Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Anticuerpos de llama de dominio único como inhibidores intracelulares de una toxina bacteriana

Alzogaray, Vanina A.

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Alzogaray, Vanina A.. (2010). Anticuerpos de llama de dominio único como inhibidores intracelulares de una toxina bacteriana. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Alzogaray, Vanina A.. "Anticuerpos de llama de dominio único como inhibidores intracelulares de una toxina bacteriana". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológica

Anticuerpos de llama de dominio único como inhibidores intracelulares de una toxina bacteriana

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

Lic. Vanina A. Alzogaray

Director de tesis: Dr. Fernando A. Goldbaum

Consejero de Estudios: Dr. Luis Ielpi

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir

Buenos Aires, 2010

A mis viejos, Norma y Pato
A Mauge y Mariano
A Inés
A mis amigos

Quiero agradecer profundamente:

A mi director de tesis Fernando Goldbaum, por haberme abierto las puertas del lab. 304 cuando no tenía idea de lo que era una "pipeta". Por la enseñanza, la paciencia, la libertad en los experimentos, por los viajes y por la confianza. Pero por sobre todo, por ser una muy buena persona.

A mi gran amiga Paula, una persona increíble, quien logra hacerme ver la vida desde un lugar maravilloso. Por estar siempre, por cuidarme, por el aguante y por mucho más. Gracias totales por la inmensa ayuda en la tesis.

A tres grandes amigos, Hernán, Sebas y Gastón, fenómenos totales en todos sentidos! Gracias por estar siempre y por el aguante!....al genio Hernán, por la ayuda en las figuras!!!

A mis amigas de la vida, Andre, Ceci, Fer, Adri, Milva, Bren y Marina!, gracias por estar siempre. Andre y Ceci, por bancarme y acompañarme tan de cerca en todo esto!. A todos mis sobrinos, a quienes adoro muchísimo: Rocío, Lautaro, Agustín, Francisco, Santino, Agostina, Juan y Mateo. Al que viene en camino!

A mi familia, mis viejos Norma y Pato, por "marchar" a mi lado y por estar siempre a mi lado. A mis hermanos, Mauge y Mariano, a quienes adoro mucho!
A Mauge, porque además de una hermana genial es una gran amiga.
A Xime, porque además de cuñada es una gran amiga.

A toda mi flia y más amigos de mi querido Tres Lomas.
A grandes amigos de La Plata. A Camu!

A July Maggini y Lu, por hacerme sentir parte de su familia.
July, gracias por aguante!

A mi reina, Victoria, por lo feliz que me hace!

A Marcos (piki-puky) por acompañarme, por estar siempre y por el aguante.
A Javi, gracias por estar!

A mis compañeros del lab 304, gente maravillosa que me ayuda y me banca todos los días de mi vida: Naty, Pau, Jime, Mariela, Gise, Vane, Gaby, Inés, Ana, Marisol, Gastón, Hernán y Victor.
A los que pasaron por el 304: Pato, Lau Z., Marie U., Lau C., Sebas K., Guille C., Meli L.B., Juancito A., Daiana N. y Sergio V.

A los vecinos del 303(d) y del 302. A los chicos del lab. 204

A Mariana H. , Sabri M. dos grandes amigas. Gracias por estar!

A dos grandes personas del tercer tercer piso, Guille Lanuza y Carlitos Labriola, por las charlas compartidas y por ese buen humor que los caracteriza y que tan bien nos hace!. A Guille por la ayuda en las figuras!

A todos las personas que integran la Fundación Instituto Leloir. Gracias por la ayuda, y la por la buena predisposición de todos.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA.
Al departamento de Química Biológica y a la Comisión de Doctorado quienes me solucionaron inconvenientes de la mejor manera posible.

A la Fundación YPF por financiar gran parte de mi doctorado. A la Fundación Instituto Leloir por financiar unos meses mi doctorado para finalizar la tesis.

A las colaboraciones: al Dr. Fritz Kock-Nolte y a la Dra. Eleonora García Véscovi. A ambos grupos de investigación, muchas gracias por el trato increíble que tuvieron hacia a mí.

A la gente que colaboro con este proyecto: Guillermo Vila Melo y Gonzalo Perez Zabala por la ayuda en las inmunizaciones. A Mariela U, Pau B. y Andrés Aguirre por la ayuda con los experimentos.

Al jurado, quién acepto leer y evaluar esta tesis: a la Dra. Angeles Zorreguieta, al Dr. Emilio Malchiodi y al Dr. Alberto Fossati. Muchas gracias!

Anticuerpos de llama de dominio único como inhibidores intracelulares de una toxina bacteriana

Resumen

Los camélidos poseen anticuerpos que carecen de cadena liviana y de una fracción de la cadena pesada. El sitio de unión al antígeno está formado por el dominio variable de la cadena pesada, denominado VHH. Su largo CDR3 resulta especialmente apto para la unión a epitopes cóncavos, como los sitios activos enzimáticos. *Salmonella tyhimurium* es una bacteria intracelular patógena que posee una ADP-ribosiltransferasa denominada SpvB, esencial para la virulencia. SpvB induce la depolimerización de los filamentos de actina, llevando a la muerte celular. En este trabajo de Tesis, mostramos la generación de una biblioteca de expresión en fagos, a partir de linfocitos de llamas inmunizadas con el dominio catalítico de SpvB, para obtener VHHs que reconocen a SpvB e inhiben su actividad enzimática. Los clones de VHHs anti-SpvB se secuenciaron y clasificaron de acuerdo al CDR3. Fueron seleccionados 5 clones, los cuales se expresaron y purificaron como proteína recombinante. Mediante dos ensayos independientes, mostramos que estos VHHs inhiben a SpvB. Uno de los ensayos nos permitió cuantificar la relación molar VHH:SpvB para lograr un 100% de inhibición identificando así a VHH5, que inhibe a SpvB en relación equimolar. Se transfectaron macrófagos con VHH5 y se infectaron con *Salmonella typhimurium.* El análisis de las células por microscopía de fluorescencia mostró claramente que VHH5 expresado en el interior celular, tiene la capacidad de proteger su citoesqueleto. Por otro lado, mediante la translocación de SpvB al citoplasma, realizamos un ensayo en células transfectadas con VHH5 para discriminar el efecto de SpvB de otros factores de virulencia. Los resultados mostraron que la expresión intracelular de VHH5 protege el citoesqueleto del efecto citopático causado por SpvB. Estos resultados constituyen una prueba de concepto sobre el uso de anticuerpos de dominio único de llama para la inhibición de enzimas intracelulares.

Palabras claves: anticuerpos de dominio único, intrabodies, inhibidores enzimáticos, Salmonella, SpvB.

Single-domain antibodies as intracellular inhibitors of a bacterial toxin

Abstract

Camelids produce unusual antibodies composed only of heavy chains. The antigen combining site of these antibodies is formed solely by the heavy-chain variable domain (VHH). Their CDR3s form long finger-like extensions that can protrude into cavities on antigens, e.g. the active site crevice of enzymes. *Salmonella tyhimurium* are pathogenic intracellular bacteria that express an ADP-ribosyltransferase called SpvB, which is essential for *its* virulence. SpvB induces the depolymerization of actin filaments leading to cell death. In the present work, we show the generation of an expression phage library from SpvB-immunized llama lymphocytes to obtain VHHs that inhibit SpvB activity. SpvB-recognizing VHHs clones were sequenced and classified according to their CDR3. Five independent clones were isolated, and the VHH proteins codified by them were expressed and purified. All VHHs were able to inhibit SpvB in two different assays. We quantitatively analyzed the inhibition of SpvB activity by fluorescence using pyrene-labelled actin as substrate. VHH5 completely inhibited SpvB activity in an equimolar ratio. Furthermore, VHH5 was subcloned in a vector for eukaryotic expression. As such, eukaryotic cells were transfected and cells expressing VHH5 were infected with *Salmonella typhimurium* to test their effect on virulence. Fluorescence microscopy analyses clearly showed that VHH5, when expressed as an intrabody, effectively protected cells from wild type SpvB-expressing strains of *Salmonella*. Transfected cells were also protected against the cytotoxic activity of a translocation competent chimeric SpvB-C2 toxin. These results constitute a proof of principle of the use of single domain antibodies for the specific intracellular inhibition of normal or pathogenic enzymatic functions.

Key words: Single-domain antibodies, intrabodies, enzymatic inhibitors, *Salmonella*, SpvB.

Parte de los resultados mostrados en esta Tesis dieron lugar a la siguiente publicación:

Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity.
Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, Cauerhff A, Danquah W, Rissiek B, Scheuplein F, Schwarz N, Adriouch S, Boyer O, Seman M, Licea A, Serreze DV, Goldbaum FA, Haag F, Koch-Nolte F. *Med Microbiol Immunol*. 2009 Aug;198(3):157-74. Review.

También hemos publicado el siguiente trabajo, estrechamente relacionado con esta Tesis:

Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 *in vivo*. Koch-Nolte F, Reyelt J, Schössow B, Schwarz N, Scheuplein F, Rothenburg S, Haag F, Alzogaray V, Cauerhff A, Goldbaum FA. FASEB J. 2007 Nov;21(13):3490-8.

El siguiente trabajo será próximamente enviado para su publicación en FASEB J:

Single domain llama antibodies as specific intracellular inhibitors of SpvB, the actin ADP-ribosylating toxin of *Salmonella typhimurium*
Alzogaray Vanina, Danquah Welbeck, Aguirre Andrés, Urrutia Mariela; Berguer Paula; García Véscovi Eleonora; Haag Friedrich; Koch-Nolte Friedrich and Goldbaum, Fernando A.

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

Amp: ampicilina

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

CDR: región determinante de la complementariedad

CH: dominio constante de la cadena pesada

CI: cuerpos de inclusión

CL: dominio constante de la cadena liviana

DO: densidad óptica

Fab: fragmento de unión al antígeno

Fc: fragmento cristalizable

FR: framework region; región de la cadena variable ubicada entre los CDRs

Fv: fragmento variable

hcIgG: inmunoglobulina G de cadena pesada

HEL: lisozima de huevo de gallina

IFA: adyuvante incompleto de Freund

Ig: Inmunoglobulina

Kan: kanamicina

KDa: kilodalton

mAb: anticuerpo monoclonal

MBP: proteína de unión a maltosa (maltose binding protein)

MOI: multiplicidad de infección (multiplicity of infection)

ON: toda la noche

OPD: ortofenildiamina

pb: pares de bases

PBS: buffer de fosfato salino

PBST: PBS + Tween

PM: peso molecular

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

scFv: fragmento variable de cadena única

sdAb: anticuerpo de dominio único

SDS-PAGE: gel de poliacrilamida desnaturalizante

SFB: suero fetal bovino

spv: plásmido de virulencia de *Salmonella*

spvB: gen que codifica para SpvB

Tet: Tetraciclina

VH: dominio variable de la cadena pesada

VHH: región variable de la cadena pesada en hcIgG

VL: dominio variable de la cadena liviana

V-NAR: anticuerpo de cadena pesada de peces cartilaginosos

INTRODUCCIÓN **1**

Los Anticuerpos 2

Figura 1. Representación esquemática de una IgG convencional y fragmentos que se pueden obtener a partir de la misma 6

Anticuerpos de Cadena Pesada de Camélidos 9

Figura 2: Distintos isotipos de IgG de camélidos 11

Aplicaciones de VHHs 21

SpvB: Una toxina crucial del patógeno *Salmonella Typhimurium* 25

OBJETIVOS **30**

MATERIALES Y MÉTODOS **32**

1. Reactivos 33

1.1. Soluciones, Medios y Buffers 33

2. Cepas de *E. coli* 33

3. Líneas celulares 34

4. Primers 34

5. Clonado, expresión y purificación de SpvB 35

5.1. Clonado 35

5.2. Expresión 35

5.3. Purificación 36

5.4. Biotinilación 36

6. Actividad enzimática de SpvB: Radioactividad y Fluorometría 37

6.1. Ensayo de Radioactividad 37

6.2. Ensayo de Fluorometría 38

7. Obtención de IgGs de llama y VHHs recombinantes anti-SpvB 38

7.1. Inmunizaciones 38

7.2. Evaluación de la respuesta policlonal 39

7.3. Construcción de una biblioteca de expresión en fagos de VHHs de llama 39

Figura 3: Secuencia del sitio de clonado y regiones flanqueantes del vector para expresión en fagos pHEN2 41

7.4. Selección de fragmentos VHH anti-SpvB en solución 43

7.5. Evaluación del método de elución 44

8. Secuenciación de clones de interés 45

8.1. Expresión y purificación de VHHs solubles 45

9. Ensayos *in vitro* de la inhibición enzimática de SpvB: Radioactividad y Fluorometría 46

9.1. Radioactividad 46

9.2. Fluorometría 47

10. Expresión de VHHs en células eucariotas 48

10.1. Clonado de VHH5 y VHHNR 48

10.2. Análisis de la expresión de VHHs: Western Blot e Inmunofluorescencia 50

11. Infección de macrófagos con *Salmonella spp* y *Salmonella* mutante 51

12. Ensayos citopáticos utilizando la quimera C2IN-C/SpvB 52

13. Ensayos citopáticos utilizando la quimera C2IN-C/SpvB y VHH5 como proteína 53

RESULTADOS Y CONCLUSIONES **54**

1. Producción del dominio C-terminal de la enzima SpvB 55

Figura 4. Purificación de SpvB 56

2. Medición de la actividad enzimática de SpvB 57

Figura 5. Representación esquemática de la actividad enzimática de SpvB 57

Figura 6: Autorradiografía. ADP-ribosilación de la molécula de actina 58

Figura 7. Autorradiografía. ADP-ribosilación de la molécula de actina en diferentes condiciones 59

Figura 8. Fluorometría. Inhibición de la polimerización de actina por SpvB 61

Figura 9: Fluorometría. Inhibición de la polimerización de actina con diferentes cantidades de SpvB 62

3. Producción de fragmentos de anticuerpos de llamas: VHHs 63

Figura 10. Esquema representativo de la generación de VHHs específicos anti-SpvB 63

3.1. Generación de la biblioteca de expresión en fagos de VHHs 64

Figura 11. Titulación del suero inmune de la llama N° 9208 en su reactividad por SpvB 64
Figura 12. Secuenciación de clones provenientes de la biblioteca de fagos 66
3.2. Selección de fragmentos VHHs anti-SpvB 67
Tabla 1. Fracción de bacteriófagos incubados ("input") y recuperados ("output") luego de cada ronda de selección 68
Figura 13. Enriquecimiento de fagos que reconocen a SpvB durante consecutivas rondas de selección 69
Tabla 2. Porcentaje de clones específicos obtenidos en el ELISA de fagos 71
4. Caracterización de VHHs y análisis *in vitro* de la inhibición enzimática de SpvB 71
Figura 14. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de 20 clones elegidos al azar 72
Figura 15. Purificación de VHHs seleccionados 75
Figura 16. Radioactividad. Inhibición de la ADP-ribosilación de la molécula de actina mediada por SpvB a través de VHHs específicos 77
Figura 17. Radioactividad. Inhibición de SpvB por diferentes cantidades de VHH 79
Figura 18. Fluorometría. Inhibición de la ADP-ribosilación de actina mediada por SpvB a través de VHHs específicos 82
Figura 19. Perfil del porcentaje de inhibición de SpvB en función de la relación molar VHH:SpvB 84
5. Expresión de VHHs en el interior de células eucariotas 85
Figura 20. Expresión de los VHHs en células eucariotas 86
Figura 21. Expresión de VHH5-His y VHHNR-His en células eucariotas 87
Figura 22. Expresión de MBP-VHH5 en tres líneas celulares 88
6. Ensayos de infección con *Salmonella typhimurium* y *Salmonella* mutante 89
Figura 23. Infección de macrófagos RAW 91
7. Ensayos de translocación con la toxina de fusión C2IN/C-SpvB al interior celular 92
Figura 24. Morfología de células Vero incubadas con la toxina de fusión C2IN/C-SpvB 94
Figura 25. Incubación de VHH5 con la toxina de fusión C2IN/C-SpvB 94
Figura 26. Translocación de C2IN-C/SpvB al interior de células transfectadas con VHH5 96

CONCLUSIONES GENERALES **98**

DISCUSIÓN **100**

BIBLIOGRAFÍA **112**

INTRODUCCIÓN

LOS ANTICUERPOS

La función esencial del sistema inmunológico es generar una respuesta efectiva contra los antígenos externos mientras evita reaccionar deletéreamente hacia los antígenos propios. El sistema inmunológico de los vertebrados comprende al sistema inmune innato y al sistema inmune adaptativo. El sistema inmune innato constituye la primera línea de defensa contra los patógenos, y es capaz de reconocer a un número limitado de estructuras moleculares de los patógenos. El mismo está filogenéticamente conservado y está presente en casi todos los organismos multicelulares, en muchos de los cuales es el único sistema inmunológico (1). La respuesta inmune adaptativa, a diferencia de la innata, es capaz de modificarse frente a exposiciones repetidas a un antígeno. El sistema inmune adaptativo está constituido por los clásicamente llamados componente celular y componente humoral. La respuesta inmune humoral se basa en la generación de anticuerpos (Inmunoglobulinas, Ig) por los linfocitos B. Las Igs son proteínas que funcionan como adaptadoras entre el agente externo al cual reconocen específicamente y las células o moléculas efectoras de la respuesta contra ese agente (2).

Los anticuerpos están formados por regiones constantes y regiones variables. Estas últimas tienen una gran variabilidad de secuencia; en el ser humano, aproximadamente 10^9 tipos de regiones variables diferentes están presentes en un momento dado (3). Siendo esta región la involucrada en el reconocimiento del antígeno, se cuenta virtualmente con anticuerpos contra cualquier posible epitope (determinante antigénico) existente. Esta variabilidad surge de mecanismos combinatoriales y de procesos de mutación (2)

Cada linfocito B realiza en estadios tempranos de su ontogenia, un armado de la región variable del anticuerpo, por rearreglos en su ADN que recombinan los llamados mini-genes. Este proceso combinatorial se realiza de manera independiente en 2 regiones del genoma, una que corresponde a los genes de la cadena pesada de

las Igs, combinando un gen V, un gen D y un gen J, y otra que corresponde a la cadena liviana, donde no hay mini-genes D, y por lo tanto, posee un menor número de combinaciones. Durante la unión física de estos genes, se introducen nucleótidos al azar, lo cual aumenta aún más la variabilidad al cambiar el marco de lectura. Con cada cadena, durante el proceso de recombinación, se incluye la región constante correspondiente. Estas dos cadenas polipeptídicas se unen, una vez expresadas, en el retículo endoplásmico del linfocito B, originando la molécula de anticuerpo. Las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena liviana (VH y VL, respectivamente) conforman en conjunto el fragmento variable (Fv). Los linfocitos con rearreglos productivos exponen la molécula de anticuerpo en la superficie celular, y aquellos linfocitos que, en el contexto de los órganos linfáticos periféricos reconocen antígenos propios, sufren un proceso de selección negativa. Los clones de linfocitos que pasan el proceso de selección tienen la capacidad de proliferar ante la presencia del antígeno reconocido por su anticuerpo de superficie. Al producirse esta unión, en presencia de estímulos provenientes de los linfocitos T, se genera la expansión de dichos clones, y su diferenciación hacia células productoras de anticuerpos –plasmocitos– que liberan grandes cantidades de anticuerpos solubles a la circulación sanguínea y linfática. Además, durante las divisiones celulares se introducen mutaciones en ciertos puntos de la región variable, principalmente en las zonas que conforman los lazos o "loops" de contacto con el antígeno, llamadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR: complementarity-determining regions). Este fenómeno se conoce como hipermutación somática y aumenta la variabilidad, alterando la afinidad de los anticuerpos. Los anticuerpos resultantes, nuevamente son seleccionados en función de su reactividad contra el antígeno, proceso denominado selección clonal, enriqueciendo a la población con los clones con mayor afinidad por el antígeno. Este proceso conjunto de selección clonal e hipermutación somática se conoce como maduración de la afinidad y permite generar anticuerpos altamente específicos, con afinidades que llegan a órdenes de 10^{10} M^{-1}.

Los linfocitos B maduros coexpresan en la membrana Igs de isotipo IgM e IgD. Los linfocitos B activados por el contacto antígeno-anticuerpo y otras señales, realizan un cambio o "switch" de isotipo. Los primeros anticuerpos secretados en una respuesta humoral son siempre IgM, pero a medida que progresa la respuesta se producen anticuerpos de igual especificidad antigénica pero de diversos isotipos. Estos anticuerpos se generan por cambios en la región constante de la cadena pesada, que inicialmente en las IgM es de tipo μ. Luego, se produce el cambio hacia cadenas de tipo γ, generándose los anticuerpos de tipo IgG. La respuesta inmune humoral está mayormente mediada por anticuerpos de tipo IgG. Concomitantemente, ocurre el proceso de maduración de la afinidad.

Normalmente, los anticuerpos IgG de mamíferos son heterotetrámeros, formados por dos cadenas pesadas y dos livianas. Las cadenas pesadas están formadas por tres dominios constantes (CH1, CH2 y CH3) y un dominio variable (VH) y están unidas entre si por la región constante mediante puentes disulfuro entre cisteínas conservadas. Las cadenas livianas están formadas por un solo dominio constante (CL) y un dominio variable (VL). La cadena pesada y la cadena liviana están unidas por un puente disulfuro entre los dominios CH1 y CL e interacciones no covalentes. La región variable de los anticuerpos, estructuralmente consiste en un barril de hojas β. La estructura de cada dominio variable se encuentra estabilizada por puentes disulfuro entre cisteínas conservadas. El barril de hojas β está constituido por el armazón o Framework (FR: framework region) y por los CDRs. Los 6 CDRs -3 de cada cadena- forman la superficie de contacto con el antígeno, la cual también puede incluir residuos de las regiones FR. En la mayoría de los casos, los CDR3, y particularmente el CDR3 de la cadena pesada, forman la mayor parte de los contactos con el antígeno (4).

Siendo los CDR loops relativamente flexibles, la superficie de contacto puede adoptar geometrías diversas. Sin embargo, ciertas generalidades han surgido del estudio de diferentes complejos antígeno-anticuerpo. Los primeros estudios estructurales fueron realizados con anticuerpos anti-haptenos y la

complementariedad estructural entre las moléculas es tal, que se ajusta a un modelo de "llave-cerradura". En el caso de antígenos más complejos, las geometrías adoptadas varían. Para antígenos intermedios, como polipéptidos y carbohidratos, se observa una topología de tipo surco, mientras que para proteínas, la superficie es principalmente plana (5). En estos casos, la metáfora de "llave-cerradura" no se aplica, y la superficie de contacto suele mostrar cambios en la orientación de cadenas laterales con respecto a la estructura del anticuerpo libre, en un marco compatible con procesos de ajuste inducido (4) o de estabilización de confórmeros preexistentes (4, 6). Tanto la flexibilidad de los CDRs, como la presencia de moléculas de agua en la superficie de contacto, dificultan la predicción de la complementariedad entre un anticuerpo y un antígeno determinado mediante el estudio de sus topologías (6). En el caso de antígenos peptídicos, se ha visto que la maduración de la afinidad conlleva cambios que aumentan la rigidez de los CDRs y, en antígenos proteicos, los cambios aumentan la complementariedad y el área de la superficie de contacto con el epitope (7-8). Estos hallazgos indican que la maduración de la afinidad está relacionada con un ajuste fino de la superficie de interacción.

Uno de los principales objetivos de la ingeniería de anticuerpos es minimizar el tamaño de las Igs para el desarrollo de drogas y, de esta manera, utilizar los fragmentos de anticuerpos como herramientas terapéuticas (9). Un importante avance fue el desarrollo de anticuerpos monoclonales obtenidos de ratones inmunizados (10). Sin embargo, estos anticuerpos presentan ciertas características que dificultan su aplicación terapéutica (11). Los anticuerpos monoclonales murinos son inmunogénicos en humanos y pueden también generar reacciones alérgicas, por lo tanto su administración repetida a pacientes está limitada. Por otro lado, su gran tamaño y complejidad constituyen otras limitaciones, especialmente para la producción (12).

Posteriormente se desarrollaron a partir de la Ig de 150 KDa bivalente intacta, pequeños fragmentos de unión al antígeno tales como el Fab y el Fv. El Fab, de 50 KDa, está formado por los dominios VH, VL y los dominios constantes CH1 y CL. El Fv, de 25 KDa, está formado por los dominios variables de ambas cadenas. Los dominios del fragmento Fv se disocian fácilmente y requieren el agregado de un linker o puentes disulfuro para vincular ambas cadenas, formando así un fragmento Fv de única cadena (scFv: single chain Fv) **Figura 1**.

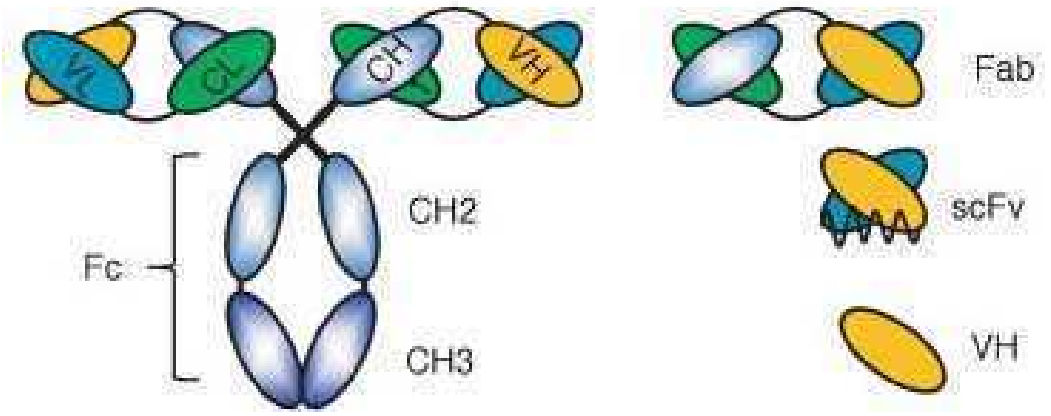


Figura 1. Representación esquemática de una IgG convencional y de los fragmentos que se pueden obtener a partir de la misma.

También pudieron ser aislados el VH y el VL como dominios únicos monoméricos denominándose anticuerpos de dominio único (sdAb: single domain antibody) (9, 11-14).

Los avances tecnológicos en el diseño de fragmentos de anticuerpos *in vitro* de alguna manera intentan imitar las estrategias de selección empleadas por el sistema inmune. A partir de las bibliotecas de expresión es posible aislar muchos anticuerpos diferentes contra virtualmente cualquier antígeno. Una de las herramientas más empleadas a partir de bibliotecas es el uso de display en fagos utilizando un

bacteriófago filamentoso de *E. coli*. (15). Mediante esta técnica, los fragmentos de anticuerpos son expuestos sobre la superficie del fago y los mismos pueden ser seleccionados por unión al antígeno. Luego, estos fagos son utilizados para infectar bacterias donde los fragmentos de anticuerpos son expresados (16-17). Una de las más exitosas aplicaciones de esta técnica de display en fagos ha sido el aislamiento de anticuerpos monoclonales a partir de grandes bibliotecas de fagos (17). A partir del ADN genómico y del ADNc pueden amplificarse repertorios grandes y diversos de Fab, scFv o sdAbs para la construcción de bibliotecas y posterior seleccLa ingeniería genética de display en fagos emula al linfocito B expresando al anticuerpo sobre su superficie, teniendo a su vez el fenotipo y genotipo de la Ig (18). ión en fagos.

Se pueden desarrollar tres tipos de bibliotecas de fagos: inmune, naive y sintéticas. En las bibliotecas inmunes, el repertorio de fragmentos de anticuerpos puede ser obtenido a partir de animales inmunizados (19), o de pacientes infectados. La ventaja que tiene el desarrollo de este tipo de bibliotecas es la obtención de una gran proporción de anticuerpos específicos y en general con elevada afinidad hacia un antígeno determinado (16). Se han construido bibliotecas inmunes a partir de especies diferentes, entre las cuales se incluyen ratones (19,21), humanos (22-23), gallinas (24-25), conejos (26) y camélidos (27). Las bibliotecas naive son obtenidas a partir del ARNm de IgM de animales no inmunizados. También se pueden diseñar bibliotecas a partir de un repertorio naive de ARNm de IgD. La afinidad de los anticuerpos seleccionados a partir de este tipo de bibliotecas es proporcional al tamaño de la misma; por ejemplo, para una biblioteca de tamaño $3x10^7$ clones se logran afinidades en el orden de 10^{6-7} M^{-1} (28-29). Por último, las bibliotecas sintéticas son construidas artificialmente por ensamblado *in vitro* de los segmentos de genes V y los segmentos de genes D-J. Muchas de estas bibliotecas son diseñadas a partir del CDR3 de la cadena pesada, introduciendo variaciones mediante síntesis al azar. Eventualmente pueden obtenerse anticuerpos con afinidades en el orden nanomolar a partir de este tipo de bibliotecas (16). Sin embargo, deben analizarse previamente a

la construcción de la biblioteca ciertas características de los fragmentos a sintetizar, como por ejemplo solubilidad, estabilidad, etc. Esta estrategia ha sido aplicada con éxito para insertar loops variables en proteínas no derivadas de Ig tales como tetranectinas, dominios de proteína A y lipocalinas (11). Otro método que ha sido descripto es el display y selección en ribosomas, en los cuales las proteínas son totalmente traducidas *in vitro* (30-31).

Las cadenas pesadas y los dominios VH son capaces de unirse al antígeno aún sin la presencia de cadenas livianas, como sucede naturalmente en camélidos. Sin embargo, las estructuras de los complejos antígeno-anticuerpo indican que son importantes las interacciones que ambos dominios hacen con el antígeno, teniendo el dominio VL el rol de otorgar diversidad estructural (32-35) por ejemplo incrementando la superficie de interacción con el antígeno. Se hicieron bibliotecas combinando a los dominios VH con un dominio VL proveniente de un único gen (36-37). Dependiendo de la técnica utilizada para realizar esta combinación, se obtendrán diferentes diversidades estructurales y tamaños de repertorios.

Existe una diversidad de métodos de selección para aislar los fagos (clones) que se unen específicamente al antígeno, de aquéllos que no se unen. Estos incluyen el antígeno inmovilizado sobre una superficie sólida, columnas o biosensor (19, 29, 38), selección utilizando el antígeno biotinilado (39), sobre células procariotas (40) o células eucariotas (23), selección sustractiva usando procedimientos de sorting (41), enriquecimientos sobre tejidos o piezas de tejidos (42) y utilizando animales vivos (43).

El tamaño de las bibliotecas combinatoriales de fragmentos Fv o scFv debe ser del orden de 10^{10} a 10^{11} clones, ya que no todos los dominios VH se combinan eficientemente con un dado dominio VL y viceversa. La interfaz VH:VL contiene muchos aminoácidos variables, lo que restringe la posibilidad estructural de combinaciones posibles. Por ello, para lograr anticuerpos específicos con afinidades

altas, se debe aumentar mucho la diversidad combinatorial, es decir el tamaño de la biblioteca. Para un laboratorio estándar en el uso de técnicas de biología molecular, lograr bibliotecas de ese tamaño constituye un desafío mayúsculo. Este hecho es una de las limitaciones más importantes para el uso extendido de esta técnica (12).

En algunos peces cartilaginosos, como los tiburones, existen anticuerpos naturales formados únicamente por cadenas pesadas, lo cual permitió aislar sdAb, denominándose a estos fragmentos V-NAR (11, 44-45). En el año 1993 se descubrieron los anticuerpos de cadena pesada de camélidos (46), surgiendo así una interesante alternativa para el desarrollo de fragmentos de unión al antígeno de pequeño tamaño.

ANTICUERPOS DE CADENA PESADA DE CAMÉLIDOS

Los camélidos son una familia de mamíferos artiodáctilos (flia. *Camelidae*, orden *Artiodactyla*) pertenecientes al suborden Tylopoda, de los cuales actualmente existen tres géneros (*Lama, Vicugna, Camelus*). La diferenciación y especiación de estos animales ha sido producto de un largo y complejo proceso evolutivo de millones de años. Las especies actuales tuvieron su origen en América del Norte en el Eoceno tardío, hace unos 40 millones de años. Algunos grupos migraron a través del Estrecho de Bering desde América del Norte a Eurasia, extendiéndose por toda Europa, África y China (camellos). Por otro lado, otros grupos, pasando por el Istmo de Panamá, invadieron las planicies y pampas de América del Sur (llamas y vicuñas) (47). Los camélidos poseen gran importancia económica debido al uso de su lana, piel y fibra, y como fuente de alimento y de transporte en ambientes deshabitados por el hombre como es el desierto de Gobi. En los últimos 15 años el sistema inmunológico de los camélidos también ha sido un tema de gran interés. En el año

1993, pudieron detectarse en el suero de camélidos, mediante cromatografía de afinidad sobre proteína A y proteína G, tres fracciones de IgG: una correspondiente a la IgG1 heterodimérica con una cadena pesada de 50 KDa y una liviana de 30 KDa, y dos fracciones homodiméricas de 45 KDa y 43 KDa correspondientes a las IgG2 e IgG3, respectivamente. Fue de gran sorpresa la aparición una única fracción en los isotipos IgG2 e IgG3, por lo tanto se planteó la hipótesis de que ambos carecían de cadenas livianas. Posteriormente, esta hipótesis pudo ser confirmada mediante el análisis del suero por columna de filtración molecular. Fue entonces a partir de estos resultados que se concluyó que los camélidos poseen, además de los anticuerpos IgG convencionales heterotetraméricos, al menos 2 isotipos de IgG homodiméricos que constan únicamente de cadenas pesadas (46). En estos anticuerpos, llamados IgG de cadena pesada (heavy chain IgG: hcIgG), se observan dos tipos de regiones constantes de cadena pesada, una con una región bisagra notoriamente más larga que la otra, lo que permitió distinguir la existencia de los isotipos IgG2 e IgG3. Las IgG convencionales únicamente constituyen el isotipo IgG1. En las hcIgG, el fragmento Fv queda formado únicamente por la región variable de la cadena pesada, y se denomina VHH (48-49) (**Figura 2).** Estudios comparativos sobre camélidos del viejo mundo (camellos) y del nuevo mundo (llamas y vicuñas) mostraron que las hcIgG componen el 50% de los anticuerpos presentes en el suero de camellos y que en las especies del nuevo mundo esa proporción es un poco menor, aproximadamente del 25%-45% (46, 50).

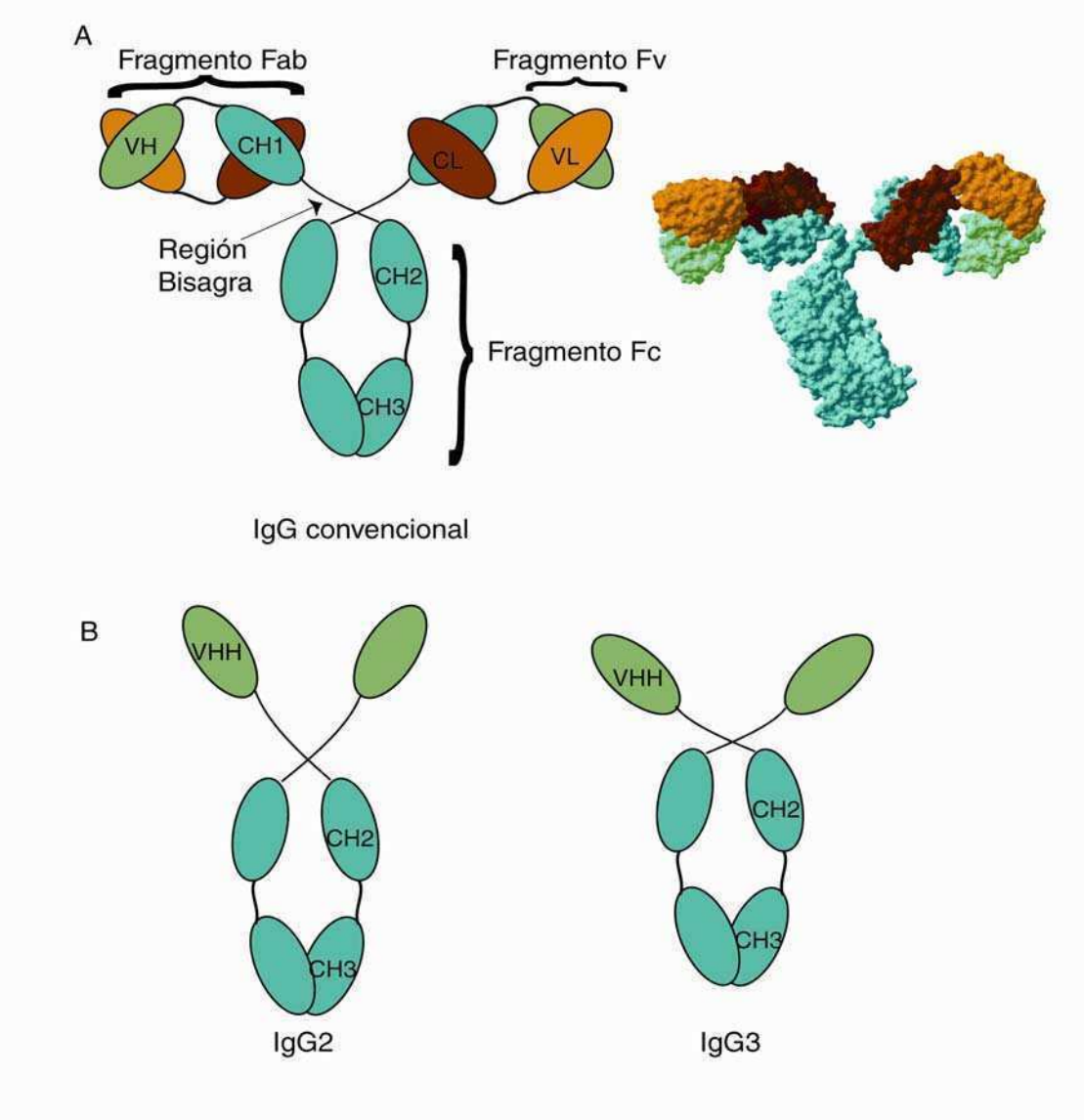


Figura 2: Distintos isotipos de IgG de camélidos. A: Estructura de IgGs convencionales de camélidos, esencialmente idénticas a las otras IgGs de mamíferos. A la izquierda se muestra un esquema de la molecula de IgG, denominado isotipo IgG1 en camélidos. Se indican los fragmentos en los que se puede subdividir la molécula. A la derecha, se muestra un modelo tridimensional de la estructura cristalográfica de una molécula de IgG, con la misma coloración que el esquema. Turquesa: regiones CH. Verde: Regiones VH. Marrón: Regiones CL. Naranja: Regiones VL**. B:** Estrucutra de las IgG de cadena pesada (hcIgG) de camélidos. El isotipo IgG2 tiene una región bisagra considerablemente mayor que el isotipo IgG3. Notese la falta del dominio CH1 en ambos isotipos. El fragmento VHH de unión al antígeno consta de una sola cadena polipeptídica. La clave de color es la misma que para A).

