



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
MAESTRÍA EN CIENCIAS EN BIOMEDICINA MOLECULAR

“Obtención de un anticuerpo monoclonal anti α -enolasa humana y caracterización de su interacción con el antígeno”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

Maestra en Ciencias en Biomedicina Molecular

PRESENTA:

Q.F.B. Elibeth Mirasol Meléndez

DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza

México, D.F., 24 DE JUNIO 2011



DIRECTORA DE TESIS:

Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza.

INTEGRANTES DEL COMITÉ TUTORAL:

Dra. Nury Pérez Hernández.

Dr. Absalom Zamorano Carrillo.

Dr. César Augusto Sandino Reyes López.

M. C. Juan Carlos Carpio Pedroza.

*Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Investigación Bioquímica de la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía–IPN bajo la dirección de la **Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza**, Profesora Investigadora Titular del programa de Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular de esta Institución.*

Y

*En el Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales del Instituto de Diagnóstico y Referencia Epidemiológicos bajo la dirección de la **Biol. Yolanda Medina Flores**, la **Q.F.B. Araceli Zavala Carballo** y el **M.C. Juan Carlos Carpio Pedroza**.*

Este proyecto fue apoyado por el Programa de Becas de Maestría del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)** con número de registro 263610, por el **Programa Institucional de Formación de Investigadores del IPN (PIFI)** y por el **Programa de Extensión de Beca Tesis del Instituto Politécnico Nacional.**

A todas estas Instituciones se les agradece de manera especial por el financiamiento otorgado.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por permitirme llegar a esta etapa de mi vida profesional y por ser la luz que me guía en todo momento y que nunca me abandona. Gracias Padre Celestial.

A la Dra. Claudia Benítez por su paciencia, su tiempo, sus conocimientos, su apoyo incondicional y por ser una persona muy humana. Gracias por todo.

A todos los integrantes del Comité Tutoral por las críticas y aportaciones realizadas a este proyecto que lo fortalecieron día con día.

A Yolanda Medina por permitirme ser parte de su Laboratorio y compartirme sus conocimientos y cariño.

A Araceli Zavala por su asesoría, comprensión y amistad que me brindó durante toda mi estancia en el InDRE. Gracias por escucharme siempre.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica porque todos me han brindado su ayuda y sobre todo por hacer más amena nuestra convivencia dentro del Laboratorio.

A Brenda y César por todos sus consejos y comprensión en los momentos difíciles tanto personales como experimentales, y a Oscar por formar parte fundamental de este proyecto.

A todos mis compañeros y trabajadores del InDRE porque de alguna manera contribuyeron al desarrollo de este proyecto y con atención especial a Veranger y Raquel por hacer más agradable mi estancia.

A mis compañeros de generación por todos los momentos compartidos.

A todos los Doctores del P.I.B.I.O.M que me han forjado como Maestra en Ciencias.

A mis amigos Ángeles, y Jesué porque sin ustedes no estaría aquí en este momento.

A todas las personas que no mencioné pero que han sido esenciales en mi vida.

DEDICATORIAS

Este trabajo y satisfacción se los dedico a las personas más importantes en mi vida: Mi Familia.

A mi mamá por darme la vida, protegerme siempre, por su fortaleza, por ser mi ejemplo a seguir como mujer y por su amor infinito que solo ella me puede brindar.

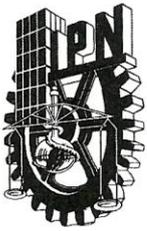
A mi papá por su paciencia, su carácter, su apoyo incondicional y por todo su cariño.

A mis hermanos Adriana y Christian por ser mis compañeros de juegos, por su confianza, por las alegrías compartidas y por ser mis amigos.

La vida es solo una, pero si volviera a nacer los elegiría sin dudarlo como mi familia nuevamente. Gracias por todo. Los amo.

Con todo mi amor y cariño para mi mamá:

La Sra. Macaria Meléndez Moto.



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 10:00 horas del día 14 del mes de Junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.N.M. y H. para examinar la tesis titulada:

"Obtención de un anticuerpo monoclonal anti α -enolasa humana y caracterización de su interacción con el antígeno"

Presentada por el alumno:

Mirasol Meléndez Elibeth
Apellido paterno Apellido materno Nombre(s)

Con registro:

A	0	9	0	0	0	8
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Director(a) de tesis

Dra. Claudia Guadalupe Benítez Cardoza

Dra. Nurys Pérez Hernández

Dr. Absalom Zamorano Carrillo

Dr. César Augusto Sandino Reyes López

M. C. Juan Carlos Carpio Pedroza

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. César Augusto Sandino Reyes López

SECRETARÍA DE
EDUCACION PUBLICA
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA
Y HOMEOPATIA
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México el día **14** del mes de **Junio** del año **2011**, la que suscribe **Elibeth Mirasol Meléndez** alumna del Programa de la **Maestría en Ciencias en Biomedicina Molecular** con número de registro **A090008**, adscrito a la **Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía-IPN**, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la **Dra. Claudia G. Benítez Cardoza** y cede los derechos del trabajo intitulado **Obtención de un anticuerpo monoclonal anti α -enolasa humana y caracterización de su interacción con el antígeno**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección emirasolm0800@ipn.mx o beni1972uk@yahoo.com.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Elibeth Mirasol Meléndez

CONTENIDO

	PÁGINA
LISTA DE ABREVIATURAS	15
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABLAS	19
RESUMEN	20
ABSTRACT	22
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	23
1.1 Anticuerpos Monoclonales	23
1.1.1 Aplicaciones de los Anticuerpos Monoclonales.	24
1.2 Enolasa	25
1.2.1 Estructura de la Enolasa.	27
1.2.2 Isoformas de la Enolasa en Humanos y porcentaje de identidad entre las distintas isoformas de la proteína.	29
1.3 α-Enolasa Humana	31
1.4 Antecedentes	34

1.5 Justificación	36
1.6 Objetivos	37
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS	38
2.1 Estrategia experimental	38
2.2 Metodologías	39
2.2.1 Sobreexpresión y purificación de α -Enolasa Humana.	39
2.2.2 Cuantificación de la proteína α -Enolasa Humana purificada.	40
2.2.3 Selección y diseño de péptidos específicos para la α -Enolasa Humana.	40
2.2.4 Alineamiento de las estructuras tridimensionales de distintas enolasas evaluadas mediante el software MOE (Molecular Operating Environment) 2008.10.	41
2.2.5 Inmunización de ratones Balb/c con antígeno α -Enolasa Humana recombinante (α -hENO1).	42
2.2.6 Determinación del título de anticuerpos específicos contra α -Enolasa Humana por la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) indirecto.	43
2.2.7 Descongelación de células X63Ag8.653	44
2.2.8 Cuantificación de las células con hemocitómetro.	44

2.2.9 Obtención de hibridomas por fusión de células del bazo y células de mieloma.	44
2.2.10 Fusión celular.	46
2.2.11 Clonación celular.	47
2.2.12 Congelamiento celular.	48
2.2.13 Purificación de Anticuerpos Monoclonales.	48
CAPÍTULO III. RESULTADOS	50
3.1 Obtención de la α-Enolasa Humana	50
3.1.1 Sobreexpresión de la α -Enolasa Humana en un Sistema Heterólogo.	50
3.1.2 Purificación de la α -Enolasa Humana.	52
3.1.3 Cuantificación de la α -Enolasa Humana	53
3.1.4 Diseño de péptidos mediante análisis <i>in silico</i> de la α -Enolasa Humana	53
3.2 Generación de anticuerpo monoclonal	59
3.2.1 Estandarización del esquema de inmunización y la técnica de ELISA para determinar el anticuerpo anti α -Enolasa Humana.	59
3.2.2 Técnica de fusión celular y obtención de hibridomas productores de los anticuerpos anti α -Enolasa Humana.	60

