



OBTENCIÓN DE ABZIMAS DE TIBURÓN CON ACTIVIDAD CORISMATO MUTASA.

Lara, H., Osuna, J. y A. Licea. CICESE, Km 107 carretera Tijuana-Ensenada, fax: 646 175 0569
alicea@cicese.mx

Abzima, corismato mutasa, IgNAR

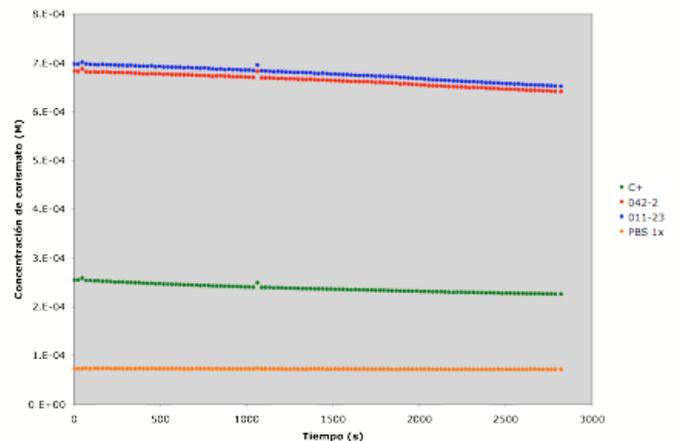
Introducción. La habilidad de los anticuerpos para complementar al antígeno ha sido explotada exitosamente para producir anticuerpos catalíticos. Debido a la actividad catalítica de estos anticuerpos, se les denomina abzimas. Los tiburones son los organismos más primitivos que poseen anticuerpos como parte de su sistema inmune, entre los que destacan las IgNAR (1). Las IgNAR poseen la particularidad de unirse al antígeno a través de solamente una región variable (1), son estables, solubles y presentan un CDR3 largo y variable (2). Por otro lado, la corismato mutasa es una enzima esencial para la producción de los aminoácidos aromáticos y solamente se encuentra en bacterias, algas, hongos y plantas. Se ha explorado la actividad corismato mutasa de anticuerpos (3), pero no se ha logrado superar la actividad de las enzimas naturales.

Debido a las ventajas de las IgNAR, analizamos la actividad corismato mutasa de fragmentos vNAR de una biblioteca no inmune del tiburón *Heterodontus francisci*.

Metodología. Reamplificamos una biblioteca de fagos que expresan vNAR(4). Seleccionamos fagos específicos usando como antígeno un análogo del estado de transición de la CM (TSA/CM)(4). Para hacer la bioselección usamos dos diluciones del antígeno: 1:100(D100) y 1:500(D500). Extrajimos fagémidos pComb3x y expresamos las proteínas en dos cepas: TOP10F' y Fa114. Construimos oligonucleótidos para subclonar en pTrc99a y posteriormente expresar en Fa114 (esta cepa es derivada de Fa113 y no produce corismato mutasa y preferato deshidrogenasa). Realizamos ELISA para verificar la unión del antígeno y los vNAR que expresan nuestros clones. Transformamos en Fa114tyrA (produce preferato deshidrogenasa) e hicimos complementación en medio mínimo para verificar actividad catalítica *in vivo*. Determinamos la actividad *in vitro* midiendo la desaparición del corismato a 275 nm.

Resultados y discusión. Aislamos 92 clones positivos vNAR de las rondas 3 y 4 (R3 y R4). Tratamos de diferenciar los clones de la R4 mediante digestión con la enzima de restricción BstO I, pero los patrones de bandas eran iguales. Se analizaron las secuencias de 20 clones de R4, y encontramos 6 clones diferentes. También analizamos las secuencias de 26 clones de R3, pero solo 8 clones presentan el inserto vNAR completo. Existe poca variabilidad en las secuencias de R4 comparada con R3, especialmente en las clonas D100.

El clon 011-R4 y el clon 042-2-R3 reconocen al antígeno más que al BSA en las pruebas de ELISA y degradan el corismato, pero al parecer su capacidad catalítica no es suficiente para complementar a las células Fa114tyrA.



Cinética enzimática de extractos celulares de las clonas 011-R4 y 042-2-R3, comparada con C+ y PBS1x.

Conclusiones. Logramos seleccionar dos clones específicos contra el TSA/CM de una biblioteca no inmune del tiburón *H. francisci* y catalizan la reacción correspondiente corismato mutasa.

Agradecimiento. A Conacyt, CICESE y el Depto. De Ingeniería Celular y Biocatálisis de la UNAM por las facilidades prestadas para el presente estudio.

Bibliografía.

1. Roux, K., Greenberg, A., Greene, L., Strelets, L. Avila, D., McKinney, E., Flajnik, M. (1998) Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): Molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 11804-11809.
2. Holliger, P., Hudson, P. (2005) Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nat. Biotechnol.* 23: 1126-1136.
3. Bowdish, K., Tang, Y., Hicks, J., Hilvert, D. (1991) Yeast expression of a catalytic antibody with chorismate mutase activity. *Journ. Biol. Chem.* 266: 11901-11908.
4. Steinberger, P., Cristoph, R., BarbasIII, C. (2001). Analysis of selected antibodies. En: *Phage Display: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Estados Unidos. 11.1-11.24.