Existen en camélidos nueve genes γ, de los cuales cinco son funcionales en el rearreglo de genes para la región constante de las Igs. Dos de estos genes (γ1a y γ1b) codifican para las Igs convencionales (IgG1a e IgG1b) y todo el ADNc analizado del gen γ contiene al exón CH1. Los otros tres genes (γ2a, γ2c y γ3), codifican para las

hcIgG y tienen ausente el exón CH1 en su ADNc. Dos de ellos, γ2a y γ2c, codifican para una región bisagra de 12 y 15 aminoácidos, respectivamente y el gen γ3 para una región bisagra de 35 aminoácidos. Esto explica la diferencia en el peso molecular entre estas subclases cuando fueron analizadas sobre proteína A/G. Por lo tanto, los camélidos poseen dos isotipos convencionales (IgG1a y IgG1b) y tres isotipos de hcIgG correspondientes a IgG2a, IgG2c e IgG3. Los otros cuatro genes γ están presentes en la línea germinal pero no han sido encontrados en el rearreglo genómico ni tampoco en el ADNc (51). En las hcIgGs, el dominio Fv está vinculado directamente a través de la región bisagra a los dominios CH2 y CH3. El análisis del gen γ2a y de dos isotipos IgG de llamas obtenidos a partir de bibliotecas genómicas reveló que los genes que codifican para el dominio CH1 están presentes en el genoma de camélidos, pero el extremo 3′ del exón posee mutaciones puntuales responsables de la eliminación de la secuencia que codifica para el dominio CH1 durante el splicing del ARNm (49, 52). El hecho de que las especies pertenecientes a la familia *Camelidae* utilicen un mecanismo común para eliminar el dominio CH1, indica que las hcIgGs provienen de un ancestro en común (49).

Los genes γ de las regiones constantes de las hcIgG tienen la típica organización génica de las IgG de mamíferos, incluyendo el largo conservado de dominios homólogos e intrones (53-54). Cada gen que codifica para la región constante tiene cuatro exones conocidos como CH1, la región bisagra, CH2 y CH3, y dos exones de unión a transmembrana (53). Todos los genes γ de las hcIgG conservan la secuencia de nucleótidos CH1, pero en todos ellos el exón CH1 tiene presente la mutación puntual en el extremo 3′, el cual es un elemento clave para la pérdida del primer dominio constante (51, 53). También están conservados los residuos claves de las principales funciones efectoras de las IgG y los sitios de glicosilación (52-53, 55) .

En las hcIgGs, VHH es el mínimo fragmento funcional de unión al antígeno que se puede obtener derivado de una Ig (48-49). El proceso combinatorial de la región variable en los hcIgG se realiza de la misma manera que en las IgG

convencionales, es decir, por recombinación de los genes V-D-J, en donde el gen V codifica para el CDR1 y CDR2 y el CDR3 es codificado por la combinación los genes V-D-J (54, 56-57).

El repertorio VH-VHH de la línea germinal de los camélidos fue evaluado por Southern blot y por clonado y secuenciación múltiple de los genes de la línea germinal. La base de datos conteniendo 92 segmentos de genes V establece que los camélidos poseen, por un lado, 42 genes únicos de la línea germinal de VHHs y 50 genes de VH convencionales. La identificación de la línea germinal de los camélidos demostró que existen genes V específicos para VHHs distintos de los utilizados en el repertorio de las IgG convencionales. Sin embargo, los genes D y J son comunes para ambos tipos de anticuerpos (51, 58-59). El análisis de las regiones flanqueantes indica que el dominio VHHs tiene todos los elementos esenciales y conservados típicos de un dominio V, incluyendo la región promotora conservada de las Igs y también la secuencia señal de recombinación (RSS). Esto apoya la hipótesis de que los genes de la línea germinal de VHHs participan en el rearreglo somático de genes V-D-J de las Igs durante la diferenciación de las células B (53).

Se demostró que en el genoma de las alpacas existe un único locus de la cadena pesada de la Ig, que contiene todos los elementos genéticos necesarios para la generación de los dos tipos de Igs presenten en el sistema inmune de los camélidos (60). Sin embargo, aún no se ha determinado si en camélidos existen uno o dos precursores de linfocitos B para dar lugar a células productoras de VH o de VHH. Una posibilidad es que en un único precursor se produzca un rearreglo que azarosamente dé lugar a la generación de un VH o un VHH y que así, la naturaleza del primer rearreglo productivo determine el destino del linfocito B. Una hipótesis alternativa sería que los dos tipos de IgGs se expresen en dos linajes separados, originados de dos precursores independientes en los cuales el rearreglo del gen V ya está definido.

Las evidencias genéticas demuestran que las hcIgG son codificadas por un conjunto separado de genes V y genes Cγ en los camélidos. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que una porción de las hcIgG sea derivada somáticamente a partir de genes VH, dado que los genes que codifican para ambos tipos de inmunoglobulinas forman parte del mismo locus (51). La organización del genoma en el locus de la cadena pesada en los camélidos se espera que siga una típica estructura multigénica: $(V)_n$-$(D)_n$-$(J_H)_n$-$(C_H)_n$ como se presenta en otras especies (61-62).

La estructura general y el plegado del dominio VHH no es diferente de la del dominio VH de las IgGs convencionales; tienen también una estructura de barril β, formada por nueve cadenas β que son plegadas en dos hojas que se juntan unas con otras y están estabilizadas por un puente disulfuro conservado. Se forman así 4 regiones FR unidas por las 3 regiones CDR que conforman el sitio de combinación antigénico (49). Sin embargo, algunas diferencias se evidencian como son las sustituciones localizadas en el FR2. En los dominios VH los residuos que están ubicados en esa región interactúan con el domino VL y están conservados evolutivamente (63). Cuatro sustituciones fueron reportadas en el FR2 de VHHs: V37F-Y; G44Q-E; L45R-C, W47G (48, 55), las cuales están incluidas en la línea germinal (52, 59) y hacen que esta región del dominio sea una zona con características hidrofílicas (49, 59). Estas sustituciones en VHHs explicarían la falta de unión a la cadena liviana en estos anticuerpos. La presencia constante de estas sustituciones en el FR2 de VHHs (48) y su importancia estructural (64), permite clasificar a VHHs en una nueva familia, denominada V_H3H para distinguirlos de la familia Vh3 de las IgG convencionales (58).

Es posible crear dominios camelizados a partir de dominios VH de Igs convencionales que alcancen elevada solubilidad introduciendo un número muy limitado de mutaciones en aquellos residuos que contactan con el dominio VL,

imitando de alguna manera a los residuos presentes en VHHs de los camélidos. Se ha demostrado que al sustituir 3 aminoácidos en los FR2 de VH humanos con los aminoácidos presentes en VHHs de camélidos, se logra un mejor plegamiento y solubilidad. El aspecto más atractivo de este dominio camelizado es la posibilidad de utilizar el dominio VH de humanos en aplicaciones terapéuticas debido a su baja inmunogenicidad (65-66). Se han obtenido dominios camelizados que se expresan en células eucariotas a partir de fragmentos VH de Igs de conejos con un correcto plegado en un ambiente reductor. Por ejemplo, se ha generado un anticuerpo camelizado derivado de una Ig de conejo con especificidad para la proteína Vif del virus de inmunodeficiencia humana (HIV). Mediante la mutación de 5 aminoácidos se logró producir un anticuerpo de alta solubilidad, que no se une a la cadena liviana y mantiene su especificidad. Los resultados muestran que este anticuerpo es capaz de bloquear a Vif neutralizando la infección viral (67).

Si bien las regiones de los FR1 y FR3 de VHHs tienen un alto grado de homología con las regiones FR de los VH de las Igs convencionales de camélidos, humano y ratón (59), existen aminoácidos conservados en algunos VHH como por ejemplo (de VH a VHH): L11S, P14A y A83P. En los dominios VH, los residuos L11, P14, A83 se encuentran localizados en la región opuesta del sitio de unión al antígeno, y por lo tanto pueden contactar con el dominio CH1 (68); además, el residuo L11 forma parte de la unión-articulación (ball-and-socket joint) entre los dominios VH y CH1 (69). En las hcIgG, al estar ausente el dominio CH1, es probable que los aminoácidos de esta región estén expuestos al solvente. El incremento en la hidrofilicidad provocado por la sustitución L11S ayuda a mantener el dominio VHH soluble (48, 55, 70).

Además de las diferencias establecidas en los FRs, las regiones hipervariables de los VHH también presentan grandes diferencias con respecto al dominio VH de las Igs convencionales. En los dominios VHHs, el sitio de combinación antigénico se

forma con solo 3, en lugar de 6, loops CDR. Estas regiones, principalmente el CDR1 y CDR3, en promedio son más largas en los VHH que en los dominios VH.

El CDR1 de los dominios VH normalmente involucra los residuos 31-35 (71), pero en los VHH esta región se alarga, involucrando los residuos 27-35. En la línea germinal de los VHH están presentes dos nuevas regiones propensas a sufrir mutaciones (hotspots). Estas mutaciones en la línea germinal conducen a sustituciones de aminoácidos (por ejemplo F27Y y F29Y), causando efectos importantes en el CDR1 como son nuevas conformaciones del loop, ampliando de esta manera el repertorio estructural de los VHH; otras mutaciones pueden provocar una sutil modificación en la superficie que podría mejorar la interacción del VHH con el antígeno. La presencia de hotspots en los codones 27 y 29 en la línea germinal de los VHH, convierte a esa región en una zona con elevada variabilidad y además, de gran importancia en la interacción con el antígeno (49, 59). Estudios cristalográficos de dos VHH en complejo con su antígeno demuestran cómo los aminoácidos localizados en esa zona del CDR1 interaccionan con el antígeno (64, 72). Además, el análisis de la estructura cristalográfica de un VHH libre de antígeno contra la hormona gonadotrofina coriónica humana (hCG) muestra claramente cómo el loop CDR1 es expuesto al solvente y forma una estructura que protruye ligeramente (73). Se ha propuesto como alternativa, en la construcción de bibliotecas sintéticas, variar estos aminoácidos (65, 74), para incrementar el repertorio de anticuerpos y de esta manera encontrar más candidatos de unión a su antígeno (59).

Estudios comparativos sobre estructuras de anticuerpos indican que existe un número limitado de conformaciones canónicas para las regiones hipervariables, a excepción del CDR3 de la cadena pesada que no asume ninguna de las conformaciones establecidas (64, 75-77). Los átomos de la cadena principal de los CDRs adoptan algunas de las posibles estructuras canónicas establecidas, las cuales dependen del largo del CDR y de la ubicación de residuos claves presentes en determinadas posiciones (75-76, 78). Se determinó que las estructuras canónicas del

CDR1 y del CDR2 de los dominios VH aparecieron muy tempranamente durante la evolución del sistema inmune, debido a la presencia de residuos claves conservados en humanos y peces cartilaginosos, especies muy distanciadas filogenéticamente (72). Basándonos en algunas estructuras cristalográficas resueltas, como por ejemplo un VHH contra anhidrasa carbónica, el CDR1 adopta una de las estructuras canónicas ya establecidas tanto en el VHH libre como en complejo con su antígeno (70); sin embargo, otras estructuras cristalográficas revelan que esta región no adopta ninguna de las estructuras canónicas predichas (64,79,73,80). Inclusive, se ha propuesto un nuevo tipo de estructura canónica para el CDR1 de VHH denominada tipo 4 (70, 79).

La arquitectura del CDR2 de VHHs es más variable que la de los dominios VH (70), pero en todas las estructuras resueltas se le atribuyen estructuras canónicas establecidas. El análisis estructural muestra que estos CDR tienen un repertorio estructural más amplio que el observado para los VH convencionales (49), pero es necesario obtener más cantidad de estructuras cristalizadas, ya que el conjunto de estructuras disponibles es limitado (70).

Los fragmentos VHHs, además de tener las cisteínas conservadas C22 y C92, presentes también en todos los dominios VH, presentan frecuentemente puentes disulfuro adicionales que unen sus CDRs. Los puentes disulfuro se forman generalmente entre el CDR3 y el CDR1 o CDR2, aunque a veces, dependiendo de las especies, las uniones pueden variar. En llamas se forman puentes disulfuro entre el CDR3 y la C33 o C50 del CDR2, y en camellos entre el CDR3 y la Cys45 del FR2. En CDRs de corta longitud en llamas, es poco probable encontrar residuos cisteína extras (55, 73). La formación de puentes disulfuro adicionales restringe la flexibilidad y permite disminuir la penalidad entrópica relacionada con la unión al antígeno de estos CDRs largos (49, 64); además brindan estabilidad al dominio y generan la formación de nuevos loops, aumentando de esta manera el repertorio de

paratope de unión al antígeno (59). Aunque son casos excepcionales, se han encontrado residuos cisteína en los CDRs de IgG de bovinos (81), de ratones y de humanos (71).

El CDR3, por otro lado, alcanza significativamente mayor longitud en estos fragmentos VHHs que en los VH de las Igs convencionales. El largo promedio del CDR3 de los dominios VH de humanos y ratones es de 12 y 9 aminoácidos, respectivamente (82), mientras que en camélidos el CDR3 de los VHHs alcanza un largo promedio de entre 16 y 18 aminoácidos, con excepción de los de llamas, que pueden tener un tamaño menor (55, 73). Incluso, se ha reportado que el CDR3 de un VHH inhibitorio contra lisozima de huevo de gallina (HEL) alcanza una longitud de 24 aminoácidos (64). Se ha demostrado con detalle para este VHH, que el CDR3, con su mayor longitud, puede adoptar una estructura que protruye del sitio de combinación, entra en el sitio activo y realiza una mímica molecular del oligosacárido sustrato de la lisozima, tanto a nivel funcional como estructural (83). Estructuras cristalizadas, muestran que 6 de 8 VHH contra HEL, con CDR3 largos y convexos, reconocen dos epitopes superpuestos que abarcan una gran cavidad, sitio donde se une el sustrato de la enzima (84). La generación de péptidos sintéticos a partir de VHH contra HEL, y aquéllos formados por los mismos residuos que el CDR3 del fragmento natural mostraron afinidad por el antígeno y resultaron inhibidores competitivos (49). También se demostró que otros VHHs con CDR3 más cortos, obtenidos contra enzimas como la anhidrasa carbónica, α-amilasa y β-lactamasa se unen al sitio activo, bloqueando la actividad catalítica de la enzima. En este mismo trabajo, las hcIgG obtenidas contra β-lactamasa, a diferencia del fragmento VHH, no tuvieron capacidad inhibitoria (85-86).

Por lo tanto, el CDR3 posee la extraordinaria capacidad de formar estructuras largas y convexas que ofrecen gran superficie de interacción, permitiendo que se extienda dentro de cavidades o hendiduras presentes en el antígeno. Este tipo de geometría se encuentra poco representada en las IgGs convencionales; en general se ha visto que los anticuerpos inhibitorios de tipo convencional tienen CDRs planares

y funcionan por impedimento estérico y disminución de la movilidad del sitio activo (5, 87). Dado que los 3 CDRs de los VHHs tienen una gran variabilidad estructural, mayor longitud y adoptan estructuras convexas, y además, principalmente a través del CDR3, se unen preferencialmente a cavidades del antígeno, se considera que los fragmentos VHH son muy buenos candidatos para ser utilizados como inhibidores enzimáticos (64, 84-85). Al carecer de cadenas livianas y estar formados por una única cadena polipeptídica, los VHHs son muy atractivos para ser utilizados en ingeniería de proteínas. Es posible clonar estos fragmentos en bibliotecas de expresión en bacteriófagos, de manera mucho más sencilla que las equivalentes bibliotecas de anticuerpos convencionales. El tamaño necesario para cubrir la diversidad natural es menor, ya que no hay diversidad combinatorial. Esto facilita mucho su construcción, en comparación con una biblioteca de anticuerpos convencionales, que requiere la combinación de los dominios VH y VL. Por esta razón se necesitan bibliotecas de menor tamaño (10^6 a 10^8 clones) para obtener varios clones de alta afinidad y especificidad para el antígeno deseado (49).

El repertorio de los VHHs es obtenido por PCR utilizando un solo set de primers a partir de linfocitos B presentes en la sangre, nódulos linfáticos o de bazo de animales inmunizados. El repertorio de los VHHs puede ser clonado en un vector para fagos y los VHHs específicos pueden ser seleccionados por varios métodos (panning) (16-17). Una vez seleccionados, los fragmentos de interés pueden ser expresados en forma recombinante lo cual se ve también ampliamente facilitado por las características intrínsecas de los VHHs. La expresión de los VHHs recombinantes origina una proteína de dominio único de aproximadamente 15 KDa, mucho más pequeño que los fragmentos Fab, scFv o Fv; además son fáciles de expresar y purificar a partir del espacio periplasmático de *E. coli* (88), compartimento donde las proteínas son correctamente plegadas ya que el medio ambiente oxidativo estimula la formación de puentes disulfuro generándose así un VHH funcional. También se

ha reportado que los VHHs obtenidos a partir de cuerpos de inclusión pueden replegarse fácilmente (49). El rendimiento es más elevado que el obtenido para los scFv (27), y se pueden expresar en otros sistemas como levaduras, plantas y células eucariotas (89). Estudios comparativos de VHH y scFv o Fab muestran que los primeros tienen mejor solubilidad, elevada resistencia a prolongadas incubaciones a 37°C y que las afinidades tienen valores en el rango nanomolar al igual que en los anticuerpos convencionales obtenidos para los mismos antígenos (27). También se ha demostrado que los VHHs se unen específicamente a su antígeno a temperaturas extremas como 90°C (90).

En resumen, en camélidos el repertorio estructural de los VHH es ampliamente diversificado por una mayor longitud en los CDR1 y CDR3, lo que permite una gran plasticidad para el remodelado del paratope, introducción de puentes disulfuro adicionales y alta tasa de mutación somática. Además se observa una alta incidencia de inserciones-deleciones y reemplazo de genes (51, 59). Los VHHs son considerados una herramienta importante para el diseño de drogas o compuestos (91), por varias razones: son más fáciles de obtener, tienen un menor tamaño, alta afinidad y especificidad por su antígeno y se obtienen altos niveles de expresión, mayor estabilidad y solubilidad. Estas características hacen de estos fragmentos una herramienta ideal para varias aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas.

APLICACIONES DE VHHS

Es lógico elegir anticuerpos para el uso de compuestos terapéuticos dado que son moléculas naturales que han evolucionado de los vertebrados protegiendo al organismo de infecciones, células malignas y toxinas (11). Se ha reportado que el fragmento Fab es capaz de penetrar en tejidos densos, como por ejemplo tumores sólidos, y se ha reportado que los scFv pueden resultar aún más efectivos (92). Por lo tanto, la reducción del tamaño a dominios únicos monoméricos (sdAb), como VH y VL teóricamente deberían hacerlos más potentes en este aspecto. Sin embargo debe tenerse en cuenta que la eliminación de una de las partes podría disminuir la afinidad por su antígeno (93), en comparación con el domino Fv original a partir del cual el VH es derivado (94). También, está bien establecido que los dominios VH aislados mantienen una actividad residual de unión al antígeno (95-96) y es común observar que los mismos tiendan a agregarse debido a la gran superficie hidrofóbica expuesta al solvente en el lado que contacta con el dominio VL (11).

Los hcIgG generados naturalmente a partir de camélidos, principalmente los dominios únicos VHH, son empleados en un amplio espectro de aplicaciones terapéuticas. Los blancos potenciales incluyen desde proteínas de la superficie celular tanto de células eucariotas como de bacterias patógenas, toxinas, venenos, citoquinas, otras proteínas secretadas, e incluso proteínas intracelulares (11, 44).

Las construcciones multivalentes y multiespecíficas son diseñadas con el fin de aumentar la funcionalidad de un fragmento de anticuerpo mejorando la unión al antígeno a través de efectos de avidez, por el aumento de la especificidad o por el entrecruzamiento de dos antígenos (11). A partir de VHHs, este tipo de construcciones son más fáciles de obtener comparando con los scFv, y las mismas permanecen activas e intactas en el plasma a 37°C por largos períodos de tiempo

(86). La aplicación pre-clínica de VHHs obtenidos contra el factor de necrosis tumoral (TNF) fue explorada como antagonistas en un modelo de ratón de artritis reumatoidea (AR). La construcción bivalente de VHHs contra TNF humano mostró un incremento en la avidez y gran potencial como antagonista, excediendo incluso a los anticuerpos anti-TNF usados clínicamente en AR (97). Por otro lado, se seleccionaron y caracterizaron VHH con función antagonista contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) asociado al desarrollo de tumores sólidos. Los VHHs seleccionados inhiben la unión del EGF a su receptor (EGFR) sin actuar como agonista del mismo (12).

A partir de bibliotecas de llamas no inmunizadas se han podido obtener VHH específicos contra algunas toxinas bacterianas como la toxina del cólera, la enterotoxina B estafilocócica y la neurotoxina botulínica A (98-99). A partir de VHH monoméricos, VHH bivalentes y VHH quiméricos (la forma bivalente unida a un Fc de humano) se logró neutralizar una toxina de escorpión, brindando una importante aplicación en sueroterapia (100).También se han obtenido VHH contra fimbrias de la superficie de *E. coli* F4 que bloquean la adhesión de las bacterias a las células hospedadoras. La aplicación de altas dosis de este VHH en cerdos infectados redujo la diarrea inducida por la bacteria (101).

Muchas compañías producen fragmentos sdAbs dirigidos contra una amplia variedad de antígenos, todos con importantes aplicaciones terapéuticas. Entre estas compañías, se encuentran Ablynx, que produce sdAbs a partir de anticuerpos de camélidos, Haptogen y Wyeth a partir de anticuerpos de tiburones, y Arana, Domantis y GSK, a partir de anticuerpos de humanos.

Los fragmentos sdAb poseen la limitación de no poder atravesar la membrana celular y por lo tanto no es posible utilizarlos contra antígenos intracelulares. Se han desarrollado dos estrategias para permitir el acceso de los sdAb al medio intracelular: la fusión a péptidos que permiten la translocación a través de la membrana y, por otro lado, la transfección de células con construcciones de ADN que codifiquen para el sdAb. La eficiencia de translocación de sdAb a través de la

membrana resulta muy variable (44, 102-103), por eso la estrategia de transfección y expresión del sdAb es una alternativa interesante.

Se define a los intrabodies como moléculas de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos diseñados para ser expresados intracelularmente y ejercer su función en determinados compartimentos sub-celulares. Estos anticuerpos son usados como herramientas biotecnológicas para interrumpir, modular o definir funciones de un amplio rango de antígenos. Se ha estudiado el efecto de los intrabodies en modelos de cáncer, de infección por el HIV y de enfermedades autoinmunes y neurodegenerativas (104). Algunos blancos de los intrabodies analizados fueron proteínas estructurales, regulatorias y enzimas del HIV y se ha observado que pueden modular tanto eventos tempranos como tardíos del ciclo viral (105). A pesar de que los scFv son los fragmentos más comúnmente empleados para la expresión en el citoplasma de células eucariotas y son utilizados como agentes terapéuticos (106), existen inconvenientes como el plegado incorrecto, baja solubilidad, corta vida media de la proteína y elevada tendencia a la agregación (107-108). Un problema asociado con la expresión de los intrabodies surge por el estado redox de los compartimentos subcelulares debido a que la formación de puentes disulfuro en los scFv se ve gravemente comprometida, conduciendo a intrabodies no funcionales (106, 109-110). Varias estrategias son empleadas para mejorar la estabilidad de estos fragmentos como son la ingeniería genética, la selección de fragmentos de anticuerpos a partir de bibliotecas de intrabodies (106, 108, 111) y el empleo de chaperonas (112-113). En algunos casos, la fusión de intrabodies con la proteína de unión a maltosa (maltosa binding protein, MBP) de *E. coli* aumenta su solubilidad y estabilidad (112, 114). Se han utilizado sdAds como VL (115) y VH (116) como intrabodies, y los mismos tienen más elevada estabilidad, solubilidad y mayores niveles de expresión que los scFv (117).

El uso de VHHs resulta una alternativa prometedora en el diseño de intrabodies debido a su elevada estabilidad y excelente plegado bajo condiciones extremas. Por tal motivo, VHHs fusionados a proteínas fluorescentes (choromobody-intrabody) son expresados en diferentes compartimentos y estructuras subcelulares de células eucariotas, y pueden reconocer diversos epitopes, incluyendo antígenos que se expresan en bajas concentraciones (118). Por otro lado, VHHs específicos contra la proteína S del virus de la hepatitis B son expresados en el retículo endoplásmico y causan una marcada reducción en la concentración de partículas virales tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* (119). A su vez, VHHs contra un retrovirus porcino, expresados en el citoplasma, bloquean la replicación viral e inhiben la citotoxicidad inducida por el virus (120). Además, también se pudo observar que VHHs expresados en el citoplasma efectivamente inhiben la apoptosis celular inducida por stress oxidativo causante de enfermedades neurodegenerativas (121).

En nuestro conocimiento, no existen anticuerpos de llamas utilizados como intrabodies para inhibir toxinas bacterianas intracelulares. Por lo tanto, presentamos y demostramos en esta Tesis el uso de anticuerpos de llama como inhibidores de toxinas bacterianas intracelulares. Particularmente, este trabajo aprovecha las características expuestas de los hcIgG de camélidos para obtener anticuerpos contra una toxina bacteriana por inmunización de llamas y realización de una biblioteca de VHHs. Como prueba de concepto, en este trabajo de Tesis utilizamos VHHs obtenidos para inhibir la infección por *Salmonella typhimurium*.

SPVB: UNA TOXINA CRUCIAL DEL PATÓGENO *SALMONELLA TYPHIMURIUM*

El género *Salmonella* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, orden *Enterobacteriales* (122). Este género está compuesto por bacilos Gram-negativos e intracelulares facultativos. *Salmonella spp* es un patógeno de humanos y animales, y causa un amplio espectro de enfermedades como gastroenteritis, fiebre tifoidea y bacteremia, las cuales tienen su origen en la infección entérica (123-124). El género *Salmonella* comprende dos especies: *Salmonella entérica*, que se subdivide en más de 2000 serovariedades (125), y *Salmonella bongori*. Para una nomenclatura simplificada en esta Tesis consideraremos los nombres de serovariedades como nombres de especies. De este modo, *Salmonella enterica* subgrupo *enterica* serotipo *Typhimurium* se referirá como *Salmonella typhimurium*.

La estrecha relación que existe entre las especies de *Salmonella* que causan enfermedades en distintos huéspedes de mamíferos ha conducido a estudiar intensamente los mecanismos patogénicos de *S. typhimurium* en ratones como modelo para comprender las enfermedades humanas.

La naturaleza y severidad de la infección generalmente dependen de la especie de *Salmonella* y del hospedador (123-124). Algunas especies están específicamente adaptadas a un hospedador determinado, como *S. typhi* a humanos, *S. pullorum* a las aves de corral, *S. dublin* al ganado vacuno y *S. arizonae* a reptiles. Otras, como *S. typhimurium*, *S. enteritidis*, y *S. choleraesius* tienen un amplio espectro de hospedadores causando diferentes enfermedades en cada uno de ellos, por ejemplo *S. typhimurium,* que causa una infección letal y sistémica en ratones, y en humanos una leve gastroenteritis (125-126)

Salmonella typhi y *paratyphi* son especies mortales para el humano, que causan fiebre tifoidea sistémica, y constituyen uno de los principales problemas de salud en los países sub-desarrollados del mundo. Se estima que hay unos 20 millones de casos y alrededor de unas 200.000 muertes anuales (127-128). Otras como *S. typhimurium* y *S. enteritidis* generan intoxicación alimentaria en los países industrializados (126), causando millones de infecciones y muertes en poblaciones de humanos cada año (129-131). En infecciones sistémicas, *Salmonella* penetra la mucosa intestinal e invade las células M de las placas de Peyer (132); las bacterias eventualmente destruyen las células M invadidas y el epitelio adyacente (133-134) accediendo al tejido linfoide. Cuando el tejido linfoide es invadido, *Salmonella* es fagocitada por macrófagos, en los que crece y se replica en un compartimento membranoso especial, denominado vacuola contenedora de *Salmonella* (VCS). Las VCS que contienen a las bacterias forman extensiones filamentosas en la membrana, conocidas como SIF (Salmonella induced filaments), las cuales son indispensables para la supervivencia intracelular (135). Las bacterias se acumulan y replican masivamente en órganos que son ricos en células fagocíticas, como son el hígado, el bazo y en la médula ósea, generando insuficiencia en los órganos afectados, la sepsis bacteriana y la muerte del individuo (123).

Estudios realizados en modelos *in vivo* e *in vitro*, mostraron que *Salmonella spp* causa la muerte celular de macrófagos (136-139). Al estudiar mutantes de *S. typhimurium* que no se replican dentro de macrófagos se observó que las mismas son atenuadas para la virulencia en ratones (140-141), sugiriendo que la supervivencia y replicación en macrófagos es esencial para la virulencia (124, 142-143). La interacción del patógeno con la célula hospedadora está particularmente caracterizada por factores que están localizados sobre la superficie de la bacteria o que son secretados hacia el espacio extracelular. Aunque las proteínas secretadas por la bacteria son numerosas, diversas y tienen un amplio rango de funciones que incluyen proteólisis, hemólisis, citotoxicidad, fosforilación y desfosforilación, solamente unas pocas vías pueden transportar estas proteínas desde el citoplasma de la bacteria hacia el espacio

extracelular (123). Cuatro vías de secreción de proteínas (tipo I a IV) han sido descriptas en bacterias Gram negativas (144-147). La virulencia en bacterias patógenas está mediada en gran medida por la presencia de genes que codifican para factores de virulencia, organizados en islas de patogenicidad (IP). Estas IP son segmentos de ADN localizados en el cromosoma de la bacteria, que no están presentes en organismos relacionados no patogénicos (148-151). Algunas de estas IP codifican para el sistema de secreción tipo III (SST3) el cual permite secretar y translocar proteínas patógenas, llamadas efectores, desde la bacteria hacia el citoplasma de las células hospedadoras (123, 152). En *Salmonella*, existen dos SST3, los cuales están codificados por la isla de patogenicidad 1 (IPS-1) y la isla de patogenicidad 2 (IPS-2) (153-155). Estos dos SST3 desempeñan roles diferentes durante la patogénesis de *Salmonella*. El SST3 y sus efectores codificados por la IPS-1 son necesarios para la invasión en las células epiteliales de la mucosa intestinal ((123, 152). La invasión a las células M es un evento activo, dado que los efectores promueven el rearreglo del citoesqueleto de actina, provocando proyecciones en la membrana denominadas "ruffling", lo que favorece la internalización de la bacteria al hospedador (156-157). Además, la entrada a las células M parece estar mediada por fimbrias propias de cada especie (158). Por lo tanto, el IPS-1 y las fimbrias funcionan sinérgicamente en la invasión de la barrera intestinal (123). El segundo SST3 y sus efectores codificados por la IPS-2 son esenciales para la supervivencia y replicación dentro de macrófagos, y a su vez para el desarrollo de la enfermedad sistémica (142)(130; (153, 155, 159-161) 147-151). Uno de los efectores requeridos en la infección de macrófagos es el operón *spv* (salmonella plasmid virulence) (162,156), el cual se encuentra localizado en un gran plásmido de virulencia presente en algunas especies de *Salmonella* (163-165,157-159). El operón es esencial para infecciones sistémicas en ratones, virulencia en otras especies (166-172,160-166) y para el crecimiento e infección de cultivos de macrófagos, provocando desprendimiento y muerte celular luego de 24 horas de infección (162,156). En algunas especies ancestrales los genes *spv* se han insertado en el cromosoma de la bacteria (173,167).

El operón *spv* está compuesto por cinco genes: un gen regulador positivo (spvR) (174-175,168; 169) y cuatro efectores (*spvA, spvB, spvC, y spvD*) (163, 165). Uno de los genes efectores que determina en gran parte el fenotipo que causa el operón, es el gen *spvB*, el cual codifica para la proteína SpvB. Esta proteína depolimeriza el citoesqueleto de actina, conduciendo a la muerte celular en las células hospedadoras (176), siendo la misma secretada desde la bacteria al citoplasma de las células hospedadoras (177). SpvB es un polipéptido de cadena única de 65 KDa formado por dos dominios: N-terminal (residuos de aminoácidos 1-366) y C-terminal (residuos de aminoácidos 374-591). Ambos dominios están unidos por siete prolinas (177). El dominio N-terminal de SpvB funciona como una señal de transporte extracelular en la proteína, siendo esencial para la secreción de SpvB (124). El dominio C-terminal es una ADP-ribosiltransferasa que transfiere covalentemente la ADP-ribosa (ADPR) a partir de la molécula de nicotinamida adenina dinucléotido (NAD) al residuo arginina 177 de la actina (178-180), depolimerizando sus filamentos. La estructura de SpvB fue resuelta, observándose que el dominio catalítico C-terminal adopta la estructura canónica de una amplia familia de ADP-ribosiltransferasas y consiste en un plegamiento α/β con dos hojas β casi perpendiculares yuxtapuestas a un dominio helicoidal (180).

La ADP-ribosilación es un modo de acción común de muchas toxinas bacterianas (181). Muchas toxinas que ADP-ribosilan son secretadas al espacio extracelular y luego translocadas al citosol de las células hospedadoras con ayuda de un dominio de translocación (por ejemplo, la toxina de difteria) o con ayuda de una subunidad asociada (por ejemplo, las toxinas de Clostridium y cólera). Estas toxinas secretadas son susceptibles a la neutralización por anticuerpos convencionales y la inmunización activa y pasiva es utilizada eficientemente para prevenir o tratar enfermedades mediadas por alguna de estas toxinas (182-183). Otras bacterias patógenas, como *Salmonella* inyectan toxinas directamente desde vacuolas hacia el citoplasma de células eucariotas, a través de algún sistema de secreción

especializado, como es el caso de SpvB que es secretado por el SST3 codificado por la IPS-2 (178, 184) evitando así su neutralización por anticuerpos.

Las estrategias terapéuticas dirigidas a bloquear la actividad enzimática de SpvB con inhibidores de tamaño pequeño, tienen la desventaja de generar posibles efectos secundarios como la inhibición de ADP-ribosiltransferasas endógenas (185).

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo consiste en demostrar como prueba de concepto que es posible generar, caracterizar y utilizar anticuerpos de llama de dominio único como inhibidores específicos de toxinas bacterianas intracelulares.

