud del linker es

posible construir anticuerpos recombinantes con distintas valencias. De esta manera si el linker tiene más de 12 residuos, el scFv es monomérico (mostrando una sola valencia), mientras que entre 3-12 aminoácidos (aa), el linker no tiene el tamaño ni la flexibilidad para que los dominios de la misma molécula se asocien entre sí, lo que conlleva a la formación de dímeros de scFv (Tabla 1-2).



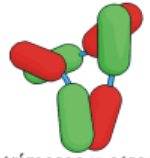
Secuencia	Estructura
Linker largo, mayores a 12 aa	 <p>monómeros</p>
Linker corto, entre 3 y 12 aa	 <p>dímeros</p>
Linker menores a 5 aa	 <p>trímeros u otros multímeros</p>

Tabla 1-2. Valencias de los scFv. La disposición de los Dominios V y la longitud del linker generan diferentes grados de oligomerización en los scFv.

No solo la longitud del linker determina el plegamiento del anticuerpo, sino también la orientación de los dominios variables en el scFv final (Hudson y Kortt, 1999). Por lo tanto cada anticuerpo puede presentar propiedades distintas las cuales deben ser ensayadas en cada caso.

1.2 ANTECEDENTES

El laboratorio de Biología Molecular de la enfermedad de Chagas, tiene una gran trayectoria en el estudio de la Cardiomiopatía Chagásica Crónica. Entre muchos estudios publicados hay dos que voy a explicar a continuación, que constituyen las bases del presente trabajo.

El primer trabajo “Modulation of Cardiocyte Functional Activity by Antibodies against *Trypanosoma cruzi* Ribosomal P2 Protein C Terminus” (Sepulveda y col, 2000) explica la relación entre la inmunoreactividad contra el extremo C-terminal de la proteína P2B de *Trypanosoma cruzi* (TcP2B) y la patología cardíaca.

Utilizando 25 péptidos sintéticos que cubren toda la secuencia de la proteína TcP2B, se estudiaron los diferentes epítopes reconocidos por sueros de ratones crónicamente infectados con *T. cruzi* y por sueros de ratones inmunizados con la proteína TcP2B recombinante (Figura 1-9).

Se encontraron marcadas diferencias en la inmunoreactividad de los diferentes sueros ya que los ratones inmunizados presentaron reacciones contra las regiones central, media y C-terminal, mientras que los sueros de ratones infectados solo reconocen la región C-terminal (Figura 1-9). Esta región se encuentra altamente conservada en las proteínas P de *T. cruzi* (péptido R13, EEEDDDMGFGLFD) y mamíferos (péptido H13, EESDDDMGFGLFD) pero el suero de los ratones inmunizados, solo reconoce el péptido R13.

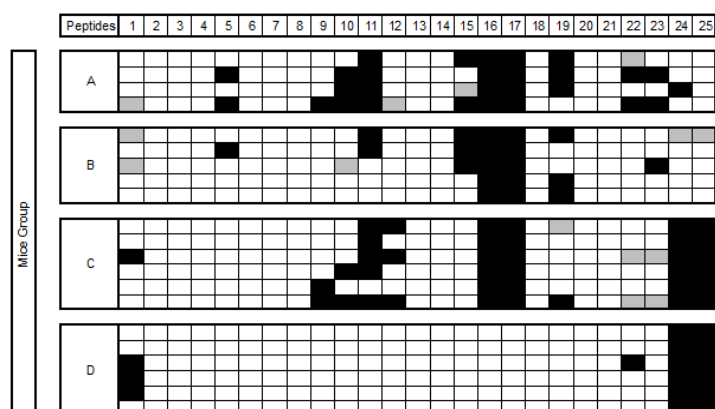


Figura 1-9. Mapa de los epítopes reconocidos por los sueros de ratones. **Grupo A:** Inmunizados con TcP2B-GST y adyuvante de Froin completo (CFA). **Grupo B:** Inmunizados con TcP2B-GST y Alumina.

Grupo C: Inmunizados con TcP2B-HIS y CFA. **Grupo D:** Infectados crónicamente con *T. cruzi*. Negro indica una alta respuesta y Gris una baja respuesta contra el péptido ensayado.

Utilizando estos sueros con distintos perfiles de reacción fue posible demostrar que solo los anticuerpos específicos contra la región C-terminal de TcP2B pueden generar un aumento en la frecuencia de latidos de cardiomiocitos de rata neonatales en cultivo (Tabla 1-3) por estimulación del β_1 -AR. De esta manera, los anticuerpos contra la región C-terminal de la proteína TcP2B desarrollados en ausencia de una infección son capaces de modular la actividad cardíaca a través de mecanismos de mimetismo molecular.

Tabla 1-3. Efecto agonista de sueros anti-R13. Se utilizaron IgGs purificadas de los ratones inmunizados con TcP2B-GST y alumina (grupo B), TcP2B-HIS y CFA (grupo C) y de ratones crónicamente infectados (grupo D).

Mouse Group	Purified antibodies	Antibodies +bisoprolol	Antibodies + atropine
Control	1.08 ± 0.88	ND	0.4 ± 0.92
B1	2.2 ± 1.16	ND	2.0 ± 1.24
C1	12.8 ± 1.32	0.6 ± 1.16	18 ± 1.56
C2	16.6 ± 1.36	0.6 ± 1.56	21.2 ± 1.4
D1	20.8 ± 1.04	12 ± 1.12	26.8 ± 1.04

El aumento en la frecuencia de latidos por minuto y el desvío estándar fue determinado del promedio de 10 mediciones diferentes. El bloqueante específico beta 1, bisoprolol (1 μ M) y el agonista beta, atropina (1 μ M) fueron agregadas en experimentos diferentes. ND: experimento no realizado.

El segundo trabajo “A monoclonal antibody against the immunodominant epitope of the ribosomal P28 protein of *Trypanosoma cruzi* interacts with the human β 1-adrenergic receptor” (Mahler y col, 2001) informa la creación de un anticuerpo monoclonal anti-R13 (mAb 17.2), utilizando las técnicas de inmunización descritas en el trabajo anterior y caracteriza la reactividad de este anticuerpo.

El mAb 17.2 reconoce las cinco proteínas P de *T. cruzi*, dado que cuatro de ellas poseen el epítipo R13 (EEEDDDMGFGLFD) y la quinta un epítipo muy similar, llamado P015 (EEEDDDDDFGMGALF). Utilizando la técnica de reemplazo por alaninas se realizó el mapeo del epítipo encontrándose como principales residuos para la interacción eeEdDDmGFglfd. Mediante la técnica de “surface plasmon resonance” (SPR, Biacore) se determinó un $K_d=3$ nM por la proteína entera y utilizando el péptido R13, un $K_i=400$ nM. El mismo análisis hecho con el péptido correspondiente al extremo C-terminal de las proteínas P humanas (H13, EESDDDMGFGLFD) muestra un $K_i=2\mu$ M. No se pudo obtener ninguna medición con el péptido correspondiente al segundo bucle extracelular del β_1 -AR (péptido H26R, HWWRAESDEARRCYNDPKCCDFVTNR).

Utilizando cardiomiocitos de rata neonatales en cultivo se demostró que el mAb 17.2 tiene actividad agonista que puede ser bloqueada tanto por el antagonista específico beta 1 adrenérgico, bisoprolol como por agregado de los péptidos R13 y/o H26R (Figura 1-10).

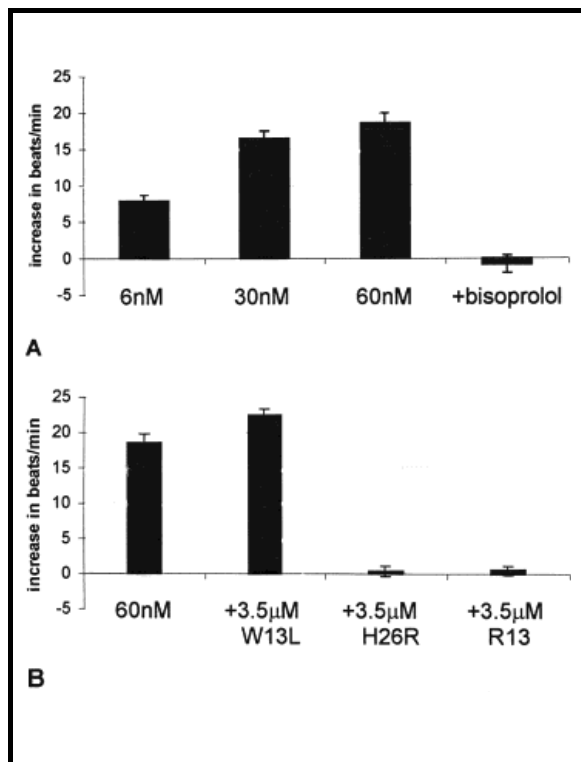


Figura 1-10. Efectos cronotrópicos del mAb 17.2 en cultivos de cardiomiocitos de rata neonatales. A. Respuesta dosis dependiente del mAb 17.2 y reversión del efecto por agregado del beta bloqueante bisoprolol (1μM). B. Inhibición de la respuesta máxima por preincubación con los péptidos H26R y R13. Por el contrario el péptido W13L, derivado del primer bucle extracelular del β_1 -AR, no produce ninguna inhibición del efecto cronotrópico.

Estos resultados confirman el posible rol patogénico de anticuerpos anti-R13 basado en la capacidad para reaccionar de manera cruzada con el β_1 -AR.

1.3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Dado que el anticuerpo monoclonal 17.2 presentó evidencias funcionales de reacción cruzada con el β_1 -AR pero no se pudo demostrar su pegado al receptor, el presente trabajo se propone:

- Construir anticuerpos recombinantes de cadena única derivados del anticuerpo monoclonal 17.2.
- Estudiar el efecto de linkers de longitud variable y el orden de clonado de los genes variables (V_H - V_L o V_L - V_H) en la actividad de dichos anticuerpos.
- Utilizar los anticuerpos recombinantes como herramientas para comprender las bases estructurales de la reactividad cruzada entre anticuerpos dirigidos contra el epítipo R13 y el segundo bucle extracelular de receptores cardíacos.
- Estudiar la propiedad de estos anticuerpos para inducir los síntomas cardíacos en ensayos de transferencia pasiva.

Resultados

Capítulo 1

1.4.1 CONSTRUCCIÓN Y SELECCIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES DE CADENA ÚNICA A PARTIR DEL mAb 17.2

El ARN mensajero codificante para el anticuerpo monoclonal (mAb) 17.2 fue obtenido del cultivo de híbridomas y copiado a ADNc. Este fue utilizado como molde para amplificar, mediante la técnica de PCR, los genes V_H y V_L . Los primers utilizados son universales y corresponden a secuencias conservadas en los genes variables de inmunoglobulinas (Ig). Una vez amplificadas las cadenas V_H y V_L se realizó una segunda PCR para agregar los sitios de restricción y unir por superposición las cadenas (Figura 1-11). Con esta estrategia (PCR overlap) se ensamblaron cuatro tipos distintos de anticuerpos de cadena simple o scFv:

1. Sentido V_H - V_L con péptido de unión corto (GGSGG).
2. Sentido V_H - V_L con péptido de unión largo (GGGGG)₃.
3. Sentido V_L - V_H con péptido de unión corto (GGSGG).
4. Sentido V_L - V_H con péptido de unión largo (GGGGG)₃.

Todas las construcciones fueron clonadas en el vector pHenII entre los sitios SfiI y NotI. Este vector es un fagémido que permite la expresión de los anticuerpos, tanto en la superficie de la cápside del fago M13 como en solución, gracias a un codón ámbar que puede ser leído como un stop o un glutámico dependiendo de la cepa de *E. coli* en que se encuentre. La utilización de este vector permitió la selección de los scFv reactivos mediante la técnica de “phage display” (Figura 1-11).

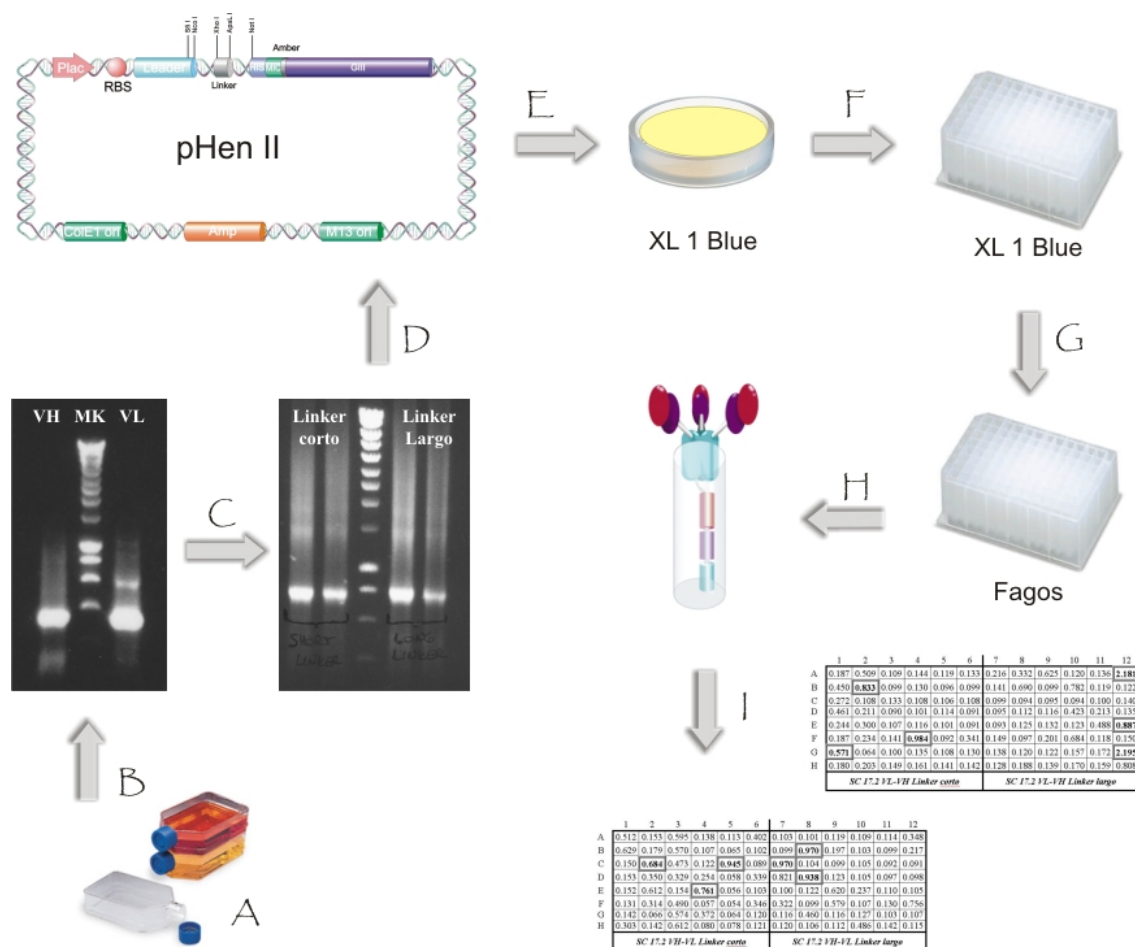


Figura 1-11. Construcción y selección de los scFv. A. Extracción de ARN y obtención del ADNc a partir de hibridomas productores del mAb 17.2. B. PCR para la amplificación de los genes VH y VL. C. PCR overlap para ensamblar las cadenas en distintos ordenes y con distintos péptidos de unión en cada caso. Los sitios de restricción son introducidos en este paso. D. Clonado en el vector pHenII entre los sitios Sfi I y Not I. E. Transformación de *E. coli* XL1 Blue electrocompetentes. F. Selección de 48 clones de cada tipo. G. Infección con fago helper. H. Producción de fagos con el anticuerpo. I. ELISA con los anticuerpos fusionados a los fagos para la selección de los clones.

Se seleccionó el anticuerpo más reactivo de cada tipo en un ELISA con fagos, y los llamamos: **C5** (VH-VL, péptido de unión corto), **B7** (VH-VL, péptido de unión largo), **F4** (VL-VH, péptido de unión corto) y **G12** (VL-VH, péptido de unión largo).

Todas las construcciones fueron secuenciadas y comparadas con los genes correspondientes a las líneas germinales de Ig de ratón. La secuencia de la región V_H tiene un 98% de identidad con la cadena pesada MRL-DNA4 (PMID M21470) (Figura 1-12 A) al igual que la región V_L que comparte un 98% de homología con la cadena liviana bd2 (PMID AJ231196) (Figura 1-12 B).

A	
17.2 20	-----CTGGGGGAAGATTGGTGCAGCCTAAAGGGTCATTGAAACTC 60
MRL 1	GAGGTGCAGCTTGTGAGA....t...G..... 60
	E V Q L E E S G G R L V Q P K G S L K L
17.2 61	TCATGTGCAGCCTCTGGATTCAATACCAATGCCATGAACTGGGTCCGCCAGGCT 120
MRL 61C..... 120
	S C A A S G F S F N T N A M N W V R Q A
17.2 121	CCAGGAAAGGGTTTGAATGGGTGCTCGCATAAGAAGTAAAATTAATAATTATTCAACA 180
MRL 121G.....G..... 180
	P G K G L E W V A R I R S K I N N Y S T
17.2 181	TATTATGCCGATTCACTGAAAGACAGGTTCCACATCTCCAGAGATGATTACAAAGCATG 240
MRL 181 240
	Y Y A D S V K D R F T I S R D D S Q S M
17.2 241	CTCTATCTGCAAATGAACAACCTTGAAGGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGTGAGA 300
MRL 241 300
	L Y L Q M N N L K T E D T A M Y Y C V R
17.2 301	GGAACGACTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCT 342
MRL	-----
	G T T Y W G Q G T L V T V S

B	
17.2 7	-----GTGATGACACAGTCTCCACTCACTTTGTTCGGTTACCATTGGACAACCAGCCTCC 60
bd2 1	GATGTT.....c...A..... 60
	E L V M T Q S P L T L S V T I G Q P A S
17.2 61	ATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGGAAAGACATATTTGAATTGG 120
bd2 61 120
	I S C K S S Q S L L D S D G K T Y L N W
17.2 121	TTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGCCTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGAC 180
bd2 121 180
	L L Q R P G Q S P K R L I Y L V S K L D
17.2 181	TCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATC 240
bd2 181 240
	S G V P D R F T G S G S G T D F T L K I
17.2 241	AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTTACATTTTCCG 300
bd2 241A.....- 299
	S R V E A E D L G V Y Y C W Q G S H F P
17.2 301	TACACGTTTCGGAGGGGGACCAAG 324
bd2	-----
	Y T F G G G T K

Figura 1-12. Secuencia de la cadena variable pesada (A) y la cadena variable liviana (B), correspondiente al mAb 17.2 y sus scFv derivados. Las secuencias nucleotídicas son comparadas con los genes de la línea germinal más cercanos. Las identidades están como puntos, las letras

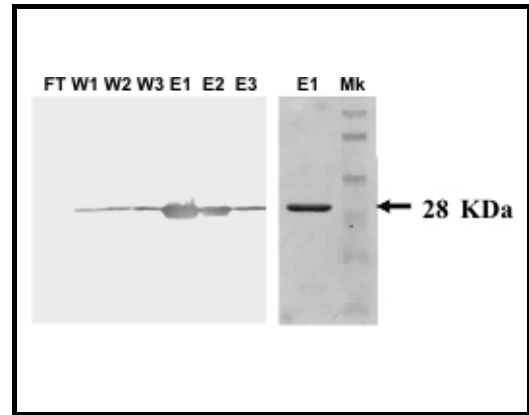
mayúsculas y minúsculas indican mutaciones que generan un cambio de aminoácido o silenciosas respectivamente. Se muestra también la secuencia aminoacídica de cada cadena. Las regiones hipervariables (CDR) están en negrita. En la sección 5.1 del anexo se muestra la secuencia completa del scFv C5.

1.4.2 EXPRESIÓN Y RENATURALIZACIÓN

Luego cambiamos a una cepa de expresión, *E. coli* HB2151, que lee el codón ámbar como stop y produce los scFv de manera soluble. Se ensayaron distintos protocolos de inducción, variando la densidad óptica a la cual se inducen los cultivos (0,6; 0,8 y 1), la concentración de IPTG utilizada (0,5 mM o 1 mM final), la temperatura de inducción (37, 30 y 20°C) y la presencia de glucosa en el medio de cultivo inicial. Los protocolos ensayados dan como resultado distintas cantidades de proteína final y distintas fracciones activas. La fracción activa de un anticuerpo es el porcentaje activo respecto del total de proteína producido. Por lo tanto se eligió la mejor relación cantidad/actividad, siendo el protocolo final:

Inocular con un cultivo saturado 2xYT-Amp-Glu (dilución 1:100), crecer a 37°C hasta $DO_{600}=1$, centrifugar y resuspender en medio 2xYT-Amp (libre de glucosa) con 1 mM IPTG, inducir 16 horas a 20°C. Cosechar las células y purificar los scFv del espacio periplásmico mediante columna de níquel. Con este protocolo la fracción activa obtenida es alrededor del 4% (Figura 1-13).

Figura 1-13. Purificación en columna de níquel de un extracto periplásmico del scFv C5. A la izquierda se muestra un western blot, los lavados se indican como W_n y las fracciones eluidas E_n. A la derecha se muestra un gel teñido con azul de coomasie del eluido 1.



No fue posible obtener un scFv F4 activo con ninguno de los protocolos ensayados a pesar de que la proteína se produce y purifica adecuadamente. En estas condiciones un ELISA de los cuatro anticuerpos recombinantes contra la proteína Tcp2B se muestra en el panel izquierdo de la figura 1-14. Por lo tanto sometimos todos los anticuerpos a un ensayo de renaturalización (refolding) *in vitro*. Bajo estas condiciones el scFv F4 recupera actividad pero la actividad original de aquellos scFv activos se ve disminuida (Figura 1-14, derecha). Por esta razón continuamos caracterizando las propiedades de los scFv C5 y B7 que constituyen un par V_H-V_L con péptido de unión corto y largo, respectivamente.

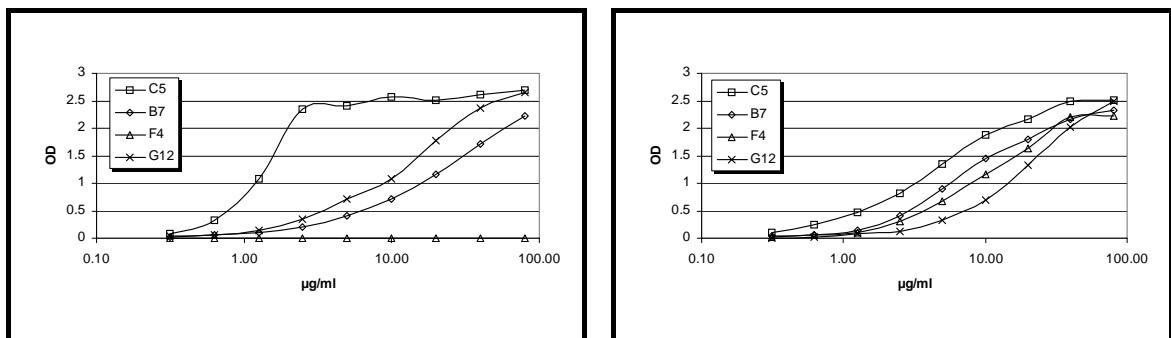


Figura 1-14. Reactividad en ELISA de los cuatro scFv derivados del mAb 17.2. A la izquierda se muestran todos los scFv purificados del espacio periplásmico y a la derecha los mismos luego del ensayo de refolding.

Dado que la longitud del péptido de unión determina el grado de oligomerización de los scFv (Kortt y col, 1997) utilizamos una columna Superdex-200 para comparar el estado de los scFv C5 y B7. La figura 1-15 muestra que el scFv C5 puro se comporta como dímero, mostrando un pico que corresponde aproximadamente a 55 kDa mientras que el scFv B7 corre como monómero, con un pico que corresponde a aproximadamente a 30 kDa.

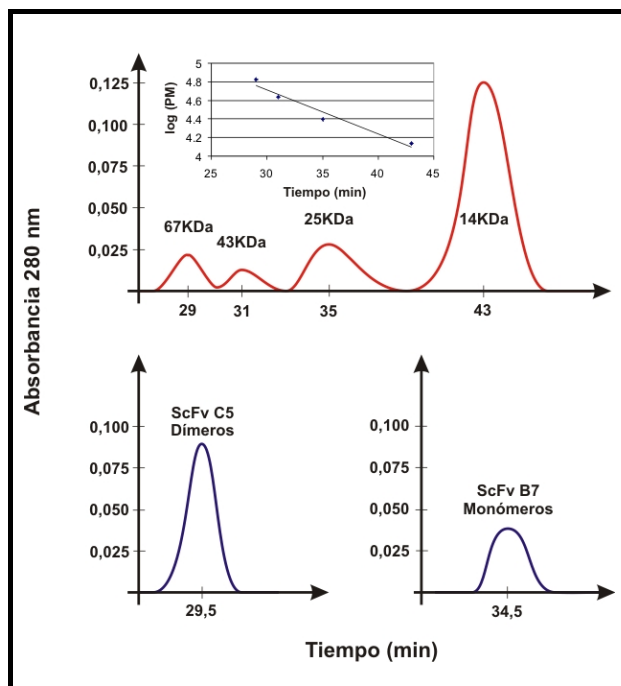


Figura 1-15. Cromatografía de los scFv C5 y B7 puros en Superdex 200. En el panel superior se indica el tiempo de elución de los marcadores de peso molecular: BSA 67 kDa, Ovalbumina 43 kDa, quimotripsinogeno 25 kDa y Ribonucleasa A 14 kDa. Se indica también la regresión lineal de los marcadores $R^2=0,962$. En el panel inferior se indican los tiempos de elución para los scFv C5 y B7.

1.4.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS scFv

Como se describió en los antecedentes, el mAb 17.2 reconoce las cinco proteínas ribosomales P de *T. cruzi*. Esto se debe a que cuatro de ellas poseen el epítipo R13: TcP1 α , TcP1 β , TcP2 α y TcP2 β y la quinta, TcP0 que posee un epítipo muy similar. De la misma manera, todos los scFv derivados del mAb reconocen las cinco proteínas P presentes en extractos totales de *T. cruzi* (Figura

1-16 A). Estos anticuerpos reaccionan con parásitos fijados en ensayos de inmunofluorescencia indirecta mostrando un patrón de tinción granular y citoplasmático, característico de una localización ribosomal (Figura 1-16 B).

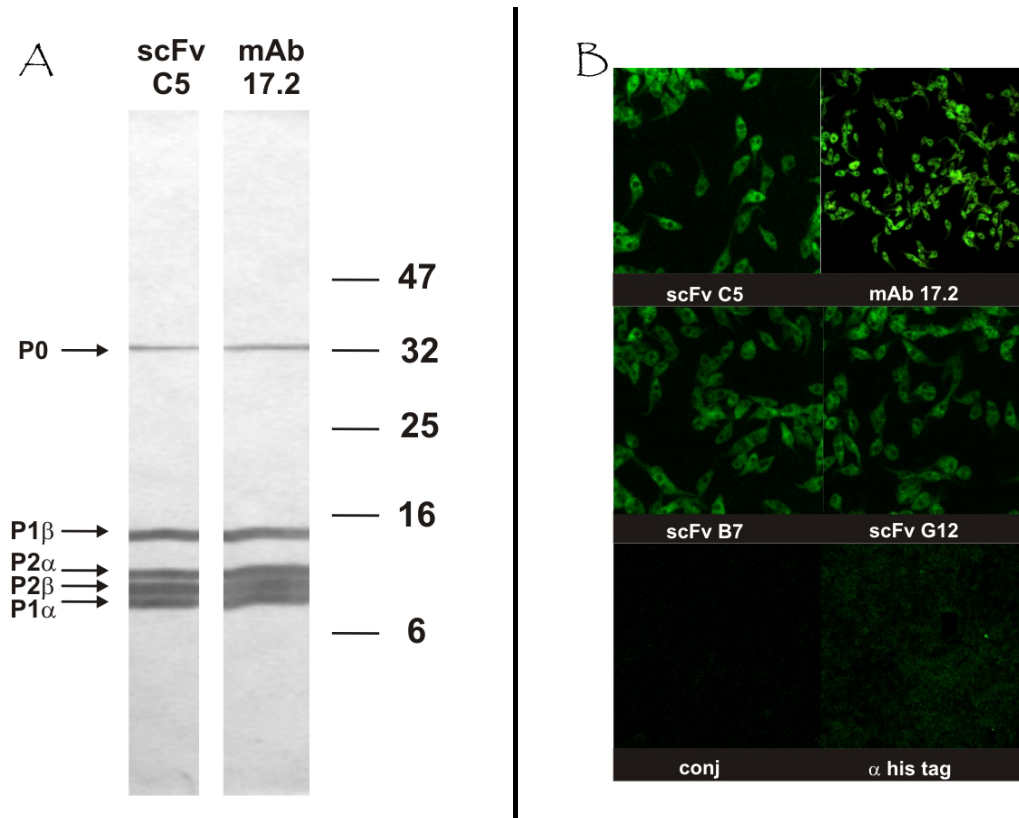


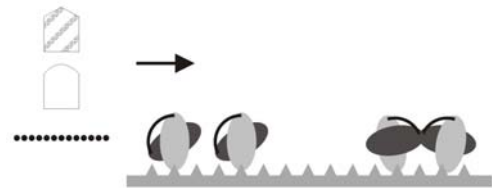
Figura 1-16. Reactividad de los scFv contra las proteínas ribosomales P de *T. cruzi*. A. Western blot del scFv C5 y mAb 17.2 contra fracciones purificadas de ribosomas de *T. cruzi*. A la izquierda se indican las 5 proteínas P identificadas. B. Inmunohistoquímica de parásitos fijados con los scFv y el mAb 17.2. Los controles de anticuerpo conjugado y anti-HIS se indican en la base.

Mediante la técnica de “Surface Plasmon Resonance” (SPR) (Malmqvist, 1999), se estudiaron las cinéticas de los scFv C5 y B7 y se compararon con la del mAb 17.2. Se analizó también la capacidad de reaccionar de manera cruzada con el péptido H26R, correspondiente al segundo bucle extracelular del receptor beta 1 adrenérgico (β_1 -AR). Para esto, utilizamos un equipo Biacore 3000 con tres configuraciones distintas de trabajo, tal como se ejemplifica a continuación:



A. scFv como ligandos

Utilizando un Chip que fija níquel en una matriz NTA, se fijaron los scFv C5 y B7 mediante la marca de histidinas y se inyectaron en solución la proteína recombinante TcP2β-HIS y el péptido H26R.



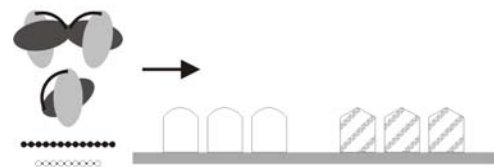
B. scFv como analitos



Utilizando un Chip CM5 que une covalentemente las moléculas, se fijó la proteína recombinante TcP2β-GST junto a un control de GST y se inyectaron en solución los scFv C5 y B7.

C. Inhibiciones

En este tipo de ensayo se utilizó el chip descrito anteriormente donde se inyectan concentraciones distintas de péptido R13 y H26R junto con los scFv a fin de obtener las constantes de inhibición para cada péptido.



Previamente, se había determinado para el mAb 17.2 un K_d por la proteína TcP2B recombinante de 3 nM (anticuerpo como analito) y utilizando el péptido R13, un $K_i=400$ nM (inhibición) (Mahler y col, 2001).

En condiciones en las cuales los scFv se utilizaron como ligandos, el C5 mostró un K_d por TcP2B similar al mAb 17.2, 8nM pero el scFv B7 mostró una menor afinidad por la proteína, $K_d= 46$ nM. Sin embargo, al utilizar los scFv como analitos sobre la proteína TcP2B-GST la afinidad aparente para C5 fue 0,2nM. Utilizando las mismas condiciones para el scFv B7, se obtuvo un $k_d= 20$ nM. Estos resultados subrayan la importancia de la avidez de las construcciones dejando en evidencia el carácter dimérico de C5 a diferencia del estado monomérico de B7. Otro resultado importante es que el scFv C5 posee mayor afinidad por TcP2B que el mAb 17.2, por lo que puede ser un mejor modelo para el estudio de las reacciones cruzadas.

Aunque el mAb 17.2 había mostrado en trabajos previos (Mahler y col, 2001) la capacidad de estimular el β_1 -AR, no había sido posible medir de manera directa esta interacción. Ahora, utilizando el scFv C5 como ligando (Figura 1-17), fue posible obtener una constante de afinidad por H26R (10 μ M) que nos permite comprender y analizar la capacidad de estos anticuerpos para reaccionar de manera cruzada con el receptor cardíaco. La relación entre las afinidades por los péptidos R13 y H26R obtenida, pone en evidencia una afinidad 20 veces menor por el péptido derivado del β_1 -AR (Tabla 1-4). Teniendo en cuenta que la afinidad por los péptidos es menor que por la proteína completa no sería extraño que la afinidad real por el receptor sea mayor a la calculada.

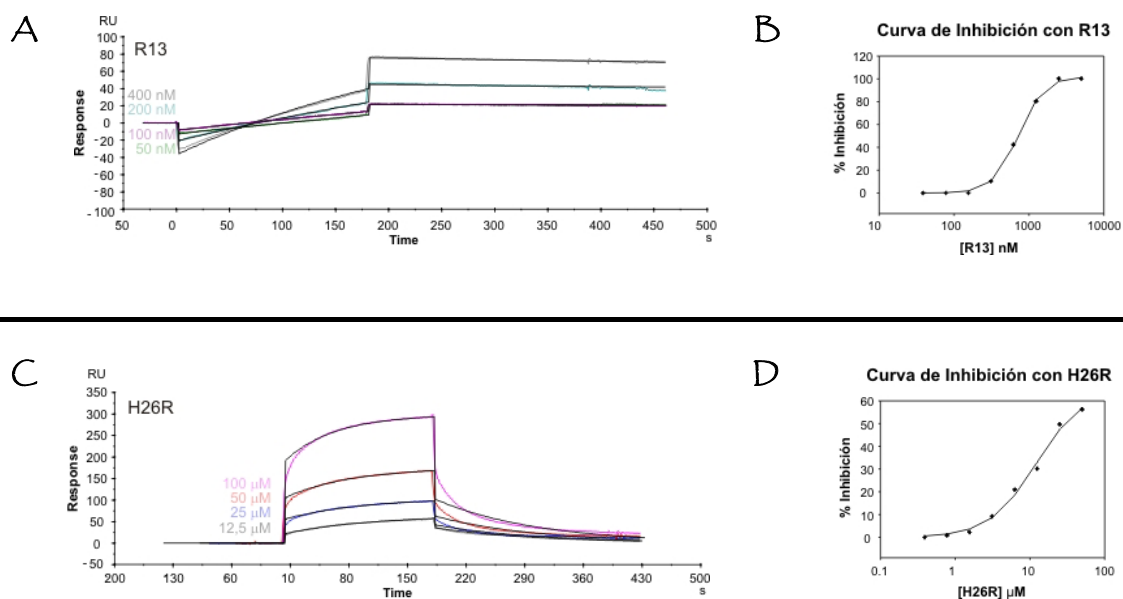


Figura 1-17. Mediciones en Biacore. **AyC.** Corresponden al scFv C5 utilizado como ligando con los péptidos R13 y H26R en solución, respectivamente. Las concentraciones utilizadas de cada péptido se indican en los sensogramas. **ByD.** Corresponden a los ensayos de inhibición de la interacción scFv C5-TcP2B, con los péptidos R13 y H26R en solución, respectivamente.

La especificidad de la interacción entre el péptido H26R y el scFv C5 fue confirmada luego con los ensayos de inhibición de la interacción entre C5 y TcP2B, obteniéndose un $IC_{50}=12\mu M$. En el mismo ensayo, se observa con el péptido R13 un $IC_{50}=725nM$. Si comparamos nuevamente con los resultados obtenidos en los ensayos donde scFv C5 se utilizó como ligando, encontramos nuevamente una afinidad 20 veces menor por el péptido derivado del β_1 -AR.

A continuación se resumen los parámetros cinéticos obtenidos en Biacore para los scFv C5 y B7 en las diferentes configuraciones ensayadas (Tabla 1-4).

Tabla 1-4. Parámetros cinéticos obtenidos en los ensayos de SPR. Se indican las tres configuraciones ensayadas para los scFv C5 y B7. NR, no realizado.

		Ligando	Analito	Inhibición
scFv C5	TcP2B	K _d =8 nM	K _d =0,2 nM	NR
	H26R	K _d =10 μM	NR	IC ₅₀ =12 μM
	R13	K _d =604 nM	NR	IC ₅₀ =725 nM
scFv B7	TcP2B	K _d =46 nM	K _d =20 nM	NR

La capacidad para reconocer y unir al β₁-AR fue determinada luego por inmunohistoquímica, utilizando células CHO establemente transfectadas con el β₁-AR humano. Tanto el scFv C5 como el B7 tiñen las células transfectadas, observándose principalmente una marcación en la membrana y el citoplasma. Esta reacción fue competida exitosamente con los péptidos R13 y H26R, demostrando, una vez mas, la especificidad de la reacción (Figura 1-18).

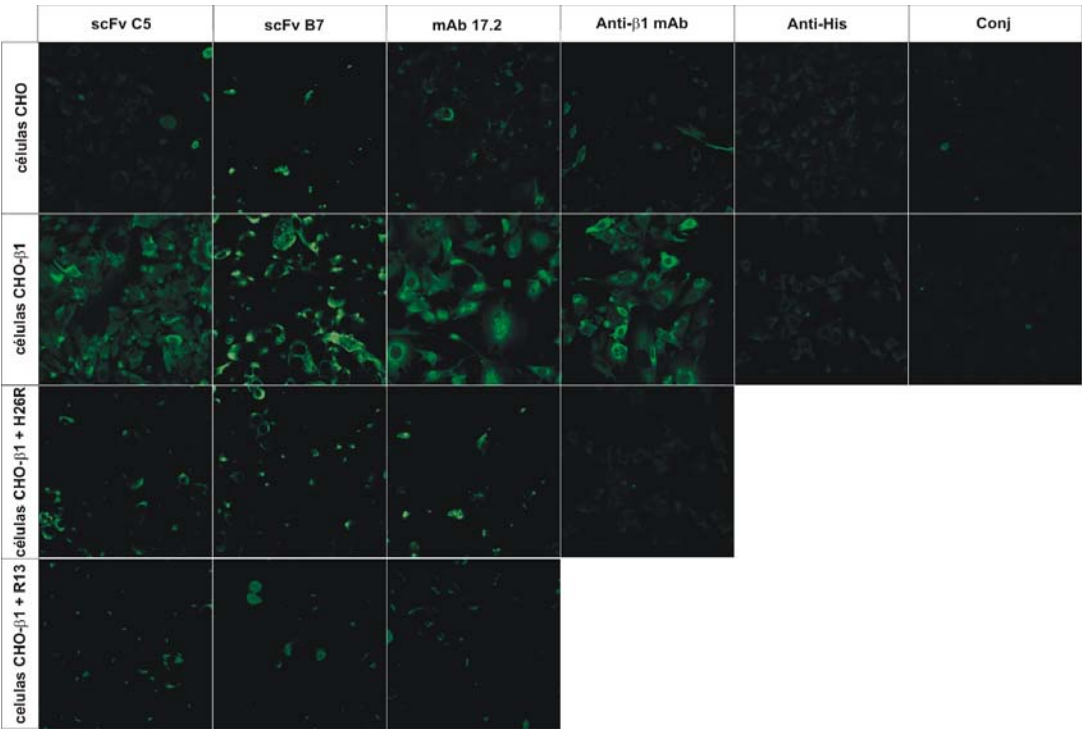


Figura 1-18. Inmunohistoquímica sobre células CHO- β_1 . Las reactividades de los scFv C5 y B7 y los mAbs 17.2 y anti- β_1 se muestran junto a los controles de anticuerpo conjugado y anti-HIS, como así también la competencia con los péptidos H26R y R13.

1.4.4 ACTIVACIÓN DEL β_1 -AR

El β_1 -AR es un receptor de siete pasos transmembrana acoplado a proteína Gs. Como producto de la activación, la proteína G heterotrimérica hidroliza GTP y se disocian sus subunidades, la subunidad $G_{\alpha s}$ activa la adenilato ciclasa que produce el primer mensajero intracelular de la cascada de señalización, el AMP cíclico (Figura 1-19). Luego el AMPc activa la proteína quinasa A (PKA) y ésta fosforila miles de moléculas blanco en la célula. Estos eventos *in vivo* se traducen en aumento de la fuerza de contracción de los cardiomiocitos, de la frecuencia de latidos y de la velocidad de conducción del nódulo atrio-ventricular (AV).

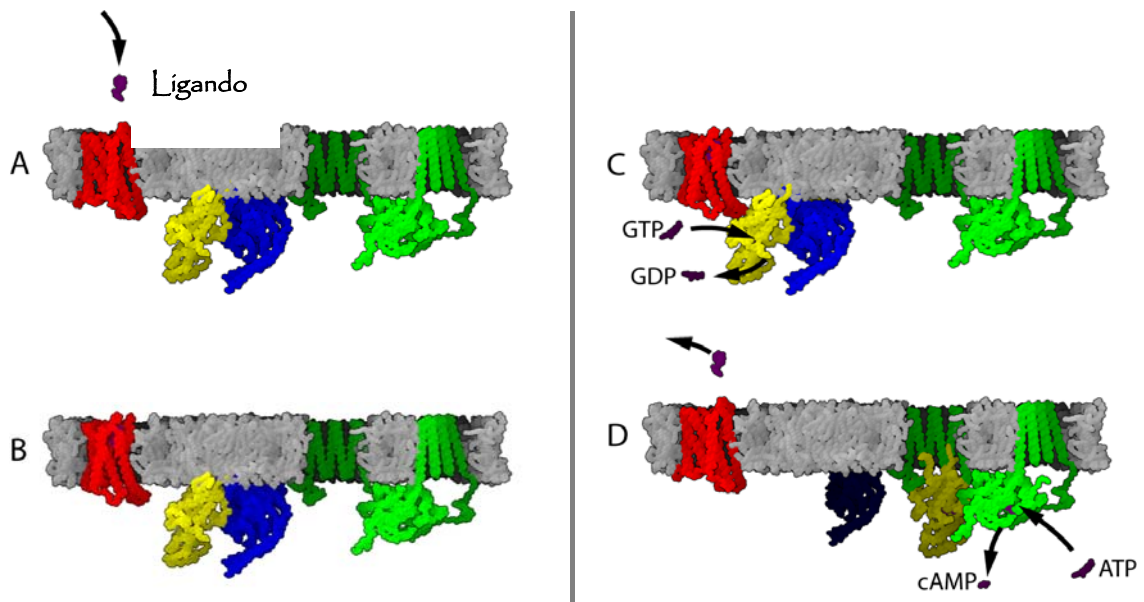


Figura 1-19. Esquema de la activación del β_1 -AR. A. El receptor es activado por un ligando y se produce un cambio conformacional en la cara citoplasmática. B. Esto permite la interacción con la proteína G heterotrimérica. C. Ésta hidroliza GTP y se disocian sus subunidades. D. La

subunidad $G\alpha$ activa una enzima de membrana, la adenilato ciclasa, que sintetiza el primer mensajero de la cascada de señalización el AMP cíclico (cAMP).

El hecho de que los scFv se unan al receptor no implica que tengan un efecto sobre la activación de este. Por lo tanto, las mismas células fueron utilizadas para determinar las propiedades farmacológicas de los scFv C5 y B7 y compararlas con las del mAb 17.2.

De esta manera, la activación del β_1 -AR fue seguida midiendo los cambios en la concentración de AMPc, primer intermediario de la cascada de señalización, al someter las células en cultivo a distintos tratamientos con los anticuerpos y también con agonistas beta adrenérgicos como el Isoproterenol (ISO) (Figura 1-20).

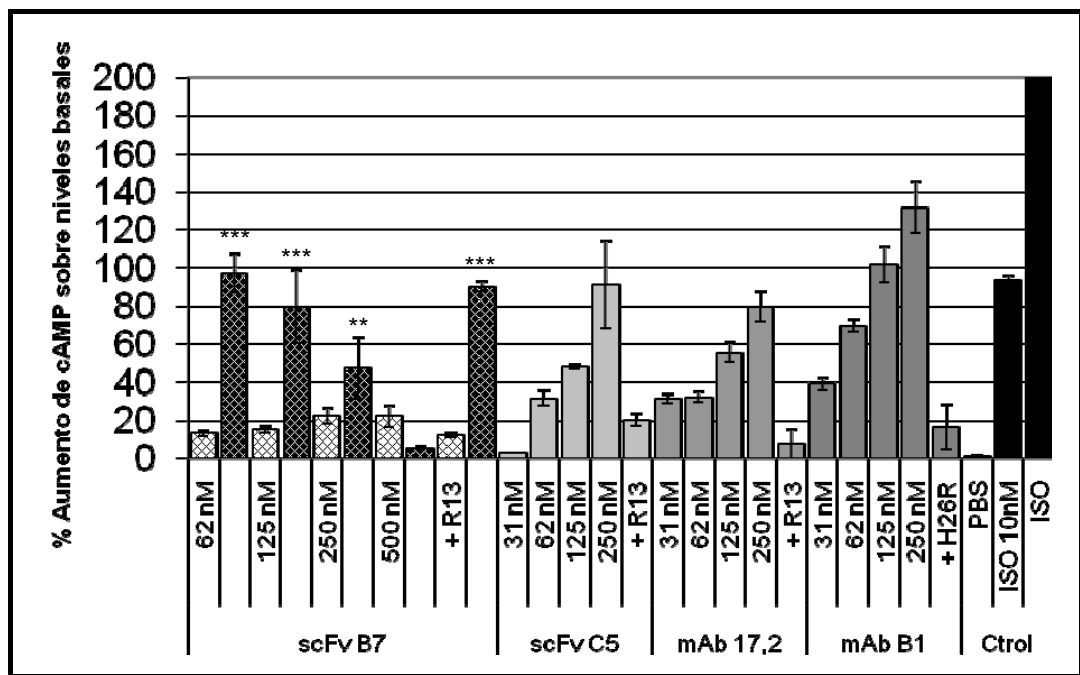


Figura 1-20. Cambios en los niveles de AMPc en células establemente transfectadas con el β_1 -AR humano. Las células fueron incubadas con distintas concentraciones de scFv C5, scFv B7, mAb 17.2 y mAb anti- β_1 -AR. En el caso de B7 las barras claras representan el agregado del scFv solo mientras que las barras oscuras representan el agregado del scFv más isoproterenol 10nM. Los

asteriscos indican los resultados estadísticamente diferentes para el ensayo con y sin isoproterenol, $p < 0,05$ test de Student.

El scFv C5, al igual que el mAb 17.2 tiene la capacidad de estimular al β_1 -AR en función de la concentración. Este fenómeno también se observó con el mAb específico anti- β_1 -AR, que reconoce la región del segundo bucle extracelular del receptor (Mobini y col, 2000). En estas condiciones el scFv B7 no tiene efecto aparente sobre la producción de cAMP. Como control positivo del ensayo se utilizó ISO $1\mu\text{M}$, un potente agonista del receptor. Luego buscamos una concentración de ISO que tenga un efecto sobre las células comparable al de los anticuerpos, aprox 10 nM , para estudiar los efectos de la adición de los scFv y el agonista juntos. De esta manera se puso en evidencia que el scFv B7 tiene la capacidad de bloquear la activación del receptor inducida por ISO. Estos resultados indican que el scFv B7 (monomérico) se une al receptor actuando como antagonista, mientras que el scFv C5 (dimérico) se une al receptor actuando como agonista.

Estas observaciones fueron luego confirmadas *in vitro*, estudiando el efecto de los scFv en la frecuencia de latidos de cultivos de cardiomiocitos de rata neonatales que laten espontáneamente. En este ensayo el scFv C5 tiene un efecto cronotrópico positivo que es totalmente desplazado por el agregado del bloqueante beta adrenérgico propanolol (Figura 1-21) indicando una activación específica del β_1 -AR. El scFv B7 no induce ningún efecto pero cuando se lo agrega antes que el ISO puede bloquear los efectos cronotrópicos positivos inducidos por el agonista. La intensidad de los efectos descritos depende de la concentración de scFv utilizada, con un efecto máximo a 250 nM . Estos resultados confirman la actividad

diferencial de un mismo anticuerpo en estado dimérico (C5) o monomérico (B7) sobre el β_1 -AR.

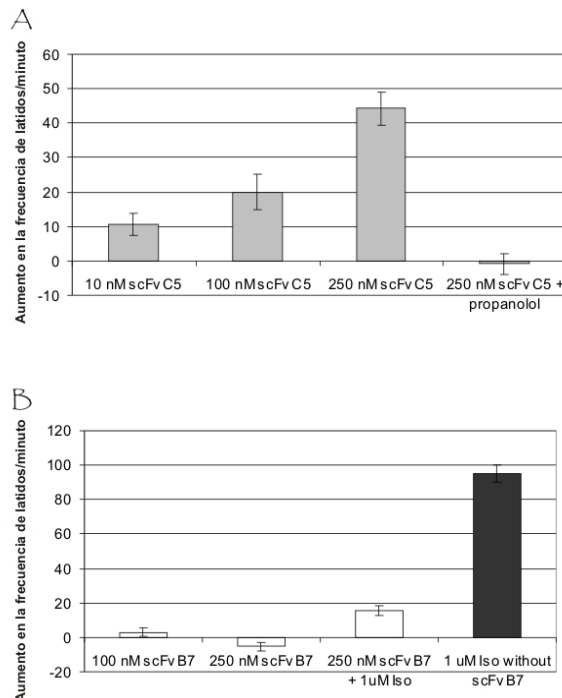
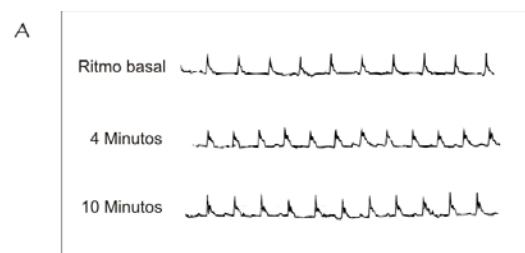


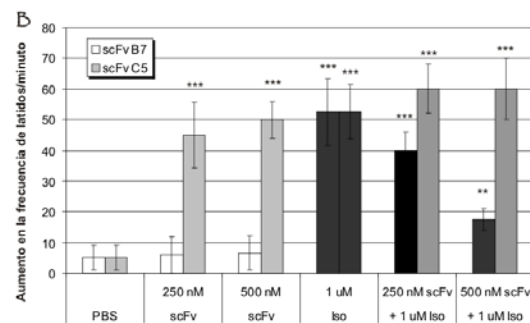
Figura 1-21. Efecto cronotrópico de los scFv C5 y B7 en cultivo de cardiomiocitos de rata neonatas. A. Respuesta dosis dependiente del tratamiento con scFv C5 y reversión del efecto por el bloqueante beta adrenergico propranolol 1 μ M. B. scFv B7 solo y junto a ISO (1 μ M), donde se puede ver la inhibición de la activación del agonista. El efecto se determina como aumento en la frecuencia de latidos por minuto.