3.2.3	Clonación y subclonación para obtener anticuerpos monoclonales	62
3.2.4	Purificación de anticuerpos α -Enolasa Humana.	64
	CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN	65
	CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	72
	CAPÍTULO VI. PERSPECTIVAS	73
	BIBLIOGRAFÍA	74
	ANEXOS	82

LISTA DE ABREVIATURAS

AcM	Anticuerpo Monoclonal.
Ag	Antígeno.
APS	Persulfato de amonio.
DAP	1-5-diaminopentano
2-D PAGE	Electroforesis Bidimensional.
DMSO	Dimetil-sulfóxido.
D.O_{600nm}	Densidad óptica a 600 nm.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
ELISA	Ensayo inmunoenzimático.
EPO	Eritropoyetina.
HAT	Hipoxantina-Aminopterina-Timina.
hENO1	Alfa enolasa humana.
hENO2	Gamma enolasa humana.
hENO3	Beta enolasa humana.
HGPRT	Hipoxantina-Guanina-Fosforibosil Transferasa.
HT	Hipoxantina-Timina.
IgG	Inmunoglobulina G.
IP	Intraperitoneal.
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranósido.
LOX	Lisil oxidasa
LOXL2	Lisil oxidasa tipo 2
λ	Longitud de onda.
OPD	Orto-fenilendiamina.
PBS	Amortiguador de fosfatos.
PEG	Polietilenglicol.

PEP	Fosfoenolpiruvato
PAG	Fosfoglicerato
PMSF	Fenil-metil-sulfonil fluoruro o Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Duodecil Sulfato Sódico o Lauril Sulfato de Sodio.
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida.
SFB	Suero Fetal Bovino.
TK	Timidina Cinasa.

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1.1 Representación esquemática para la reacción catalizada por la enolasa en la vía de la glucólisis.	13
Figura 1.2 Representación en listón de la molécula homodimérica de la enolasa.	15
Figura 1.3 Representación esquemática de la estructura secundaria del monómero de α -enolasa humana (hENO1).	16
Figura 1.4 Alineamiento de la α -enolasa humana (ENOA-HUMAN) contra sus isoformas presentes en el humano β y γ -enolasas.	17
Figura 2.1 Mapa del vector pET28a+	25
Figura 3.1 Restricción enzimática del vector peT28a y liberación del inserto HsENO1.	34
Figura 3.2 Perfil electroforético de la enolasa.	35
Figura 3.3 Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones obtenidas del proceso de purificación.	36
Figura 3.4 Identificación de las cinco regiones más diferentes entre las isoformas α , β y γ -enolasa de humano	36
Figura 3.5 Estructuras tridimensionales evaluadas en el programa RasMol	40

Figura 3.6	Identificación de las tres regiones inmunogénicas de la α -enolasa humana	41
Figura 3.7	Resultados de las inmunizaciones practicadas a los cinco ratones Balb/C.	43
Figura 3.8	Evaluación de hibridomas mediante la técnica de ELISA indirecta.	44
Figura 3.9	Evaluación de clonas celulares mediante la técnica de ELISA indirecta.	45
Figura 3.10	Evaluación de clonas celulares mediante la técnica de ELISA indirecta.	46
Figura 3.11	Evaluación de clonas celulares mediante la técnica de ELISA indirecta.	47
Figura 3.12	Purificación del AcM 3C8B8D11 analizado en un gel de SDS-PAGE al 12 %.	48
Figura 4.1	Alineamiento de las secuencias de los distintos antígenos utilizados.	51
Figura 4.2	Alineamiento tridimensional de las estructuras de los distintos antígenos utilizados.	60

LISTA DE TABLAS.

		PÁGINA
Tabla 1	Calendario de cambios de medio de cultivo utilizado en la selección bioquímica de los híbridos después de la fusión celular.	31
Tabla 2	Secuencias de los péptidos seleccionados después de realizar el análisis <i>in silico</i> de la proteína α -enolasa humana.	41

RESUMEN.

La Enolasa es una enzima de la vía glucolítica que cataliza la reacción reversible de deshidratación del 2-D-fosfoglicerato a Fosfoenolpiruvato y además es una proteína que se encuentra altamente conservada. En el humano existen tres isoformas de esta enzima: α , β y γ . De estas tres isoformas la α -enolasa humana se ha identificado como una proteína multifuncional ya que se ha reportado en distintos compartimentos celulares desempeñando diferentes funciones en varios organismos. Diversos autores han reportado la generación de anticuerpos monoclonales en contra de otras proteínas altamente conservadas y han encontrado resultados relevantes al evaluar la interacción de estos anticuerpos con sus antígenos.

En este trabajo se generó un Anticuerpo Monoclonal (AcM) utilizando como antígeno a la α -enolasa humana recombinante con la cual se inmunizaron a cinco ratones hembra de la cepa Balb/C durante siete semanas y se evaluó la respuesta inmunológica de cada ratón mediante ensayos de ELISA indirecto. Posteriormente se realizó una esplenectomía al ratón que presentó una mejor respuesta inmunológica hacia el antígeno α -enolasa humana recombinante y se obtuvo el hibridoma mediante la fusión de las células del bazo del ratón con células de mieloma X63Ag8.653. Este hibridoma fue clonado y subclonado y para seleccionar tanto el hibridoma como sus clones más afines al antígeno, los sobrenadantes celulares fueron evaluados mediante ensayos de ELISA indirecto utilizando como antígenos a la α -enolasa humana y a un péptido que se diseñó y mandó sintetizar para la selección de clones. Este péptido se diseñó realizando un análisis *in silico* de la secuencia y estructura tridimensional de la

α -enolasa humana y corresponde a una región de la secuencia de la α -enolasa humana que es poco conservada con respecto a las otras isoformas de enolasa humana, es inmunogénica y está expuesta al solvente en la estructura tridimensional. Finalmente la especificidad del AcM fue evaluada mediante ensayos de ELISA indirecto utilizando también otras enolasas como la de *Saccharomyces cerevisiae* y *Trichomona vaginalis*.

ABSTRACT.

Enolase is a glycolytic enzyme that catalyzes the dehydration of 2-phospho-D-glycerate to phosphoenolpyruvate. In humans there are three isoforms: α , β and γ . One of them, α -enolase has been found to play different roles in a variety of cellular compartments and tissues.

Monoclonal Antibodies against several proteins have been generated showing interesting results about the interaction between antigen-antibody that might have important implications in biomedicine. In this work we produced a monoclonal antibody using recombinant human α -enolase as antigen. Five female Balb/C mice were immunized with this antigen for seven weeks and the immunologic response was evaluated by indirect ELISA assay. Subsequently, the mouse that showed a better immune response to antigen recombinant human α -enolase was submitted to splenectomy. Hybridomas were obtained by fusing the mouse spleen cells with myeloma cells X63Ag8.653. In order to select either the hybridoma or its clones, cell supernatants were screened by indirect ELISA using as antigens human α -enolase and a peptide that was designed and synthesized to control the selection of clones. This peptide was designed by *in silico* analysis of the sequence and the three-dimensional structure of human α -enolase and corresponds to a region of the sequence of human α -enolase that is poorly conserved among human enolases, is immunogenic and is exposed to the solvent in the three-dimensional structure. Finally monoclonal antibody specificity was assessed by indirect ELISA using also other enolases like *Saccharomyces cerevisiae* and *Trichomonas vaginalis*.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.