Los objetivos particulares son:

- Clonar, expresar y purificar el dominio catalítico C-terminal de la toxina SpvB de *Salmonella typhimurium*.
- Utilizar métodos radioactivos y fluorométricos para analizar la actividad enzimática de SpvB.
- Inmunizar llamas con dicho dominio y verificar que se produzca una respuesta inmune humoral específica.
- Obtener a partir de sangre periférica de dichos animales una biblioteca combinatorial de fragmentos VHHs.
- Seleccionar, mediante el antígeno biotinilado en solución, fagos que expresen VHHs específicos contra SpvB.
- Caracterizar VHHs específicos mediante secuenciación y capacidad de inhibición de la actividad enzimática de SpvB.
- Seleccionar VHHs con mayor capacidad inhibitoria, y demostrar que inhiben en forma dosis-dependiente a SpvB.
- Expresar dichos VHHs inhibitorios en células eucariotas.
- Demostrar la capacidad inhibitoria de dichos VHHs como intrabodies.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos

1.1. Soluciones, Medios y Buffers:

Nombre	Composición
2xTY	16g/l Triptona, 10g/l Extracto de levadura, 5g/l Nacl, pH 7.4
Buffer10	300mM NaCl, 50mM NaH_2PO_4, 10 mM Imidazol, pH 8 (con DTT para SpvB)
Buffer250	300mM NaCl, 50mM NaH_2PO_4, 250 mM Imidazol, pH 8 (con DTT para SpvB)
LB	10g/l Triptona, 5g/l Extracto de levadura, 5g/l Nacl, pH 7.4
LB agar	LB + 10g/l Agar-Agar
OPD	2mg/ml OPD (Sigma) en buffer citrato/fosfato 50mM pH=5 + 0.02%(v/v) H_2O_2
PBS	10mM Na_3PO_4 pH=7.4, 150 mM NaCl, 2.7mM KCl
PBST	PBS + 0.05%(v/v)Tween-20
SFB5%	10%(v/v) SFB en RPMI 1640
SOC	20g/l Triptona, 10g/l Extracto de levadura, 10mM NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl, 10mM $MgSO_4$, 20mM Glc
TES	30mM Tris-HCl pH 8, 20%(m/v) Sacarosa, 1mM EDTA
TBE	45mM Tris borato pH 8.3, 2mM EDTA

Las sales y reactivos de uso común cuyo proveedor no se especifica son de calidad para análisis y provienen de Merck o Sigma.

2. Cepas de *E. coli*:

Cepa	Fenotipo
DH5α	supE44 thi- 1 recA1 gyrA (Nalr) relA1 Δ(lacIZYAargF) U169 deoR (Φ80 dlacΔ (lacZ)M15)
Top10 F′	F′{lacIq, Tn10(TetR)} mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG
XL1Blue F′	F′::Tn 10 (Tet^R) proA+ B+ lacIq Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nalr) thi hsdR17(r – m +) supE44 relA1 lac

3. Líneas celulares

Línea celular	Tipo celular
HEK 293	fibroblastos embrionarios de riñón humano
Hela:	epiteliales de carcinoma cervical humano
J774A.1	monocitos/macrófagos
RAW 264.1	macrófagos
Vero 76	epiteliales de riñón
CHO	células de ovario de hámster chino

4. Primers

nombre	secuencia (5' > 3')
Clonado de SpvB en pET26b	
SP1-NcoI	cct cct ccg acc atg gga ggt aat tca tct cga c
SP4-XhoI	gat tct tag ctc gag tga gtt gag tac cct cat gtt
Clonado de VHHs en pHEN2	
Lam07-NotI	gat ggt gat gat gat gtg cgg ccg cgc tgg ggt ctt cgc tgt ggt gcg
Lam08-NotI	gat ggt gat gat gat gtg cgg ccg ctg gtt gtg gtt ttg gtg tct tgg
VH1b-SfiI	gct gga ttg tta tta ctc gcg gcc cag ccg gcc atg gcc cag gts mar ctg cag sag tcw gg
VH6b-SfiI	cgt gga ttg tta tta tct gcg gcc cag ccg gcc atg gcc gat gtg cag ctg cag gcg tct ggr gga gg
Clonado de MBP-VHH5 y MBP-VHHNR en $pcDNA_6$	
MBP-VHH-Hind III	act agt gca aag ctt atg aaa atc gaa gaa ggt aaa ctg gta atc tgg
VHH- XbaI	ggt aat cgg tct aga tca tgg ttg tgg ttt tgg tgt ctt gg

5. Clonado, expresión y purificación de SpvB

5.1. Clonado: La secuencia del dominio C-terminal de SpvB fue clonada en el vector pET-26b (+) (Novagene). La cepa de *E. coli* DH5α fue transformada con el plásmido en medio LB con kanamicina (Kan) a 37°C y se plaquearon alícuotas de dichos cultivos en placas LB agar + Kan a 37°C. Se tomaron colonias únicas y se realizaron minipreps (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN) para obtener ADN de buena calidad. Se corrieron alícuotas en gel de agarosa 1% TBE y se estimó la concentración y pureza del mismo. La misma fue determinada por absorbancia, considerando que una DO_{260}=1.0 = 50 ng/µl. Se tomaron alícuotas del ADN y se eligieron 5 clones los cuales fueron secuenciados. Por otro lado, se transformó la cepa *E. coli* BL21 con ADN puro y de concentración estimada y se crecieron cultivos, luego se plaquearon alícuotas de estos cultivos en placas de LB agar + 70 µg/ml de Kan.

5.2. Expresión: SpvB fue purificada a partir de citoplasma y de cuerpos de inclusión. Para ambos casos, a partir de la cepa *E. coli* BL21 transformada se crecieron cultivos en medio LB con Kan a 37°C durante toda noche (ON). Una dilución de estos cultivos se creció hasta alcanzar una DO_{600}=0.5-0.8 en agitación constante a 37°C. Cuando el cultivo alcanzó la DO esperada, se indujo con 1mM IPTG para sobre-expresar la proteína recombinante.

Para la obtención de la proteína de citoplasma, luego de la inducción el cultivo fue dejado ON a 28°C, centrifugado a 4000xg y el pellet fue resuspendido en buffer de lisis: 50 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, 0.5 % tritón, β-mercaptoetanol y 1 mM PMSF pH8. El pellet solubilizado fue sonicado varias veces para reducir al mínimo la viscosidad, centrifugado a 18.000xg y el sobrenadante fue dializado ON con el buffer de corrida (buffer10).

Para obtener la proteína a partir de cuerpos de inclusión, el cultivo se incubó ON a 37°C, se centrifugó, y el pellet fue resuspendido en el buffer de lisis. El pellet solubilizado, fue sonicado varias veces para reducir al mínimo la viscosidad,

centrifugado a 18.000xg y luego lavado 3 veces con 50 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF pH 8 para eliminar el exceso de tritón. El pellet fue solubilizado en 6M GdnHCl ON a temperatura ambiente en agitación. El pellet completamente soluble se sometió a varios cambios de diálisis con PBS para lograr el replegado de la proteína. Por último, se realizó una diálisis ON con el buffer de corrida (buffer10).

5.3. Purificación: Se realizaron dos pasos de purificación de la proteína. En el paso inicial se utilizó una columna His-Trap™ HP (GE Healthcare) y la misma fue previamente lavada con el buffer de corrida. El sobrenadante dializado contra el buffer de corrida (Buffer 10) fue purificado en la columna His-Trap™ HP. Se utilizó como buffer de elución el buffer250. Para la elución de SpvB se utilizó un gradiente creciente de imidazol de 10mM a 250 mM. La fracción correspondiente a SpvB fue dializada con Tris-HCL pH 8 + 0.5 mM NaCl, 1 mM DTT. Luego se procedió a un segundo paso de purificación, utilizando una columna de tamiz molecular (S75: Superdex™ 75). Las muestras fueron calentadas durante 10 min a 90°C y analizadas por gel SDS-PAGE.

5.4. Biotinilación. SpvB fue biotinilada y para tal fin se siguió el protocolo del fabricante (EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin, Pierce). La biotinilación de SpvB fue corroborada por ELISA. La placa fue sensibilizada con 1 μg de streptavidina en 50 μl PBS en pocillos de placa Maxisorp (Nunc) durante 1 hs a temperatura ambiente. Se lavó cada pocillo 3 veces con PBST y se agregó 0.5 μg de SpvB biotinilada en 50 μl PBS durante 1 hs a temperatura ambiente. Los pocillos se bloquearon con 200 μl 3% (m/v) leche descremada PBST ON a 4°C. La placa se lavó tres veces con PBST. A continuación se incubaron los pocillos con suero de llama anti-SpvB durante 1 h diluidos en 1% (m/v) leche descremada en PBST. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG de llama desarrollado en conejo en dilución 1/1000 el cual se reveló con un anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (HRP) desarrollado en cabra (Sigma) en dilución 1/1000. La placa se lavó, y se agregó una solución fresca de sustrato OPD. Luego de 10 min, la reacción cromogénica fue detenida por agregado

de H_2SO_4 4N. La DO_{492} de cada pocillo fue medida en un lector de placas de ELISA (Σ960 Metertech Inc).

6. Actividad enzimática de SpvB: Radioactividad y Fluorometría.

6.1. Ensayo de radioactividad: Se midió la actividad enzimática de SpvB incubando 1 μg de la enzima pura, 1 μCi [^{32}P]-NAD, 1 mM ADP-ribosa y 1 mM DTT durante 1 h a 37°C. Se utilizó como fuente de actina un lisado de células CHO (ovario de hamster chino, $1x10^6$ células). Las muestras fueron incubadas en acetona fría ON a -20°C y luego centrifugadas a 16000xg durante 30 minutos a 4°C. El pellet fue lavado dos veces con acetona fría y resuspendido en loading buffer. Como control se realizó la misma mezcla, pero sin el agregado de la enzima. Alícuotas de la reacción y de los controles fueron sometidos a una corrida electroforética por SDS-PAGE 15% y luego el gel fue expuesto a autorradiografía durante 24 hs para poder evaluar la actina marcada radioactivamente. También se midió la actividad enzimática de SpvB utilizando actina comercial. Para tal fin, se siguió un protocolo idéntico al detallado anteriormente. Se utilizó un equipo Storm (Molecular dynamics, Amersham Pharmacia Biotech) para observar las bandas de actina marcadas radioactivamente.

Para poder estimar la cantidad mínima necesaria de SpvB, se realizó un ensayo de actividad enzimática variando la cantidad de SpvB, a diferentes tiempos. Para ello, se siguió un protocolo idéntico al detallado anteriormente. Se incubó un lisado de células CHO con 50 ng, 25 ng y 10 ng de SpvB pura durante 10, 30 y 60 minutos a 37°C. Se agregó a la reacción 1 μCi [^{32}P]-NAD (Amersham Pharmacia Biotech), 1 mM ADP-ribosa y 1 mM DTT. Se incubaron las muestras en acetona fría ON a -20°C y se centrifugaron a 16000xg durante 30 min. Se lavó el pellet dos veces con acetona fría y se resuspendió en loading buffer. Las muestras fueron sometidas a corrida electroforética por SDS-PAGE 15%. Luego se realizó una autorradiografía durante 24 hs.

6.2. Ensayo de Fluorometría: Aplicando la técnica de fluorometría, se midió la actividad enzimática de SpvB. En estos ensayos la polimerización de la actina puede ser visualizada por el incremento de fluorescencia luego del agregado de un buffer que permite dicha polimerización (buffer G). Se incubaron 0.5 μg ($6.66x10^{-8}$M) de SpvB pura, 0.4 mg/ml de actina marcada con pyrene (Actin Polymerization Biochem Kit) y 0.05mM de NAD durante 15 min a temperatura ambiente. Luego fue monitoreada la línea de base durante 3 minutos y por último se agregó a la reacción el buffer de polimerización de actina (buffer G) y la fluorescencia fue monitoreada durante 15 min. Como controles del ensayo se incubó a SpvB en ausencia de NAD y en presencia de un VHH no relacionado (VHHNR).

Para estimar la cantidad de enzima necesaria para inhibir la polimerización de actina, se utilizaron diferentes cantidades de SpvB. Para tal fin, se incubó 0.5 μg ($6.66x10^{-8}$M), 0.25 μg ($3.33x10^{-8}$M) y 0.05 μg ($6.66x10^{-9}$M) de SpvB pura, 0.4 mg/ml actina marcada con pyrene y 0.05 mM de NAD durante 15 min a temperatura ambiente. La línea de base fue evaluada durante 3 minutos y se agregó a la reacción el buffer G y la fluorescencia fue monitoreada durante 20 min. En todos los casos para monitorear la fluorescencia se utilizó un aparato espectrofotómetro de luminiscencia (Perkin Elmer).

7. Obtención de IgGs de llama y VHH recombinantes anti-SpvB

7.1. Inmunizaciones: Se inmunizaron dos llamas (*Lama glama*) con 3 dosis de 0.8 mg de ADN y 3 dosis de 250 μg de proteína. Para la inmunización con ADN se utilizó un vector de expresión que codifica para el C-terminal de SpvB (pME CD8F.SpvB.GPI^{DA}). Para la inmunización con proteína, se utilizó SpvB pura emulsionada en adyuvante incompleto de Freund (IFA, Sigma) en relación 1:1 v:v proteína:adyuvante. Se realizaron seis inmunizaciones en total, a intervalos de 21

días. Antes de las inmunizaciones y luego de las realizadas con proteína, se extrajo una muestra de sangre de la vena yugular para analizar la respuesta policlonal anti-SpvB generada por las inmunizaciones anteriores en ambas llamas. A los 20 días luego de la última inmunización, se extrajeron 120 ml de sangre heparinizada del animal con mejor respuesta (9208), para aislar células mononucleares y analizar la respuesta sérica policlonal.

7.2. Evaluación de la respuesta policlonal: El suero de la llama 9208 fue analizado por ELISA para determinar el título de anticuerpos anti-SpvB alcanzado luego de la última inmunización. Para ello se inmovilizó SpvB pura (0.5 μg en PBS) en pocillos de placa Maxisorp (Nunc) durante 2 hs y se bloqueó con 200 μl en 3% (m/v) leche descremada en PBST (bloqueante) ON a 4°C. A continuación, se incubaron los pocillos con diluciones seriadas del suero de llama durante 1 h diluidos en 1% (m/v) leche descremada en PBST. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG de llama desarrollado en conejo (dilución 1/1000), el cual se reveló con un anti-IgG de conejo conjugado a HRP desarrollado en cabra (Sigma) en dilución 1/1000. Se lavó, y se agregó una solución fresca de sustrato OPD. Luego de 10 min, la reacción cromogénica fue detenida por agregado de H_2SO_4 4N. La DO_{492} de cada pocillo fue medida en un lector de placas de ELISA (Σ960 Metertech Inc). En todos los pasos, salvo que se indique lo contrario, el volumen utilizado por pocillo fue de 50 μl; los lavados fueron realizados con PBST (3 repeticiones) y las incubaciones fueron realizadas en cámara húmeda. Cada determinación fue realizada por duplicado.

7.3. Construcción de una biblioteca de expresión en fagos de VHHs de llama: A partir de la sangre heparinizada de la llama 9208, se aislaron las células mononucleares por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque™ PLUS (GE Healthcare). El ARN total proveniente de las células fue purificado con TRIZOL (Invitrogen). El ARN obtenido fue analizado por electroforesis en gel de agarosa 1% en TBE para corroborar su integridad y cuantificado por absorbancia a 260 nm,

considerando que una DO_{260}=1.0 corresponde a 40 μg/ml de ARN. La muestra fue considerada altamente purificada (relación DO_{260}/DO_{280}≥1.8 a pH básico). A partir de 16 μg de ARN total, se procedió a realizar síntesis de la primera hebra incubando la muestra por 10 min a 70°C en presencia de 2 μg Oligo-dT18, se enfrió rápidamente y se llevó a 0.4 mM dNTPs, 1U/ul RNAsin, y 8U/μl MMLV-RT (Promega) en un volumen de 100μl en Buffer RT. Se incubó por 1 h a 42°C y se detuvo la reacción incubando 15 min a 70°C. El ADN doble cadena (dcADN) fue obtenido por PCR con primers específicos para VHH de llama (50). Se realizaron dos reacciones, utilizando 2 primers diferentes correspondientes a las primeras bases de la región variable,VH1b y VH6b que contienen sitios de reconocimiento de la enzima SfiI, con un primer complementario a la región bisagra de las hcIgG, Lam07 y Lam08 que contienen un sitio de reconocimiento de la enzima de restricción Not1. Las reacciones de PCR constaron de los siguientes ciclos: 1 ciclo inicial de desnaturalización (5 min a 95°C), 30 ciclos de amplificación (1 min 95°C, 1 min 55°C, 1 min 72°C) y un ciclo final de elongación (10 min 72°C). Los productos de PCR, de ≈500pb, fueron purificados desde gel de agarosa (GFX PCR DNA & Gel Band purification kit, Qiagen), digeridos secuencialmente por las enzimas de restricción SfiI y NotI y repurificados a partir de gel de agarosa. Los insertos fueron mezclados y ensayados en ligaciones a escala pequeña con el plásmido de expresión en fagos pHEN2 (**Figura 3**), que confiere resistencia a ampicilina (Amp) (186) previamente digerido con las enzimas SfiI y NotI. Se probaron dos relaciones molares vector:inserto diferentes. Para la relación molar 1:3 (vector:inserto) se utilizó 50 ng de plásmido y 15 ng de inserto, y para la relación molar 1:6 (vector:inserto) se utilizó 50 ng de plásmido y 30 ng de inserto. La eficiencia de transformación de cada una de las ligaciones y de una reacción control sin inserto fue determinada por transformación por pulso eléctrico de 50 μl de células de *E. coli* XL1 Blue electrocompetentes de alta eficiencia (~$3{,}3 \times 10^9$ ufc/μg ADN) con 1 μl de la reacción. Los parámetros del electroporador (BioRad Gene Pulser II System) se establecieron en 2.5 kV, 25 μF y 200 Ω. Como los resultados fueron satisfactorios con la relación

molar 1:3 vector:inserto se procedió a realizar ligaciones a alta escala. Se incubó 1 μg de vector con 300 ng de la mezcla de los insertos, 1X buffer ligasa y 0.1 U/μl de ligasa de bacteriófago T4 (Promega) en 200 μl de reacción, ON a 15°C. La reacción fue purificada mezclando 1 volúmen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico 25:24:1. Luego de centrifugar, la fase acuosa fue extraída 2 veces con cloroformo y precipitada con 0.15 volúmenes de acetato de sodio 2 M pH=5.2, 2 volúmenes de EtOH absoluto frío y 20 ng glucógeno ON a -20°C. Luego de centrifugar a 12.000xg 30 min a 4°C, el precipitado se lavó con EtOH 70%, se dejó secar y se resuspendió en 15 μl de ddH_2O estéril.

```
                 LMB3
         ---------------------->                  RBS
TT CAC ACA GGA AAC AGC TAT GAC CAT GAT TAC GCC AAG CTT GCA TGC AAA TTC

                                                pelB leader
TAT TTC AAG GAG ACA GTC ATA ATG AAA TAC CTA TTG CCT ACG GCA GCC GCT GGA
                             M   K   Y   L   L   P   T   A   A   A   G

                      SfiI
TTG TTA TTA CTC GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAGGTGCAGCTGCAGGTCGACCTCGAG
 L   L   L   L   A   A   Q   P   A   M   A


TGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTAGTGCACAGGTCCAACTGCAGGAGCTCGATATCA

          NotI            6xHis-tag
AACGG GCG GCC GCA CAT CAT CAT CAC CAT CAC GGG GCC GCA GAA CAA AAA CTC
       A   A   A   H   H   H   H   H   H   G   A   A   E   Q   K   L

       myc-tag                          Amber
ATC TCA GAA GAG GAT CTG AAT GGG GCC GCA TAG ACT GTT GAA AGT TGT TTA
 I   S   E   E   D   L   N   G   A   A   *
                                         E   T   V   E   S   C   L

                  fdSeq1
         <----------------------
GCA AAA CCT CAT ACA GAA AAT TCA TTT ...
 A   K   P   H   T   E   N   S   F  ...
```

Figura 3: Secuencia del sitio de clonado y regiones flanqueantes del vector para expresión en fagos pHEN2. Se detallan en negrita los sitios de reconocimiento de SfiI y NotI, el sitio de unión a ribosomas se encuentra subrayado. Se muestra la traducción a aminoácidos del péptido señal pelB, y también la de la región río abajo del inserto conteniendo las secuencias 6xHis-tag y myc-tag (subrayadas) y el codón ámbar. Los primeros aminoácidos de la proteína pIII del fago M13 se indican en itálica. Se muestran los primers usados para la secuenciación de los insertos. Adaptado de Griffiths (186).

Se procedió entonces a transformar 180 μl de células electrocompetentes con 3 μl de la ligación, en un total de 5 transformaciones. Se utilizó un total de 1.3 μg de ADN para las transformaciones. Se resuspendieron rápidamente las células electroporadas en 1.5 ml de medio SOC y se juntaron todas las transformaciones en un mismo tubo de cultivo (aproximadamente 7.5 ml volumen final) y se incubaron a 37°C durante 40 minutos con agitación para permitir la expresión de la resistencia a Amp otorgada por el plásmido.

Por un lado, se plaquearon alícuotas de estos cultivos en placas de LB agar + 100 μg/ml de Amp y se contó el número de colonias para determinar el tamaño de la biblioteca. Se tomaron 10 colonias únicas, se cultivaron en 3 ml de LB + Amp y se guardaron los cultivos para su posterior secuenciación y para analizar la variabilidad de la biblioteca.

Por otro lado, se le agregó al cultivo de células electroporadas 300 ml de medio 2xTY+ 100 μg/ml Amp + glucosa estéril 1% y se incubó por 1 h a 37°C con agitación, luego se agregó Amp hasta una concentración final de 50 μg/ml y se incubó por otra hora más en iguales condiciones. Se guardaron alícuotas de este cultivo como "stock" de la biblioteca a –70°C en 10% glicerol. El resto del cultivo fue llevado a 500 ml con medio 2xTY+ 100 μg/ml Amp y glucosa estéril 1% hasta DO≈0.5. Para obtener partículas de fagos que expresen VHHs como proteína de fusión con pIII, se determinó aproximadamente la densidad celular por absorbancia a 600 nm, considerando que una DO_{600}=1 corresponde a $8x10^8$ bacterias/ml y se agregó una suspensión de fagos helper VCS-M13 a una multiplicidad de infección (MOI: multiplicity of infection) MOI=20 de manera de asegurar la infección de todas las células y por ende la representación de todos los fagos, y se incubó media hora mas a 37°C en agitación. El cultivo fue centrifugado a 3000xg durante 10 minutos y luego fue resuspendido en 400 ml en medio 2xTY + 50 μg/ml Amp + 10 μg/ml Tetraciclina (Tet) + 70 μg/ml Kan, y se incubó ON a 30°C con agitación. El cultivo fue centrifugado, y los fagos del sobrenadante fueron precipitados agregando 4% PEG 8000 y 0.5M NaCl concentración final, incubando en hielo durante 1 hora y

centrifugando a 4000xg a 4°C durante 45 min. El precipitado se resuspendió en 5 ml de PBS estéril, de los cuales 1 ml se reservó para cuantificar el contenido de fagos, 3 ml se congelaron con N_2 líquido y se guardaron a -70°C y el mililitro restante se reservó para la selección de "binders" de SpvB.

7.4. Selección de fragmentos VHH anti-SpvB en solución: Se realizaron 3 rondas de selección (panning) en solución y para cada una de ellas se utilizaron dos concentraciones de SpvB biotinilado: 10 nM y 50 nM. Se mezcló la enzima biotinilada con los fagos de la biblioteca previamente cuantificados a una densidad de $1.6x10^{14}$ en 4% (m/v) leche descremada en PBS. Como control negativo se utilizaron los fagos de la biblioteca mezclados con PBS. Se incubaron los tubos durante 2 hs a temperatura ambiente con agitación suave para permitir la unión de VHHs a SpvB biotinilado. Luego se agregó 100 µl de esferas magnéticas con streptavidina previamente bloqueadas en 5% (m/v) leche descremada en PBS y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente para permitir la unión del complejo (VHH-fago+SpvB-esferas/streptavidina). Para separar el complejo del sobrenadante se utilizó un imán y se lavó 7 veces con 1% (m/v) leche descremada en PBST y de esta manera poder descartar los fagos no unidos específicamente. Los fagos retenidos al complejo fueron eluidos por cambio de pH utilizando 200 µl de 100 mM de trietilamina durante 5 min a temperatura ambiente agitando suavemente. Los fagos eluidos fueron rápidamente neutralizados agregando 100 µl 1M Tris HCl pH 7.4. Diez µl de los fagos eluidos fueron utilizados para infectar 2.5 ml de cultivo de células XL1Blue en fase exponencial incubando 30 min a 37°C y alícuotas de estos cultivos fueron plaqueadas en placas de LB agar + Amp para cuantificar.

El resto de los cultivos infectados con fagos provenientes de la primera ronda fue usado como fuente de fagos para la segunda ronda de selección. Cada cultivo (≈2,5ml) fue llevado a 8 ml de volumen con medio 2xTY + 100 µg/ml Amp + 10 µg/ml Tet + 1% glucosa estéril, crecido durante 1 h a 37°C, luego se agregó 50 µg/ml

Amp y se incubaron a 37°C por 1 h más. Se determinó aproximadamente la densidad celular por absorbancia a 600 nm, y se infectó cada cultivo con fago helper VCS-M13 a una MOI=20 y se incubó 30 min a 37°C. Los cultivos fueron centrifugados a 3000xg durante 10 min y luego resuspendidos en 150 ml de 2xTY + 100 μg/ml Amp + 10 μg/ml Tet + 70 μg/ml Kan. Los cultivos se incubaron ON a 30°C con agitación y al día siguiente los fagos del sobrenadante se precipitaron con 4% PEG 8000 y 0.5 M NaCl concentración final como se indicó anteriormente y se resuspendieron en PBS estéril. Los fagos previamente cuantificados se utilizaron para la segunda ronda de selección en condiciones idénticas a la primera. En este caso, se incubaron $2x10^{13}$ fagos y los mismos fueron eluidos de la misma manera que se realizó para la primera ronda. La tercera ronda de selección fue llevada a cabo en condiciones idénticas a las anteriores rondas, y se respetó el método de elución empleado. En la ronda 3 la cantidad de fagos incubados fue de $2x10^{13,}$ y los fagos eluidos fueron cuantificados por infección de cultivos bacterianos y alícuotas de los mismos fueron plaqueadas en placas de LB agar + Amp.

7.5. Evaluación del método de elución: A partir de los fagos eluidos con 50 nM de antígeno se infectaron 80 colonias de bacterias (20 provenientes de la ronda 1, 20 de la ronda 2 y 40 de la ronda 3) y se prepararon fagos a escala pequeña (200 μl) en placas de cultivo de 96 pocillos. Se analizó por ELISA la especificidad contra SpvB y se contó con diferentes controles. La placa fue sensibilizada con 0.5 μg de streptavidina en 50 μl PBS en pocillos de placa Maxisorp (Nunc) durante 2 hs a temperatura ambiente. Se lavó cada pocillo 3 veces con PBST y se agregó 0.5 μg de SpvB biotinilada en 50 μl PBS durante 2 hs a temperatura ambiente. Los pocillos se bloquearon con 200 μl 3% (m/v) leche descremada PBST ON a 4°C. La placa se lavó tres veces con PBST. A continuación se incubaron los pocillos con 50 μl de sobrenadante de los fagos producidos suplementados con 1% leche descremada durante 3 hs. Nuevamente la placa fue lavada 3 veces con PBST. Los fagos retenidos fueron revelados con un anticuerpo monoclonal anti-M13 conjugado a HRP (Sigma),

en dilución 1/2000. Luego, se lavo y se agregó una solución fresca de sustrato OPD. La reacción cromogénica fue detenida por agregado de H_2SO_4 4N, y la DO_{492} de cada pocillo fue medida en un lector de placas de ELISA (Σ960 Metertech Inc). Se utilizó como control positivo fagos producidos a partir de una biblioteca de VHH anti-transialidasa, como control negativo se utilizaron fagos de la ronda 3 los cuales fueron incubados en pocillos sin sensibilizar. Se utilizó el programa GraphPad Software para graficar el ELISA de fagos. Se seleccionaron 10 clones positivos de la ronda 2 y 10 clones de la ronda 3 y los mismos fueron secuenciados.

8. Secuenciación de clones de interés: Fueron secuenciados 10 clones anti-SpvB de la ronda 2 y 10 clones de la ronda 3, ambos provenientes de la selección con 50 nM de antígeno. Se cultivaron las bacterias en medio selectivo y a partir de colonias aisladas se crecieron ON a 37°C con agitación en 3 ml de medio. Se obtuvo el ADN plasmídico en preparación de baja escala (miniprep) utilizando un kit comercial (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen). La integridad y pureza de la preparación fue evaluada por electroforesis en gel de agarosa 1% (m/v) en TBE. La concentración fue determinada por absorbancia a 260 nm, considerando que una DO=1 corresponde a 50 ng/µl de dcADN. A partir de muestras de buena calidad y concentración ≥ 200 ng/µl se secuenció el inserto correspondiente al VHH utilizando los primers LMB3 (5'caggaaacagctatgac3') y Fdseq1 (5'gaattttctgtatgagg3') (**Figura 3**), complementarios a regiones del vector flanqueantes al sitio de clonado, en el servicio de secuenciación de la Fundación Instituto Leloir. Las secuencias fueron analizadas utilizando el programa NCBI blast.

8.1. Expresión y purificación de VHHs solubles: Se eligieron 5 VHHs representativos con diferente longitud en su CDR3 y se expresaron los fragmentos VHHs de interés (VHH5, VHH6, VHH16, VHH38 y VHH1) transformando con el ADN puro la cepa *E. coli* Top10, que al ser no supresora reconoce el codón ámbar

entre el VHH y pIII como codón stop, secretando VHH al espacio periplasmático. A partir de 1 litro de cultivo bacteriano en LB + 50 μg Amp en fase exponencial (DO=0.7) se indujo la expresión de VHH agregando 1 mM IPTG 1 e incubando 4 hs a 30°C en agitación. Se aisló luego la fracción periplásmica por shock osmótico, resuspendiendo el precipitado bacteriano en 60 ml de TES frío, incubando en hielo durante 10 min y centrifugando 4000xg durante 20 min a 4°C. El sobrenadante se reservó y el precipitado se resuspendió en 40 ml de TES:H_2O relación 1:4 frío, se incubó nuevamente en hielo y se centrifugó, y el sobrenadante se mezcló con el anterior y se dializaron los ≈100ml con el buffer ISP10 ON a 4°C. Se aplicó la fracción soluble de la diálisis a una columna de afinidad de níquel (HiTrap™ Amersham Biosciences) previamente equilibrada en el mismo buffer de diálisis. Luego de lavar extensivamente con el mismo buffer, las proteínas retenidas se eluyeron aplicando el buffer ISP250 en un gradiente continuo de 10 mM a 250 mM de imidazol en 60 min. Los picos de absorbancia a 280 nm fueron colectados y alícuotas de cada fracción fueron evaluadas por SDS-PAGE 15%. Las muestras con proteína de interés fueron dializadas en PBS y se sometieron a un segundo paso de purificación por columna S75 la cual previamente había sido equilibrada con 0.5 M NaCl en PBS. La proteína de interés migra con un PM aparente cercano a los 20 KDa. Se determinó la concentración de VHH por absorbancia a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción teórico obtenido a partir de la secuencia aminoacídica correspondiente, usando el programa ProtParam (www.expasy.ch).

9. Ensayos *in vitro* de la inhibición enzimática de SpvB: Radioactividad y Fluorometría

9.1. Radioactividad: Se incubaron 10 ng ($1.21X10^{-9}$ M) de SpvB con 10 μg ($2.16X10^{-6}$ M) de los VHH seleccionados (VHH1, VHH6, VHH5, VHH16 y VHH38) y con un VHH no relacionado (VHH NR) durante 1 h a 37°C. Luego se agregó un lisado de células CHO ($1x10^6$ células), 1 μCi [^{32}P]-NAD (Amersham), 1 mM ADP-ribosa y 1

mM DTT y se incubó nuevamante durante 10 min a 37°C. Se agregó a cada reacción loading buffer y las muestras fueron calentadas durante 10 min a 95°C y sometidas a una corrida electroforética en gel SDS-PAGE 15%. Luego, el gel fue secado y sometido a autorradiografía durante 24 hs a -80°C. También se llevaron a cabo ensayos de dosis respuesta, y para tal fin se incubaron 10 ng de SpvB con dosis incrementadas de VHHs las cuales fueron de 10 ng hasta 10 μg. Cada reacción de VHHs y enzima fue incubada durante 1 h a 37°C y luego se agregó a cada una de ellas un lisado de células CHO ($1x10^6$ células), 1 μCi [^{32}P]-NAD (Amersham), 1 mM ADP-ribosa y 1 mM DTT y se incubaron durante 10 min a 37°C. Luego, a cada reacción se le agregó loading buffer y las muestras fueron calentadas durante 10 min a 95°C y sometidas a una corrida electroforética en gel SDS-PAGE 15%. El gel fue sometido a autorradiografía durante 24 hs a -80°C. Se utilizó un equipo Storm (Molecular dynamics,Amersham Pharmacia Biotech) para observar la actina marcada radioactivamente.

9.2. Fluorometría: Para todos los ensayos se utilizó 0.5 μg ($6.66X10^{-8}$ M) de SpvB pura y se incubó durante 1 h a temperatura ambiente con diferentes concentraciones de los VHHs seleccionados. Para el VHH1 se utilizaron $4X10^{-7}$M; $3.2X10^{-7}$M; $2.4X10^{-7}$M; $1.6X10^{-7}$M. Para el VHH5 se utilizaron $1.33X10^{-7}$ M; $6.66X10^{-8}$ M; $4.66X10^{-8}$ M; $3.33X10^{-8}$ M; $2.33X10^{-8}$ M y $1.33X10^{-8}$ M. Para VHH6 se utilizaron $8.69X10^{-8}$ M; $1.73X10^{-7}$ M; $4.34X10^{-8}$ M; $2.60X10^{-8}$M; $1.3X10^{-8}$M. Para VHH38 se utilizaron $2.4X10^{-7}$M; $1.6X10^{-7}$M; $8X10^{-8}$M; $4X10^{-8}$M. Se agregó a cada reacción una concentración de 0.4 mg/ml de actina marcada con pyrene (Actin Polymerization Biochem Kit) y 0.05 mM NAD durante 15 min a temperatura ambiente. Luego la línea de base fue monitoreada durante 3 min y por último se agregó el buffer de polimerización (buffer G) y la señal de fluorescencia fue monitoreada durante 20 min mediante un espectrofotómetro de luminiscencia. En cada ensayo se incluyó un control que indicó el 0% de polimerización de actina compuesto por 0.5 μg ($6.66X10^{-8}$ M) de SpvB, 0.4 mg/ml de actina marcada con pyrene y 0.05 mM NAD, y un control que indicó el

100% de polimerización de actina compuesto por 0.4 mg/ml de actina marcada con pyrene y 0.05 mM NAD. Para ambos controles se siguió el mismo protocolo de incubación que para el detallado anteriormente. Para monitorear la fluorescencia se utilizó un aparato espectrofotómetro de luminiscencia (Perkin Elmer). Se calculó el porcentaje de inhibición de los VHHs seleccionados a partir de las curvas de fluorescencias. Para tal fin se fijó un tiempo de 800 segundos y se tomó como referencia los valores de 100% y 0% de polimerización actina. Para cada relación molar de cada uno de los VHH analizados se calculó el porcentaje de inhibición y se realizó un ajuste de los datos utilizando el programa ORIGEN Pro 8. Para monitorear la fluorescencia se utilizó un aparato espectrofotómetro de luminiscencia (Perkin Elmer).

10. Expresión de VHHs en células eucariotas

10.1. Clonado de VHH5 y VHHNR: Fue seleccionado VHH5 y un VHH no relacionado (VHHNR) para clonarlos en el vector de expresión eucariota $pcDNA_6$ (Invitrogen). Se desarrolló el mismo protocolo para ambos VHHs. Todas las reacciones de PCR constaron de los siguientes ciclos: 1 ciclo inicial de desnaturalización (5 min a 95°C), 30 ciclos de amplificación (1 min 95°C, 1 min 55°C, 1 min 72°C) y un ciclo final de elongación (10 min 72°C). El fragmento VHH fue amplificado por PCR a partir del vector pHEN2 con el primer (primer2 N-ter-EcoRI 5′ GAG GGA AGG ATT TCA *GAA TTC* GCC CAG GTG AAA CTG CAG G 3′) y con el primer VHH-XbaI. Los productos de PCR de ≈500pb fueron digeridos secuencialmente por las enzimas de restricción EcoR1 y XbaI (NEB) y purificados desde gel de agarosa (GFX PCR DNA & Gel Band purification kit, Qiagen). Los fragmentos fueron ligados en el vector procariota pMAL-c2 (NEB) el cual había sido previamente digerido con las mismas enzimas. Este vector posee el gen *malE* que codifica para la proteína de fusión MBP. Se utilizaron 50 ng de plásmido y 15 ng de

inserto (relación molar 1:3 vector inserto) para la ligación. La eficiencia de transformación de la ligación y de una reacción control sin inserto fue determinada por transformación por shock térmico de 50 µl de células de *E. coli* DH5α con 1 µl de la reacción. Se resuspendieron las células transformadas en 3 ml de medio LB y se incubó a 37°C durante 45 min con agitación para permitir la expresión de la resistencia a Amp otorgada por el plásmido. Se plaquearon alícuotas de estos cultivos en placas LB agar 50 µg/ml Amp. Algunas colonias positivas fueron seleccionadas y se cultivaron en 3 ml de medio LB+Amp y su ADN se purificó el mediante minipreps (Invitrogen). Se procedió entonces a realizar una segunda PCR utilizando los primers específicos para obtener el fragmento MBP-VHH (MBP-VHH-HindIII y VHH5-XbaI, ver tabla). Los productos de PCR obtenidos de aproximadamente 1.500 pb fueron digeridos secuencialmente con las enzimas de restricción HindIII y XbaI (NEB), purificados desde gel y ligados en el vector de expresión eucariota pcDNA$_6$ (Invitrogen) el cual había sido previamente digerido con las mismas enzimas. La eficiencia de transformación de la ligación y de una reacción control sin inserto fue determinada por transformación por shock térmico de 50 µl de células de *E. coli* DH5α con 1 µl de la reacción. Se resuspendieron las células transformadas en 3 ml de medio LB y se incubó a 37°C durante 45 min. Se plaquearon alícuotas de estos cultivos en placas LB agar 50 µg/ml Amp. Se seleccionaron 5 colonias y por digestión y secuenciación las mismas dieron resultados positivos, es decir, todos los clones seleccionados tenían el fragmento MBP-VHH5 y MBP-VHHNR.