Por último se realizó una caracterización fisiológica de los scFv C5 y B7, ensayando los efectos *in vivo* por transferencia pasiva de los anticuerpos recombinantes a ratones y monitoreo constante del electrocardiograma (ECG). El ensayo consiste en anestesiár los ratones, tomar un ECG de referencia e inyectar de manera intravenosa ISO, scFv C5, scFv B7 y scFv B7 seguido de ISO (Figura 1-22).

Figura 1-22. Transferencia pasiva de los scFv C5 y B7. A. Un ECG representativo del tratamiento de ratones BALB/c con 200 μ l de



scFv C5 250 nM i.v.. **B.** Aumento de la frecuencia cardíaca inducida por los scFv en los distintos tratamientos, a los 10 minutos post inyección. Las dos barras negras con ISO 1 μ M corresponden a las dos grupos experimentales (C5 y B7).



Los asteriscos indican los resultados estadísticamente diferentes de los tratamientos con solución salina solamente $p < 0.05$ en un test de Student.

El scFv C5 induce un aumento significativo de la frecuencia cardíaca al inyectar 200 μ l de una solución 250 nM, luego de 10 minutos de tratamiento. El mAb 17.2 también induce un aumento de la frecuencia cardíaca al inyectar 200 μ l de una solución 200 nM, luego de 30 minutos de tratamiento (dato no mostrado). Esta diferencia en el tiempo de respuesta se puede deber al tamaño de las moléculas utilizadas. El scFv es 5 veces más chico que el mAb y le puede permitir mayor penetrabilidad y rápida bio-distribución. En los dos tratamientos descriptos se observan en los ECG anomalías de repolarización y bloqueo AV de primer grado. Luego de los tiempos citados en cada caso la frecuencia de latido basal se recupera lentamente.

La inyección de ISO (2 mg/kg) induce un marcado aumento de la frecuencia cardíaca. Mientras que el tratamiento con el scFv B7 no produce efectos notorios en el ECG. Cuando se inyecta primero el scFv B7 y 5 minutos después el ISO, se bloquea la taquicardia inducida por el agonista. Este efecto se logra solo de esta

manera ya que si se inyectan ambas sustancias al mismo tiempo o el ISO primero no se puede desplazar el efecto del agonista.

1.4.5 MODELO DEL PARATOPE DEL ANTICUERPO

La existencia de la estructura tridimensional de un anticuerpo (PDB 1NBV) con alto grado de homología con las cadenas V_H y V_L del mAb 17.2 nos permitieron la creación de un modelo estructural del paratope. La estructura utilizada corresponde a un anticuerpo anti-ADN cristalizado con una resolución de 2Å (Herron y col, 1991). A nivel de aminoácidos ambas cadenas V_H y V_L del 1NBV tienen un 86% y 71% de identidad con las correspondientes cadenas del mAb 17.2 (Figura 1-23). Esto nos permitió construir un modelo *in silico* realista del sitio de unión al antígeno y fijar los péptidos derivados de TcP2B y del β_1 -AR para comparar las bases estructurales de la reactividad cruzada (Figura 1-24).

		CDR1	CDR2	
DNA H: 1	EVQPVETGGGLVQPKGSLKLSCAASGFSFN	INAMN	NWVRQAPGKGLEWVARIRSKSN	NYAT 60
17.2H: 1	EVQ E+GG LVQPKGSLKLSCAASGFSFN	NAMN	NWVRQAPGKGLEWVARIRSK	NNY+T 60
	EVQLEESGGRLVQPKGSLKLSCAASGFSFN	TNAM	NWVRQAPGKGLEWVARIRSK	INNYST 60
		CDR3		
DNA H: 61	YYADSVKDRFTISRDDSQNMLYLQMN	NLKTEDTAMYYCVRDQTGTAWFAY	WGQGLTVTS	120
17.2H: 61	YYADSVKDRFTISRDDSQ+MLYLQMN	NLKTEDTAMYYCVR T	YWQQGLTVTS	
	YYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMN	NLKTEDTAMYYCVRGTT-----	YWQQGLTVTS	114
		CDR1	CDR2	
DNA L: 1	DVVMQTPLSLPVS LGDQASISC	RSSQSLVHSNGNTYLH	WYLQKPGQSPKLLIY	KVSNRF 60
17.2L: 1	++VMTQ+PL+L V++G ASISC+SSQSL+ S+G TYL+W LQ+PGQSPK LIY VS			
	ELVMTQSPLTSLVTIGQPASISC	KSSQSLLDSDGKTYLN	WLLQRPQSPKRLIY	LVSKLD 60
		CDR3		
DNA L: 61	SGVPDRFSGSGSIDFTLKISRVEAEDLGVYFC	SQSTHVPLTF	GAGTK	108
17.2L: 61	SGVPDRF+GSGSG DFTLKISRVEAEDLGVY+C Q +H P TFG GTK			
	SGVPDRFTGSGSGDFTLKISRVEAEDLGVYYC	WQGSHPYTF	EGGGTK	108

Figura 1-23. Alineamiento de secuencias. La secuencia de aminoácidos de las cadenas V_H y V_L del mAb 17.2 (17.2H y 17.2L respectivamente) son comparadas con las del anticuerpo anti-ADN utilizado como molde (DNA H y DNA L). Los residuos del mAb 17.2 que establecen contacto

sólo con el péptido derivado de TcP2B están en rojo, aquellos exclusivos del péptido derivado del β_1 -AR están en azul y aquellos que establecen contactos con ambos péptidos están en verde.

Los péptidos que se modelaron en la estructura son residuos de 10 aminoácidos, derivados del extremo C-terminal de TcP2B, EDDDMGFGLF y del segundo bucle extracelular del β_1 -AR, ESDEARRCYN. La **figura 1-24** muestra que 9 de los 10 aminoácidos del péptido derivado de TcP2B podrían interactuar con 25 residuos de los CDRs, formando dos uniones salinas (Glu1-Arg H52 y Asp4-Lys L58) y 9 puentes de hidrógeno. En comparación, 9 de los 10 aminoácidos del péptido derivado del β_1 -AR aparecen interactuando con 21 residuos de los CDRs, formando tres uniones salinas (Glu1-Arg H52, Glu1-Arg H50 y Glu4-Lys L58) y 12 puentes de hidrógeno (**Figura 1-24**). Más aun, la Phe8 del péptido derivado de TcP2B queda rodeado de 4 residuos hidrofóbicos (Tyr L37, Leu L55, Trp L94 y Tyr L101) mientras que la Tyr9 en el péptido derivado del β_1 -AR queda rodeado de 3 residuos aromáticos (Tyr L37, Phe L99 y Tyr L101). Estas diferencias son las principales responsables de la baja energía intermolecular calculada, -965 Kcal/mol para el complejo del péptido derivado de TcP2B y el anticuerpo comparada con -504 Kcal/mol para el complejo del péptido derivado del β_1 -AR y el anticuerpo.

El modelo nos permitió estimar que el número de residuos en contacto, entendido como el número de residuos que tienen al menos un átomo a 3Å de cada residuo (12 de la V_H y 15 de la V_L para la interacción del péptido derivado de TcP2B y el scFv, y 11 de la V_H y 12 de la V_L péptido derivado del β_1 -AR y el anticuerpo) en el paratope es similar. Otra observación interesante que se desprende del modelo es que 20 de los residuos que están en contacto con péptido

derivado de TcP2B están en contacto con el péptido derivado del β_1 -AR, lo cual explica la capacidad de reaccionar de manera cruzada con ambos epítopes. Por último es de destacar que los residuos E1 y D4 del péptido derivado de TcP2B, (EDDDMGFGLF) establecen la mayor cantidad de uniones con el paratope, dejando en evidencia una vez más la importancia de estos residuos tal como se determinó con la técnica de reemplazo por alaninas para el mAb 17.2 (EddDmGFglf)(Malher y col, 2001). En la interacción con el péptido derivado de β_1 -AR, estas posiciones están ocupadas por el E1 y E4 (ESDEARRCYN), siendo los puntos de unión en el paratope los mismos para ambos péptidos.

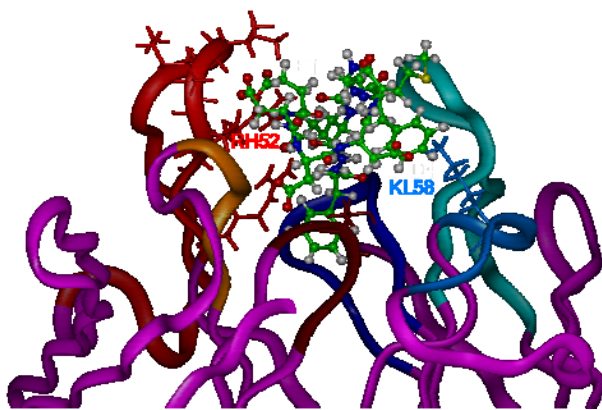
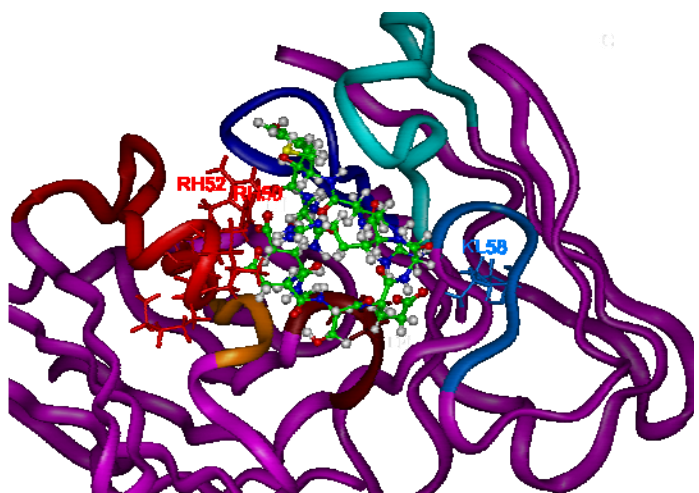


Figura 1-24. Modelo del paratope del anticuerpo. A la izquierda se muestra el modelo con el péptido derivado de TcP2B y a la derecha con el péptido derivado del β_1 -AR.

Los CDRs están representados en colores: CDRL1 celeste, CDRL2 azul, CDRL3 azul oscuro, CDRH1 naranja, CDRH2 rojo y CDRH3 marrón. Los aminoácidos del paratope involucrados en interacciones electrostáticas con los residuos del péptido E1 y D4/E4 se representan como sticks.



1.4.6 OTROS BLANCOS DE LOS scFv

Mahler y col, 2004; describieron que la fracción inmunopurificada de anticuerpos anti-R13 del suero de pacientes con Cardiomiopatía Chagásica Crónica, puede tener distintos efectos sobre los receptores cardíacos. Mediante cultivos de cardiomiocitos de ratas neonatales se determinaron los efectos cronotrópicos de los sueros inmunopurificados y se encontró que algunas fracciones anti-R13 generan un efecto cronotrópico positivo que se desplaza con propanolol (lo cual indica un efecto sobre el β_1 -AR). Pero existen otras fracciones, también anti-R13 que generan un efecto cronotrópico negativo que se desplaza con atropina (droga anticolinérgica), lo cual indica un efecto sobre el receptor colinérgico muscarínico de tipo 2 (M_2 -AChR).

Por lo tanto, utilizamos el mismo desarrollo hecho para estudiar la reactividad cruzada con el β_1 -AR para estudiar la reacción con el segundo bucle extracelular del M_2 -AChR. Si se comparan las secuencias de los péptidos derivados de TcP2B, β_1 -AR y M_2 -AChR (Tabla 1-5) se encuentra un motivo ácido muy conservado lo que sugiere que este último receptor es un posible blanco del anticuerpo.

Tabla 1-5. Comparación de los péptidos derivados de los receptores cardíacos y TcP2B. La sección 5.3 y 5.4 del anexo contiene las secuencias completas de los receptores β_1 -AR y M_2 -AChR.

Nombre	Proteína	Posición	Secuencia	Alineamiento
R13	TcP2B	107-119	EEEDDDMGFGLFD	E _d DD _m GF
H26R	β_1 -AR	197-222	HWWRAESDEARRCYNDPKCCDFVTNR	E _s DE
V22G	M_2 -AChR	169-193	VRTVEDGECYIQFFSNAAVTFG	E _{Dg} E

Primero determinamos en Biacore el pegado del scFv C5 al péptido V22G de dos maneras distintas. En condiciones en las cuales el scFv se utilizó como analito, fijando el péptido V22G biotinilado sobre un chip con estreptoavidina, se obtuvo un $K_d=90\text{nM}$ (Tabla 1-6). En la misma configuración, sobre TcP2B, el scFv C5 tenía un $K_d=0,2\text{nM}$, lo cual indica una afinidad 500 veces menor por el péptido derivado del receptor $M_2\text{-AChR}$. Luego, realizamos un ensayo de inhibición de la interacción TcP2B-scFv C5 con el péptido V22G libre. Como se muestra en la figura 1-25, se obtuvo un $IC_{50}=594\text{nM}$. Al comparar este resultado con los obtenidos para los péptidos H26R y R13 vemos que el K_i para el péptido V22G es similar al del péptido R13, ambos menores al registrado para el péptido H26R (Tabla 1-6).

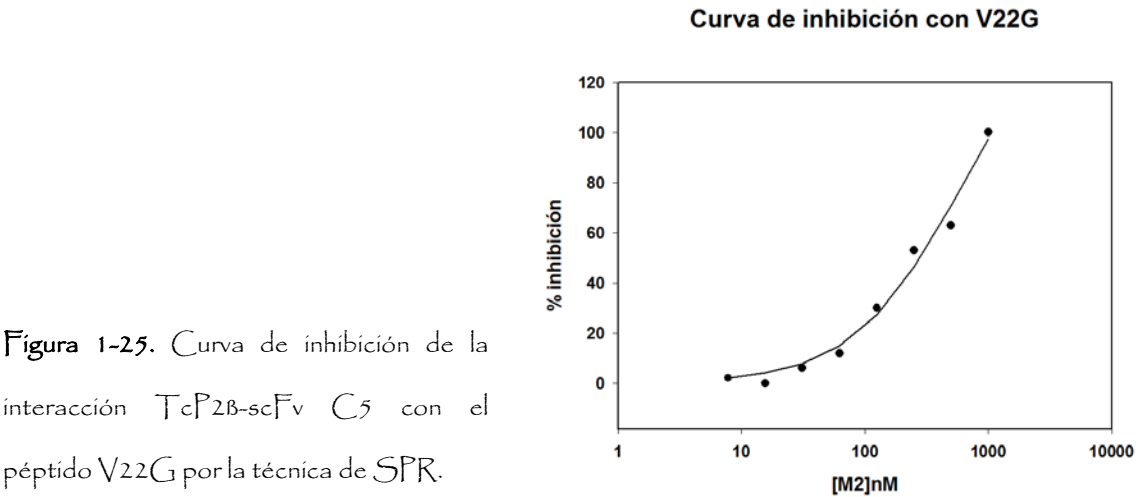


Tabla 1-6. Parámetros cinéticos obtenidos para los distintos péptidos ensayados. Ver tabla 1-5 por la referencia de los péptidos.

	TcP2B	R13	H26R	V22G	V22G-biot
mAb 17.2	$K_d= 3\text{ nM}$	$K_i= 400\text{ nM}$			
scFVC5	$K_d= 0,2\text{ nM}$	$K_i= 30\text{ nM}$	$K_i= 600\text{ nM}$	$K_i= 40\text{ nM}$	$K_d= 90\text{ nM}$

Estos resultados indican que *in vitro* el pegado al péptido derivado del segundo bucle extracelular del M₂-AChR (V22G) es más fuerte que el pegado al péptido derivado del β₁-AR (H26R), por lo tanto estudiamos la capacidad para reconocer al receptor nativo en la superficie de células CHO.

Utilizamos células CHO establemente transfectadas con el M₂-AChR humano. Tanto el scFv C5 como el B7 tiñen las células transfectadas, observándose principalmente una marcación en la membrana y el citoplasma. Esta reacción fue competida exitosamente con los péptidos R13 y V22G, demostrando la especificidad de la reacción (Figura 1-26).

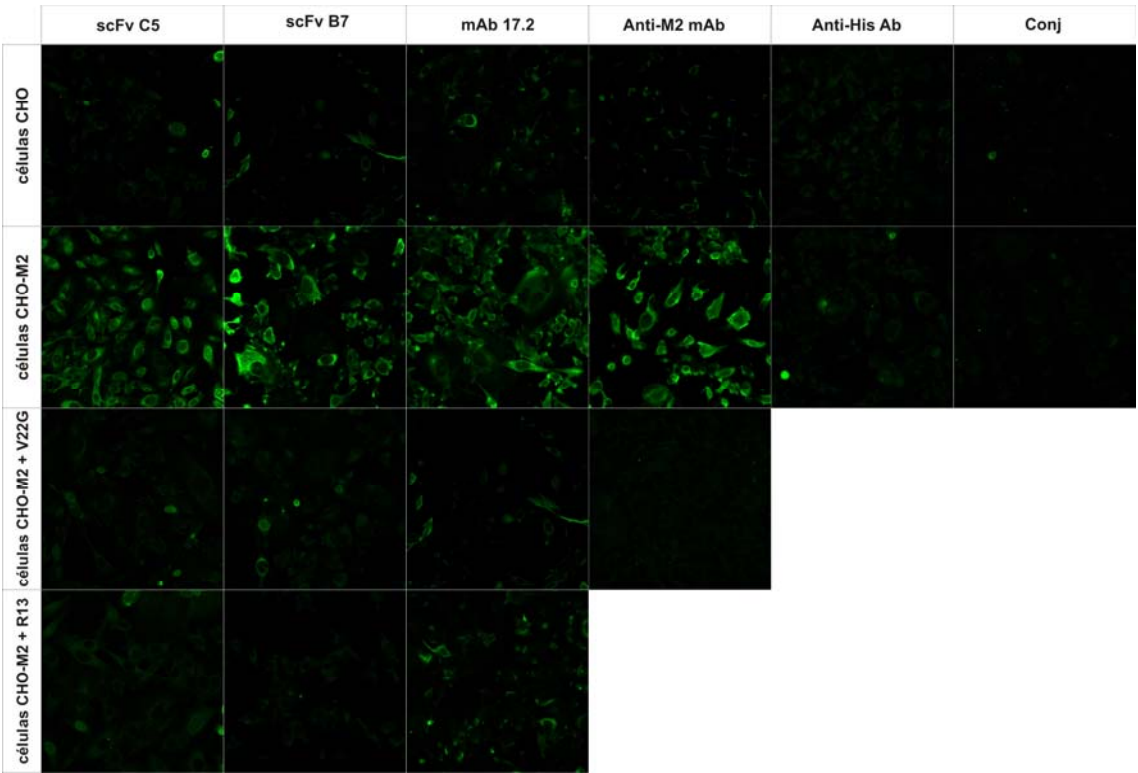


Figura 1-26. Inmunohistoquímica sobre células CHO-M2. La reactividades de los scFv C5 y B7 y los mAbs 17.2 y anti-M2 se muestran junto a los controles de Ac conjugado y Ac anti-HIS, como así también la competencia con los péptidos V22G y R13.

1.4.7 ACTIVACIÓN DEL M₂-AChR

El M₂-AChR es un receptor de la misma familia que el β_1 -AR (siete pasos transmembrana) pero esta acoplado a proteína G_i. Como producto de la activación del receptor, la proteína G heterotrimérica hidroliza GTP y se disocian sus subunidades, la subunidad G α_i inhibe la adenilato ciclasa y bloquea la producción de cAMP intracelular (Figura 1-27). *In vivo* genera hiperpolarización de la membrana del cardiomiocito por estar acoplado a canales de potasio y disminuye la frecuencia de latidos.

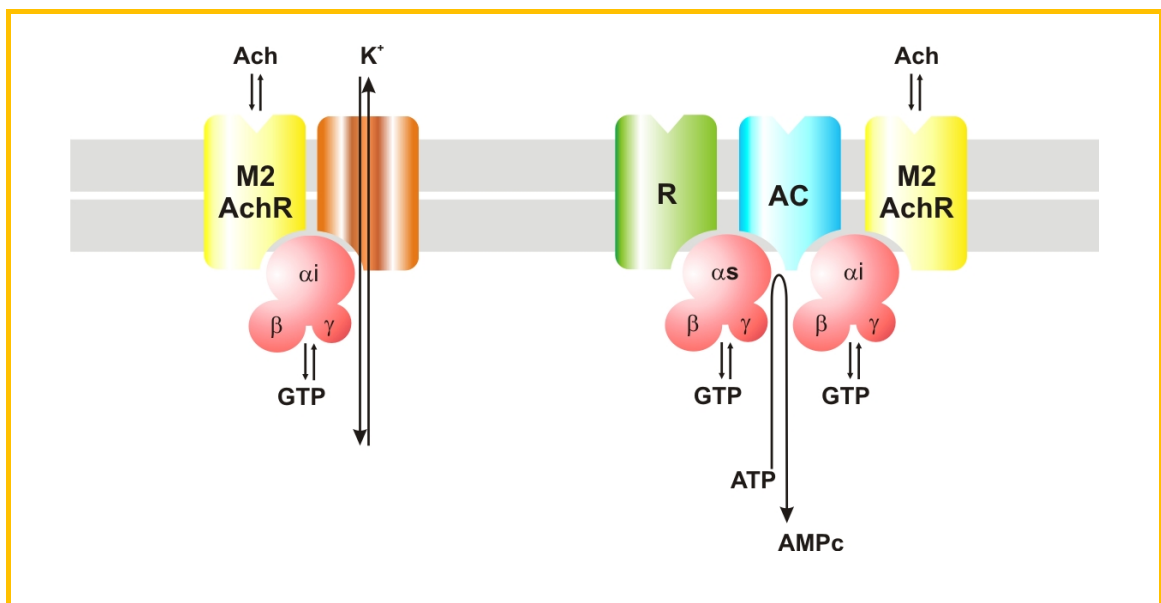


Figura 1-27. Activación del M₂-AChR. La noradrenalina sobre el β_1 -AR (R) activa la proteína G_s y produce un aumento en los niveles de cAMP vía adenilato ciclasa. La acetilcolina sobre el M₂-AChR activa la proteína G_i y produce inhibición de la adenilato ciclasa, activación de canales iónicos y otros blancos.

Tal como se describió para el caso del β_1 -AR, el pegado al receptor no implica un efecto sobre la activación de este. Por lo tanto, las mismas células fueron utilizadas para determinar las propiedades farmacológicas de los scFv C5 y B7 y compararlas con las del mAb 17.2.

En este sistema, la activación del M2-AchR fue seguida midiendo los cambios en la concentración de cAMP. Las células son tratadas con forskolina, un potente activador de la adenilato ciclasa, que genera un aumento en los niveles basales de cAMP. De esta manera, la activación del receptor ante los distintos tratamientos con anticuerpos y agonistas químicos como el carbacol, producirán una inhibición de la activación de la adenilato ciclasa, con la consecuente disminución en los niveles de cAMP. La interpretación de estos resultados es, por lo tanto, inversa a la descripta para el β_1 -AR (Figura 1-28).

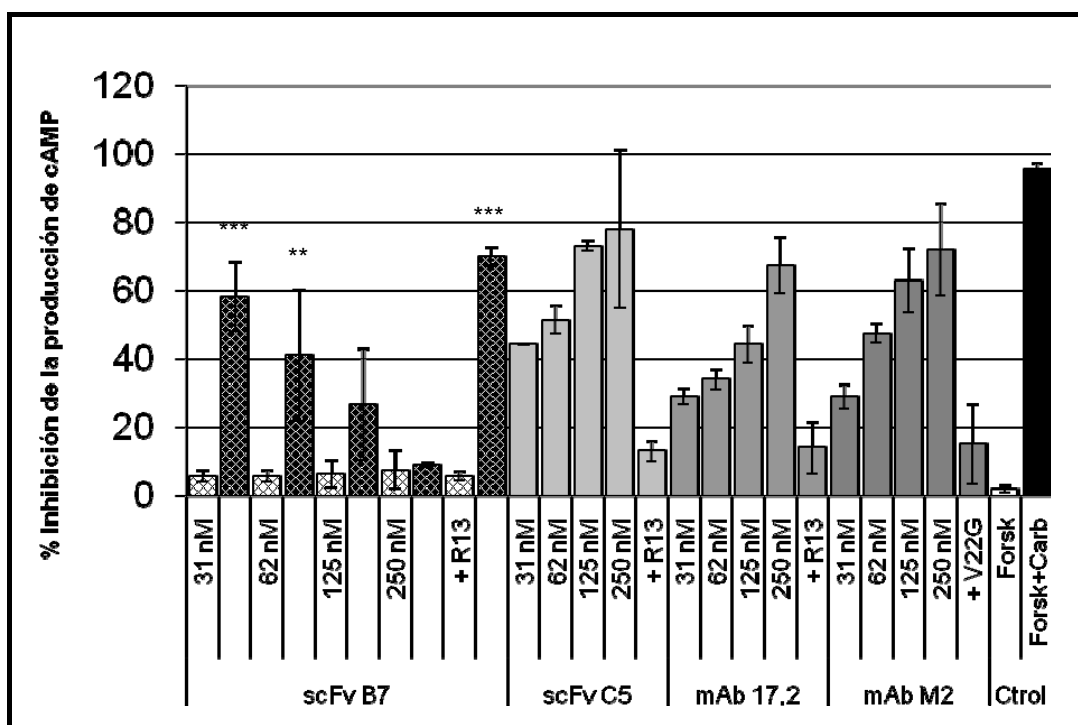


Figura 1-28. Cambios en los niveles de cAMP en células establemente transfectadas con el receptor M2-AChR humano. Las células fueron incubadas con Forskolina y distintas concentraciones de scFv C5, scFv B7, mAb 17.2 y mAb anti-M₂-AChR. En el caso de B7 las

barras claras representan el agregado del scFv solo mientras que las barras oscuras representan el agregado del scFv mas carbacol 100nM. Los asteriscos indican los resultados estadísticamente diferentes para el ensayo con y sin carbacol, $p < 0,05$ test de Student.

La búsqueda de actividad muscarínica en ensayos de cardiomiocitos de rata neonatales dio resultados controversiales y poco reproducibles. Pero no descarta un efecto mixto sobre los receptores M_2 -AChR y β_1 -AR,

La atropina (droga antagonista colinérgica) utilizada en ensayos de transferencia pasiva ratones, no produce ningún cambio significativo en la frecuencia de latido. Mientras que el carbacol (droga agonista colinérgica) produce una bradicardia profunda. Al combinar *in vivo* los tratamientos con drogas y anticuerpos vimos que el scFv B7 no bloquea la bradicardia inducida por el carbacol y que el scFv C5 induce taquicardia aun en presencia de atropina (igual o menor a la que induce solo).

Es claro que *in vivo* el efecto de la transferencia pasiva del scFv C5 es la taquicardia, por lo que la actividad sobre el β_1 -AR parece o bien enmascarar la activación del M_2 -AChR o bien no suceder la activación del M_2 -AChR *in vivo* (ver discusión). De todas maneras este anticuerpo manifiesta la propiedad de reaccionar de manera cruzada con el motivo $E_{xx}E$ presente en ambos receptores cardíacos *in vitro*.

1.4.8 NUEVOS EFECTOS FISIOLÓGICOS

Matsumoto y col, 2006; describieron una fuerte asociación entre la presencia de anticuerpos con actividad funcional sobre el β_1 -AR y la ocurrencia de una disfunción visual en pacientes con Cardiomiopatía Chagásica Crónica. Esta disfunción genera disminución de la visión nocturna y fue asociada a un efecto de reactividad cruzada de estos anticuerpos sobre la Rodopsina.

La rodopsina es un receptor de siete pasos transmembrana, acoplado a proteína Gt, presente en los conos y bastones de la retina (Figura 1-29).

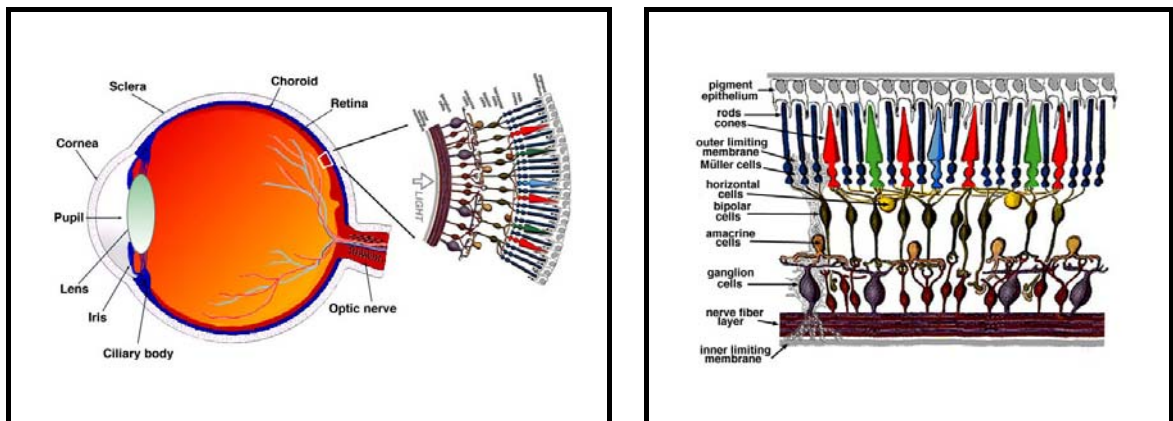


Figura 1-29. Estructura y organización de la retina. A la izquierda se muestra un esquema de un corte de un ojo humano y ampliado una sección de retina. A la derecha un diagrama de la organización de la retina.

Cuando la rodopsina recibe un estímulo lumínico cambia de conformación activando la proteína G heterotrimerica, que producirá luego la inhibición de la fosfodiesterasa (PDE), con la consiguiente disminución del GMPc (Figura 1-30).

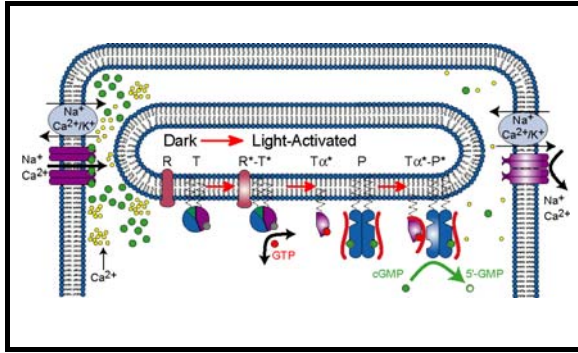


Figura 1-30. Esquema de activación de un fotoreceptor dentro de los discos de los bastones.

Dentro de los bastones la rodopsina se distribuye en discos membranosos intracelulares presentes en los segmentos exteriores, por lo que resultaría muy difícil el acceso de anticuerpos a esta región.

La manera de estudiar *in vivo* un efecto sobre la retina es el electroretinograma (ERG). En este registro se pueden diferenciar efectos sobre distintas regiones de la retina, tal como se muestra en la figura 1-31.

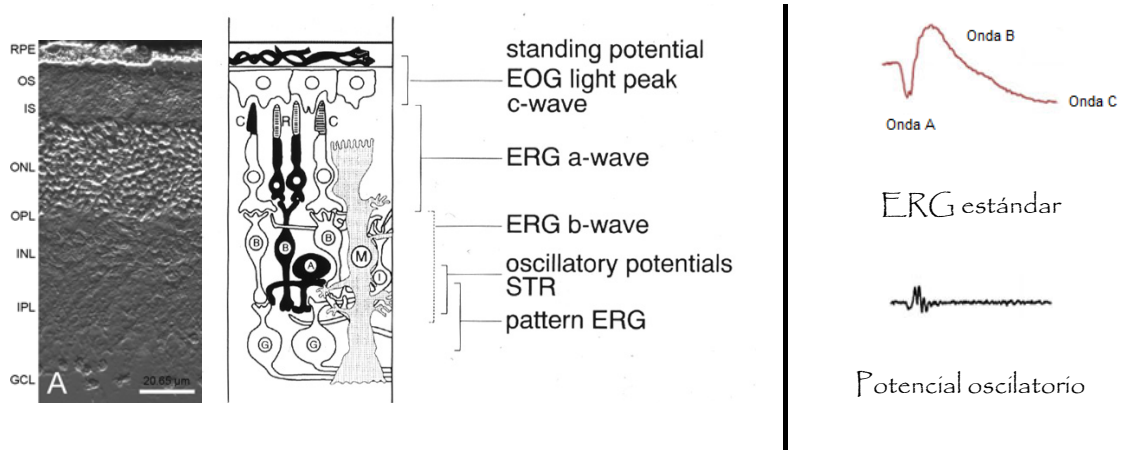


Figura 1-31. Corte de retina y respuesta de las distintas zonas en ERG. Las regiones del epitelio pigmentado (RPE), segmentos exteriores (OS), segmentos interiores (IS), lámina exterior nuclear (ONL), lámina plexiforme exterior (OPL), lámina interior nuclear (INL), lámina plexiforme interior (IPL) y lámina de celular ganglionares (GCL) se indican sobre el margen izquierdo. A la derecha se muestran los trazos de un ERG estándar humano y el potencial oscilatorio.

Por lo tanto realizamos ERG en ratones sometidos a transferencia pasiva del scFv C5 a distintos tiempos post inyección. La administración intravenosa de 200 μ l de una solución 250 nM del scFv C5 produce una disminución significativa de la onda B. Este efecto es mayor a medida que aumenta el tiempo de registro, siendo el máximo a los 30 minutos (Figura 1-32).

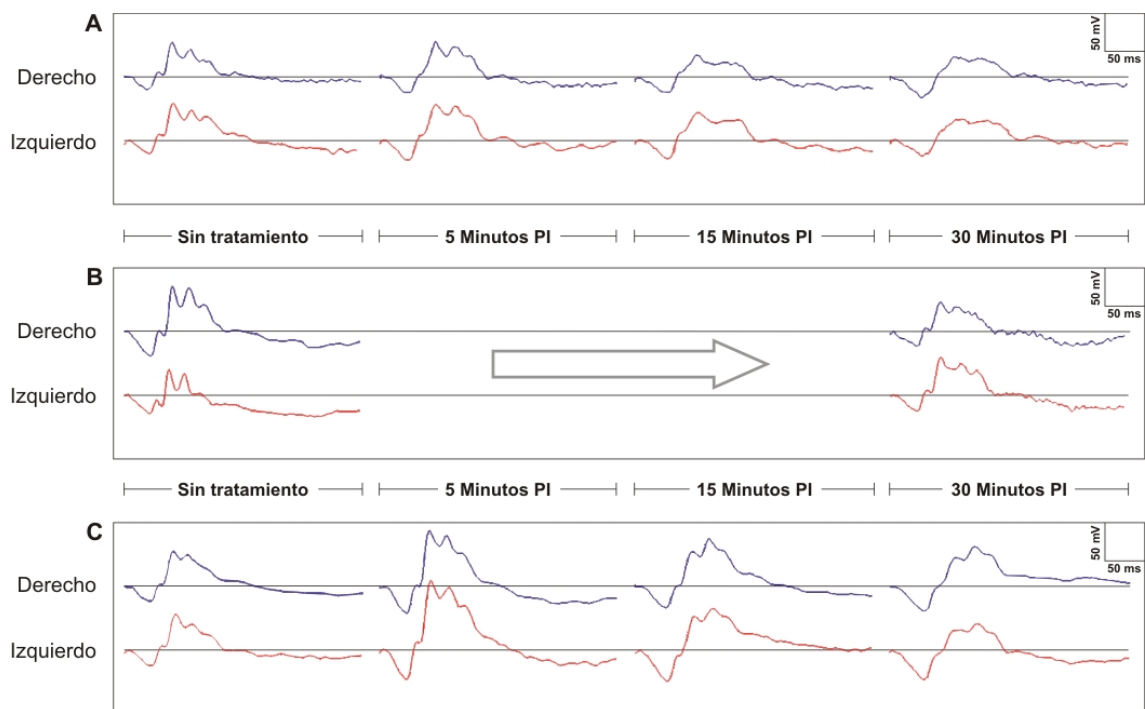


Figura 1-32. ERG de ratones BALB/c sometidos a distintos tratamientos. A. Registro representativo de la transferencia pasiva de 200 μ l del scFv C5 250 nM. B. Registro representativo de la inyección de 200 μ l de PBS i.v.. C. Registro representativo del tratamiento de ratones con ISO (2 mg/kg) i.v..

El tratamiento con ISO no genera disminución de la onda B, lo cual podría indicar que lo que se observa con el scFv C5 no es un efecto sobre el β_1 -AR en la retina, o bien que el ISO, al ser un agonista beta adrenérgico general, activa otros blancos. Se sabe que

el ISO disminuye las resistencias vasculares periféricas por relajación de la musculatura lisa arterial y esto puede ser registrado como un efecto potenciado en el ERG.

Otro efecto notorio de la transferencia pasiva del scFv C5 es la disminución casi total del potencial oscilatorio que refleja una acción sobre la capa interna de la retina (Figura 1-33).

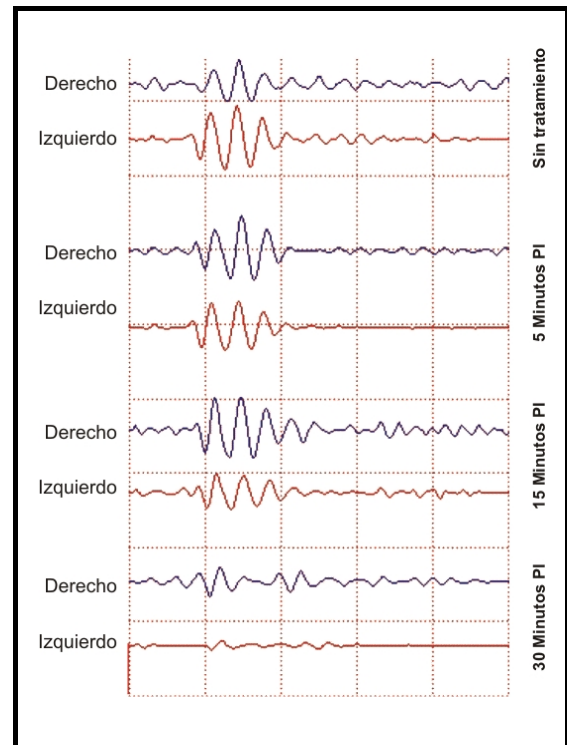


Figura 1-33. Potenciales oscilatorios. Registro representativo de la transferencia pasiva de 200 µl del scFv C5 250 nM.

1.4.9 INMUNOHISTOQUÍMICA EN CORTES DE RETINA

Dado que no se ha reportado en la literatura la distribución del β_1 -AR en retina, realizamos en colaboración con el Dr Uwe Wolfgang (Mainz, Alemania), inmunohistoquímica en cortes de retina de ratón. Se compararon la marca del mAb anti- β_1 -AR, la del mAb 17.2 y el scFv C5 (Figura 1-34).

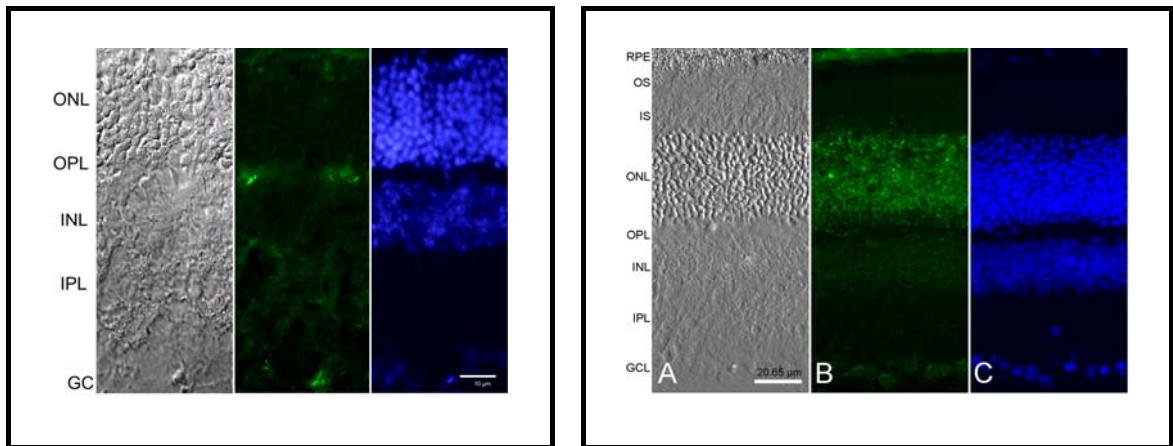


Figura 1-34. Inmunohistoquímica en cortes de Retina. A la izquierda se muestra la marcación del mAb anti- β_1 -AR y a la derecha se muestra la marcación del mAb 17.2.

Las inmunofluorescencias muestran zonas de marcación en común, como la lámina de células ganglionares (GC) y la lámina interior nuclear (INL), pero existen también otras zonas de marcación diferencial. Al comparar este patrón con el del scFv C5, vemos que la distribución de marca es similar a la del mAb 17.2 (**Figura 1-35**). El patrón de ERG de los ratones tratados muestra un cambio general en el registro, disminución de la onda B y disminución de los potenciales oscilatorios. Todos estos datos son consistentes con un efecto de los anticuerpos sobre la capa interior de la retina (INL, IPL y GLC).

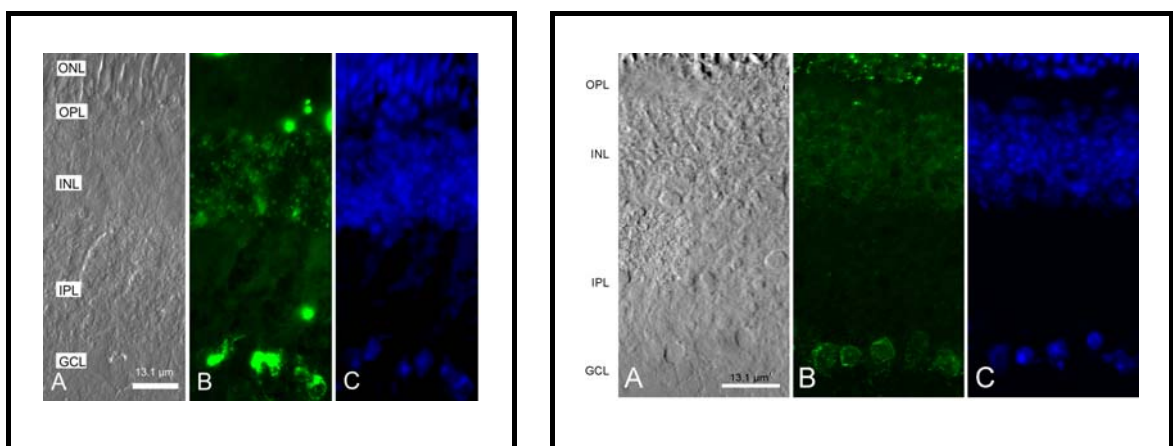


Figura 1-35. Inmunohistoquímica en cortes de Retina. A la izquierda se muestra la marcación del sc Fv C5 y a la derecha se muestra la marcación del mAb 17.2.

1.4.10 BIODISTRIBUCIÓN DEL scFv C5

Realizamos un ensayo de biodistribución en ratones, inyectando el scFv C5 intravenoso, marcado con iodo 125 (Demartís y col, 2001). Analizamos la presencia de marca en corazón, ojos, cerebro, bazo, hígado, riñón y sangre a tiempo 5, 10, 20 y 40 minutos. En la mayoría de los tejidos se observó la misma cinética de distribución que consiste en un pico máximo a los 10 minutos seguido de un descenso brusco y estabilización de la marca. Pero esto no sucedió en corazón y en ojos.

Hígado y riñón comparten el 60% del total de marca inyectado. Como es de esperar, estos tejidos constituyen las vías de absorción inmediata del scFv. La permanencia en circulación es baja, encontrándose alrededor de un 9% del producto inyectado a las 40 minutos (Figura 1-36). Esto se relaciona con el tamaño pequeño del scFv, lo cual genera una gran penetración y una rápida adsorción en los tejidos.

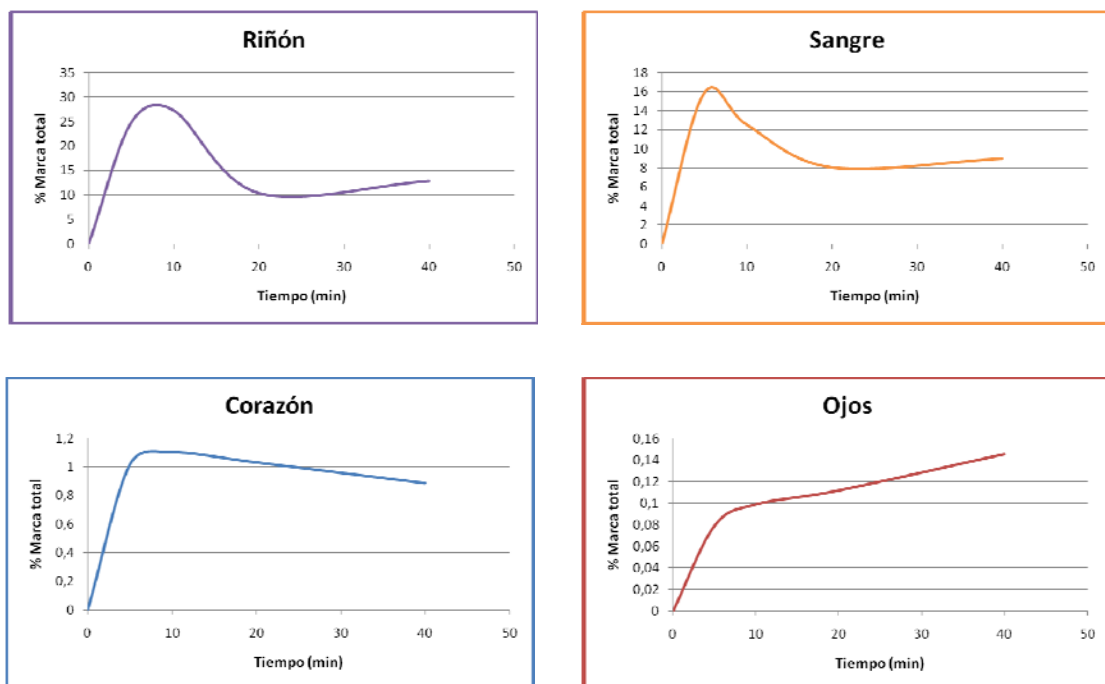


Figura 1-36. Distribución del scFv C5 *in vivo* luego de la transferencia pasiva. Se muestran las cinéticas en Riñón, Sangre, Corazón y Ojos a los tiempos 5, 10, 20 y 40 minutos post inyección en función del porcentaje del total de marca inyectada.

En corazón se observa un pico máximo a los 10 minutos, coincidente con el efecto cardíaco máximo observado en los ECG y luego una disminución gradual (Figura 1-36). La cinética que se observa en los ojos consiste en un aumento sostenido de la marca en función del tiempo, siendo el máximo tiempo medido 40 minutos (Figura 1-36). Esto coincide con el efecto funcional sobre la retina registrado con los ERG, donde el efecto máximo se obtiene en el tiempo máximo de registro (30 minutos).

1.4.11 CRISTALOGRAFÍA DE LOS ANTICUERPOS

En el marco de una colaboración con el Dr Hong Ming (Albany, New York, USA) se comenzó con la cristalización de los anticuerpos recombinantes C5 y B7 con los distintos péptidos asociados. Para esto, fue necesario sacar el epítipo MIC presente en el vector pHenII ya que es muy flexible y no colabora con la formación de los cristales. Por lo tanto subclonamos los scFv C5 y B7 en el vector pET22b+ que solo posee marca de histidinas. Al igual que el vector pHenII este último tiene una señal de localización periplásmica. El promotor es el de T7 y se utiliza una cepa de *E. coli* B121 en la que el agregado de IPTG induce la síntesis de la ARN polimerasa de T7 que luego comienza con la transcripción del vector. En teoría este

sistema es más activo que la clásica inducción del promotor Lac pero en nuestro caso se obtuvieron niveles similares de expresión y actividad (Figura 1-37).

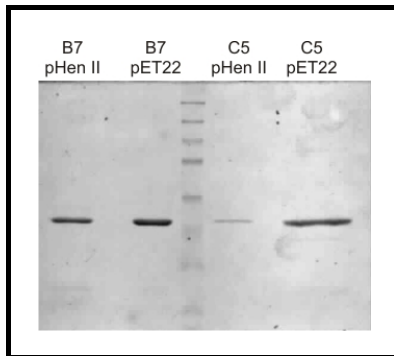


Figura 1-37. Tinción con azul de coomaiise de la expresión de los scFv C5 y B7 en los dos sistemas procariotas utilizados. Los scFv en pHenII se expresan en HB2151 y los scFv en pET22b+ en BL21

Los resultados de los cristales de los scFv aun se están analizando pero se ha finalizado con el análisis de los cristales de la región Fab del mAb 17.2 unido al péptido R13 (Figura 1-38).