1.1 Anticuerpos Monoclonales.

Un anticuerpo monoclonal (AcM) es una inmunoglobulina estable, reproducible y uniforme, con especificidad, afinidad y clase conocidas; producida por una única clona de células B. La producción de un AcM involucra la creación de moléculas específicas, repetibles e inagotables provenientes de células que secretan grandes cantidades del AcM. Estas células se obtienen mediante la fusión de dos tipos celulares que tienen características muy especiales, empleando un desestabilizante de membranas como el polietilenglicol (PEG). Una de estas células son los linfocitos B de ratón, que mediante inmunización previa son productores de anticuerpos específicos, los cuales se fusionan con células de mieloma, que además de dividirse indefinidamente que es característico de las células cancerosas y tienen la maquinaria celular de síntesis y excreción de anticuerpos notablemente desarrollada, presentan dos mutaciones genéticas que las hacen carentes de las enzimas hipoxantina-guanina-fosforibosil transferasa (HGPRT) y timidina cinasa (TK). Estas características inhabilitan a las células de mieloma para efectuar la ruta alterna en la síntesis de ADN, de tal forma, que al agregarle a la fusión celular un bloqueador de la síntesis normal de producción de ADN, como es la aminopterina, solamente pueden sobrevivir aquellos híbridos (linfocito B-mieloma) que contengan las enzimas HGPRT y TK aportadas por las células B, las cuales producirán su ADN *de novo* a partir de bases púricas y pirimídicas presentes en el medio de cultivo. (Rattner et al. 1991)

Posteriormente a la fusión y a la selección bioquímica, los sobrenadantes de todos los cultivos de células, se prueban con la finalidad de identificar aquellos híbridos que producen el anticuerpo deseado, los pozos positivos, se clonan, es decir se propagan a partir de una sola célula, que producirá un anticuerpo monoclonal específico capaz de proliferar en cultivo o propagarse en animales genéticamente compatibles (Marshall & Serpell 2009)

Dado que cada AcM reconoce un determinante antigénico único, es posible seleccionar aquél que identifica exclusivamente la molécula de interés, evitando las reacciones cruzadas que son características de muchos antisueros policlonales. De esta forma las reacciones cruzadas inesperadas se deberán exclusivamente a la presencia de epítopes idénticos o muy similares (Ong et al. 2011).

1.1.1 Aplicaciones de los Anticuerpos Monoclonales.

Los AcM presentan una serie de ventajas sobre los anticuerpos policlonales entre las cuales se puede mencionar la afinidad por el antígeno y con esto mayor especificidad de reconocimiento. (Graven et al. 1993)

Debido a estas características, los AcM están siendo muy útiles como reactivos diagnósticos, imagenológicos y terapéuticos en medicina clínica. Al principio se utilizaron sobre todo como reactivos diagnósticos *in vitro*. Entre los múltiples reactivos diagnósticos de AcM se encuentran disponibles las pruebas inmunológicas de embarazo, valoración de la compatibilidad de antígenos de histocompatibilidad, reconocimiento de antígenos liberados por algunos tumores, monitorización de drogas, detección de enfermedades infecciosas en microbiología, detección de alérgenos en

alergias hematológica. En las técnicas diagnósticas se emplean diversas herramientas de biología molecular como ELISA, citometría, inmunohistoquímica e inmunofluorescencia. Por otro lado las aplicaciones terapéuticas constituyen el campo más importante de los AcM, ya que son capaces de erradicar ciertas infecciones y destruir células, incluidas las tumorales, mediante distintos mecanismos. Por esta razón, son excelentes sustancias para el tratamiento de enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes, el cáncer o en trasplantes para evitar el rechazo de órganos ((Hori et al. 2011).

En fechas recientes la disponibilidad de AcM y la posibilidad de humanizarlos utilizando técnicas de ingeniería genética ha dado nuevo ímpetu a este campo (Hori et al. 2011, Ong et al. 2011).

Por otro lado, hasta hace poco la mayoría de los medicamentos de biotecnología iniciales eran fármacos protéicos como la insulina recombinante y la hormona de crecimiento humano entre otros. Finalmente se ha considerado la opción de utilizar a los AcM como posibles fármacos ya que es una molécula producida *in vitro* similar a la que se produce naturalmente en el organismo y que tiene la capacidad de reconocer y neutralizar a los agentes extraños al organismo. Hasta el momento los AcM en proceso de desarrollo son los que están considerados como candidatos para tratar el asma, el lupus y algunos tipos de Cáncer (Ricart 2011)

1.2 Enolasa

La enolasa es una metaloenzima que fue descubierta en 1934 por Lohman y Meyerhof mientras estudiaban la conversión del 3-fosfoglicerato (PGA) a piruvato en extractos musculares. Esta enzima es una de las proteínas citosólicas más

abundantemente expresadas en todos los organismos que realizan glucólisis (Pancholi 2001).

La enolasa es una enzima clave en la vía glucolítica o ruta de Emden Meyerhoff-Parnas [Lohman]. Esta enzima cataliza la reacción reversible de deshidratación del 2-D-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato (PEP) (vía catabólica) y en la gluconeogénesis (vía anabólica) de fosfoenolpiruvato a fosfoglicerato (Wold 1975). La enolasa tiene un absoluto requerimiento por ciertos iones metálicos divalentes con los cuales forma un complejo antes de la fijación del sustrato. El cofactor natural de la enolasa es el catión divalente Mg^{2+} con el cual la enolasa desempeña su reacción catalítica con mayor eficiencia (Pancholi 2001). (**Figura 1.1**). Existen otros cationes que pueden unirse a la enolasa además del Mg^{2+} y el orden de afinidad por actividad de la enolasa es $Mg^{2+} > Zn^{2+} > Mn^{2+} > Fe(II)^{2+} > Cd^{2+} > Co^{2+}, Ni^{2+}, Sm^{3+}, Tb^{3+}$ (Brewer 1981, Malmstrom 1955).

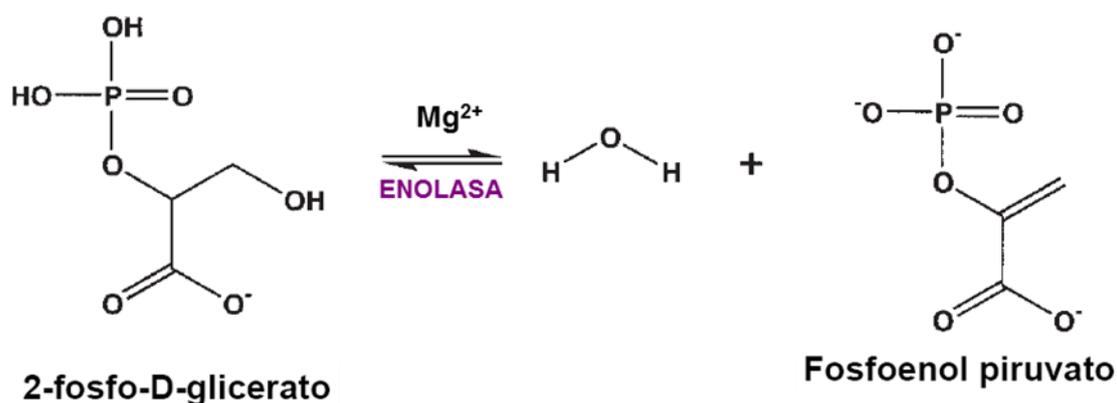


Figura 1.1 Representación esquemática para la reacción catalizada por la enolasa en la vía de la glucólisis.