Otra estrategia empleada fue obtener a los VHHs sin la MBP. Para tal fin se siguió un protocolo similar al mencionado anteriormente. La diferencia radicó en que los fragmentos amplificados por PCR a partir del vector pHEN2 fueron directamente clonados en el vector de expresión eucariota pcDNA$_6$. Para tal fin, se utilizaron los primers (primer4 N-ter- EcoRI 5´ GAG GGA AGG ATT TCA <u>*GAA TTC*</u> ATG GCC CAG GTG AAA CTG CAG G 3') y el primer VHH-XbaI. Se obtuvieron clones positivos de la construcción VHH5-His-pcDNA$_6$ y VHH1-His-pcDNA$_6$.

10.2. Análisis de la expresión de VHHs. Western Blot e Inmunofluorescencia: Se realizó una maxiprep (Quiagen) con las construcciones obtenidas anteriormente. Se creció un cultivo de 500 ml y se siguieron las instrucciones del fabricante. La integridad y pureza del ADN fue chequeada por electroforesis en gel de agarosa 1% (m/v) en TBE. La concentración fue determinada por absorbancia a 260 nm, considerando que una DO=1 corresponde a 50 ng/µl de dcADN. Obtenido el ADN de ambas construcciones, se procedió a transfectar células eucariotas. Se utilizaron varias líneas celulares: HEK, Hela, macrófagos RAW y J774 y Vero (ATCC). En todos los casos se incubó 1 µg de vector (MBP-VHH5 o MBP-VHHNR) con el reactivo de transfección Jet-Pei (Polyplus transfection) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Las células fueron cultivadas en RPMI (PAA) y 5% SFB (PAA) en estufa a 37°C, 5% CO_2 y llevadas a 50% de confluencia. Las células fueron transfectadas y se dejaron durante 24 hs para permitir la expresión del VHH en el citoplasma de las mismas. Para analizar la expresión de los VHHs por western blot en las diferentes líneas celulares, las células fueron tripsinizadas (TrypLE™ Express, GIBCO) y lisadas con 0.05% de tritón en PBS. El lisado fue resuspendido en loading buffer y las muestras fueron sometidas a corrida electroforética en SDS-PAGE 15%. Se corroboró la expresión MBP-VHH revelando con un anticuerpo primario anti-MBP (policlonal de conejo, Abcam) y uno secundario anti-conejo IgG conjugado a HRP (Sigma). Las células que fueron transfectadas con la construcción VHH5-His se revelaron con un anticuerpo anti-His Peroxidasa (Sigma).

Para analizar la expresión de MBP-VHH por inmunofluorescencia las células fueron cultivadas en placas de 24 wells y crecida ON sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro (Deckglaser) y luego transfectadas como se detallo anteriormente. Posteriormente se fijaron con 4% de paraformaldehído y se permeabilizaron con 0.05% de tritón X100 en PBS. Las células fueron incubadas con un anticuerpo primario anti-MBP (policlonal de conejo, Abcam) y uno secundario anti-IgG de conejo acoplado a Cy™ 3 (Amersham). Las células coloreadas de rojo denotan la

expresión del VHH en el citoplasma de las mismas. Los núcleos fueron teñidos de color azul (Hoechst, Invitrogen).

11. Infección de macrófagos con *Salmonella typhimurium* y *Salmonella* mutante

Las cepas de *Salmonella typhimurium* y *Salmonella* mutante (wt y mut respectivamente) fueron crecidas ON en medio LB suplementado con 0.3 M NaCl a 37°C sin agitación. Las bacterias fueron usadas para infectar macrófagos a una MOI=100. *Salmonella* mutante posee delecionado el gen spvB, por lo tanto no expresa la proteína SpvB. Esta mutante fue cedida por el laboratorio de la Dra. Eleonora García Véscovi y la misma fue realizada por el Dr. Andrés Aguirre.

La línea celular RAW 264.7 (ATCC) fue cultivada en placas de 24 pocillos en RPMI 1640 (PAA) con 5% SFB (PAA) y crecida ON sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro (Deckglaser) a 37°C en estufa con 5% de CO_2. Las células fueron transfectadas con 1 μg de ADN de cada una de las construcciones (MBP-VHH5 y MBP-VHHNR) utilizando el reactivo JetPEI (Polyplus transfection) y siguiendo el protocolo del fabricante. Las células fueron incubadas 24 hs a 37°C y CO_2 5% para permitir la expresión de VHH en el citoplasma celular. Luego, fueron lavadas 3 veces con HBSS (Hanks Balanced SALT Solution, GIBCO) e infectadas con las cepas de *Salmonella* wt y *Salmonella* mut, centrifugadas a 18°C durante 10 min a 200xg para permitir el contacto de la bacterias con los macrófagos. Para permitir la entrada del patógeno a la célula hospedadora se incubó durante 30 min en estufa a 37°C y 5% CO_2. Luego, el sobrenadante fue aspirado cuidadosamente y las células fueron lavadas 2 veces con HBSS. Se agregó RPMI 1640 suplementado con 5% de SFB y gentamicina 50 μg/ml. Las células fueron cultivadas durante 16 hs a 37°C en estufa con 5% de CO_2. Para realizar la inmunofluorescencia, se lavaron 2 veces las células con HBSS y se fijaron con 4% de paraformaldehído durante 15 min. Luego fueron lavadas nuevamente dos veces con HBSS y permeabilizadas con 0.05% Triton X-100

en PBS durante 5 min. La actina fueron teñidos y visualizada con faloidina-FITC (Sigma). Las bacterias fueron teñidas con un anticuerpo primario anti-LPS de *Salmonella typhimurium* (Abcam, 1/2000) y un anticuerpo secundario Alexa 350 (Molecular Probes, 1/200). Para confirmar la expresión intracelular de VHHs se utilizó un anticuerpo primario anti-MBP (Abcam 1/2000) y luego un anticuerpo secundario IgG Cy^{tm}3-Linked (Amersham). Las muestras fueron visualizadas por microscopia de fluorescencia.

12. Ensayos citopáticos utilizando la quimera C2IN-C/SpvB

Células Vero fueron cultivadas en DMEM (GIBCO) suplementadas con 5% SFB (PAA) a 37°C y 5% de CO_2 durante 24 hs en botellas de 25 cm^2. Las células fueron transfectadas con 5 μg de ambas construcciones (MBP-VHH5 y MBP-VHHNR) y con 0.5 μg de GFP-pcDNA6 como control de transfección. Se utilizó el reactivo jetPEI (Polyplus transfection) y las células fueron incubadas durante 6 hs a 37°C en estufa con CO_2 5%. Luego de la incubación, las células fueron lavadas 3 veces con DMEM y tripsinizadas (TrypLE™, GIBCO) y cultivadas en placas de 24 pocillos con DMEM y 5% SFB sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro durante 12 hs. Para los ensayos citopáticos, se ensayaron diferentes cantidades de toxinas, las cuales fueron: C2I (0.1 μg/ml) + C2IIa (0.2 μg/ml) y de C2IIa (0.5 μg/ml) + C2IN-C/SpvB (0.25 μg/ml); por otro lado: C2I (0.2 μg/ml) + C2IIa (1 μg/ml) y de C2IIa (2 μg/ml) + C2IN-C/SpvB (1 μg/ml) y por último: : C2I (0.5 μg/ml) + C2IIa (1 μg/ml) y de C2IIa (5 μg/ml) + C2IN-C/SpvB (2.5 μg/ml). Sólo con la última combinación de concentraciones de toxinas se observó el redondeamiento del 100% de las células. Las células fueron incubadas con las toxinas durante 3 hs a 37°C y 5% de CO_2 y luego lavadas dos veces cuidadosamente con DPBS (GIBCO). Las células fueron fijadas con 4% de paraformaldehído durante 15 min, lavadas dos veces con DPBS y permeabilizadas con 0.05 Triton X-100 en DPBS durante 5 min. La actina fue teñida con faloidina-

FITC (SIGMA). Las células transfectadas fueron teñidas con un anticuerpo primario anti-MBP (Abcam, 1/2000) y un anticuerpo secundario IgG Cy^{tm}3-Linked (Amersham). Las muestras fueron visualizadas por microscopia de fluorescencia.

13. Ensayos citopáticos utilizando la quimera C2IN-C/SpvB y VHH5 como proteína

Se pre-incubaron 10 μg del VHH5 con 2.5 μg/ml de C2IN-C/SpvB durante 15 min a 4°C. Como control se incubaron 10 μg del VHH5 y 0.5 μg/ml de C2 con 1 μg/ml de C2IIa; 0.5 μg/ml C2I con 1 μg/ml C2IIa y células sin toxinas. Las células fueron incubadas durante 3 hs a 37°C y 5% de CO_2 con las toxinas. Luego se tomaron fotografías de contraste de fase para observar la morfología de las células tratadas con las toxinas.

RESULTADOS Y CONCLUSIONES

1. Producción del dominio C-terminal de la enzima SpvB

El dominio catalítico C-terminal de la enzima SpvB de *Salmonella typhimurium* fue clonado, expresado, purificado y obtenido como proteína recombinante. Luego, fue utilizado para inmunizar llamas y para estudios de actividad e inhibición enzimática de SpvB. Todos los ensayos de esta Tesis fueron realizados con el dominio C-terminal de SpvB, a excepción de los ensayos intracelulares donde se utilizó el patógeno. Por lo tanto, nos referiremos al dominio catalítico C-terminal de esta enzima como "SpvB".

Para obtener SpvB expresada y purificada, el gen del dominio C-terminal de la enzima fue clonado en el vector pET-26b(+). La clonación introduce un 6xHis-tag en el extremo C-terminal de SpvB lo que facilita su posterior purificación. Luego, se transformaron bacterias para expresar la proteína en forma recombinante. En la primera purificación se confirmó la identidad de la proteína por Western Blot (no mostrado). SpvB fue expresada y purificada de citoplasma y de cuerpos de inclusión y su rendimiento fue evaluado. Para ambos casos se realizaron dos pasos de purificación, uno inicial por columna de níquel y uno posterior por tamiz molecular (S75: Superdex 75). Tanto la expresión y la purificación como cada una de las fracciones eluidas fueron analizadas por SDS-PAGE. Cuando SpvB fue purificada de cuerpos de inclusión se realizó un análisis por dicroísmo circular de la proteína en el UV lejano y pudimos confirmar que la misma se encontraba correctamente plegada. En la **Figura 4** se muestra un gel SDS-PAGE de la proteína SpvB purificada a partir de citoplasma (**A**) y de cuerpos de inclusión (**B**) luego de la purificación por S75.

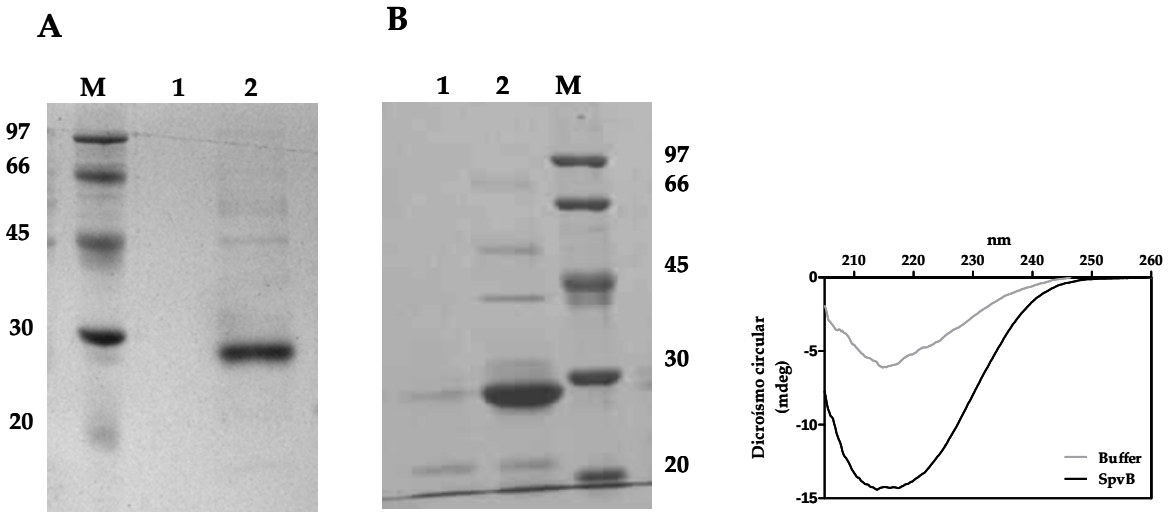


Figura 4. Purificación de SpvB. Se muestra la corrida electroforética correspondiente a una alícuota del pico obtenido de SpvB luego de la S75. **A:** Purificación a partir de citoplasma. **B**: Purificación a partir de cuerpos de inclusión y espectro de dicroísmo circular. Se observan en ambos geles las fracciones eluidas de la S75 correspondientes a un PM aproximado de 28 KDa.(Calle 2: SpvB) y a proteínas de mayor PM (Calle 1); **M**: Marcadores de PM en KDa.

Se pudo observar una banda aproximada a los 28 KDa correspondiente al peso esperado de SpvB. El grado de pureza a partir de citoplasma y cuerpos de inclusión resultó adecuado, aunque nunca se logró obtener un 100% de pureza para ambos casos. Luego de varios intentos por mejorar las purificaciones que provenían de citoplasma logramos obtener rendimientos satisfactorios. Por ejemplo, pudimos observar que la incubación de cultivos a 28°C en agitación toda la noche mejoró notablemente la expresión de SpvB en el citoplasma. El rendimiento en general fue de 0.5 a 2 mg de SpvB por litro de cultivo para ambos casos.

Debido a que no se encontraron importantes diferencias al obtener SpvB de citoplasma o cuerpos de inclusión, las purificaciones fueron obtenidas a partir de citoplasma, lo cual no requiere el replegamiento de la proteína. Se biotinilaron fracciones purificadas de SpvB para estudios posteriores y la biotinilación fue corroborada por ELISA (no mostrado).

Por lo tanto, fue posible expresar y purificar el dominio catalítico C-terminal de SpvB tanto a partir de citoplasma como de cuerpos de inclusión, con un rendimiento adecuado.

2. Medición de la actividad enzimática de SpvB.

Para poder analizar la actividad enzimática de SpvB, luego de purificar la enzima, desarrollamos dos técnicas muy diferentes entre si: radioactividad y fluorometría.

En los ensayos por radioactividad, la incorporación de la ADP-ribosa en la molécula de actina a partir del NAD marcado radioactivamente (^{32}P-NAD) indica que la actina es ADP-ribosilada por la enzima SpvB. Esta técnica es muy utilizada por varios autores para medir la actividad enzimática de SpvB (177, 178-179, 187). A continuación se muestra en la **Figura 5** una representación esquemática de la reacción.

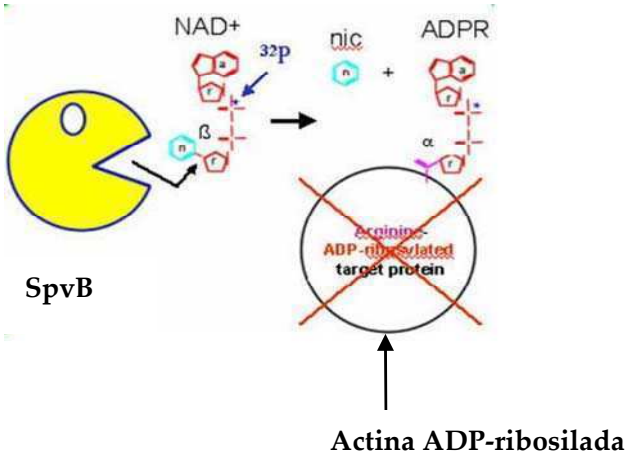


Figura 5. Representación esquemática de la actividad enzimática de SpvB. Se puede observar cómo SpvB se une a la molécula de NAD, libera la nicotinamida y transfiere la ADP-ribosa a proteínas blanco, como la actina en este caso. Cuando la actina es ADP-ribosilada, sus filamentos se depolimerizan.

Para medir la actividad enzimática de las fracciones purificadas a través de esta técnica, 1 μg de la enzima pura fue incubada en presencia de ^{32}P-NAD y de un lisado de células CHO, el cual fue utilizado como fuente de actina. Los ensayos se realizaron a 37°C. La marca radioactiva observada a un peso molecular de 43 KDa (PM aproximado de la migración electroforética de la molécula de actina) indica que SpvB ADP-ribosila la actina presente en el lisado de las células. Empleando la misma técnica, pero cambiando la fuente de actina, es decir utilizando actina comercial, también se observó la marca radioactiva a los 43 KDa. Pudimos utilizar como control positivo SpvB pura, proveniente del laboratorio del Dr Fritz Koch-Nolte, a la cual se le había medido la actividad enzimática con resultados satisfactorios. En la **Figura 6** se muestra una autorradiografía con las bandas de actina marcadas radioactivamente.

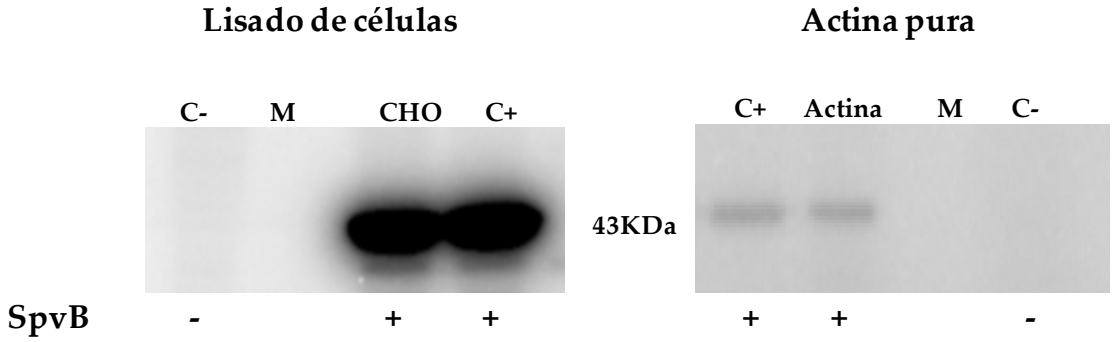


Figura 6. Autorradiografía. ADP-ribosilación de la molécula de actina. La marca de actina radioactiva indica que SpvB ADP-ribosila a la molécula de actina. **C-** (control negativo): control sin enzima; **C+** (control positivo): control con enzima; **M**: marcadores de PM.

Claramente se pudo observar que el dominio C-terminal de SpvB purificado tenía actividad ADP-ribosiltransferasa, observándose por autorradiografía la marca de una única banda radioactiva a los 43 KDa, lo cual indicó que la actina fue ADP-ribosilada.

Aplicando la misma técnica se analizó la cantidad mínima necesaria de SpvB para ADP-ribosilar a la actina. El ensayo fue realizado de manera muy similar que el mencionado anteriormente. Aquí, también se utilizó un lisado de células CHO, pero antes de lisar las células las mismas fueron previamente contadas para añadir aproximadamente una cantidad similar de actina a cada reacción. Decidimos sumar una variable más al ensayo que fue el tiempo de incubación. En la **Figura 7** se muestra una autorradiografía con bandas marcadas radioactivamente a los 43 KDa correspondientes a la molécula de actina.

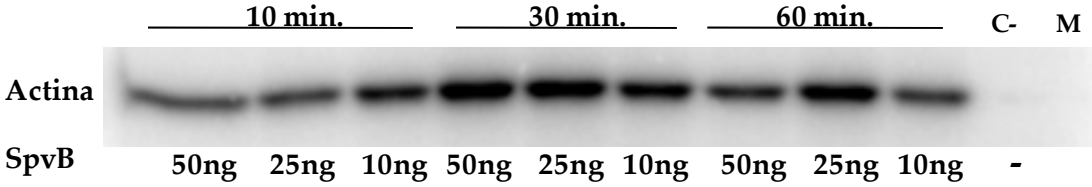


Figura 7. Radioactividad. ADP-ribosilación de la molécula de actina en diferentes condiciones. Se muestra la marca de actina radioactiva correspondiente a los 43KDa para todas las condiciones ensayadas. **C- (control negativo**): control sin enzima; **M**: marcadores de PM.

Como se pudo visualizar por autorradiografía, aún a bajas cantidades de enzima y tiempos de incubación cortos, SpvB ADP-ribosila la molécula de actina. En todas las reacciones ensayadas solo se observó una única banda de 43 KDa marcada radioactivamente indicando la especificidad de SpvB por su sustrato. La actina fue ADP-ribosilada independientemente de la cantidad de enzima como también de los tiempos de incubación ensayados.

A partir de estos resultados pudimos demostrar y corroborar que las fracciones de SpvB que habían sido purificadas tenían actividad enzimática y además, que son suficientes 10 ng de enzima durante 10 minutos de incubación para ADP-ribosilar a la actina.

También existe otra manera de medir la actividad enzimática de SpvB (179) la cual llevamos a cabo debido a que la misma sería de gran utilidad para futuros ensayos. La técnica de fluorescencia nos permite una evaluación cuantitativa y sensible para medir la actividad enzimática de SpvB. En este ensayo la actina marcada con pyrene (actina-pyrene) se encuentra en forma de monómero (G-actina) y para que pueda polimerizar es necesario agregar a la reacción un buffer de polimerización de actina. La molécula pasa de un estado de monómero a un estado de formación de filamentos, es decir, de polimerización (la actina pasa de G-actina a F-actina). La F-actina, a diferencia de la G-actina, emite fluorescencia; por lo tanto, en este ensayo un incremento en la fluorescencia a través del tiempo indica que la actina fue polimerizada. Se puede observar este fenómeno en la **Figura 8** en la curva denominada actina-pyrene. Cuando 0.5 μg de SpvB fue incubado con actina-pyrene y con NAD no se observó incremento de fluorescencia, indicando que SpvB impidió la polimerización de la actina (**Figura 8**, curva SpvB). Por otro lado, la ausencia de sustrato NAD en la reacción mostró una curva con incremento de la fluorescencia (**Figura 8**, SpvB sin NAD). Debido que a partir de esta técnica evaluaremos la capacidad inhibitoria de VHHs seleccionados contra SpvB, consideramos importante incluir en este ensayo un grupo control conteniendo en la reacción un VHH no relacionado (VHHNR). La incubación de SpvB con VHHNR mostró ausencia completa de fluorescencia (**Figura 8**, SpvB + VHHNR). En la **Figura 8** se pueden apreciar todas las curvas mencionadas anteriormente.

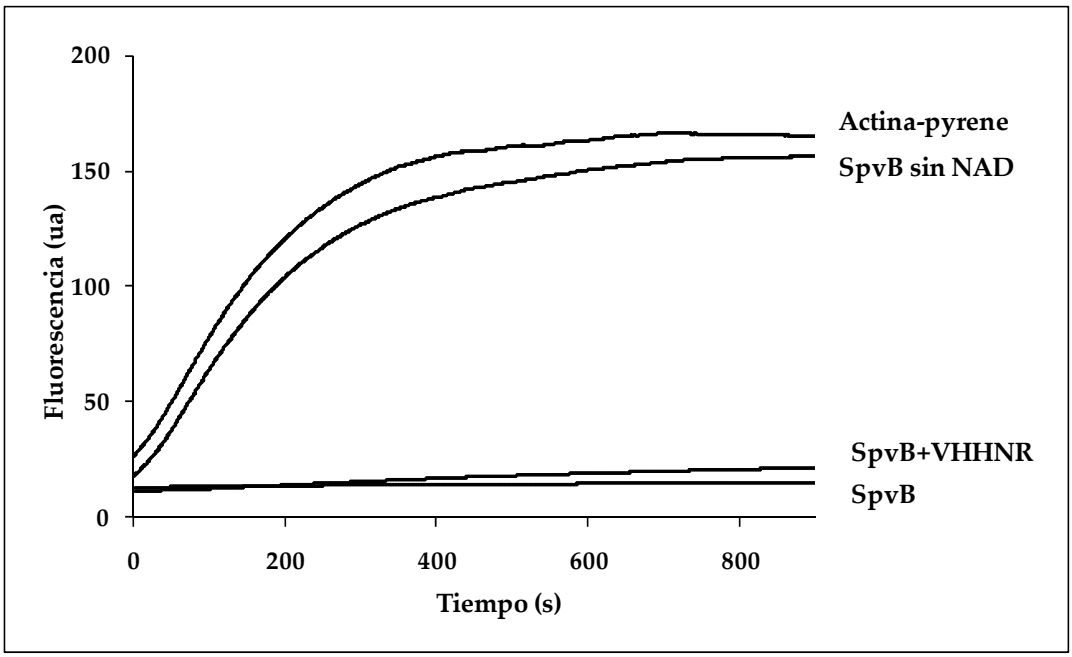


Figura 8. Fluorometría. Inhibición de la polimerización de actina por SpvB. El incremento en la fluorescencia a través del tiempo indicó que la actina fue polimerizada. El agregado a la reacción de SpvB y de un VHH NR mostró ausencia completa de la fluorescencia.

Se pudo observar claramente que SpvB ADP-ribosila la actina, impidiendo su polimerización, y que para tal efecto utiliza la molécula de NAD como sustrato de la reacción. El agregado de un VHH NR no inhibió la actividad enzimática de SpvB.

Para cuantificar la cantidad mínima requerida de SpvB para ADP-ribosilar a la actina incubamos durante 10 minutos diferentes cantidades de SpvB, con NAD y actina-pyrene. A medida que se agregaron dosis mayores de SpvB se observó una disminución de la fluorescencia. En la **Figura 9** se muestran tres curvas con diferentes cantidades de SpvB y una curva correspondiente al control sin enzima (actina-pyrene).

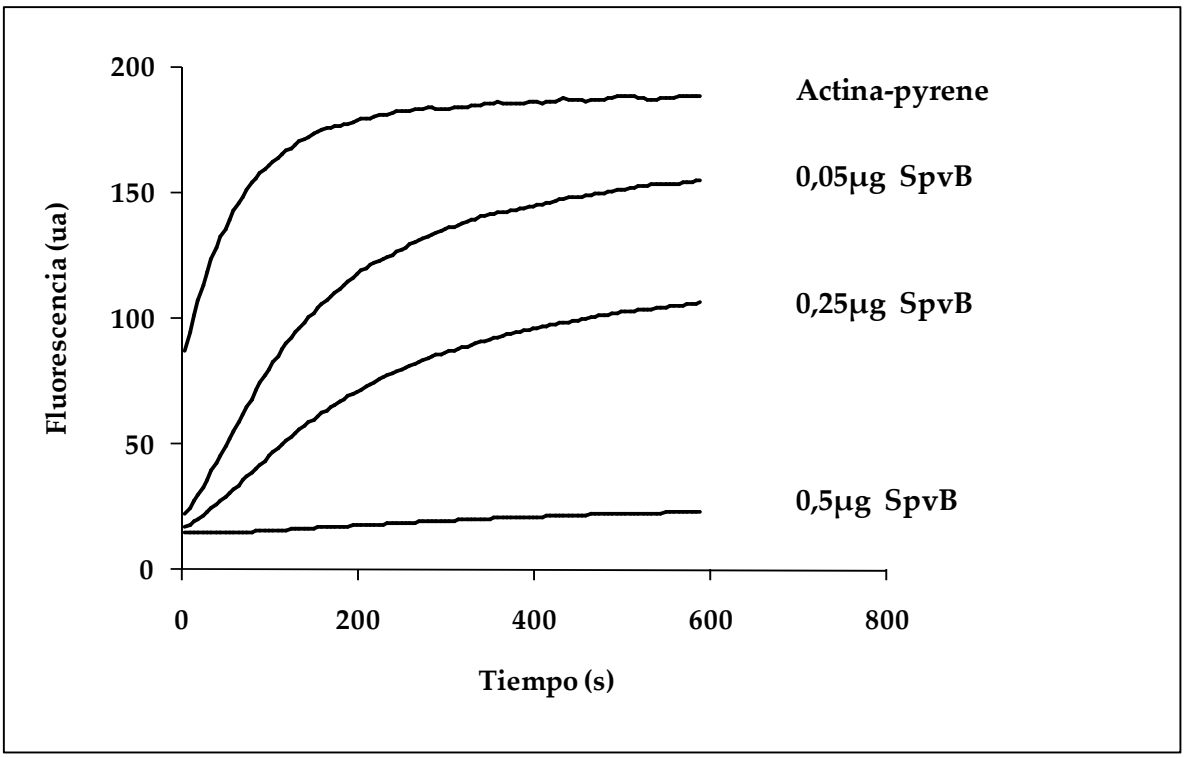


Figura 9. Fluorometría. Inhibición de la polimerización de actina con diferentes cantidades de SpvB. Se muestra la variación de la fluorescencia en función del tiempo. Para que la actina esté totalmente ADP-ribosilada se requieren 0.5 µg ($6.6x10^{-8}$M) de enzima. Se muestra también la curva control sin SpvB (Actina-pyrene).

Se observó claramente que con 0.5 µg de SpvB la totalidad de la actina presente en la reacción fue ADP-ribosilada. Por lo tanto, a partir de fracciones purificadas de SpvB y aplicando dos técnicas diferentes entre si, pudimos observar que con una determinada cantidad de enzima a tiempos cortos de incubación, SpvB ADP-ribosila la actina. La enzima utiliza de manera específica al NAD y a la actina como sustratos de la reacción.

El hecho de contar con métodos sencillos para medir la actividad enzimática de SpvB nos permitió diseñar estrategias de inmunización en llamas con SpvB para obtener hcIgG, por lo que nos abocamos a ello.

3. Producción de fragmentos de anticuerpos de llamas: VHHs

Para obtener las regiones variables VHHs de las hcIgG a partir de una biblioteca de expresión en bacteriófagos se diseñó un plan de inmunización en llamas. Luego, VHH que reconocieron a la enzima fueron seleccionados, secuenciados y purificados. Se realizaron ensayos *in vitro* e intracelulares de la inhibición enzimática de SpvB. En la **Figura 10** se muestra un esquema del protocolo utilizado para la construcción de la biblioteca y la obtención de VHHs.

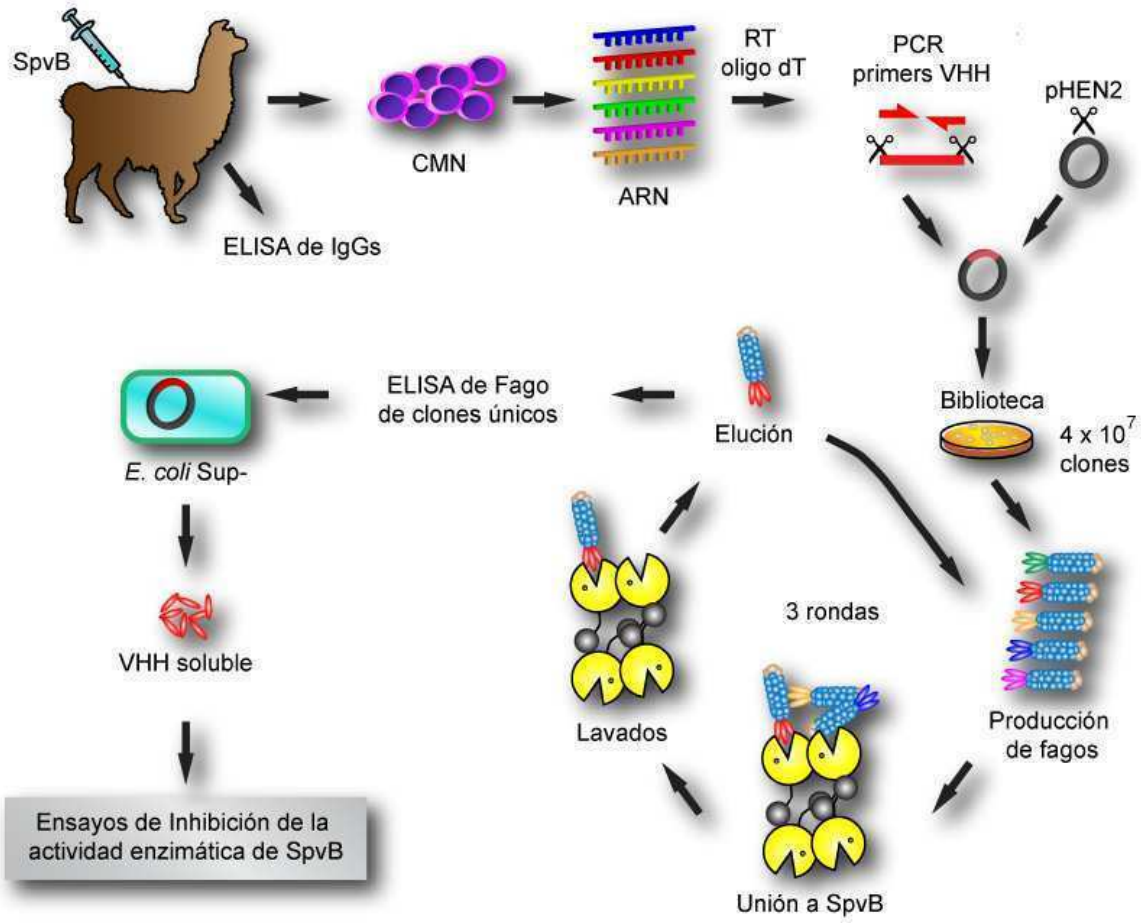


Figura 10. Esquema representativo de la generación de VHHs específicos anti-SpvB. Se inmunizaron llamas con SpvB purificada. Se analizó por ELISA la reactividad del suero contra SpvB. A partir del ARNm de las células mononucleares (CMN) se construyó una biblioteca de VHHs en un vector de expresión en fagos. Los bacteriófagos se seleccionaron por unión a SpvB en solución mediante 3 rondas. Se realizó un ELISA para analizar la reactividad de los fagos eluidos contra SpvB. Se secuenciaron 10 clones de la ronda 2 y 10 clones de la ronda 3 específicos contra SpvB. Se transformaron bacterias *E. coli* no supresoras (Sup-) con el ADN de 5 clones seleccionados y luego se expresaron y purificaron los 5 VHHs.

3.1. Generación de la biblioteca de expresión en fagos de VHHs

Se inmunizaron dos llamas con 3 dosis de un plásmido que codifica para SpvB y con 3 dosis de SpvB. Inmediatamente antes de cada inoculación con proteína se extrajeron muestras de sangre para analizar la respuesta inmunológica policlonal contra el inmunógeno obtenida por la inmunización anterior. De las dos llamas, una de ellas (N° 9208) presentó respuestas sensiblemente mayores que la restante (no mostrado) por lo que en adelante se trabajó sólo con este animal. En la **Figura 11** se muestra el ensayo de ELISA de titulación contra SpvB de los sueros inmunes luego de cada inmunización con proteína y del suero pre-inmune.

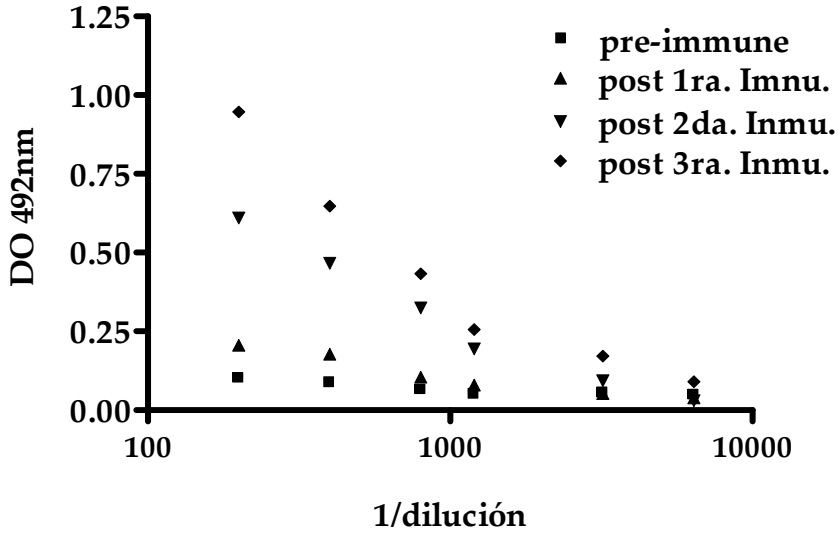


Figura 11. Titulación del suero de la llama N° 9208 en su reactividad por SpvB. Se ensayaron diluciones seriadas de los sueros por ELISA luego de cada inmunización con SpvB analizando la presencia de IgG totales anti-SpvB. Comparativamente se incluyó el suero pre-inmune. Se muestra el promedio de los duplicados de la densidad óptica (DO) en función de la inversa de la dilución ensayada.