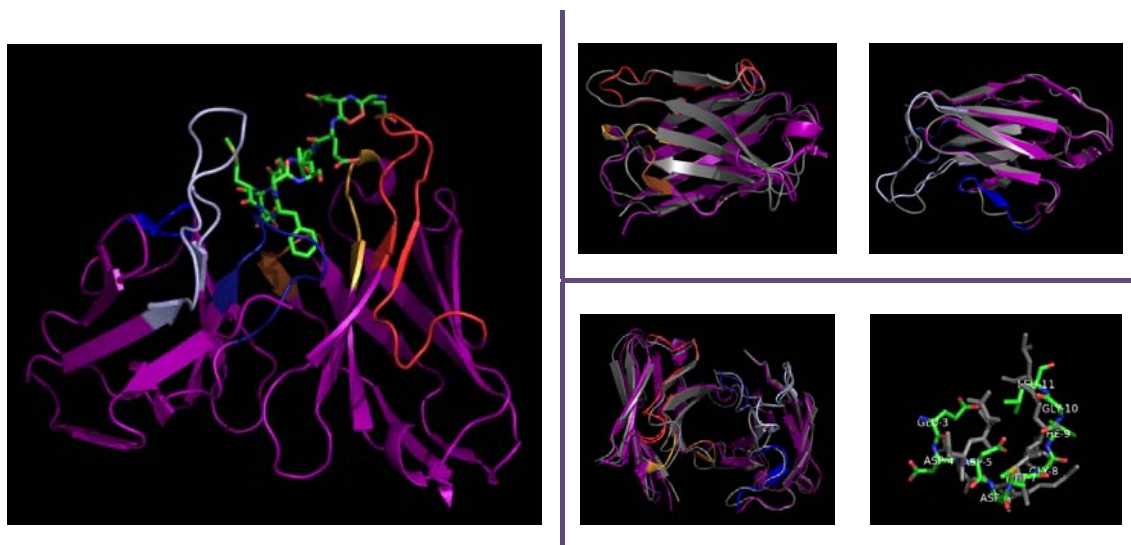


Figura 1-38. Estructuras derivadas de cristalografía. A la izquierda se ve la estructura del complejo Fab17.2-R13. A la derecha, parte superior se muestran las comparaciones estructurales con el modelo *in silico* (izquierda V_H y derecha V_L). A la derecha, parte inferior se muestran las comparaciones estructurales del paratope completo (izquierda) y la orientación de los péptidos (derecha). Los CDRs están representados en colores: CDRL1 celeste, CDRL2 azul, CDRL3 azul oscuro, CDRH1 naranja, CDRH2 rojo y CDRH3 marrón. En gris se compara la estructura producto del modelado *in silico*.

La comparación del cristal con el modelo *in silico* aporta importantes consideraciones. Cuando se realiza la minimalización energética de los modelos se liberan las regiones de los CDRs junto al péptido, por lo que las otras regiones del anticuerpo permanecen rígidas como en el molde. Por lo tanto solo vamos a poner atención en la estructura de los CDRs y el péptido.

De los tres CDRs de la cadena pesada el CDR2 y el 3 son los que presentan mayores diferencias con el modelo ya que quedan un poco más abiertos, dándole más accesibilidad al paratope. Lo mismo sucede con el CDR1 de la cadena liviana. Esto en principio no genera ninguna contradicción ya que vimos que, de acuerdo al péptido modelado en el paratope, este se abre o se cierra. En el cristal se resuelven 11 aminoácidos del péptido R13 (EEEDDDMGFGLFD) que son distintos a los 10 aminoácidos modelados (EDDDMGFGLF). La principal diferencia observada es la disposición de los residuos laterales del péptido (Figuras 1-38 y 1-39).

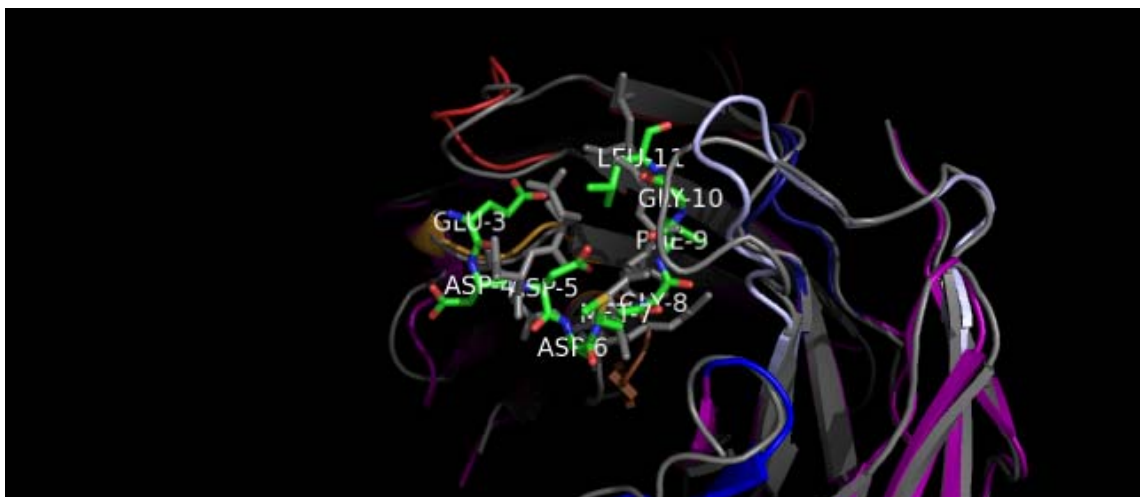


Figura 1-39. Estructura comparada de la cristalografía y el modelado *in silico*. Superposición del modelo (gris) y el cristal (violeta). Solo se muestran los residuos del péptido en común. Los CDRs

están representados en colores: CDRL1 celeste, CDRL2 azul, CDRL3 azul oscuro, CDRH1 naranja, CDRH2 rojo y CDRH3 marrón.

A pesar de las diferencias observadas en el péptido, muchos de los residuos del paratope identificados en el modelo permanecen como residuos importantes en el cristal. Esto se hace muy evidente con la observación previa de la importancia de los residuos E1 y D4 del modelado, E3 y D6 en el cristal (Figura 1-40).

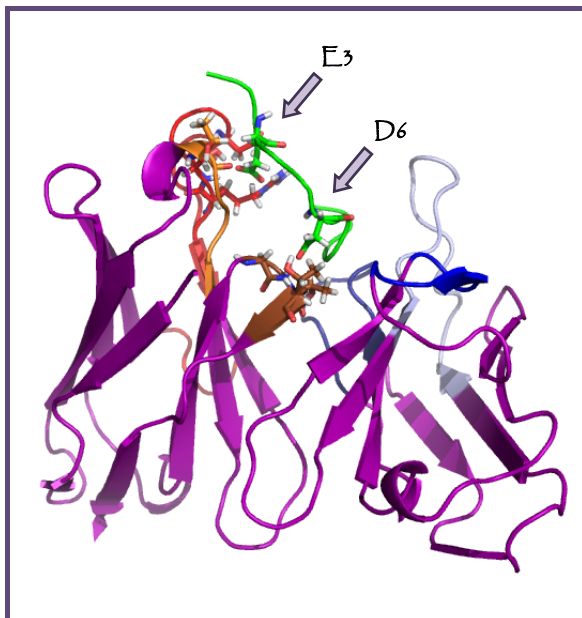


Figura 1-40. Interacción de los residuos E3 y D6 con el anticuerpo. Los residuos que interaccionan están representados como sticks, conservando los colores del CDR al que pertenecen. Los CDRs están representados en colores: CDRL1 celeste, CDRL2 azul, CDRL3 azul oscuro, CDRH1 naranja, CDRH2 rojo y CDRH3 marrón.

El ácido glutámico de la posición 3 (E3) tiene próximos 10 residuos distintos de los aminoácidos Thr H31, Arg H52, Asn H56 y Ser H53, pudiendo establecer tres uniones puente de hidrógeno con los tres aminoácidos del CDR H2 (Figura 1-40). Algo similar ocurre con el ácido aspártico de la posición 6 (D6) que tiene próximos 13 residuos de los aminoácidos Arg L51, Gly H101, Thr

H102 y Thr H103, pudiendo establecer dos uniones puente de hidrógeno con las treoninas 102 y 103 del CDRH3 (Figura 1-40).

Por lo tanto estos resultados avalan las conclusiones del modelado y refuerzan la importancia del motivo E_{xx}D en la reactividad cruzada. Este fenómeno se va a terminar de comprender cuando se analicen los cristales de los scFv con el péptido derivado del β_1 -AR.

1.4.12 EXPRESIÓN EN SISTEMAS EUCARIONTES

Con el objetivo de aumentar la cantidad y la fracción activa de los scFv producidos y también para conocer la posibilidad de utilizar estos anticuerpos para la construcción de animales transgénicos, pasamos a sistemas de expresión eucariotas. En primera instancia utilizamos el sistema de *Pichia pastoris* (Cregg y col, 1993 y Waterham y col, 1997) comercializado por invitrogen. Se utilizaron vectores que, inducidos por metanol, secretan la proteína al medio (PicZ α) pero no fue posible producir los scFv en este sistema. Se detectaron niveles muy bajos de expresión en periodos de inducción largos (mas de diez días).

Por lo tanto decidimos trabajar con expresión en células de mamíferos utilizando el sistema de expresión "Free Style 293" (invitrogen, cat no K9000-01). Este sistema utiliza las células HEK293F que crecen en suspensión, en agitación constante, lo cual permite alcanzar una mayor densidad celular y por consiguiente mayor producción de proteína.

El vector empleado fue el pSecTag 2A (invitrogen) que posee un promotor de citomegalo virus (CMV), una señal de exportación de la cadena kappa de inmunoglobulina (Igk), un sitio de clonado compatible con el vector pHenII (SfiI-NotI), una marca Myc y una marca de histidinas (HIS) para detección y purificación. En estas células el scFv se expresa en muy baja cantidad pero la fracción activa es notoriamente más alta que en *E. coli* (Figura 1-41).

Por lo tanto no se utilizó este sistema para la expresión cotidiana del scFv pero demostramos que el anticuerpo es activo en un sistema de expresión eucariota.

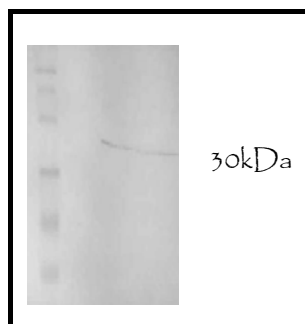


Figura 1-41. Expresión eucariota del scFv C5. Se tomó una muestra de 50 ul de medio de cultivo 48 hs post transfección y se corrió en un gel SDS, se transfirió a nitrocelulosa y se reveló con un anticuerpo anti-HIS. Esta fracción es activa en ensayos de ELISA y western blot.

La importancia de determinar la actividad del scFv en un sistema eucariota radicó en la utilización de este anticuerpo para la construcción de vectores para transgénesis. El objetivo es obtener un ratón transgénico que exprese el scFv C5 de manera inducible para estudiar los efectos de una exposición crónica a este tipo de anticuerpos (Figura 1-42).

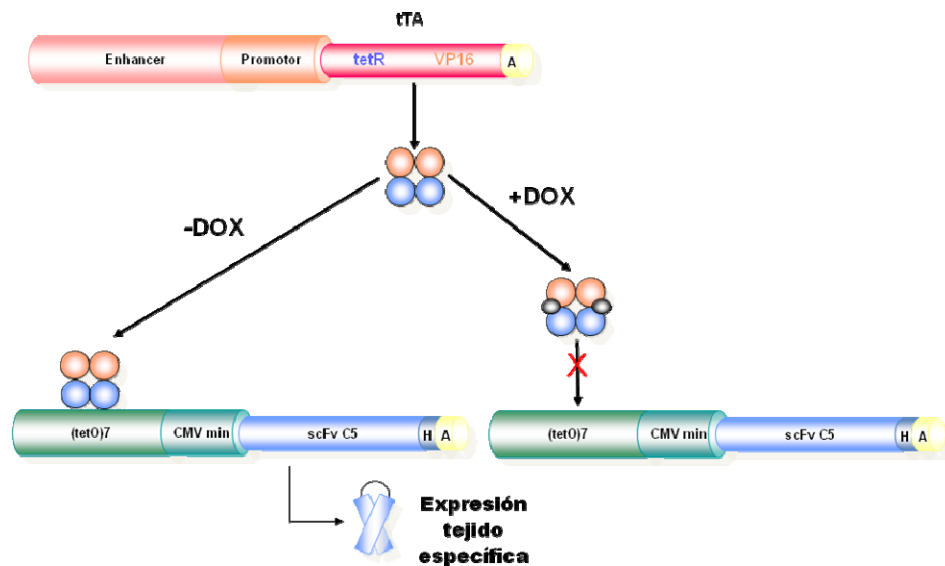


Figura 1-42. Expresión condicional del scFv C5 en ratones transgénicos. Una línea de ratones portadores del transactivador de tetraciclina bajo el control de un promotor tejido específico serán cruzados con los ratones portadores del scFv C5 bajo el control de un promotor mínimo CMV y el operador de tetraciclina. En presencia del análogo de la tetraciclina, doxiciclina (DOX), se reprime la expresión del transgen.

La construcción del transgen del scFv C5 se realizó en el vector pTRE-Tight (BD Biosciences Clontech, PT 3720-5). Este vector tiene un elemento de respuesta a tetraciclina junto a un promotor de CMV mínimo y la señal de corte y poliadenilación de SV40, para asegurar la correcta expresión del transgen. Se sacó del vector pSecTag 2A el casete entero del scFv C5 incluyendo la secuencia de exportación de Igk y las marcas Myc e HIS y se lo insertó entre los sitios HindIII y XbaI.

Todas las construcciones fueron controladas por secuenciación. La preparación del inserto para la transgénesis se logró por digestión con la enzima BsrBI, que libera un fragmento de aproximadamente 1300 bases que abarca desde

el promotor hasta la señal de poli A de SV40. Este inserto se purifica en gel y el producto se liofiliza (Figura 1-43).

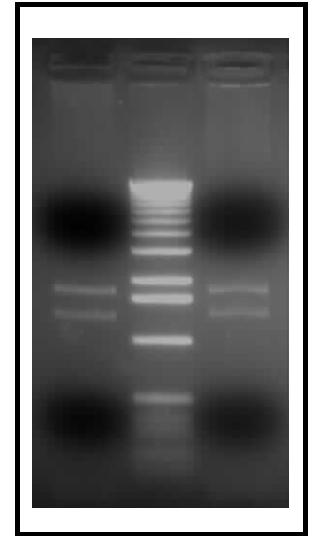


Figura 1-43. Digestión de los transgenes C5 y B7. Izquierda C5 y derecha B7. La banda inferior corresponde al transgen completo y la superior al vector residual.

En estos momentos ya se realizó la transgénesis y se está analizando en el laboratorio la presencia del transgen del scFv C5 en la primera camada de ratones.

Díscusión

Capítulo 1

Aunque muchos estudios han propuesto que proteínas del parásito pueden generar anticuerpos con capacidad para reaccionar de manera cruzada con proteínas del hospedador generando daño tisular y/o alterando funciones fisiológicas normales, solo existían hasta ahora evidencias parciales (Giordanengo y col, 2000; Hernandez-Munain y col, 1992; Hernandez-Munain y col, 1993; Snary y col, 1983; Sterin-Borda y col, 1986). Este trabajo fue diseñado para demostrar claramente que anticuerpos dirigidos contra la región C-terminal de las proteínas P de *T. cruzi* pueden estimular receptores cardíacos y para definir de la manera más precisa posible las bases moleculares de esta reacción cruzada.

Estudios previos del laboratorio demostraron que la inmunización con la proteína ribosomal TcP28 induce alteraciones en la frecuencia cardíaca, asociada a niveles elevados de anticuerpos contra la región C-terminal, péptido R13 (Lopez-Bergami y col, 1997; 2001; 2005). Estos protocolos fueron utilizados luego para producir un anticuerpo monoclonal anti-R13, llamado mAb 17.2. Este anticuerpo reacciona con las cinco proteínas P del parásito en ensayos de western blot y muestra una marcación citoplasmática y granular en ensayos de inmunofluorescencia. También fueron demostradas las propiedades cronotrópicas positivas en cultivos de cardiomiocitos de ratas neonatas (Mahler y col, 2001). Sin embargo, en estos trabajos, no se ha demostrado la unión del mAb 17.2 al β_1 -AR, como tampoco la interacción con el péptido correspondiente al segundo bucle extracelular del β_1 -AR (H26R) en ensayos de SPR. Esto último es probable que se deba a la baja afinidad por el péptido derivado del receptor.

En el presente trabajo se construyeron cuatro anticuerpos recombinantes de simple cadena (scFv) derivados del mAb 17.2. Dos de ellos, clonados en sentido V_H-V_L con distintos péptidos de unión (C5 y B7), presentaron nuevas características con respecto a las del mAb 17.2. El scFv C5 demostró ser dimérico y tener mayor afinidad por la proteína TcP2B que el mAb 17.2, mientras que el scFv B7 demostró ser monomérico y tener una menor afinidad por la proteína TcP2B que el mAb 17.2. Estas diferencias no son solo producto de la avidez (C5 dimérico y B7 monomérico) ya que cuando se utilizan los scFv como ligandos en SPR se elimina este factor y se siguen viendo diferentes afinidades. Por lo tanto hay un efecto directo de los péptidos de unión utilizados en la estructura del scFv, afectando el plegamiento y la actividad del anticuerpo recombinante.

Distintos ensayos *in vitro* demostraron que ambos scFvs, C5 y B7, tienen efectos sobre los receptores M_2 -AChR y β_1 -AR. Por medio de SPR solo fue posible cuantificar la interacción del scFv C5 con los péptidos derivados de los receptores, gracias al aumento en la afinidad de este recombinante con respecto al mAb 17.2. Estas mediciones constituyen la primer evidencia incuestionable de que un anticuerpo generado contra una proteína intracelular de *T. cruzi* tiene la capacidad de reaccionar con un péptido derivado del segundo bucle extracelular de receptores cardíacos humanos.

El hecho de que anticuerpos diméricos (scFv C5 y mAbs) tengan la capacidad de estimular los receptores M_2 -AChR y β_1 -AR, apoya la idea de que anticuerpos anti-receptores de siete pasos transmembrana ejercen su efecto por dimerización del receptor (Mobini y col, 2000; Peter y col, 2004). Mientras que la unión de un anticuerpo monovalente como el B7 ejerce probablemente su efecto antagonista rigidizando la estructura del receptor o cerrando el acceso del fármaco, como fue previamente descrito para anticuerpos recombinantes contra los receptores M_2 y β_2 -AR (Peter y col, 2003; 2004). Estos resultados también están relacionados con la importancia del segundo bucle extracelular para la activación de esta familia de receptores (Klco y col, 2005).

Los estudios *in vivo*, por transferencia pasiva de los scFv han demostrado dos efectos fisiológicos claros, uno en corazón y otro en ojos. Estos efectos se correlacionan con la biodistribución del anticuerpo y las cinéticas en cada tejido. A los 10 minutos post inyección se alcanza el máximo efecto cardíaco y la máxima concentración de anticuerpo en ese tejido mientras que en los ojos el efecto máximo se ve a los 30 minutos post inyección al igual que la máxima concentración del anticuerpo.

La pregunta que nos hacemos es si es posible que *in vivo* el scFv C5 active ambos receptores M_2 -AChR y β_1 -AR produciendo taquicardia o si la activación del β_1 -AR enmascara el efecto del M_2 -AChR o este último nunca sucede *in vivo*.

Si estudiamos en detalle el control de la frecuencia cardíaca (**Figura 1-44**) vemos que todas las células cardíacas pueden generar un latido rítmico pero las más rápidas están localizadas en el nódulo sino-atrial o sino-auricular (SA). Una vez que el SA inicia un potencial de acción para la contracción, estimula a las células cercanas para que se activen, antes de que lo haga la señal propia de la célula. De esta manera, lidera y coordina el impulso. Una onda de contracción se desplaza desde el nódulo SA hacia el nódulo atrio-ventricular (AV o NA). Luego de recibir esta señal, el nódulo AV espera un momento y luego manda su propia señal a los ventrículos a través de un tipo de célula nerviosa muscular, llamada haz de HIS. Este haz termina en la base de los ventrículos y cede el impulso a otro grupo de células cardíacas modificadas, las fibras de purkinje. A medida que la onda viaja de la base de los ventrículos hacia arriba, se estimula la contracción de las células ventriculares.

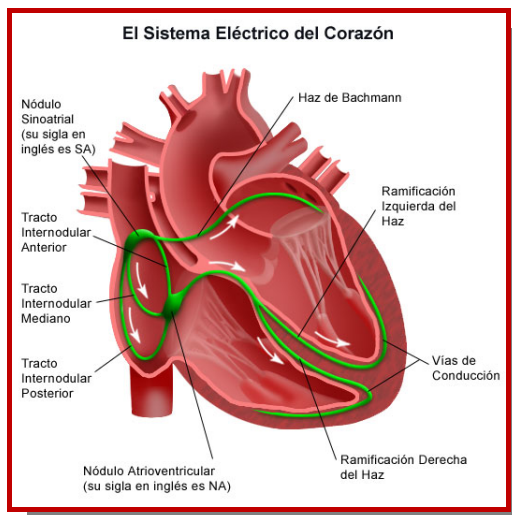


Figura 1-44. Esquema del sistema eléctrico del corazón. Regulación de la sístole (Contracción del corazón, particularmente ventrículos) y la diástole (Relajación del corazón, particularmente ventrículos)

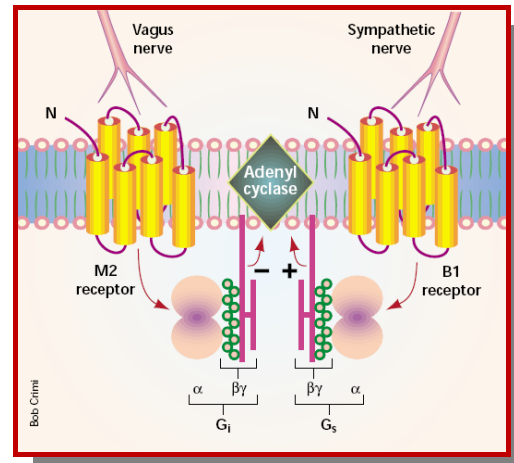
Esta secuencia permite un latido coordinado del corazón: El nódulo SA inicia el proceso completo, luego el atrio se contrae llenando los ventrículos. El nódulo AV recibe la señal y espera un momento permitiendo el llenado de los ventrículos. La señal viaja hasta la base de los ventrículos, desde el nódulo AV e inicia una onda de contracción desde la base hacia arriba. Esto fuerza a la sangre de los ventrículos a salir por las arterias (aorta y Pulmonar), localizadas sobre los ventrículos. Las válvulas previenen el flujo reverso de la sangre.

El ajuste en la frecuencia cardíaca y la fuerza de contracción lo realiza la médula que envía señales para acelerar o disminuir la frecuencia cardíaca vía el sistema nervioso simpático o parasimpático, respectivamente (Figura 1-45).

Sistema nervioso simpático: La mayoría de las fibras nerviosas que llegan al corazón terminan en el nódulo SA. Cuando estimulan liberan noradrenalina (norepinefrina) en las terminales nerviosas. Esto aumenta el potencial de membrana (despolariza) de las células del nódulo SA y de esta manera laten más rápido que la frecuencia normal (también aumenta la fuerza de contracción). Este efecto se logra por un aumento en la permeabilidad de Ca^{2+} y Na^{+} por aumento de los niveles intracelulares de cAMP.

Sistema nervioso parasimpático: Es similar al simpático pero el neurotransmisor liberado es la acetilcolina. Cuando esto sucede hay una reducción del potencial de membrana (hiperpolarización por difusión de K^+) que conduce a una disminución de la frecuencia cardíaca.

Figura 1-45. Esquema de funcionamiento del sistema nervioso simpático y parasimpático.



Por todo lo descrito es claro que el efecto de la taquicardia es debido a la activación del β_1 -AR pero algunas manifestaciones eléctricas de los ECG como anomalías de repolarización y bloqueo AV de primer grado podrían tener relación, al menos en parte, con efectos sobre el receptor M2.

Los efectos en el ojo son menos claros y están en un nivel de estudio mas preliminar. Los datos de pacientes con Cardiomiopatía Chagásica Crónica indican una fuerte asociación entre la disfunción retinal y la actividad sobre el β_1 -AR. Esto nos hace pensar en la posibilidad de un efecto de los anticuerpos sobre el β_1 -AR en retina, pero el hecho de que no se haya descrito la presencia de este receptor en este tejido dificulta el análisis. Los ensayos de inmunohistoquímica muestran localización de β_1 -AR en distintas zonas de la retina pero no se sabe que función tiene en la transmisión del estímulo lumínico. Por otro lado la inyección del scFv B7 genera también en este sistema un efecto antagónico al de

C5 ya que aumenta el patrón general del ERG (dato no mostrado) lo que sugiere el mismo juego agonista/antagonista de los scFvs C5/B7 en retina.

El modelado de la estructura del anticuerpo y del péptido R13 en esta estructura, nos dieron las primeras bases para comprender y explicar la propiedad de este anticuerpo para reaccionar de manera cruzada con los receptores cardíacos. Finalmente estos estudios se completaron con datos cristalográficos del anticuerpo monoclonal 17.2 asociado al péptido R13 donde se corroboraron las principales conclusiones obtenidas del modelado *in silico*. En este último habíamos observado la importancia de las interacciones Glu1-Arg H52 y Asp4- Lys L58 con el péptido derivado de la proteína TcP2B y de las interacciones Glu1-Arg H52, Glu1-Arg H50 y Glu4-Lys L58 con el péptido derivado del β_1 -AR.

En el cristal se confirman la importancia del Glu 1 (posición 3 en el cristal) que puede establecer tres uniones puente de hidrógeno con los tres aminoácidos del CDR H2 (Arg H52, Asn H56 y Ser H53). Algo similar ocurre con el Asp4 (posición 6 en el cristal) que puede establecer dos uniones puente de hidrógeno con las treoninas 102 y 103 del CDR H3. Estos datos apoyan la idea inicial de que los residuos E1 y D4 del decapeptido derivado de TcP2B, (EDDDMGFGLF) establecen una gran cantidad de uniones con el paratope y explican también la capacidad de este anticuerpo para reconocer los residuos ácidos presentes en el segundo bucle extracelular de los receptores M_2 -AChR y β_1 -AR. Considerando los motivos EDGE derivado del M_2 -AChR y ESDE derivado del β_1 -AR, las posiciones ácidas 1 y 4 estarían dispuestas de manera similar a los residuos ácidos reconocidos en el péptido de *T. cruzi*.

Los resultados aquí descriptos constituyen una clara demostración de que anticuerpos originados contra la región C-terminal de las proteínas P pueden reaccionar de manera cruzada con el segundo bucle extracelular de receptores cardíacos y estimularlos.

Dado que se han detectado altos niveles de anticuerpos anti-R13 en casos severos de la enfermedad (Chiale y col, 2001; Elies y col, 1996; Kaplan y col, 1997; Levín y col, 1993; Levitus y col, 1991; Mahler y col, 2004; Mesri y col, 1990) es posible hipotetizar que en estas condiciones, las propiedades agonistas de estos anticuerpos puedan tener un efecto mucho mas amplio induciendo cambios funcionales en tejidos y tipos celulares que presenten estos receptores, aumentando de esta manera las manifestaciones clínicas de un organismo infectado.

Por último, la construcción de un ratón transgénico que exprese estos anticuerpos bajo un sistema inducible nos permitirá estudiar los efectos sistémicos de la exposición y estimulación crónica como así también realizar la búsqueda de agentes que puedan neutralizar los efectos patogénicos de los anticuerpos anti-R13.

Introducción

Capítulo 2

2.1.1 EL RIBOSOMA Y LA TRADUCCIÓN

El ribosoma es la maquinaria responsable de la síntesis de proteínas en todos los seres vivos. Está formado por dos subunidades; menor y mayor. La partícula completa posee una masa molecular aproximada de $2,5 \times 10^3$ y $4,5 \times 10^3$ kDa en procariotas (70S) y eucariotas (80S), respectivamente.

La estructura general del ribosoma se esquematiza en la **Figura 2-1**. Existe una cavidad entre ambas subunidades formada casi exclusivamente por ARNr, abierta en ambos extremos, donde se encuentran tres bolsillos en los cuales se albergan los ARNt, llamados sitio A (Aminoacil-ARNt), que es el sitio decodificador; sitio P (peptidil-ARNt), donde se halla el centro peptidil-transferasa que cataliza la formación de la unión peptídica, y sitio E (exit, de salida), desde donde el ARNt abandona el ribosoma.

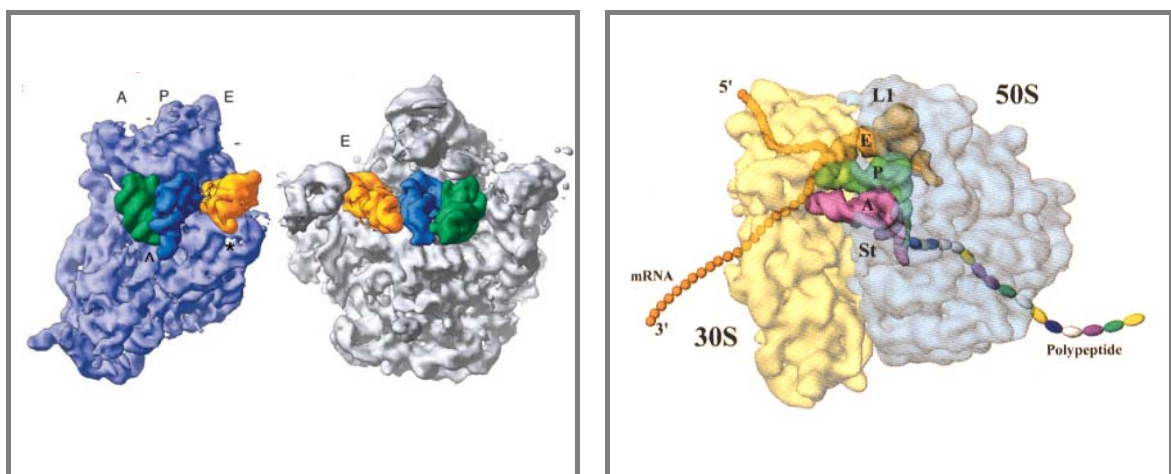


Figura 2-1. Esquema de la estructura del ribosoma 70S. En el panel izquierdo se observan la subunidad menor (izquierda) y la mayor (derecha) y los tres sitios de unión a los ARNt (A, P y E). (Cate y col, 1999). En el panel derecho se muestran los sitios A, P y E, los lugares de entrada y salida del ARNm y el túnel de salida de la cadena polipeptídica. (Frank, 2001).

Morfológicamente, la subunidad menor es alargada, y se observan claramente varios dominios estructurales (Figura 2-2) los cuales han sido denominados como cuerpo (body, **b**), cabeza (head, **h**), plataforma (platform, **pt**), protuberancia (spur, **sp**) y hombro (shoulder, **sh**). Por el contrario, la subunidad mayor posee una forma más redondeada, a excepción de tres protuberancias, llamadas central (CP), L1 (L1) y L7/L12 stalk (en procariotas) o P stalk (en eucariotas) (**St**). La región de la cavidad entre ambas subunidades cercana al sitio A y el stalk constituye la región donde interactúan los factores de elongación, de terminación y de reciclado. En el otro extremo de la cavidad se encuentra el sitio E, cercano a la protuberancia L1 de la subunidad mayor y la región llamada “platform” de la subunidad menor.

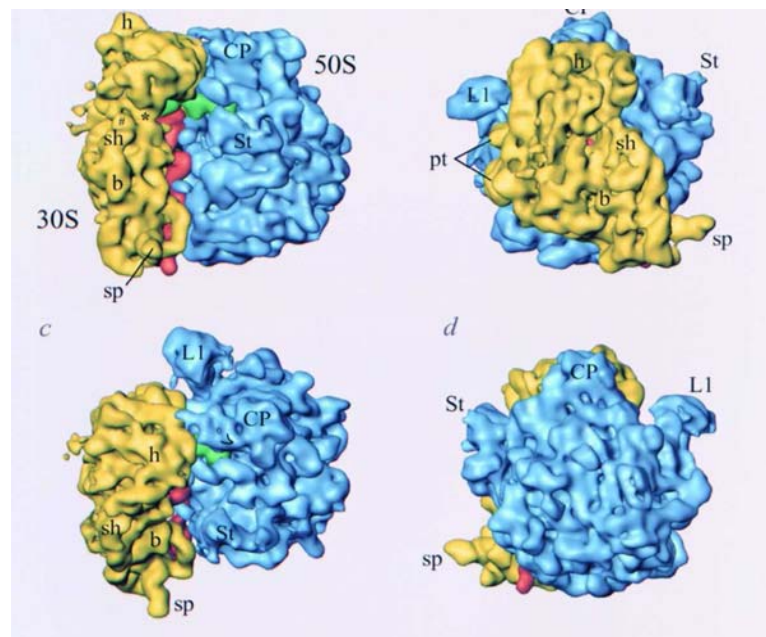


Figura 2-2. Estructura del ribosoma 70S de *E. coli*. Se muestran separadas las densidades correspondientes a la subunidad menor 30S (amarillo) y mayor 50S (azul). Los dominios estructurales de la subunidad menor, body (**b**), head (**h**), platform (**pt**), spur (**sp**) y shoulder (**sh**) junto con los de la subunidad mayor stalk base (**St**), proteína L1 (**L1**) y central protuberancias (**CP**) están indicados (Gabashvili y col, 2000).

Las moléculas de ARNr forman la parte central de ambas subunidades, y por lo tanto son los responsables de las características morfológicas mencionadas anteriormente. En procariotas, el ARNr de la subunidad menor posee cuatro dominios claramente separados, cada uno de los cuales forma un componente morfológico distinto. El dominio I forma la estructura llamada body, el dominio II forma la región denominada platform, el dominio IIIa compone la región llamada head y el dominio IIIb forma la interface con la subunidad mayor (figura 2-3, panel izquierdo). En cambio, los seis dominios de estructura secundaria que componen el ARN 23S de la subunidad mayor se encuentran mucho más intrincados formando una estructura más compacta, como se puede ver en la figura 2-3, panel derecho.

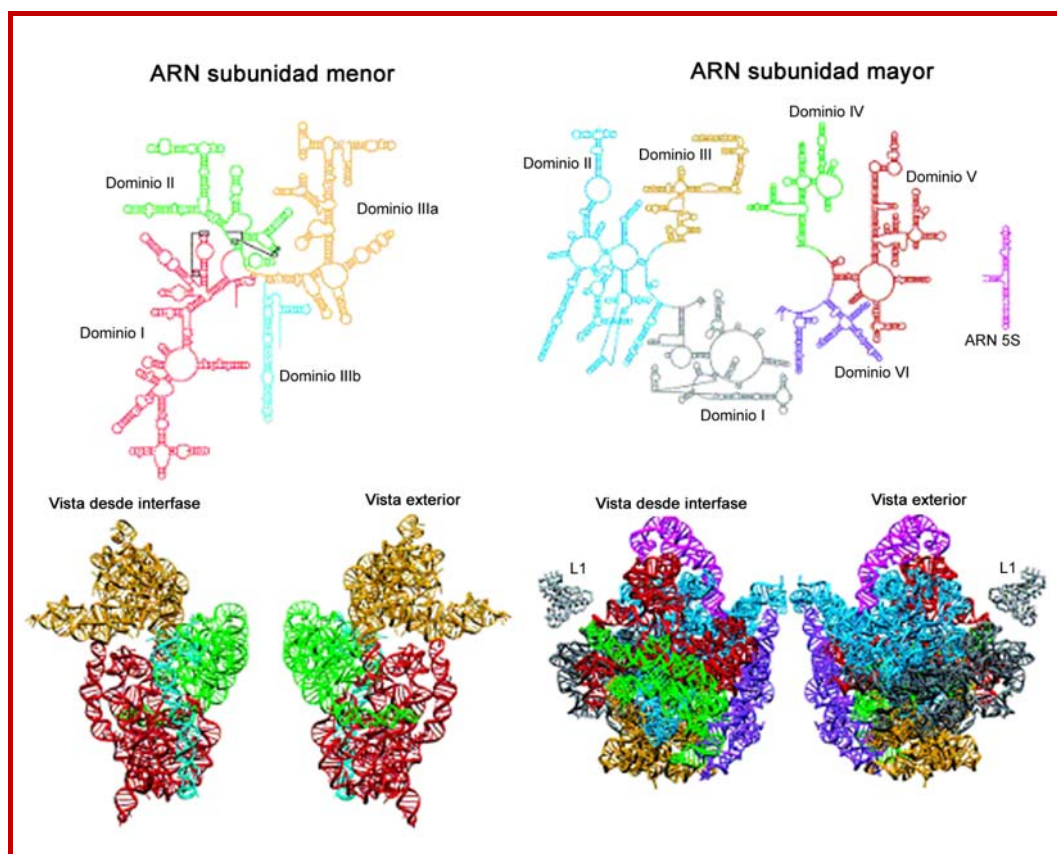


Figura 2-3. Dominios de las moléculas de ARN del ribosoma 70S. Se muestran los diagramas de estructura secundaria (arriba) y terciaria (abajo). (Ramakrishnan y Moore, 2001).

La estructura secundaria de los ARN ribosomales eucariotas es similar, con algunas diferencias. En primer lugar, el ARNr 5,8S eucariota corresponde al dominio I del ARN 23S procariota. Además, las moléculas de ARNr eucariotas presentan importantes inserciones dentro de la estructura central conservada. Estas inserciones son denominadas Segmentos Expandidos, y su longitud es variable dependiendo de la especie. Estructuralmente, estas regiones únicas del ribosoma eucariota se encuentran localizadas exclusivamente en la periferia.

Los kinetoplásticos presentan una característica única dentro de los eucariotas. La molécula de ARNr correspondiente al ARNr 23S procariota, es procesada mediante múltiples digestiones en sitios específicos para formar finalmente seis moléculas de ARN ribosomal, las cuales en conjunto son homólogas al ARNr 28S de otros organismos eucariotas. Estas moléculas se denominan 28S α , 28S γ , 28S β , 28S δ , 28S ζ y 28S ϵ . Los sitios precisos de este procesamiento inusual han sido identificados en *T. brucei* (White y col, 1986). Las razones y significado funcional de este mecanismo son actualmente desconocidos.

Mediante ensayos de crío-microscopía electrónica (crío-ME), se han obtenido las primeras imágenes de un ribosoma eucariota; el de *S. cerevisiae* (Spahn y col, 2001). Los resultados de estos estudios han mostrado que la región central del ribosoma eucariota muestra una gran similitud con el ribosoma procariota. Sin embargo, se hallaron algunas diferencias estructurales en regiones funcionalmente importantes, y grandes cambios en las regiones periféricas, debido principalmente a la presencia de expansiones en las moléculas de ARN y la presencia de proteínas ribosomales adicionales. El ribosoma eucariota presenta cuatro puntos adicionales de interacción entre ambas subunidades, además de los

seis hallados previamente en el ribosoma procariota. Al igual que en bacterias, la mayor parte de estas interacciones son llevadas a cabo por ARN.

Desde el punto de vista del mecanismo, la síntesis de proteínas es dividida tradicionalmente en etapas de **iniciación**, **elongación** y **terminación**. Todas estas etapas son catalizadas por los correspondientes factores de iniciación, elongación y terminación, los cuales interactúan transitoriamente con el ribosoma. Muchos de estos factores son GTPasas, y su actividad depende de cambios conformacionales inducidos luego de la hidrólisis de GTP. Los mecanismos de elongación y terminación son altamente conservados entre procariotas y eucariotas. Por lo tanto se describirán los procesos y factores descritos en procariotas, y se mencionarán las particularidades de dichos procesos en eucariotas. Por el contrario, la iniciación es un proceso mucho más complejo, y los factores involucrados y mecanismos son mucho más divergentes, por lo que se mencionará únicamente el modelo eucariota.

2.1.2 INICIACIÓN.

Esta etapa se puede dividir en los siguientes eventos (Figura 2-4):

1. El factor de iniciación 3 (eIF3) se asocia a la subunidad menor del ribosoma evitando la unión con la subunidad mayor.
2. El eIF2 une GTP y se asocia específicamente al ARNt-Met (iniciador) formando un complejo ternario (eIF2-GTP-ARNt-Met).
3. El complejo ternario se asocia a la subunidad ribosomal 40S.

4. El complejo $43S$ contiene varias proteínas: $eIF4E$, que es la subunidad que interactúa directamente con el CAP; $eIF4A$, una ARN helicasa que rompe estructuras secundarias en la región 5'UTR permitiendo que el complejo $43S$ pueda unirse y "leer" el ARNm; e $eIF4G$, que funciona como una proteína central interactuando con $eIF4E$, $eIF4A$ e $eIF3$. $eIF4G$ también interactúa con la proteína de unión a poli A (Poly A Binding Protein; PABP), permitiendo de esta manera la circularización del ARNm (Wells y col, 1998). La unión de todo el complejo guía la subunidad $40S$ activada hacia el extremo 5' del mRNA. Este tipo de iniciación se conoce como iniciación dependiente del CAP y es el tipo más común de iniciación (Lamphear y col, 1995). También ocurre a través de un mecanismo alternativo independiente del CAP.
5. Todo el complejo asociado al ARN mensajero se desplaza hacia el extremo 3' en busca del codón iniciación AUG. Este proceso, conocido como exploración, requiere energía y factores adicionales de la iniciación.
6. Cuando la subunidad $40S$ activada ha alcanzado el codón iniciación, se asocia la subunidad mayor $60S$. Esta reacción requiere un factor adicional de la iniciación, $eIF5$, que hidroliza el GTP unido al $eIF2$, liberando los factores de iniciación del ribosoma (Pestova y col, 1998; Shin y col, 2002). Como resultado de este proceso, el ARNt-Met se coloca en el sitio P del ribosoma listo para comenzar con la elongación. Una vez finalizada la síntesis de proteínas el ribosoma $80S$ se disocia en las subunidades $40S$ y $60S$. La reasociación espontánea de las subunidades es prevenida por el factor $eIF3$.

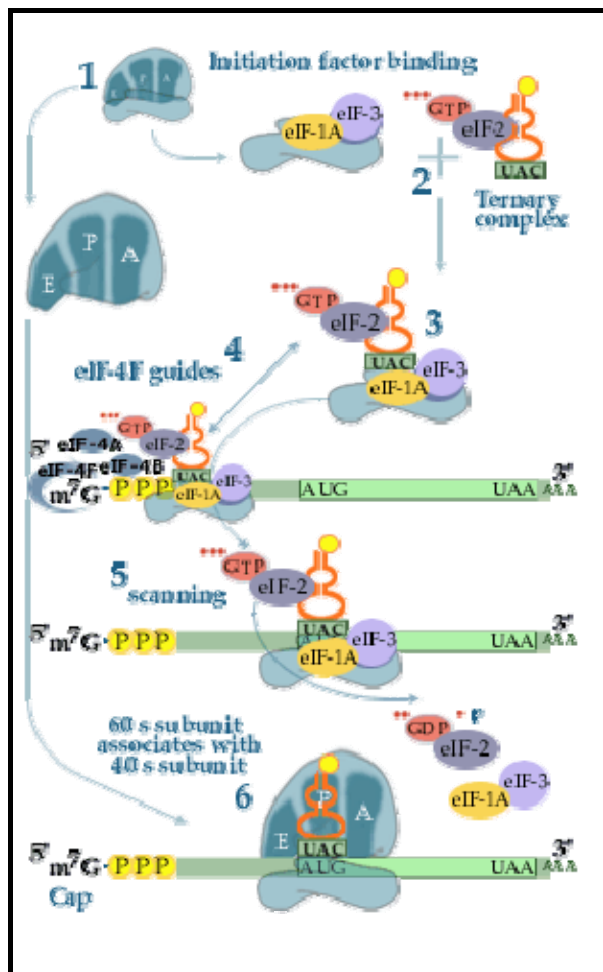


Figura 2-4. Esquema del mecanismo de inicio de la traducción en eucariotas. 1, 2 y 3; Formación del complejo de preiniciación 43S. 4 y 5; El ARNm se asocia a la subunidad menor del ribosoma a través del complejo eIF-4F, el cual reconoce el cap 5' (m⁷G), permitiendo que la subunidad 40S encuentre el codón de iniciación (AUG). 6; Se produce la liberación de los factores de iniciación y la asociación de la subunidad 60S.

2.1.3 ELONGACIÓN.

En el proceso de elongación, los mecanismos están más conservados entre procaríotas y eucariotas. Esta etapa requiere de dos factores; llamados en bacterias EF-Tu (EF-1 en eucariotas) y EF-G (EF-2 en eucariotas).

Un complejo formado por EF-Tu unido al aminoacil-ARNt y GTP se aproxima al ribosoma y el anticodón del ARNt es enfrentado al codón del ARNm localizado en el sitio A (Figura 2-5 b). Una buena complementariedad entre codón y anticodón permite la unión de EF-Tu al ribosoma, disparando a su vez la hidrólisis de GTP, lo que produce un cambio conformacional de EF-Tu. El complejo EF-

Tu:GDP posee baja afinidad por el ARNt, por lo que se disocia del ribosoma. La liberación de EF-Tu:GDP permite la reorientación del aminoacil-ARNt a una posición cercana al centro peptidil-transferasa (Stark y col, 1997). La actividad peptidil-transferasa es debida al ARNr 23S de la subunidad mayor, más precisamente ubicado en el asa central del dominio V (Hampl y col, 1981; Noller, 1993). El grupo peptidil unido al ARNt localizado en el sitio P del ribosoma es transferido al aminoacil-ARNt ubicado en el sitio A (Figura 2-5 c y d). Esto deja un peptidil-ARNt en el sitio A y un ARNt deacetilado en el sitio P (Wilson y Noller, 1998).

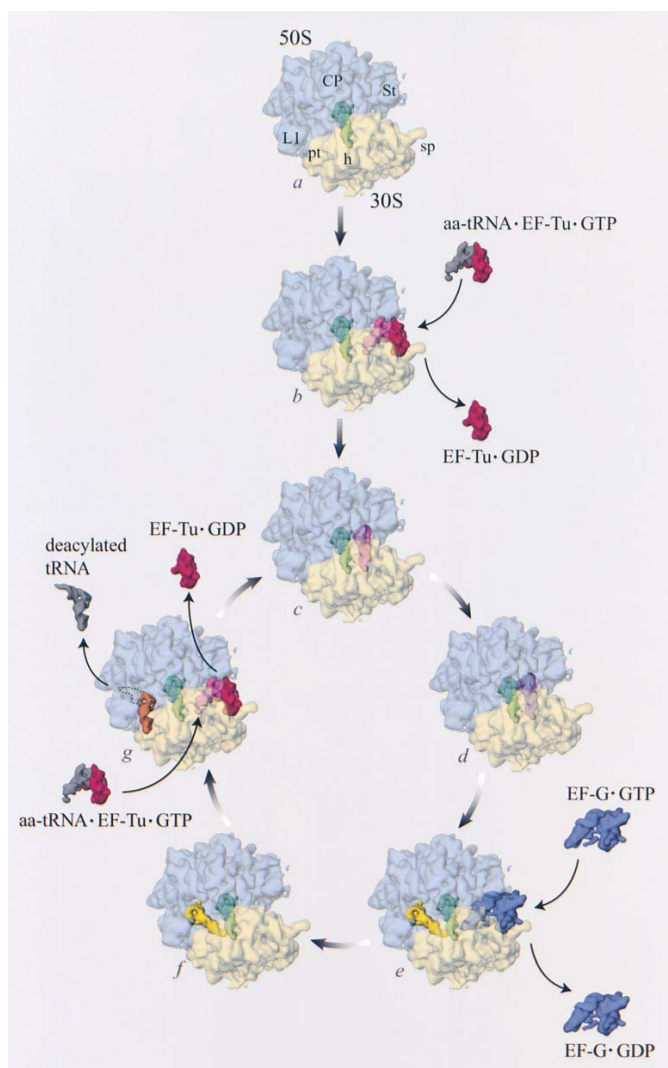


Figura 2-5. Modelo del mecanismo de elongación peptídica durante la síntesis de proteínas. **a;** Unión del aminoacil-ARNt correcto en el sitio A del ribosoma. **b;** Ingreso del complejo aa-tRNA:EF-Tu:GTP y liberación del EF-Tu:GDP luego de la hidrólisis de GTP. **c;** Ingreso del EF-G que por hidrólisis del GTP produce la traslocación del peptidil-ARNt del sitio A al sitio P y del ARNt libre del sitio P al E. **g;** Liberación del ARNt libre. El ribosoma está listo para reiniciar otro ciclo. (Agrawal y col, 2000)

La etapa final de la elongación es la translocación del ARNt vacío del sitio P al E y del peptidil-ARNt del sitio A al P, y el desplazamiento del ARNm por tres nucleótidos dejando el próximo codón en el sitio A del ribosoma (Figura 2-5 e). Esta etapa es catalizada por EF-G (EF-2 en eucariotas), el cual se une al ribosoma acompañado con GTP (Kaziro, 1978; Czworkowski y Moore, 1996; Nyborg y Liljas, 1998). Luego se produce la hidrólisis de GTP, liberando la energía necesaria para la translocación, y finalmente EF-G (EF-2) unido a GDP se disocia del ribosoma.

2.1.4 TERMINACIÓN

La finalización de la síntesis de la cadena polipeptídica (Figura 2-6) se produce cuando uno de los tres codones de terminación (UAG, UAA o UGA) se encuentra en el sitio A del ribosoma (Ganoza, 1966; Capecchi, 1967; Scolnick y col, 1968) (Reviews: Nakamura y col, 1996; Buckingham y col 1997). En bacterias existen dos factores de terminación o liberación que reconocen los codones de terminación: RF1 (UAA y UAG) y RF2 (UAA y UGA) y activan la peptidil-hidrolasa del ribosoma. En eucariotas, sólo existe un factor de liberación que reconoce los tres codones de terminación, llamado RF1 (Kisselev y col, 2003).

Una vez que se ha producido la liberación de la cadena polipeptídica del ribosoma, RF1/2 es liberado por RF3, el cual se une formando un complejo con GDP. La unión de RF3 al ribosoma produce la liberación del GDP unido. Sólo después de esta etapa RF3 puede unir GTP, el cual es hidrolizado y permite la liberación de RF3 del ribosoma (Kisselev y col, 2003). El complejo de post-terminación está formado probablemente por un ribosoma con un sitio A vacío, un

ARN^m unido, y un ARN^t deacetilado en el sitio P. Posteriormente se unen al ribosoma el factor de reciclado (RRF; ribosome recycling factor) y EF-G:GTP, los cuales llevan a la separación de ambas subunidades (Hirashima y Kaji, 1973; Janosí y col 1996).

