



OBTENCIÓN DE LIGANDOS POTENCIALMENTE INHIBIDORES DE LA FIBRILOGÉNESIS DE CADENAS LIGERAS LAMBDA VI

Brenda L. Alvarado Espinoza, Baltazar Becerril Luján*
baltazar@ibt.unam.mx

Palabras clave: amiloidosis, scFv, fagos.

Introducción. Algunos péptidos o proteínas, bajo ciertas condiciones, pueden convertirse de su forma soluble a agregados fibrilares, y dichas transiciones pueden dar lugar a condiciones patológicas que van desde desórdenes neurodegenerativos a amiloidosis sistémicas. Las amiloidosis son un grupo de enfermedades caracterizadas por el depósito en órganos y/o tejidos, de fibrillas proteicas, las cuales tienen propiedades ópticas y tintoriales específicas. Actualmente se conocen más de 20 péptidos o proteínas, cuya característica común es la estructura en hoja β cruzada y son causa de enfermedades tales como Alzheimer, Parkinson y Huntington, entre otras. Las bases moleculares de las amiloidosis no se encuentran totalmente esclarecidas, lo cual ha dificultado el hallazgo de un tratamiento eficaz para las mismas. Por ello, se ha recurrido a la generación de un modelo peptídico, que ha permitido el estudio de la amiloidosis AL, una enfermedad generada por cadenas ligeras de inmunoglobulinas. Este modelo a su vez, esta coadyuvando para encontrar potenciales agentes inhibidores de la agregación.¹

Dentro de este marco, nuestro grupo se ha involucrado en la obtención de ligandos, basados en la estructura de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv's) humanos, potencialmente inhibidores de la fibrilogénesis *in vitro* del dominio variable recombinante $\lambda 6$.

Metodología. Mediante la técnica de despliegue en fagos², se tamizó una biblioteca no immune de scFvs humanos³. Las clonas seleccionadas se utilizaron para analizar su capacidad de reconocimiento específico hacia la cadena ligera 6aJL2. Se llevó a cabo la expresión del fragmento de anticuerpo elegido, y se caracterizó en términos de estabilidad y afinidad (mediante ELISA), además de su capacidad de inhibición de la extensión de fibrillas de 6aJL2 y su mutante R25G (mediante fluorescencia).⁴

Resultados y discusión. Después de 3 rondas de tamizado, se logró el aislamiento de fragmentos variables de cadena sencilla entre las cuales se seleccionó el scFv 7D que tiene capacidad de reconocer tanto a la forma soluble como a la fibrilla formada por 6aJL2. El scFv tiene una cadena pesada que pertenece a la familia V_{H3} y una ligera que corresponde a las lambda 2; su peso se aproxima a los 25 KDa. Se comprobó que el anticuerpo tiene una capacidad inhibitoria de la extensión de fibrillas formadas por 6aJL2 y R25G en alrededor de un 50% y 60% respectivamente, cuando es utilizado en una proporción 1:1 de monomero $\lambda 6$:scFv.

Mediante un ensayo de competencia, por ELISA, el scFv 7D reconoció un epítipo distinto al que reconoce un anticuerpo monoclonal murino dirigido específicamente contra el monomero de 6aJL2 (control positivo), ya que no se observó ningún desplazamiento de la cadena sencilla por este último. El scFv pierde el 75% del reconocimiento a su antígeno en presencia de 2 M de Cloruro de Guanidinio, sin embargo, lo mantiene a temperaturas de hasta 50°C; su baja estabilidad es explicada debido a que procede de una biblioteca no immune, donde no ha habido un proceso de maduración dirigido por el antígeno.

Conclusiones. El scFv 7D representa un agente potencialmente terapéutico de una gran variedad de amiloidosis, ya que por las propiedades estructurales que poseen en común las proteínas amiloidogénicas, un agente inhibitorio de alguna de ellas, podría ser útil en el tratamiento de otras. Además, es un anticuerpo susceptible a ser modificado por maduración *in vitro*. Entre otras, se podrían mejorar propiedades tales como la estabilidad, afinidad y la capacidad inhibitoria de la agregación de proteínas amiloidogénicas.

Agradecimiento. Este proyecto fue posible gracias al apoyo económico brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (registro de CONACYT no. 190596).

Bibliografía.

1. Fabrizio, C., Dobson, C. M. (2006). Protein misfolding, functional amyloid, and human disease. *Annu. Rev. Biochem.* 75:333-366.
2. Marks, J.D., Hoogenboom, H.R., Bonnert, T.P., McCafferty, J., Griffiths, A.D., Winter, G. (1991). By-Passing immunization, human antibodies form V-gene libraries displayed of phage. *J. Mol. Biol.* 222:581-597.
3. Riaño, L., Juárez, V.R., Olamendi, T., Ortiz, M., Possani, L.D., Becerril, B. (2005). A strategy for the generation of specific human antibodies by directed evolution and phage display. *FEBS Journal.* 272: 2591-2601
4. O'Nuallain, B., Hrnčić, R., Wall, J.S., Weiss, D., Solomon, A. (2006). Diagnostic and therapeutic potential of amyloid-reactive IgG antibodies contained in human sera. *J. Immunol.* 176: 7071-7078.