Como se puede apreciar, se obtiene una respuesta humoral significativa luego de la segunda inmunización. Al comparar el título de IgGs totales anti-SpvB obtenido luego de la primera inmunización con el obtenido luego de la tercera

inmunización, observamos que este último resultaba significativamente mayor. El nivel de respuesta luego de la tercera inmunización fue considerado adecuado, por lo cual se extrajo sangre heparinizada para proceder a la construcción de una biblioteca de expresión en fagos de los fragmentos variables de las hcIgG: VHH.

La construcción de bibliotecas de expresión en fagos de anticuerpos de camélidos está facilitada por la existencia de hcIgG en estos organismos. La obtención y clonación de los ADNc correspondientes a los fragmentos VHHs de la llama N° 9208 luego de las inmunizaciones se realizó como se detalla en Materiales y Métodos. Los insertos VHHs obtenidos por PCR fueron ligados en el vector pHEN y se realizó la electroporación de bacterias *E. coli* Sup+ (XL1-Blue, supresora). El vector pHEN permite la expresión de los fragmentos como proteína de fusión con la proteína pIII de la cápside del fago M13 con un codón ámbar entre ambos dominios. De esta manera, se pueden analizar las especificidades de los clones obtenidos y luego por infección de bacterias *E. coli* Sup- (Top10, no supresora) obtener el fragmento VHH aislado. Además, la clonación introduce un 6xHis-tag en el extremo C-terminal del fragmento VHH lo que facilita su posterior purificación.

La electroporación de bacterias de *E. coli* Sup+ con el producto de ligación nos permitió obtener una biblioteca de un tamaño de $4x10^7$ clones (ver **Figura 10**). En bibliotecas de camélidos obtenidas a partir de hcIgG donde no hay diversidad combinatorial debido a la ausencia de la cadena liviana, este tamaño es suficiente para aislar clones con reactividades de un amplio rango de afinidad.

Para analizar la calidad y variabilidad de la biblioteca se secuenciaron 10 clones elegidos al azar. En la **Figura 12** se muestra la secuencia de los 10 clones seleccionados.

Clones

```
                FR1          CDR1          FR2                CDR2
8     ----------RLSCAAS GFTLDDYGLG WFRQAPGKEREGVS CISSSVGNTYYRDFVKG
9     --------SLRLSCAAS GFTLDYYAIG WFRQAPGKEREGVS CISSSGGSTYYADSVKG
1     GGLVQAVSSLRLSCAAS GFTFDEYSIG WFRQAPGKEREGLS CISANDGYIYYED-SKD
2     --------SLRLSCAAS GDTICIGDMA WYRQSPGKEREWVA TLTYG-GVPAYRDTMKD
7     GGPVEAGGSLTLACAAS GRTSTLYTMA GFRQAPRNEREFVA FIA-TGGNTNYADSVE-
10    GGLVQAGGSLRLSCAAS GRTFYNYAMG WFRQAPGKEREFVA AISWSGGSTLYADSVKG
3     -GLVQPGGSLTLSCAAS GISNSINAMS WYRQAPGKQRELVA RIW-RSGSTNYKDSVQG
5     -GLVQPGGSLTLSCAAS GISNSINAMS WYRQAPGKQRELVA RIW-RSGSTNYKDSVQG
4     GGLVAPGESLKLSCVAS GFHFNYRLF- WVRQPPGADIEFVA SIGSAGMSKAYADAVKG
6     GGLVQAGGSLRLSCAAS GDTICISTMG WYRQGPGKERELVA SITRQGGAN-YADSVKG

                FR3                          CDR3                FR4
8     RFTISRDRAKNTVSLQMNSLKPEDTAIYYC AAVHRSQFKLGPLCTRGGSMDV WGQG
9     RFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC AVAQ-SCLRGG---VRGG---Y WGQG
1     RFTISTDKAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYIC GAPR-HCSAYGP-----SPTDH WGQG
2     RLTISKDKGKNTLYLQMNGLKSDDTAVYYC HGTRDGPALCG------RVREY WGQG
7     RFTISGDYAKNTVYLQMNDLKPADTAVYFC AANVKGPYY-------KPLYDY WGQG
10    RFTISRANAQNTVYLQMNKLKPEDTAVYYC AADADAQPMGV-----IENYDY WGQG
3     RFIISRDNGKNTIWLHMNNLKTEDTAVYYC AAGQAAMTG-------VETFDY WGQG
5     RFIISRDNGKNTIWLHMNNLKTEDTAVYYC AAGQAAMTG-------VETFDY WGQG
4     RFTISRDNAKSTLYLQMNALKPEDTGRYYC ARD-----SG----GSLRGLG-- ---
6     RFTISRDDTSKSLWLQMNALKPADTAVYYC NVSPVPYCSGF---GTILSLGS WGQG
```

Figura 12. Secuenciación de clones provenientes de la biblioteca de fagos. Se muestran las secuencias de 10 clones elegidos al azar a partir de la biblioteca de fagos. Se indican en la figura las regiones framework (FR); las 3 regiones determinantes antigénicas (CDR1, 2 y 3); en amarillo se muestran las cisteínas canónicas; en turquesa las cisteínas adicionales y en rosa se indican los residuos aminoacídicos característicos del FR2 de camélidos. Se indican los clones 3 y 5 con flechas los cuales comparten 100% de homología.

Las secuencias fueron alineadas, analizadas y agrupadas de acuerdo a su homología. En ninguno de los clones analizados se observaron secuencias que no corresponden a VHH ni correspondientes a clones sin inserto, lo que demostró que la biblioteca es de buena calidad. Se pudo observar también que nueve de ellos son diferentes entre si, indicando que la biblioteca obtenida es variable. Los clones 3 y 5 comparten el 100% de homología sugiriendo que provienen de una misma línea germinal VH y el mismo rearreglo V-D-J. El largo promedio del CDR3 en todas las secuencias analizadas fue de 16.5 aminoácidos. Además de la presencia de las cisteínas canónicas, el 50% de los clones mostró cisteínas adicionales. Los clones 1, 8 y 9 presentaron cisteínas en el CDR2 y en el CDR3, mientras que los clones 2 y 6 mostraron cisteínas adicionales en el CDR1 y en el CDR3.

3.2. Selección de fragmentos VHHs anti-SpvB

A partir de la biblioteca obtenida se procedió a infectar el cultivo de bacterias con el fago helper para poder obtener bacteriófagos y de esta manera seleccionar aquéllos que reconozcan a SpvB. La selección de bacteriófagos que se unieron a SpvB se realizó por incubación en solución con el antígeno biotinilado, y el complejo (SpvB+fago) fue capturado a partir de bolitas magnéticas recubiertas con streptavidina. Se realizaron tres rondas de selección y en cada una de ellas se hicieron lavados extensivos. La elución de los bacteriófagos unidos a SpvB se obtuvo por acidificación brusca del medio y posterior neutralización. Los bacteriófagos obtenidos en la primera ronda fueron amplificados y utilizados para una segunda y tercer ronda en condiciones idénticas a la anterior (ver **Figura 10**). La selección fue hecha con dos concentraciones de antígeno, 10 nM y 50 nM. En cada ronda se contó con un control negativo el cual consistió en fagos de la biblioteca que no fueron enfrentados contra el antígeno y donde también se siguió el mismo protocolo de incubación, lavado y elución. El número de fagos incubados ("Input") y el número de fagos eluidos ("Output") en cada una de las rondas de selección se muestra en la **Tabla 1.**

	Ronda 1		Ronda 2		Ronda 3	
	Input	Output	Input	Output	Input	Output
10nM Ag. Biot.	$1.6x10^{14}$	$2.8x10^{7}$	$2.0x10^{13}$	$1.0x10^{9}$	$2.0x10^{13}$	$7.0x10^{10}$
Control Neg.	$1.6x10^{14}$	$2.2x10^{7}$	$2.0x10^{13}$	$5.2x10^{8}$	$2.0x10^{13}$	$2.0x10^{10}$
50nM Ag. Biot.	$1.6x10^{14}$	$4.0x10^{7}$	$2.0x10^{13}$	$8.7x10^{9}$	$2.0x10^{13}$	$3.3x10^{10}$
Control Neg.	$1.6x10^{14}$	$2.2x10^{7}$	$2.0x10^{13}$	$2.5x10^{8}$	$2.0x10^{13}$	$7.7x10^{7}$

Tabla 1. Fracción de bacteriófagos incubados ("**input**") **y recuperados** ("**output**") **luego de cada ronda de selección.** Se muestra un enriquecimiento de fagos con 50 nM de SpvB biotinilado en solución durante las rondas de selección. Comparativamente se incluyó un control negativo consistente en fagos de la biblioteca sin enfrentar a SpvB.

Como se puede observar, luego de tres rondas de selección utilizando 50 nM de antígeno biotinilado se obtuvo una importante selección de clones que reconocen a SpvB. El hecho de que se haya obtenido una mejor selección a esa concentración de antígeno se reflejó en el "output" de la ronda 3 donde se pudo visualizar que la selección de clones es tres órdenes de magnitud mayor con respecto al control negativo. Esta diferencia indicó que hubo un importante enriquecimiento en la población de clones específicos contra SpvB. Sin embargo, con 10 nM se mantuvo prácticamente el mismo orden de magnitud en el "output" de todas las rondas de selección indicando un enriquecimiento de ambas poblaciones, es decir, de bacteriófagos específicos y no específicos.

Estos resultados muestran que a partir del método de selección en solución con 50 nM de SpvB, se obtuvieron fagos que reconocieron a SpvB por medio de tres rondas de selección.

Por lo tanto, debido a las claras diferencias entre ambas concentraciones, en adelante sólo se trabajó con los bacteriófagos eluidos con 50 nM de antígeno.

Consideramos que no fueron necesarias nuevas rondas de selección ya que la diferencia obtenida con el control negativo es significativa, y además podría llevar a la pérdida de variabilidad. Decidimos entonces evaluar el método de selección y para tal fin se analizó en detalle la reactividad de los clones eluidos.

A partir de los bacteriófagos eluidos de cada ronda de selección se seleccionaron un total de 80 clones elegidos al azar, de los cuales 20 pertenecieron a la ronda 1, 20 clones a la ronda 2 y 40 clones a la ronda 3 y se analizó su reactividad contra SpvB por medio de un ELISA de fagos. En la **Figura 13** se muestra el ELISA de fagos donde cada punto de las rondas 1, 2 y 3 representan fagos que fueron preparados a partir de una única colonia. Se incluyeron en el ensayo varios controles.

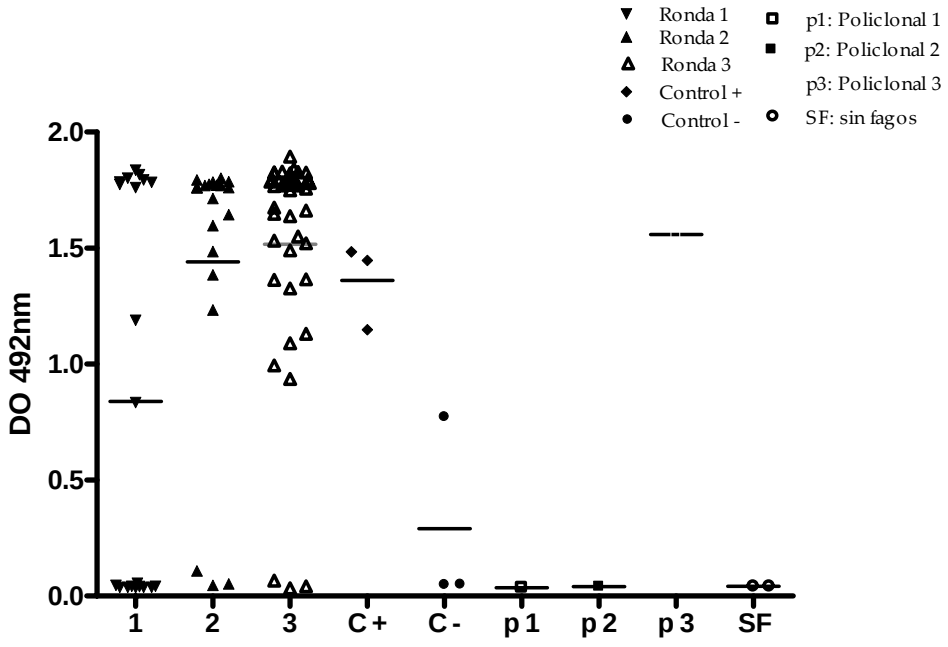


Figura 13. **Enriquecimiento de fagos que reconocen a SpvB durante consecutivas rondas de selección.** Se muestra la reactividad contra SpvB de los clones VHH individuales elegidos al azar, para cada ronda se selección. 1: Ronda 1; 2: Ronda 2 y 3: Ronda 3; C-: fagos de la ronda 3 en pocillos sin sensibilizar; C+: fagos anti-transialidasa en pocillos sensibilizados con transialidasa; p1, p2 y p3: fagos policlonales eluidos de cada ronda de selección.

En la ronda 1 la mitad de los clones no mostró reactividad contra la enzima pero en la siguiente ronda esa población había disminuido considerablemente. Nótese que en todas las rondas, la mayoría de los clones específicos tuvieron DO elevadas y por encima de la media. Los pocillos utilizados para el control positivo (C+) fueron sensibilizados con la proteína transialidasa de *T. cruzi* e incubados con fagos producidos a partir de una biblioteca de VHH anti-transialidasa. Este control permitió corroborar que la técnica había funcionado correctamente. La misma información fue brindada por el control sin fagos (SF). Los controles de los policlonales (p1, p2 y p3) ensayados en el ELISA fueron provenientes de los bacteriófagos eluidos en cada ronda, y solamente presentaron reactividad los de la última ronda de selección. Si observamos los policlonales de la ronda 2 y de la ronda 3 y los comparamos con sus respectivos controles negativos (ver **Tabla 1**) tal vez podría suponerse que en la ronda 2 existió una mayor competencia entre bacteriófagos específicos e inespecíficos, fenómeno no observado en la ronda 3. Puede ser factible que dicha competencia haya originado que el policlonal 2 no presente reactividad por SpvB, sucediendo lo contrario en el policlonal 3.

Por lo tanto, los resultados muestran que a lo largo de las rondas de selección hubo un importante enriquecimiento de clones específicos contra SpvB.

En la **Tabla 2** se muestra el porcentaje de clones positivos de cada una de las rondas de selección.

Rondas	Clones positivos
1	50% (10 de 20)
2	85% (17 de 20)
3	92,5% (37 de 40)

Tabla 2. Porcentaje de clones específicos obtenidos en el ELISA de fagos. Se muestra el número total de clones analizados y el porcentaje y número total de clones que reconocen a SpvB a través de las distintas rondas de selección.

Se puede visualizar claramente que en la ronda 1 el 50% de los clones fue específico contra SpvB y que en la ronda 3 dicho porcentaje ascendía al 92.5%.

En su conjunto, todos estos resultados demostraron que en la ronda 2 hubo un importante enriquecimiento de clones específicos contra SpvB y haber realizado una ronda más de selección permitió que el sistema se enriqueciera aún más, alcanzando un porcentaje de clones específicos muy elevado.

4. Caracterización de VHHs y análisis *in vitro* de la inhibición enzimática de SpvB

Para evaluar la diversidad de los clones contra SpvB seleccionamos 10 clones de la ronda 2 y 10 clones de la ronda 3 con $DO_{492} \geq 1.8$ y por secuenciación se los analizó más detalladamente.

Los fragmentos VHHs fueron secuenciados y analizados para evaluar la diversidad de los clones contra SpvB obtenidos luego de las rondas de selección y analizados por ELISA de fagos. Las secuencias de los 20 clones se muestran en la **Figura 14**, alineadas por la longitud del CDR3 y por su similitud.

```
Grupo                 FR1                 CDR1     FR2          CDR2
      Ronda2.Clon5    MAQVKLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GSIFSINAMG WYRRAPGKERELVA GISTGGYTSYRDSVKG
      Ronda2.Clon17   MAQVKLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GSIFSINAMG WYRRAPGKERELVA GISTGGYTSYRDSVKG
      Ronda2.Clon13   MAQVKLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GSIFSTNAMG WYRRAPGKERELVA GISTGGYTSYRDSVKG
      Ronda2.Clon19   MAQVKLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GSIFSINAMG WYRRAPGKERELVA GISTGGYTSYRDSVKG
      Ronda2.Clon18   MAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GSIFSINAMG WYRRAPGKERELVA GISTGGYTSYRDSVKG
1     Ronda2.Clon1    MAQVKLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GTIFSINAMG WYRRAPGKQRELVA GISTGGYTQYRDSVKG
      Ronda2.Clon6    MAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GTIFSINAMG WYRRAPGKQRELVA GISTGGYTQYRDSVEG
      Ronda3.Clon16   MAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GSIFSINAMG WYRRAPGKERELVA GISTGGYTSYRDSVKG
      Ronda3.Clon20   MAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GSIFSINAMG WYRRAPGKERELVA GISTGGYTSYRDSVKG
      Ronda3.Clon33   MAQVKLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GSIFSINAMG WYRRAPGKERELVA GISTGGYTSYRDSVKG
      Ronda3.Clon37   MAQVKLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GTIFSINAMG WYRQAPGKQRELVA GISTGGYTSYRDSVKG
      Ronda3.Clon12   MAQVKLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GTIFSINAMG WYRRAPGKQRELVA GISTGGYTQYRDSVKG
2     Ronda3.Clon1    MAQVKLQESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GSIFSINAMG WYRRAPGKERELVA GISTGGYTSYRDSVKG
3     Ronda3.Clon38   MADVQLQASGGGLVQPGGSLTLSCAVS ANLFSSNIMG WYRQTPGKEREFVA TLTRAGSTNYADSAKG
      Ronda2.Clon20   MADVQLQASGGGLVQPGGSLRLSCAAS ASLFSINAMN WYRQTPGKERELVA VLTSGAYSGYADSVKG
      Ronda2.Clon16   MADVQLQASGGGLVQPGGSLRLSCAAS ASLFSINAMN WYRQTPGKERELVA VLTSGAYSGYADSVKG
      Ronda2.Clon3    MADVQLQASGGGLVQPGGSLRLSCAAS ASLFSINAMN WYRQTPGKERELVA VLTSGAYSGYADSVKG
4     Ronda3.Clon24   MADVQLQASGGGLVQPGGSLRLSCAAS ASLFSINAMN WYRQTPGKERELVA VLTSGAYSGYADSVKG
      Ronda3.Clon39   MADVQLQASGGGLVQPGGSLRLSCAAS ASLFSINAMN WYRQTPGKERELVA VLTSGAYSGYADSVKG
      Ronda3.Clon40   MADVQLQASGGGLVQPGGSLRLSCAAS ASLFSINAMN WYRQTPGKERELVA VLTSGAYGGYADSVKG

                      FR3                         CDR3        FR4
      Ronda2.Clon5    RFTISRVNAENMVYLQMNSLKPEDTAVYYC NIVPVDLTMTPPNYGMDY WGQG
      Ronda2.Clon17   RFTISRVNAENMVYLQMNSLKPEDTAVYYC NIVPVDLTMTPPNYGMDY WGQG
      Ronda2.Clon13   RFTISRVNAENMVYLQMNSLKPEDTAVYYC NIVPVDLTMTPPNYGMDY WGQG
      Ronda2.Clon19   RFTISRVNAENMVYLQMNSLKPEDTAVYYC NIVPVDLTMTPPNYGMDY WGKG
      Ronda2.Clon18   RFTISRVNAENMVYLQMNSLKPEDTAVYYC NIVPVDLTMTPPNYGMDY WGKG
1     Ronda2.Clon1    RFTISRVNANNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC NAVPVDLTQTPPNYGMDY WGKG
      Ronda2.Clon6    RFTISRVNANNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC NAVPVDLTQTPPNYGMDY WGQG
      Ronda3.Clon16   RFTISRVNAENMVYLQMNSLKPEDTAVYYC NIVPVDLTMTPPNYGMDY WGKG
      Ronda3.Clon20   RFTISRVNAENMVYLQMNSLKPEDTAVYYC NIVPVDLTMTPPNYGMDY WGKG
      Ronda3.Clon33   RFTISRVNAENMVYLQMNSLKPEDTAVYYC NIVPVDLTTTPPNYGMDY WGKG
      Ronda3.Clon37   RFTISRVNAENMVYLQMNSLKPEDTAVYYC NIVPVDLTMTPPNYGMDY WGQG
      Ronda3.Clon12   RFTISRVNAENTVYLQMNSLKPEDTAVYYC NAVPVDLTQTPPNYGMDY WGKG
2     Ronda3.Clon1    RFTISRVNAENMVYLQMNSLKPEDTAVYYC NIAPSI-L-PPPTTAWTT GAKG
3     Ronda3.Clon38   RFTISRDNARTTVNLQMNSLKPEDTAVYYC NAVLV-----HGSTAYNI WGQG
      Ronda2.Clon20   RFTISRDLAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC NADLG-----YR----DV WGQG
      Ronda2.Clon16   RFTISRDLARNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC NADLG-----YR----DV WGQG
4     Ronda2.Clon3    RFTISRDLAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC NADLG-----YR----DV WGQG
      Ronda3.Clon24   RFTISRDLAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC NADLG-----YR----DV WGQG
      Ronda3.Clon39   RFTISRDLAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC NADLG-----YR----DV WGQG
      Ronda3.Clon40   RFTISRDLAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC NADLG-----YR----DV WGQG
```

Figura 14. Alineamiento de la secuencia aminoacídica de 20 clones elegidos al azar. Se muestra la secuencia de aminoácidos de 10 VHHs de la ronda 2 y de 10 VHHs de la ronda 3 elegidos al azar después de las rondas de selección. Los VHHs fueron clasificados en 4 grupos de acuerdo a la longitud del CDR3. **Grupo 1**: 18 aminoácidos; **Grupo 2**: 16 aminoácidos; **Grupo 3**: 13 aminoácidos; **Grupo 4**: 9 aminoácidos. Se puede visualizar que se señalaron las regiones FR, los 3 CDR, las cisteínas canónicas (amarillo), los residuos típicos de VHH encontrados en el FR2 (rosa) y se señalaron en color gris las variantes de aminoácidos dentro de cada grupo.

Como se puede apreciar, el análisis de la secuencia, en base a la longitud y a la similitud del CDR3 de los VHHs permitió clasificar a las secuencias en cuatro grupos diferentes. El grupo 1 se caracterizó por tener un CDR3 de 18 aminoácidos de longitud y estuvo formado por el 60% de los clones (12 de 20). Los 3 CDRs de estos clones fueron muy similares entre si, inclusive en algunos casos idénticos. Este grupo estuvo representado por prácticamente la misma cantidad de clones provenientes de ambas rondas de selección. El grupo 2 y el grupo 3 estuvieron representados por el 5% de los clones (1 de 20) con un CDR3 de 16 y de 13 aminoácidos de longitud, respectivamente. El clone del grupo 2 y del grupo 3 sólo estuvieron presentes en la ronda 3. El grupo 4, con un CDR3 de 9 aminoácidos de longitud, estuvo conformado por el 30% de los clones (6 de 20) y todos mostraron 100% de homología de secuencia, a excepción del clon 40 y del clon 16 que fueron distintos en un único aminoácido. Este grupo estuvo formado por la misma proporción de clones derivados de ambas rondas de selección.

La identidad de secuencia que se presentó por un lado entre los clones del grupo 1 y por el otro, entre los clones del grupo 4, sugiere que dentro de cada uno de estos grupos existe una relación clonal, es decir que provienen de un mismo clon de linfocitos B. Sus diferencias surgen por mutación somática posterior al rearreglo V-D-J durante la ontogenia de los linfocitos B. Por otro lado, la secuencia del clon del grupo 2 presentó un CDR1 y un CDR2 idénticos a algunas de las secuencias del grupo 1, pero difiere marcadamente en su CDR3, sugiriendo que derivó de la misma línea germinal VH pero con un rearreglo V-D-J diferente. De la misma manera, el clon 38 del grupo 3 habría derivado de la misma línea germinal que los clones del grupo 4, ya que sus CDR1 y CDR2 son similares.

Todas las secuencias de los clones analizados presentaron las cisteínas canónicas en la posición 22 y 92, pero en ningún caso se observaron cisteínas adicionales como presentó el 50% de las secuencias de la biblioteca. También se

observaron en el FR2 los residuos hidrofílicos característicos de los VHHs y en ninguna secuencia la leucina 11 estuvo remplazada por el residuo serina. Los CDRs de los 20 clones analizados son claramente diferentes a los CDRs de los clones de la biblioteca antes del proceso de selección.

El análisis de las secuencias en su conjunto permitió concluir que los clones del grupo 1, con CDR3 de mayor longitud y secuencias muy similares, fueron los más representativos, es decir que hubo una fuerte selección de esos VHHs a lo largo de las rondas de selección. Por otro lado, la comparación y análisis de las secuencias de ambas rondas nos permitió observar que la ronda 3 presentó mayor variabilidad, resaltando la importancia de haber realizado una tercera ronda de selección, lo cual incrementó las probabilidades de encontrar VHHs inhibitorios.

Para analizar si alguno de los VHHs secuenciados específicos contra SpvB inhibe la actividad enzimática de SpvB, se eligieron 5 VHHs representativos: los clones 5 y 6 del grupo 1 (VHH5 y VHH6), el clon 1 del grupo 2 (VHH1), el clon 38 del grupo 3 (VHH38) y el clon 16 del grupo 4 (VHH16). Se expresaron como proteínas recombinantes y fueron purificados a partir de un lisado periplasmático. Se realizaron dos pasos de purificación, uno inicial por columna de níquel y otro final por tamiz molecular S75. En la **Figura 15** se muestra como ejemplo un gel SDS-PAGE de un VHH representativo luego de la purificación inicial por columna de níquel (**Figura 15A**) y luego de la purificación final por S75 (**Figura 15B**).

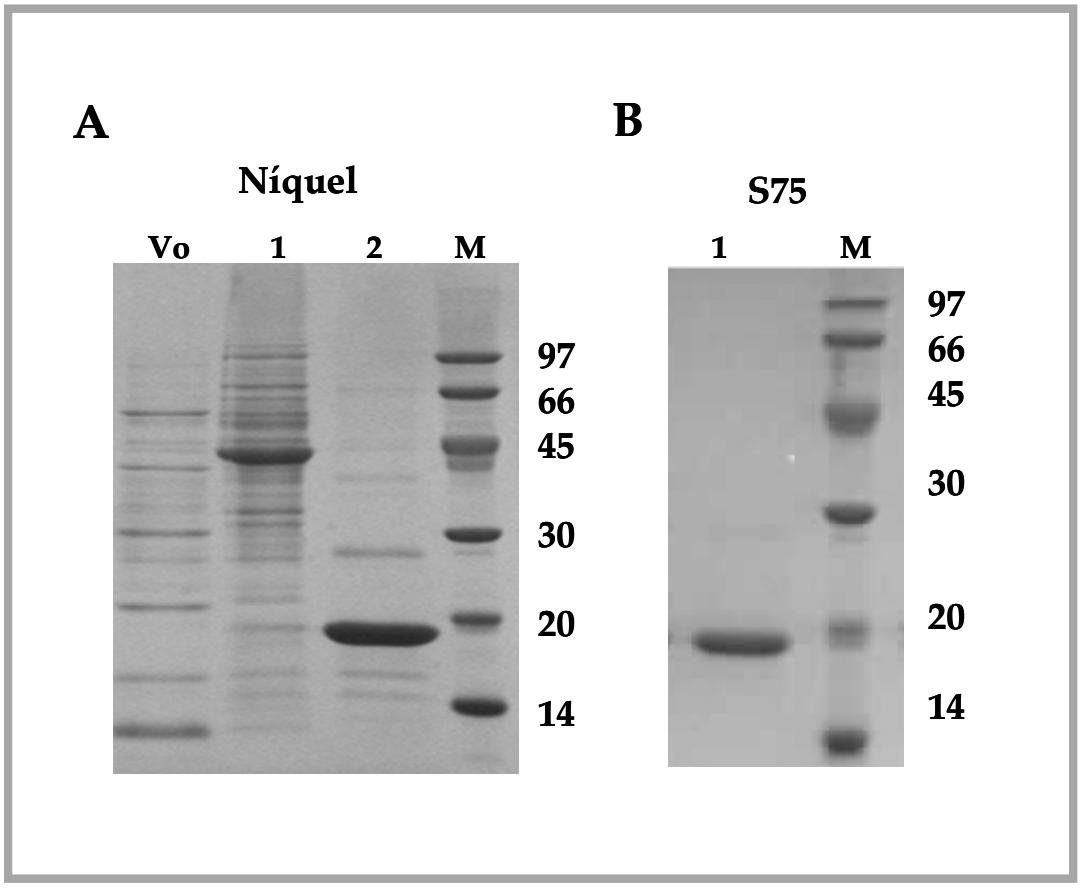


Figura 15. Purificación de los VHHs seleccionados. Se muestra la corrida electroforética en SDS-PAGE correspondiente a **A**: alícuotas de la fracción eluida (Vo) y de los picos obtenidos al aplicar el gradiente de imidazol (Pico 1 y VHH). **B**: Purificación final por S75 de un VHH representativo; M: Marcadores de PM en KDa.

Todos los clones seleccionados pudieron ser purificados. La migración electroforética mostró que los VHHs tienen un PM cercano a los 20 KDa. El rendimiento fue aproximadamente de 1 a 5 mg de VHH por litro de cultivo y el grado de pureza fue adecuado.

Con el objetivo de analizar si los VHHs seleccionados poseen la capacidad de inhibir a SpvB, se aplicaron las mismas técnicas empleadas para medir la actividad enzimática de SpvB: radioactividad y fluorometría. El ensayo de radioactividad consistió en medir la incorporación de ^{32}P-ADP-Ribosa (a partir del ^{32}P-NAD) a la

molécula de actina. El ensayo de fluorometría consistió en el sensado de la polimerización de actina-pyrene evidenciada por incremento de la fluorescencia a través del tiempo.

Para el ensayo de radioactividad se incubaron 10 ng de SpvB, ^{32}P-NAD y un lisado de células CHO, como fuente de actina. Posteriormente se realizó una corrida electroforética y por autorradiografía se observó la presencia de actina marcada radioactivamente (**Figura 16**, calle 2). La banda de 43 KDa indicó que la actina fue ADP-ribosilada; dado que en la calle 1, en ausencia de SpvB, no se observó la banda de actina, podemos concluir que la ADP-ribosilación fue realizada por SpvB. Los ensayos de inhibición enzimática se realizaron en una primera instancia utilizando una relación molar SpvB:VHH de 1:1000. La inhibición de la ADP-ribosilación fue evaluada por el agregado de los diferentes VHHs seleccionados a la reacción. Para tal fin, se incubó previamente a la enzima con los diferentes VHHs y luego se agregó a la reacción el lisado de células y el ^{32}P-NAD. En la **Figura 16** (calles 3, 4, 6, 7 y 8) se puede visualizar claramente que el agregado de cada uno de los VHHs originó la ausencia de la banda marcada radioactivamente, indicando que todos los VHHs ensayados bloquearon la actividad enzimática de SpvB. Se incluyó en el ensayo un VHHNR como control de especificidad. Nótese la marca radioactiva de la actina indicando que fue ADP-ribosilada cuando la enzima fue incubada con el VHHNR (**Figura 16,** calle 5).

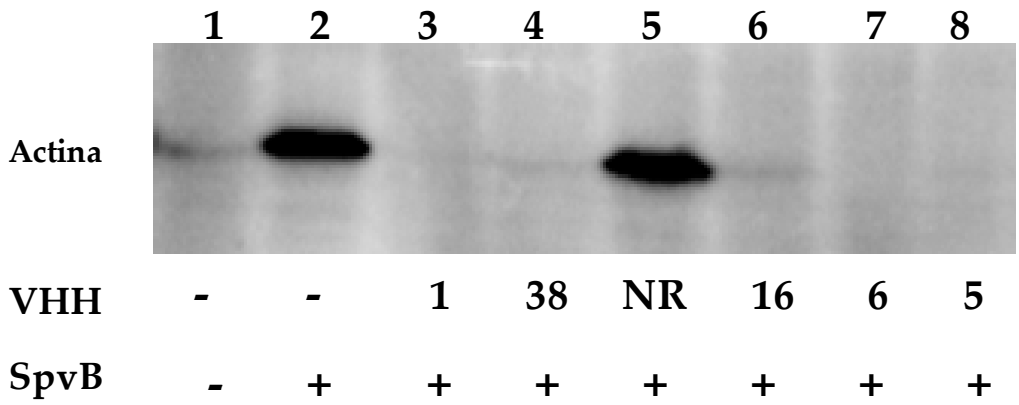
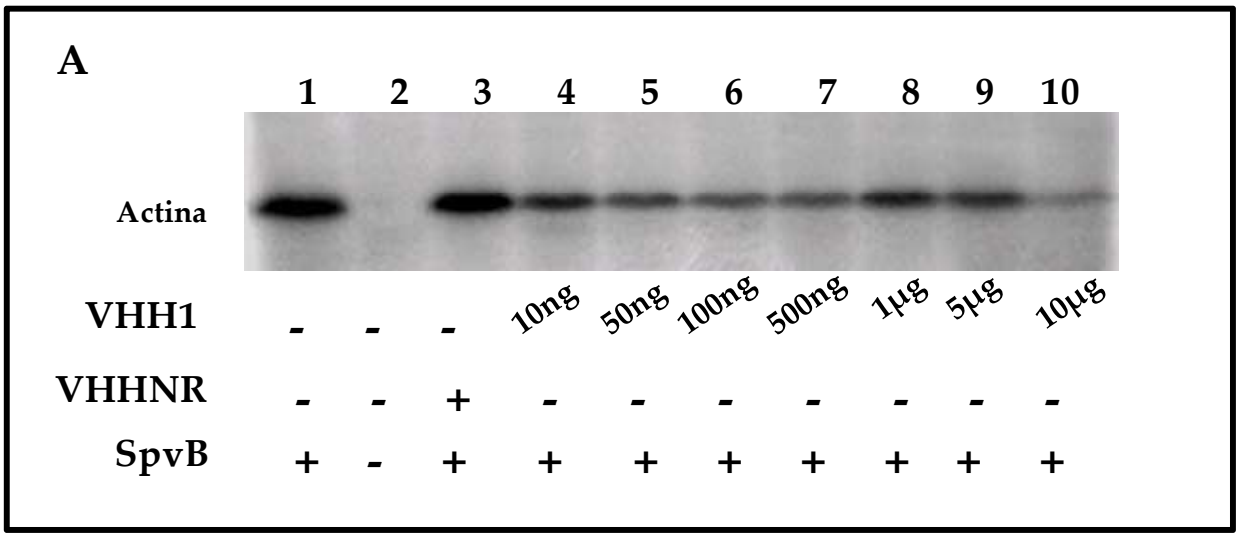
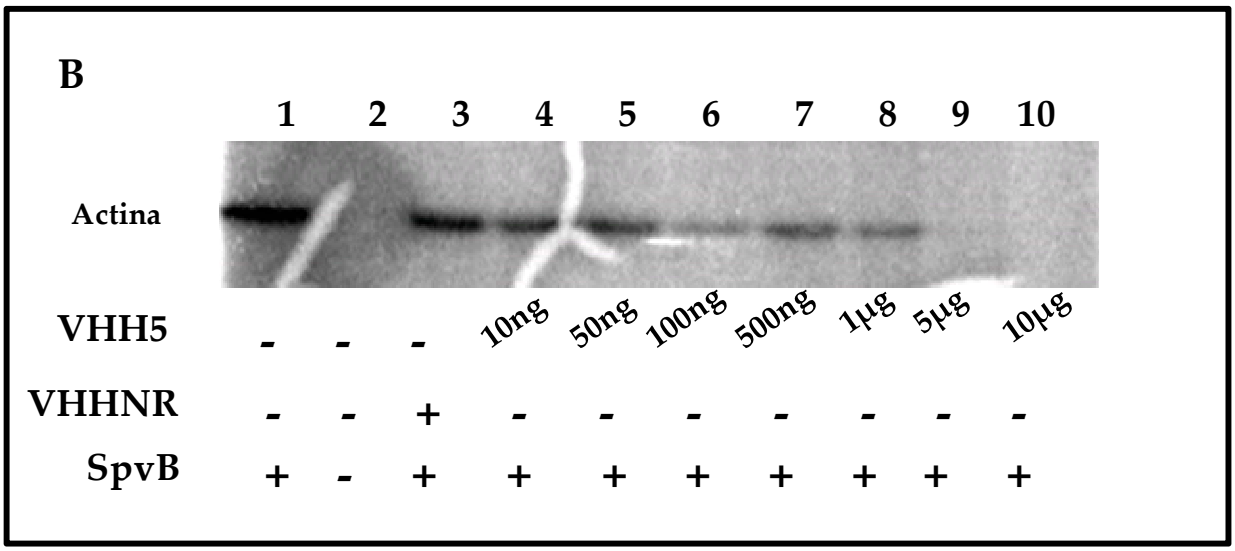


Figura 16. Radioactividad. Inhibición de la ADP-ribosilación de la molécula de actina mediada por SpvB a través de VHHs específicos. Se muestra una autorradiografía obtenida al incubar un lisado de células CHO con SpvB, ^{32}P-NAD y diferentes VHHs anti-SpvB o un VHH no relacionado (VHH NR). Se puede observar en los controles sin VHH (calle 2) y con VHH NR (calle 5) la banda correspondiente a la actina marcada radioactivamente. SpvB: 10 ng ($1{,}21 \times 10^{-9}$ M); VHHs: 10 μg ($2{,}16 \times 10^{-6}$ M).