1.2.1 Estructura de la Enolasa.

Actualmente se conoce la estructura tridimensional de la enolasa de 8 especies (Pancholi 2001). En la mayoría de las especies, la enolasa se ha descrito como un homodímero, con la excepción de las enolasas de algunas bacterias termófilas y de *Streptococcus pneumoniae* (Veronese et al. 1984, Schurig et al. 1995, Brown et al. 1998, Kolberg et al. 2006) en las que se ha encontrado como un octámero. En cualquier caso las subunidades ya sea de los dímeros o de los octámeros son idénticas y tienen un peso molecular dentro del intervalo de 82,000 y 100,000 Da (**Figura 1.3**). Cada subunidad de esta enzima se conforma por dos dominios, el N-terminal que consiste en cuatro hélices- α , y una hoja- β formada por tres hebras y el dominio C-terminal que tiene una estructura de barril TIM modificado, cuya topología se describe como: $\alpha\alpha\beta\beta(\alpha/\beta)_6$. El sitio activo se localiza en el extremo C-terminal del barril, ambos dominios poseen asas que se pliegan sobre el sitio activo después de la unión del sustrato. Como se mencionó anteriormente para la catálisis es necesaria la unión de la enolasa a Magnesio y hasta el momento se ha descrito la existencia de cuatro sitios (en *Trypanosoma brucei*) de unión a esta catión divalente: el sitio I, denominado sitio conformacional, el cual induce cambios conformacionales del sitio de unión al sustrato; el sitio II, también conocido como catalítico y el sitio III, conocido como inhibidor (**Figura 1.2**) (Schreier & Höcker 2010).

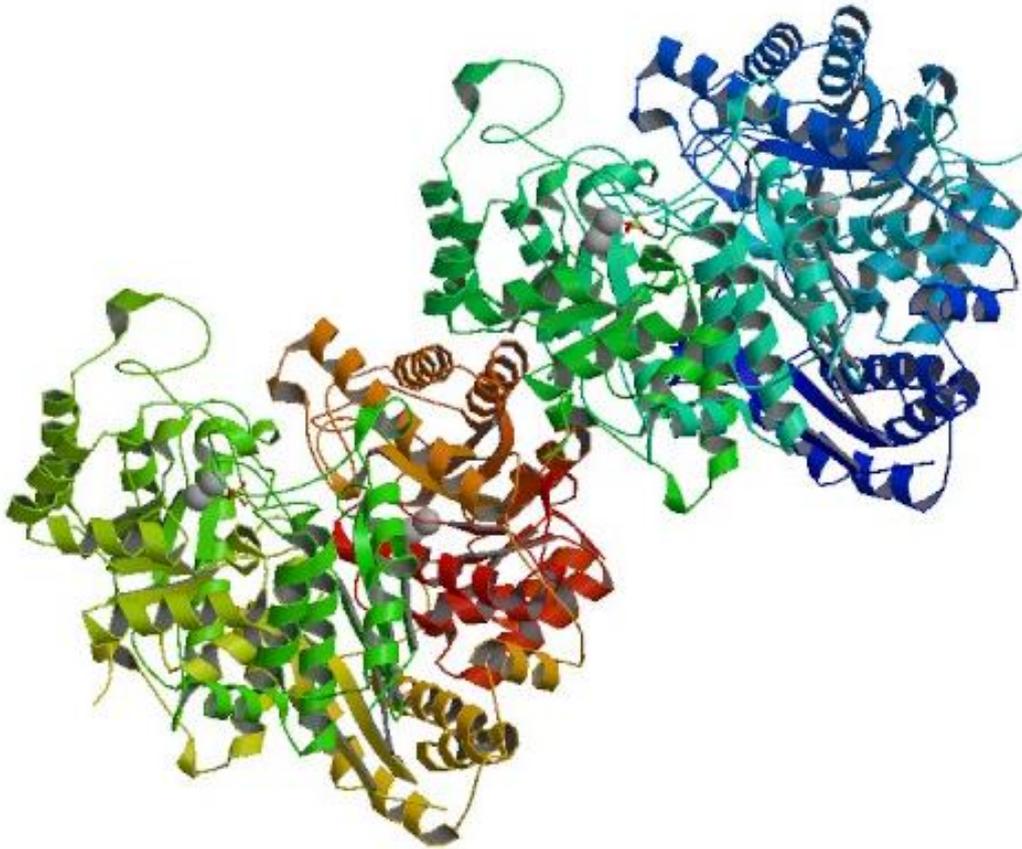


Figura 1.2. Representación de listones de la molécula homodimérica de la α -Enolasa Humana. (Archivo PDB: 3B97).

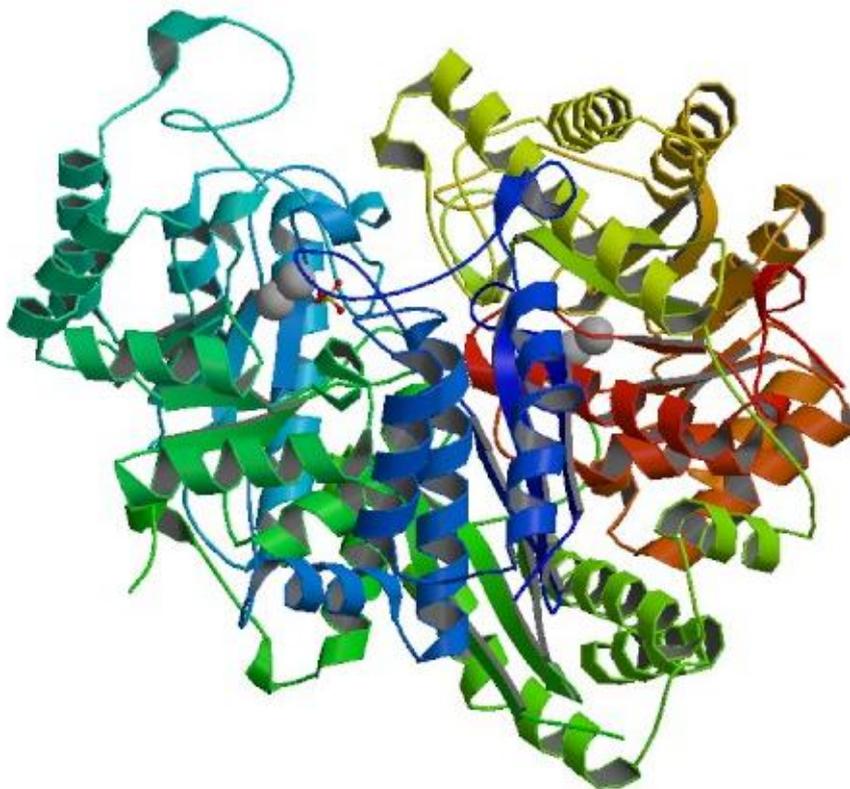


Figura 1.3: Representación esquemática de la estructura secundaria del monómero de α -enolasa humana (Archivo PDB: 3B97).

1.2.2 Isoformas de la enolasa en mamíferos.

En vertebrados la enolasa es activa en su conformación homodimérica (**Figura 1.2**) y existen diferentes isoformas las cuales son codificadas por genes distintos. Todos los mamíferos tienen tres isoformas de esta enzima denotadas como α , β y γ -enolasa (Brown et al. 1998).