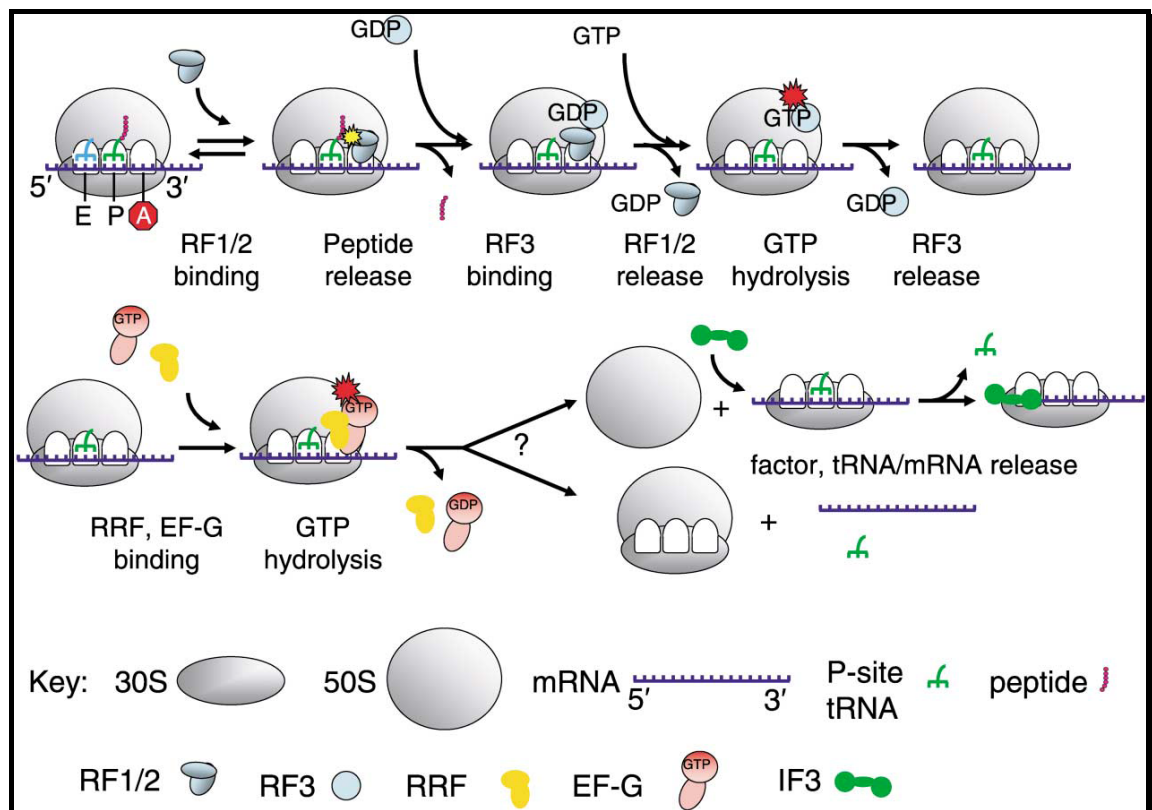


Figura 2-6. Mecanismo de terminación de la traducción en procariotas. El ribosoma llega a un codón de terminación y por lo tanto se incorpora un Factor de Liberación (RF1/2) en el sitio A. Esto produce la hidrólisis de la unión peptídica y la consiguiente liberación de la proteína del ribosoma. El ribosoma incorpora RF3, el cual interactúa con RF2 en su estado libre de nucleótidos. La incorporación de GTP a RF3 produce la liberación de RF2 y la posterior hidrólisis libera al RF3 del ribosoma. Para desacoplar las subunidades ribosomales es necesaria la acción del RRF-EF-G. (Ramakrishnan, 2002).

2.1.5 LA ESTRUCTURA DEL STALK RIBOSOMAL

La subunidad mayor de los ribosomas, tanto procariotas como eucariotas, posee una protuberancia lateral flexible directamente involucrada en el proceso de síntesis de proteínas, llamada stalk. En los organismos procariotas esta estructura está formada por la proteína L11, una región del ARNr 23S a la cual se une L11, la proteína L10 y múltiples copias de las proteínas L7/L12 (las cuales son la forma no acetilada y acetilada, respectivamente, de una misma cadena polipeptídica). L7 y L12 forman dímeros estables en solución y su estructura consiste de un dominio N-terminal flexible unido a un dominio C-terminal globular compacto (Liljas y col, 1978). Estudios de criomicroscopía electrónica han demostrado que la región GTPasa de muchos factores de transcripción (IF2, EF-Tu, EF-G, RF3) interacciona con la región comprendida entre el sarcin-ricin loop (SRL), el ARNr 23S y el stalk. Esto sugiere que esta región del ribosoma constituye un dominio GTPasa (Figura 2-7) (Diaconu y col, 2005).

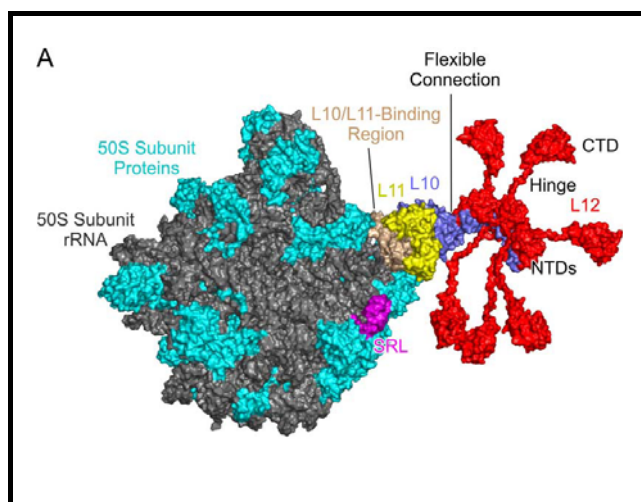


Figura 2-7. Modelo de la organización del Stalk procariota. Vista del complejo L10-(L12)₆ modelado en la subunidad ribosomal 50S. Las cadenas polipeptídicas están en color cian y las cadenas de ARNr 23S y 5S en gris.

El sitio de unión de las proteínas L10/L11 al ribosoma es beige, L11 amarillo, L10 azul, L12 rojo. El sarcin-ricin loop en magenta (SRL). Los dominios C-terminales (CTD) y N-terminales (NTD) de L12 están indicados.

Los componentes ortólogos en el ribosoma eucariota son las proteínas ribosomales P, y es aceptado en forma general que cumplen roles funcionales similares. Sin embargo, las proteínas eucariotas poseen algunas importantes diferencias respecto de sus contrapartes procariotas, y no presentan homología de secuencia relevante.

2.1.6 LAS PROTEÍNAS RIBOSOMALES P

En los eucariotas se encuentran diferentes tipos de proteínas ribosomales P. En general existe un solo tipo de proteína P “grande” (35-40 kDa), llamada P0 y diferentes tipos de proteínas P “chicas” (10-12 kDa).

Las proteínas P “chicas” son funcionalmente análogas a L7/L12 pero a diferencia de estas últimas, son codificadas por genes independientes. En algunos eucariotas, incluyendo humanos (Rich y Steitz, 1987), rata (Wool y col, 1991), e invertebrados (van Agthoven y col 1977; Wigboldus, 1987), han sido descritas dos clases; P1 y P2. Sin embargo, el número de proteínas P “chicas” es mayor en otros organismos. P1, P2 y P3 han sido descritas en plantas (Bailey-Serres y col, 1997), P1 α , P1 β , P2 α y P2 β existen en *S. cerevisiae* (Planta y Mager, 1998) y lo mismo ocurre en *T. cruzi* (Levín y col, 1993; Jurí Ayub y col, 2005).

El extremo C-terminal se encuentra altamente conservado en todas las proteínas ribosomales P. El péptido consenso DMGFGLFD se encuentra en casi todos los organismos con sólo algunas variaciones menores en plantas y protozoos. El alto grado de conservación de esta secuencia sugiere que cumple una

función importante, y debido a que se encuentra expuesta al medio citoplasmático, se ha propuesto que interactúa con los factores de elongación. Evidencias experimentales de estas interacciones han sido descritas en rata (Bargis-Surgey y col, 1999) y levadura (Lalioti y col, 2002). Por otro lado, este péptido es altamente antigénico y es fuertemente reconocido por sueros de pacientes con enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico (Elkon y col, 1985) e infecciosas tales como la enfermedad de Chagas (Levin y col, 1993) y leishmaniasis (Skeiky y col, 1994).

Una importante particularidad de las proteínas P1/P2 que las diferencia del resto de las proteínas ribosomales es la presencia de una fracción libre en el citoplasma, no asociada a las partículas ribosomales. En tal sentido, estas proteínas han sido detectadas en el citoplasma en *Artemia salina* (van Agthoven y col, 1978), *S. cerevisiae* (Mitsui y col, 1988); y *Rattus rattus* (Uchiumi y Komínami, 1992; Tsurugi y Ogata, 1985). En *S. cerevisiae*, se ha demostrado que el número de proteínas P1/P2 unidas al ribosoma varía dependiendo del estado metabólico de las células (Saenz-Robles y col, 1990), sugiriendo un rol clave de estas proteínas en la regulación de la traducción. Más aún, la expresión de estas proteínas no es esencial para la viabilidad en *S. cerevisiae*, como se ha demostrado mediante la técnica de "knock out" (Remacha y col, 1995). Sin embargo, dichas cepas presentan una velocidad de crecimiento significativamente menor y un patrón de expresión de proteínas diferente al de las cepas salvajes, sugiriendo un papel importante de las proteínas P1/P2 en la regulación de la traducción.

A nivel estructural, las proteínas P1 y P2 carecen de un plegamiento terciario compacto. En condiciones fisiológicas estas proteínas muestran una estructura muy cercana a un "random coil", como ha sido demostrado mediante espectros de dicroísmo circular (CD) y resonancia magnética nuclear (RMN) (Zurdo y col, 1997; 2000a).

Al igual que P₁ y P₂ con L₇/L₁₂, P₀ es la proteína funcionalmente análoga a L₁₀ pero la similitud de secuencia no es obvia. P₀ es una proteína de mayor peso molecular que L₁₀ y posee una prolongación C-terminal de unos 100 aminoácidos, altamente homóloga a las proteínas P₁ y P₂. Por lo tanto, P₀ parece ser el resultado de una fusión entre una proteína similar a L₁₀ y una proteína P “chica”. La similitud entre P₀ y P₁/P₂ es especialmente clara en los últimos aminoácidos, los cuales poseen la secuencia consenso DMGFGLFD. Esta secuencia altamente conservada es la responsable de la inmunorreactividad cruzada entre las proteínas P₀, P₁ y P₂.

La caracterización funcional de P₀, principalmente en *S. cerevisiae*, ha permitido localizar diferentes dominios responsables de la interacción de esta proteína con distintos componentes del ribosoma y del citosol. El dominio N-terminal (aproximadamente 200 aminoácidos) es altamente conservado entre distintas especies y está involucrado en la interacción con el dominio GTPasa del ARNr 28S (Rodríguez-Gabriel y col, 2000). La región intermedia es responsable de la interacción de P₀ con las proteínas P₁/P₂ (Santos y Ballesta, 1995; Lalioti y col, 2002), mientras que el dominio C-terminal de 21 aminoácidos parece interactuar con el EF-2 (Bargis-Surgey y col, 1999; Lalioti y col, 2002).

A pesar de que el péptido C-terminal de las proteínas P es la región más conservada, en algunos organismos existen diferencias dentro de esta secuencia consenso (Anexo 5.6). En particular, la proteína P₀ de *T. cruzi* no es reconocida por la totalidad de los sueros reactivos contra P₁/P₂ (Schijman y col, 1992).

Mediante ensayos de inmunoprecipitación (Mitsui y col, 1988) e inmunotransferencia (Western blot) no ha podido detectarse la presencia de proteína P₀ libre en el citoplasma (Santos y Ballesta, 1994). Más aún, la sobreexpresión de P₀ en *S. cerevisiae* tampoco resulta en la acumulación de una fracción soluble. Esto sugiere que, al contrario que P₁ y P₂, la proteína P₀ no es estable fuera del contexto del ribosoma.

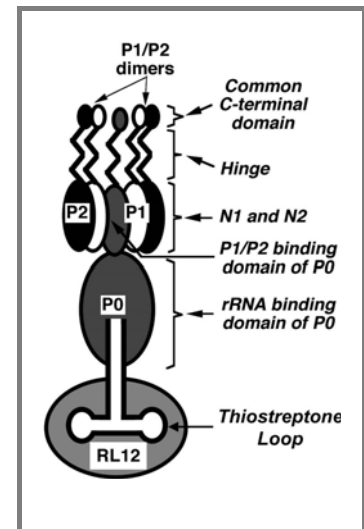
Otra importante diferencia entre las proteínas P₁/P₂ y P₀, es que esta última parece ser imprescindible para la viabilidad celular en *S. cerevisiae*. Esto se puso en evidencia con la creación de una cepa mutante condicional (Santos y Ballesta, 1994). De esta manera se pudo estudiar el efecto de modificaciones de la proteína P₀ sobre la viabilidad celular.

2.1.7 EL COMPLEJO RIBOSOMAL P

Como es de esperar, P₀ interactúa con las proteínas P₁/P₂, confirmando la similitud funcional con las proteínas bacterianas L10 y L7/L12. Un complejo de las proteínas P₀/P₁/P₂ ha sido aislado a partir de extractos de células de mamíferos (Rich y Steitz, 1987; Uchiyumi y Komínami, 1992). Ensayos de entrecruzamiento (cross-linking) realizados con ribosomas de *Artemia salina* también mostraron la existencia de un complejo P₀/P₁/P₂ (Uchiyumi y col, 1987). Más recientemente, el complejo de rata ha sido reconstituido *in vitro* a partir de las proteínas P recombinantes (Gonzalo y col, 2001).

Si bien es ampliamente aceptado que las proteínas P₀/P₁/P₂ forman un complejo pentamérico similar al observado para las proteínas L₁₀/L₇/L₁₂ bacterianas, la organización de las proteínas P dentro de esta estructura sólo es conocida con cierto detalle en el caso de *S. cerevisiae*. Además, el número variable de proteínas P₁ y P₂ (e incluso la existencia de P₃ en plantas) impide extrapolar los datos surgidos en un sistema a otro. Una de las preguntas a resolver es si las proteínas P₁/P₂ dentro del complejo se hallan formando homodímeros (P₁/P₁ y P₂/P₂) o heterodímeros (P₁/P₂). Las primeras evidencias surgidas de estudios de cross-linking sobre ribosomas de *Artemia salina* (Uchiumi y col, 1987) parecían apoyar la primera posibilidad. En cambio, experiencias *in vitro* con proteínas P de rata sugieren que P₁ es el puente entre P₀ y P₂, ya que P₁ puede unirse a P₀ en ausencia de P₂. Además, la formación de un complejo entre P₀ y P₂ requiere de P₁ (Figura 2-8) (Gonzalo y col, 2001; Gonzalo y Reboud, 2003). Ensayos mediante el método de doble híbrido en levaduras utilizando las proteínas P₁ y P₂ humanas también han mostrado una fuerte interacción heterodimérica (Tchórzewski y col, 2000). Por lo tanto, las evidencias apuntan a una interacción heterodimérica entre P₁ y P₂.

Figura 2-8. Representación de los componentes del stalk de mamíferos. P0 interacciona con el ARNr 28S y une dos dímeros P1/P2 al ribosoma. Los dominios C-terminales quedan expuestos y la región bisagra (hinge) extendida. P2 no tiene contacto directo con P0 y se une a P1 a través de la región N terminal. La proteína L12, se une al dominio N-terminal de P0 y al Thiostreptone loop del RNAr 28S constituyendo la base del stalk.



El sistema de las proteínas P de *S. cerevisiae* ha sido el más profundamente estudiado, mediante diferentes aproximaciones experimentales. Utilizando diversas cepas *knock out* para una o más proteínas P1/P2, se ha analizado el efecto de cada una de éstas sobre la capacidad de las restantes proteínas para unirse a los ribosomas. Estos estudios han mostrado que las proteínas P1/P2 de *S. cerevisiae* interactúan formando heterodímeros, y que existen pares de interacción preferenciales; P1 α /P2 β y P1 β /P2 α . La ausencia de alguna de las proteínas P1/P2 impide o disminuye sensiblemente la posibilidad de que su par interactuante se una al ribosoma (Zurdo y col, 2000b). Estudios más recientes utilizando la técnica de doble híbrido han confirmado las interacciones preferenciales detectadas inicialmente (Laloti y col, 2002). Además, han permitido estudiar con mayor detalle las interacciones entre P0 y cada una de las proteínas P1/P2.

Mediante el uso de las cepas de levaduras mutantes condicionales para P0 (Santos y Ballesta, 1995) se han mapeado los dominios funcionales de esta proteína. Cuando se eliminan los 132 aminoácidos C-terminales de P0 (los cuales incluyen toda la extensión de P0 homóloga a P1/P2), los ribosomas se vuelven inactivos y las proteínas P1/P2 no pueden interactuar con el ribosoma. Cuando se utiliza una mutante de P0 carente de los últimos 21 aminoácidos en una cepa de levaduras que además carece de las proteínas

P1/P2, los ribosomas se vuelven inactivos, demostrando que la presencia del péptido C-terminal de P0 es absolutamente imprescindible para la viabilidad celular en esta cepa. Estos resultados sugieren que la protuberancia ribosomal contiene cinco péptidos C-terminales ácidos estructural y funcionalmente análogos, y que la presencia de al menos uno de ellos es imprescindible para la función del ribosoma.

Todo esto ha permitido obtener un modelo sólido acerca de la organización de las proteínas ribosomales P en *S. cerevisiae* (Figura 2-9). En este modelo las proteínas P1/P2 se encuentran formando pares heterodiméricos preferenciales (P1 α /P2 β y P1 β /P2 α). Además, se han demostrado fuertes interacciones entre ambas proteínas P1 y P0. Mientras que sólo existen evidencias directas de la interacción de P0 con P2 α .

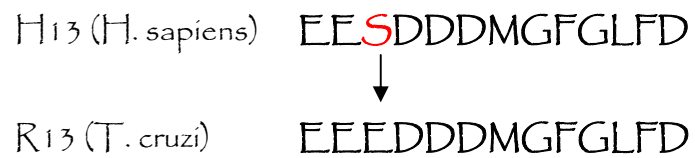


Figura 2-9. Modelo propuesto por Guarinos y col, 2003 para las interacciones entre las proteínas ribosomales P de *S. cerevisiae*. Las proteínas P1 α y P1 β interactúan fuertemente con P0. Se forman preferencialmente los heterodímeros P1 α /P2 β y P1 β /P2 α . La asociación a P0 se da inicialmente a través de las P1 y finalmente se exponen en P0 los sitios de interacción para las P2.

2.1.8 LAS PROTEÍNAS RIBOSOMALES P DE *T. cruzi*.

Trypanosoma cruzi posee 5 proteínas ribosomales P: TcP1 α , de 109 aminoácidos (Acceso GeneDB P26643), TcP1 β , de 115 aminoácidos (Acceso GeneDB Q61WF5), TcP2 α , de 112 aminoácidos (Acceso GenDB P26795), TcP2 β , de 107 aminoácidos (Acceso GenDB Q26957) y TcPo, de 321 aminoácidos (Acceso GenDB Q4E3A3). Un alineamiento de las 5 proteínas P de *T. cruzi* se muestra en la sección 5.5 del anexo. Estas proteínas presentan muchas particularidades con respecto a los modelos expuestos anteriormente y a pesar de que posee 5 proteínas, tal como se describió para *S. cerevisiae* no existe relación evolutiva entre ellas.

El estudio de las proteínas P de *T. cruzi* comienza con la identificación el antígeno JL5, correspondiente a la región C-terminal de la proteína TcP2 β , rastreando una biblioteca de expresión de *T. cruzi* con el suero de un paciente (UL) con cardiopatía chagásica severa (Levín y col, 1989; Mesri y col, 1990). Mas tarde se identificó el recombinante JL52 correspondiente a la región C-terminal de la proteína TcPo (Schijman y col, 1992). Mediante el uso de péptidos sintéticos se demostró que el determinante antigénico de la proteína TcP2 β que reconocen los sueros de pacientes chagásicos corresponde a los 13 aminoácidos C-terminales de la misma (Mesri y col, 1990). Este péptido fue llamado R13. Resultó de interés el hecho de que la región correspondiente de las proteínas P humanas (H13) es también el epítipo reconocido por los sueros de pacientes con la enfermedad autoinmune Lupus Eritematoso Sistémico (Elkon y col, 1985; 1987). Las secuencias de H13 y R13 sólo difieren en un aminoácido, debido al reemplazo de un residuo Ser en H13 por Glu en R13:



Algunos sueros de pacientes chagásicos son capaces de reconocer las proteínas P humanas, mientras que la mayoría de los sueros lúpicos reconocen las proteínas ribosomales P de *T. cruzi*. Sin embargo, la afinidad de los sueros chagásicos por H13 es mucho menor que por R13 (Kaplan y col, 1997). Esto sugiere que la respuesta inmune está dirigida específicamente contra el parásito, por lo que se postula un mecanismo de inmunorreactividad cruzada, en lugar de un proceso autoinmune.

2.2 ANTECEDENTES

El laboratorio de Biología Molecular de la enfermedad de Chagas tiene una gran trayectoria en el estudio de las proteínas ribosomales P de *T. cruzi*. En el último período se ha comenzado a describir a profundidad los componentes del stalk del ribosoma de *T. cruzi* y las interacciones entre las proteínas que lo componen. Hay dos publicaciones recientes que voy a explicar a continuación que constituyen las bases del presente trabajo.

El primer trabajo “Protein–protein interaction map of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein complex” (Juri Ayub y col, 2005) explica cómo está formado el complejo P que forma el stalk en *Trypanosoma cruzi* y muestra un mapa de interacciones entre las proteínas que lo forman.

Se habían descrito y caracterizado, hasta el momento de esta publicación, cuatro proteínas P (TcP0, TcP1, TcP2 α , and TcP2 β). Utilizando técnicas de bioinformática en bases de datos del proyecto genoma de *T. cruzi* se encontró un quinto componente, que resultó ser la proteína P1 β . Se realizó un mapeo de las interacciones entre las cinco proteínas basado en la técnica de doble híbrido y se encontraron características únicas dentro de los eucariotas (Figura 2-10). La proteína TcP0 puede interactuar tanto con las proteínas P1 como con las P2. Además se identificaron interacciones entre la proteína TcP2 β y TcP1 α como así también la capacidad de la primera para formar homodímeros. La cuantificación de las distintas interacciones realizada por doble híbrido muestra al par TcP0/TcP1 β como el más fuerte del complejo.

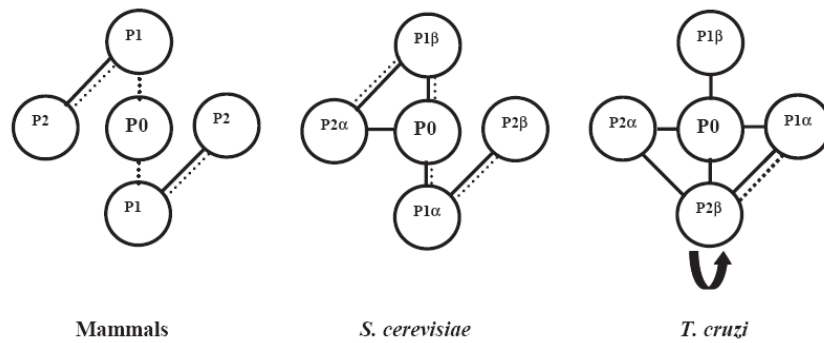


Figura 2-10. Organización del stalk ribosomal en distintas especies. Las interacciones proteína-proteína detectadas entre las proteínas P se indican como líneas. Aquellas interacciones detectadas por la técnica de doble híbrido se indican como líneas completas. Las líneas punteadas indican evidencias de interacción por otras técnicas. La flecha negra indica la capacidad de TcP2β para formar homodímeros.

El segundo trabajo “The structure of the 80S ribosome from *Trypanosoma cruzi* reveals unique rRNA components” (Gao y col 2005) presenta un análisis por criomicroscopía electrónica de la estructura del ribosoma completo.

El mapa de densidades obtenido del ribosoma 80S de *T. cruzi* muestra las estructuras conservadas filogenéticamente del ARNr junto a características distintivas en las subunidades mayor y menor (Figura 2-11). Aparece una estructura que no había sido descrita hasta el momento (spire), que es una hélice próxima al sitio de salida del ARNm. Se propone que esta estructura participa en el reclutamiento del extremo 5' del mensajero facilitando y modulando el inicio de la traducción, único en Trypanosomátidos.

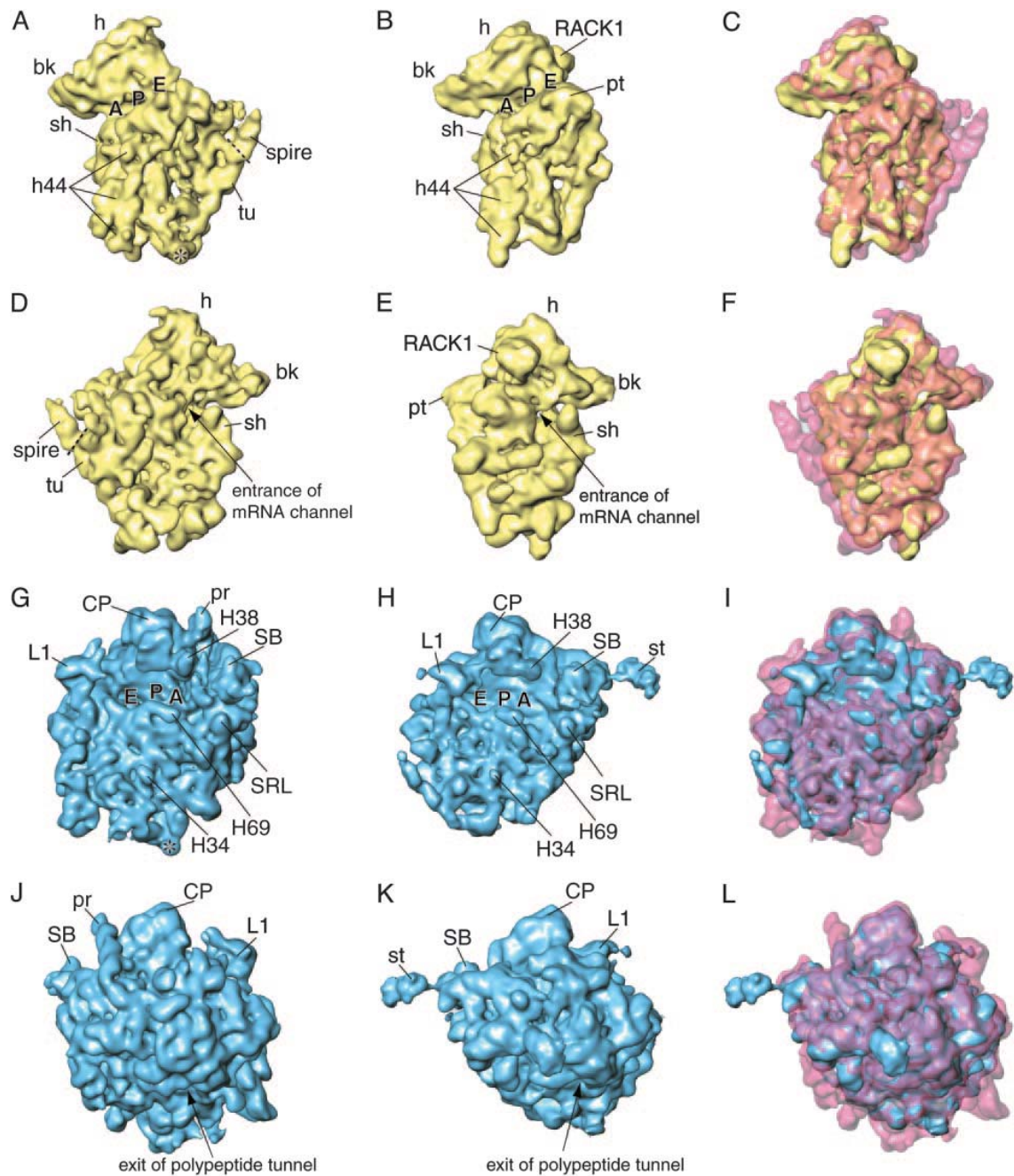


Figura 2-11. Comparación estructural del ribosoma de *T. cruzi* y levadura. (A y B) Vista de la región interna de la subunidad 40S. (D y E) Vista de la región externa de la subunidad 40S. (C y F) Superposición de las subunidades (*T. cruzi* 40S semitransparente rojo y levadura 40S en Amarillo sólido). (G y H) Vista de la región interna de la subunidad 60S. (J y K) Vista de la región externa de la subunidad 60S. (I y L) Superposición de las subunidades (*T. cruzi* 60S semitransparente rojo y levadura 60S en Amarillo sólido).

Este mapa expone características únicas del ribosoma de *T. cruzi* que junto a otras caracterizaciones, como la expuesta en el trabajo anterior, orientan la búsquedas de drogas específicas con actividad tripanocida.

2.3 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Trypanosoma cruzi presenta una organización general del complejo P distinta a la de mamíferos y es posible que esta estructura sea común al resto de los Trypanosomátidos. Por lo tanto, el estudio a profundidad de las proteínas que lo forman y sus interacciones pueden ser utilizados para el diseño de drogas en distintas infecciones parasitarias (Chagas, Leishmaniasis, enfermedad del sueño).

Uchiumi y col, 1990 y Zampieri y col, 2003 demostraron que los anticuerpos anti proteínas P y sus recombinantes, dirigidos contra la región C-terminal, tienen efectos inhibitorios sobre la síntesis de proteínas. Por lo tanto, dado el desarrollo de anticuerpos recombinantes dirigidos contra la región C-terminal de las proteínas P de *T. cruzi* expuesto en el capítulo 1, el presente trabajo propone:

- Identificar el número y tipo de proteínas P que forman el stalk en los distintos protozoarios secuenciados.
- Profundizar los conocimientos sobre la estructura del stalk de *T. cruzi* y las asociaciones entre las proteínas P y el factor de elongación 2, utilizando principalmente técnicas de “surface plasmon resonance”.
- Realizar una caracterización funcional de los anticuerpos recombinantes sobre ribosomas de *T. cruzi* y de mamíferos buscando actividades inhibitorias específicas y/o selectivas en *T. cruzi*.
- Diseñar péptidos miméticos que puedan mantener el efecto inhibitorio del anticuerpos sobre el ribosoma pero que no tengan efecto sobre los receptores cardíacos.

Resultados

Capítulo 2

2.4.1 COMPARACIÓN DEL COMPLEJO P EN PROTOZOARIOS

Gracias a la gran cantidad de proyectos genoma, contamos hoy en día con las secuencias de las proteínas P de numerosas especies de protozoarios. En muy pocos casos esta familia de proteínas está clasificada. Por lo tanto, utilizando las proteínas ribosomales P de *T. cruzi*, realizamos la búsqueda de las ortólogas en distintos protozoarios. Los organismos totalmente secuenciados hasta el momento que incluimos en este análisis son:

- *Cryptosporidium parvum* (Cp)
- *Dictyostelium discoideum* (Dd)
- *Eimeria tenella* (Et)
- *Entamoeba histolytica* (Eh)
- *Leishmania braziliensis* (Lb)
- *Leishmania infantum* (Li)
- *Leishmania major* (Lm)
- *Plasmodium berghei* (Pb)
- *Plasmodium chabaudi* (Pc)
- *Plasmodium falciparum* (Pf)
- *Plasmodium knowlesi* (Pk)
- *Theileria annulata* (Ta)
- *Theileria parva* (Tp)
- *Trypanosoma brucei* (Tb)
- *Trypanosoma congolense* (To)
- *Trypanosoma cruzi* (Tc)
- *Trypanosoma vivax* (Tv)

Encontramos en cada organismo todos los componentes del complejo P pero en la mayoría estaban mal identificados. En todos los casos encontramos la proteína P_O, centro organizador del complejo y punto de anclaje al ribosoma. En algunos casos se encontró una

proteína P1 y una P2 y en otros dos proteínas P1 (α y β) y dos proteínas P2 (α y β) tal como se había descrito previamente en *T. cruzi*. Para unificar la clasificación de las proteínas P realizamos un alineamiento de secuencias y construimos un árbol filogenético (Figura 2-12). Se utilizaron como marcadores de los grupos las proteínas P humanas (Hs P0, P1 y P2), las de levadura (Sc P0, P1 α , P2 α , P1 β y P2 β), las de *Arabidopsis thaliana* (At P0, P1, P2 y P3) y las de *T. cruzi* (Tc P0, P1 α , P2 α , P1 β y P2 β).

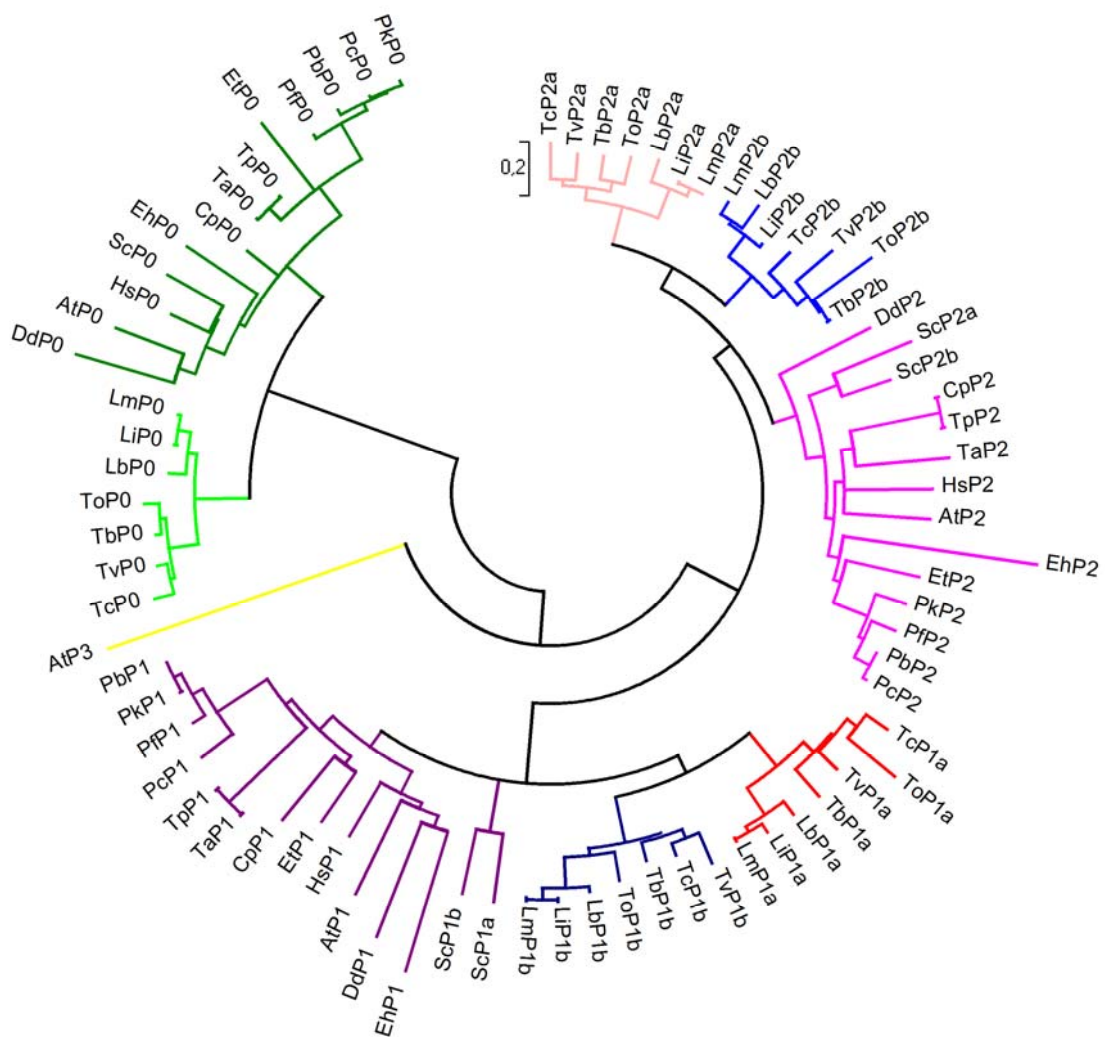


Figura 2-12. Agrupamiento de las proteínas P de protozoarios. En rosa se agrupan las P2 α , en celeste las P2 β , en lila las P2, en rojo las P1 α , en azul las P1 β , en violeta las P1. La proteína P3 de *Arabidopsis thaliana* se representa en amarillo. Las proteínas P0 están en color verde y se diferencian en oscuro y claro aquellos organismos que poseen una P1 y P2 de los que tienen dos P1 y P2 distintas respectivamente.

De este análisis se desprende que la divergencia entre proteínas α y β de levaduras es distinta a la de los protozoarios y que el grupo de los Trypanosomátidos (géneros: *Trypanosoma* y *Leishmania*, entre otros) poseen dos P1 y dos P2 distintas, mientras que los restantes poseen una sola proteína de cada tipo. Existe también divergencia entre las proteínas P0 ya que se agrupan diferencialmente las de Trypanosomátidos. Por lo tanto, es de esperar, que la organización del stalk en estos últimos sea distinta a la observada en levaduras y también difiera de la de mamíferos tal como se mostró en los antecedentes.

De los alineamientos de secuencias se desprenden zonas altamente conservadas, diferenciadas del consenso general, en Trypanosomátidos. La **figura 2-13** muestra una representación gráfica del alineamiento de todas las proteínas P1 que se utilizaron para la construcción del árbol filogenético. En este alineamiento se pueden identificar tres zonas altamente conservadas, correspondientes a la región N-terminal, media y C-terminal. Si analizamos estas zonas dentro del grupo de Trypanosomátidos encontramos patrones conservados entre P1 α y P1 β , tanto en la región N-terminal como en la C-terminal, pero la zona media de la proteína presenta motivos distintos en los dos subtipos de P1 (**Figura 2-13**).

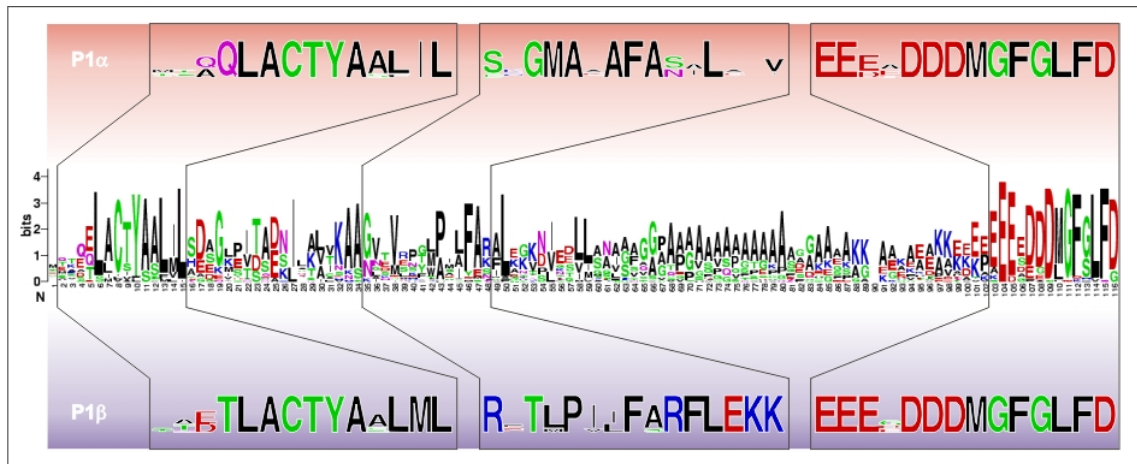


Figura 2-13. Alineamiento de las proteínas P1. En el centro se muestra la representación gráfica del alineamiento de las secuencias de las proteínas P1 utilizadas en la construcción del árbol filogenético. En la parte superior se destaca el alineamiento de las proteínas P1α de Trypanosomátidos en distintas zonas. En la parte inferior se destaca el alineamiento de las proteínas P1β de Trypanosomátidos en distintas zonas.

La representación gráfica del alineamiento de todas las proteínas P2 (figura 2-14) muestra también tres zonas altamente conservadas, correspondientes a la región N-terminal, media y C-terminal. Si analizamos estas zonas dentro del grupo de Trypanosomátidos encontramos patrones conservados entre P2α y P2β en las tres regiones.

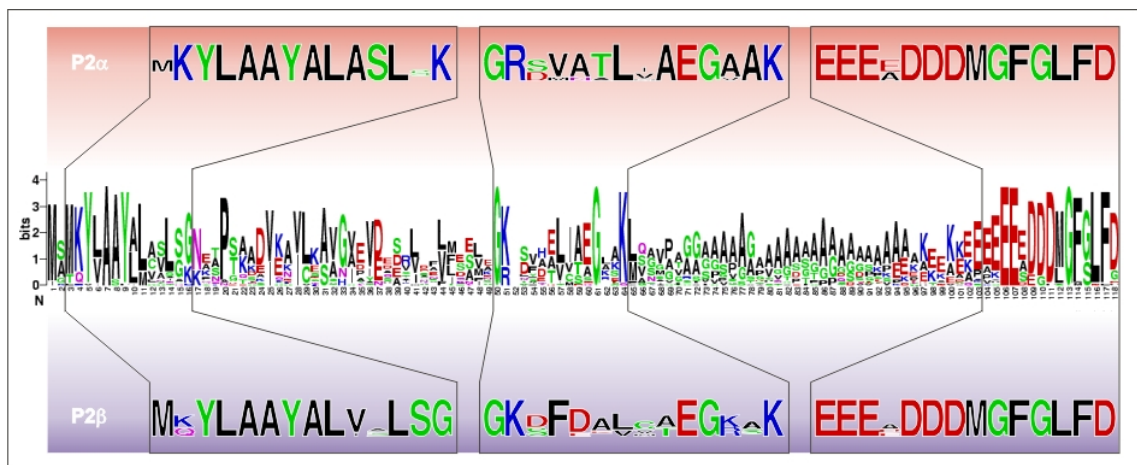


Figura 2-14. Alineamiento de las proteínas P2. En el centro se muestra la representación gráfica del alineamiento de las secuencias de las proteínas P2 utilizadas en la construcción del árbol filogenético. En la parte superior se destaca el alineamiento de las proteínas P2 α de Trypanosomátidos en distintas zonas. En la parte inferior se destaca el alineamiento de las proteínas P2 β de Trypanosomátidos en distintas zonas.

El análisis de las proteínas P0 muestra una región altamente conservada que corresponde aproximadamente a la mitad N-terminal y que constituye el sitio de unión al ARN ribosomal y de interacción con la proteína L11. El tercio C-terminal es la región involucrada en la interacción con los otros componentes del sistema P. Se muestra entonces (Figura 2-15) la representación gráfica del alineamiento de secuencias del tercio C-terminal de las proteínas P0 utilizadas para la construcción del árbol filogenético. Se destacan en Trypanosomátidos las regiones media y C-terminal, altamente conservadas.

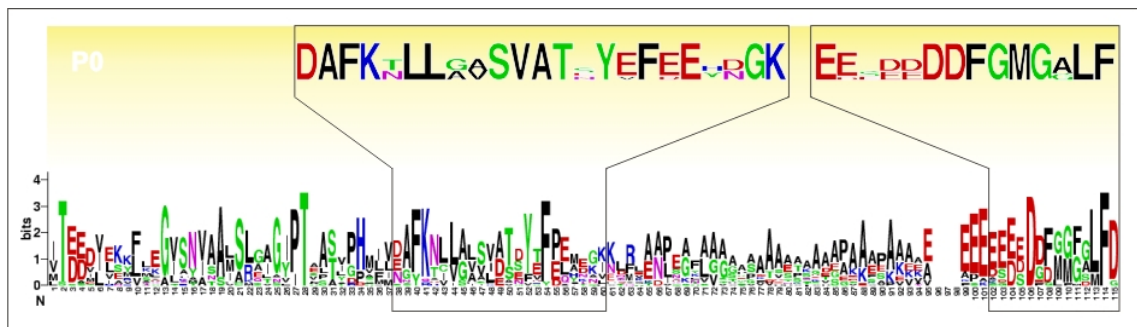


Figura 2-15. Alineamiento de las proteínas P0. En el centro se muestra la representación gráfica del alineamiento de las secuencias del tercio C-terminal de las proteínas P0 utilizadas en la construcción del árbol filogenético. En la parte superior se destaca el alineamiento de las proteínas P0 de Trypanosomátidos en distintas zonas.

2.4.2 INTERACCIONES ENTRE LAS PROTEÍNAS P

Realizamos un mapeo completo de las interacciones entre las distintas proteínas P de *T. cruzi* utilizando la técnica de SPR (Biacore 3000). Para esto trabajamos con las cinco proteínas P fusionadas a histidinas (vector pRSET) y a GST (vector pGEX). No se utilizó la proteína P₀ entera sino el tercio C-terminal, llamado CP₀ (Figura 5.7 Anexo).

Las proteínas fusionadas a GST junto a un canal control de GST libre fueron unidas covalentemente a un chip CM5, mientras que las proteínas fusionadas a histidinas se utilizaron en solución para determinar las cinéticas de las interacciones. La tabla 2-1 resume las cinéticas ensayadas y expone la capacidad para formar homodímeros de las proteínas CP₀, P_{2α} y P_{2β}. Solamente de la última proteína había evidencias de dimerización por la técnica de doble híbrido. Otro resultado a destacar es que no solo la proteína P₀ puede interactuar con todas las proteínas P “chicas” sino que también lo hace P_{2β}; siendo las interacciones mas fuertes las que se dan con la proteína P₀. Por lo tanto estamos ante un panorama novedoso y distinto al descrito mediante la técnica de doble híbrido.

Tabla 2-1. Parámetros cinéticos de las interacciones entre las proteínas P de *T. cruzi*. Se muestran los datos de K_d (M) relativizados al orden de magnitud. Se adjunta una tabla con los resultados reales (Figura 5.8 Anexo).

Solución	Chip CM5				
	CP ₀	P _{2β}	P _{1α}	P _{1β}	P _{2α}
CP ₀	1x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁷	1x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁷	1x10 ⁻⁶
P _{2β}	1x10 ⁻⁶	1x10 ⁻⁶	1x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁵
P _{1α}	1x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁶	(-)	(-)	(-)
P _{1β}	1x10 ⁻⁶	1x10 ⁻⁶	(-)	(-)	1x10 ⁻⁶
P _{2α}	1x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁶	(-)	1x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁵

Queda expuesta la capacidad de las proteínas P2 de *T. cruzi* para formar homodímeros, al igual que la capacidad para interactuar α con β . Por el contrario las proteínas P1 no forman homodímeros ni heterodímeros α/β (Figura 2-16). La proteína P0 sigue manteniendo un rol central en las interacciones pero aparece la proteína P2 β con un rol importante también ya que es la única proteína P “chica” con capacidad para interactuar con todo el complejo (Figura 2-16).

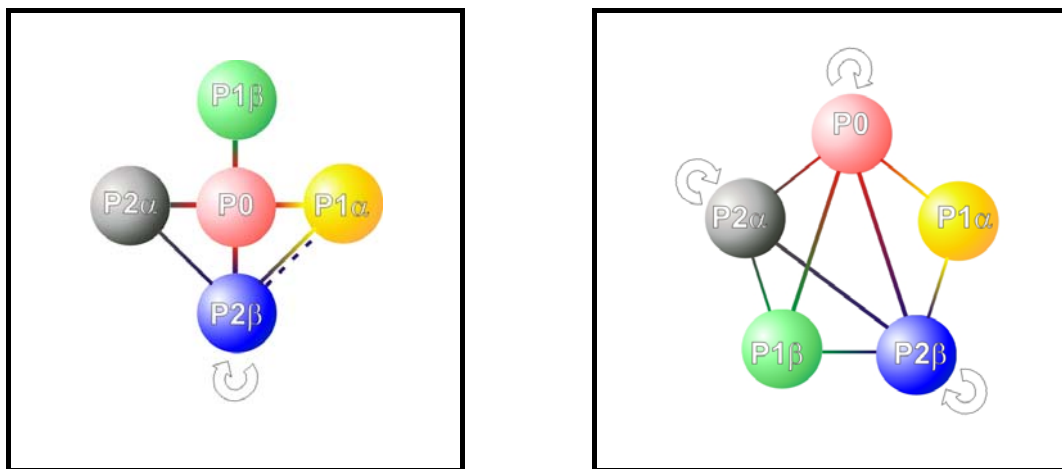


Figura 2-16. Interacciones entre las proteínas P de *T. cruzi*. A la izquierda se muestra el mapa de interacciones basado en la técnica de doble híbrido (líneas solidas) y ensayos bioquímicos (línea punteada). A la derecha se muestra el mapa de interacciones basado en la técnica de SPR (Biacore 3000).

Para poder profundizar en los dominios de interacción entre las proteínas P utilizamos proteínas truncadas de CPO a distintos puntos desde la región C-terminal. A la truncada $\Delta 3$ se le removieron 17 aminoácidos, a la truncada $\Delta 5$ se le removieron 51 aminoácidos y a la truncada $\Delta 2$ se le removieron 87 aminoácidos, tal como se ejemplifica en la figura 2-17.

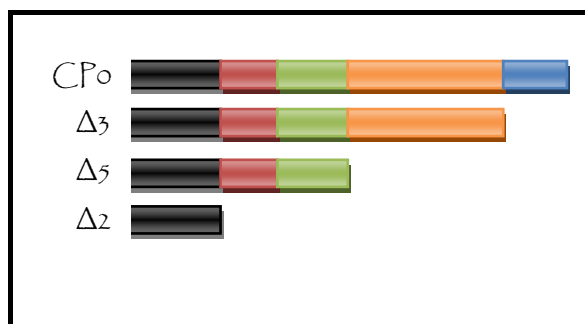


Figura 2-17. Esquema de las variantes truncadas de CPO. La región roja corresponde a la truncada Δ4 utilizada solamente en los ensayos de doble híbrido.

Todas estas variantes fueron utilizadas en ensayos cualitativos de SPR, en los cuales se inyectaron en solución contra todas las proteínas P fijadas en el CHIP (Tabla 2-2).

Tabla 2-2. Resumen de las interacciones detectadas por SPR. Las proteínas truncadas utilizadas en este ensayo son fusiones a GST. No se utilizaron fusiones a histidinas por un problema en la purificación de las truncadas mas pequeñas.

Solución	Chip CM5				
	CPO	P2β	P1α	P1β	P2α
CPO-Δ2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CPO-Δ3	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
CPO-Δ5	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)

De esta manera quedan delimitados los dominios de interacción de CPO con las proteínas P “chicas” y también el dominio de homodimerización. Estos resultados son coincidentes con los ensayos de doble híbrido realizados con las truncadas para el par CPO/P1α y CPO/P2α. Cuando se eliminaron 81 aminoácidos del extremo C-terminal de CPO (variante Δ2), se inhibieron totalmente las interacciones. Si se eliminan sólo 17

aminoácidos (variante $\Delta 3$), dichas interacciones no se ven perturbadas. Finalmente, la variante $\Delta 5$ recuperó la interacción con todas las proteínas P “chicas” pero no con CPO.

Estos datos, junto con los de doble híbrido, delimitan una región de 19 aminoácidos como responsable de la interacción con las proteínas P1 α y P2 α . No se descarta que la región $\Delta 4$ esté involucrada en la interacción cuando hay mas de una proteína interactuante (Jurí Ayub y col, 2005). En tal caso, la zona se extendería 11 aminoácidos hacia la región N-terminal.