Este resultado nos permite concluir que todos los VHHs seleccionados son específicos contra SpvB y que en las condiciones analizadas bloquean su actividad enzimática.

En una segunda instancia sobre la evaluación de la capacidad inhibitoria de estos VHHs, aplicando la misma técnica, realizamos ensayos de dosis-respuesta. Es decir, se mantuvo constante la cantidad de SpvB (10 ng) y se fueron agregando dosis incrementadas de VHH, las cuales fueron de 10 ng hasta 10 μg. En cada curva se incluyó un control positivo el cual estuvo compuesto por SpvB, ^{32}P-NAD y un lisado de células y un control de especificidad donde se incluyó un VHHNR. Por un lado se analizó por autorradiografía la disminución gradual de la banda marcada radioactivamente a medida que se agregó a la reacción mayor cantidad de VHH. Por otro lado, se intentó cuantificar la presencia de las bandas a través del Storm, teniendo en cuenta el área de cada una de ellas. En la **Figura 17** se muestra una autorradiografía de VHH1 (**Figura 17A**), VHH5 (**Figura 17B**) y de VHH6 (**Figura 17C**).


A
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Actina
VHH1 - - - 10ng 50ng 100ng 500ng 1µg 5µg 10µg
VHHNR - - + - - - - - - -
SpvB + - + + + + + + + +


B
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
Actina
VHH5 - - - 10ng 50ng 100ng 500ng 1µg 5µg 10µg
VHHNR - - + - - - - - - -
SpvB + - + + + + + + + +

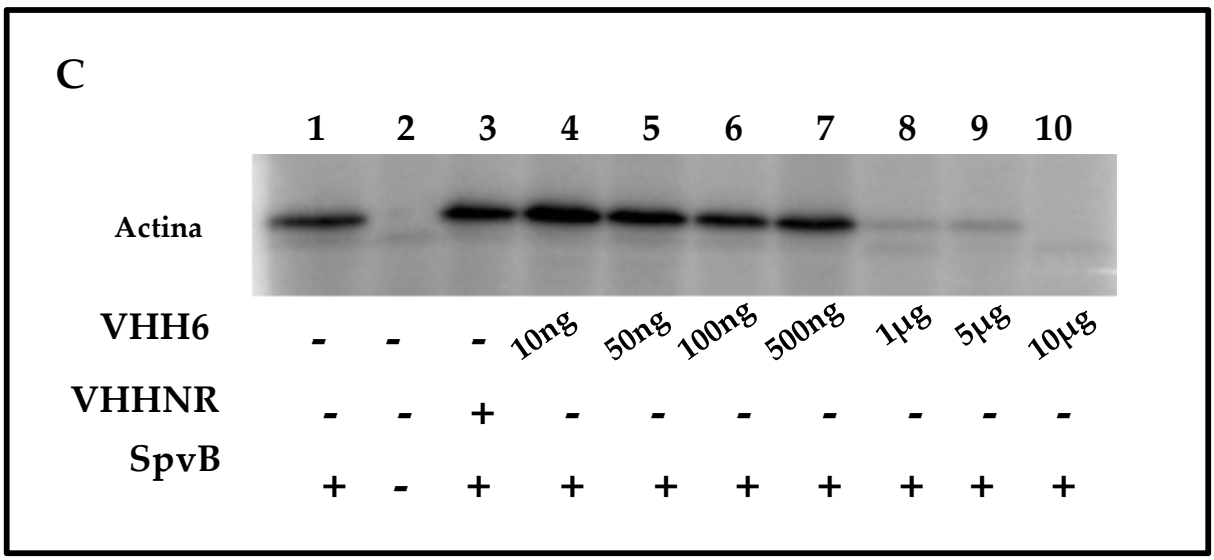


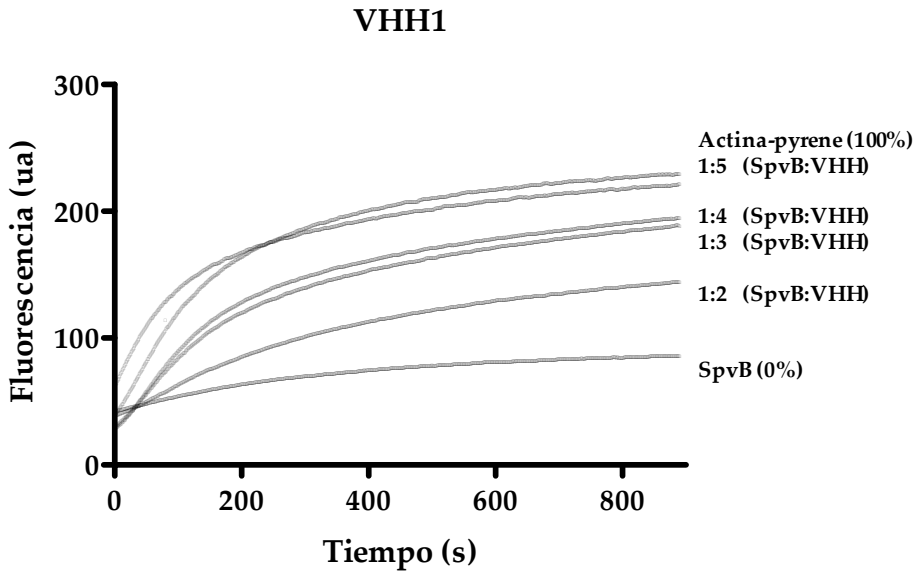
Figura 17. Radioactividad. Inhibición de SpvB por diferentes cantidades de VHH. Se muestra una autorradiografía obtenida al incubar un lisado de células CHO con SpvB, ^{32}P-NAD y diferentes cantidades de **A**: VHH1, **B**: VHH5, **C**: VHH6 o con un VHH NR**.**

En estos ensayos fue clara la aparición de la banda de actina marcada radioactivamente en presencia de SpvB (**Figura 17A, B y C, 1**) y cuando se incubó con VHHNR (**Figura 17A, B y C**, **3**). El análisis de todos los VHHs nos permitió observar ausencia de la banda radioactiva con 10 µg de VHHs, indicando que los 3 VHHs analizados inhibieron a SpvB en las condiciones analizadas. Con respecto a VHH1, esta fue la única cantidad de anticuerpo capaz de inhibir en un 100% a SpvB. Sin embargo, para VHH5 y para VHH6 también se observó ausencia de bandas para 5 µg y para 1 y 5 µg, respectivamente. A partir de este análisis, podríamos concluir que VHH5 y VHH6 son mejores inhibidores que el VHH1, debido a que son capaces de inhibir a SpvB en dosis más bajas. Se pudo observar en la autorradiografía de VHH1 y VHH5 que algunas cantidades de VHHs ensayadas, no correspondieron a una relación de dosis-dependencia (**Figura 17A, 8 y 9** y **Figura 17B, 7 y 8**). Por lo tanto, cuando cuantificamos estas bandas a través del Storm no logramos obtener una curva adecuada que responda a un efecto de dosis-dependencia. De todas maneras, esta técnica nos permitió concluir claramente que los VHHs seleccionados bloquean específicamente la actividad enzimática de SpvB en relación molar SpvB:VHH 1:1000. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, decidimos realizar

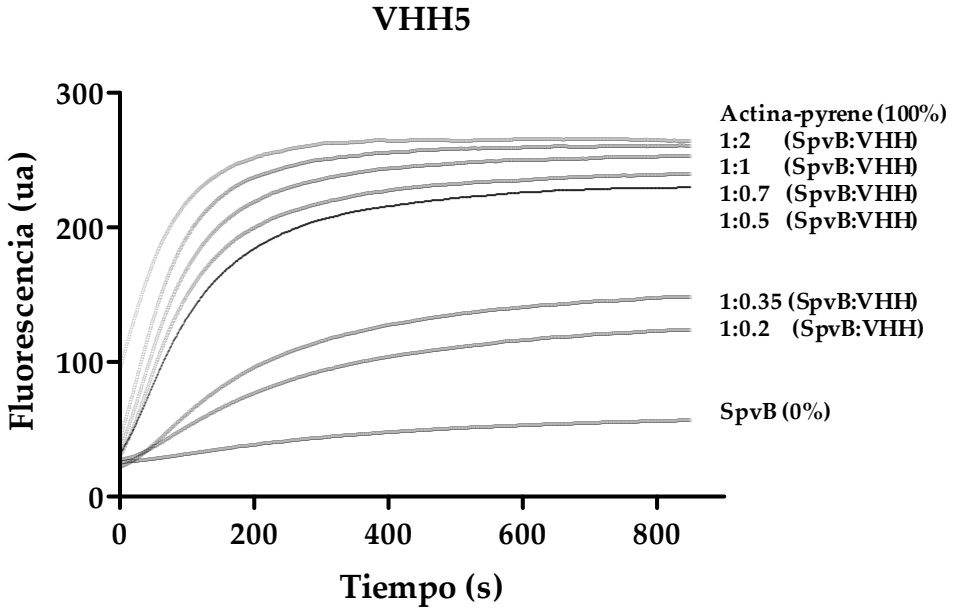
un ensayo que permita cuantificar la capacidad inhibitoria de cada uno de los VHHs seleccionados. Aplicamos para ello la técnica de fluorometría.

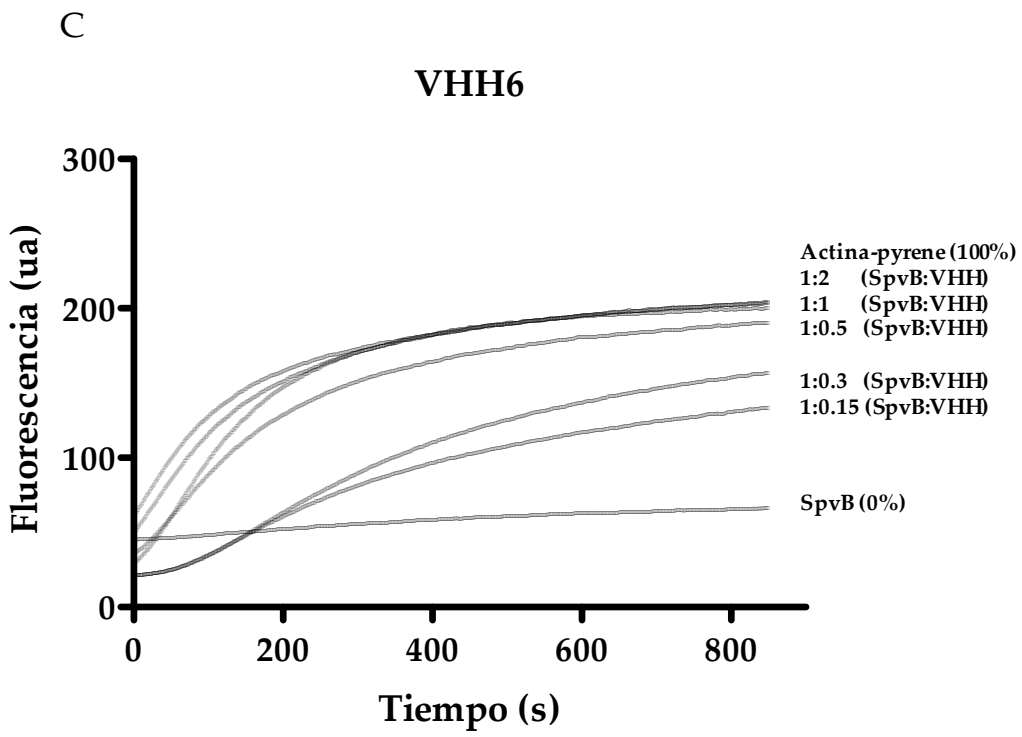
Como se mencionó anteriormente en los ensayos de actividad enzimática de SpvB por medio de la técnica de fluorometría, un incremento de la fluorescencia a través del tiempo indica que la actina-pyrene monomérica forma filamentos, es decir que se polimeriza (G-actina a F-actina). En estos ensayos de inhibición de la actividad enzimática de SpvB se pudo observar que cuando 0.5 μg (66 nM) de SpvB fueron incubados con la actina-pyrene y con NAD no se observó incremento de fluorescencia, indicando que la enzima ADP-ribosila la totalidad de la actina presente en la reacción, previniendo así la conversión de G-actina a F-actina. Nosotros consideramos que esta curva corresponde al 0% de polimerización. Contrariamente, en ausencia de SpvB se produjo polimerización de la actina, efecto que fue observado por un incremento de la fluorescencia, y por lo tanto esta curva corresponde al 100% de polimerización. Se pueden visualizar ambos controles en la **Figura 18** (SpvB (0%); Actina-pyrene (100%)) para todos los VHHs analizados. Para poder calcular la cantidad mínima de VHH necesaria para inhibir a 0.5 μg de SpvB se analizaron los VHHs seleccionados y cantidades variables de cada uno de ellos fue previamente incubada con la enzima. En la **Figura 18** se muestra el análisis para cada uno de ellos.

A


VHH1
Fluorescencia (ua)
300
200
100
0
0
200
400
600
800
Tiempo (s)
Actina-pyrene (100%)
1:5 (SpvB:VHH)
1:4 (SpvB:VHH)
1:3 (SpvB:VHH)
1:2 (SpvB:VHH)
SpvB (0%)

B


VHH5
Fluorescencia (ua)
300
200
100
0
0
200
400
600
800
Tiempo (s)
Actina-pyrene (100%)
1:2 (SpvB:VHH)
1:1 (SpvB:VHH)
1:0.7 (SpvB:VHH)
1:0.5 (SpvB:VHH)
1:0.35 (SpvB:VHH)
1:0.2 (SpvB:VHH)
SpvB (0%)



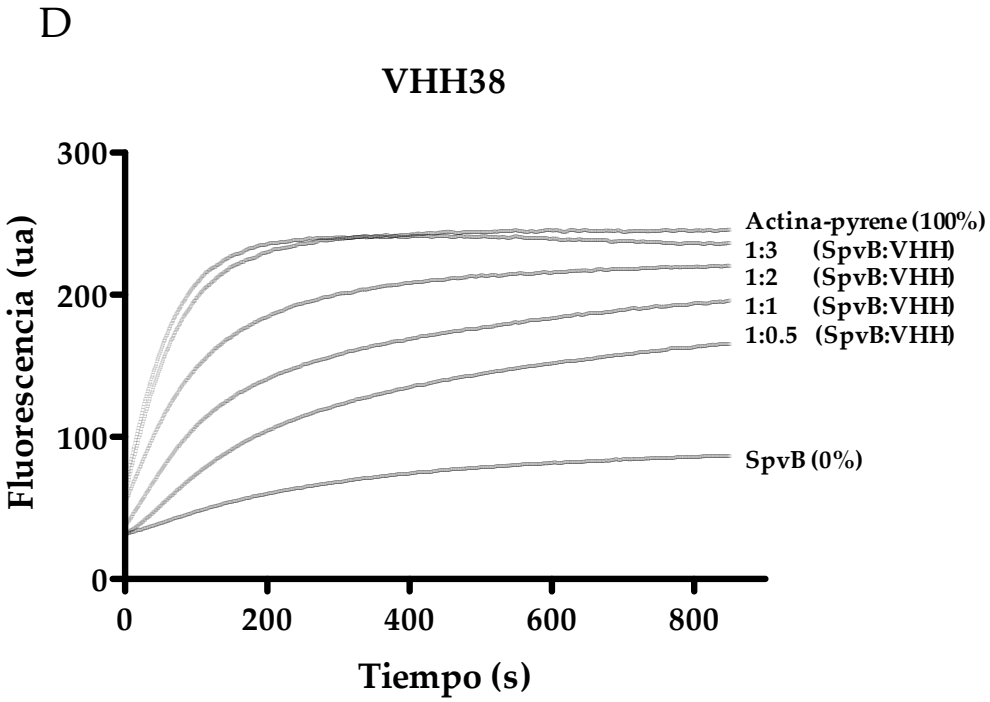


Figura 18. Fluorometría. Inhibición de la ADP-ribosilación de actina mediada por SpvB a través de VHHs específicos. Se muestra la variación de la fluorescencia en función del tiempo. Diferentes concentraciones de **A**: VHH1, **B**: VHH5, **C**: VHH6 y **D**: VHH38, fueron utilizadas manteniendo constante la concentración de SpvB. 100% de polimerización: 0.4mg/ml actina-pyrene + 0.05 mM NAD. 0% de polimerización: 0.4 mg/ml actina-pyrene + 6.66×10^{-8} M SpvB + 0.05 mM NAD. Se muestra para cada curva la relación molar SpvB:VHH.

Para todos los VHHs analizados, cuando SpvB fue incubada con cantidades crecientes de VHH, se produjo un incremento en la fluorescencia. Esto indicó que los VHHs inhiben la polimerización de actina mediada por SpvB de manera dosis-dependiente. Se necesitó una cantidad diferente de cada VHH para bloquear completamente a SpvB y así poder alcanzar el 100% de polimerización. Fue notorio visualizar que VHH5 y VHH6 a una relación molar SpvB:VHH 1:1 lograron bloquear completamente a SpvB generándose un 100% de polimerización. Sin embargo, VHH38 y VHH1 necesitaron un exceso molar de 3 (SpvB:VHH 1:3) a 5 veces (SpvB:VHH 1:5), respectivamente, para lograr inhibir completamente a la enzima y alcanzar el 100% de polimerización.

Estos resultados nos permitieron concluir que los VHHs seleccionados inhiben específicamente a SpvB, pero se necesita de cada uno de ellos una determinada cantidad para bloquear completamente a la enzima. Es decir, logramos obtener 4 VHHs con capacidad inhibitoria diferente por SpvB.

A partir de las curvas de fluorometría se evaluó el porcentaje de inhibición de cada uno de los VHHs analizados. Para tal fin se fijó un tiempo (800 segundos) y se tomó como referencia el 100% y el 0% de polimerización de actina y se calculó el porcentaje de inhibición para cada curva analizada, es decir para cada relación molar. Se puede apreciar en la **Figura 19** el porcentaje de inhibición en función de la relación molar VHH:SpvB.

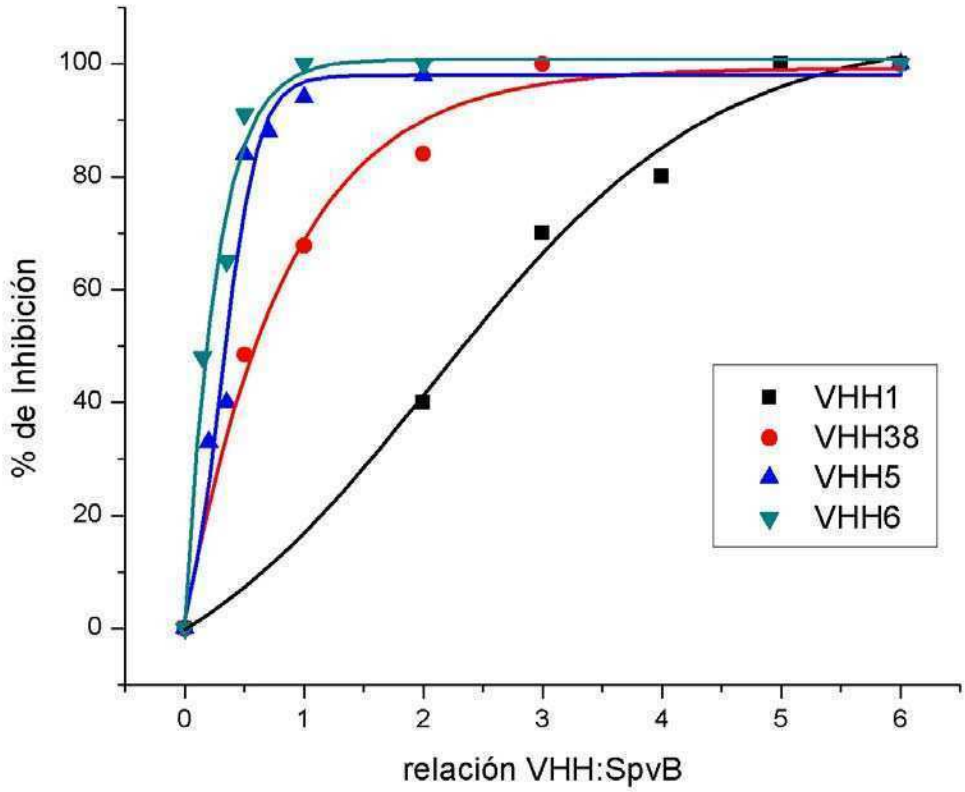


Figura 19. Perfil del porcentaje de inhibición de SpvB en función de la relación molar VHH:SpvB. Se muestran las curvas obtenidas para cada VHHs analizado. Se utilizaron los valores de fluorescencia obtenidos a los 800 segundos para calcular el porcentaje de inhibición tomando como referencia los valores a 100% y 0% de polimerización correspondiente a cada VHHs.

El análisis conjunto de todos los VHHs nos permitió concluir que VHH5 y VHH6, con CDR3 más largos y de secuencias muy similares entre si, lograron alcanzar una inhibición de la actividad enzimática de SpvB del 100% a una relación molar 1:1 SpvB:VHH, indicando que ambos fragmentos son muy buenos inhibidores. Notablemente nuestros resultados sugieren que hay una correlación entre la longitud del CDR3, la similitud de secuencia y el porcentaje de inhibición.

Por lo tanto, mediante estos análisis *in vitro* pudimos seleccionar dos VHHs con la capacidad de inhibir a SpvB en relación equimolar. Esto nos condujo a elegir uno de ellos para, en una primera etapa, intentar su expresión en el citoplasma de células eucariotas y en una segunda etapa, realizar ensayos de inhibición intracelular.

5. Expresión de VHHs en el interior de células eucariotas

Los ensayos *in vitro* nos permitieron demostrar que a partir de las técnicas aplicadas pudimos hallar VHHs que inhiben la actividad enzimática de SpvB. Estos resultados nos condujeron a evaluar la capacidad inhibitoria de estos VHHs en el interior de células eucariotas, y para esto, expresar a los VHHs como intrabodies (93). Según la bibliografía, estos fragmentos pueden ser expresados en diferentes compartimentos de células eucariotas (108-112). Por lo tanto, elegimos a VHH5 y a un VHHNR utilizado como control y se evaluó su expresión en el citoplasma de distintas líneas celulares eucariotas. Ambos VHHs fueron fusionados a MBP (MBP-VHH5 y MBP-VHHNR) y luego clonados en el vector $pcDNA_6$ de expresión eucariota. El clonado de ambos MBP-VHHs en el vector de expresión eucariota $pcDNA_6$ fue corroborado por digestión con enzimas específicas y por secuenciación (no mostrado). Dos motivos nos condujeron a clonar ambos VHHs junto a MBP. El primero fue poder otorgarle mejor estabilidad al VHH, ya que se ha demostrado que MBP actúa como chaperona aumentando la solubilidad y estabilidad de los intrabodies tanto en el citoplasma de bacterias como en el de células eucariotas (103; 104). El segundo fue poder utilizar a MBP como "tag" y de esta manera poder evaluar y visualizar la expresión de los intrabodies. Todas las transfecciones se realizaron en forma transiente. En una primera etapa, y para asegurarnos que MBP-VHH5 y MBP-VHHNR se podían expresar en el citoplasma de las células, elegimos dos líneas celulares que según el reactivo utilizado (jetPei™, Polyplus transfection) son las más accesibles para la transfección. Por tal motivo utilizamos las líneas celulares HEK y Hela para evaluar la expresión de los VHHs, y la misma fue analizada en un principio por Western blot. Para asegurarnos de trabajar en cada ensayo con la misma cantidad de células y así poder comparar la expresión en los distintos tipos celulares, las mismas fueron cultivadas hasta un 50% de confluencia, transfectadas, contadas y luego lisadas. Se puede apreciar en la **Figura 20** la

presencia de una banda de 63 KDa correspondiente a MBP-VHH5 (**A**) y MBP-VHHNR (**B**).

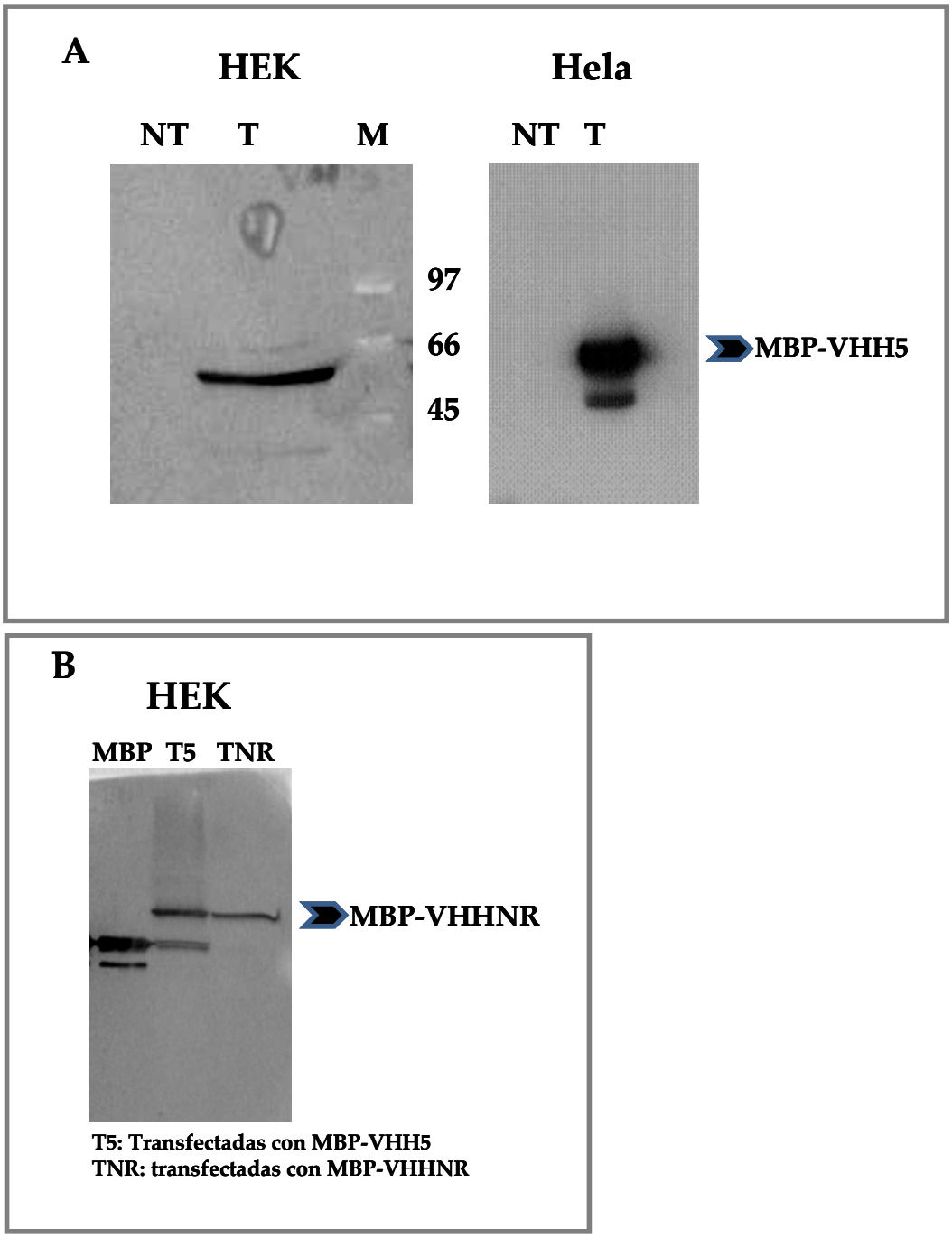


Figura 20. Expresión de los VHHs en células eucariotas. A: Las células que fueron transfectadas con MBP-VHH5 (T) y el control de células sin transfectar (NT) se lisaron y alícuotas de dicho lisado fueron sometidas primero a una corrida electroforética y luego a un Western blot utilizando un anticuerpo anti-MBP. **M**: marcadores de peso molecular. **B**: El mismo protocolo se siguió para visualizar y corroborar la expresión del MBP-VHHNR. Se incluyeron alícuotas del MBP-VHH5 y de MBP sola. Nótese que la migración electroforética originó un PM cercano a los 63 KDa para ambos MBP-VHHs.

Este resultado claramente mostró que ambos VHHs lograron expresarse en el citoplasma de células eucariotas luego de 24 hs de transfección. Se puede observar que la expresión fue más elevada para MBP-VHH5 en células Hela.

Por otro lado, también evaluamos si ambos VHHs podían expresarse sin MBP en el citoplasma de células eucariotas. Para este caso, se clonaron directamente ambos fragmentos en un vector de expresión eucariota $pcDNA_6$ y se utilizó como "tag" 6xHis. En la **Figura 21** se muestra un Western blot de ambos VHHs.

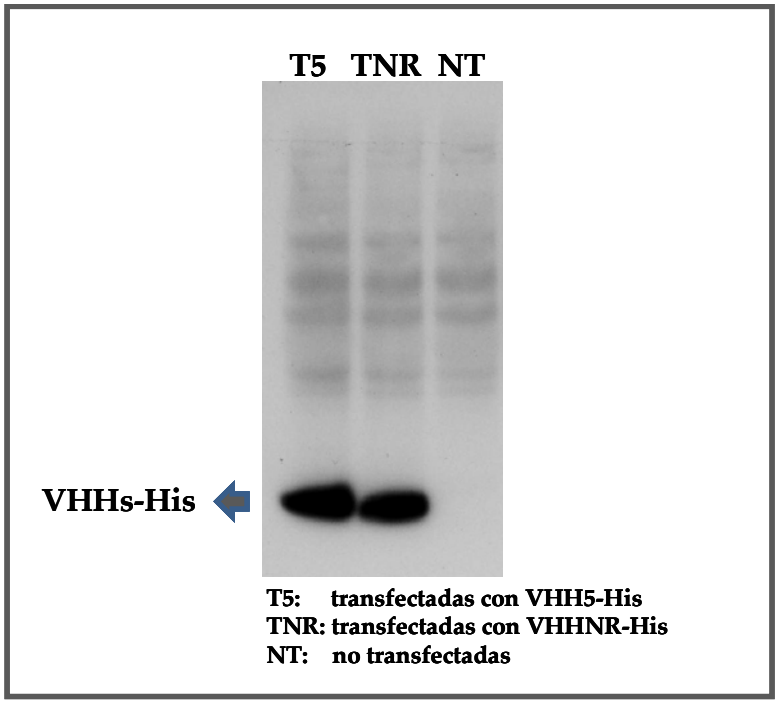


Figura 21. Expresión de VHH5-His y VHHNR-His en células eucariotas. A partir de un lisado de células HEK se pudo visualizar y confirmar por Western blot la expresión de ambos VHHs (VHH5 y VHHNR) en el citoplasma de células eucariotas revelando con un anticuerpo anti-His. Se muestra como control un lisado de células sin transfectar (**NT**). El PM corresponde a aproximadamente 20 KDa.

Independientemente de la presencia o ausencia de MBP, fue claro que ambos VHHs pudieron expresarse en el citoplasma de células eucariotas, sugiriendo que estos fragmentos toleran correctamente el medio ambiente reductor del citoplasma y corroborando su muy buena estabilidad en este ambiente.

En una segunda etapa, la expresión de MBP-VHH5 y de MBP-VHHNR también fue corroborada y evaluada por inmunofluorescencia en líneas celulares como Hela, macrófagos RAW y células Vero. Para tal fin aquellas células que fueron transfectadas y que expresaron MBP-VHH5 pudieron ser identificadas por medio de un anticuerpo secundario acoplado a Cy™3 coloreando el citoplasma de las células de rojo. En la **Figura 22** se muestran inmunofluorescencias de las tres líneas celulares donde se puede apreciar claramente la expresión de MBP-VHH5. También se logró expresar MBP-VHHNR en dichas líneas celulares (no mostrado) y ambos intrabodies fueron expresados en macrófagos J774 (no mostrado) con resultados similares a los mostrados para macrófagos RAW.

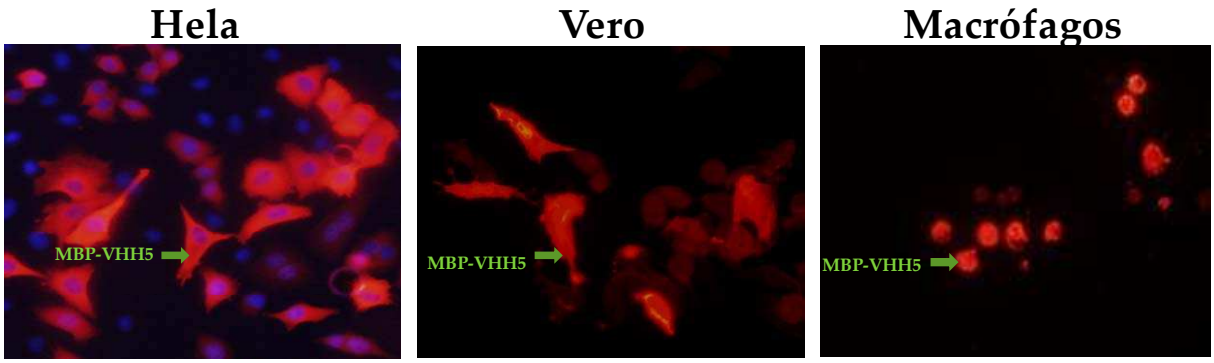


Figura 22. Expresión de MBP-VHH5 en tres líneas celulares. Se observa el citoplasma de las células coloreado de rojo, indicando que MBP-VHH5 se expresó en todas las líneas celulares.

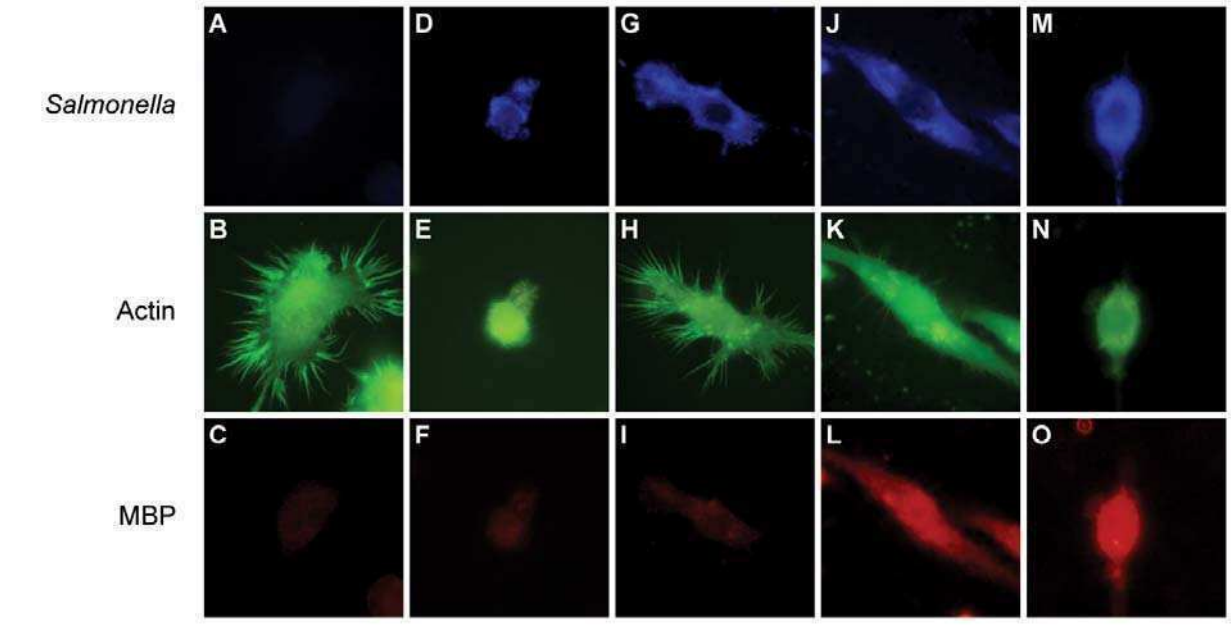
En todas las líneas celulares probadas MBP-VHH5 y MBP-VHHNR se expresaron como intrabodies en el citoplasma de las células. La eficiencia de transfección fue variable de una línea celular a otra. Por ejemplo, en células Hela la eficiencia fue de un 25 a 30%, mientras que en macrófagos y células Vero fue de un 10 a 15%, inclusive en macrófagos ese porcentaje en algunas ocasiones se vio disminuido. Si bien las construcciones VHHs-His pudieron ser expresadas en células HEK, como observamos mediante Western blot, las mismas no resultaron adecuadas para realizar los ensayos de inmunofluorescencia. Probablemente esto se deba a inconvenientes con esta técnica utilizando el anticuerpo anti-His. Por lo tanto, en adelante todos los ensayos de expresión intracelular de VHHs se realizaron con las construcciones MBP-VHHs.