El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la α -enolasa humana contra las otras isoformas presentes en el humano, β y γ -enolasa reveló un porcentaje de

identidad del 83% entre ellas. En la **Figura 1.4** se muestra el alineamiento de las tres isoformas.

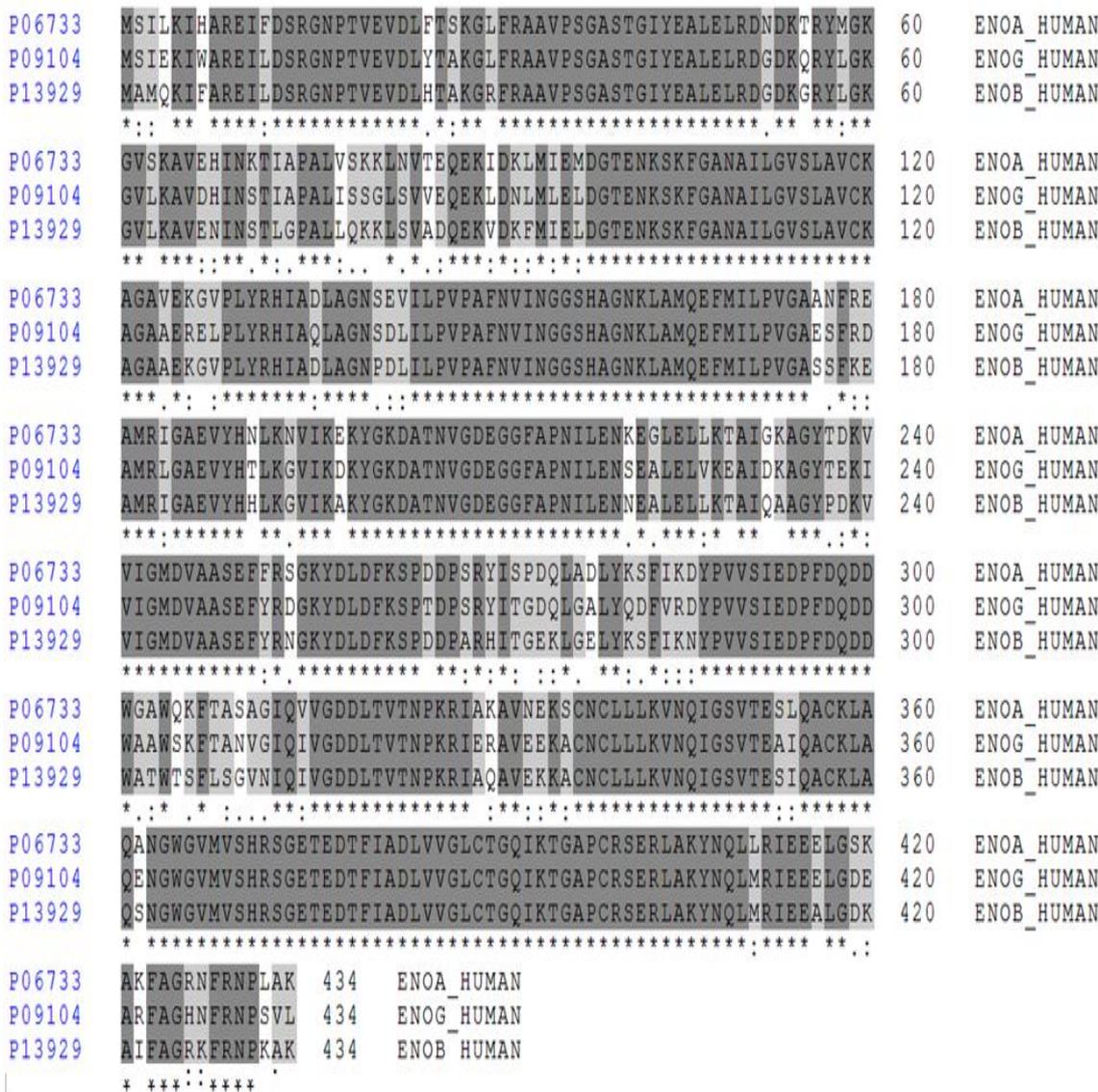


Figura 1.4. Alineamiento de la α -Enolasa Humana contra sus isoformas presentes en el humano β y γ -enolosas. El orden de aparición en la figura es α -enolasa (P06733 ENOA_HUMAN), γ -enolasa (P09104 ENOG_HUMAN) y β -enolasa (P13929 ENOB_HUMAN). Las regiones más sombreadas representa a las regiones conservadas entre las tres isoformas de la enzima y las regiones más claras representa a las regiones variables.

1.3 α -Enolasa humana

La α -enolasa humana tiene una longitud de 434 aminoácidos y un punto isoeléctrico de 7.4; la masa molecular de esta proteína es de aproximadamente 48 kDa.

La expresión de los genes que codifican para las distintas isoformas de la enolasa en los mamíferos está regulada de manera específica en distintos tejidos. La α -enolasa (ENO1) se encuentra en una variedad de tejidos. En humano es posible localizarla en páncreas, hígado, corazón, riñón, entre otros. (Wold 1975). La β -enolasa (ENO2) se encuentra exclusivamente expresada en tejido muscular y la γ -enolasa (ENO3) se expresa en neuronas y tejido neuroendócrino (Schurig et al. 1995).

Recientemente se ha descubierto que la α -Enolasa, a diferencia de sus isoformas β y γ no sólo participa en la glucólisis en el citoplasma, sino que también presenta una variedad de funciones y se encuentra en una variedad de tejidos y compartimentos celulares tales como membrana, citoplasma y en el núcleo; sin embargo, la señalización peptídica responsable de esta localización aún es incierta (Seweryn et al. 2009). Por ejemplo, se ha detectado a la α -enolasa en la superficie celular de células endoteliales, epiteliales y hematopoyéticas. Se ha observado que la expresión de α -enolasa en la superficie celular depende de las condiciones fisiopatológicas en las que se encuentre la célula. Hasta el momento se desconoce el mecanismo de transporte de esta proteína a la superficie celular, pero se sabe que funciona como receptor de plasminógeno, sugiriendo que la α -enolasa puede tener una participación importante en el sistema fibrinolítico peri-celular e intravascular. La actividad de proteasas en cascada que se inicia por la activación de plasminógeno en la superficie celular tiene una implicación

muy importante en varios eventos fisiológicos y patológicos, como la cicatrización, embriogénesis y la invasión de células tumorales (von Heijne & Blomberg 1979, Fischetti et al. 1990, Navarre & Schneewind 1999, Plow et al. 1991, Boyle & Lottenberg 1997, Arza et al. 1997, Giallongo et al. 1986)

También se ha descrito la presencia tanto de enolasa, como de una isoforma de secuencia mas corta (MBP-1) en el núcleo celular, interaccionando con el promotor del gen que codifica al factor de transcripción c-Myc, disminuyendo su expresión y por lo tanto ejerciendo un efecto como supresor de tumores (Ehinger et al. 2004, Lindquist & Craig 1988).