Se ha demostrado que el fragmento C-terminal de la proteína L10 de *E.coli* (ortóloga de PO), comprendido por los residuos 71-164 participa en la unión de dos dímeros L7/L12 (ortólogos de las P “chicas”) (Gudkov y col, 1980). Luego (Gríaznova y Traut, 2000) se delimitó esta región a un segmento de 20 aminoácidos que une las cuatro copias de las proteínas L7/L12: la región 145-154 pega un dímero L7/L12 y la región 155-164 pega el otro (Figura 2-18). La cristalización del complejo L10-L7/L12 (Diaconu y col, 2005) de *Thermotoga marítima* reveló que existen tres sitios de unión consecutivos para el dímero L7/L12 (Figura 2-18). En levaduras las regiones 230-290 (Santos y Ballesta, 1995), 212-262 (Laloti y col, 2002), y 213-250 (Perez-Fernandez y col, 2005) de la mitad C-terminal de PO fueron identificadas como los sitios de unión de las proteínas P1/P2, aunque no se distinguieron sitios individuales para los dos dímeros P1/P2 (Figura 2-18). Finalmente, trabajando con la región C-terminal de la proteína PO del gusano de la seda (Hagiya y col, 2005) identificaron dos sitios distintos, consecutivos que tienen la capacidad de unir el heterodímero P1/P2. Esta región corresponde a los residuos 210-251 y 252-261 (Figura 2-18).

Para comparar todos estos datos con los obtenidos en el presente trabajo se alinearon todas las regiones de interacción mapeadas en las proteínas P₀. Se indica en cada caso las regiones de interacción con las proteínas P “chicas” o sus equivalentes procariotas L₇/L₁₂ (Figura 2-18).

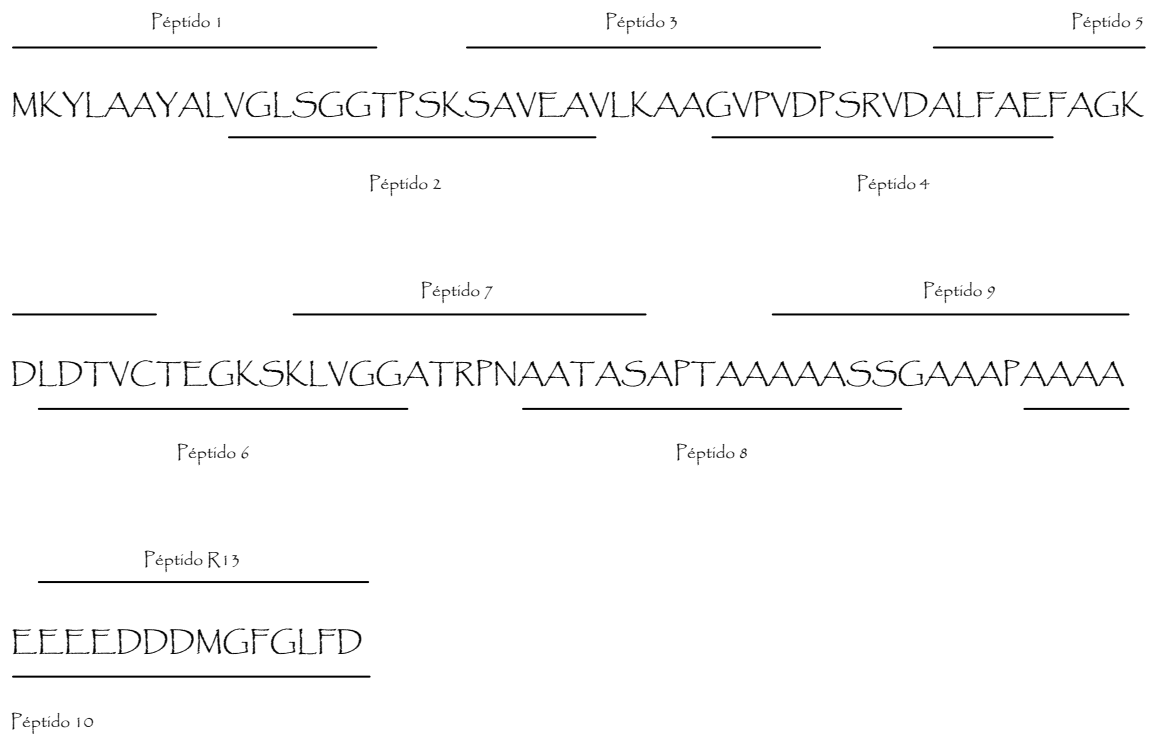
TcP ₀	217	VEKYLLEGISNVAALSLGAGIPTAATLPHMIMDAFK	TLLGASVATEYEFDEFDGNLR	275
ScP ₀	212	---HFVSAVSTIASISLAIGYPTLPSVGHTLINNYKDLLAVA	IAASYHYPEIEDLVDR	267
BmP ₀	210	LRAKFQAGVANVAALSLAIGYPTIASAPHSIANGFKNLLAIAAVTEVEFEE	-----	261
EcL ₁₀	145	----IDRLATLPTYEEAIALMATMKE	EASAGKLVRTLAAVRDAKEAA	164
TmL ₁₀	133	----LPSKEEL	YAMLVGRVKAPITGLVFALSGILRLNLVYVLNAIKEKK	177

Figura 2-18. Alineamiento de la región C-Terminal de las proteínas P₀ y L₁₀. Las proteínas P₀ de *Trypanosoma cruzi* (Tc), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) y *Bombyx mori* (Bm) o gusano de seda, junto a las proteínas L₁₀ de *Escherichia coli* (Ec) y *Thermotoga maritima* (Tm) fueron alineadas con el programa Mega 4.0. En rojo se resalta la primer zona de interacción, en azul la segunda y en naranja la tercera. En rosa se marcan las regiones que pueden o no contener un segundo dominio de interacción. En negrita se muestran los residuos hidrofóbicos que interactúan directamente con los dímeros L₇/L₁₂ según datos cristalográficos.

No existe un motivo conservado en estas regiones, aunque los residuos hidrofóbicos podrían tener un rol central. Se ha postulado una interacción de tipo cierre de leucinas (Tsurugi y Mitsui, 1991; Tsurugi, 1992). Este podría ser el caso de los Trypanosomátidos ya que estos residuos se encuentran altamente conservados.

La capacidad de CPo para formar homodímeros queda delimitada a la región C-terminal, en la que no participan los últimos 17 residuos de la proteína. No sabemos si este efecto es producto de trabajar con una fracción de Po (CPo) o si tiene una importancia *in vivo*. Bioquímicamente esta interacción es posible y diferencial con respecto a las P “chicas”.

Para profundizar el estudio de la interacción de la proteína P2β con el resto del complejo P utilizamos una serie de péptidos que mapean por completo la secuencia de esta proteína:



Los resultados obtenidos con estos péptidos muestran que los puntos de interacción están localizados en zonas altamente conservadas entre las proteínas P2, como ser la región N-terminal y central (Tabla 2-3 y Figura 2-14). Los péptidos 1 y 5 son

capaces de interactuar con la proteína TcP2 β completa, lo cual indica que estas dos zonas están involucradas en la homodimerización.

Tabla 2-3. Parámetros cinéticos de las interacciones entre los péptidos de TcP2 β y las proteínas P de *T. cruzi*. Los péptidos que no están en la tabla fueron negativos para todas las interacciones. Se muestran los datos de K_d (M) relativizados al orden de magnitud. Se adjunta una tabla con los resultados reales (Figura 5.8 Anexo).

Solución	Chíp CM5				
	CPo	P2 β	P1 α	P1 β	P2 α
Pep 1 P2 β	(-)	1x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁴	(-)
Pep 5 P2 β	1x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁵	1x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁴	1x10 ⁻⁴

Solamente el péptido 5 interactúa con la proteína TcCPo, por lo que el par interactuante CPo/P2 β queda acotado a una región de 19 y 15 aminoácidos, respectivamente. En negrita y subrayado se representan los aminoácidos hidrofóbicos:

CPo 254- TLLGASVATEYEFDEFDGK -272

P2 β 40- ALFAEFAGKDLDTVC -54

Este mismo péptido (5) es el responsable de la interacción con P2 α pero se desconoce el sitio de interacción en esta última. Un alineamiento de las secuencias de P2 α y CPo muestra una zona de alta homología, por lo que es posible que esta región esté involucrada en la interacción con P2 β . En rojo se representan los residuos idénticos y en verde los conservados:

CPo 254- TLLGASVATEYE -265

P2 α 46- SIAGRSVATLVA -57

No se sabe como interacciona el péptido 5 de TcP2 β con las otras proteínas P pero pensamos que las uniones ácido-base son importantes ya que ambas proteínas P1 son muy básicas en esta zona.

El hecho de que el péptido 1 no se asocie a TcP2 α presenta una particularidad ya que esta proteína es muy similar a P2 β en la región N-terminal. Esto podría indicar que las interacciones no se dan entre las mismas zonas mapeadas sino con otras regiones de la proteína. En rojo se representan los residuos idénticos y en verde los conservados:

TcP2 β 1-MKYLAAYALVGLSGG-15

TcP2 α 3-MKYLAAYALASLNKP-18

Al comparar esta misma región con la correspondiente en las P1, no se encuentra tal homología, pero existe un dominio tipo cierre de leucinas presente:

TcP2 β LX₄LX₂L TcP2 α LX₄LX₂L

TcP1 β LX₆LXLX₄L TcP1 α LX₆LXL

El cierre de leucinas es un motivo en el cual dos hélices de proteínas diferentes se unen entre sí como una hélice superenrollada dando lugar a un dímero. Las repeticiones deben ser cada 6 residuos (LX₆L) y repetirse este motivo en ambas hélices al menos 4 veces. Por lo tanto, en nuestro caso, ninguno constituye un cierre de leucinas típico, a excepción de TcP1 β , si consideramos una isoleucina como parte del motivo: LX₆LX₆LX₆I.

Estos resultados son consistentes con los publicados para las proteínas P₁/P₂ del gusano de la seda (Naganuma y col, 2007) donde la eliminación de 10 aminoácidos de la región N-terminal son suficientes para evitar la formación de heterodímeros P₁/P₂ y para impedir el pegado a P₀. También se ha demostrado que la región N-terminal de la proteína P₁ de rata (resíduos 1-63) es insoluble pero puede ser solubilizada por el agregado de la misma porción de la proteína P₂ (Gonzalo y col, 2001); sugiriendo una interacción entre estos dominios. Por último, ensayos de dicroísmo circular con las proteínas P de levaduras indican que el dímero P₁/P₂ contiene un 65% de α -hélices, mientras que solas forman una estructura de tipo “random coil” (Tchórzewski y col, 2003).

2.4.3 FORMACIÓN DEL COMPLEJO P (STALK)

Luego de analizar las interacciones entre las proteínas P de a pares comenzamos con el estudio de la formación de complejos ternarios por SPR. Para esto utilizamos en solución una concentración fija de una proteína junto a concentraciones variables de otra y este conjunto fue inyectado sobre el chip CM5 que tiene fijadas todas las proteínas P. Este ensayo puede dar un aumento de la señal si están formando complejos ternarios o una disminución de la señal si existe inhibición de la interacción de las proteínas en solución con la del chip. Por lo tanto se ensayaron todas las interacciones posibles entre las proteínas P (Tabla 2-4).

Tabla 2-4. Ensayo de formación de complejos ternarios por SPR. Se indica como 3X a un aumento de la señal en función de la proteína variable; Inhibición, a una disminución de la señal en función de la proteína variable; (-) cuando no hay interacción detectable y “—” cuando hay una sola proteína que interacciona en el par.

Solución	Chíp CM5				
	CPo	P2β	P1α	P1β	P2α
P2β + P1α	Inhibición	3X	Inhibición	Inhibición	3X
P2β + P1β	Inhibición	3X	3X	3X	3X
P2β + P2α	Inhibición	Inhibición	Inhibición	Inhibición	Inhibición
P2β + CPo	3X	3X	3X	3X	3X
CPo + P1α	3X	3X	Inhibición	3X	3X
CPo + P1β	3X	3X	3X	Inhibición	3X
CPo + P2α	3X	Inhibición	Inhibición	Inhibición	Inhibición
P1α + P1β	3X	3X	(-)	(-)	--
P1α + P2α	3X	Inhibición	(-)	--	--
P1β + P2α	3X	Inhibición	(-)	Inhibición	Inhibición

De este estudio se desprende que siempre que haya dos proteínas CPo involucradas en la interacción en distintas configuraciones (chíp o solución) se van a formar complejos 3x. Esto se debe a que el dominio de homodimerización ($\Delta 3$, Figura 2-17) no participa de interacciones con las proteínas P “chicas”. Algo similar ocurre con la proteína P2β a excepción del par P2β/P2α. La presencia de la proteína P2α en solución inhibe todas las interacciones de P2β, probablemente debido a la similitud de los dominios N-terminal.

Es destacable que el par P2 β /CPO forma complejos ternarios con todas las proteínas, coincidentemente con los resultados de interacciones individuales.

Del análisis todas las interacciones ternarias, se construyeron distintos modelos de asociación secuencial de las proteínas en el complejo P. En la **tabla 2-4**, se observa que las proteínas P no se asocian al azar; por lo tanto, diseñamos un ensayo de asociación secuencial usando SPR. En este experimento se inyectan de manera secuencial y en series diferentes, las proteínas P “chicas” sobre la proteína CPO fijada en el Chip (**Figura 2-19**). Dado que las cinéticas de disociación de estas proteínas son muy rápidas, es de esperar que la formación de un complejo ternario lo estabilice, permitiendo la asociación de una cuarta proteína, y así sucesivamente.

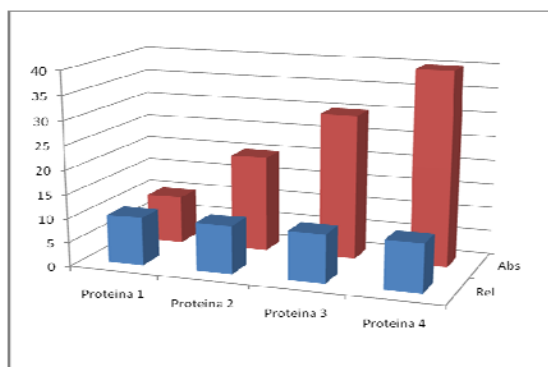
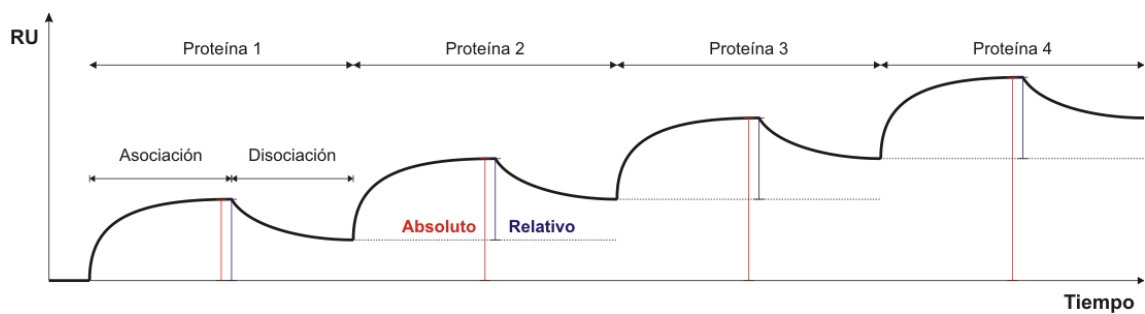


Figura 2-19. Curva teórica del ensayo de interacción secuencial. Se prueban distintas secuencias de inyección de proteínas y se registran los valores de unidades de respuesta (RU) absolutas y relativas en cada caso. Luego estos resultados son volcados a un gráfico de barras, donde se resta el canal control.

De acuerdo a las secuencias ensayadas las relaciones entre RU absolutas y relativas variaron notablemente. Lo que buscamos en este ensayo son las combinaciones que permitan una asociación equimolar de cada proteína inyectada (iguales RU relativas) y que esta asociación represente un incremento proporcional en las inyecciones sucesivas (RU absolutas), es decir condiciones en las que se repita la curva teórica de la **figura 2-19**. La **figura 2-20** ilustra una de las secuencias ensayadas que se asemeja al modelo propuesto:

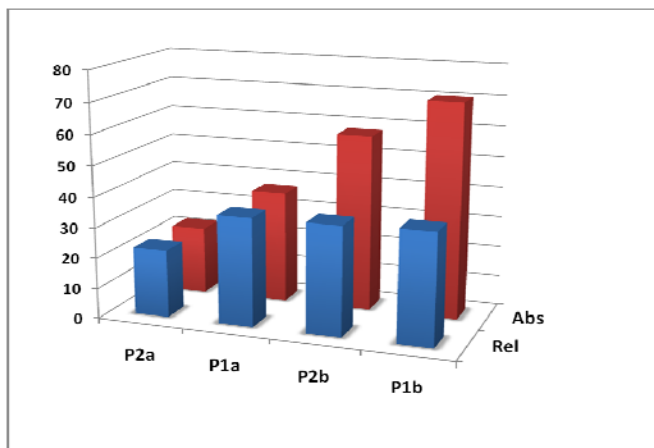


Figura 2-20. Formación de complejo P completo. Uno de las series de asociación posibles entre las proteínas P “chicas” y sobre CPo. Rojo, RU absolutas; azul, RU relativas.

En la inyección secuencial de las proteínas $P2\alpha$, $P1\alpha$, $P2\beta$ y $P1\beta$ hay una asociación equimolar y un aumento proporcional de la respuesta absoluta. Esto indica que este orden de asociación es altamente estable y permite la formación de un complejo pentamérico con un componente de cada tipo. Otras secuencias que dieron resultados similares fueron: $P2\alpha$ - $P1\beta$ - $P1\alpha$ - $P2\beta$ y $P2\alpha$ - $P1\alpha$ - $P1\beta$ - $P2\beta$. En todos los casos se cumple que $P2\alpha$ es la primera y que $P1\alpha$ se asocia antes que $P2\beta$.

Al no haber interacción entre $P2\alpha$ y $P1\alpha$ y por todo lo descripto hasta ahora, estos resultados parecen indicar que $CP0$ expone dos sitios de interacción y $P2\alpha$ se une a uno de ellos, luego quedan expuestos nuevamente dos sitios (uno en $CP0$ y otro en $P2\alpha$) que pueden ser ocupados por $P1\alpha$ en $CP0$ o por $P1\beta$ en $P2\alpha$ sin un orden determinado. Por último $P2\beta$ se uniría a $P1\alpha$ finalizando con la constitución del complejo pentamérico. Como estas proteínas presentan interacciones redundantes con los distintos miembros del complejo, el orden de las interacciones se puede alterar, ocupando una proteína un lugar distinto, pero esto perjudica luego la asociación de las proteínas siguientes que no se van a poder acoplar o que van a desplazar a otra para asociarse, tal como se vio con las otras secuencias de proteínas inyectadas. Cabe aclarar que las posibilidades ensayadas no cubren toda la combinatoria posible ya que las secuencias de inyección se diseñaron en función de los resultados de formación de complejos ternarios pero solo estas tres configuraciones entre mas de 20 ensayadas dieron este resultado de manera reproducible.

La constitución del stalk en mamíferos está dada por dos heterodímeros $P1/P2$ asociados a $P0$ donde las proteínas $P1$ actúan como puentes (Gonzalo y Reboud, 2003) (Figura 2-21). En levaduras se forman los heterodímeros $P2\alpha/P1\beta$ y $P2\beta/P1\alpha$ que se asocian a $P0$ (Guarínos y col, 2003). En ese mismo trabajo los autores proponen que todas las proteínas P "chicas" interactúan con $P0$ aunque no se ha demostrado la capacidad de la proteína $P0$ de levaduras para unir 4 proteínas (figura 2-21).

región C-terminal de las proteínas P para su actividad GTPasa (Gomez-Lorenzo y col, 2002; Uchiumi y col, 1990).

La región del stalk que forma una protuberancia lateral en la subunidad mayor del ribosoma se puede dividir en tres segmentos. El primero está formado por la región del RNA_r reconocida por la proteína L12 y la región N-terminal de P0. Esta es la base del stalk y es el punto de anclaje para componentes más periféricos como las proteínas P “chicas”. El segundo segmento está formado por las regiones N-terminales de las proteínas P “chicas” que incluyen las zonas de asociación con la región central de P0. Este segmento es muy flexible y constituye una plataforma móvil probablemente funcional al proceso de elongación. El tercero está compuesto por las regiones C-terminales de todas las proteínas P, contiene una región bisagra que une los péptidos C-terminales conservados que les confiere gran movilidad (Diaconu y col, 2005). Es justamente la región C-terminal de las proteínas P la que interactúa funcionalmente con EF2. Si se le bloquea la flexibilidad o se elimina esta región se anula la síntesis de proteínas.

El EF2 de levaduras ha sido cristalizado en distintas conformaciones (Jørgensen y col, 2003). Un análisis comparativo con el EF2 de *T. cruzi* muestra un 60% de identidad en las secuencias, con un 76% de homología (Figura 2-22). Los seis dominios estructurales están totalmente conservados en *T. cruzi*. Los sitios de unión a GTP, sombreados en la figura 2-22 están conservados así como la histidina 699 (Sc) o 703 (Tc) que se modifica luego de la traducción en una diftamida. Sin embargo, existen dos treoninas conservadas en levaduras y mamíferos (T57 y T59), que son fosforilables, una de las cuales no está presente en *T. cruzi*. El sitio principal de fosforilación es la T57 (Marzouki y col, 1989) y en el TcEF2 solo está presente la T59.

TcEF2	1	MVNFTVDEVRALMDYPEQIRNMSVIAHVDHGKSTLSDSLVAAGIIKMEDAGDKRIMDTR	60
		MV FTVD++R+LMD +RNMSVIAHVDHGKSTL+DSLVAAGII AG+ R DTR	
ScEF2	1	MVAFTVDQMRSLMDKVTNVRNMSVIAHVDHGKSTLTDLSLVQRAGIISAAKAGEARFTDTR	60
		MVAFTVDQMRSLMDKVTNVRNMSVIAHVDHGKSTLTDLSLVQRAGIISAAKAGEARFTDTR	
TcEF2	61	ADEIARGITIKSTAISMHYHVPPEIADLPD--DKRDFLINLIDSPGHVDFSSEVTAALR	118
		DE RGITIKSTAIS++ + E + ++ D FLINLIDSPGHVDFSSEVTAALR	
ScEF2	61	KDEQERGITIKSTAISLYSEMSDEDVKEIKQKTGNSFLINLIDSPGHVDFSSEVTAALR	120
		KDEQERGITIKSTAISLYSEMSDEDVKEIKQKTGNSFLINLIDSPGHVDFSSEVTAALR	
TcEF2	119	VTDGALVVVDCVEGVCVQTETVLRQALTERIRPVVFINKVDRAILELQLDPEEAYQGFVK	178
		VTDGALVVVD +EGVCVQTETVLRQAL ERI+PVV INKVDRA+LELQ+ E+ YQ F +	
ScEF2	121	VTDGALVVVDITIEGVCVQTETVLRQALGERIKPVVINKVDRAILELQVSKEDLYQTFAR	180
		VTDGALVVVDITIEGVCVQTETVLRQALGERIKPVVINKVDRAILELQVSKEDLYQTFAR	
TcEF2	179	TLQNVNVVISTYNDPVMGDVQVYPEKGTVAIGSGLQAWAFSVTRFAKMYAAKFGVDEAKM	238
		T+++VNV++STY D V+GDVQVYP +GTVA GSGL WAF++ +FA YA KFGVD+AKM	
ScEF2	181	TVESVNVIVSTYADEVLGDVQVYPARGTVAFGSGLHGWAFTIRQFATRYAKKFGVDKAKM	240
		TVESVNVIVSTYADEVLGDVQVYPARGTVAFGSGLHGWAFTIRQFATRYAKKFGVDKAKM	
TcEF2	239	CERLWGDNFFDAKNNKWKSETNAAGERVRRAFQCQCLDPIYQIFDAVMTEKQEKVDKML	298
		+RLWGD+FF+ K KKW +T+A G+ + RAF F LDPI+++F A+M K++++ +L	
ScEF2	241	MDRLWGDSFFNPKTKKWTNKDTDAEGKPLERAFNMFIIDPIFRLFTAIMNFKKDEIPVLL	300
		MDRLWGDSFFNPKTKKWTNKDTDAEGKPLERAFNMFIIDPIFRLFTAIMNFKKDEIPVLL	
TcEF2	299	KSLNISLTADEREQVPKLLKSIMMKFLPAAETLLQMIVAHLPSPKKAQSYRAEMLYSGE	358
		+ L I L DE++ K LLK +M KFLPAA+ LL+MIV HLPSP AQ+YRAE LY G	
ScEF2	301	EKLEIVLKGEKDLGKALKVVMRKFLPAADALLEMIVLHLPSPVTAQAYRAEQLYEGP	360
		EKLEIVLKGEKDLGKALKVVMRKFLPAADALLEMIVLHLPSPVTAQAYRAEQLYEGP	
TcEF2	359	SGPDDKYYVGIKNCDPEAPLMYISKMVPTADRGRFFAFGRIFAGKVRSGQKVRIMGNNY	418
		+ DD + IKNCDP+A LMLY+SKMVPT+D+GRF+AFGR+FAG V+SGQKVRI G NY	
ScEF2	361	A--DDANCIAIKNCDPKADLMYVSKMVPTSDKGRFYAFGRVFAGTVKSGQKVRIOGPNY	418
		A--DDANCIAIKNCDPKADLMYVSKMVPTSDKGRFYAFGRVFAGTVKSGQKVRIOGPNY	
TcEF2	419	VFGKKQDLIEDKPVQRTVLMMGRYQEAEDMPCGNVVLGVGVDKYIVKSATITDDGESPH	478
		V GKK DL+ K +QR VLMMGR+ E ++D P GN++GLVG+D++++K+ T+T E+ H	
ScEF2	419	VPGKKDDLF- IKAIQRVVLMMGRFVEPIDDCPAGNIIGLVGIDQFLKTGTLT-TSETAH	476
		VPGKKDDLF- IKAIQRVVLMMGRFVEPIDDCPAGNIIGLVGIDQFLKTGTLT-TSETAH	
TcEF2	479	PLRDMKYSVSPVVRVAVEAKNPSDLPKLVGLKRLSKSDPLVVCTIEESGEHIVAGAGEL	538
		++ MK+SVSPVV+VAVE KN +DLPKLVGLKRLSKSDP V+ + ESGEHIVAG GEL	
ScEF2	477	NMKVMKFSVSPVVQVAVEVKNANDLPKLVGLKRLSKSDPCVLTYSSESGEHIVAGTGEL	536
		NMKVMKFSVSPVVQVAVEVKNANDLPKLVGLKRLSKSDPCVLTYSSESGEHIVAGTGEL	
TcEF2	539	HLEICLKDLDQEDFMNGAPLVKSEPVVSFRETVDVSSIQLSKSANKHNRLFRCGAPLTE	598
		HLEICL+DL+ D G PLK+S PVV++RETV SS LSXS NKHNR++ + P+ E	
ScEF2	537	HLEICLDLEHDHA-GVPLKISPPVVAIRETVESESSOTALSKSPNKHNRILYKAEPIDE	595
		HLEICLDLEHDHA-GVPLKISPPVVAIRETVESESSOTALSKSPNKHNRILYKAEPIDE	
TcEF2	599	ELCVEMEEGLNAGSEADPKVRARFLADKFDWDVAEARKIWCYGPDPNRPVVDVTKGVQ	658
		E+ + +E G+ D K RAR +AD + WDV +ARKIWC+GPD GPN+V+D TK VQ	
ScEF2	596	EVSLAIENGI-INPRDDFKARARIMADDYGWDVTDARKIWCYGPDPGNGPNLVIDQKAVQ	654
		EVSLAIENGI-INPRDDFKARARIMADDYGWDVTDARKIWCYGPDPGNGPNLVIDQKAVQ	
TcEF2	659	NMSEMKDSFVAAWQWATREGVLCDENMRGVRINVEDVTMHADAIHRGGGQIIPTRRVFY	718
		+ E+KDS VAA+QWAT+EG + E MR VR+N+ DVT+HADAIHRGGGQIIPTRR Y	
ScEF2	655	YLHEIKDSVVAWFQWATKEGPIFGSEMRSVRVNILDVTLHADAIHRGGGQIIPTRRRATY	714
		YLHEIKDSVVAWFQWATKEGPIFGSEMRSVRVNILDVTLHADAIHRGGGQIIPTRRRATY	
TcEF2	719	ACCLTAAPRLMEPMFQVDIQTVEHAVGGIYNVLTTRRGVIIGREENRPGTPPIYNVRAILPV	778
		A L A P++ EP+F V+IQ E AVGGIY+VL ++RG ++ EE RPGTP++ V+AYLPV	
ScEF2	715	AGFLADPKIQEPVFLVEIQCEQAVGGIYSVLNKKRGQVVSEEQRPGLFTVKAAYLPV	774
		AGFLADPKIQEPVFLVEIQCEQAVGGIYSVLNKKRGQVVSEEQRPGLFTVKAAYLPV	
TcEF2	779	AESFGFTADLRAGTGGQAFQCVFDHWQYQPGDPLEPKSQANTLTLSVRQRKGLKPDIPP	838
		ESFGFT +LR TGGQAFQ VFDHW DPL+P S+A + L+ R+R G+K ++P	
ScEF2	775	NESFGFTGELROATGGQAFQMVFDHWSTLGSDDLPTSKAGEIVLAARKRHGMKEEVPG	834
		NESFGFTGELROATGGQAFQMVFDHWSTLGSDDLPTSKAGEIVLAARKRHGMKEEVPG	
TcEF2	839	LDTFLDKL 846	
		+ DKL	
ScEF2	835	WQEYYDKL 842	

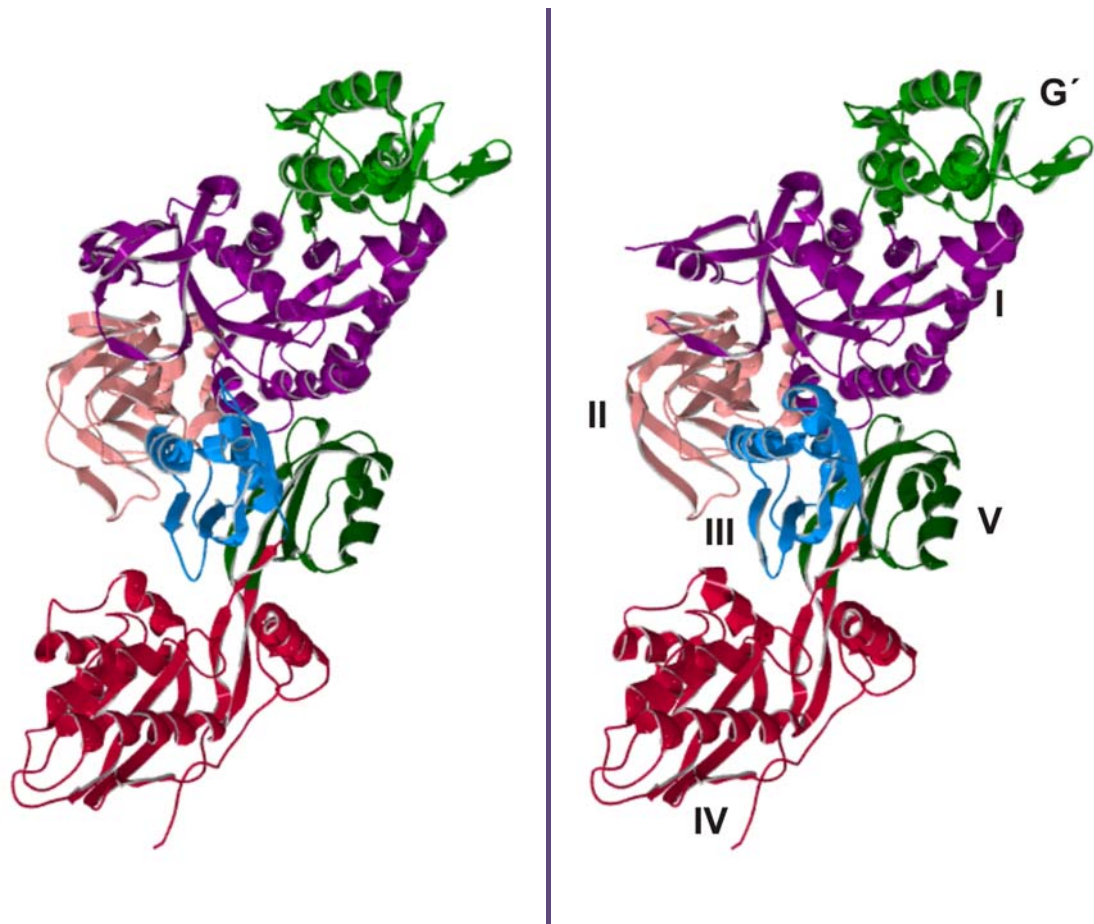
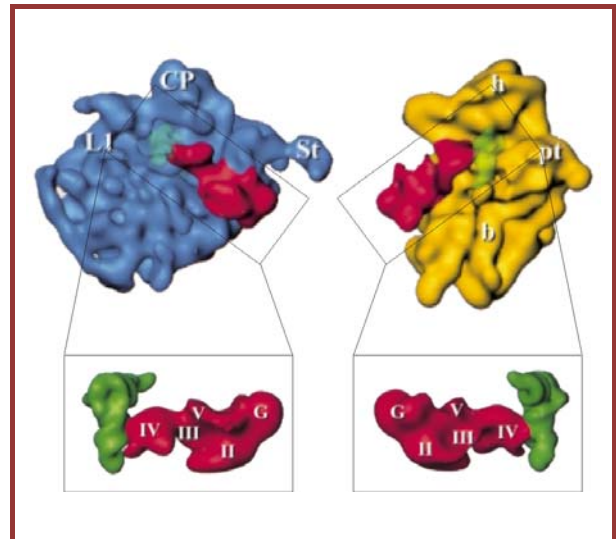


Figura 2-22. Comparación estructural de los EF2 de levadura y de *T. cruzi*. En la parte superior se muestra el alineamiento de secuencia y la estructura secundaria del EF2 de levadura (Sc) y la esperada para *T. cruzi* (Tc). A la derecha se muestra la estructura 3D del EF2 de levadura (PDB 1NoV). A la izquierda se muestra la estructura 3D del EF2 de *T. cruzi* modelado. Los dominios estructurales se representan en color violeta (I), rosa (II), azul (III), rojo (IV), verde oscuro (V) y verde claro (G').

El dominio I es el dominio catalítico, une e hidroliza GTP generando un cambio conformacional que permite la translocación del ribosoma. Ensayos de crio-microscopía electrónica en levadura demostraron que el dominio II interacciona con el “shoulder” de la subunidad menor. El dominio III entra en contacto con el cuerpo de la subunidad menor, cerca del sitio A. El dominio IV mimetiza la estructura de un ARN de transferencia y el dominio V junto al dominio G interacciona con la base del stalk (Gomez-Lorenzo y col,

2000) (Figura 2-23). El análisis estructural no revela evidencias de contacto con la región C-terminal de las proteínas P aunque son imprescindibles para la actividad GTPasa.

Figura 2-23. Localización del EF2 de levaduras. Mapa de crío-microscopía electrónica del ribosoma de levadura con el EF2 unido. Las subunidades mayor (azul) y menor (amarillo) junto al EF2 (rojo) y un ARNt (verde) se indican junta a los dominios estructurales de cada uno.



Para comprender como interacciona el factor de elongación 2 de *T. cruzi* con las proteínas que conforman el stalk, clonamos el TcEF2 fusionado a histidinas y expresamos la proteína recombinante en *E. coli*; pero el producto fue insoluble (cuerpos de inclusión). Para solubilizarla ensayamos diversos protocolos de renaturalización de factores de elongación (Kristensen y Laurberg, 2002; Li y col, 2006), pero ninguno dio resultado. Luego recurrimos a la técnica de “step wise diálisis” que reduce la concentración de los agentes desnaturizantes de manera gradual. Como el EF2 tiene actividad GTPasa, se agregó en los buffers GTP 1mM y MgCl₂ 5mM. En estas condiciones ensayamos el EF2 recombinante sobre las cinco proteínas P en Biacore (Tabla 2-5).

Tabla 2-5. Parámetros cinéticos de las interacciones entre el TcEF2 y las proteínas P de *T. cruzi*. Se muestran los datos de K_d (M) relativizados al orden de magnitud. Las tablas siguientes corresponden a los ensayos de inhibición con los péptidos derivados de TcP2 β y la última con las proteínas truncadas de CPo y el péptido correspondiente a la región C-terminal (P015). Se adjunta una tabla con los resultados reales (Figura 5.8 Anexo).

Solución	Chip CM5				
	CPo	P2 β	P1 α	P1 β	P2 α
EF2	1×10^{-5}	1×10^{-7}	1×10^{-7}	1×10^{-7}	1×10^{-7}

EF2 + Pep1	IC ₅₀ 1×10^{-5}	Inhibición	Inhibición	Inhibición
EF2 + Pep10	Inh 2 fase IC ₅₀ 1×10^{-5}	Aumento	Aumento	Inh 2 fase

EF2 + CPo- Δ 2	(-)
EF2 + CPo- Δ 5	IC ₅₀ 1×10^{-6}
EF2 + P015	(-)

Existen en la literatura datos de la interacción del EF2 con las proteínas P de rata (Bargis-Surgey y col, 1999); para la proteína P1 se midió un $K_d = 1 \times 10^{-8}$ M mientras que para la proteína P2 un $K_d = 1 \times 10^{-6}$ M, no existen datos de la interacción con Po.

En nuestro estudio encontramos una interacción similar con todas las proteínas P “chicas” y una afinidad dos órdenes menor por Po. Dado que la región C-terminal de las proteínas P es esencial para el funcionamiento del EF2, probamos inhibiciones con los péptidos C-terminales de las proteínas P “chicas” (pep10) y de Po (P015). El péptido

P015 no inhibe la interacción EF2/CPO; por el contrario el péptido 10 aumenta la interacción del EF2 con las proteínas P1 (α y β) y solo inhibe la segunda fase de asociación en las interacciones EF2/P2 (α y β). Estas cinéticas son atípicas y poseen una fase de asociación partida (Figura 2-24). La zona de interacción de las proteínas P con el EF2 está contenida en el péptido 1 de P2 β , que inhibe por completo las interacciones con las proteínas P “chicas” al igual que la proteína truncada $\Delta 5$ para CPO (Figura 2-25).

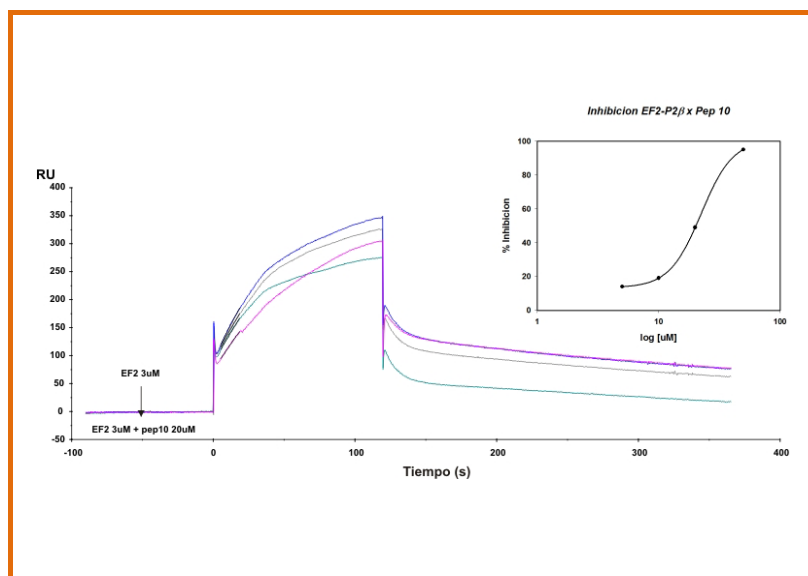
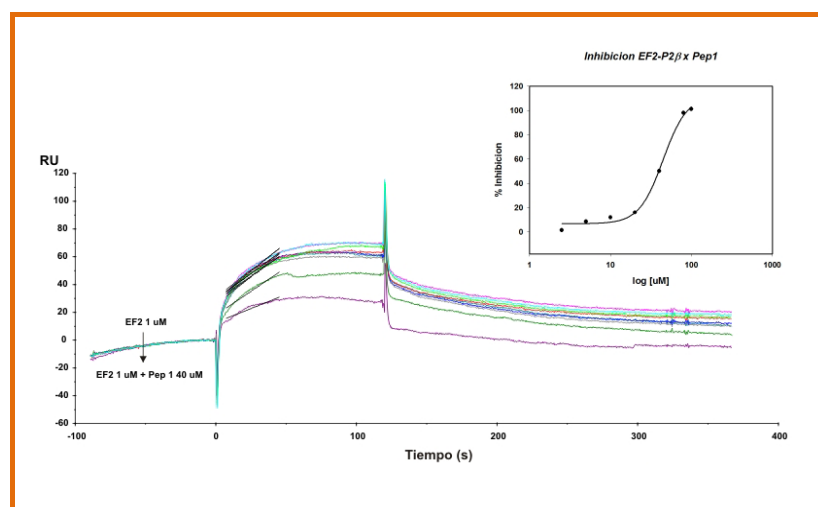


Figura 2-24. Ensayo de inhibición de la interacción EF2/P2 β con el péptido 10. La pendiente de la segunda fase de asociación se utilizó para el cálculo del IC₅₀.

Figura 2-25. Ensayo de inhibición de la interacción EF2/P2 β con el péptido 1. La pendiente de la primera fase de asociación se utilizó para el cálculo del IC₅₀.



Por lo tanto, identificamos la región N-terminal de las proteínas P como las que interactúan con el EF2, en concordancia con los datos de localización por crió microscopía electrónica. La afinidad de la interacción es distinta para P0 que para las P “chicas” mientras que la región C-terminal podría tener un rol regulatorio en la interacción del factor con las proteínas P, aumentando o disminuyendo la interacción según se trate de proteínas P1 o P2 respectivamente (Tabla 2-5). Algunos autores sugieren que el péptido C-terminal es necesario para gatillar la actividad GTPasa del factor de elongación una vez dentro del ribosoma (Diaconu y col, 2005).

Dada la función regulatoria de la actividad ribosomal de la región C-terminal de las proteínas P y dada la completa caracterización de los anticuerpos recombinantes anti R-13 expuesta en el capítulo 1 decidimos estudiar la capacidad del scFv C5 para inhibir la síntesis de proteínas en Trypanosomátidos y mamíferos.

2.4.5 ESPECIFICIDAD DE EPÍTOPE

Como se describió en el capítulo 1, el scFv C5 que reconoce la región C-terminal de la proteína TcP2β (péptido R13), reconoce las cinco proteínas P. Esto se debe a que las cuatro proteínas P “chicas” (TcP1α, TcP1β, TcP2α y TcP2β) comparten la misma región C-terminal y la quinta, TcP0, posee una región homóloga llamada P015 (Figura 2-26A).

Los residuos importantes en el reconocimiento del anticuerpo sobre el péptido R13 son 3-ExDDxGF-9 pero no conocíamos con exactitud la influencia en su reactividad de las sustituciones presentes en la contraparte humana, H13 o los cambios que presenta P015. Utilizando SPR, comparamos la inhibición de la interacción scFvC5/TcP2β por los péptidos R13, P015 y H13. Los ensayos son equivalentes a los descritos en la página 32

(Inhibición) (Figura 2-26B). Solo se obtuvo una curva de inhibición completa con los péptidos R13 ($IC_{50}=2,4\mu M$) y P015 ($IC_{50}=22,6\mu M$) pero no con H13. Estos resultados demuestran la baja afinidad del scFv C5 por el epítipo presente en mamíferos (péptido H13) a pesar de un único cambio con respecto a R13. P015 también presenta cambios con respecto a R13 pero parece que en este motivo el reemplazo de la glicina 8 (R13) por el ácido aspártico (P015) afecta menos al reconocimiento del anticuerpo que el cambio del ácido glutámico 3 (R13) por serina (H13). Luego hicimos ensayos de western blot para ver si el scFv C5 puede reconocer las proteínas P de mamíferos (*Rattus norvegicus*) pero esto no ocurrió (Figura 2-26C).

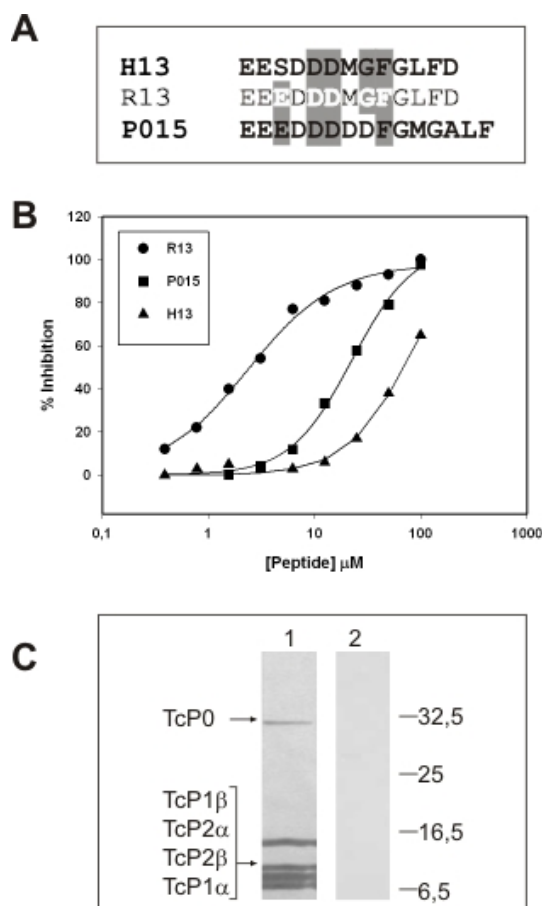
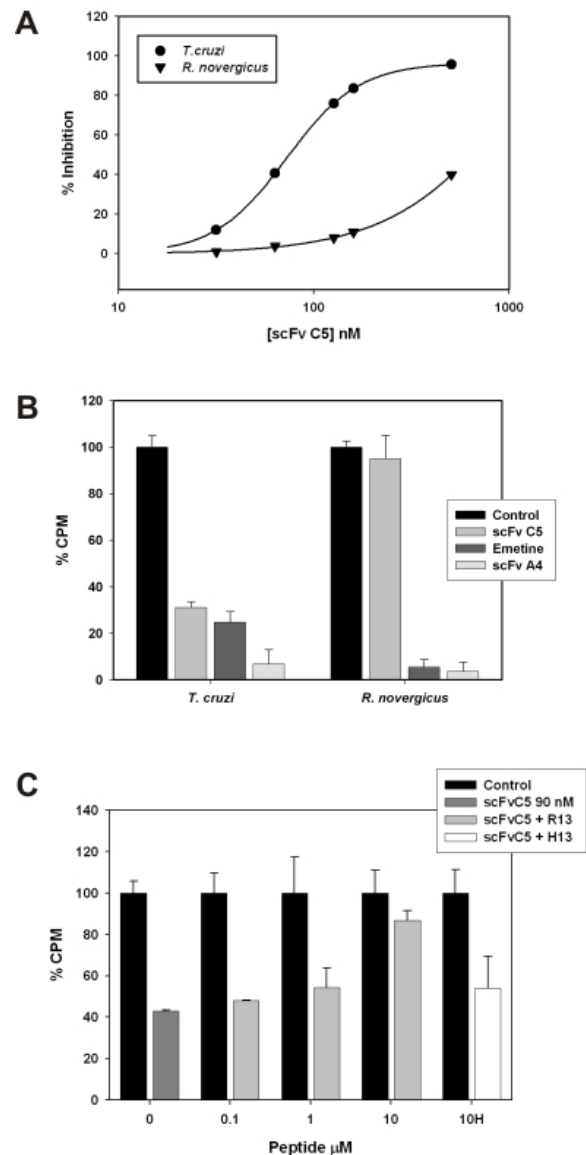


Figura 2-26. Especificidad de epítopes del scFv C5. **A.** Alineamiento de secuencia de los péptidos de *T. cruzi* R13 y P015 con el correspondiente en mamíferos H13. Las letras blancas corresponden a los residuos necesarios para el reconocimiento del anticuerpo. El fondo sombreado indica los residuos conservados en los otros dos péptidos. **B.** Inhibición de la interacción entre el scFv C5 y TcP2b por los péptidos R13, P015 y H13, utilizando la técnica de SPR. **C.** Western blot de extractos crudos de *T. cruzi* (calle 1) y *R. norvegicus* (calle 2) con el scFv C5. La posición de las proteínas P de *T. cruzi* se indican a la izquierda.

2.4.6 INHIBICIÓN DE LA TRADUCCIÓN

Diseñamos un sistema de traducción *in vitro* para determinar la capacidad del scFv C5 para inhibir la síntesis de proteínas. Se utilizaron extractos ribosomales de *T. cruzi* y *R. novergicus* y se compararon los efectos del anticuerpo en ambos sistemas. La concentración de ribosomas en las preparaciones fue de aproximadamente 130 nM. En estas condiciones la inhibición de la traducción por el scFv C5 sobre ribosomas de *T. cruzi* fue dependiente de la dosis con un IC_{50} de 78,5 nM (Figura 2-27A). Para los ribosomas de rata no fue posible obtener una inhibición completa de la traducción, incluso a concentraciones de 500 nM de scFv C5. Mas aun, una concentración de 160 nM de scFv C5 que inhibe fuertemente la incorporación de metionina (^{35}S -Met) en *T. cruzi*, no tiene efecto sobre los ribosomas de rata (Figura 2-27B). En estos ensayos se utilizó un anticuerpo recombinante (A4) como control positivo de inhibición. Se trata de la versión recombinante de un autoanticuerpo anti-P (región C-terminal), conocido por su acción inhibitoria de la traducción, obtenido de un paciente con la enfermedad de lupus eritematoso (Zampieri y col, 2003). Los valores de fondo de incorporación de marca se calcularon utilizando Emetina, que es un inhibidor de la elongación (Oleinick, 1977). El efecto inhibitorio del scFv C5 se revierte por completo con el agregado del péptido R13 pero no por H13 (Figura 2-27C). Estos resultados indican que el scFv C5 bloquea la elongación de los ribosomas por unión a la región C-terminal de las proteínas P del parásito.