Los ensayos de inhibición intracelular fueron llevados a cabo en las líneas celulares RAW, J774 y Vero. A pesar de los reiterados intentos y grandes esfuerzos por mejorar la eficiencia de transfección, no logramos obtener mejorías al respecto. En una primera etapa se realizaron ensayos de transfección con ambos MBP-VHHs e infección con el patógeno *Salmonella typhimurium* y en una segunda instancia se realizaron ensayos de transfección con ambos MBP-VHHs y translocación de SpvB al interior de células Vero. Para ambos casos se analizó protección celular por medio de MBP-VHH5.

6. Ensayos de infección con *Salmonella typhimurium* y *Salmonella* mutante

Para evaluar la capacidad inhibitoria de VHH5 como intrabody en el citoplasma de macrófagos, se llevaron a cabo ensayos de infección con el patógeno *Salmonella typhimurium* (*Salmonella* wt). La infección en cultivos de macrófagos con *Salmonella* wt induce cambios morfológicos caracterizados por redondeamiento,

desprendimiento y apoptosis luego de 24 hs de infección (114; 170; 181). Sin embargo, se reportaron ensayos de infección con *Salmonella typhimurium* mutante, la cual posee mutaciones puntuales en el gen *spvB* (originando SpvB mutada en su sito activo) que no mostraron modificaciones en el citoesqueleto, es decir que no se presentaron los cambios morfológicos mencionados anteriormente (172). Para los ensayos de infección se transfectaron de manera transiente macrófagos RAW, los mismos fueron infectados con Salmonella wt y los resultados fueron visualizados por inmunofluorescencia. Incluimos los siguientes controles: por un lado, *Salmonella typhimurium* mutante (*Salmonella* mut), la cual tiene delecionado el gen *spvB* en el plásmido de virulencia y por lo tanto la enzima no se expresa en el citoplasma de la célula hospedadora; por otro lado, las células fueron transfectadas con MBP-VHHNR e infectadas. Para el análisis de los resultados, consideramos que las células estaban protegidas cuando se las infectó y mostraron su citoesqueleto polimerizado. En la **Figura 23** se puede apreciar una inmunofluorescencia del ensayo de infección con sus correspondientes controles.



Salmonella wt	-	+	-	+	+
Salmonella mt	-	-	+	-	-
VHH5	-	-	-	+	-
VHHαtr	-	-	-	-	+

Figura 23. Infección de macrófagos RAW. Inmunofluorescencia de macrófagos RAW transfectados con MBP-VHH5 (VHH5), MBP-VHHNR (VHHαtr) o sin transfectar, e infectados con *Salmonella wt* o con la cepa que no expresa SpvB (Salmonella mut). Se observa en la fila superior la presencia de las bacterias (anticuerpo anti-*Salmonella*, azul). En la fila central se muestran las células marcadas con faloidina-FITC (verde). En la fila inferior se muestran las células marcadas con anti-MBP (rojo). Se muestran los controles correspondientes.

En los macrófagos RAW transfectados con los vectores que codifican para MBP-VHH5 y para MBP-VHHNR se confirmó por microscopia de fluorescencia que ambos fueron igualmente expresados en el citoplasma (**Figura 23; L, O)**. Luego, estos cultivos fueron infectados con *Salmonella* wt (**Figura 23; J, M**) y la morfología del citoesqueleto (**Figura 23; K, N**) fue observada, analizada y comparada con los controles incluidos en el ensayo. Las células que expresaron MBP-VHHNR y que fueron infectadas mostraron su citoesqueleto redondeado. Al observar las células en cultivo, se pudieron visualizar células parcialmente despegadas y también se observó apoptosis celular. Esta morfología (citoesqueleto redondeado) fue similar a la presentada por las células que solo fueron infectadas con *Salmonella* wt (**Figura 23D, E vs N**). Este efecto fue atribuido en gran parte a SpvB, debido a que las células que fueron infectadas con *Salmonella* mut (**Figura 23G**) no mostraron su citoesqueleto modificado (**Figura 23H**). Las células que expresaron MBP-VHH5 y fueron infectadas con *Salmonella* wt, si bien presentaron un cambio parcial en su morfología, presentaron el citoesqueleto protegido, sugiriendo que el mismo podría ser comparado al citoesqueleto que se visualizó en las células infectadas con *Salmonella* mut (**Figura 23H vs K**).

Estos resultados, efectivamente nos indicaron que MBP-VHH5 protege a las células del efecto tóxico causado por el factor de virulencia SpvB, es decir, VHH5 neutraliza a la toxina en el citoplasma de las células. Esta protección resultó específica debido a que, como se mostró anteriormente, las células que expresaron MBP-VHHNR y fueron infectadas con *Salmonella* wt se redondearon. Claramente, MBP-VHHNR no protegió a las células del efecto tóxico causado por SpvB.

Para cuantificar la cantidad de células protegidas por MBP-VHH5, se contaron en cada pocillo las células que expresaron el intrabody y que habían sido infectadas. Observamos que en el 94% de las células que fueron transfectadas con MBP-VHH5 e infectadas, el citoesqueleto se encontraba protegido. Consideramos que el porcentaje de células que mostró su citoesqueleto protegido es significativo.

Para discriminar los efectos citotóxicos generados por SpvB de otros factores de virulencia presentes en el patógeno, encaramos nuevos ensayos en los cuales SpvB fue translocada al interior celular.

7. Ensayos de translocación con la toxina de fusión C2IN/C-SpvB al interior celular

Para evaluar de forma unívoca la capacidad inhibitoria del VHH5 sobre SpvB, analizamos el efecto protectivo del intrabody expresado en el interior de células Vero las cuales fueron tratadas con SpvB agregada exógenamente.

En los ensayos de translocación, trabajamos con la toxina de fusión C2IN/C-SpvB para que SpvB pudiera translocarse al interior de las células, utilizando la estrategia descripta por Pust et al (188). A continuación se detalla brevemente la estrategia utilizada por los autores mencionados. *Clostridium botulinum* posee una toxina denominada C2 que, al igual que SpvB, ADP-ribosila la actina, depolimerizando los filamentos y causando pérdida de la morfología celular evidenciada por el redondeamiento y generando apoptosis celular. El patógeno reside en endosomas cuando se encuentra en el interior de las células hospedadoras. *Clostridium* secreta la toxina C2, la cual interacciona con otro componente proteico

denominado C2IIa, el cual se une a receptores de la membrana de los endosomas. La interacción de ambos componentes y la unión de C2IIa a receptores de la membrana de los endosomas permiten que la toxina C2 sea translocada al citoplasma de las células hospedadoras. El componente enzimático de C2, llamado C2I es una ADP-ribosiltransferasa. La interacción de C2 con C2IIa es mediada por el N-terminal de C2 (C2IN). C2IN es enzimáticamente inactivo. Por lo tanto, C2IN y C2IIa pueden ser utilizados como adaptador y translocador, respectivamente, para el ingreso de proteínas al interior de células eucariotas. SpvB no puede ingresar al interior de células eucariotas, por tal motivo se diseñó una quimera utilizando el componente enzimáticamente inactivo de *Clostridium spp*, C2IN. Estos autores fusionaron el dominio C-terminal de SpvB (C-SpvB) junto a C2IN, construyendo así una quimera denominada C2IN/C-SpvB. Ensayos realizados con la quimera mostraron cambios morfológicos detectados en las células los cuales son atribuidos al efecto tóxico causado por SpvB.

En una primera etapa y para calcular qué cantidad de toxinas fueron necesarias para que el 100% de las células se redondearan, se incubaron diferentes cantidades de C2I + C2IIa por un lado y por otro C2IN/C-SpvB + C2IIa y las mismas fueron agregadas a un cultivo de células Vero durante 3 hs. En los ensayos de infección pudimos identificar a las células infectadas mediante tinción o anticuerpos específicos; en este ensayo no resultó posible realizar la identificación de las toxinas. Por esto, fue de gran importancia conocer la cantidad de toxinas necesaria (ver Materiales y métodos) para asegurar que la totalidad de las células estuviera afectada para, en una etapa posterior, analizar el efecto inhibitorio de VHH5. En la **Figura 24** se muestra la morfología de las células sin tratar y las tratadas con las toxinas, mediante microscopía de contraste de fase.

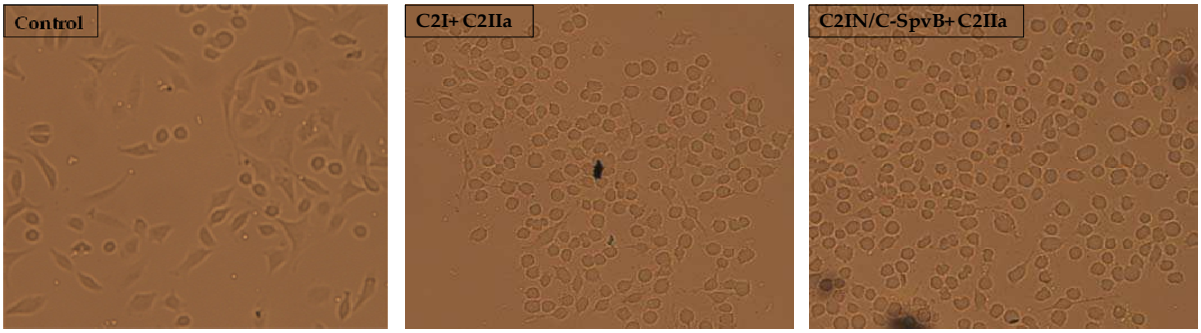


Figura 24. Morfología de células Vero incubadas con la toxina de fusión C2IN/C-SpvB. Se incubaron células Vero con las toxinas C2I + C2IIa o C2IN/C-SpvB + C2IIa durante 3 hs y luego la morfología celular fue analizada por microscopía de contraste de fase.

Claramente se puede observar que la toxina de fusión C2IN/C-SpvB indujo el redondeamiento de las células, de la misma manera que el control positivo con la toxina de *Clostridium spp*. Posteriormente, analizamos la capacidad de VHH5 de inhibir a C2IN/C-SpvB. Para tal fin, las toxinas C2I y C2IN/C-SpvB fueron incubadas previamente en presencia o ausencia de VHH5 y luego fueron agregados al cultivo de células Vero durante 3 hs. Nuevamente, la citotoxicidad fue monitoreada por microscopía de contraste de fase (**Figura 25**).

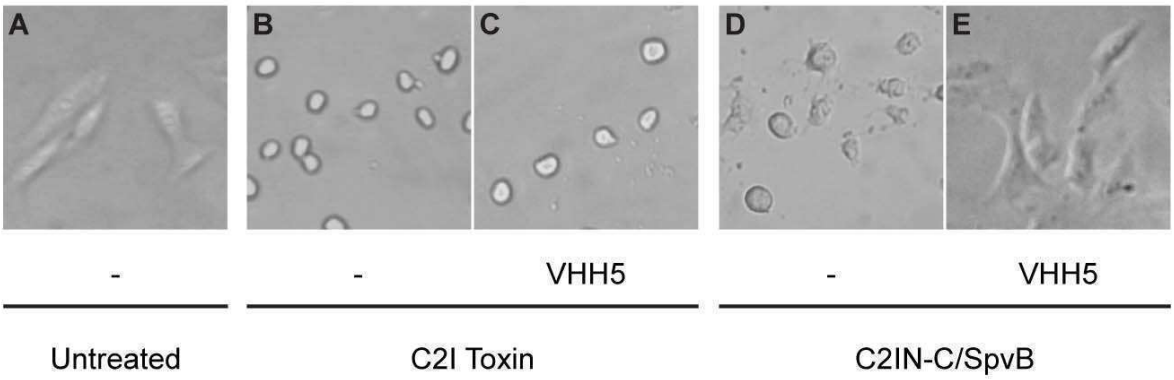


Figura 25. Incubación de VHH5 con la toxina de fusión C2IN/C-SpvB. Se muestran fotografías de microscopía de contraste de fase de células Vero incubadas con C2I en presencia o ausencia de VHH5 o con C2IN/C-SpvB en presencia o ausencia de VHH5. Se muestra el control de células Vero sin tratar.

Como se observó en el ensayo anterior, las células tratadas con la toxina C2IN/C-SpvB se redondearon, al igual que el control de células tratadas con la toxina de *Clostridium* (**Figura 25Dy B**). Se observa claramente que las células tratadas con la mezcla VHH5 + C2IN/C-SpvB conservan su morfología intacta, similar a la morfología de las células sin tratar (**Figura 25A y E**). VHH5 no tuvo un efecto inhibitorio en la toxicidad de C2I, evidenciando su especificidad por SpvB (**Figura 25C**). El 100% de las células tratadas con VHH5 conservó su morfología intacta.

En este caso el efecto protector de VHH5 cuando es incubado con la quimera se puede deber a la inhibición de la actividad tóxica o alternativamente, a la inhibición de la translocación de SpvB al interior de las células. Para estudiar la capacidad inhibitoria de VHH5 sobre la actividad enzimática de la toxina de fusión, realizamos un ensayo similar utilizando a VHH5 como intrabody.

Evaluamos si VHH5 como intrabody es capaz de inhibir a la toxina de fusión C2IN/C-SpvB en el interior de células eucariotas. Para observar este efecto, células Vero creciendo en subconfluencia se transfectaron con la construcción MBP-VHH5 y los cultivos fueron incubados con la toxina de fusión C2IN/C-SpvB. Las células fueron observadas por microscopía de fluorescencia (**Figura 26**).

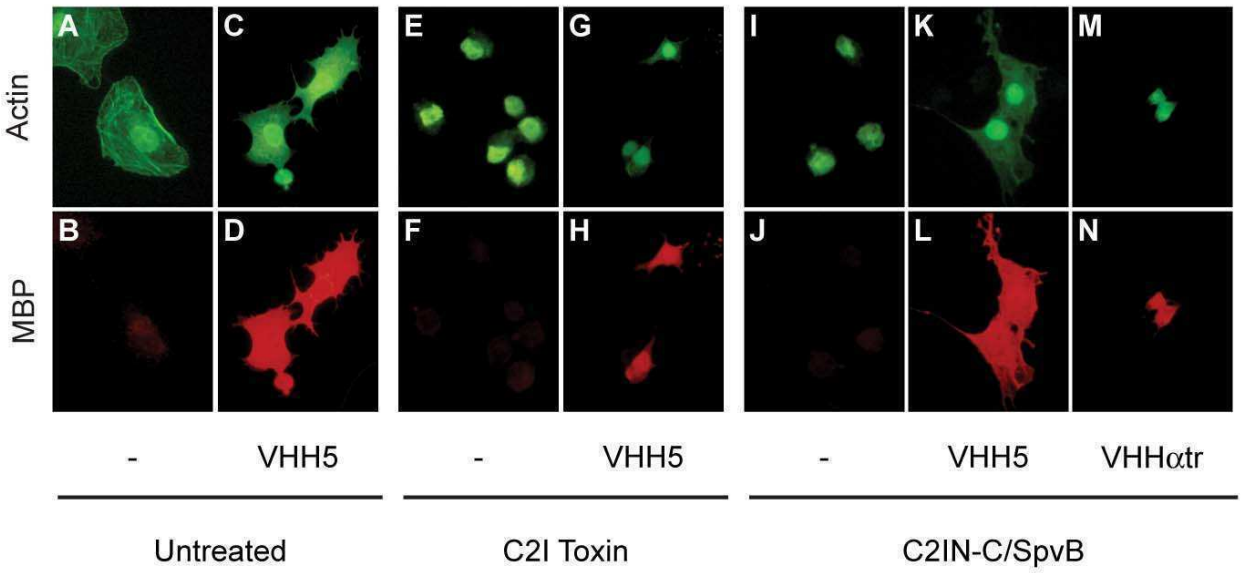


Figura 26. Translocación de C2IN/C-SpvB al interior de células transfectadas con VHH5. Inmunofluorescencia de células Vero transfectadas con MBP-VHH5, con MBP-VHHNR (VHHαtr) o sin transfectar (-) y tratadas con la toxina C2I o con C2IN/C-SpvB o sin tratar. En la fila superior se muestran las células marcadas con faloidina-FITC (verde). En la fila inferior se muestran las células marcadas con anti-MBP (rojo).

Las células transfectadas con MBP-VHH5 e incubadas con C2IN/C-SpvB no presentaron redondeamiento celular (**Figura 26K y L**). Tanto las células tratadas con C2IN/C-SpvB y no transfectadas (**Figura 26I y J**) como las transfectadas con MBP-VHHNR e incubadas con C2IN/C-SpvB presentaron redondeamiento (**Figura 26M y N**). Estos resultados muestran que MBP-VHH5 inhibe los efectos citopáticos causados por C2IN/C-SpvB.

MBP-VHH5 no tiene ningún efecto sobre la toxicidad de C2I, evidenciando la especificidad de VHH5 por la toxina SpvB (**Figura 26G y H**). Las células transfectadas con MBP-VHH5 e incubadas con C2IN/C-SpvB (**Figura 26K y L**) tienen una morfología levemente modificada con respecto a las células no tratadas (**Figura 26A y B**), pero similar a las que fueron solamente transfectadas (**Figura 26C y D**), lo que sugiere que la transfección por si misma modifica a las células.

Pudimos estimar que el 98% de las células transfectadas con MBP-VHH5 e incubadas con C2IN/C-SpvB conservó su citoesqueleto intacto y el 2% restante presentó su morfología algo modificada.

El conjunto de estos resultados nos permite concluir que VHH5 bloquea la actividad de SpvB cuando la misma es translocada al interior de células eucariotas.

En resumen, pudimos probar que VHH5 inhibe a SpvB en células eucariotas por tres ensayos diferentes. Como estos ensayos difieren en la fuente de la toxina y del anticuerpo, podemos concluir que el fragmento VHH5 de llamas es específico para SpvB y funcionalmente activo en un ambiente reductor como es el citoplasma de células eucariotas.

Conclusiones generales

- La enzima SpvB fue purificada y su actividad enzimática fue medida por radioactividad y fluorometría. El dominio C-terminal de SpvB que obtuvimos, ADP-ribosila a la actina, depolimerizando los filamentos de la misma.

- Se diseñó un plan de inmunización en llamas y las mismas fueron inmunizadas con el dominio catalítico C-terminal de SpvB. Se produjo una respuesta humoral significativa contra SpvB, lo que permitió generar una biblioteca de expresión en fagos (de tamaño $4x10^7$ clones) de los fragmentos variables de hcIgG denominados VHH. La biblioteca obtenida fue de buena calidad y variable.

- A partir de tres rondas de selección en solución con 50 nM de SpvB, se obtuvieron fagos que reconocieron a SpvB. Mediante un ELISA de fagos a partir de clones únicos, se identificó la presencia de un gran porcentaje de clones específicos contra SpvB.

- El análisis de las secuencias de los VHHs específicos contra SpvB reveló que el grupo mayoritario tiene un CDR3 de 18 aminoácidos de largo.

- Se pudieron expresar y purificar como proteína soluble cinco VHHs representativos. Mediante un ensayo de radioactividad pudimos observar que todos los VHHs seleccionados inhibieron la actividad enzimática de SpvB.

- El ensayo de fluorometría permitió cuantificar la capacidad de cada VHH de inhibir a SpvB. Los anticuerpos VHH5 y VHH6 lograron un 100% de inhibición en relación equimolar en las condiciones ensayadas.

- Fue posible expresar VHHs como intrabodies en el citoplasma de diferentes líneas celulares y su expresión no afectó la integridad celular.

- La expresión de VHH5 en macrófagos que luego fueron infectados con *Salmonella*, logró neutralizar la toxina y, si bien las células presentaron un cambio parcial en su morfología, mostraron el citoesqueleto protegido.

- La translocación de SpvB al interior de células Vero no indujo citotoxicidad en las células que expresaron VHH5 como intrabody. A diferencia de los ensayos de infección, no se observaron alteraciones en la arquitectura celular, debido a la ausencia de otros factores de virulencia de *Salmonella*.

- Los controles realizados en los ensayos de infección y de translocación nos permitieron concluir claramente que la actividad de SpvB es inhibida específicamente por VHH5 (y no por VHH NR) y además, que VHH5 reconoce específicamente a SpvB, debido a que no tuvo un efecto inhibitorio sobre la toxicidad de la toxina C2I de *Clostridium spp*.

Estos resultados constituyen una prueba de concepto sobre el uso de anticuerpos de dominio único de llama para la inhibición de enzimas intracelulares.

DISCUSIÓN

Una estrategia atractiva para impedir el proceso infectivo de bacterias y virus es el bloqueo de factores de virulencia mediante anticuerpos específicos. Sin embargo, esta estrategia presenta dificultades en el caso de patógenos intracelulares, dado que el medio intracelular es un ambiente reductor en el cual los anticuerpos convencionales no presentan estabilidad estructural (176,184). En este trabajo de tesis evaluamos la obtención y el uso de anticuerpos de dominio único, estables en un ambiente reductor, para inhibir a la toxina SpvB de *Salmonella spp*. Las enzimas que ADP-ribosilan, como la toxina del cólera y la toxina diftérica, son factores de virulencia esenciales en una gran variedad de patógenos bacterianos, incluyendo ciertas bacterias intracelulares (181-183). La virulencia de *Salmonella spp* está determinada en parte por la toxina SpvB, una ADP-ribosiltransferasa secretada al citoplasma de las células hospedadoras que interfiere en la polimerización de la actina, causando apoptosis y muerte celular.

Los camélidos poseen, además de anticuerpos convencionales, anticuerpos desprovistos de cadena liviana y del dominio CH1, denominados hcIgG. El sitio de unión al antígeno en los hcIgG está formado por un único dominio, llamado VHH (46,48). El hecho de que este dominio sea de pequeño tamaño, y esté formado por una única cadena polipeptídica, facilita su obtención y posibles aplicaciones. En este trabajo estudiamos las características de VHHs obtenidos a partir de una llama inmunizada con el dominio catalítico de la enzima SpvB de *Salmonella typhimurium* y demostramos que estos anticuerpos pueden bloquear intracelularmente la actividad enzimática y citotóxica de esta toxina bacteriana.

Una parte de este trabajo se centró en la generación de una biblioteca inmune de expresión en bacteriófagos de la región variable (VHH) de las hcIgG. A partir de la biblioteca obtenida, de tamaño de $4x10^7$ clones, se expresaron los bacteriófagos y se seleccionaron en solución aquéllos que reconocieron a SpvB. Previamente a la selección de VHHs específicos contra SpvB, secuenciamos 10 clones elegidos al azar

y no se encontraron clones sin inserto ni secuencias no correspondientes a VHHs. Ninguno de estos clones coincidió con los clones secuenciados luego de la selección. La biblioteca resultó de alta calidad y variabilidad y su tamaño resultó adecuado, resultando similar al obtenido para otras bibliotecas construidas en el laboratorio (189,190-191). A pesar de que en los clones secuenciados de la biblioteca el 50 % presentó cisteínas adicionales, éstas no fueron encontradas en ninguno de los clones secuenciados luego de la selección. Pensamos que esto podría deberse a que la conformación adquirida en los VHHs que poseen dichas cisteínas no resulte adecuada para unirse a SpvB.

En bibliotecas obtenidas previamente, la selección se realizó a partir de un ELISA inmovilizando el antígeno en fase sólida, seguida por una elución clásica o por una elución específica (189-190, 192), o mediante selección sobre células expresando el antígeno en su membrana (191). Nosotros, en cambio, elegimos el método de selección por afinidad en solución (193). Al utilizar el inmunógeno en solución se conserva su estructura nativa, no produciéndose la desnaturalización que ocurre al adsorberlo a una superficie sólida. De esta manera se seleccionan mayoritariamente anticuerpos que reconozcan al antígeno en su estado nativo. Otra ventaja de esta técnica es que posibilita trabajar con bajas concentraciones de antígeno y así permite seleccionar a los anticuerpos con mayor afinidad. Cabe destacar que el método de selección en solución permite discriminar a los anticuerpos por su afinidad intrínseca a diferencia de la selección en fase sólida, en la cual también juega un rol la avidez.

La selección fue hecha con dos concentraciones de antígeno, 10 nM y 50 nM. Observamos que con 10 nM de SpvB no hubo un enriquecimiento significativo de fagos específicos mientras que con 50 nM de SpvB sí lo hubo. Esto sugiere que en nuestro sistema, se estarían seleccionando anticuerpos con una afinidad en el orden submicromolar. Para confirmar esto se deberá realizar un análisis por biosensor. Estos resultados fueron similares a los obtenidos para otros VHHs generados en nuestro laboratorio (189, 191-192) y a otros VHHs mencionados en la bibliografía.

Por ejemplo, en el trabajo de Koch-Nolte y col., las afinidades de los dominios VHHs analizados estuvieron en un rango de 36 a 55 nM (191) y en el de Ratier y col., estuvieron en el rango de 22 a 86 nM (192). A pesar de haber maximizado las condiciones para obtener anticuerpos de mayor afinidad que los obtenidos por otros métodos en nuestro laboratorio, no logramos obtener anticuerpos con mayor afinidad. Para obtener anticuerpos de mayor afinidad, se debería haber aumentado el número de inmunizaciones, la frecuencia de la toma de muestras o el tamaño de la biblioteca. Sin embargo, consideramos importante evaluar los costos, los tiempos y el bienestar de los animales. Pudimos obtener con el plan de inmunización diseñado y el método de selección elegido, anticuerpos capaces de inhibir la actividad enzimática de SpvB, objetivo principal de nuestro trabajo.

Los 20 clones elegidos al azar, secuenciados y seleccionados presentaron un FR2 típico de camélidos y ausencia completa del dominio CH1. Ninguno presentó mutaciones en la leucina11 y tampoco se observaron puentes disulfuro adicionales. Si bien se ha postulado que la presencia de puentes disulfuro adicionales confiere una mayor estabilidad a los dominios VHHs, la ausencia de los mismos en los clones de VHHs obtenidos no impidió su expresión y purificación, e incluso fue posible conservarlos durante varias semanas a 4°C y a altas concentraciones de imidazol sin que su estabilidad y capacidad de unión por el antígeno se vieran comprometidas. Clasificamos a los 20 clones seleccionados de acuerdo al largo y a la similitud del CDR3. En VHHs, el CDR3 se caracteriza por el largo y elevada variabilidad y además provee una gran superficie de unión al antígeno capaz de penetrar en el sitio activo de enzimas inhibiendo su actividad (64, 84-85). Notablemente, la mayoría de los clones presentó un CDR3 de 18 aminoácidos de largo. Consideramos que los clones con CDR3 más largos eran los mejores candidatos para inhibir la actividad ADP-ribosiltransferasa de SpvB.

Para realizar un análisis detallado sobre la capacidad inhibitoria de estos fragmentos, elegimos 5 VHHs representativos de la población analizada, de acuerdo a la longitud de su CDR3. Para medir la actividad enzimática de SpvB desarrollamos dos técnicas muy diferentes entre si, mediante el uso de radioactividad y de fluorescencia. Mediante el ensayo de radioactividad, observamos que todos los VHHs analizados bloquean la capacidad de SpvB de ADP-ribosilar la actina, mientras que el VHH no relacionado es incapaz de inhibir a SpvB, demostrando la especificidad de los VHHs seleccionados. Todos los VHHs específicos ensayados inhibieron a SpvB en una relación molar SpvB:VHH de 1:1000, no lográndose observar claramente mediante esta técnica la inhibición de la actividad enzimática a menores concentraciones de VHH, como se explicó en Resultados y Conclusiones. En trabajos previos, empleando esta misma técnica logramos obtener una curva de dosis-respuesta con 3 VHHs que inhiben la actividad ADP-ribosiltransferasa de ecto-enzimas de la superficie de linfocitos (191). Es posible que en este trabajo se haya logrado realizar la curva de dosis respuesta debido a que realizaron los ensayos con un sustrato de SpvB cuantificado (en este caso agmatina) en lugar del lisado de células (como fuente de actina) que nosotros utilizamos. Teniendo en cuenta los resultados de esta Tesis en los ensayos de fluorometría, podemos decir que los VHHs evaluados sí son capaces de inhibir la actividad de SpvB en menores concentraciones de anticuerpo. Probablemente podríamos haberlo mostrado por radioactividad modificando algunos procedimientos del ensayo, sin embargo decidimos aplicar la técnica de fluorometría. El análisis de fluorometría nos permitió determinar cuantitativamente la capacidad inhibitoria de cada uno de los VHHs seleccionados. Cada VHH bloqueó de manera dosis-dependiente la actividad ADP-ribosiltransferasa de SpvB y dos VHHs, VHH5 y VHH6, inhibieron a SpvB en relación 1:1 en concentraciones nanomolares. Resulta interesante notar que VHH5 y VHH6, con CDR3 de 18 aminoácidos y secuencias muy similares, fueron capaces de producir un 100% de inhibición a una relación SpvB:VHH equimolar. Esta inhibición se produjo utilizando una concentración de 66 nM de enzima y de VHH, por lo tanto

se puede estimar que el valor de la afinidad de estos VHHs sería cercano a 66 nM. Esta estimación concuerda con la realizada en las rondas de selección de fagos. Para medir la afinidad de estos VHHs por SpvB, queda pendiente realizar el análisis en biosensor. Por otro lado, aquellos VHHs con un CDR3 más corto y distinto, necesitaron un exceso molar de 3 a 5 veces más de VHH para alcanzar el 100% de inhibición. Estos resultados nos sugieren que los anticuerpos VHH5 y VHH6 se unen al sitio activo o a un sitio solapado con el sitio activo de SpvB, inhibiendo la actividad ADP-ribosiltransferasa de la enzima. En cambio, los otros VHHs, quizás se unan más débilmente a la enzima (menor afinidad), o alternativamente, interactúen con un sitio parcialmente solapado con el sitio activo de SpvB. Mediante la utilización de biosensor con mutantes de SpvB en su sitio activo se podrían analizar las hipótesis mencionadas. A partir de la cristalización de estos VHHs unidos a la enzima se podrán confirmar estas hipótesis. Según nuestros resultados, y lo establecido anteriormente, es posible que exista una correlación entre el tamaño del CDR3 y el porcentaje de inhibición. Para corroborarlo, tendremos que analizar más VHHs específicos contra SpvB por la técnica de fluorometría.

Se ha demostrado que los VHHs pueden ser expresados en el citoplasma de células eucariotas y en otros compartimentos celulares, siendo funcionalmente activos (118,119, 121). Los trabajos reportados hasta el momento sobre intrabodies, en general están basados en la inhibición de proteínas y virus, pero no se obtuvieron inhibidores intracelulares de toxinas bacterianas. Por este motivo, y porque tanto VHH5 como VHH6 con CDR3 de mayor longitud inhiben la actividad enzimática de SpvB en relación equimolar, consideramos que ambos fragmentos eran buenos candidatos para inhibir a SpvB en el interior de células eucariotas, es decir, que podían ser utilizados como intrabodies. La eficacia de un intrabody está determinada por su afinidad, estabilidad y nivel de expresión dentro de las células. Se ha descripto que, aún con afinidades muy bajas, ciertos VHHs tienen la capacidad de inhibir la acción de proteínas intracelulares (121). Como indican Gueorguieva y

col., VHHs con afinidades micromolares pueden inhibir eficientemente funciones celulares si el intrabody es lo suficientemente estable y tiene elevados niveles de expresión. En dicho trabajo se muestra la capacidad de VHHs expresados como intrabodies y con afinidades en el rango micromolar, de inhibir una proteína citoplasmática involucrada en enfermedades neurodegenerativas. Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis sugieren que las afinidades de VHH5 y VHH6 por SpvB se encuentran en el rango nanomolar. Teniendo en cuenta esto y la ya conocida estabilidad de los VHHs en ambientes reductores, elegimos a VHH5 como posible candidato a inhibir a SpvB en el interior de células eucariotas. Los VHHs pudieron ser expresados en 5 líneas celulares. En una primera etapa y para asegurarnos que los VHHs se podían expresar en el citoplasma de las células, utilizamos líneas celulares como HEK y Hela, usualmente usadas para transfección. Como los resultados fueron satisfactorios, luego se intentó y se corroboró la expresión en las líneas de macrófagos (RAW y J774) y en células Vero. Fue de gran importancia e interés expresar los intrabodies en estas líneas ya que estos son los tipos celulares utilizados como modelos en la infección por *Salmonella*. La presencia del intrabody (VHH5 y VHHNR) en ningún caso inhibió el crecimiento celular ni tampoco se observó una modificación de la morfología celular, sugiriendo que los VHHs son bien tolerados por las células y no interfieren en ningún otro proceso celular. Dado que en una transfección transiente el número de células transfectadas puede ser bajo o heterogéneo, intentamos en un principio obtener líneas de transfección estables en células Hela y macrófagos en J774. A pesar de que ambas líneas sobrevivieron al proceso de selección por antibióticos, (es decir, que contenían el plásmido con el gen del VHH y la resistencia a Geneticina), luego de unas semanas ambas líneas dejaron de replicarse. A pesar de que con células Hela se avanzó un poco más, hasta el momento no ha sido posible obtener una línea estable de células que expresen un VHH. Si bien se ha reportado la obtención de una línea celular de expresión estable de un VHH (183), este trabajo se ha realizado en células CHO, las cuales no son

útiles para nuestros ensayos. Por lo tanto, debimos trabajar con un sistema de transfección transiente.

Por medio de dos experimentos independientes entre si, uno infectando con la bacteria *Salmonella* wt y el otro translocando la toxina SpvB al interior de las células, demostramos que VHH5 es capaz de bloquear la actividad ADP-ribosiltransferasa de SpvB en el citoplasma de células eucariotas. En los ensayos de infección, VHH5 protegió a las células de la citotoxicidad causada por SpvB en los tiempos evaluados. Pudimos observar que las células que expresaron VHH5 y que fueron infectadas mostraron su citoesqueleto protegido, indicando que el intrabody neutraliza a la toxina en el citoplasma de la célula. Las diferencias observadas entre la morfología celular de las células sin infectar y la de las infectadas con *Salmonella* mut evidencian que la presencia de otros factores de virulencia diferentes a SpvB en *Salmonella* wt producen leves modificaciones en la arquitectura celular. Consideramos que en aquellas células en las que el intrabody se expresó correctamente y que luego fueron infectadas, el citoesqueleto fue totalmente protegido de la actividad de SpvB, y que las leves alteraciones en la arquitectura celular fueron producto de otros factores de virulencia y posiblemente de la transfección, como se muestra en el ensayo de translocación. De esta manera, en las células transfectadas con VHH5 e infectadas, no se observa el mismo fenotipo que en las células sin infectar, pero sí resulta similar al observado en las células infectadas con la bacteria mutante para SpvB. A pesar de los cambios morfológicos en el citoesqueleto de las células transfectadas con VHH5 e infectadas con *Salmonella spp*, el intrabody es capaz de proteger a las células de la ADP-ribosilación causada por SpvB disminuyendo notablemente la mortalidad de las mismas, al menos en los tiempos empleados en el ensayo. Una línea de expresión estable de VHH5 nos hubiese permitido evaluar la supervivencia celular a tiempos mayores. Como se mencionó previamente, la baja eficiencia de transfección y en algunos casos la ausencia de expresión del intrabody fue una limitante que se presentó en estos ensayos, y por tal motivo los mismos fueron repetidos varias veces. Con una línea

estable se hubiese logrado una homogénea expresión de VHH y descartado la alteración que induce el proceso de transfección en las células, restándole así variables al sistema.

Pudimos estimar que un 94 % de células transfectadas e infectadas presentó el citoesqueleto protegido, es decir, que la mayoría de las células no mostró signos de mortalidad luego de 24 hs de infección. En el 6 % restante de las células que expresaron VHH5 y que fueron infectadas, el citoesqueleto no fue protegido. Consideramos que esto pudo deberse a un defecto en la expresión o el plegamiento de VHH5.

En el ensayo de translocación de SpvB al interior de células eucariotas, VHH5 expresado en el citoplasma de células Vero neutralizó completamente a la toxina logrando una protección total. El 98 % de las células transfectadas con VHH5 presentó el citoesqueleto intacto, no manifestando signos de muerte celular, como redondeamiento y desprendimiento celular. Las diferencias observadas entre las células transfectadas y las células sin transfectar evidencian, como se comentó previamente, que la transfección en si modifica levemente la morfología celular, característica observada en esta línea celular, como también en la mayoría de las líneas celulares utilizadas en este trabajo. Los controles realizados tanto con la toxina C2I de *Clostridium botulinum* como con el VHH no relacionado, proporcionaron resultados contundentes. El 100 % de las células tratadas con estos controles presentaron redondeamiento y desprendimiento celular. Este sistema brindó importantes ventajas en comparación con el ensayo de infección con *Salmonella*; una de ellas es la ausencia de otros factores de virulencia bacterianos, permitiendo atribuir las modificaciones en la morfología celular únicamente a los efectos citotóxicos causados por SpvB.