Además, la α -enolasa humana es una proteína con alta capacidad inmunogénica y debido a esto puede actuar como autoantígeno por lo que se le ha relacionado con una amplia variedad de enfermedades autoinmunes como fiebre reumática aguda, vasculitis, lupus eritematoso, nefritis, colitis ulcerante, hepatitis autoinmune, cirrosis biliar, Síndrome Tourette, entre muchas otras (Feo et al. 2000, Lebioda et al. 1989)

Por otro lado, la α -Enolasa Humana es una proteína que se sobre-expresa en stress hipóxico en células endoteliales, probablemente incrementando el metabolismo anaeróbico para protección celular (Aaronson et al. 1995)

Finalmente se ha identificado que la proteína de los lentes oculares conocida como τ -cristalina, presenta la misma secuencia que la α -enolasa, pero sin la actividad glucolítica. Se ha encontrado también, que la τ -cristalina, es decir la α -enolasa, podría

estar involucrada en la formación de cataratas oculares (Seweryn et al. 2008, Terrier et al. 2007)

ANTECEDENTES

Hasta el momento existen pocos trabajos relacionados con la generación de AcM contra enolasas u otras proteínas que se encuentran altamente conservadas con sus isoformas. Uno de ellos es el publicado por Héctor M. Rodríguez en el que estudian la modulación enzimática de la Lisil Oxidasa Tipo 2 (LOXL2) la cual pertenece a la familia de proteínas de las Lisil Oxidasas (LOX). Estas enzimas poseen una región catalítica altamente conservada entre las proteínas de esa familia. La actividad enzimática fue analizada con tres sustratos distintos: 1-5-diaminopentano (DAP), espermina y colágeno fibrilar tipo 1. En este estudio se reportó tanto la espermina y el DAP son capaces de activar a la LOXL2 presentando constantes de Michaelis (K_m) y k_{cat} similares. Por otro lado se ha reportado que el β -aminopropionitrilo es un inhibidor competitivo de la actividad enzimática de las LOX y en este estudio se comprobó que esta sustancia es un fuerte inhibidor competitivo de la actividad enzimática de la LOXL2 en presencia de los sustratos espermina y DAP. En adición a todo esto, generaron un Anticuerpo Monoclonal utilizando como antígeno a la LOXL2, para esto los autores identificaron y sobreexpresaron las regiones peptídicas más diferenciadas entre la LOXL2 con respecto a las otras proteínas de la familia de las LOX, esto fue realizado con el objetivo de realizar la selección clonal de manera más específica. Posteriormente mediante técnicas de ELISA indirecto y Western Blot se identificó a un AcM que reconocía específicamente a la LOXL2 sin presentar una reacción cruzada en contra de las otras LOX. Finalmente se evaluó la actividad catalítica de la LOXL2 en presencia del AcM generado y se observó que este AcM funciona como un inhibidor

alostérico de la actividad catalítica de la LOXL2 en presencia de los dos sustratos utilizados espermina y DAP.

Otro trabajo publicado por Ipsita Pal-Bhowmick y colaboradores en 2006 en el cual generan un AcM contra la enzima enolasa de *Plasmodium falciparum* utilizando como Ag a la enzima enolasa recombinante de este parásito y a un péptido acoplado a seroalbúmina. Este péptido corresponde a una región de la proteína que se encuentra diferenciada entre distintos organismos y fue identificada mediante un alineamiento utilizando el programa CLUSTAL W. En este trabajo logran identificar mediante técnicas de ELISA indirecto y Western Blot a un AcM que reconoce a la enzima enolasa de *Plasmodium falciparum* y además reconoce a la región peptídica acoplada a seroalbúmina sin presentar reacción cruzada con enolasas de otros organismos como enolasa de conejo y enolasa de levadura.

JUSTIFICACIÓN

La α -enolasa humana es una proteína multifuncional cuyos cambios en sus niveles de expresión han sido asociados con diversas enfermedades. Por lo que identificar específicamente la presencia de la α -enolasa en diversos tejidos podría facilitar el diagnóstico de las enfermedades en las que se ha asociado. Sin embargo, los anticuerpos monoclonales podrían reconocer a cualquier isoforma de la enolasa por lo que resulta necesario generar anticuerpos monoclonales que reconozcan específicamente a α -enolasa.

Además, un anticuerpo monoclonal podría ser utilizado como un inhibidor específico de la actividad catalítica de la α -enolasa, y por ello también se plantea describir la interacción antígeno-anticuerpo.

OBJETIVO GENERAL

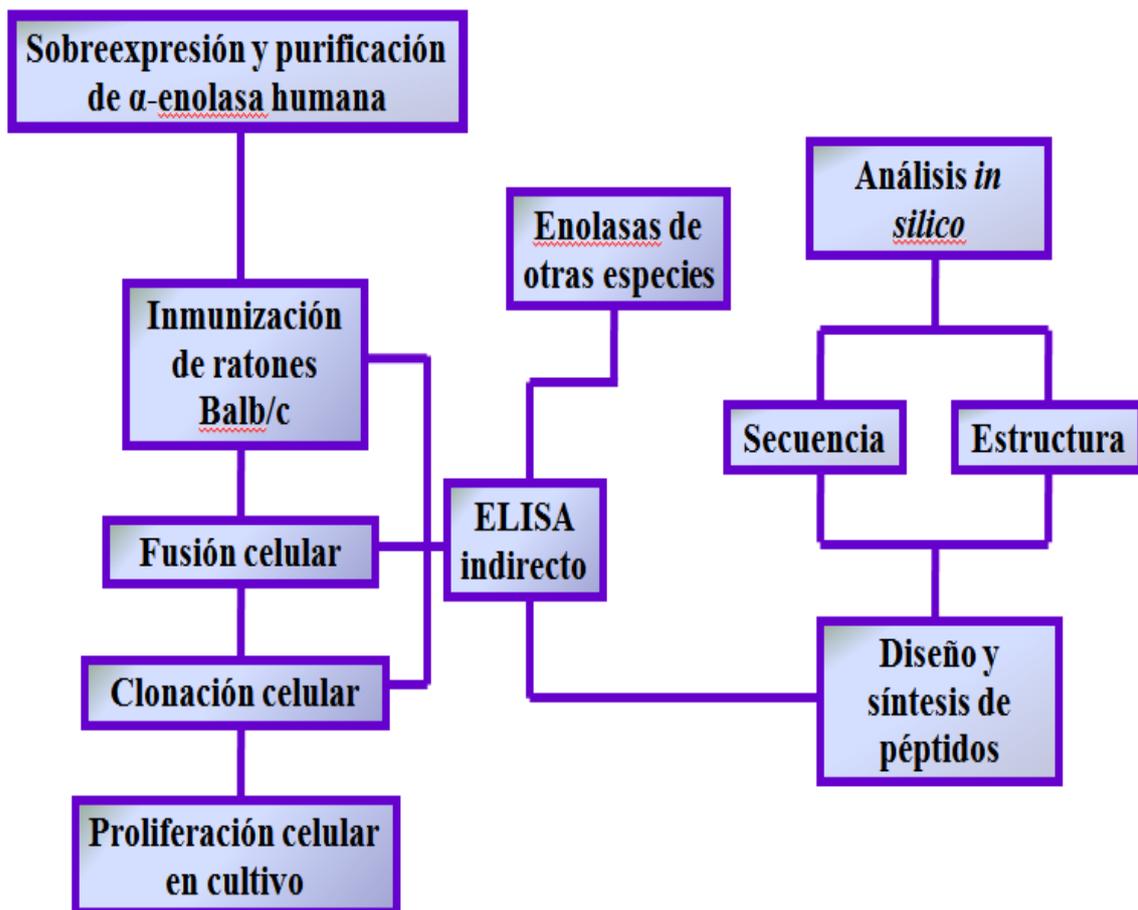
- ❖ *Obtener anticuerpos monoclonales anti α -enolasa humana y caracterizar su interacción con el antígeno.*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. **Sobreexpresar y purificar la proteína α -enolasa humana.**
2. **Identificar las regiones inmunogénicas y específicas para la proteína α -enolasa humana.**
3. **Generar anticuerpos monoclonales contra α -enolasa humana.**
4. **Evaluar el reconocimiento del anticuerpo monoclonal anti α -enolasa humana contra otras proteínas homólogas de la enolasa de otras especies.**

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS.