Figura 2-27. Inhibición de la traducción. A. Efecto dependiente de la dosis del scFv C5 sobre la síntesis de proteínas *in vitro* en extractos de *R. novergicus* y *T. cruzi*. B. Efecto del scFv C5 160 nM en la síntesis de proteínas *in vitro* en extractos de *R. novergicus* y *T. cruzi* comparado con el inhibidor de la elongación Emetina 0,1mg/ml y el anticuerpo recombinante control A4. C. Reversión del efecto del scFv C5 por preincubación con el péptido R13. El mismo tratamiento con el péptido H13 no revierte el efecto. Las inhibiciones observadas con el scfv C5 son significativas ($p < 0,05$)



2.4.7 INTRABODIES

Un intrabody es un anticuerpo recombinante que, expresado en el citoplasma de una célula, sigue vías distintas a la secreción. Para este tipo de construcciones, se utilizan péptidos señal que determinan la localización de anticuerpo dentro de la célula. Así, estos pueden reaccionar con distintos blancos intracelulares.

Utilizando la secuencia nucleotídica del scFv C5 y distintos vectores de expresión construimos un vector para expresar intrabodies en *T. cruzi*. Utilizamos el vector pTREX, de alta expresión (Vazquez y Levin, 1999) y el vector pRIBOTEX, de mediana expresión (Lorenzi y col, 2003) para la expresión citoplasmática del scFv C5. Todas las células transfectadas dejaron de crecer antes de finalizar el periodo de selección, no así los controles con vector solo. Luego, utilizando el vector pcDNA3 construimos un intrabody para ser expresado en células CHO. Este anticuerpo se expresa bien en células de mamífero y no afecta la tasa de crecimiento. Por último, dado que *T. brucei* posee la misma región C-terminal de las proteínas P y que existe en este organismo un sistema de expresión condicional, clonamos el scFv C5 en el vector pLew 100. Este vector posee promotor de T7 y operador de tetraciclina regulando al transgen. Se transfecta la cepa de *T. brucei* 29-13 la cual expresa la ARN polimerasa de T7 y el represor de tetraciclina en los plásmidos pLEW13 y pLEW29 (Figura 5.9 Anexo) (Wirtz y col, 1999). En estos experimentos se usan como control positivo el vector pLEW100 conteniendo el gen de la luciferasa y como control adicional un intrabody correspondiente a un scFv contra un epítopo interno de la proteína TcP2β (scFV S3), cuya secuencia no está conservada en *T. brucei*.

Los parásitos transfectados fueron sometidos a dos semanas de selección y se obtuvieron clones individuales por dilución límite. Se realizaron curvas de crecimiento para cada clon seleccionado en presencia de tetraciclina y reversión del efecto por remoción del antibiótico.

Después de ocho días de tratamiento se pudo detectar por RT-PCR el ARNm correspondiente al scFv C5 (Figura 2-28A). Para detectar el producto proteico lisamos los parásitos y absorbimos el scFv C5 en níquel-NTA. Luego analizamos esta fracción por SDS PAGE y western blot, demostrando la presencia del intrabody (Figura 2-28B). El scFv C5 también se observó en ensayos de inmunofluorescencia indirecta donde

la tinción se distribuye de manera punteada en el citoplasma, reaccionando de la misma manera que el scFv C5 soluble sobre parásitos no transfectados (Figura 2-28C). Las imágenes magnificadas muestran algunos cambios fenotípicos como aumento de tamaño y pérdida de la forma alargada, asociado a una disminución notoria de la tasa de crecimiento (Figura 2-29).

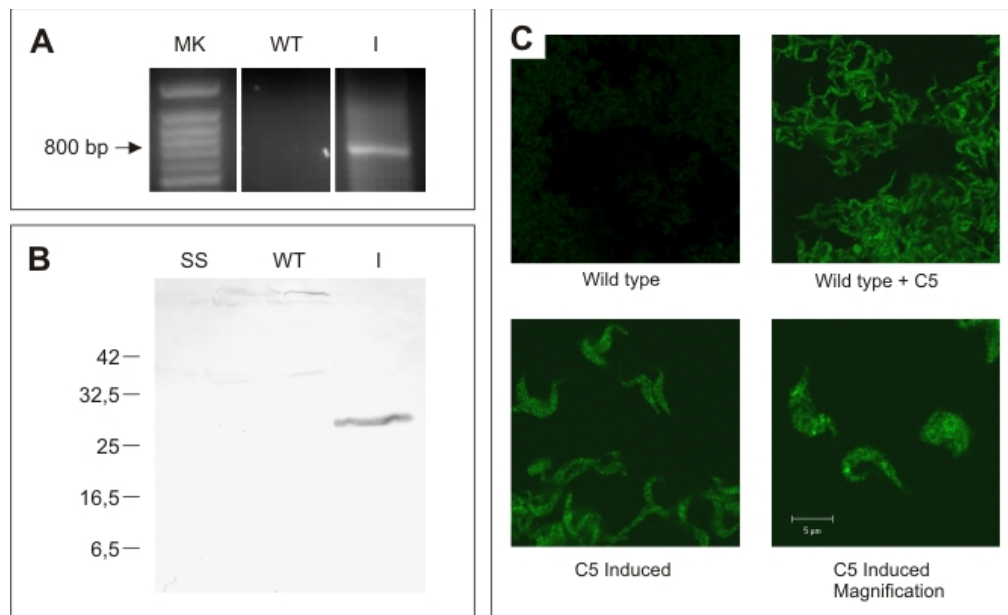


Figura 2-28. Expresión del intrabody de C5 en *T. brucei*. **A.** RT-PCR del ARN correspondiente al scFv C5. Wt corresponde a parásitos salvajes y la letra I indica los parásitos inducidos. **B.** Detección del intrabody por western blot. Ss corresponde al sobrenadante luego de la absorción con Ni-NTA, wt corresponde a parásitos salvajes y la letra I indica los parásitos inducidos, todos tratados de la misma manera. **C.** Inmunofluorescencia indirecta de parásitos salvajes (wt) e inducidos.

2.4.8 TASA DE CRECIMIENTO

Cada uno de los clones inicialmente seleccionados fue sometido a un periodo de inducción de veinte días. Durante el mismo se comparó la tasa de crecimiento de parásitos transfectados con el intrabody del scFv C5 o el scFv S3 y el control de luciferasa (Figura 2-29).

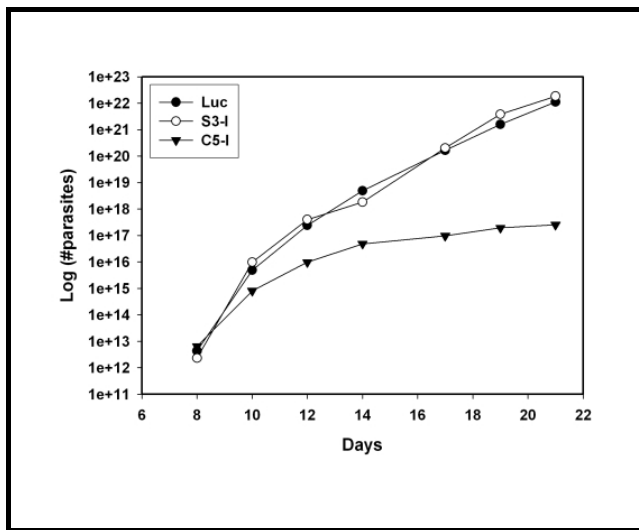


Figura 2-29. Curvas de crecimiento de parásitos transgénicos. Comparación de las tasas de crecimiento de parásitos transfectados con luciferasa (Luc), scFv S3 (S3-I) y scFv C5 (C5-I).

La tasa de crecimiento de los parásitos scFv S3 es normal comparada con la de los parásitos transfectados con el gen de la luciferasa. Los efectos son lentos ya que las curvas se separan luego de diez días de inducción y ese fue uno de los problemas para la detección del ARN y la proteína correspondientes al scFv. En los primeros 3 a 5 días de inducción, los parásitos se vuelven redondeados y forman agregados, luego de los 5 días los agregados desaparecen y las células comienzan a aumentar de tamaño. Los parásitos portadores del scFv C5 inducidos, son aproximadamente 40% mas grandes que los portadores del scFv S3 y poseen una relación ADN/ARN anormal, consistente con una acumulación de ARN.

2.4.9 DISEÑO DE PÉPTIDOS DERIVADOS DEL SCFV C5

La resolución de la estructura tridimensional del anticuerpo asociado al péptido R13 nos dio la pauta de cuales son los residuos principales para la interacción con la región C-terminal de las proteínas P. El CDR2 de la cadena pesada establece un gran número de interacciones con el péptido (Figura 1-40). Teniendo en cuenta este análisis, se sintetizó un péptido correspondiente a esta región con el agregado de dos cisteínas en los extremos, con el fin de preservar la forma de bucle que adquiere esta región en el anticuerpo (Figura 2-30).

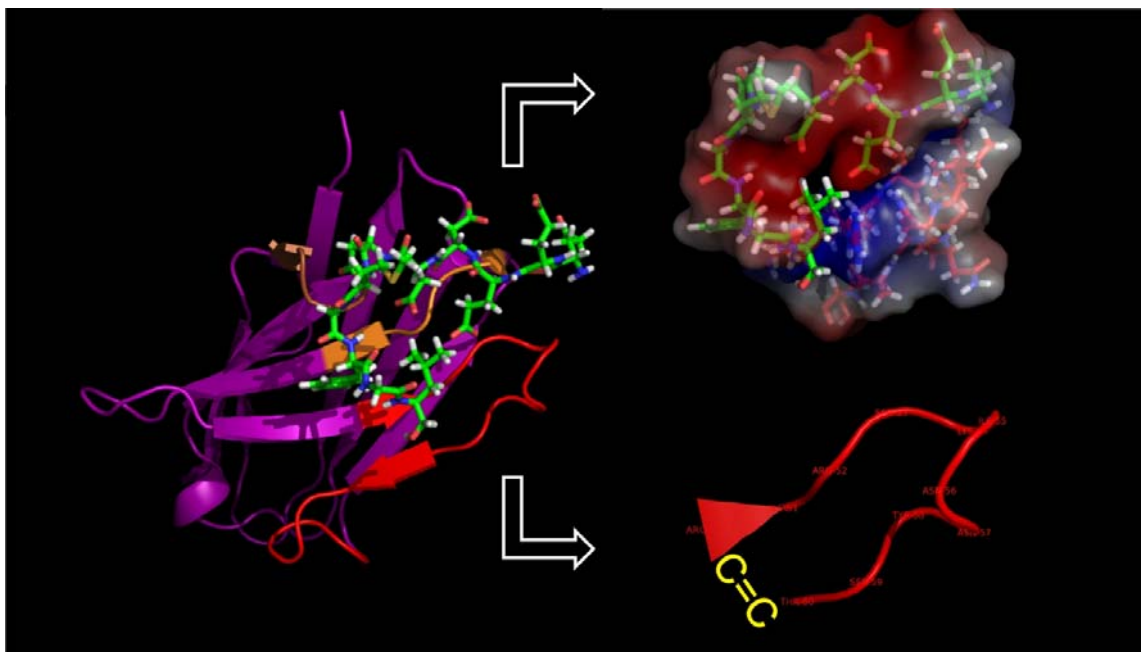


Figura 2-30. Estructura del péptido derivado del scFv C5. Los datos están extraídos del cristal del mAb 17.2 con el péptido R13. En rojo se representa el CDR2 de la cadena pesada

La secuencia del péptido es: N-CRIRSKINNYSTC-C, 13 aminoácidos con un peso molecular de 1558 Da y un punto isoelectrico de 9,5 (el más alto de los 6 CDRs). Una vez sintetizado el péptido, como se describe en materiales y métodos, se cicló por

oxidación natural (16hs en agitación permanente) a temperatura ambiente. La evolución de la reacción se siguió por espectroscopía de masa.

El péptido circular fue purificado en HPLC y se utilizó en ensayos de SPR, junto con el péptido lineal, para determinar la cinética de interacción con las proteínas P de *T. cruzi*. A diferencia del péptido lineal, el circular se pega a las proteínas P “chicas” con un $K_d=1 \times 10^{-5}$ (Figura 2-31).

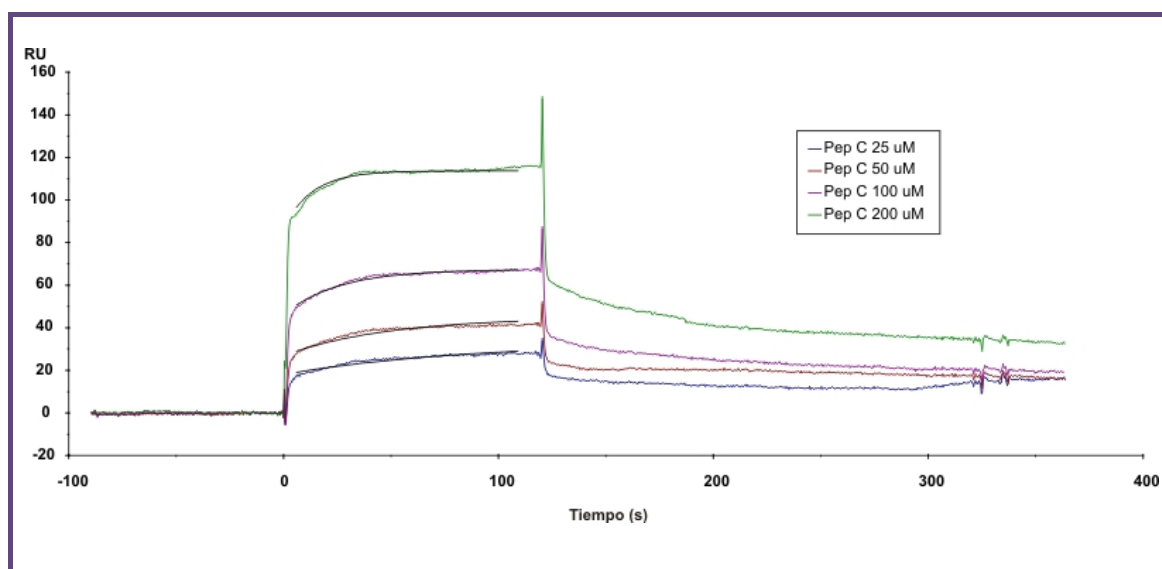


Figura 2-31. Sensograma obtenido para la interacción del péptido circular de C5 con la proteína P1α. $K_a=1,42 \times 10^5$ 1/M, $K_d=7,05 \times 10^{-6}$ M. Las otras proteínas P “chicas” dieron cinéticas similares.

Actualmente se están realizando los ensayos de inhibición de la traducción para determinar si el péptido lineal o el circular mantiene la capacidad del scFv C5 para inhibir la traducción de manera selectiva.

Díscusión

Capítulo 2

Mientras que las comparaciones de secuencias muestran una gran diversidad entre las proteínas del stalk de los distintos reinos, hay una organización funcional conservada y se pueden distinguir motivos conservados. Dentro de los protozoarios analizados hay dos grandes grupos distinguibles, aquellos que poseen un solo tipo de proteínas P1 y P2 y aquellos que poseen dos tipos de proteínas P1 (α y β) y P2 (α y β). Junto con este fenómeno se observa que las proteínas P0 de estos últimos organismos se agrupan diferencialmente de las otras, lo cual indica una organización general particular. Dentro de este grupo encontramos los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma*, por lo que es probable que todos estos posean una organización similar del complejo P (Stalk). Tomando a *T. cruzi* como modelo de este grupo vemos que presenta una organización similar a la de levaduras aunque es claro que la divergencia entre α y β observada en levaduras es independiente a la de protozoarios. Sin embargo tienen en común que todas las proteínas P “chicas” tienen la capacidad de unirse a P0. Esto puede deberse a una redundancia de sitios de interacción, a la redundancia de proteínas o a una razón funcional que aun no conocemos. En la mayoría de los organismos estudiados el stalk es un complejo pentamérico pero falta definir en nuestro caso cuantos sitios de unión existen en P0 para saber si es posible la interacción de dímeros de P chicas (dos sitios) o de monómeros (cuatro sitios). Integrando las regiones de interacción mapeadas hasta el momento con los ensayos de SPR y de formación de complejos pentaméricos es posible reconstruir una primera aproximación a la arquitectura del stalk de *Trypanosoma cruzi* (Figura 2-32).

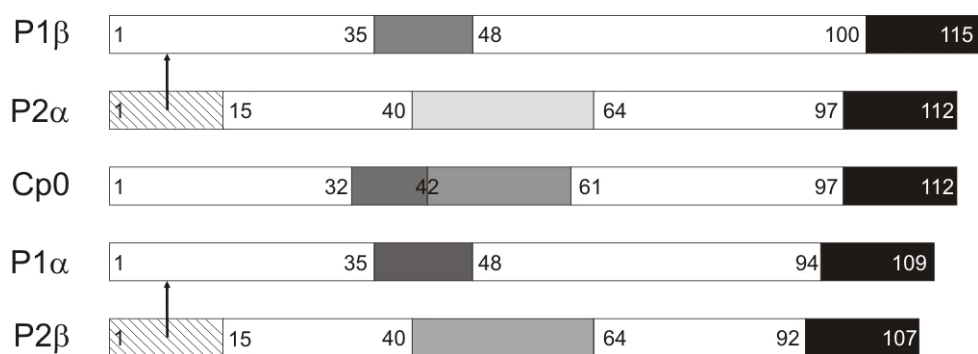


Figura 2-32. Arquitectura del Stalk de *Trypanosoma cruzi*. El esquema representa un alineamiento de los sitios de interacción mapeados para uno de los posibles esquemas de interacción. En rayado se representa el péptido 1 de TcP2β y su correspondiente en P2α. En negro se representan los extremos C-terminales ácidos y en distintas escalas de grises los sitios internos encontrados en Cp0 y P2β junto con las regiones más conservadas de las otras proteínas P.

De manera equivalente a las proteínas ribosomales P el factor de elongación 2 está conservado entre las especies no solo a nivel estructural si no a nivel de secuencia. Consistentemente, experimentos donde se intercambia el stalk sugieren que tuvo lugar un mecanismo de coevolución donde se mantuvieron las parejas funcionales L7/L12 – EF-G y proteínas P- EF-2 (Wahl y Möller, 2002).

Ensayos en levaduras con proteínas P carentes del extremo C-terminal ácido demostraron la pérdida de la capacidad de síntesis de proteínas. Esto está asociado a una incapacidad funcional del EF2. Por otro lado se habían hecho estudios de SPR para demostrar la interacción del EF2 con las proteínas P pero no existen evidencias directas de la interacción con la región C-terminal (Bargis-Surgey y col, 1999). Nuestro trabajo pone en evidencia que la región N-terminal de todas las proteínas P de *T. cruzi* (base del stalk) están involucradas en el reconocimiento del factor de elongación, tal como se espera de su localización dentro del ribosoma. Pero demuestra también el efecto de la región C-terminal en esta interacción. Los ensayos de SPR entre el EF2 y las proteínas P2 (α y β) muestran

dos fases de asociación donde solo la segunda se inhibe por el agregado del péptido C-terminal. Es muy extraño el efecto observado con las proteínas P1 (α y β) donde el agregado del péptido C-terminal favorece la interacción. Todo parece indicar que la interacción diferencial del EF2 con las proteínas P “chicas”, en presencia del péptido C-terminal, obedece a un rol regulatorio de la elongación, como ha sido propuesto para el EF-G procariota y la región C-terminal del dímero L7/L12 (Díaconu y col, 2005) (Figura 2-33).

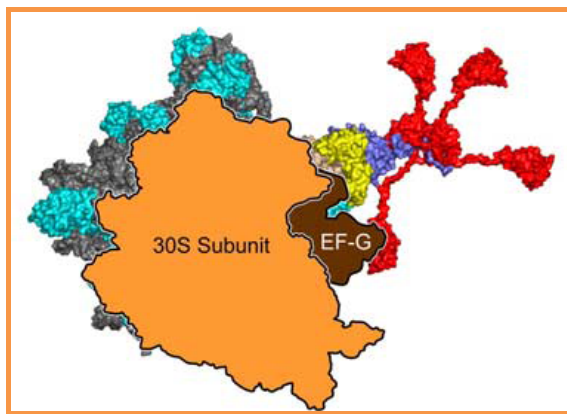


Figura 2-33. Reconstrucción del stalk procariota. Modelo que explica la interacción funcional de la región C-terminal de las proteínas del stalk con los factores de elongación durante la síntesis de proteínas.

Todos los motivos característicos de *T. cruzi* encontrados constituyen potenciales blancos para el diseño racional de drogas altamente selectivas.

Fue demostrado por Uchiúmi y col, en 1990 que anticuerpos dirigidos contra la región C terminal de las proteínas P y no contra otras regiones de estas proteínas son capaces de inhibir la síntesis de proteínas en sistemas *in vitro*. El pegado de los anticuerpos reduce la unión del factor de elongación 2 y su actividad GTPasa. También se vio que los anticuerpos generados en la enfermedad lupus eritematoso sistémico, contra la región C-

terminal de las proteínas P humanas tienen el mismo efecto al igual que los anticuerpos recombinantes derivados (Zampieri y col, 2003).

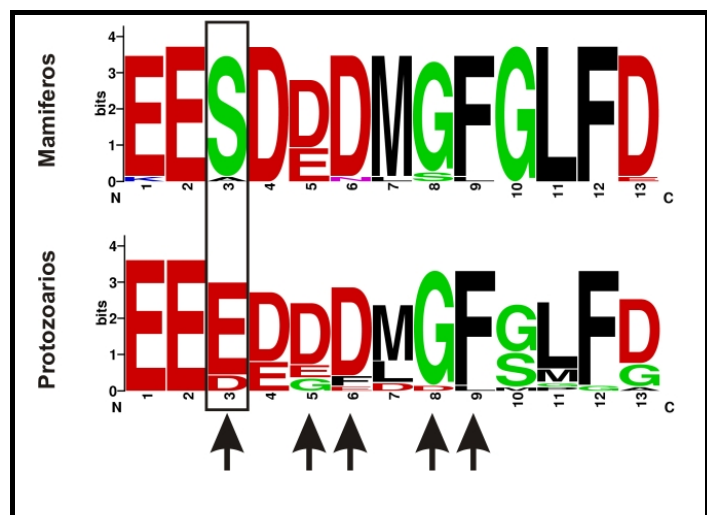
Por todo esto decidimos estudiar la especificidad del scFv C5 en el reconocimiento del extremo C-terminal de distintas proteínas P. Encontramos una gran especificidad en el reconocimiento del epítipo de *T. cruzi* (R13) a diferencia de su contraparte de mamíferos (H13) y esta diferencia se hizo evidente en los ensayos de inhibición de la traducción *in vitro*. Los diferentes IC_{50} calculados por SPR (R13=2,4 μ M y H13=22,6 μ M) explican la inhibición selectiva a una misma concentración de anticuerpo. Esta especificidad quedo demostrada *in vivo* mediante la generación de intrabodies (expresión citoplasmática del scFv C5) en células CHO y *Trypanosoma brucei*, donde solo se afectó la morfología y la tasa de crecimiento en los últimos. Como no se pudo demostrar la expresión en *T. cruzi* tuvimos que recurrir un sistema de expresión condicional. El sistema mejor descrito era el de *T. brucei*, principalmente utilizado para ensayos de ARN interferencia. Dado que *T. brucei* y *T. cruzi* comparten la arquitectura del stalk y poseen la misma región C-terminal en las proteínas P decidimos utilizar este sistema. En estas condiciones fue posible seleccionar clones de parásitos transgénicos y hacer pruebas de inducción en las cuales se pudo detectar el ARNm codificante para el scFv C5 y el producto proteico gracias a una marca de histidinas introducida en el clonado. Las curvas de crecimiento retrasadas y los cambios fenotípicos observados son consistentes con un bloqueo de la actividad ribosomal.

Los intrabodies se han expresado con éxito en diferentes tipos celulares (Kontermann, 2004; Böldicke y col, 2005; Wolfgang y col, 2005; Paganetti y col, 2005; Griffin y col, 2006). Por lo que sabemos hasta el momento es la primera vez que se describe la expresión de un intrabody en Trypanosomátidos. Esta estrategia de “knock-down” presenta algunas ventajas sobre los ensayos de ARNi para el estudio de genes que tienen alta tasa de reemplazo a nivel de ARNm o también para aquellos productos proteicos que

tienen baja tasa de reemplazo ya que actúa directamente sobre una proteína blanco y no se ve afectado por la dinámica de esta proteína. Por todo esto, el uso de intrabodies tiene un gran valor para el bloqueo de funciones proteicas o complejos proteicos que puedan servir como punto de partida para el diseño de drogas (Stocks, 2004).

Los análisis de secuencias muestran que los mamíferos poseen un extremo C-terminal en las proteínas P ligeramente diferente al de Trypanosomátidos, siendo la diferencia principal la sustitución de un glutámico por una serina en la posición 3 del péptido R13 (Figura 2-34) La Figura 5.6 del anexo muestra los extremos C-terminales de todos los protozoarios utilizados en el estudio filogenético.

Figura 2-34. Región C-terminal de las proteínas P pequeñas. Las flechas indican los residuos críticos para el reconocimiento del scFv C5.



Este residuo parece ser clave en el reconocimiento del anticuerpo, y si esto es así, este anticuerpo podría inhibir la traducción en muchos otros parásitos protozoarios causantes de enfermedades en mamíferos sin afectar a la célula hospedadora.

Ensayos de western blot contra lisados de distintos protozoos muestran una correlación entre el reconocimiento de las proteínas P y la capacidad de inhibir la traducción (*T. brucei*, *T. cruzi*). *Crithidia fasciculata* constituye un nuevo ejemplo de esto y estamos ampliando la búsqueda de otros posibles blancos (Figura 2-35).

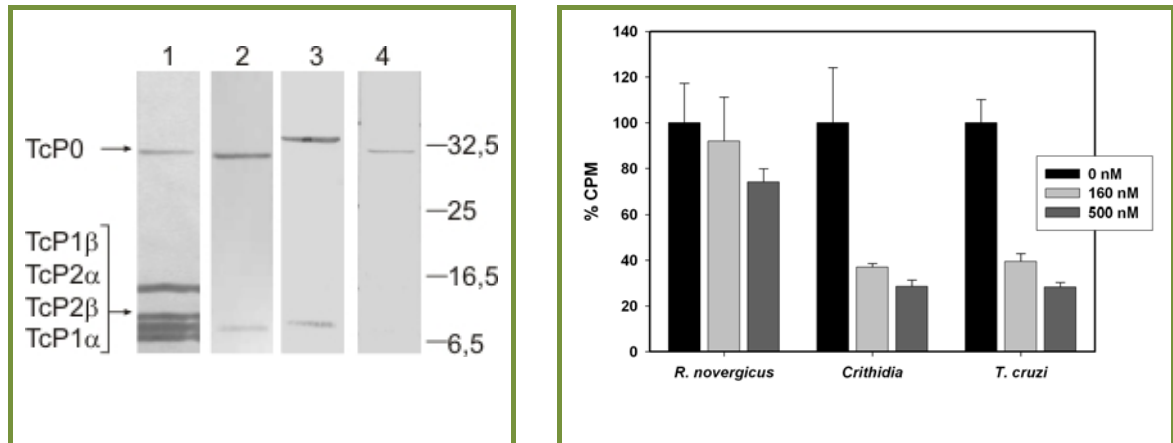


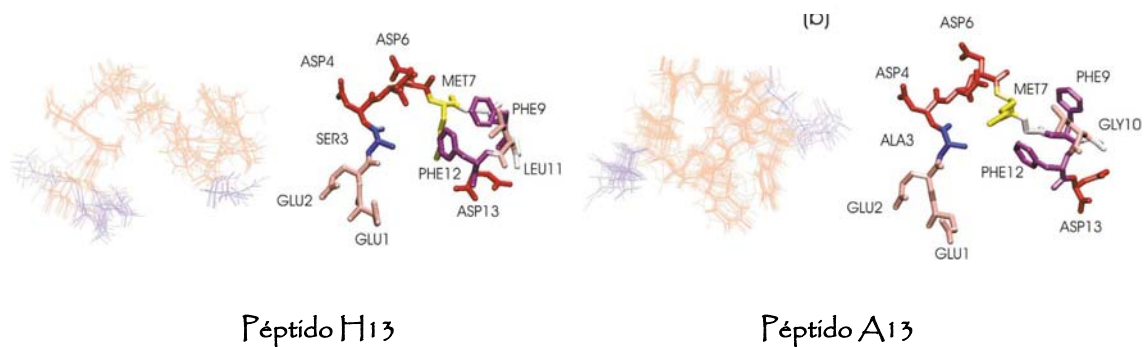
Figura 2-35. Reconocimiento de las proteínas P e inhibición de la traducción en distintos extractos. A la izquierda se muestra un ensayo de Western blot con el scFv C5: Calle 1 extracto de *T. cruzi*, calle 2 *T. brucei*, calle 3 *C. fasciculata* y calle 4 *L. mexicana*. A la derecha se muestra la inhibición de la traducción a distintas concentraciones del scFv C5 comparada en los distintos extractos ribosomales.

Desafortunadamente no hay datos disponibles de las secuencias de las proteínas P de *C. fasciculata* pero nuestros resultados sugieren que contiene el mismo extremo C-terminal o uno altamente homólogo.

Leishmania spp., a diferencia de *T. cruzi* y mamíferos poseen otro cambio en la región C-terminal de las proteínas P “chicas”:

<i>Trypanosoma spp</i> (R13)	107-119	EEEDDDMGFGLFD
Humano (H13)	102-115	EESDDDDMGFGLFD
<i>Leishmania spp</i> (A13)	93-105	EEADDDMGFGLFD

Estudios de resonancia magnética nuclear demostraron que la seguidilla de residuos ácidos en R13 generan una gran libertad de movimientos y no es posible determinar una estructura para este péptido. Distinto es el caso de H13 donde la serina rigidiza la estructura y algo similar ocurrió en A13 (Soares y col, 2004).



Por todo esto es probable que se observe un efecto en *Leishmania spp*, el mismo se deba al reconocimiento del extremo C-terminal de P0 y no al de las P “chicas” tal como se ve en el ensayo de western blot de la **figura 2-35**. Esto nos permitirá comprender mejor los roles de las distintas proteínas P durante la etapa de elongación en la síntesis de proteínas.

El diseño del péptido derivado del scFv C5 fue bueno en términos de que conserva la capacidad de unión a las proteínas P. La cinética registrada para las P “chicas” muestra un $K_d = 1 \times 10^{-5}$ M. Esto representa el mismo orden que la inhibición de la segunda fase de

asociación EF2-P^{chicas} registrada con el péptido R13 (1×10^{-5}) por lo que podría seguir existiendo una competencia por el sitio C-terminal. En la **Figura 5.2** del anexo se muestran las características de los distintos péptidos derivados de los CDRs del scFv C5. Este dato junto a los estudios cristalográficos revela que es posible derivar péptidos de otros CDRs que puedan conservar la unión a las proteínas P, como ser el CDR3 de la cadena pesada. Mas aun, los datos cristalográficos del mAb 17.2 unido al péptido R13 son el punto de partida para el diseño de pseudopéptidos y distintas estrategias de miméticos que puedan inhibir específicamente la síntesis de proteínas en Trypanosomas (Saragoví y col, 1991; Takasaki y col, 1997; Berezov y col, 2003; Casset y col, 2003).

Sin embargo, los resultados aquí expuestos, demuestran que no solo la región C-terminal de las proteínas P constituye un blanco específico, sino que todos los motivos ribosomales exclusivos de *T. cruzi* son posibles blancos para el diseño de drogas.

Materiales y Métodos

3.1 MEDIOS DE CULTIVO

- LB: 1% Triptona, 0.5% Extracto de levadura, 1% NaCl, pH: 7.0.
- LB-Amp: LB + 100 µg/ml ampicilina.
- LB-Agar: LB + 1.5% Agar-Select.
- 2xYT: 1,6% Triptona, 1% Extracto de levadura, 0,5% NaCl, pH: 7,4.
- 2xYT-Amp: 2xYT + 100 µg/ml ampicilina.
- 2xYT-Gluc: 2xYT + 2% dextrosa anhidra.
- 2xYT-Agar: 2xYT + 1.5% Agar-Select.
- Medio SOB: 2% Triptona, 0,5% Extracto de levadura, 10mM NaCl, 2,5mM KCl. Autoclavar y agregar 10mM MgCl₂ y 10mM MgSO₄.
- Medio SOC: Medio SOB + 2% dextrosa anhidra.
- Medio LIT: 0,5% Infusión de hígado, 0,5% Triptosa, 68 mM NaCl, 5.3 mM KCl, 22 mM Na₂HPO₄, 0,2% dextrosa anhidra, 1 ml hemina, penicilina G 100 U/ml y sulfato de streptomina 100ug/ml, 10 % suero fetal bovino.
- D-MEM F-12 (GIBCO): suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, GIBCO), penicilina G 100 U/ml y sulfato de streptomina 100ug/ml.

3.2 Bacterias:

- *E. coli* DH5 α : F^- , *endA*1, *hsdR*17 (rK^-mK^+), *glnV*44, *thi*-1 *deoR*, *gyrA*96, *recA*1, *relA*1, *supE*44, $\Delta(lacZYA-argF)U169$, λ^- , ($\phi80dlac\Delta(lacZ)M15$)
- *E. coli* HB2151: $\Delta lac-pro ara$ Nal^r *thi* F' (*proAB lac^f lacZ* $\Delta M15$)
- *E. coli* XL1-Blue: *endA*1 *hsdR*17 *supE*44 *thi*-1 *recA*1 *gyrA*96 *relA*1 *lac F'* (*proAB lac^f lacZ* $\Delta M15$ Tn10)
- *E. coli* DH10B: F^- *mcrA* Δ -(*mrr hsd RMS-mcr BC*) $\phi80dlacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ *deoR* *recA*1 *araD*139 $\Delta(ara leu)7697$ *galU galK* λ^- *rpsL* *endA*1 *nupG*
- BL21(DE3)pLysE: F^- , *ompT* *hsdS*B (*rB*- *mB*-) *gal dcm* (DE3) pLysS (Cam R)

3.3 Levaduras:

- *P. pastoris* X-33: Cepa salvaje de *Pichia pastoris*, presenta fenotipo Mut $^+$.
- *P. pastoris* GS-115: Incluye la mutación *his4* (inactivación del gen que codifica para la enzima histidinol deshidrogenasa), son levaduras que necesitan de medio enriquecido con histidina para crecer.

3.4 Parásitos:

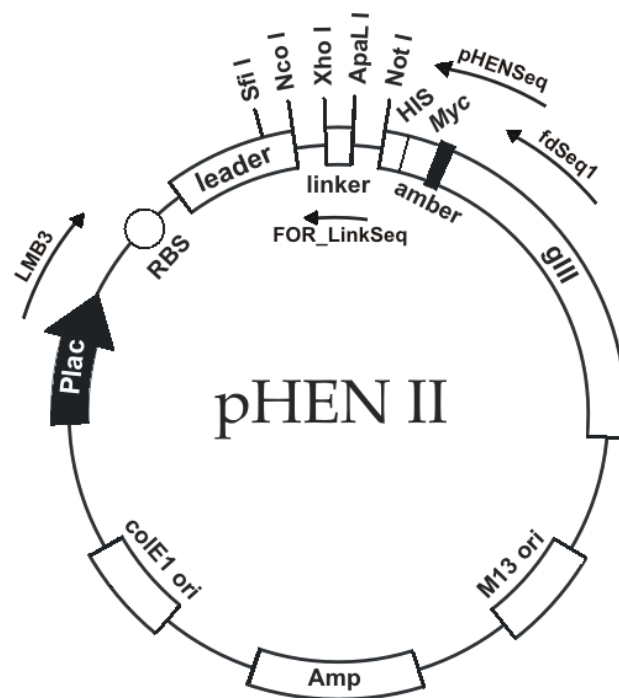
- *Trypanosoma cruzi*: CL Brener
- *Trypanosoma brucei* cepa 29-13: Posee integrados los genes que codifican para la polimerasa de T7 y el represor de tetraciclina.

3.5 Líneas Celulares:

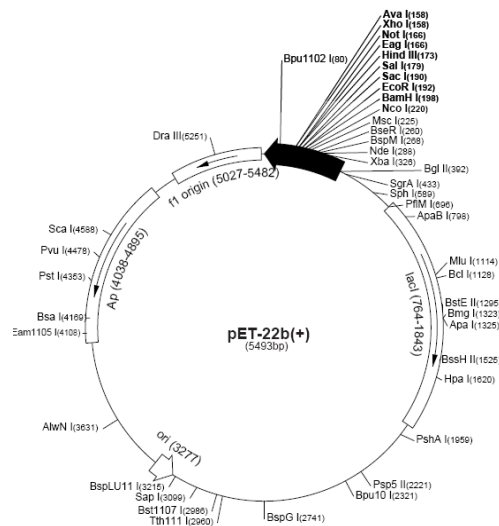
- CHO-K1: Células provenientes de ovario de hámster chino.

3.6 VECTORES

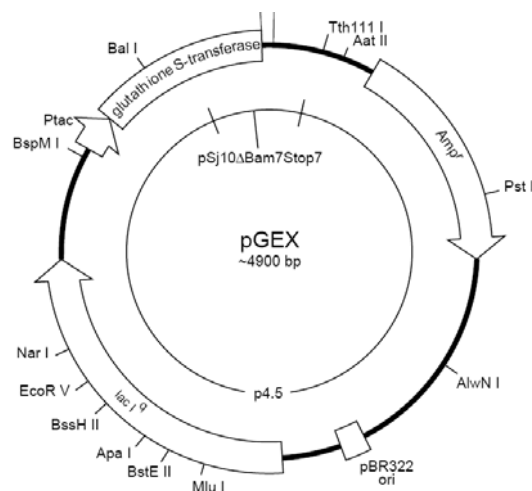
pHen-II: Vector de clonado de anticuerpos de cadena simple y expresión procariota. Posee gen de resistencia a Ampicilina; secuencia de exportación periplásmica *pelB*; sitio de clonado múltiple con sitios *Sfi*I, *Nco*I, *Xho*I, *Apa*L I y *Not*I; péptido de unión de 15 aminoácidos; marca de Histidinas (6x); marca Myc; codón stop ámbar TAG. Promotor Lac, inducido por IPTG. Por ser un vector fagémido permite la expresión dirigida al periplasma de los anticuerpos fusionados o no a la proteína 3 del fago M13 dependiendo si la cepa de *E. Coli* es supresora o no respectivamente.



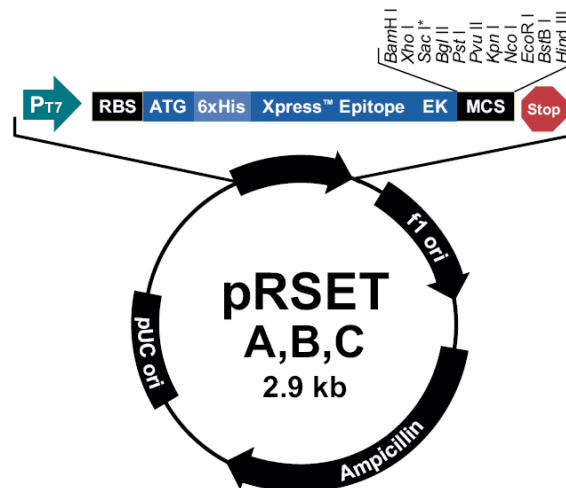
pET22b+: Vector de expresión procariota. Posee gen de resistencia a Ampicilina; secuencia de exportación periplásmica pelB; sitio de clonado múltiple (ver esquema) y marca de Histidinas (6x). El producto clonado esta bajo el control del promotor T7. Al inducir la cepa BL21 (DE3)pLysE con IPTG se sintetiza la ARNpol de T7 y se activa la síntesis de la proteína codificada en el vector.



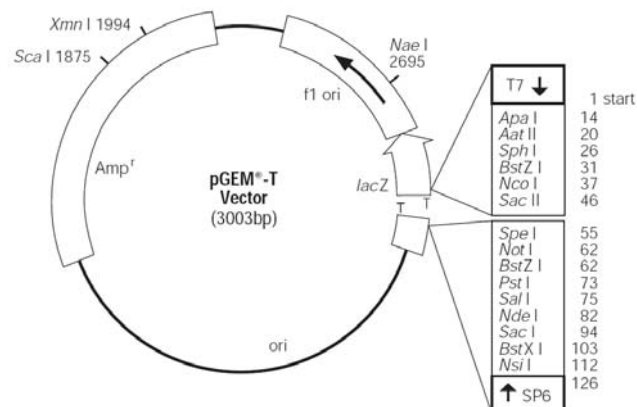
pGEX: Vector de expresión procariota de proteínas de fusión a GST. Posee gen de resistencia a Ampicilina; secuencia de GST fusionada al extremo N-terminal; sitio de clonado múltiple (ver esquema). Promotor Lac, inducido por IPTG.



pRSET: Vector de expresión procariota. Posee gen de resistencia a Ampicilina; secuencia de 6 histidinas fusionadas al extremo N-terminal; sitio de clonado múltiple (ver esquema). Posee promotor T7. Al inducir la cepa BL21 (DE3) pLysE con IPTG se sintetiza la ARNpol de T7 y se activa la síntesis de la proteína codificada en el vector.



pGEM-T: Vector de clonado y selección de transformantes. Posee gen de resistencia a Ampicilina. El sitio de clonado múltiple posee extremos abiertos cohesivos con la presencia de timidinas (para la inserción directa de productos de PCR). Este sitio está interrumpiendo el gen LacZ de manera que se puede realizar una búsqueda de las colonias con y sin inserto por actividad de la enzima ante la presencia de un sustrato que da un producto coloreado (Xgal).



pPICZα B (3.6 kb)

α-factor

Cla I^{*} Pst I EcoR I Xba I Sma I Bsp8 I Asp718 I Kpn I Xho I Sac II Not I Xba I

c-myc epitope 6xHis stop

* Frame-dependent variations

5' AOX1

BamH I

Pst I

BamH I

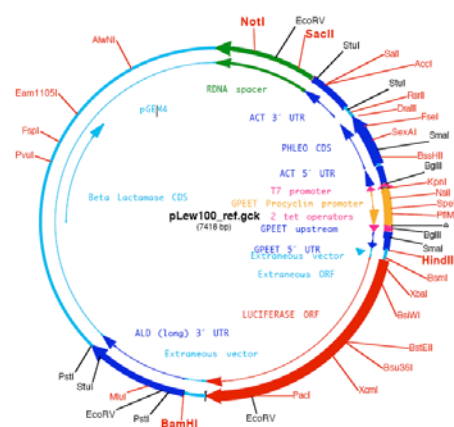
Zeocin^r

C1C1 TT

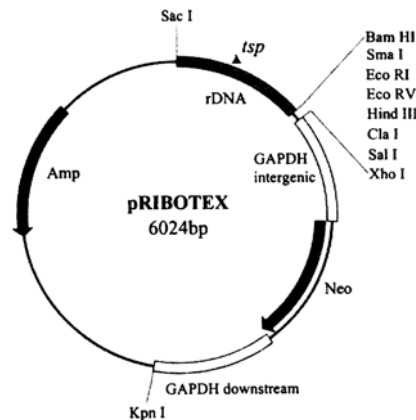
pUC ori

Bgl II

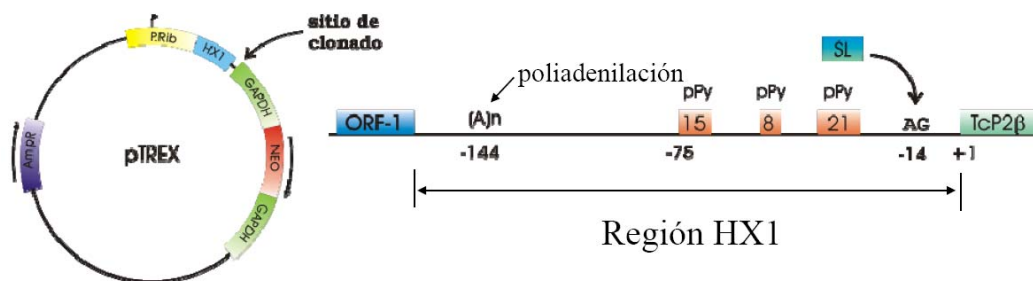
pPICZαB

[illegible]

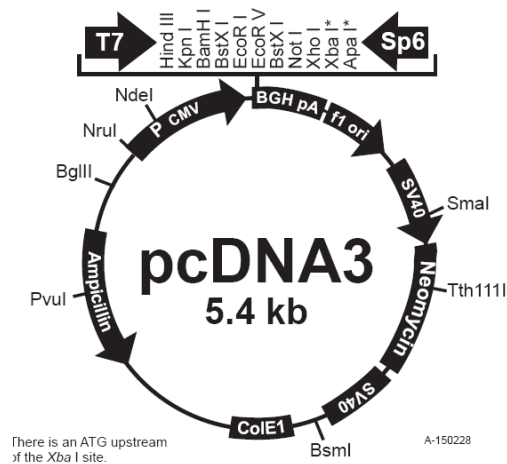
pRIBOTEX: Vector de expresión en *T. cruzi*. Es un derivado del pTEX (Kelly y col, 1992) que posee un sitio de inicio de la transcripción (TSP) del gen de RNA ribosomal de *T. cruzi* y la región intergénica de procesamiento GAPDH.



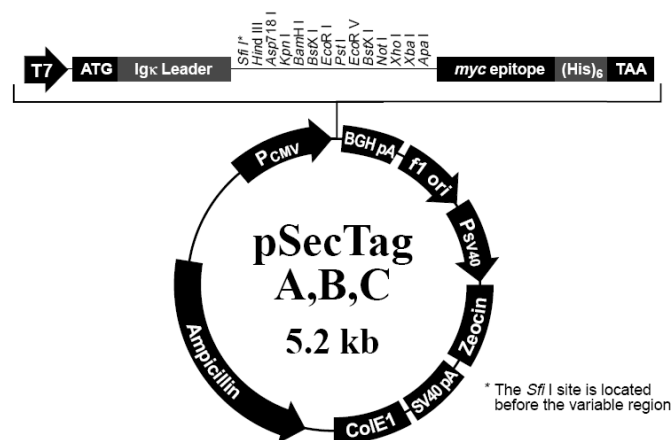
pTREX: Vector de alta expresión en *T. cruzi*. Posee gen de selección (neomicina) flanqueado por regiones de procesamiento (GAPDH). Promotor ribosomal de *T. cruzi*. Debajo del promotor ribosomal contiene la región HX1 de 220 pb que se encuentra río arriba del gen TcP2beta y que posee señales de trans-splicing muy eficientes.



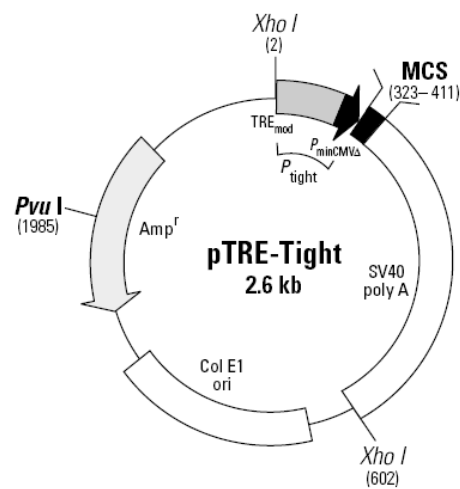
pcDNA3: Vector de expresión eucariota. Posee gen de resistencia a Ampicilina (procaríotas) y Neomicina (eucariotas); sitio de clonado múltiple y señal de corte y poliadenilación (BGH). Promotor CMV.



pSecTag2: Vector de expresión eucariota. Posee gen de resistencia a Ampicilina (procaríotas) y Zeocina (eucariotas); sitio de clonado múltiple; marca Myc; marca HIS y señal de corte y poliadenilación (BGH). Promotor CMV y señal de exportación de inmunoglobulina kappa.



pTRE-Tight: Vector de expresión condicional eucariota. Posee gen de resistencia a Ampicilina; sitio de clonado múltiple; señal de corte y poliadenilación (SV40). Promotor CMV mínimo junto a un elemento de respuesta a tetraciclina modificado (TRE_{mod}). Para activar la transcripción requiere del transactivador de tetraciclina (tTA) codificado en otro vector. Si el transactivador es directo, la adición de tetraciclina reprime la expresión del gen. Si el transactivador es reverso (rtTA), la adición de tetraciclina induce la expresión del gen.



3.7 SOLUCIONES Y BUFFERS

- Bromuro de Etidio (BrEt): 10mg/ml.
- Buffer de Siembra 6X (ADN): 60% Glicerina; 0,25% Azul de Bromofenol; 0,25% Xilencianol.
- Buffer Cítrato: 0,1M Citrato de Sodio; 0,1M Ácido Cítrico. Ajustar a pH 5,5.
- Buffer Carbonato (0.1M carbonato): 1.59g Na_2CO_3 , 2.93g NaHCO_3 , llevar a 1l y ajustar a pH: 9.
- Cloroformo Isoamílico: 24 partes de Cloroformo más 1 parte de Alcohol Isoamílico.
- Dextran Sulfato: 1% Dextran Sulfato en Buffer Cítrato.
- EDTA 0,5M pH 8: (250ml) 46,53g EDTA; 175ml H_2O ; agitar con calor; llevar a pH 8 con 10N NaOH; completar con H_2O y autoclavar.
- IPTG 100mM: 2,4mg IPTG en 10 ml de H_2O .
- PBS: 0,8% p/v NaCl; 0,02% KCl; 0,14 % Na_2HPO_4 ; 0,024% KH_2PO_4 ; pH 7,4.
- PBS-TW: 0.05% de Tween 20 en PBS.
- TBS: 50mM Tris-HCl pH 7,4, 150mM NaCl.
- TBS-TW: 0,05% de Tween 20 en TBS.
- TAE 50X: (1L) 242g Tris Base; 57,1ml Ácido Acético Glacial; 0,5M EDTA (pH 8,0) 100ml.
- TBE 10x: (1 litro) 108 g Tris base, 55 g ácido bórico, 40 ml de EDTA 0.5M (pH 8.0).

- **TE:** 10 mM Tris-HCl (pH: 8), 1 mM EDTA.
- **TMB (3,3', 5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride, Sigma):** 30 mg/ml de TMB en buffer citrato 0,1 M, 7,2% DMSO, 1,8% glicerol.
- **Tris-HCl 1M pH 8:** (1 L) 121g Tris Base; 700ml H₂O; llevar a pH 8 con 5N HCl. Completar con H₂O.
- **Fenol/Cloroformo:** 50% de fenol más 50% de cloroformo saturado con buffer Tris 0,1M pH 8.
- **Reactivo de Bradford:** Bio-Rad Protein Assay, de BIORAD, diluido 1/5 en agua.

Soluciones para minipreparación de ADN plasmídico (Miniprep)

- **Solución 1:** 25mM Tris-HCl pH 8; Glucosa 50mM; 10 mM EDTA. Autoclavar.
- **Solución 2:** 0,2N NaOH; SDS 1%.
- **Solución 3:** (100 ml) 60ml de Acetato de Potasio 5M; 11,5ml Ácido Acético Glacial; 28,5ml de H₂O.