Por otro lado, adoptando un sistema similar al mencionado anteriormente, pero preincubando la toxina SpvB con VHH5, pudimos demostrar que el VHH5 inhibe la toxicidad de SpvB, reflejado en la morfología intacta de las células, la cual

claramente fue comparable con la morfología de las células sin tratar. No descartamos la posibilidad de que VHH5 pueda ejercer un efecto protectivo inhibiendo la translocación de la toxina al interior de las células.

A partir de ensayos que difieren en la fuente de la toxina y en la del anticuerpo, pudimos demostrar que VHH5 inhibe la ADP-ribosilación de la toxina SpvB en el interior de células eucariotas. Nosotros hipotetizamos que el CDR3 de este VHH, se introduce en el sitio activo de SpvB. De todas maneras, a partir de estudios estructurales sobre los contactos que efectivamente se establecen en la interacción entre VHH5 y SpvB podremos confirmar esta hipótesis. Para ello, intentaremos cristalizar el complejo entre VHH5 y SpvB.

En este trabajo de Tesis se demuestra que a partir de una biblioteca de una llama inmunizada con el dominio catalítico de SpvB se obtuvieron VHHs que bloquean específicamente la actividad ADP-ribosiltransferasa de SpvB en el interior de células eucariotas. VHHs que bloquean la actividad de SpvB no solo constituyen herramientas útiles para investigación, también proveen la base para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, por ejemplo a través de la transfección o la expresión transgénica de intrabodies, a través de la fusión a dominios translocadores o bien a través de péptidos sintetizados en base al CDR3. En algunos animales domésticos ya se han establecido tanto la introducción transgénica como la expresión tejido-específica de genes foráneos. Para aumentar la resistencia en animales domésticos hacia cepas patógenas de *Salmonella*, una estrategia experimental podría ser la expresión transgénica de VHHs como intrabodies neutralizando a SpvB en el citoplasma de las células blanco de este patógeno. En este contexto, es interesante señalar que la expresión transgénica de anticuerpos de llama de domino único ya ha sido utilizada con éxito en *Drosophila* para bloquear la agregación nuclear de una proteína (194) y en plantas (papas) para bloquear la actividad de una enzima cloroplástica que procesa el almidón (195). Por otro lado, la fusión genética a

dominios de translocación puede servir como un mecanismo para translocar proteínas a través de la membrana hacia el citoplasma de las células (102-103); de hecho, recientemente se ha utilizado para introducir anticuerpos convencionales scFv contra el oncogen *c-myc* en el citoplasma de una línea celular humana (103). Del mismo modo, la fusión de un VHH a una proteína o péptido adecuados podría ser utilizada para neutralizar a SpvB en el citoplasma de células epiteliales. Debido a su alta solubilidad y capacidad de re-plegado y menor tamaño, los anticuerpos de dominio único de camélidos podrían ser incluso más aptos para tales estrategias de translocación que los anticuerpos convencionales.

Con respecto al CDR3, debido al largo y a su interacción con el antígeno, puede ser utilizado para la síntesis y el diseño de péptidos, manteniendo la especificidad y funcionalidad del anticuerpo de dominio único. Este principio ha sido recientemente demostrado a partir de un VHH que bloquea a la lisozima (196). Los péptidos son fáciles de producir en grandes cantidades y pueden ser más fáciles de translocar a través de la membrana plasmática que las proteínas para el diseño de drogas de péptidos miméticos.

Nuestro trabajo proporciona una prueba de concepto para el desarrollo de VHHs para neutralizar a toxinas que ADP-ribosilan. En trabajos previos mostramos la capacidad de VHHs de inhibir *in vivo* a la ectoenzima ART2.2, una ADP-ribosiltransferasa que se expresa en la superficie de los linfocitos que tiene una estrecha relación con toxinas bacterianas que ADP-ribosilan (191). Como SpvB, la exoenzima S de *Pseudomonas aeruginosa* y HopU1 de *Pseudomonas syringae* son citotoxinas que ADP-ribosilan y que son translocadas al citoplasma de células de animales y de plantas, respectivamente, a través del sistema de secreción de tipo III (197-198). Teniendo en cuenta que los VHHs son muy estables en distintos ambientes y que se pueden adaptar a formatos multivalentes, son particularmente adecuados para ser utilizados como herramientas en un número variado de estrategias.

Nuestros resultados subrayan la potencialidad de VHHs de camélidos para bloquear enzimas de interés biológico en compartimentos extra e intracelulares. El presente trabajo es un aporte original sobre la utilización de anticuerpos de llama de dominio único para inhibir toxinas bacterianas en el interior de células eucariotas. Los VHHs que bloquen a SpvB, además de constituir una herramienta en investigación, pueden proporcionar una importante base para el desarrollo de nuevos reactivos terapéuticos.

Bibliografía

1. Hoffmann JA, Kafatos FC, Janeway CA, & Ezekowitz RA (1999) Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science* 284(5418):1313-1318.
2. Janeway CA, Travers P, Walport M, & Shlomchik M (2001) Immunobiology Cap. 9(5ta ed.).
3. Knappik A, *et al.* (2000) Fully synthetic human combinatorial antibody libraries (HuCAL) based on modular consensus frameworks and CDRs randomized with trinucleotides. *J Mol Biol* 296(1):57-86.
4. Braden BC & Poljak RJ (1995) Structural features of the reactions between antibodies and protein antigens. *FASEB J* 9(1):9-16.
5. Wilson IA & Stanfield RL (1994) Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes. *Curr Opin Struct Biol* 4(6):857-867.
6. Goldbaum FA, *et al.* (1996) The effect of water activity on the association constant and the enthalpy of reaction between lysozyme and the specific antibodies D1.3 and D44.1. *J Mol Recognit* 9(1):6-12.
7. De Genst E, *et al.* (2004) Chemical basis for the affinity maturation of a camel single domain antibody. *J Biol Chem* 279(51):53593-53601.
8. Cauerhff A, Goldbaum FA, & Braden BC (2004) Structural mechanism for affinity maturation of an anti-lysozyme antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(10):3539-3544.
9. Sandhu JS (1992) Protein engineering of antibodies. *Crit Rev Biotechnol* 12(5-6):437-462.
10. Kohler G & Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256(5517):495-497.
11. Saerens D, Ghassabeh GH, & Muyldermans S (2008) Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 8(5):600-608.
12. Roovers RC, van Dongen GA, & van Bergen en Henegouwen PM (2007) Nanobodies in therapeutic applications. *Curr Opin Mol Ther* 9(4):327-335.
13. Glockshuber R, Malia M, Pfitzinger I, & Pluckthun A (1990) A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments. *Biochemistry* 29(6):1362-1367.
14. Brinkmann U, Reiter Y, Jung SH, Lee B, & Pastan I (1993) A recombinant immunotoxin containing a disulfide-stabilized Fv fragment. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(16):7538-7542.
15. Smith GP (1985) Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228(4705):1315-1317.
16. Hoogenboom HR, *et al.* (1998) Antibody phage display technology and its applications. *Immunotechnology* 4(1):1-20.
17. Winter G, Griffiths AD, Hawkins RE, & Hoogenboom HR (1994) Making antibodies by phage display technology. *Annu Rev Immunol* 12:433-455.
18. Marks C & Marks JD (1996) Phage libraries--a new route to clinically useful antibodies. *N Engl J Med* 335(10):730-733.
19. Clackson T, Hoogenboom HR, Griffiths AD, & Winter G (1991) Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352(6336):624-628.
20. Chester KA, *et al.* (1994) Phage libraries for generation of clinically useful antibodies. *Lancet* 343(8895):455-456.
21. Kettleborough CA, *et al.* (1994) Isolation of tumor cell-specific single-chain Fv from immunized mice using phage-antibody libraries and the re-construction of whole antibodies from these antibody fragments. *Eur J Immunol* 24(4):952-958.
22. Barbas CF, 3rd, *et al.* (1993) Molecular profile of an antibody response to HIV-1 as probed by combinatorial libraries. *J Mol Biol* 230(3):812-823.
23. Cai X & Garen A (1995) Anti-melanoma antibodies from melanoma patients immunized with genetically modified autologous tumor cells: selection of specific

antibodies from single-chain Fv fusion phage libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(14):6537-6541.
24. Davies EL, *et al.* (1995) Selection of specific phage-display antibodies using libraries derived from chicken immunoglobulin genes. *J Immunol Methods* 186(1):125-135.
25. Yamanaka HI, Inoue T, & Ikeda-Tanaka O (1996) Chicken monoclonal antibody isolated by a phage display system. *J Immunol* 157(3):1156-1162.
26. Lang IM, Barbas CF, 3rd, & Schleef RR (1996) Recombinant rabbit Fab with binding activity to type-1 plasminogen activator inhibitor derived from a phage-display library against human alpha-granules. *Gene* 172(2):295-298.
27. Arbabi Ghahroudi M, Desmyter A, Wyns L, Hamers R, & Muyldermans S (1997) Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies. *FEBS Lett* 414(3):521-526.
28. Griffiths AD, *et al.* (1993) Human anti-self antibodies with high specificity from phage display libraries. *EMBO J* 12(2):725-734.
29. Marks JD, *et al.* (1991) By-passing immunization. Human antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *J Mol Biol* 222(3):581-597.
30. Mattheakis LC, Bhatt RR, & Dower WJ (1994) An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(19):9022-9026.
31. Hanes J & Pluckthun A (1997) In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(10):4937-4942.
32. Amit AG, Mariuzza RA, Phillips SE, & Poljak RJ (1986) Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 A resolution. *Science* 233(4765):747-753.
33. Colman PM, *et al.* (1987) Three-dimensional structure of a complex of antibody with influenza virus neuraminidase. *Nature* 326(6111):358-363.
34. Stanfield RL, Fieser TM, Lerner RA, & Wilson IA (1990) Crystal structures of an antibody to a peptide and its complex with peptide antigen at 2.8 A. *Science* 248(4956):712-719.
35. Rini JM, *et al.* (1993) Crystal structure of a human immunodeficiency virus type 1 neutralizing antibody, 50.1, in complex with its V3 loop peptide antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(13):6325-6329.
36. Hoogenboom HR & Winter G (1992) By-passing immunisation. Human antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged in vitro. *J Mol Biol* 227(2):381-388.
37. Barbas CF, 3rd, Bain JD, Hoekstra DM, & Lerner RA (1992) Semisynthetic combinatorial antibody libraries: a chemical solution to the diversity problem. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(10):4457-4461.
38. Griffiths AD, *et al.* (1994) Isolation of high affinity human antibodies directly from large synthetic repertoires. *EMBO J* 13(14):3245-3260.
39. Hawkins RE, Russell SJ, & Winter G (1992) Selection of phage antibodies by binding affinity. Mimicking affinity maturation. *J Mol Biol* 226(3):889-896.
40. Bradbury A, Persic L, Werge T, & Cattaneo A (1993) Use of living columns to select specific phage antibodies. *Biotechnology (N Y)* 11(13):1565-1569.
41. de Kruif J, Terstappen L, Boel E, & Logtenberg T (1995) Rapid selection of cell subpopulation-specific human monoclonal antibodies from a synthetic phage antibody library. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(9):3938-3942.
42. Van Ewijk W, *et al.* (1997) Subtractive isolation of phage-displayed single-chain antibodies to thymic stromal cells by using intact thymic fragments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(8):3903-3908.

43. Pasqualini R & Ruoslahti E (1996) Organ targeting in vivo using phage display peptide libraries. *Nature* 380(6572):364-366.
44. Wesolowski J, *et al.* (2009) Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med Microbiol Immunol* 198(3):157-174.
45. Dooley H, Flajnik MF, & Porter AJ (2003) Selection and characterization of naturally occurring single-domain (IgNAR) antibody fragments from immunized sharks by phage display. *Mol Immunol* 40(1):25-33.
46. Hamers-Casterman C, *et al.* (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* 363(6428):446-448.
47. Wheeler JC (2006) A brief History of Camelids in the Western Hemisphere. *International Camelid Quarterly* (ISSN 1705-0332).
48. Muyldermans S, Atarhouch T, Saldanha J, Barbosa JA, & Hamers R (1994) Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains. *Protein Eng* 7(9):1129-1135.
49. Muyldermans S (2001) Single domain camel antibodies: current status. *J Biotechnol* 74(4):277-302.
50. van der Linden R, *et al.* (2000) Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama. *J Immunol Methods* 240(1-2):185-195.
51. Conrath KE, Wernery U, Muyldermans S, & Nguyen VK (2003) Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Dev Comp Immunol* 27(2):87-103.
52. Woolven BP, Frenken LG, van der Logt P, & Nicholls PJ (1999) The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy-chain antibody formation. *Immunogenetics* 50(1-2):98-101.
53. Nguyen VK, Hamers R, Wyns L, & Muyldermans S (1999) Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire C(H)1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies. *Mol Immunol* 36(8):515-524.
54. Tonegawa S (1983) Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302(5909):575-581.
55. Vu KB, Ghahroudi MA, Wyns L, & Muyldermans S (1997) Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies. *Mol Immunol* 34(16-17):1121-1131.
56. Tomlinson IM, *et al.* (1994) Human immunoglobulin VH and D segments on chromosomes 15q11.2 and 16p11.2. *Hum Mol Genet* 3(6):853-860.
57. Cook GP & Tomlinson IM (1995) The human immunoglobulin VH repertoire. *Immunol Today* 16(5):237-242.
58. Nguyen VK, Muyldermans S, & Hamers R (1998) The specific variable domain of camel heavy-chain antibodies is encoded in the germline. *J Mol Biol* 275(3):413-418.
59. Nguyen VK, Hamers R, Wyns L, & Muyldermans S (2000) Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire. *EMBO J* 19(5):921-930.
60. Achour I, *et al.* (2008) Tetrameric and homodimeric camelid IgGs originate from the same IgH locus. *J Immunol* 181(3):2001-2009.
61. Reynaud CA, Dahan A, Anquez V, & Weill JC (1989) Somatic hyperconversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region. *Cell* 59(1):171-183.
62. Cook GP, *et al.* (1994) A map of the human immunoglobulin VH locus completed by analysis of the telomeric region of chromosome 14q. *Nat Genet* 7(2):162-168.

63. Kabat EAW, T T ; Perry , H M; Gottesman, K S and Foeller, C. (1991) Sequences of proteins of immunological interest. *Departament of Health and Human Sevices, U S. Public Health Service, NIH., Bethesda, MD.*
64. Desmyter A, *et al.* (1996) Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat Struct Biol* 3(9):803-811.
65. Davies J & Riechmann L (1994) 'Camelising' human antibody fragments: NMR studies on VH domains. *FEBS Lett* 339(3):285-290.
66. Riechmann L & Muyldermans S (1999) Single domain antibodies: comparison of camel VH and camelised human VH domains. *J Immunol Methods* 231(1-2):25-38.
67. Aires da Silva F, *et al.* (2004) Camelized rabbit-derived VH single-domain intrabodies against Vif strongly neutralize HIV-1 infectivity. *J Mol Biol* 340(3):525-542.
68. Padlan EA (1994) Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* 31(3):169-217.
69. Lesk AM & Chothia C (1988) Elbow motion in the immunoglobulins involves a molecular ball-and-socket joint. *Nature* 335(6186):188-190.
70. Decanniere K, Muyldermans S, & Wyns L (2000) Canonical antigen-binding loop structures in immunoglobulins: more structures, more canonical classes? *J Mol Biol* 300(1):83-91.
71. Kabat EA & Wu TT (1991) Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol* 147(5):1709-1719.
72. Barre S, Greenberg AS, Flajnik MF, & Chothia C (1994) Structural conservation of hypervariable regions in immunoglobulins evolution. *Nat Struct Biol* 1(12):915-920.
73. Spinelli S, *et al.* (1996) The crystal structure of a llama heavy chain variable domain. *Nat Struct Biol* 3(9):752-757.
74. Reiter Y, Schuck P, Boyd LF, & Plaksin D (1999) An antibody single-domain phage display library of a native heavy chain variable region: isolation of functional single-domain VH molecules with a unique interface. *J Mol Biol* 290(3):685-698.
75. Chothia C, *et al.* (1992) Structural repertoire of the human VH segments. *J Mol Biol* 227(3):799-817.
76. Chothia C, *et al.* (1989) Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* 342(6252):877-883.
77. Tramontano A, Chothia C, & Lesk AM (1990) Framework residue 71 is a major determinant of the position and conformation of the second hypervariable region in the VH domains of immunoglobulins. *J Mol Biol* 215(1):175-182.
78. Chothia C & Lesk AM (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol* 196(4):901-917.
79. Decanniere K, *et al.* (1999) A single-domain antibody fragment in complex with RNase A: non-canonical loop structures and nanomolar affinity using two CDR loops. *Structure* 7(4):361-370.
80. Spinelli S, *et al.* (2000) Camelid heavy-chain variable domains provide efficient combining sites to haptens. *Biochemistry* 39(6):1217-1222.
81. Armour KL, *et al.* (1994) Sequences of heavy and light chain variable regions from four bovine immunoglobulins. *Mol Immunol* 31(17):1369-1372.
82. Wu TT, Johnson G, & Kabat EA (1993) Length distribution of CDRH3 in antibodies. *Proteins* 16(1):1-7.
83. Transue TR, De Genst E, Ghahroudi MA, Wyns L, & Muyldermans S (1998) Camel single-domain antibody inhibits enzyme by mimicking carbohydrate substrate. *Proteins* 32(4):515-522.

84. De Genst E, *et al.* (2006) Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(12):4586-4591.
85. Lauwereys M, *et al.* (1998) Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies. *EMBO J* 17(13):3512-3520.
86. Conrath KE, *et al.* (2001) Beta-lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the camelidae. *Antimicrob Agents Chemother* 45(10):2807-2812.
87. Padlan EA (1996) X-ray crystallography of antibodies. *Adv Protein Chem* 49:57-133.
88. Skerra A (1993) Bacterial expression of immunoglobulin fragments. *Curr Opin Immunol* 5(2):256-262.
89. Harmsen MM & De Haard HJ (2007) Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol* 77(1):13-22.
90. van der Linden RH, *et al.* (1999) Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta* 1431(1):37-46.
91. Sheriff S & Constantine KL (1996) Redefining the minimal antigen-binding fragment. *Nat Struct Biol* 3(9):733-736.
92. Wu AM & Senter PD (2005) Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates. *Nat Biotechnol* 23(9):1137-1146.
93. Borrebaeck CA, *et al.* (1992) Kinetic analysis of recombinant antibody-antigen interactions: relation between structural domains and antigen binding. *Biotechnology (N Y)* 10(6):697-698.
94. Borrebaeck CA & Ohlin M (2002) Antibody evolution beyond Nature. *Nat Biotechnol* 20(12):1189-1190.
95. Utsumi S & Karush F (1964) The Subunits of Purified Rabbit Antibody. *Biochemistry* 3:1329-1338.
96. Ward ES, Gussow D, Griffiths AD, Jones PT, & Winter G (1989) Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli. *Nature* 341(6242):544-546.
97. Coppieters K, *et al.* (2006) Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 54(6):1856-1866.
98. Goldman ER, *et al.* (2006) Facile generation of heat-stable antiviral and antitoxin single domain antibodies from a semisynthetic llama library. *Anal Chem* 78(24):8245-8255.
99. Goldman ER, *et al.* (2008) Thermostable llama single domain antibodies for detection of botulinum A neurotoxin complex. *Anal Chem* 80(22):8583-8591.
100. Hmila I, *et al.* (2008) VHH, bivalent domains and chimeric Heavy chain-only antibodies with high neutralizing efficacy for scorpion toxin AahI'. *Mol Immunol* 45(14):3847-3856.
101. Harmsen MM, van Solt CB, van Zijderveld-van Bemmel AM, Niewold TA, & van Zijderveld FG (2006) Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy. *Appl Microbiol Biotechnol* 72(3):544-551.
102. Cohen-Saidon C, *et al.* (2003) A novel strategy using single-chain antibody to show the importance of Bcl-2 in mast cell survival. *Blood* 102(7):2506-2512.
103. Avignolo C, *et al.* (2008) Internalization via Antennapedia protein transduction domain of an scFv antibody toward c-Myc protein. *FASEB J* 22(4):1237-1245.
104. Lo AS, Zhu Q, & Marasco WA (2008) Intracellular antibodies (intrabodies) and their therapeutic potential. *Handb Exp Pharmacol* (181):343-373.

105. Rondon IJ & Marasco WA (1997) Intracellular antibodies (intrabodies) for gene therapy of infectious diseases. *Annu Rev Microbiol* 51:257-283.
106. Kontermann RE (2004) Intrabodies as therapeutic agents. *Methods* 34(2):163-170.
107. Cattaneo A & Biocca S (1999) The selection of intracellular antibodies. *Trends Biotechnol* 17(3):115-121.
108. Tanaka T & Rabbitts TH (2003) Intrabodies based on intracellular capture frameworks that bind the RAS protein with high affinity and impair oncogenic transformation. *EMBO J* 22(5):1025-1035.
109. der Maur AA, *et al.* (2002) Direct in vivo screening of intrabody libraries constructed on a highly stable single-chain framework. *J Biol Chem* 277(47):45075-45085.
110. Proba K, Honegger A, & Pluckthun A (1997) A natural antibody missing a cysteine in VH: consequences for thermodynamic stability and folding. *J Mol Biol* 265(2):161-172.
111. Worn A & Pluckthun A (2001) Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *J Mol Biol* 305(5):989-1010.
112. Bach H, *et al.* (2001) Escherichia coli maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic single-chain antibodies. *J Mol Biol* 312(1):79-93.
113. Jurado P, Ritz D, Beckwith J, de Lorenzo V, & Fernandez LA (2002) Production of functional single-chain Fv antibodies in the cytoplasm of Escherichia coli. *J Mol Biol* 320(1):1-10.
114. Shaki-Loewenstein S, Zfania R, Hyland S, Wels WS, & Benhar I (2005) A universal strategy for stable intracellular antibodies. *J Immunol Methods* 303(1-2):19-39.
115. Colby DW, *et al.* (2004) Development of a human light chain variable domain (V(L)) intracellular antibody specific for the amino terminus of huntingtin via yeast surface display. *J Mol Biol* 342(3):901-912.
116. Tanaka T, Lobato MN, & Rabbitts TH (2003) Single domain intracellular antibodies: a minimal fragment for direct in vivo selection of antigen-specific intrabodies. *J Mol Biol* 331(5):1109-1120.
117. Jespers L, Schon O, Famm K, & Winter G (2004) Aggregation-resistant domain antibodies selected on phage by heat denaturation. *Nat Biotechnol* 22(9):1161-1165.
118. Rothbauer U, *et al.* (2006) Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat Methods* 3(11):887-889.
119. Serruys B, Van Houtte F, Verbrugghe P, Leroux-Roels G, & Vanlandschoot P (2009) Llama-derived single-domain intrabodies inhibit secretion of hepatitis B virions in mice. *Hepatology* 49(1):39-49.
120. Dekker S, *et al.* (2003) Intracellularly expressed single-domain antibody against p15 matrix protein prevents the production of porcine retroviruses. *J Virol* 77(22):12132-12139.
121. Gueorguieva D, *et al.* (2006) Identification of single-domain, Bax-specific intrabodies that confer resistance to mammalian cells against oxidative-stress-induced apoptosis. *FASEB J* 20(14):2636-2638.
122. Garrity GM, Bell, J.A. & Lilburn, T.G. (2004) Taxonomic Outline of the Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd Edition. Release 5.0. Springer-Verlag, New York.*:1-399.
123. Hueck CJ (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62(2):379-433.
124. Gotoh H, *et al.* (2003) Extracellular secretion of the virulence plasmid-encoded ADP-ribosyltransferase SpvB in Salmonella. *Microb Pathog* 34(5):227-238.
125. Coburn B, Grassl GA, & Finlay BB (2007) Salmonella, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol* 85(2):112-118.

126. Miller SI, E. L. Hohmann, and D. A. Pegues (1995) In G. L. Mandell, J. E. Bennett, and D.Raphael (ed.), Principles and practice of infectious diseases. *Churchill Livingstone, Inc., New York, N.Y.* 2:2013–2033.
127. Crump JA, Luby SP, & Mintz ED (2004) The global burden of typhoid fever. *Bull World Health Organ* 82(5):346-353.
128. Pang T, Bhutta ZA, Finlay BB, & Altwegg M (1995) Typhoid fever and other salmonellosis: a continuing challenge. *Trends Microbiol* 3(7):253-255.
129. Chalker RB & Blaser MJ (1988) A review of human salmonellosis: III. Magnitude of Salmonella infection in the United States. *Rev Infect Dis* 10(1):111-124.
130. Cooke EM (1990) Epidemiology of foodborne illness: UK. *Lancet* 336(8718):790-793.
131. McClelland M, *et al.* (2001) Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2. *Nature* 413(6858):852-856.
132. Clark MA, Jepson MA, Simmons NL, & Hirst BH (1994) Preferential interaction of Salmonella typhimurium with mouse Peyer's patch M cells. *Res Microbiol* 145(7):543-552.
133. Daniels JJ, Autenrieth IB, Ludwig A, & Goebel W (1996) The gene slyA of Salmonella typhimurium is required for destruction of M cells and intracellular survival but not for invasion or colonization of the murine small intestine. *Infect Immun* 64(12):5075-5084.
134. Kohbata S, Yokoyama H, & Yabuuchi E (1986) Cytopathogenic effect of Salmonella typhi GIFU 10007 on M cells of murine ileal Peyer's patches in ligated ileal loops: an ultrastructural study. *Microbiol Immunol* 30(12):1225-1237.
135. Steele-Mortimer O, Meresse S, Gorvel JP, Toh BH, & Finlay BB (1999) Biogenesis of Salmonella typhimurium-containing vacuoles in epithelial cells involves interactions with the early endocytic pathway. *Cell Microbiol* 1(1):33-49.
136. Chen LM, Kaniga K, & Galan JE (1996) Salmonella spp. are cytotoxic for cultured macrophages. *Mol Microbiol* 21(5):1101-1115.
137. Lindgren SW, Stojiljkovic I, & Heffron F (1996) Macrophage killing is an essential virulence mechanism of Salmonella typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(9):4197-4201.
138. Monack DM, Raupach B, Hromockyj AE, & Falkow S (1996) Salmonella typhimurium invasion induces apoptosis in infected macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(18):9833-9838.
139. Richter-Dahlfors A, Buchan AM, & Finlay BB (1997) Murine salmonellosis studied by confocal microscopy: Salmonella typhimurium resides intracellularly inside macrophages and exerts a cytotoxic effect on phagocytes in vivo. *J Exp Med* 186(4):569-580.
140. Finlay BB (1994) Molecular and cellular mechanisms of Salmonella pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 192:163-185.
141. Galan JE (1996) Molecular and cellular bases of Salmonella entry into host cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 209:43-60.
142. Fields PI, Swanson RV, Haidaris CG, & Heffron F (1986) Mutants of Salmonella typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(14):5189-5193.
143. Worley MJ, Nieman GS, Geddes K, & Heffron F (2006) Salmonella typhimurium disseminates within its host by manipulating the motility of infected cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(47):17915-17920.
144. Fath MJ & Kolter R (1993) ABC transporters: bacterial exporters. *Microbiol Rev* 57(4):995-1017.

145. Finlay BB & Falkow S (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 61(2):136-169.
146. Salmond GP & Reeves PJ (1993) Membrane traffic wardens and protein secretion in gram-negative bacteria. *Trends Biochem Sci* 18(1):7-12.
147. Van Gijsegem F, Genin S, & Boucher C (1993) Conservation of secretion pathways for pathogenicity determinants of plant and animal bacteria. *Trends Microbiol* 1(5):175-180.
148. Blum G, *et al.* (1994) Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an Escherichia coli wild-type pathogen. *Infect Immun* 62(2):606-614.
149. Lee CA (1996) Pathogenicity islands and the evolution of bacterial pathogens. *Infect Agents Dis* 5(1):1-7.
150. McDaniel TK, Jarvis KG, Donnenberg MS, & Kaper JB (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(5):1664-1668.
151. Ritter A, *et al.* (1995) tRNA genes and pathogenicity islands: influence on virulence and metabolic properties of uropathogenic Escherichia coli. *Mol Microbiol* 17(1):109-121.
152. Zhou D & Galan J (2001) Salmonella entry into host cells: the work in concert of type III secreted effector proteins. *Microbes Infect* 3(14-15):1293-1298.
153. Ochman H, Soncini FC, Solomon F, & Groisman EA (1996) Identification of a pathogenicity island required for Salmonella survival in host cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(15):7800-7804.
154. Mills DM, Bajaj V, & Lee CA (1995) A 40 kb chromosomal fragment encoding Salmonella typhimurium invasion genes is absent from the corresponding region of the Escherichia coli K-12 chromosome. *Mol Microbiol* 15(4):749-759.
155. Shea JE, Hensel M, Gleeson C, & Holden DW (1996) Identification of a virulence locus encoding a second type III secretion system in Salmonella typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(6):2593-2597.
156. Takeuchi A (1967) Electron microscope studies of experimental Salmonella infection. I. Penetration into the intestinal epithelium by Salmonella typhimurium. *Am J Pathol* 50(1):109-136.
157. Galan JE & Bliska JB (1996) Cross-talk between bacterial pathogens and their host cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12:221-255.
158. Baumler AJ, Tsolis RM, & Heffron F (1996) The lpf fimbrial operon mediates adhesion of Salmonella typhimurium to murine Peyer's patches. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(1):279-283.
159. Hensel M, *et al.* (1998) Genes encoding putative effector proteins of the type III secretion system of Salmonella pathogenicity island 2 are required for bacterial virulence and proliferation in macrophages. *Mol Microbiol* 30(1):163-174.
160. Uchiya K, *et al.* (1999) A Salmonella virulence protein that inhibits cellular trafficking. *EMBO J* 18(14):3924-3933.
161. Vazquez-Torres A, *et al.* (2000) Salmonella pathogenicity island 2-dependent evasion of the phagocyte NADPH oxidase. *Science* 287(5458):1655-1658.
162. Libby SJ, Lesnick M, Hasegawa P, Weidenhammer E, & Guiney DG (2000) The Salmonella virulence plasmid spv genes are required for cytopathology in human monocyte-derived macrophages. *Cell Microbiol* 2(1):49-58.
163. Gulig PA, *et al.* (1993) Molecular analysis of spv virulence genes of the Salmonella virulence plasmids. *Mol Microbiol* 7(6):825-830.
164. Guiney DG, Fang FC, Krause M, & Libby S (1994) Plasmid-mediated virulence genes in non-typhoid Salmonella serovars. *FEMS Microbiol Lett* 124(1):1-9.

165. Guiney DG, *et al.* (1995) Biology and clinical significance of virulence plasmids in Salmonella serovars. *Clin Infect Dis* 21 Suppl 2:S146-151.
166. Chikami GK, Fierer J, & Guiney DG (1985) Plasmid-mediated virulence in Salmonella dublin demonstrated by use of a Tn5-oriT construct. *Infect Immun* 50(2):420-424.
167. Gulig PA & Curtiss R, 3rd (1987) Plasmid-associated virulence of Salmonella typhimurium. *Infect Immun* 55(12):2891-2901.
168. Barrow PA, Simpson JM, Lovell MA, & Binns MM (1987) Contribution of Salmonella gallinarum large plasmid toward virulence in fowl typhoid. *Infect Immun* 55(2):388-392.
169. Heffernan EJ, Fierer J, Chikami G, & Guiney D (1987) Natural history of oral Salmonella dublin infection in BALB/c mice: effect of an 80-kilobase-pair plasmid on virulence. *J Infect Dis* 155(6):1254-1259.
170. Danbara H, *et al.* (1992) Effect of 50 kilobase-plasmid, pKDSC50, of Salmonella choleraesuis RF-1 strain on pig septicemia. *J Vet Med Sci* 54(6):1175-1178.
171. Wallis TS, Paulin SM, Plested JS, Watson PR, & Jones PW (1995) The Salmonella dublin virulence plasmid mediates systemic but not enteric phases of salmonellosis in cattle. *Infect Immun* 63(7):2755-2761.
172. Libby SJ, *et al.* (1997) The spv genes on the Salmonella dublin virulence plasmid are required for severe enteritis and systemic infection in the natural host. *Infect Immun* 65(5):1786-1792.
173. Boyd EF & Hartl DL (1998) Salmonella virulence plasmid. Modular acquisition of the spv virulence region by an F-plasmid in Salmonella enterica subspecies I and insertion into the chromosome of subspecies II, IIIa, IV and VII isolates. *Genetics* 149(3):1183-1190.
174. Abe A & Kawahara K (1995) Transcriptional regulation and promoter sequence of the spvR gene of virulence plasmid pKDSC50 in Salmonella choleraesuis serovar Choleraesuis. *FEMS Microbiol Lett* 129(2-3):225-230.
175. Krause M, Fang FC, & Guiney DG (1992) Regulation of plasmid virulence gene expression in Salmonella dublin involves an unusual operon structure. *J Bacteriol* 174(13):4482-4489.
176. Browne SH, Lesnick ML, & Guiney DG (2002) Genetic requirements for salmonella-induced cytopathology in human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun* 70(12):7126-7135.
177. Otto H, *et al.* (2000) The spvB gene-product of the Salmonella enterica virulence plasmid is a mono(ADP-ribosyl)transferase. *Mol Microbiol* 37(5):1106-1115.
178. Lesnick ML, Reiner NE, Fierer J, & Guiney DG (2001) The Salmonella spvB virulence gene encodes an enzyme that ADP-ribosylates actin and destabilizes the cytoskeleton of eukaryotic cells. *Mol Microbiol* 39(6):1464-1470.
179. Tezcan-Merdol D, *et al.* (2001) Actin is ADP-ribosylated by the Salmonella enterica virulence-associated protein SpvB. *Mol Microbiol* 39(3):606-619.
180. Margarit SM, Davidson W, Frego L, & Stebbins CE (2006) A steric antagonism of actin polymerization by a salmonella virulence protein. *Structure* 14(8):1219-1229.
181. Aktories K & Barbieri JT (2005) Bacterial cytotoxins: targeting eukaryotic switches. *Nat Rev Microbiol* 3(5):397-410.
182. Collier RJ (2001) Understanding the mode of action of diphtheria toxin: a perspective on progress during the 20th century. *Toxicon* 39(11):1793-1803.
183. Lowy I, *et al.* (2010) Treatment with monoclonal antibodies against Clostridium difficile toxins. *N Engl J Med* 362(3):197-205.
184. Browne SH, Hasegawa P, Okamoto S, Fierer J, & Guiney DG (2008) Identification of Salmonella SPI-2 secretion system components required for SpvB-mediated

cytotoxicity in macrophages and virulence in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 52(2):194-201.
185. Koch-Nolte F, Kernstock S, Mueller-Dieckmann C, Weiss MS, & Haag F (2008) Mammalian ADP-ribosyltransferases and ADP-ribosylhydrolases. *Front Biosci* 13:6716-6729.
186. Griffin HM & Ouwehand WH (1995) A human monoclonal antibody specific for the leucine-33 (P1A1, HPA-1a) form of platelet glycoprotein IIIa from a V gene phage display library. *Blood* 86(12):4430-4436.
187. Kurita A, *et al.* (2003) Intracellular expression of the Salmonella plasmid virulence protein, SpvB, causes apoptotic cell death in eukaryotic cells. *Microb Pathog* 35(1):43-48.
188. Pust S, *et al.* (2007) A cell-permeable fusion toxin as a tool to study the consequences of actin-ADP-ribosylation caused by the salmonella enterica virulence factor SpvB in intact cells. *J Biol Chem* 282(14):10272-10282.
189. Zarebski LM, Urrutia M, & Goldbaum FA (2005) Llama single domain antibodies as a tool for molecular mimicry. *J Mol Biol* 349(4):814-824.
190. Dona V, *et al.* (2010) Single domain antibodies are specially suited for quantitative determination of gliadins under denaturing conditions. *J Agric Food Chem* 58(2):918-926.
191. Koch-Nolte F, *et al.* (2007) Single domain antibodies from llama effectively and specifically block T cell ecto-ADP-ribosyltransferase ART2.2 in vivo. *FASEB J* 21(13):3490-3498.
192. Ratier L, *et al.* (2008) Relevance of the diversity among members of the Trypanosoma cruzi trans-sialidase family analyzed with camelids single-domain antibodies. *PLoS One* 3(10):e3524.
193. Parmley SF & Smith GP (1988) Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes. *Gene* 73(2):305-318.
194. Chartier A, *et al.* (2009) Prevention of oculopharyngeal muscular dystrophy by muscular expression of Llama single-chain intrabodies in vivo. *Hum Mol Genet* 18(10):1849-1859.
195. Jobling SA, *et al.* (2003) Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments. *Nat Biotechnol* 21(1):77-80.
196. Marquardt A, Muyldermans S, & Przybylski M (2006) A synthetic camel anti-lysozyme peptide antibody (peptibody) with flexible loop structure identified by high-resolution affinity mass spectrometry. *Chemistry* 12(7):1915-1923.
197. Deng Q & Barbieri JT (2008) Molecular mechanisms of the cytotoxicity of ADP-ribosylating toxins. *Annu Rev Microbiol* 62:271-288.
198. Engel J & Balachandran P (2009) Role of Pseudomonas aeruginosa type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol* 12(1):61-66.