2.1 Estrategia Experimental.



2.2 Metodologías

2.2.1 Sobreexpresión y purificación de la proteína α -enolasa humana.

El gen que codifica para la α -enolasa humana se encuentra clonado en el vector peT28a el cual se encuentra bajo el control del promotor T7, posee gen de resistencia a Kanamicina y un sitio poli-linker. Las proteínas sobreexpresadas utilizando este vector presentan un tracto de 6 histidinas localizado en el extremo N-terminal del gen de la enolasa el cual permite purificarla mediante cromatografía de afinidad. El tracto puede eliminarse mediante el corte con trombina ya que el polipéptido producido, también contiene un sitio específico para esta proteasa.

Para la obtención de la proteína recombinante de α -enolasa humana, se transformaron células de *E. coli* BL21(DE3)pLys con el vector de expresión peT28a (**Figura 2.1**). El crecimiento celular se llevó a cabo a 37°C en medio LB complementado con Kanamicina y la sobreexpresión de la proteína se indujo cuando la densidad óptica del cultivo a 600 nm fue cercana a 0.6 mediante la adición de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1.0 mM. El crecimiento celular se dejó durante toda la noche. Se centrifugó la muestra 40 minutos y el precipitado celular se resuspendió en una solución amortiguadora. Posteriormente se lisaron las células mediante sonicación, se eliminó la pastilla y el lisado se conservó para su purificación.

La purificación de α -enolasa humana recombinante se realizó mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de Níquel-Agarosa. Posteriormente se eluyó con 250 mM de imidazol y las fracciones obtenidas en las diferentes etapas de la purificación se analizaron mediante geles de poliacrilamida SDS-PAGE.

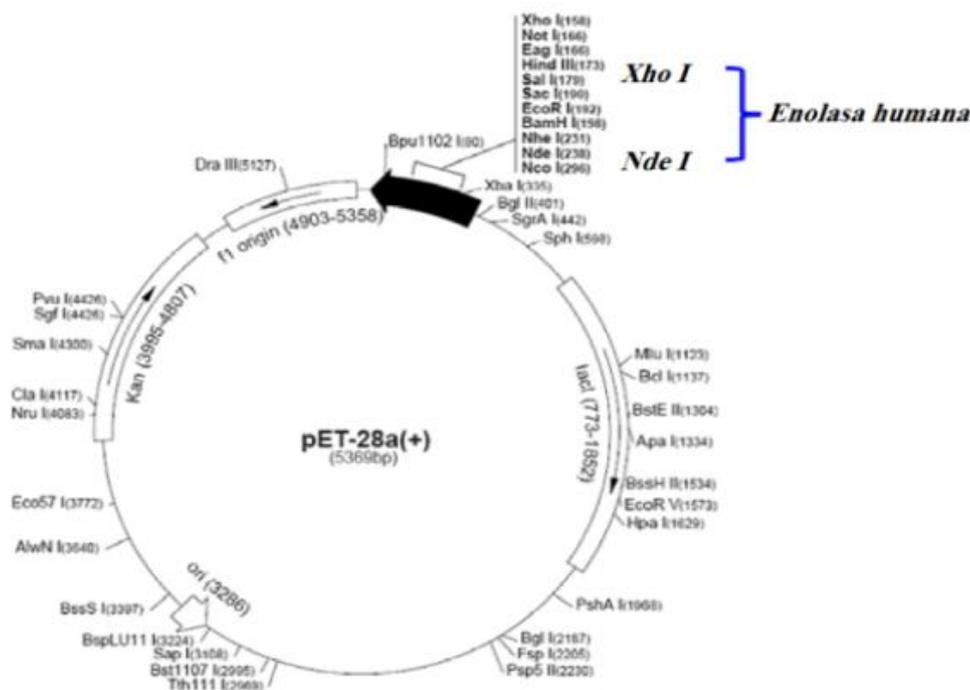


Figura 2.1. Mapa del vector pET28a+, el gen de la α -enolasa humana se encuentra clonado entre los sitios de restricción Xho1 y Nde1.

2.2.2 Cuantificación de la proteína α -enolasa humana purificada.

La proteína purificada se cuantificó utilizando el Kit BCA Protein Assay utilizando seroalbúmina para realizar la curva de calibración y 100 μ l de enolasa purificada. Las absorbancias fueron leídas ya sea a longitud de onda de 590 nm o bien de 592 nm.

2.2.3 Selección y diseño de péptidos específicos para α -enolasa humana.

Se mandaron a sintetizar dos péptidos los cuales corresponden a regiones específicas de la α -enolasa humana y con estos se seleccionaron los Anticuerpos Monoclonales. Para el diseño de los péptidos se tomaron en cuenta los siguientes criterios de selección:

1. *Secuencias diferentes entre las tres isoformas de enolasas humanas.*
2. *Tamaño mínimo de 20 aminoácidos.*
3. *Regiones expuestas en la conformación estructural de la proteína.*
4. *Regiones inmunogénicas.*

Se realizó un análisis de las secuencias de aminoácidos de la α -enolasa humana con respecto a las isoformas β y γ -enolasas (**Figura 3.4**) debido a que estas guardan un porcentaje de identidad del 83%. De este alineamiento, se eligieron las regiones que presentan menos similitud entre las tres isoformas. Posteriormente, se delimitó el tamaño de estas regiones a 20 aminoácidos como mínimo considerando que tuvieran la mayor cantidad posible de aminoácidos diferentes entre las tres enzimas analizadas. Las secuencias elegidas, fueron analizadas *in silico* mediante el software RasMol el cual nos permite visualizar la localización de estas secuencias en la estructura tridimensional de la α -enolasa humana y de esta manera se evaluó la exposición superficial de estas regiones en la estructura de la proteína. Finalmente se utilizó el software EMBOSS para evaluar la inmunogenicidad de las secuencias seleccionadas en el que se alimentó al programa con la secuencia de aminoácidos de la α -enolasa humana en código FASTA, posteriormente el programa como resultado de salida envió las secuencias que encontró con alta inmunogenicidad en toda la secuencia de la proteína, indicando los aminoácidos que conformaban esas secuencias, el tamaño de las secuencias, la localización exacta de las secuencias y el valor numérico asignado por el programa indicó el nivel de inmunogenicidad de estas secuencias.

2.2.4 Alineamiento de las estructuras tridimensionales de distintas enolasas evaluadas mediante el software MOE (Molecular Operating Environment) 2008.10.

Con la finalidad de analizar tridimensionalmente las diferentes estructuras de la α -Enolasa Humana con respecto a las isoformas de enolasas presentes en el humano (β y γ) y las enolasas de otras especies como *Saccharomyces cerevisiae*, se realizó un alineamiento tridimensional de estas estructuras para lo cual se obtuvieron los archivos PDB de las estructuras cristalográficas disponibles en la página web <http://expasy.org/>

Posteriormente el software MOE (Molecular Operating Environment) 2008.10. fue alimentado con los archivos PDB y con el comando “superpose” se logró alinear todas las estructuras tridimensionales. Cada estructura fue resaltada por colores distintos para diferenciarlas. Finalmente para identificar la región estructural correspondiente al Péptido C, en cada una de las estructuras fue resaltada la región correspondiente a los aminoácidos en las posiciones de 265 al 286 en el que se encuentra ubicada la secuencia del Péptido C en la secuencia total de la α -Enolasa Humana.