Soluciones utilizadas en SDS-PAGE y Western blot

- **Buffer de Corrida:** Glicina 385mM; Tris Base 50mM; SDS 0,1% p/v.
- **Buffer de Muestra 3X (Cracking Buffer):** Tris-HCl (pH 6,8) 240mM; SDS 6% p/v; Glicerol 33% v/v; una gota de Azul de Bromofenol; 5% v/v de β -Mercaptoetanol.
- **Buffer de gel de separación (4X):** Tris-HCl pH 8 1,5M.
- **Buffer de gel de concentración (4X):** Tris-HCl pH 6,8 1M.

- **Buffer de Transferencia (*Western blot*):** Glicina 385mM; TrisBase 50mM; Metanol 20%.
- **Rojo Ponceau:** Ponceau S 0,5%; Ácido Acético 1%.
- **Azul de Coomassie:** 0,25% de Coomassie Brilliant Blue R 250 en metanol: agua: ácido acético (5:5:1).
- **Solución Decolorante:** Metanol 25% v/v, Ácido Acético Glacial 7% v/v.

Purificación de proteínas en condiciones nativas con marca de histidinas.

- **Buffer de Lisis:** 50mM NaH_2PO_4 pH 8; 300mM NaCl.
- **Buffer de Extracción Periplásmica:** 17,2% sacarosa, 200mM Tris, 1μM EDTA e Inhibidor de Proteasa ("Complete Mini, EDTA free" de Roche).
- **Buffers de Lavado:** 50mM NaH_2PO_4 , pH 8; 300mM NaCl; 5-25mM imidazol.
- **Buffer de Elución:** 50mM NaH_2PO_4 , pH 8; 300mM NaCl; 500mM imidazol.

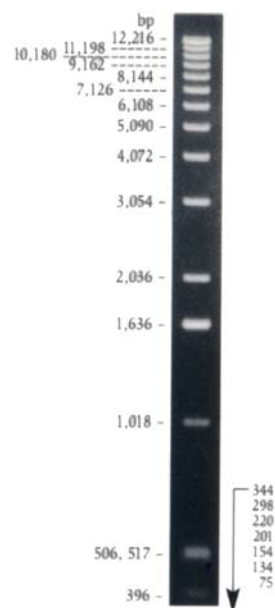
Soluciones para preparar cultivo de cardiomiocitos de rata neonatal

- **PBS-Glucosa 1%**
- **Solución enzimática:** 80 mg de tripsina, 5 mg de collagenasa y 2,5 mg de ADNasa en 50 ml de PBS 1x. Esterilizar por filtrado con filtros Millipore® de 0,22 μm.

- **Solución de pipeteo:** 2,5 mg de ADNasa en 25 ml de PBS-glucosa 1 %, 1 ml de suero fetal bovino (SFB, GIBCO). Esterilizar por filtros Millipore® de 0,22 µm.
- **DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium-F12®, GIBCO):** DMEM-F12, 3,574 g HEPES, 1,2 g Na₂CO₃, 1 g glucosa. Llevar a pH: 7,2-7,4 con NaOH y ajustar volumen a 1 litro con 10% suero fetal bovino inactivado por calor.

3.8 Marcadores

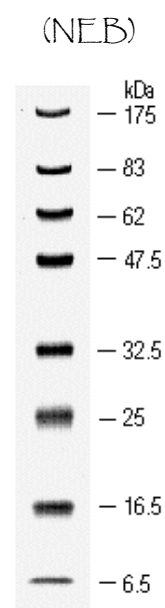
1 kb DNA Ladder
(Invitrogen™)



1 kb+ DNA Ladder
(Invitrogen™)



Prestained Protein Marker
Broad Range 6-175 kDa



3.9 Enzimas y anticuerpos

Las *Taq* ADN polimerasa, con sus respectivos buffers, fueron adquiridas en Invitrogen.

Las enzimas de restricción y la enzima T4 ADN ligasa, fueron adquiridas de New England BioLabs. En todos los casos, estas enzimas fueron utilizadas según las instrucciones de los fabricantes.

Los anticuerpos monoclonales anti-His y anti-IgG de ratón ambos acoplados a peroxidasa y el anticuerpo anti-Myc utilizados fueron los producidos por SIGMA-ALDRICH.

3.10 Construcción de los scFv

El RNA total fue extraído de hibridomas productores del mAb 17.2, utilizando el RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). La síntesis de ADNc se realizó con transcriptasa reversa (Invitrogen) utilizando hexámeros al azar como primers (Promega, Madison, WI, USA). La amplificación de V_H y V_L se realizó por separado utilizando primers específicos.

Amplificación V_H

17.2 Back 5'-GAAGTGCAGCTCGAGGAGTCTGG-3'

17.2 For 5'-AGAGACAGTGACCAGAGTCCCTTGGCC-3'

Amplificación VL

VLA₁ 5'-GAGCTCGTGATGACACAGTCTCCA-3'

VK2_{For} 5'-CCGTTTTTATTTCCAGCTTGGTCCC-3'

Mezcla:

MgCl₂ (50mM) 3μl

Buffer de PCR 10x 5μl

dNTP (25mM) 1μl

ADNc 5μl

Primer Sentido (5pmol/μl) 6μl

Primer Antisentido (5pmol/μl) 6μl

Taq polimerasa 1μl

H₂O c.s.p. 50μl

Ciclos:

94°C 5 min

40 ciclos: 94°C 30 seg

52°C 30 seg

72°C 30 seg

72°C 10 min

Recuperar la banda de 400-350pb.

Purificar en gel de agarosa.

Los péptidos de unión y los sitios de restricción fueron agregados por superposición en una segunda reacción de PCR (PCR overlap), utilizando los siguientes primers:

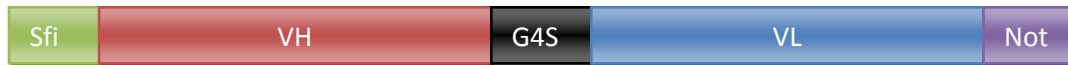
Ensamble de los scFvs sentido V_H-V_L péptido de unión corto:

17.2 Sfi 5'-CATGCCATGACTCGCGGCCCAGCCGGCC
ATGGCCGAAGTGCAGCTCGAGGAGTCTGG-3'

17.2 LBSH 5'-GCCACCCAGCCCGCCAGAGACAGTGAC
CAGAGTCCCTTGGCC-3'

17.2 LFSH 5'-GGCGGGTCGGGTGGCGAGCTCGTGATG
ACACAGTCTCC-3'

NOTVKFOR₂ 5'-GATATGAGATACTGCGGCCGCCCGTT
TTATTTCCAGCTTGGTCCC-3'



Péptido de unión largo:

17.2 LBLG 5'-CCCCCGCCGCCCCGACCCGCCACCTCCAG
AGACAGTGACCAGAGTCCCTTGGCC-3'

17.2 LFLG 5'-GGCGGGTCGGGCGGCGGGGGATCGGGTG
GCGGAGGGTCGGAGCTCGTGATGACACAGTCTCC-3'



Ensamble de los scFvs sentido V_L-V_H, péptido de unión corto:

17.2 Sfi VL 5'-CATGCCATGACTCGCGGCCCAGCCGGCC
ATGGCCGAGCTCGTGATGACACAGTCTCC-3'

17.2 LBSH VL 5'-GCCACCCGACCCGCCCCGTTTTATTT
CCAGCTTGGTCCC-3'

17.2 LFSH VH 5'-GGCGGGTCGGGTGGCGAAGTGCAGCT
CGAGGAGTCTGG-3'

NOTVKFOR₂ VH 5'-GATATGAGATACTGCGGCCGCAGA
GACAGTGACCAGAGTCCCTTGGCC-3'



Péptido de unión largo:

17.2 LBLG VL 5'-CCCCCGCCGCCCGACCCGCCACCTCC
CCGTTTTATTTCCAGCTTGGTCCC-3'

17.2 LFLG VH 5'-GGCGGGTCGGGCGGCGGGGGATCGGG
TGGCGGAGGGTCGGAAGTGCAGCTCGAGGAGTCTG
G-3'



Mezcla:		Ciclos:
MgCl ₂ (50mM)	3μl	94°C 5 min
Buffer de PCR 10x	5μl	30 ciclos: 94°C 30 seg
dNTP (25nM)	1μl	52°C 30 seg
V _H (cantidades equimolares)	xμl	72°C 1 min
V _L (cantidades equimolares)	xμl	72°C 10 min
Primer Sentido (5pmol/μl)	5μl	
Primer Antisentido (5pmol/μl)	5μl	
Primer solapante 1 (0,5pmol/μl)	0,5μl	Recuperar la banda de 800-750pb.
Primer solapante 2 (0,5pmol/μl)	0,5μl	Purificar en gel de agarosa.
Taq polimerasa	1μl	
H ₂ O c.s.p.	50μl	

Los productos fueron clonados en los sitios SfiI y NotI del vector pHenII.

3.1.1 Purificación de Fragmentos de ADN

La purificación de fragmentos de ADN producto de PCR y de digestiones enzimáticas se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) 1% + BrEt 0.01% en TAE 1x. Las bandas correspondientes al fragmento de ADN a purificar se cortan del gel visualizándolas en un transiluminador de luz UV y se purifican con el kit "Wizard DNA Cleanup[®] System" (PROMEGA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.12 Digestión Enzimática de Plásmido e Insertos

- Plásmido/Insertos 10 μ l (5 mg/ml)
- H₂O 16 μ l
- 10x NEB2 (New England Biolabs) 3,5 μ l
- BSA 1/10 4 μ l
- Sfi I (5 U/ μ l) 1 μ l
- Digestión O/N (16hs) 50°C
- NaCl 5M 2 μ l
- 10x NEB2 0,7 μ l
- H₂O 2 μ l
- Not I (5 U/ μ l) 1 μ l
- Digestión 5-6hs a 37°C

3.13 Ligación

Las proporciones inserto/plásmido se establecen por comparación de bandas en un gel de agarosa 1% + BrEt 0.01%. Las ligaciones se armaron a volumen final 10 μ l conteniendo distintas relaciones inserto/plásmido, 1 μ l de Buffer de Ligación, 0,5 μ l de T4 Ligasa (5 U/ μ l) y H₂O hasta completar volumen. Incubación O/N 16°C o 2-3 hs. a temperatura ambiente. Se detiene la reacción mediante una incubación a 65°C por 10 minutos.

Para las ligaciones a pGEM-T se siguieron las indicaciones del fabricante.

3.14 Transformación

Para la transformación de bacterias utilizamos tres metodologías distintas: shock térmico, electroporación o infección con fagos.

Shock Térmico

- 50-100µl de cultivo saturado de bacterias competentes químicas
- 1 µl plásmido
- 30 minutos en hielo
- 45 segundos a 42°C
- 2 minutos en hielo
- Agregar 400µl 2xYT o SOC
- Incubar 45 minutos en agitación a 200 rpm a 37°C
- Plaquear en 2xYT-Agar-Ampicilina

Electroporación

- 50-100µl de cultivo saturado de bacterias electrocompetentes
- 2µl de plásmido
- 10 minutos en hielo
- Transferir a cubeta de electroporación
- Electroporar a 2,5 Kv, 25 µF y 200Ω τ4,6-4,7
- Lavar inmediatamente con 1 ml de SOC y pasar a un tubo estéril.
- Repetir el paso anterior 2 veces, recuperando el medio en el mismo tubo.
- Incubar por 1 hora en Agitación a 200 rpm a 37°C
- Plaquear en 2xYT-Agar-Ampicilina

3.15 Expresión de scFv en la cápside del fago

Se transformó por electroporación *E. coli* XL1 blue (cepa no supresora) con las construcciones mencionadas y se plaquearon en placas 2xYT amplicilina (Amp), suplementadas con glucosa (Glu) al 2% para reprimir la expresión de los

scFv. Se seleccionaron 48 colonias de cada tipo y se crecieron cultivos líquidos (200 μ l 2xYT-Amp-Glu) en placas de 96 pocillos. Esta placa fue copiada a una nueva y la anterior fue glicerolada al 20% y guardada a -80°C . La nueva placa se infecta con fago helper, que aporta las proteínas de la cápside necesarias para el ensamblaje de los fagos-scFv

3.16 Infección con Fagos

- En 200 μ l de 2xYT-ampicilina-glucosa inocular 2-10 μ l de bacterias transformadas
- Incubar 2hs en agitación a 200 rpm a 37°C
- Agregar 25 μ l de 2xYT-ampicilina-glucosa y 2 μ l de Fago Helper
- Incubar 30 minutos a 37°C sin agitación
- Incubar 60 minutos en agitación a 200 rpm a 37°C
- Centrifugar 10 minutos a 1800G y descartar el sobrenadante
- Resuspender el pellet en 200 μ l de 2xYT-ampicilina-kanamicina e incubar O/N en agitación a 200 rpm a 37°C
- Centrifugar el cultivo (en el sobrenadante se encuentran los fagos)
- Lanzar cultivos en 200 μ l de las células a ser transformadas con los fagos e incubarlas 90 minutos en agitación a 200 rpm a 37°C
- Infectar los cultivos con 10 μ l del sobrenadante que contiene los fagos
- Incubar 30 minutos a 37°C sin agitación
- Plaquear en 2xYT-Agar-Ampicilina

3.17 Minipreps

- Las minipreparaciones de ADN plasmídico a partir de cultivos bacterianos se realizaron mediante el sistema "GenElute™ Plasmid Miniprep Kit" (SIGMA-ALDRICH), o con el siguiente protocolo:
- Partiendo de 3-15 ml de cultivo líquido saturado de bacterias
- Centrifugar los cultivos 5 minutos a 3000 rpm y descartar el sobrenadante.
- Resuspender en 300 µl de Solución 1
- Agregar 300 µl de Solución 2 y mezclar 10 veces por inversión.
- Agregar 300 µl de Solución 3 y mezclar 10 veces por inversión.
- Dejar 10 minutos en hielo
- Centrifugar 15 minutos a 4°C
- Pasar el sobrenadante a un tubo limpio y agregar 8 µl de RNAsa, incubar por 1 hr a 37°C
- Añadir 600 µl de Cloroformo Isoamílico, mezclar enérgicamente, centrifugar 5 minutos a 4°C.
- Pasar la fase acuosa (superior) a un tubo limpio conteniendo 700 µl de Isopropanol
- Incubar 30 minutos a temperatura ambiente
- Centrifugar 15 minutos a 4°C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en etanol 70%
- Centrifugar 5 minutos a 4°C
- Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet a temperatura ambiente
- Resuspender el pellet en 50 µl H₂O

Para la cuantificación se utilizó un equipo Genespec1[®], calculando la concentración y pureza de las muestras mediante los valores de DO a 230 nm, 260 nm y 280 nm.

3.18 Inmunoensayo Enzimático (ELISA)

Todas las reacciones se realizaron en placas de poliestireno de 96 celdas.

- **Cobertura (coating):** Se diluyen las proteínas a ser unidas a las placas en Buffer Carbonato a una concentración de 5 µg/ml. Se utilizan 50 µl de la solución por cada celda y se incuban las placas O/N a 4°C.
- **Bloqueado:** Se ponen 200 µl de PBS-TW con 5% leche descremada por cada celda. Incubación de 1 hora en estufa a 37°C.
- **Anticuerpo Primario:** Se utilizan 100 µl por celda de una solución de PBS-TW con 1% leche descremada y el anticuerpo de interés (scFv). Incubación de 1 hora en estufa a 37°C.
- **Anticuerpo Secundario:** Se utiliza anti-histidina acoplada a peroxidasa en la misma forma que el punto anterior.
- **Revelado:** Se realiza utilizando TMB como sustrato cromogénico. Se detiene la reacción con 50 µl por celda de HCl 1 N.
- Las placas se leen a una longitud de onda de 450 nm en un lector de microplacas VERSAmax[®] (Molecular Devices Corporation).
- **Lavados:** Entre paso y paso se vacían las celdas por volcado y se lavan 3 veces con PBS-TW.

3.19 Expresión en *E. coli* de anticuerpos recombinantes a pequeña escala

- Incubar bacterias transformadas en 3ml de 2xYT-ampicilina-glucosa O/N en agitación a 200 rpm a 37°C
- Repicar 30μl del cultivo anterior a 3ml de 2xYT-ampicilina e incubar 4 horas en agitación a 200 rpm a 37°C
- Agregar 3μl de IPTG 1M (inducción) e incubar 4 horas en agitación a 200 rpm a 37°C
- Bajar las bacterias y resuspenderlas en 150μl de H₂O
- Tomar 40μl de la resuspensión y agregar 10μl de Cracking Buffer
- A partir de este punto se procede como en un SDS-Page y Western Blot normales

3.20 Expresión en *E. coli* de anticuerpos recombinantes a gran escala

- De cultivos de 15ml de 2xYT, saturados de bacterias (HB2151) crecidos O/N en agitación a 200 rpm a 37°C tomar 7ml e inocular 800ml de 2xYT con 1% de glucosa y ampicilina. Crecer en agitación a 200 rpm a 37°C hasta que el medio alcance una densidad óptica (DO) de 1 para una longitud de onda de 600nm.
- Centrifugar los cultivos a una temperatura de 4°C.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet de bacterias en 800ml de 2xYT con ampicilina (sin glucosa) mediante agitación.
- Agregar el IPTG (1mM final) e incubar O/N en agitación a 200 rpm a 20°C.
- Centrifugar los cultivos a una temperatura de 4°C.

- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 10ml de Buffer de Extracción Periplásmica mediante pipeteo.
- Centrifugar a 4°C a fin de separar los esferoblastos (pellet) del periplasma (sobrenadante).

3.21 Expresión de Proteínas en *P. pastoris*

La preparación de los medios de cultivo especiales para *P. pastoris*, así como la transformación, selección y expresión se realizaron siguiendo las instrucciones del fabricante acorde a las dos cepas utilizadas.

3.22 Purificación de los Anticuerpos Recombinantes

La purificación de los scFvs del periplasma se realizó mediante cromatografía de afinidad utilizando HIS-SelectTM Nickel Affinity Gel (SIGMA), la cual se incubó 1-2 horas con el periplasma a 4°C , luego se realizan 3 lavados de 10 minutos con Buffer de Lavado y 4 eluciones de 5 minutos con Buffer de Elución. Las fracciones eluidas obtenidas se vuelven a dializar contra PBS para eliminar el exceso de Imidazol.

3.23 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las electroforesis en geles de poliacrilamida se realizaron utilizando el sistema Mini Protean IIITM de BioRad.

Se utilizaron geles con diversos porcentajes de poliacrilamida, utilizando una relación acrilamida/bisacrilamida 29,2%/0,8%. La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 100-150 V para la separación.

3.24 Tinción de geles con Azul de Coomasie

Los geles fueron teñidos O/N con agitación suave en Solución de Coomasie, y posteriormente decolorados con Solución Decolorante hasta que las bandas se observaron claramente sobre el fondo.

3.25 Inmunotransferencia (Western Blot)

Para la detección inmunológica de las proteínas separadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, estas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Bioscience GE). Las transferencias se llevaron a cabo en Buffer de Transferencia aplicando una tensión constante de 100 V durante 60 minutos. Para confirmar que las proteínas fueron transferidas correctamente, las membranas fueron teñidas reversiblemente con Rojo Ponceau y luego decoloradas en sucesivos lavados con agua destilada.

Las membranas con las proteínas transferidas fueron bloqueadas O/N a 4°C con TBS suplementado con 5% de leche en polvo descremada.

La detección de scFvs se realizó utilizando anticuerpos monoclonales anti-histidina conjugado a peroxidasa o anticuerpos anti-myc y anti-IgG murina acoplado a peroxidasa. Los anticuerpos para dicho fin fueron preparados en TBS suplementado con 1% de leche en polvo descremada (para disminuir la probabilidad de formación de uniones inespecíficas). El revelado se realizó utilizando TMB como sustrato cromogénico.

3.26 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas se mide mediante un micrométodo adaptado del protocolo original descrito por Bradford (Bradford, 1976). A 10µl de cada

muestra se le agregan 100µl de Reactivo de Bradford preparado según las instrucciones del fabricante (Bio Rad). Las muestras se analizan por duplicado en placas de poliestireno de 96 celdas y se mide la absorbancia a 595 nm en un lector de microplacas VERSAmax® (Molecular Devices Corporation). Se utilizan patrones de BSA (0,075-1 mg/ml) para la construcción de una curva de calibración y sobre la base de la misma se determina la concentración proteica de las muestras.

En el caso de los scFvs purificados, la cuantificación se lleva a cabo midiendo la absorbancia a 280 nm. El coeficiente de extinción molar para las proteínas se calcula a partir de su secuencia de aminoácidos utilizando el programa ProtParam de Expasy, disponible en el sitio www.expasy.org.

3.27 Renaturalización (refolding)

El ensayo de refolding de los anticuerpos se realizó con la técnica de “step-wise dialysis” (Asano y col, 2002). Consiste en diálisis sucesivas de 12 hs cada una, donde se elimina el agente desnaturizante gradualmente y se agrega un par redox para favorecer la formación de puentes disulfuro.

El ensayo de refolding del EF2 se realizó con la misma técnica pero con distintos buffers. Partiendo de cuerpos de inclusión puros, se resuspendió la proteína en buffer fosfato 8M Urea. Se armaron alícuotas de distintas concentraciones y el protocolo se probó en 20, 10 y 5 µM EF2. Los buffers de diálisis utilizados fueron:

Buffer 1: 4M Urea, 50mM NaH₂PO₄, 300 mM KCl.

Buffer 2: 2M Urea, 50mM NaH₂PO₄, 300 mM KCl.

Buffer 3: 1 M Urea, 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 5 mM MgCl_2 , 0,1 mM GDP, 0,5 mM GSSG, 0,05 mM GSH, 0,4 M L-Arg.

Buffer 4: 0,5 M Urea, 50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM KCl, 0,5 mM EDTA, 5 mM MgCl_2 , 0,1 mM GDP, 0,5 mM GSSG, 0,05 mM GSH, 0,2 M L-Arg.

Buffer 5: 20 mM HEPES, 75 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mM GDP.

3.28 Cromatografía de exclusión

Los scFvs C5 y B7 fueron sometidos a una cromatografía analítica en una columna Superdex 200 HR 10/30 (Amersham Pharmacia). Se utilizó un sistema de FPLC a 21°C en PBS, previamente calibrado con estándares de proteínas de SIGMA. El flujo fue 0,5 ml/min y la absorbancia del eluido fue seguida a 280 nm (Kortt y col, 1994; 1997).

3.29 Surface Plasmon Resonance (SPR)

Se utilizó un equipo BIACORE 3000 para la determinación de los parámetros cinéticos de los scFvs y las proteínas ribosomales P. Todos los reactivos utilizados fueron obtenidos de BIACORE (Uppsala, Suecia).

Para los scFv se ensayaron tres condiciones diferentes:

A) scFv como ligando: Los anticuerpos C5 y B7 junto a un scFv control son inmovilizados en un chip NTA. Este chip se regenera en cada medición con una solución de NiCl_2 a un flujo de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ por un minuto, previo lavando con EDTA. Los antígenos fueron inyectados a un flujo de 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ por tres minutos seguido de una fase de disociación de tres minutos.

B) scFv como analito: La matriz de dextrano carboxilada (B1) fue activada con 35 μl de una mezcla de 0.2 M *N*-ethyl-*N*-dimethylaminopropyl carbodiimida y

0.05 M *N*-hydroxysuccinimida a 5 $\mu\text{l}/\text{min}$. Las proteína de fusión junto a un control de GST sola fueron inmovilizadas con el protocolo estándar a una densidad de 0.05 pmol/mm². Los estudios cinéticos de las proteínas inyectadas fueron realizados como se describe en la referencia 18.

C) Inhibición: Se pre incubó una concentración fija del analito con concentraciones crecientes del agente inhibidor (péptido o proteína) por 30 minutos y se inyectaron luego en el chip conteniendo la proteína de fusión. En estas condiciones la pendiente de la fase de asociación es directamente proporcional a la inhibición de la interacción (Richalet-Secordel y col, 1997). La concentración necesaria para inhibir el 50% de la interacción (IC₅₀) fue calculada en un grafico logit (Sigmaplot).

Para las interacciones entre las proteínas ribosomales P se utilizo la forma de analito donde las cinco proteínas recombinantes fusionadas a GST fueron unidas al chip y las proteínas recombinantes fusionadas a 6 x histidinas se utilizaron en solución. También se hicieron ensayos de inhibición en estas condiciones.

En todos los casos los sensogramas fueron analizados por ajuste general con el programa Biaeval 1.4

3.30 Inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre células CHO

Células CHO-K establemente transfectadas y células no transfectadas fueron lavadas 2 veces con PBS 1X, se fijaron con formaldehído (3.8%) en PBS 1X por 30 min a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 1X (2 veces). Se agregó glicina 0,02M en PBS 1X por 5 min a temperatura ambiente para neutralizar los grupos aldehídos libres del formaldehído y se lavaron las células con PBS 1X (2 veces). Cada manipulación fue precedida por 5 lavados con PBS-

0.05% Tween 20 (PBS-T) por 5 min. Todos los anticuerpos se diluyeron en PBS-T20-BSA (1%) y se incubaron con agitación suave por 1 h a temperatura ambiente. Después de bloquear las células con PBS-BSA (5%) durante 1 h a temperatura ambiente, las células se incubaron con los distintos anticuerpos mAb anti-B₁ (150 nM), mAb anti-M2 (150 nM), mAb 17.2 (300 nM) or scFvs (200 nM). Se reveló la reacción inmunológica con anticuerpos contra IgG de ratón (H+L) acoplados a FITC (Jackson ImmunoResearch, Baltimore Pike, P.O.) diluidos 1/100. Para los scFvs se realizó una incubación previa con mouse anti-His tag. Luego de los lavados con PBS-T, las células se lavaron 1 vez con PBS 1X y se puso líquido de montaje. La marcación se visualizó mediante un microscopio confocal Zeiss LSM-510 con objetivos de C-Apochromat x 40 numerical aperture 1.2 under water. Las imágenes se procesaron con el programa del microscopio confocal Zeiss LSM Image Browser versión 3.0.

Los ensayos de competición fueron realizados por preincubación con los péptidos H26R (1 μ M), V22G (1 μ M) o R13 (100 nM) durante una hora a temperatura ambiente.

3.31 Inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre parásitos.

Trypanosoma cruzi CL Brenner y *Trypanosoma brucei* 29/13 tanto de la línea salvaje como transfectados con los intrabodies según se explico en cada caso fueron lavados dos veces en PBS helado y fijados con 3,8% (v/v) de formaldehído en PBS por 30 min a temperatura ambiente y se lavaron con PBS 1X (2 veces). Se agregó glicina 0,02M en PBS 1X por 5 min a temperatura ambiente para neutralizar los grupos aldehídos libres del formaldehído y se lavaron las células con PBS 1X (2 veces). Cada manipulación fue precedida por 5 lavados con PBS-

0.05% Tween 20 (PBS-T) por 5 min. Luego del bloqueo con PBS-BSA 5% las células fueron incubadas con mAb anti-HIS (~350 nM) y/o scFv C5 (200 nM). La reacción fue detectada con un anticuerpo anti-mouse acoplado a FITC (Jackson ImmunoResearch, Baltimore, MD, USA)

3.32 Producción de AMPc en células establemente transfectadas

Se crecieron las líneas celulares correspondientes ($\sim 10^5$ células/pocillo) en placas de 96 pocillos 24 h antes de la estimulación. Se lavaron con PBS 1X y se incubaron con 1 ml del medio Hanks' conteniendo 10mM de HEPES y 100 μ M de isobutil metil xantino (IBMX) (bloquea la hidrólisis del AMPc) durante 30 min a 37°C. Se determinaron los niveles de AMPc luego de incubar las células con concentraciones crecientes de los distintos anticuerpos y agonistas específicos durante 1 h a 37°C. Se determinó el AMPc total usando el kit comercial "AMPc enzyme immunoassay" (Amersham Pharmacia) y se siguieron las indicaciones del proveedor. Los ensayos se realizaron por duplicado de tres experimentos independientes. Los desvíos Standard se calcularon con el programa de GraphPad Prism.

3.33 Cultivo de Cardiomiocitos de Ratas Neonatas

(Para aproximadamente 20-30 placas de 35mm)

- Gelatinizar las placas con gelatina 0,1 % (en H₂O). Dejar 2 horas, recuperar la gelatina sobrenadante y secar a 37°C en estufa.
- Tomar 5-6 ratas Wistar neonatas (idealmente de 1-3 días). Sacrificarlas por decapitación. Rocíar los cuellos con EtOH 70% y realizar un corte en el tórax de cada rata que rompa el esternón. Con una pinza curva, extraer los corazones y pasarlos inmediatamente a un falcon con 10ml de PBS-Glucosa pre-enfriada.
- Descartar el PBS-Glucosa y pasar los corazones a una placa de petri esterilizada y previamente mantenida en hielo. Cortar los corazones en pedazos teniendo cuidado de no desgarrarlos. Tomar los corazones con una pipeta y pasarlos a un falcon, realizar dos lavados con 5ml de PBS-Glucosa pre-enfriado. Descartar el PBS-Glucosa dejando el menor volumen posible de líquido.
- Agregar 8ml de Solución Enzimática. Agitar suavemente el falcon durante 10 minutos. Guardar en hielo.
- Agregar 4ml de Solución de Pipeteo y disgregar el tejido mediante un suave pipeteo durante 2 minutos. Dejar decantar los pedazos de tejido y tomar el sobrenadante pasándolo a un falcon limpio y guardarlo en hielo. Repetir el protocolo desde el punto anterior con el falcon en el que quedó el decantado de tejido. Repetir esta operación hasta obtener 6 tubos.
- Centrifugar los falcon obtenidos por 5 minutos a 1400 rpm.

- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en medio de cultivo F12-SFB, utilizando 1 ml de medio cada dos pellets. Guardar en hielo hasta plaquear.

3.34 Ensayo de actividad funcional

Luego de obtener el cultivo primario de cardiomiocitos donde las células laten coordinadamente se realizaron las mediciones en el incremento en la frecuencia del latido. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Una hora antes de realizar las determinaciones, las células se incubaron con medio DMEM-F12 sin suero.

- En las placas de 35 mm, se realizaron 10 marcas de campos en el fondo de cada placa, para contar los latidos durante 15 seg en cada campo y realizar un promedio de los mismos.
- Se determinó la frecuencia de contracción basal de los cardiomiocitos de cada campo por 15 segundos. Las frecuencias de contracción basal ideal deben ser de 60 a 120 latidos/min.
- Se agregaron a cada placa los anticuerpos correspondientes a distintas concentraciones hasta obtener un efecto funcional (curva dosis-respuesta). Se incubaron durante 1 h en estufa de 5% CO₂ a 37°C, y se determinó la frecuencia de contracción de los cardiomiocitos.
- Para determinar la especificidad del efecto observado, se incubó con antagonistas específicos de los receptores cardiovasculares sospechados de estar involucrados. Bisoprolol 1 μ M, antagonista β_1 -AR o atropina 1 μ M, antagonista colinérgico.

3.35 Transferencia pasiva

Ratones BALB/c hembras fueron anestesiadas con una inyección intraperitoneal de Tribromoethanol 150 mg/Kg. Se realizaron los registros basales de electrocardiograma (ECG) o electroretinogramas (ERG) y se inyectaron en la vena de la cola 200 μ l de una solución de scFvs a las concentraciones indicadas en cada caso. También se realizaron ensayos combinando el tratamiento con anticuerpos y drogas agonistas y antagonistas de los receptores cardíacos. Los registros se tomaron a 5, 15 y 30 minutos post inyección. En los ECG se analizaron las seis medidas estándar (I, II, III, AVR, AVL, AVF) a una velocidad de 50 mm/s y una amplitud de 20 mm/mV con un electrocardiógrafo Fukuda-Denshi Fx-2111 (Tokyo, Japan) (Lopez-Bergami y col, 2001; 2005). En los ERG se analizaron el patrón general y los potenciales oscilatorios. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Graphpad.

3.36 Modelado Molecular

Todos los procedimientos se realizaron con el Software Insight II, Biopolymer, Homology, Docking and Discover de Accelrys (San Diego, Ca.). Para el modelado se aprovechó la elevada similitud de los sitios de reconocimiento de los scFvs con la de un anticuerpo previamente cristalizado (Herron y col, 1991), PDB: 1NBV, lo que permitió construir un modelo realista del sitio de unión *in silico*. Se realizaron manualmente los reemplazos de los aminoácidos que diferían con la secuencia utilizada como molde. La estructura resultante se sometió a minimización por gradiente conjugado (desviación de RMS <0.001 Kcal/molÅ, bajo condiciones de carga del sitio de unión a antígeno de los scFv a pH=7,4). Para

identificar los residuos críticos del sitio de unión a antígeno, se realizó una prueba de unión con los decapeptidos correspondientes a la proteína TcP2B (EDDDMGFGLF) y al epítopo del segundo rulo extracelular del β_1 -AR (ESDEARRCYN).

Las estructuras obtenidas se sometieron a simulación dinámica a 300°K fijando los aminoácidos de los FWR, y permitiendo la movilidad en los CDR y el decapeptido, y se obtuvo la conformación estructural con menor energía potencial. Esta fue nuevamente sometida a minimización por gradiente conjugado.

3.37 Construcción de los intrabodies

La secuencia codificante del scFv C5 fue amplificada por PCR con oligonucleótidos que portan los sitios Hind III (PFHind) y Xho I (PRHISXho), este último porta una secuencia de 6 histidinas para facilitar la detección y la purificación. Estas construcciones se utilizaron para el clonado en los vectores pTREX y pRIBOTEX. Se realizó el mismo procedimiento con los scFv C5 y S3 con oligonucleótidos que portan los sitios Hind III (PFHind) y Xba I (PRHISXba) para el clonado en pLew 100.

PFHind 5'-CCCAAGCTTGCCRCCATGGATGGCCGAAGTGCAGCTC
GAGGAGTCTGGAGG-3'.

PRHISXba 5'-GCTCTAGATCAGTGATGGTGATGATGATGCCGTTT
KATTTCCAGCTTGGTSCCYCCWCC-3'

PRHISXho 5'-GCCTCGAGTCAGTGATGGTGATGATGATGCCGTT
TKATTTCCAGCTTGGTSCCYCCWCC-3'

3.3.8 Cultivo de parásitos y transfección

La cepa *T. brucei* procíclicos 29/13 (cedida por el Dr. Daniel Sanchez), que posee integrados los genes para la polimerasa de T7 y el represor de tetraciclina, fue crecida en SDM-79 suplementada con 10% de suero fetal bovino (Wirtz y col, 1999). Los parásitos fueron crecidos en presencia de G418 (15 µg/ml) e higromicina (50 µg/ml) para mantener los constructos portadores de la polimerasa de T7 y el represor de tetraciclina. Para la transfección las células fueron lavadas en 5 ml de ZPFM (132 mM NaCl; 8 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1.5 mM KH₂PO₄; 1.5 mM MgAcet; 90 mM CaCl₂) y resuspendidas en 0.5 ml de ZPFM que contenía 10 µg de plásmido linearizado. La linearización se realiza en los sitios SacII o NotI para que se integre en la región espaciadora del locul ribosomal (Wirtz y Clayton, 1995). Las transfecciones se realizaron en cuvetas de 2mm con un electroporador BIO-RAD con una descarga de 1,5 kV. Inmediatamente luego de la transfección, las células fueron transferidas a 5 ml de SDM-79 suplementado con G418 e higromicina. Luego de un día se agregó fleomicina 2,5 µg/ml para la selección y se mantuvieron dos semanas para formar líneas estables. Luego las células se clonaron por dilución límite en placas de 24 pocillos utilizando medio condicionado. Para la inducción, las células fueron crecidas en el mismo medio conteniendo tetraciclina 0,1 mg/ml. Las células fueron diluidas diez veces cada vez que la densidad celular alcanzaba 1×10^6 células/ml. El conteo se realizó en cámara de Neubauer y graficado en función del tiempo el logaritmo del número de células multiplicado por las diluciones sucesivas.

3.39 RT-PCR

El RNA total de 4×10^5 parásitos fue extraído con el reactivo de TRIzol (Invitrogen). La síntesis del ADNc se realizó con el protocolo estándar de la enzima Omniscript RT (QIAGEN). La amplificación para la detección del scFv C5 se realizó con los primers 17.2 Back y VK2For (descritos previamente), que da un producto de aproximadamente 750 pb.

3.40 Purificación de ribosomas de hígado de Rata

Todos los pasos se realizan a 4°C . Para la fracción S150, se parte de un homogenato total de hígado (como se describe a continuación) que se centrifuga 10 minutos a 17.000 xg, luego el sobrenadante se centrifuga a 140.000 xg por 2 horas y se recogen cuidadosamente 4/5 del volumen de la parte superior del tubo que se alicuotan y se guardan a -80°C hasta ser usados.

Para la purificación de ribosomas, un hígado de aproximadamente 20gr fue lavado con sacarosa 0,25M. Luego se homogeniza el tejido en buffer de homogeneización (50 mM Tris-HCl pH 7.5; 250 mM KCl; 5 mM MgAcet; sacarosa 0.25 M) suplementado con 10% de la fracción S150 previamente descrita. El homogenato se trata con 10 U/ml de α -amilasa y 0,1 mM CaCl_2 por 15 minutos y luego se centrifuga por 4 minutos a baja velocidad. El sobrenadante se centrifuga 20 minutos a 23.000 xg. Este nuevo sobrenadante que contiene los polisomas se suplementa con Tritón X-100 1% y deoxicolato 0.5 % y se centrifuga 5 minutos a 16.000 xg. El sobrenadante se carga en un gradiente discontinuo de sacarosa 2M y 1.5 M en buffer A (50 mM Tris-HCl pH 7.5; 250 mM KCl; 5 mM MgAcet; DTT 1 mM y 10% de la fracción S150) y centrifugado 16 horas a 140.000 xg. El pellet que contiene la fracción ribosomal se lava y se resuspender en

Tris 10 mM pH 7.5; KCl 10 mM; MgAcet 1.5 mM. Por último la concentración de ribosomas se determina por absorbancia a 260 nm.

3.41 Purificación de ribosomas de *T. cruzi* y *C. fasciculata*

Epimastigotes de *T. cruzi*, cepa CL Brener y *C. fasciculata* fueron crecidos a 28°C en medio rico que contiene infusión de corazón y cerebro, triptona (BHT) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado hasta una densidad celular de 30-40x10⁶ parásitos/ml. Se agregó cicloheximida (50 µg/ml) 10 minutos antes de colectar las células por centrifugación a 4°C y se lavaron dos veces con PBS + cicloheximida (50 µg/ml). Las células se resuspendieron en buffer de lisis (20 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM MgCl₂; 5 mM KCl; 3 mM CaCl₂; 5 mM 2-mercaptoetanol y 250 mM sacarosa) y lisadas con 0.2-0.4 % de Nonidet P40 en hielo. El homogenato fue centrifugado 2-3 veces 20 minutos a 12.000 xg y el sobrenadante final fue cargado en un gradiente discontinuo de sacarosa 2M y 1,5M en buffer TMK (10 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM Mg Acet; y 100 mM KAcet). El gradiente se centrifuga 16 horas a 140.000 xg. El sobrenadante se descarta y el pellet se lava cuidadosamente con buffer TMK. Finalmente se resuspender en el mismo buffer, se hacen alícuotas y se guardan a -80°C. La concentración de ribosomas se determina como se describo previamente.

3.42 Síntesis de proteínas *in vitro*

Las mezclas de reacción se prepararon en hielo y contienen 50 μM de cada uno de los 19 aminoácidos (a excepción de metionina), 2mM DTT; 100 mM MgAcet; 3,5mM MgAcet; 75 $\mu\text{g/ml}$ de ARNt de germen de trigo; 18mM HEPES/KOH pH 7,5; 1 mM ATP; 0,5 mM GTP; 7,5 mM creatina fosfato; 37,5 $\mu\text{g/ml}$ creatina fosfoquinasa; 2 μl de la fracción S150 de hígado de rata; 0,3 unidades de absorbancia a 260 nm de *T. cruzi*, *C. fasciculata* o ribosomas de rata purificados y 2 μCi of ^{35}S -metionina en un volumen final de reacción de 30 μl . Las reacciones se realizaron a 30°C 60 minutos y se detuvieron por agregado de 150 μl de NaOH 1,5 M; Met 1 mM, BSA 170 $\mu\text{g/ml}$ e incubación por 30 minutos a 37°C. Luego, las proteínas se precipitan con 1 ml de TCA 25% 60 minutos en hielo. Las muestras se centrifugan a 13.000 rpm a 4°C durante 20 minutos, el pellet se lava con 1 ml de TCA 10% frío y el pellet final se resuspende en 0.5 ml de líquido de centelleo. Por último se mide la incorporación de radiactivo a las muestras.

3.43 Péptidos

Los péptidos fueron sintetizados con la técnica Fmoc, utilizando un sistema automático en fase sólida. En todos los casos se purificó por HPLC y se comprobó la estructura de los péptidos por espectroscopia de masa. La tabla que se muestra a continuación resume los péptidos utilizados, los nombres y las regiones de las proteínas que los contienen. Las secuencias completas de las proteínas nombradas se encuentran en el anexo.

Nombre	Proteína	Posición	Secuencia
R13	TcP2β	94-107	EEEDDDMGFGLFD
P015	TcPo	306-321	EEDDDDDDFGMGALF
H13	HuP2	102-115	EESDDDMGFGLFD
H26R	Huβ ₁ -AR	197-222	HWWRAESDEARRCYNDPKCCDFVTNR
V22G	HuM2-AchR	168-190	VRTVEDGECYIQFFSNAAVTFG
Pep1	TcP2β	1-15	MKYLAAYALVGLSGG
Pep2	TcP2β	10-24	VGLSGGTPSKSAVEA
Pep3	TcP2β	20-34	SAVEAVLKAAGVPVD
Pep4	TcP2β	30-44	GVPVDPSRVDALFAE
Pep5	TcP2β	40-54	ALFAEFAGKDLDTVC
Pep6	TcP2β	50-64	LDTVCTEGKSKLVGG
Pep7	TcP2β	60-74	KLVGGATRPNAATAS
Pep8	TcP2β	70-84	AATASAPTAAAAASS
Pep9	TcP2β	80-94	AAASSGAAAPAAAAE
Pep10	TcP2β	90-107	AAAAEEEEEDDDMGFGLFD
PepC5	scFvC5	50-61	CRIRSKINNYSTC

Referencias

- Agrawal RK, Spahn CM, Penczek P, Grassucci RA, Nierhaus KH, Frank J. (2000) Visualization of tRNA movements on the *Escherichia coli* 70S ribosome during the elongation cycle. **J Cell Biol.** **150**(3):447-60.
- Asano R, Kudo T, Nishimura Y, Makabe K, Hayashi H, Suzuki M, Tsumoto K, Kumagai J. (2002) Efficient construction of a diabody using a refolding system: anti-carcinoembryonic antigen recombinant antibody fragment. **J Biochem.** **132**:903-9.
- Bailey-Serres, J., Vangala, S., Szick, K. and Lee, C.H. (1997). Acidic phosphoprotein complex of the 60S ribosomal subunit of maize seedling roots. Components and changes in response to flooding. **Plant Physiol.** **114**:1293-305.
- Bargis-Surgey, P., Lavergne, J.P., Gonzalo, P., Vard, C., Filhol-Cochet, O. and Reboud, J.P. (1999). Interaction of elongation factor eEF-2 with ribosomal P proteins. **Eur. J. Biochem.** **262**:606-611.
- Benaïm G, Sanders JM, García-Marchán Y, Colina C, Lira R, Caldera AR, Payares G, Sanoja C, Burgos JM, Leon-Rossell A, Concepción JL, Schijman AG, Levin M, Oldfield E, Urbina JA. (2006) Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. **J Med Chem.** **49**(3):892-9.
- Berezov A, Greene MJ, Murali R. (2003) Structure-based approaches to inhibition of erbB receptors with peptide mimetics. **Immunol Res.** **27**(2-3):303-8.
- Böldicke T, Weber H, Mueller PP, Barleon B, Bernal M. (2005) Novel highly efficient intrabody mediates complete inhibition of cell surface expression of the human vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2/KDR). **J Immunol Methods.** **300**(1-2):146-59.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.** **72**:248-54.
- Brener Z. (1979) Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the Western Hemisphere. **Pharmacol Ther.** **7**(1):71-90.
- Buckingham RH, Grentzmann G, Kisselev L. (1997) Polypeptide chain release factors. **Mol. Microbiol.** **24**:449-56.
- Capecchi MR. (1967) Polypeptide chain termination in vitro: isolation of a release factor. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **58**:1144-1151.

- Casset F, Roux F, Mouchet P, Bes C, Chardes T, Granier C, Mani JC, Pugnère M, Laune D, Pau B, Kaczorek M, Lahana R, Rees A. (2003) A peptide mimetic of an anti-CD4 monoclonal antibody by rational design. *Biochem Biophys Res Commun.* **307**(1):198-205.
- Cate JH, Yusupov MM, Yusupova GZ, Earnest TN, Noller HF. (1999) X-ray crystal structures of 70S ribosome functional complexes. *Science.* **285**(5436):2095-104.
- Chiale PA, Ferrari I, Mahler E, Vallazza MA, Elizari MV, Rosenbaum MB, Levin MJ. (2001) Differential profile and biochemical effects of antiautonomic membrane receptor antibodies in ventricular arrhythmias and sinus node dysfunction. *Circulation.* **103**(13):1765-71.
- Coloma MJ, Hastings A, Wims LA, Morrison SL. (1992) Novel vectors for the expression of antibody molecules using variable regions generated by polymerase chain reaction. *J Immunol Methods.* **152**(1):89-104.
- Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. (1993) Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y).* **11**(8):905-10.
- Czworkowski J and Moore PB. (1996) The elongation phase of protein synthesis. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **54**:293-332.
- Demartis S, Tarli L, Borsi L, Zardi L, Neri D. (2001) Selective targeting of tumour neovasculature by a radiohalogenated human antibody fragment specific for the ED-B domain of fibronectin. *Eur J Nucl Med.* **28**(4):534-9.
- Diaconu M, Kothe U, Schlünzen F, Fischer N, Harms JM, Tonevitsky AG, Stark H, Rodnina MV, Wahl MC. (2005) Structural basis for the function of the ribosomal L7/12 stalk in factor binding and GTPase activation. *Cell.* **121**(7):991-1004.
- Dias JC. (1993) Chagas' disease and its control in Latin America: an analysis of possibilities. *Cad Saude Publica.* **9**(2):201-9.
- Elies R, Ferrari I, Wallukat G, Lebesgue D, Chiale P, Elizari M, Rosenbaum M, Hoebeke J, Levin MJ. (1996) Structural and functional analysis of the B cell epitopes recognized by anti-receptor autoantibodies in patients with Chagas' disease. *J Immunol.* **157**(9):4203-11.
- Elizari MV, Chiale PA. (1993) Cardiac arrhythmias in Chagas' heart disease. *J Cardiovasc Electrophysiol.* **4**(5):596-608.

- Elkon K, Bonfa E, Skelly S, Weissbach H, Brot N. (1987) Ribosomal protein autoantibodies in systemic lupus erythematosus. **Bioessays** 7:258-261.
- Elkon KB, Parnassa AP, Foster CL. (1985) Lupus autoantibodies target ribosomal P proteins. **J. Exp. Med.** 162:459-471.
- Frank J. (2001) Ribosomal dynamics explored by cryo-electron microscopy. **Methods.** 25(3):309-15.
- Frenken LG, Hensing JG, Van den Hondel CA, Verrips CT. (1998) Recent advances in the large-scale production of antibody fragments using lower eukaryotic microorganisms. **Res Immunol.** 149(6):589-99.
- Freund C, Ross A, Plückthun A, Holak TA. (1994) Structural and dynamic properties of the Fv fragment and the single-chain Fv fragment of an antibody in solution investigated by heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy. **Biochemistry.** 33(11):3296-303.
- Gabashvili IS, Agrawal RK, Spahn CM, Grassucci RA, Svergun DI, Frank J, Penczek P. (2000) Solution structure of the *E. coli* 70S ribosome at 11.5 Å resolution. **Cell.** 100(5):537-49.
- Ganoza M.C. (1966) Polypeptide chain termination in cell-free extracts of *E. coli*. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.** 31:273-278.
- Gao H, Ayub MJ, Levin MJ, Frank J. (2005) The structure of the 80S ribosome from *Trypanosoma cruzi* reveals unique rRNA components. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 102(29):10206-11.
- Giordanengo L, Maldonado C, Rivarola HW, Iosa D, Girones N, Fresno M, Gea S. (2000) Induction of antibodies reactive to cardiac myosin and development of heart alterations in cruzipain-immunized mice and their offspring. **Eur J Immunol.** 30:3181-9.
- Gomez-Lorenzo MG, Spahn CM, Agrawal RK, Grassucci RA, Penczek P, Chakraborty K, Ballesta JP, Lavandera JL, Garcia-Bustos JF, Frank J. (2000) Three-dimensional cryo-electron microscopy localization of EF2 in the *Saccharomyces cerevisiae* 80S ribosome at 17.5 Å resolution. **EMBO J.** 19(11):2710-8.
- Gonzalo P, Reboud JP. (2003) The puzzling lateral flexible stalk of the ribosome. **Biol Cell.** 95(3-4):179-93.

- Gonzalo, P., Lavergne, J.P., Reboud, J.P. (2001). Pivotal role of the P1 N-terminal domain in the assembly of the mammalian ribosomal stalk and in the proteosynthetic activity. *J. Biol. Chem.* **276**:19762-19769.
- Griaznova O, Traut RR. (2000) Deletion of C-terminal residues of *Escherichia coli* ribosomal protein L10 causes the loss of binding of one L7/L12 dimer: ribosomes with one L7/L12 dimer are active. *Biochemistry*. **39**(14):4075-81.
- Griffin H, Elston R, Jackson D, Ansell K, Coleman M, Winter G, Doorbar J. (2006) Inhibition of papillomavirus protein function in cervical cancer cells by intrabody targeting. *J Mol Biol.* **355**(3):360-78.
- Guarinos E, Santos C, Sánchez A, Qiu DY, Remacha M, Ballesta JP. (2003) Tag-mediated fractionation of yeast ribosome populations proves the monomeric organization of the eukaryotic ribosomal stalk structure. *Mol Microbiol.* **50**(2):703-12.
- Gudkov AT, Tumanova LG, Gongadze GM, Bushuev VN. (1980) Role of different regions of ribosomal proteins L7 and L10 in their complex formation and in the interaction with the ribosomal 50 S subunit. *FEBS Lett.* **109**(1):34-8.
- Hagiya A, Naganuma T, Maki Y, Ohta J, Tohkairin Y, Shimizu T, Nomura T, Hachimori A, Uchiumi T. (2005) A mode of assembly of P0, P1, and P2 proteins at the GTPase-associated center in animal ribosome: in vitro analyses with P0 truncation mutants. *J Biol Chem.* **280**(47):39193-9.
- Hampl H, Schulze H, Nierhaus KH. (1981) Ribosomal components from *Escherichia coli* 50 S subunits involved in the reconstitution of peptidyltransferase activity. *J. Biol. Chem.* **256**:2284-2288.
- Hernandez-Munain C, De Diego JL, Alcina A, Fresno M. (1992) A *Trypanosoma cruzi* membrane protein shares an epitope with a lymphocyte activation antigen and induces crossreactive antibodies. *J Exp Med.* **175**:1473-82.
- Hernandez-Munain C, De Diego JL, Bonay P, Girones N, Fresno M. (1993) GP 50/55, a membrane antigen of *Trypanosoma cruzi* involved in autoimmunity and immunosuppression. *Biol Res.* **26**:209-18.

- Herron JN, He XM, Ballard DW, Blier PR, Pace PE, Bothwell AL, Voss EW Jr, Edmundson AB. (1991) An autoantibody to single-stranded DNA: comparison of the three-dimensional structures of the unliganded Fab and a deoxynucleotide-Fab complex. **Proteins** 11:159-75.
- Hirashima A and Kaji A. (1973) Role of elongation factor G and a protein factor on the release of ribosomes from messenger ribonucleic acid. **J. Biol Chem.** 248:7580-7587.
- Holvoet P, Laroche Y, Lijnen HR, Van Cauwenberge R, Demarsin E, Brouwers E, Matthyssens G, Collen D. (1991) Characterization of a chimeric plasminogen activator consisting of a single-chain Fv fragment derived from a fibrin fragment D-dimer-specific antibody and a truncated single-chain urokinase. **J Biol Chem.** 266(29):19717-24.
- Hudson PJ, Kortt AA. (1999) High avidity scFv multimers; diabodies and triabodies. **J Immunol Methods.** 231(1-2):177-89.
- Janosi L, Hara H, Zhang S, Kaji A. (1996) Ribosome recycling by ribosome recycling factor (RRF)—an important but overlooked step of protein biosynthesis. **Adv. Biophys.** 32:121-201.
- Jing-Jing Li, Musturi Venkataramana, Suparna Sanyal, Jan-Christer Janson, Zhi-Guo Su (2006) Immobilized β -cyclodextrin polymer coupled to agarose gel properly refolding recombinant *Staphylococcus aureus* elongation factor-G in combination with detergent micelle. **Protein Expression and Purification** 45:72-79
- Jørgensen R, Ortiz PA, Carr-Schmid A, Nissen P, Kinzy TG, Andersen GR. (2003) Two crystal structures demonstrate large conformational changes in the eukaryotic ribosomal translocase. **Nat Struct Biol.** 10(5):379-85.
- Juri Ayub M, Smulski CR, Nyambega B, Bercovich N, Masiga D, Vazquez MP, Aguilar CF, Levin MJ. (2005) Protein-protein interaction map of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein complex. **Gene.** 357(2):129-36.
- Kaplan D, Ferrari I, Bergami PL, Mahler E, Levitus G, Chiale P, Hoebeke J, Van Regenmortel MH, Levin MJ. (1997) Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 94(19):10301-6.

- Kaziro Y. (1978) The role of guanosine 5'-triphosphate in polypeptide chain elongation. *Biochim. Biophys. Acta* **505**:95-127.
- Kelly JM, Ward HM, Miles MA, Kendall G. (1992) A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.* **20**(15):3963-9.
- Kisselev L, Ehrenberg M, Frolova L. (2003) Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors? *EMBO J.* **22**:175-82.
- Klco JM, Wiegand CB, Narzinski K, Baranski TJ. (2005) Essential role for the second extracellular loop in C5a receptor activation. *Nat Struct Mol Biol.* **12**:320-6.
- Kontermann RE. (2004) Intrabodies as therapeutic agents. *Methods.* **34**(2):163-70.
- Kortt AA, Lah M, Oddie GW, Gruen CL, Burns JE, Pearce LA, Atwell JL, McCoy AJ, Howlett GJ, Metzger DW, Webster RG, Hudson PJ. (1997) Single-chain Fv fragments of anti-neuraminidase antibody NC10 containing five- and ten-residue linkers form dimers and with zero-residue linker a trimer. *Protein Eng.* **10**:423-33.
- Kortt AA, Malby RL, Caldwell JB, Gruen LC, Ivancic N, Lawrence MC, Howlett GJ, Webster RG, Hudson PJ, Colman PM. (1994) Recombinant anti-sialidase single-chain variable fragment antibody. Characterization, formation of dimer and higher-molecular-mass multimers and the solution of the crystal structure of the single-chain variable fragment/sialidase complex. *Eur J Biochem.* **1**:151-7.
- Kristensen O, Laurberg M. (2002) Expression, refolding and crystallization of Aquifex aeolicus elongation factor P. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **58**(Pt 6 Pt 2):1039-41.
- Lalioí, V.S., Pérez-Fernandez, J., Remacha, M. and Ballesta, J.P.G. (2002). Characterization of interaction sites in the *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk components. *Mol. Microbiol.* **46**:719-729.
- Lamphear BJ, Kirchweber R, Skern T, Rhoads RE. (1995) Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J. Biol. Chem.* **270**:21975-21983.

- Levi GC, Lobo IM, Kallás EG, Amato Neto V. (1996) Etiological drug treatment of human infection by *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. **38**(1):35-8.
- Levin MJ, Mesri E, Benarous R, Levitus G, Schijman A, Levy-Yeyati P, Chiale PA, Ruiz AM, Kahn A, Rosenbaum MB, et al. (1989) Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **41**:530-538.
- Levin, M. J., Vazquez, M., Kaplan, D., and Schijman, A. G., (1993) The *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein family: classification and antigenicity. *Parasitol. Today* **9**:381-384.
- Levitus G, Hontebeyrie-Joskowicz M, Van Regenmortel MH, Levin MJ. (1991) Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. *Clin Exp Immunol.* **85**:413-7.
- Liljas A, Eriksson S, Donner D, Kurland CG. (1978) Isolation and crystallization of stable domains of the protein L7/L12 from *Escherichia coli* ribosomes. *FEBS Lett.* **88**:300-304.
- Lopes ER, Chapadeiro E, Andrade ZA, Almeida HO, Rocha A. (1981) Pathological anatomy of hearts from asymptomatic Chagas disease patients dying in a violent manner. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **76**(2):189-97.
- Lopez Bergami P, Gómez KA, Levy GV, Grippo V, Baldi A, Levin MJ. (2005) The beta1 adrenergic effects of antibodies against the C-terminal end of the ribosomal P2beta protein of *Trypanosoma cruzi* associate with a specific pattern of epitope recognition. *Clin Exp Immunol.* **142**(1):140-7.
- López Bergami P, Scaglione J, Levin MJ. (2001) Antibodies against the carboxyl-terminal end of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins are pathogenic. *FASEB J.* **15**(14):2602-12.
- Lopez-Bergami, P., Cabeza Meckert, P., Kaplan, D., Levitus, G., Elías, F. Quintana, F., Van Regenmortel, M. H. V., Laguens, R. and Levin, M. J., (1997) Immunization with recombinant *Trypanosoma cruzi* ribosomal P2B protein induces changes in the electrocardiogram of immunized mice. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **18**:75-85.
- Lorenzi HA, Vazquez MP, Levin MJ. (2003) Integration of expression vectors into the ribosomal locus of *Trypanosoma cruzi*. *Gene.* **310**:91-9.
- Luo D, Geng M, Noujaim AA, Madiyalakan R. (1997) An engineered bivalent single-chain antibody fragment that increases antigen binding activity. *J Biochem (Tokyo).* **121**(5):831-4.

- Mahler E, Hoebeke J, Levin MJ. (2004) Structural and functional complexity of the humoral response against the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P2 beta protein in patients with chronic Chagas' heart disease. *Clin Exp Immunol.* **136**(3):527-34.
- Mahler E, Sepulveda P, Jeannequin O, Liegeard P, Gounon P, Wallukat G, Eftekhari P, Levin MJ, Hoebeke J, Hontebeyrie M. (2001) A monoclonal antibody against the immunodominant epitope of the ribosomal P2beta protein of *Trypanosoma cruzi* interacts with the human beta 1-adrenergic receptor. *Eur J Immunol.* **31**(7):2210-6.
- Malmqvist, M. (1999) BIACORE: an affinity biosensor system for characterization of biomolecular interactions. *Biochem Soc Trans* **27**: 335-340
- Marzouki A, Lavergne JP, Reboud JP, Reboud AM. (1989) Heterogeneity of native rat liver elongation factor 2. *FEBS Lett.* **255**(1):72-6.
- Matsumoto SC, Labovsky V, Roncoroni M, Guida MC, Giménez L, Mitelman J, Gori H, Jurgelevicius R, Grillo A, Manfredi P, Levin MJ, Paveto C. (2006) Retinal dysfunction in patients with chronic Chagas' disease is associated to anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies that cross-react with rhodopsin. *FASEB J.* **20**(3):550-2.
- Mesri EA, Levitus G, Hontebeyrie-Joskowicz M, Dighiero G, Van Regenmortel MH, Levin MJ. (1990) Major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinant in Chagas' heart disease shares homology with the systemic lupus erythematosus ribosomal P protein epitope. *J Clin Microbiol.* **28**:1219-24.
- Mitsui K, Nakagawa T, Tsurugi K. (1988) On the size and the role of a free cytosolic pool of acidic ribosomal proteins in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* **104**:908-911.
- Mitsui K, Nakagawa T, Tsurugi K. (1988) On the size and the role of a free cytosolic pool of acidic ribosomal proteins in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.* **104**:908-911.
- Mobini R, Fu M, Wallukat G, Magnusson Y, Hjalmarson A, Hoebeke J. (2000) A monoclonal antibody directed against an autoimmune epitope on the human beta1-adrenergic receptor recognized in idiopathic dilated cardiomyopathy. *Hybridoma.* **19**(2):135-42.
- Morrison SL. (1992) In vitro antibodies: strategies for production and application. *Annu Rev Immunol.* **10**:239-65.

- Naganuma T, Shiogama K, Uchiyama T. (2007) The N-terminal regions of eukaryotic acidic phosphoproteins P1 and P2 are crucial for heterodimerization and assembly into the ribosomal GTPase-associated center. *Genes Cells*. **12**(4):501-10.
- Nakamura Y, Ito K, Isaksson LA. (1996) Emerging understanding of translation termination. *Cell* **87**:147-150.
- Noller HF. (1993) Peptidyl transferase: protein, ribonucleoprotein, or RNA? *J. Bacteriol.* **175**:5297-5300.
- Nyborg J, Liljas A. (1998) Protein biosynthesis: structural studies of the elongation cycle. *FEBS Lett.* **430**:95-9.
- Oleinick NL. (1977) Initiation and elongation of protein synthesis in growing cells: differential inhibition by cycloheximide and emetine. *Arch Biochem Biophys.* **182**(1):171-80.
- Paganetti P, Calanca V, Galli C, Stefani M, Molinari M. (2005) beta-site specific intrabodies to decrease and prevent generation of Alzheimer's A β peptide. *J Cell Biol.* **168**(6):863-8.
- Pérez-Fernández J, Remacha M and Ballesta JPG. (2005) The acidic protein binding site is partially hidden in the free *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk protein P0. *Biochemistry* **44**:5532-5540.
- Pestova TV, Borukhov SI, Hellen CU. (1998) Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* **394**:854-859.
- Peter JC, Eftekhari P, Billiald P, Wallukat G, Hoebeke J. (2003). scFv single chain antibody variable fragment as inverse agonist of the beta2-adrenergic receptor. *J Biol Chem.* **278**:36740-7.
- Peter JC, Wallukat G, Tugler J, Maurice D, Roegel JC, Briand JP, Hoebeke J. (2004). Modulation of the M2 muscarinic acetylcholine receptor activity with monoclonal anti-M2 receptor antibody fragments. *J Biol Chem.* **279**:55697-706.
- Planta, R. and Mager, W. (1998). The list of cytoplasmic ribosomal proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**:471-477.
- Rader C, Barbas CF 3rd. (1997) Phage display of combinatorial antibody libraries. *Curr Opin Biotechnol.* **8**(4):503-8.

- Raether W and Hanel H. (2003) Nitroheterocyclic drugs with broad spectrum activity. *Parasitol. Res.* **90**:19-39.
- Ramakrishnan V. (2002) Ribosome structure and the mechanism of translation. *Cell.* **2002** **108**(4):557-72.
- Ramakrishnan V. and Moore P.B. (2001) Atomic structures at last: the ribosome in 2000. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11**: 144-154.
- Remacha M, Jimenez-Diaz A, Bermejo B, Rodriguez-Gabriel MA, Guarinos E, Ballesta JP. (1995) Ribosomal acidic phosphoproteins P1 and P2 are not required for cell viability but regulate the pattern of protein expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**:4754-4762.
- Rich BE, Steitz JA. (1987) Human acidic ribosomal phosphoproteins P0, P1, and P2: analysis of cDNA clones, in vitro synthesis, and assembly. *Mol. Cell. Biol.* **7**:4065-4074.
- Richalet-Secordel, P. M., Rauffer-Brugere, N., Christensen, L. L., Ofenloch-Haehnle, B., Seidel, C., and Van Regenmortel, M. H. (1997) Concentration measurement of unpurified proteins using biosensor technology under conditions of partial mass transport limitation. *Anal. Biochem.* **249**:165-173
- Rode HJ, Moebius U, Little M. (1999) T cell activation by monoclonal antibodies bound to tumor cells by a cell surface displayed single-chain antibody. *J Immunol Methods.* **224**(1-2):151-60.
- Rodrigues Coura J and de Castro SL. (2002) A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **97**: 3-24.
- Rodriguez-Gabriel MA, Remacha M, Ballesta JP. (2000) The RNA interacting domain but not the protein interacting domain is highly conserved in ribosomal protein P0. *J. Biol. Chem.* **275**:2130-6.
- Rosenbaum MB, Chiale PA, Schejtman D, Levin M, Elizari MV. (1994) Antibodies to beta-adrenergic receptors disclosing agonist-like properties in idiopathic dilated cardiomyopathy and Chagas' heart disease. *J Cardiovasc Electrophysiol.* **5**(4):367-75.
- Saenz-Robles MT, Remacha M, Vilella MD, Zinker S, Ballesta JP. (1990) The acidic ribosomal proteins as regulators of the eukaryotic ribosomal activity. *Biochim. Biophys. Acta* **1050**:51-55.

- Santos C, Ballesta JP. (1994) Ribosomal protein P0, contrary to phosphoproteins P1 and P2, is required for ribosome activity and *Saccharomyces cerevisiae* viability. *J. Biol. Chem.* **269**:15689-15696.
- Santos C, Ballesta JP. (1995) The highly conserved protein P0 carboxyl end is essential for ribosome activity only in the absence of proteins P1 and P2. *J. Biol. Chem.* **270**:20608-20614.
- Saragovi HU, Fitzpatrick D, Raktabutr A, Nakanishi H, Kahn M, Greene ML. (1991) Design and synthesis of a mimetic from an antibody complementarity-determining region. *Science.* **253**(5021):792-5.
- Schijman, A.G., Levitus, G. and Levin, M.J. (1992). Characterization of the C-terminal region of a *Trypanosoma cruzi* 38-kDa ribosomal P0 protein that does not react with lupus anti-P autoantibodies. *Immunology Letters* **33**:15-20.
- Scolnick E, Tompkins R, Caskey T, Nirenberg M. (1968) Release factors differing in specificity for terminator codons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **61**:768-774.
- Sepulveda P, Liegeard P, Wallukat G, Levin MJ, Hontebeyrie M. (2000) Modulation of cardiocyte functional activity by antibodies against *Trypanosoma cruzi* ribosomal P2 protein C terminus. *Infect Immun.* **68**(9):5114-9.
- Shin BS, Maag D, Roll-Mecak A, Arefin MS, Burley SK, Lorsch JR, Dever TE. (2002) Uncoupling of initiation factor eIF5B/IF2 GTPase and translational activities by mutations that lower ribosome affinity. *Cell* **111**:1015-1025.
- Skeiky YA, Benson DR, Elwasila M, Badaro R, Burns JM Jr, Reed SG. (1994) Antigens shared by *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*: immunological comparison of the acidic ribosomal P0 proteins. *Infect. Immun.* **62**:1643-51.
- Snary D, Flint JE, Wood JN, Scott MT, Chapman MD, Dodd J, Jessell TM, Miles MA. (1983) A monoclonal antibody with specificity for *Trypanosoma cruzi*, central and peripheral neurones and glia. *Clin Exp Immunol.* **54**:617-24.
- Soares MR, Bisch PM, Campos de Carvalho AC, Valente AP, Almeida FC. (2004) Correlation between conformation and antibody binding: NMR structure of cross-reactive peptides from *T. cruzi*, human and *L. braziliensis*. *FEBS Lett.* **560**(1-3):134-40.

- Sogin ML. (1991) Early evolution and the origin of eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev.* **1**(4):457-63.
- Spahn CM, Beckmann R, Eswar N, Penczek PA, Sali A, Blobel G, Frank J. (2001) Structure of the 80S ribosome from *Saccharomyces cerevisiae*-tRNA-ribosome and subunit-subunit interactions. *Cell* **107**:373-386.
- Stark H, Rodnina MV, Rinke-Appel J, Brimacombe R, Wintermeyer W, van Heel M. (1997) Visualization of elongation factor Tu on the *Escherichia coli* ribosome. *Nature* **389**:403-406.
- Sterin-Borda L, Cantore M, Pascual J, Borda E, Cossio P, Arana R, Passeron S. (1986) Chagasic IgG binds and interacts with cardiac beta adrenoceptor-coupled adenylate cyclase system. *Int J Immunopharmacol.* **8**:581-8.
- Stocks MR. (2004) Intrabodies: production and promise. *Drug Discov Today.* **9**(22):960-6.
- Takasaki W, Kajino Y, Kajino K, Murali R, Greene MJ. (1997) Structure-based design and characterization of exocyclic peptidomimetics that inhibit TNF alpha binding to its receptor. *Nat Biotechnol.* **15**(12):1266-70.
- Tanowitz HB, Gumprecht JP, Spurr D, Calderon TM, Ventura MC, Raventos-Suarez C, Kellie S, Factor SM, Hatcher VB, Wittner M, et al. (1992) Cytokine gene expression of endothelial cells infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis.* **166**(3):598-603.
- Tchorzewski M, Boldyreff B, Issinger O, Grankowski N. (2000) Analysis of the protein-protein interactions between the human acidic ribosomal P-proteins: evaluation by the two hybrid system. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**:737-746.
- Tchórzewski M, Krokowski D, Boguszevska A, Liljas A, Grankowski N. (2003) Structural characterization of yeast acidic ribosomal P proteins forming the P1A-P2B heterocomplex. *Biochemistry.* **42**(12):3399-408.
- Trill JJ, Shatzman AR, Ganguly S. (1995) Production of monoclonal antibodies in COS and CHO cells. *Curr Opin Biotechnol.* **6**(5):553-60.
- Tsurugi K, Mitsui K. (1991) Bilateral hydrophobic zipper as a hypothetical structure which binds acidic ribosomal protein family together on ribosomes in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* **174**(3):1318-23.

- Tsurugi K, Ogata K. (1985) Evidence for the exchangeability of acidic ribosomal proteins on cytoplasmic ribosomes in regenerating rat liver. *J. Biochem.* **98**:1427-1431.
- Tsurugi K. (1992) Hydrophobic zippers and hook-and-eye: evolutionarily conserved protein sequence motifs in eukaryotic acidic ribosomal proteins which are assumed to be involved in the association of the protein family. *Protein Seq Data Anal.* **5**(1):33-8.
- Uchiumi T and Kominami R. (1992) Direct evidence for interaction of the conserved GTPase domain within 28S RNA with mammalian ribosomal acidic phosphoproteins and L12. *J. Biol. Chem.* **267**:19179-19185.
- Uchiumi T, Traut RR, Kominami R. (1990) Monoclonal antibodies against acidic phosphoproteins P0, P1, and P2 of eukaryotic ribosomes as functional probes. *J Biol Chem.* **265**(1):89-95.
- Uchiumi T, Wahba AJ, Traut RR. (1987) Topography and stoichiometry of acidic proteins in large ribosomal subunits from *Artemia salina* as determined by crosslinking. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **84**:5580-4.
- van Agthoven A, Krick J, Amons R, Moller W. (1978) Isolation and characterization of the acidic phosphoproteins of 60S ribosomes from *Artemia salina* and rat liver. *Eur. J. Biochem.* **91**:553-565.
- van Agthoven AJ, Maassen JA, Moller W. (1977) Structure and phosphorylation of an acidic protein from 60S ribosomes and its involvement in elongation factor-2 dependent GTP hydrolysis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77**:989-998.
- Vaughan TJ, Williams AJ, Pritchard K, Osbourn JK, Pope AR, Earnshaw JC, McCafferty J, Hodits RA, Wilton J, Johnson KS. (1996) Human antibodies with sub-nanomolar affinities isolated from a large non-immunized phage display library. *Nat Biotechnol.* **14**(3):309-14.
- Vazquez MP, Levin MJ. (1999) Functional analysis of the intergenic regions of TcP2beta gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. *Gene.* **239**(2):217-25.
- Wahl MC, Möller W. (2002) Structure and function of the acidic ribosomal stalk proteins. *Curr Protein Pept Sci.* **3**(1):93-106.




- Waterham HR, Digan ME, Koutz PJ, Lair SV, Cregg JM. (1997) Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. **Gene**. **186**(1):37-44.
- Wells SE, Hillner PE, Vale RD, Sachs AB. (1998) Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. **Mol. Cell** **2**:135-40.
- White TC, Rudenko G, Borst P. (1986) Three small RNAs within the 10 kb trypanosome rRNA transcription unit are analogous to domain VII of other eukaryotic 28S rRNAs. **Nucleic Acids Res.** **14**:9471-9489.
- Wigboldus JD. (1987) cDNA and deduced amino acid sequence of *Drosophila* rp21C, another 'A'-type ribosomal protein. **Nucleic Acids Res.** **15**:10064.
- Wilson KS, Noller HF. (1998) Molecular movement inside the translational engine. **Cell** **92**:337-349.
- Wirtz E, Clayton C. (1995) Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. **Science**. **268**(5214):1179-83.
- Wirtz E, Leal S, Ochatt C, Cross GA. (1999) A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. **Mol Biochem Parasitol.** **99**(1):89-101.
- Wolfgang WJ, Miller TW, Webster JM, Huston JS, Thompson LM, Marsh JL, Messer A. (2005) Suppression of Huntington's disease pathology in *Drosophila* by human single-chain Fv antibodies. **Proc Natl Acad Sci USA**. **102**(32):11563-8.
- Wool IG, Chan YL, Gluck A, Suzuki K. (1991) The primary structure of rat ribosomal proteins P0, P1, and P2 and a proposal for a uniform nomenclature for mammalian and yeast ribosomal proteins. **Biochimie** **73**:861-870.
- World Health Organization. (2002) Control of Chagas Disease. Report of a WHO Expert Committee, **World Health Organ. Tech. Rep.** **905**, 1-109.
- Zampieri S, Mahler M, Blüthner M, Qiu Z, Malmegrim K, Ghirardello A, Doria A, van Venrooij WJ, Raats JM. (2003) Recombinant anti-P protein autoantibodies isolated from a human autoimmune library: reactivity, specificity and epitope recognition. **Cell Mol Life Sci.** **60**(3):588-98.

- Zurdo J, Gonzalez C, Sanz JM, Rico M, Remacha M, Ballesta JP. (2000a) Structural differences between *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk proteins P1 and P2 support their functional diversity. **Biochemistry** **39**:8935-8943.
- Zurdo J, Parada P, van den Berg A, Nusspaumer G, Jimenez-Diaz A, Remacha M, Ballesta JP. (2000b) Assembly of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal stalk: binding of P1 proteins is required for the interaction of P2 proteins. **Biochemistry** **39**:8929-8934.
- Zurdo J, Sanz JM, Gonzalez C, Rico M, Ballesta JP. (1997) The exchangeable yeast ribosomal acidic protein YP2beta shows characteristics of a partly folded state under physiological conditions. **Biochemistry** **36**:9625-9635.

Anexo

5.1 Secuencia completa del scFv C5 (V_H-V_L)

1	GAA	GTG	CAG	CTC	GAG	GAG	TCT	GGG	GGA	AGA	TTG	GTG	CAG	CCT	AAA
1	E	V	Q	L	E	E	S	G	G	R	L	V	Q	P	K
46	GGG	TCA	TTG	AAA	CTC	TCA	TGT	GCA	GCC	TCT	GGA	TTC	AGC	TTC	AAT
16	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	S	F	N
91	ACC	AAT	GCC	ATG	AAC	TGG	GTC	CGC	CAG	GCT	CCA	GGA	AAG	GGT	TTG
31	T	N	A	M	N	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L
136	GAA	TGG	GTT	GCT	CGC	ATA	AGA	AGT	AAA	ATT	AAT	AAT	TAT	TCA	ACA
46	E	W	V	A	R	I	R	S	K	I	N	N	Y	S	T
181	TAT	TAT	GCC	GAT	TCA	GTG	AAA	GAC	AGG	TTC	ACC	ATC	TCC	AGA	GAT
61	Y	Y	A	D	S	V	K	D	R	F	T	I	S	R	D
226	GAT	TCA	CAA	AGC	ATG	CTC	TAT	CTG	CAA	ATG	AAC	AAC	TTG	AAA	ACT
76	D	S	Q	S	M	L	Y	L	Q	M	N	N	L	K	T
271	GAG	GAC	ACA	GCC	ATG	TAT	TAC	TGT	GTG	AGA	GGA	ACG	ACT	TAC	TGG
91	E	D	T	A	M	Y	Y	C	V	R	G	T	T	Y	W
316	GGC	CAA	GGG	ACT	CTG	GTC	ACT	GTC	TCT	GGC	GGG	TCG	GGT	GGC	GAG
106	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	G	G	S	G	G	E
361	CTC	GTG	ATG	ACA	CAG	TCT	CCA	CTC	ACT	TTG	TCG	GTT	ACC	ATT	GGA
121	L	V	M	T	Q	S	P	L	T	L	S	V	T	I	G
406	CAA	CCA	GCC	TCC	ATC	TCT	TGC	AAG	TCA	AGT	CAG	AGC	CTC	TTA	GAT
136	Q	P	A	S	I	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	D
451	AGT	GAT	GGA	AAG	ACA	TAT	TTG	AAT	TGG	TTG	TTA	CAG	AGG	CCA	GGC
151	S	D	G	K	T	Y	L	N	W	L	L	Q	R	P	G
496	CAG	TCT	CCA	AAG	CGC	CTA	ATC	TAT	CTG	GTG	TCT	AAA	CTG	GAC	TCT
166	Q	S	P	K	R	L	I	Y	L	V	S	K	L	D	S
541	GGA	GTC	CCT	GAC	AGG	TTC	ACT	GGC	AGT	GGA	TCA	GGG	ACA	GAT	TTC
181	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	T	D	F
586	ACA	CTG	AAA	ATC	AGC	AGA	GTG	GAG	GCT	GAG	GAT	TTG	GGA	GTT	TAT
196	T	L	K	I	S	R	V	E	A	E	D	L	G	V	Y
631	TAT	TGC	TGG	CAA	GGT	TCA	CAT	TTT	CCG	TAC	ACG	TTC	GGA	GGG	GGG
211	Y	C	W	Q	G	S	H	F	P	Y	T	F	G	G	G
676	ACC	AAG	CTG	GAA	ATA	AAA	CGG	GCG	GCC	GCA	CAT	CAT	CAT	CAC	CAT
226	T	K	L	E	I	K	R	A	A	A	H	H	H	H	H
721	CAC	GGG	GCC	GCA	GAA	CAA	AAA	CTC	ATC	TCA	GAA	GAG	GAT	CTG	AAT
241	H	G	A	A	E	Q	K	L	I	S	E	E	D	L	N
766	GGG	GCC	GCA	TAG											
256	G	A	A	*											

 Linker
 Myc Tag
 His Tag

5.2 Péptidos derivados de los CDRs y sus características.

LCDR₁ KSSQSLLDSDGKTYLN

Numero de aminoácidos: 16, Peso molecular: 1755.9, pI: 5.96

LCDR₂ LVSKLDS

Numero de aminoácidos: 7, Peso molecular: 760.8, pI: 5.84

LCDR₃ WQGSHPYTF

Numero de aminoácidos: 10, Peso molecular: 1269.3, pI: 6.74

HCDR₁ TNAMN

Numero de aminoácidos: 5, Peso molecular: 549.6, pI: 5.19

HCDR₂ RIRSKINNYSTYYADSVKD

Numero de aminoácidos: 19, Peso molecular: 2293.5, pI: 9.40

HCDR₃ RGTTYW

Numero de aminoácidos: 6, Peso molecular: 782.8, pI: 8.75

Pep C5 CRIRSKINNYSTC

Numero de aminoácidos: 13, Peso molecular: 1557.8, pI: 9.5

Este último corresponde al péptido circular sintetizado derivado del HCDR₂.

5.3 Secuencia del receptor beta 1 adrenérgico humano.

```

1 atg ggc gcg ggg gtg ctc gtc ctg ggc gcc tcc gag ccc ggt aac ctg tcg tcg gcc gca
1 M G A G V L V L G A S E P G N L S S A A
61 ccg ctc ccc gac ggc gcg gcc acc gcg gcg cgg ctg ctg gtg ccc gcg tcg ccg ccc gcc
21 P L P D G A A T A A R L L V P A S P P A
121 tcg ttg ctg cct ccc gcc agc gaa agc ccc gag ccg ctg tct cag cag tgg aca gcg ggc
41 S L L P P A S E S P E P L S Q Q W T A G
181 atg ggt ctg ctg atg gcg ctc atc gtg ctg ctc atc gtg gcg ggc aat gtg ctg gtg atc
61 M G L L M A L I V L L I V A G N V L V I
241 gtg gcc atc gcc aag acg ccg cgg ctg cag acg ctc acc aac ctc ttc atc atg tcc ctg
81 V A I A K T P R L Q T L T N L F I M S L
301 gcc agc gcc gac ctg gtc atg ggg ctg ctg gtg gtg ccg ttc ggg gcc acc atc gtg gtg
101 A S A D L V M G L L V V P F G A T I V V
361 tgg ggc cgc tgg gag tac ggc tcc ttc ttc tgc gag ctg tgg acc tca vtg vac gtg ctg
121 W G R W E Y G S F C E L W T S V D V L
421 tgc gtg acg gcc agc atc gag acc ctg tgt gtc att gcc ctg gac cgc tac ctc gcc atc
141 C V T A S I E T L C V I A L D R Y L A I
481 acc tcg ccc ttc cgc tac cag agc ctg ctg acg cgc gcg cgg gcg cgg ggc ctc gtg tgc
161 T S P F R Y Q S L L T R A R A R A R A L V C
541 acc gtg tgg gcc atc tcg gcc ctg gtg tcc ttc ctg ccc atc ctc atg cac tgg tgg cgg
181 T V W A I S A L V S F L P I L M H W W R
601 ggc gag agc gac gag gcg cgc cgc tgc tac aac gac ccc aag tgc tgc gac ttc gtc acc
201 A E S D E A R R C Y N D P K C C D F V T
661 aac cgg gcc tac gcc atc gcc tcg tcc gta gtc tcc ttc tac gtg ccc ctg tgc atc atg
221 N R A Y A I A S S V V S F Y V P L C I M
721 gcc ttc gtg tac ctg cgg gtg ttc cgc gag gcc cag aag cag gtg aag aag atc gac agc
241 A F V Y L Y L R V F R E A Q K Q V K K I D S
781 tgc gag cgc cgt ttc ctc ggc ggc cca gcg cgg ccg ccc tcg ccc tcg ccc gtc
261 C E R R F L G G P A R P P S P S P S P V
841 ccc gcg ccc gcg ccg ccg ccc gga ccc ccg cgc ccc gcc gcc gcc gcc gcc acc gcc ccg
281 P A P A P P P G P P R P A A A A A A T A P
901 ctg gcc aac ggg cgt gcg ggt aag cgg cgg ccc tcg cgc ctc gtg gcc ctg cgc gag cag
301 L A N G R A G K R R P S R L V A L R E Q
961 aag gcg ctc aag acg ctg ggc atc atc atg ggc gtc ttc acg ctc tgc tgg ctg ccc ttc
321 K A L K T L G I I M G V F T L C W L P F
1021 ttc ctg gcc aac gtg gtg aag gcc ttc cac cgc gag ctg gtg ccc gac cgc ctc ttc gtc
341 F L A N V V K A F H R E L V P D R L F V
1081 ttc ttc aac tgg ctg ggc tac gcc aac ctg gcc ttc aac ccc atc atc tac tgc cgc agc
361 F F N W L G Y A N S A F N P I I Y C R S
1141 ccc gac ttc cgc aag gcc ttc cag cga ctg ctc tgc tgc gcg cgc agg gct gcc cgc cgg
381 P D F R K A F Q R L L C C A R R A A R R
1201 cgc cac gcg acc cac gga gac cgg ccg cgc gcc tcg ggc tgt ctg gcc cgg ccc gga ccc
401 R H A T H G D R P R A S G C L A R P G P
1261 ccg cca tcg ccc ggg gcc gcc tcg gac gac gac gac gat gtc gtc ggg gcc acg ccg
421 P P S P G A A S D D D D D D V V G A T P
1321 ccc gcg cgc ctg ctg gag ccc tgg gcc ggc tgc aac ggc ggg gcg gcg gcg gac agc gac
441 P A R L L E P W A G C N G A A A D S D
1381 tcg agc ctg gac gag ccg tgc cgc ccc ggc ttc gcc tcg gaa tcc aag gtg tag
461 S S L D E P C R P G F A S E S K V *

```

En rojo se representan las regiones extracelulares, en azul las regiones de membrana y en negro las regiones intracelulares. El segundo bucle extracelular esta resaltado en negrita.

5.4 Secuencia del receptor colinérgico muscarínico 2 humano.

```

1 atg aat aac tca aca aac tcc tct aac aat agc ctg gct ctt aca agt cct tat aag aca
1 M N N S T N S S N N S L A L T S P Y K T
61 ttt gaa gtg gtg ttt att gtc ctg gtg gct gga tcc ctg agt ttg gtg acc att atc ggg
21 F E V V F I V L V A G S L S L V T I I G
121 aac atc cta gtc atg gtt tcc att aaa gtc aac cgc cac ctg cag acc gtc aac aat tac
41 N I L V M V S I K V N R H L Q T V N N Y
181 ttt tta ttc agc ttg gcc tgt gct gac ctt atc ata ggt gtt ttc tcc atg aac ttg tac
61 F L F S L A C A D L I I G V F S M N L Y
241 acc ctg tac act gtg att ggt tac tgg cct ttg gga cct gtg gtg tgt gac ctt tgg cta
81 T L Y T V I G Y W P L G P V V C D L W L
301 gcc ctg gac tat gtg gtc agc aat gcc tca gtt atg aat ctg ctg atc atc agc ttt gac
101 A L D Y V V S N A S V M N L L I I S F D
361 agg tac ttc tgt gtc aca aaa cct ctg acc tac cca gtc aag cgg acc aca aaa atg gca
121 R Y F C V T K P L T Y P V K R T T K M A
421 ggt atg atg att gca gct gcc tgg gtc ctg tct ttc atc ctg ttg gct cca gcc att ctg
141 G M M I A A A W V L S F I L W A P A I L
481 ttc tgg cag ttc att gta ggg gtg aga act gtg gag gat ggg gag tgc tac att cag ttt
161 F W Q F I V G V R T V E D G E C Y I Q F
541 ttt tcc aat gct gct gtc acc ttt ggt gct att gca gcc ttc tat ttg cca gtg atc
181 F S N A A V T F G T A I A A F Y L P V I
601 atc atg act gtg cta tat tgg cac ata tcc cga gcc agc aag agc agg ata aag aag gac
201 I M T V L Y W H I S R A S K S R I K K D
661 aag aag gag cct gtt gcc aac caa gac ccc gtt tct cca agt ctg gta caa gga agg ata
221 K K E P V A N Q D P V S P S L V Q G R I
721 gtg aag cca aac aat aac aac atg ccc agc agt gac gat ggc ctg gag cac aac aaa atc
241 V K P N N N N M P S S D D G L E H N K I
781 cag aat ggc aaa gcc agg gat cct gtg act gaa aac tgt gtt cag gga gag gag aag
261 Q N G K A P R D P V T E N C V Q G E E K
841 gag agc tcc aat gac tcc acc tca gtc agt gct gtt gcc tct aat atg aga gat gat gaa
281 E S S N D S T S V S A V A S N M R D D E
901 ata acc cag gat gaa aac aca gtt tcc act tcc ctg ggc cat tcc aaa gat gag aac tct
301 I T Q D E N T V S T S L G H S K D E N S
961 aag caa aca tgc atc aga att ggc acc aag acc cca aaa agt gac tca tgt acc cca act
321 K Q T C I R I G T K T P K S D S C T P T
1021 aat acc acc gtg gag gta gtg ggg tct tca ggt cag aat gga gat gaa aag cag aat att
341 N T T V E V V G S S G Q N G D E K Q N I
1081 gta gcc cgc aag att gtg aag atg act aag cag cct gca aaa aag aag cct cct cct tcc
361 V A R K I V K M T K Q P A K K K P P P S
1141 cgg gaa aag aaa gtc acc agg aca atc ttg gct att ctg ttg gct ttc atc atc act tgg
381 R E K K V T R T I L A I L L A F I I T W
1201 gcc cca tac aat gtc atg gtg ctg att aac acc ttt tgt gca cct tgc atc ccc aac act
401 A P Y N V M V L I N T F C A P C I P N T
1261 gtg tgg aca att ggt tac tgg ctt tgt tac atc aac agc act atc aac cct gcc tgc tat
421 V W T I G Y W L C Y I N S T I N P A C Y
1321 gca ctt tgc aat gcc acc ttc aag aag acc ttt aaa cac ctt ctg atg tgt cat tat aag
441 A L C N A T F K K T F K H L L M C H Y K
1381 aac ata ggc gct aca agg taa
461 N I G A T R *

```

En rojo se representan las regiones extracelulares, en azul las regiones de membrana y en negro las regiones intracelulares. El segundo bucle extracelular esta resaltado en negrita.

5.5 Proteínas P de *Trypanosoma cruzi*.

```

TcP2α -----MSMKYLAAYALASLNKPTPGAADVEAICKACGIEVESDALSFVMESIAGRSVA
TcP2β -----MKYLAAYALVGLSGGTPSKSAVEAVLKAAGVPVDPSRVDALFTEFAGKDFD
TcP1α ----MSSKQQLACTYAAALILADSGK-TDMSLLKVTKAAGVDVSKGMASAFASILKNVDIN
TcP1β MADKVEANDTLACTYAAALMLSDAGLPITAEGIEAACVAAGLKVRNTLPVIFARFLEKKPLE
TcP0 -----SITDDVVEKYLLEGISNVAALSLGAGIPTAATLPHMIMDAFKTLLGASVATEYEFD

TcP2α TLVAEGAAKMSAVAVSAAPAAGDAAAPAAAAGGAAAPAAADAKKE-EEEEDDDMGFGLFD
TcP2β TVCTEGKSKLVGGVTRPNAATASAPTAATAAASSGAAAPAATAE----EEEDDDMGFGLFD
TcP1α DVLS-----KVSFGGVAPAAGGATAAPAAAAAAPAAAAAKKE-EEEEDDDMGFGLFD
TcP1β TLFA-----AAAATAPAEGAAAPAAAGSAAPAAAAAGAPAKDTKEEEEEDDDMGFGLFD
TcP0 EFDGKN---LRKAALEGNLGGGAADAAAATDTGAAAAPAAAAEPE-EEDDDDDFGMGALF

```

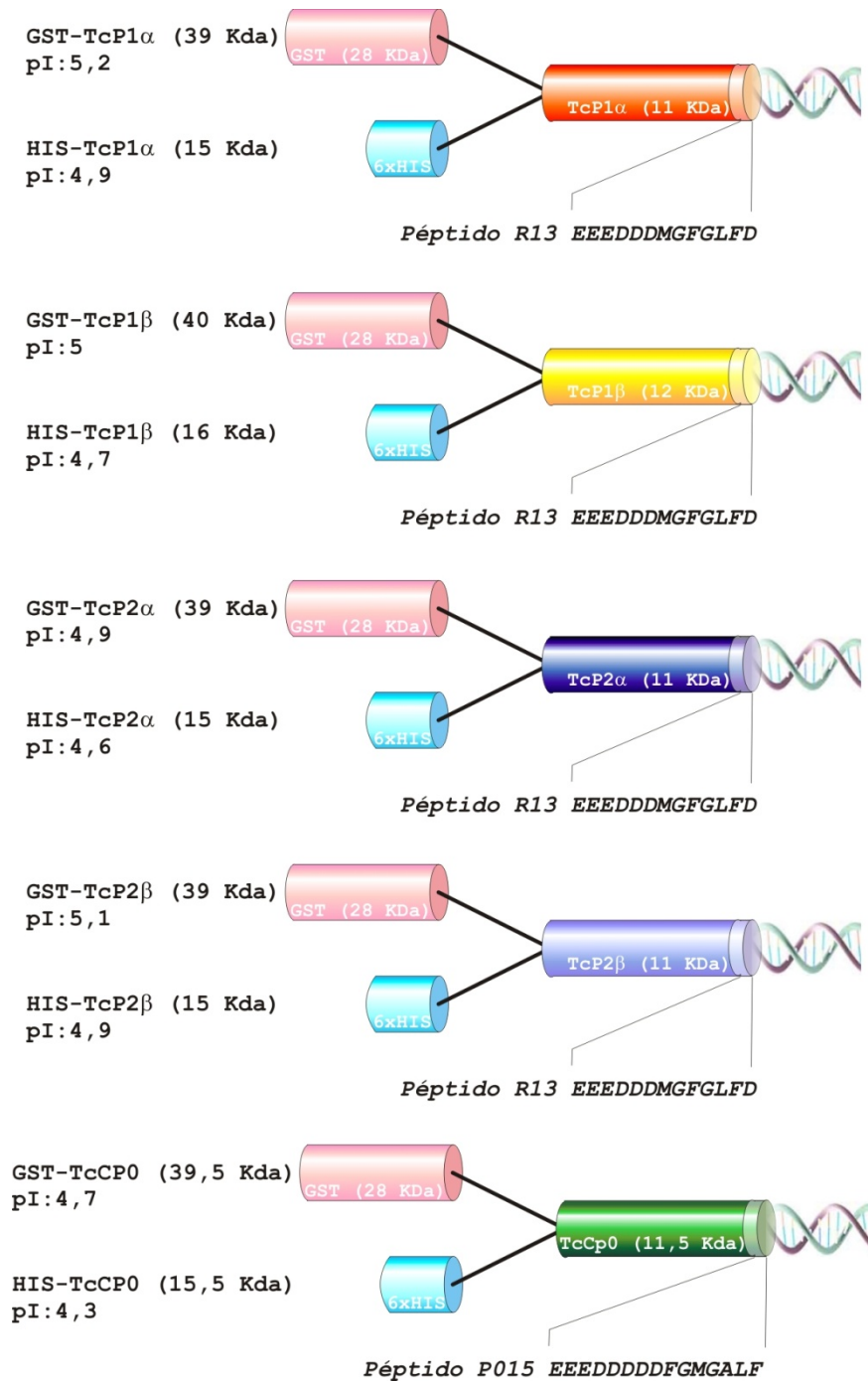
Alineamiento de las proteínas P de *Trypanosoma cruzi* realizado con el programa MEGA4.0. Los recuadros representan las zonas de interacción mapeadas con péptidos (TcP2β) o con proteínas truncadas (TcP0).

5.6 Secuencia de la Región C-terminal de los distintos protozoarios.

>TcP0	EDDDDDDFGMGALF	>EtP0	EEEDGDMGFSLFD
>TcP1 α	EEEDDDMGFGLFD	>EtP1	EEEDADMGFSLFD
>TcP1 β	EEEDDDMGFGLFD	>EtP2	EEEDGDMGLSLFD
>TcP2 α	EEEDDDMGFGLFD	>TaP0	EEEDDDLGFSLFD
>TcP2 β	EEEDDDMGFGLFD	>TaP1	EEEDDMGFSLFD
>TvP0	EEEDDDDFGMGALF	>TaP2	EEEDDMGFSLFD
>TvP1 α	EEEDDDMGFGLFD	>PbP0	EEEDGFMGFGMFD
>TvP1 β	EEEDDDMGFGLFD	>PbP1	EEEDDDLGFSLFG
>TvP2 α	EEEDDDMGFGLFD	>PbP2	EEEDDDLGFSLFG
>TvP2 β	EEEDDDMGFGLFD	>PcP0	EEEDGFMGFGMFD
>ToP0	EEEDDDDFGMGALF	>PcP1	EEEDDDLGFSLFG
>ToP1 α	EEEDDDMGFGLFD	>PcP2	EEEDDDLGFSLFG
>ToP1 β	EEEDDDMGFGLFD	>PkP0	EEEDGFMGFGMFD
>ToP2 α	EEEDDDMGFGLFD	>PkP1	EEEDDDLGFSLFG
>ToP2 β	EEEDDDMGFGLFD	>PkP2	EEEDDDLGFSLFG
>TbP0	EEEDDDDFGMGALF	>PfpP0	EEEDGFMGFGMFD
>TbP1 α	EEEDDDMGFGLFD	>PfpP1	EEEDDDLGFSLFG
>TbP1 β	EEEDDDMGFGLFD	>PfpP2	EEEDDDLGFSLFG
>TbP2 α	EEEDDDMGFGLFD	>EhP0	EEEDDFGGFGDLF
>TbP2 β	EEEDDDMGFGLFD	>EhP1	EAEDDFGGFGDLF
>LiP0	ESDEDDDFGMGGLF	>EhP2	EEEDDFGGFGDLF
>LiP1 α	EDADDDMGFGLFD	>DdP0	EEESDDDMGMGLFD
>LiP1 β	EEGDDDMGFGLFD	>DdP1	EEESDDMDKHVQD
>LiP2 α	EEADDDMGFGLFD	>DdP2	EEESDDDMGMGLFD
>LiP2 β	EEADDDMGFGLFD	>CpP0	EEEEGDLGFSLFD
>LmP0	ESDEDDDFGMGGLF	>CpP1	EEEEGDLGFSLFD
>LmP1 α	EDADDDMGFGLFD	>CpP2	EEEEGDLGFSLFD
>LmP1 β	EEGDDDMGFGLFD	>TpP0	EEEDDMGFSLFD
>LmP2 α	EEADDDMGFGLFD	>TpP1	EEEDDMGFSLFD
>LmP2 β	EEADDDMGFGLFD	>TpP2	EEEEGDLGFSLFD
>LbP0	ESEEDDFGMGALF	>HsP0	EEESDDMGFGLFD
>LbP1 α	EEADDDMGFGLFD	>HsP1	EEESDDMGFGLFD
>LbP1 β	EEGDDDMGFGLFD	>HsP2	EEESDDMGFGLFD
>LbP2 α	EEADDDMGFGLFD	>ScP0	EEESDDMGFGLFD
>LbP2 β	EEADDDMGFGLFD	>ScP1 α	EEESDDMGFGLFD
		>ScP1 β	EEESDDMGFGLFD
		>ScP2 α	EEESDDMGFGLFD
		>ScP2 β	EEESDDMGFGLFD

El recuadro indica los residuos reconocidos por el scFv C5 en las proteínas P “chicas” de *Trypanosoma cruzi*.

5.7 Esquema de las proteínas P recombinantes utilizadas en SPR



Las fusiones a GST se realizaron en el vector pGEX y las fusiones a histidinas en el vector pRSET.

5.8 Estudio por SPR de las interacciones entre las proteínas P. Los valores corresponden a los K_d (M) o a los IC_{50} cuando se indica.

Solución	Chíp CM5				
	CPo	P2β	P1α	P1β	P2α
scFv C5 (C+)	+	+	+	+	+
CPo	1×10^{-5}	1×10^{-7}	6×10^{-7}	6×10^{-7}	1×10^{-6}
P2β	3×10^{-6}	6×10^{-7}	1×10^{-5}	1×10^{-5}	1×10^{-5}
P1α	9×10^{-6}	1×10^{-6}	(-)	(-)	(-)
P1β	2×10^{-6}	8×10^{-7}	(-)	(-)	4×10^{-6}
P2α	1×10^{-5}	1×10^{-6}	(-)	9×10^{-6}	1×10^{-5}
EF2	7×10^{-6}	6×10^{-8}	8×10^{-8}	3×10^{-7}	1×10^{-7}

Pep 1 P2β	(-)	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-4}	(-)
Pep 5 P2β	1×10^{-5}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-4}	1×10^{-4}
Pep 10 P2β	1×10^{-4}	1×10^{-4}	1×10^{-4}	1×10^{-4}	1×10^{-4}

CPo-Δ2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
CPo-Δ5	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
P2β + CPo-Δ5	Inhibición				

EF2 + Pep1	$IC_{50} 4 \times 10^{-5}$	Inhibición	Inhibición	Inhibición
EF2 + Pep10	Inh 2 fase $IC_{50} 2 \times 10^{-5}$	Aumento	Aumento	Inh 2 fase

EF2 + CPo-Δ2	(-)
EF2 + CPo-Δ5	$IC_{50} 2 \times 10^{-6}$
EF2 + P015	(-)

P2β + P1α	Inhibición	3X	Inhibición	Inhibición	3X
P2β + P1β	Inhibición	3X	3X	3X	3X
P2β + P2α	Inhibición	Inhibición	Inhibición	Inhibición	Inhibición
P2β + CPo	3X	3X	3X	3X	3X
CPo + P1α	3X	3X	Inhibición	3X	3X
CPo + P1β	3X	3X	3X	Inhibición	3X
CPo + P2α	3X	Inhibición	Inhibición	Inhibición	Inhibición
P1α + P1β	3X	3X	(-)	(-)	--
P1α + P2α	3X	Inhibición	(-)	--	--
P1β + P2α	3X	Inhibición	(-)	Inhibición	Inhibición

5.9 Esquema de los vectores utilizados para la expresión condicional de los intrabodies en *Trypanosoma brucei* y su funcionamiento.