2.2.5 Inmunización de ratones Balb/c con antígeno α -Enolasa Humana (hENO1) recombinante para la producción de anticuerpos.

Se inmunizaron cinco ratones hembras de la cepa Balb/C de 4 semanas de nacidos con 15 μ g de antígeno (Ag) α -enolasa humana y se marcaron en diferentes partes del cuerpo con ácido pícrico al 1% para diferenciarlos y aplicar el esquema de inmunización de 7 semanas vía intraperitoneal. Entre cada inmunización hubo 8 días de diferencia, dos días después de cada inmunización se sangró a los ratones vía retroorbital para determinar la presencia de anticuerpos dirigidos hacia el antígeno (Ag) por un ensayo inmunoenzimático (ELISA) indirecto. El ratón que presentó títulos de anticuerpos

altos se inmunizó una vez más vía vena caudal y tres días después se sacrificó para realizar la fusión celular.

2.2.6 Determinación del título de anticuerpos específicos contra α -enolasa humana (hENO1) por la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA) indirecto.

Se diluyó el antígeno α -enolasa humana a una concentración de 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en amortiguador de carbonatos a pH 9.6 para sensibilizar los pozos de poliestireno de las placas de ELISA (Nalgene Maxi Sorp). A la placa se agregaron 100 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de la solución de antígeno y se incubó a 4 $^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Esta solución se eliminó vertiendo el contenido de la placa y el exceso de humedad se secó sobre una gasa. La placa se lavó 4 veces con 100 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de PBS Tween 20 al 0.5% a pH 7.2 y una vez más con PBS (Solución salina de fosfatos) el intervalo de tiempo entre cada lavado fue de 5 min. Para bloquear los sitios en donde no se adhirió el antígeno (hENO1) se agregaron 200 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de solución bloqueadora (Leche baja en grasa al 5% diluida en PBS Tween 20 pH 7.2); se incubó por 30 min a 37 $^{\circ}\text{C}$. Los lavados se repitieron como se mencionó anteriormente. Se agregaron 100 μL del suero diluido de cada uno de los ratones. Las diluciones se realizaron en PBS pH 7.2 y fueron de 1:100 hasta 1:1000. La placa se incubó por 24 h a 4 $^{\circ}\text{C}$. Una vez transcurrido este tiempo se procedió a lavar la placa como en los pasos anteriores. Se colocaron 100 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ del conjugado anti-gamma globulina de ratón unido a peroxidasa diluido 1:5000. La placa se incubó a 37 $^{\circ}\text{C}$ durante 2 horas. Se repitieron los lavados anteriormente mencionados. Después se colocaron 100 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de la solución cromógeno/sustrato para peroxidasa (Véase sección de Anexos) y se incubó por 30 min. La reacción se detuvo agregando 100 $\mu\text{L}/\text{pozo}$ de ácido sulfúrico 2 N. Finalmente se leyeron las absorbancias de cada pozo en el lector de ELISA Marca Labsystems Modelo Multiskan Plus a 492 nm.

2.2.7 Descongelación de células x63Ag8.653

Se descongeló la línea celular X63Ag8.653 procedente de mieloma de ratón Balb/C en baño María a 37°C, la suspensión celular se transfirió a un tubo cónico y se agregaron 8 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute) y precalentado a 37°C. Se centrifugó a 2500 rpm durante 5 min y se resuspendió el paquete celular en 8 mL de medio RPMI complementado con 12% de suero fetal bovino descomplementado (SFB). Las células se cultivaron primero en placas de 8 pozos hasta su recuperación y después en botellas de cultivo estériles de 250 mL (Gavilondo C. J. 1990).

2.2.8 Cuantificación de las células con hemocitómetro.

Se tomaron 10 µL de suspensión celular y se adicionaron 90 µL de azul de tripano. Esta suspensión se colocó en una cámara de Neubauer. En el cuadrículado de la cámara se localizaron 4 cuadros grandes ubicados en las esquinas, se contaron las células, el total se dividió entre cuatro y se multiplicó por el factor de la cámara (10000) y por 10 que fue el factor de dilución que se utilizó, de esta forma se obtuvo el número de células por mililitro.

2.2.9 Obtención de hibridomas por fusión de células del bazo y células de mieloma.

Células de bazo.

A partir de los resultados de la técnica de ELISA, el ratón con mejor título de anticuerpos anti enolasa fue sometido a esplenectomía, para esto se extrajo toda la sangre que fue posible mediante punción retroorbital y el suero obtenido sirvió como

control positivo para los ensayos de ELISA posteriores. Posteriormente, el ratón fue sacrificado por dislocación cervical y el bazo fue extraído de forma aséptica en campana de flujo laminar. El bazo fue envuelto en tela de organza estéril y colocado en una caja de Petri con 5 mL de medio RPMI e inmediatamente con un émbolo de jeringa se disgregó el tejido. La suspensión celular obtenida se colocó en un tubo Falcon estéril con 50 mL de medio RPMI precalentado a 37°C, se centrifugó por 10 min a 1200 rpm, el sobrenadante fue eliminado y se resuspendió el botón celular en 25 mL de medio. Se determinó el número de células viables en la cámara de Neubauer como se indicó anteriormente excluyendo los eritrocitos.

Células de mieloma X63Ag8.653

Se empleó la línea celular de mieloma X63Ag8.653 en crecimiento exponencial como pareja de fusión en medio de cultivo RPMI-1640 complementado con 15 % de SFB descomplementado. Esta línea celular fue sembrada 24 h antes de la fusión. Se colocaron 5×10^6 células del mieloma en botellas de 75 cm² con 20 mL de medio RPMI-1640, después se incubó a 37 °C en atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Estas células tienden a adherirse un poco a la botella en donde crecen, por lo tanto se resuspendieron con una pipeta de 5 mL y la suspensión celular fue colocada en un tubo Falcon estéril de 50 mL. Se centrifugó a 1200 rpm por 10 min, el sobrenadante se eliminó, se resuspendió el botón celular en medio RPMI-1640 y se contó la cantidad de células por mililitro como se indicó anteriormente.

***Nota: Las células del mieloma se lavaron al mismo tiempo que las células de bazo.**

2.2.10 Fusión celular.

En un tubo estéril de 50 mL fueron colocadas células de bazo y de mieloma en proporción 5:1 respectivamente. La mezcla se centrifugó a 1200 rpm por 5 min, se eliminó el sobrenadante y el botón celular fue disgregado suavemente. Por cada 60 millones de células se agregaron 0.5 mL de polietilenglicol (PEG al 42%) en un tiempo aproximado de 60 segundos agitando suavemente (se utilizó un agitador de baja velocidad). De la misma forma se mezclaron 5 mL de medio RPMI-1640 en un lapso de 3 min, después se añadieron 15 mL más del medio en un lapso de 1 min, se centrifugó a 1200 rpm por 10 min a 37°C y posteriormente el sobrenadante fue eliminado y el botón celular se resuspendió en 100 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (GIBCO BRL. No. Cat. 31800-022) con 20% de SFB descomplementado adicionado con 1 mL de medio selectivo HAT 100X (hipoxantina, aminopterina y timina. GIBCO. No. Cat. 31062-037). Se colocaron 200 µL/pozo en placas de cultivo de 96 pozos e incubaron a 37°C en atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% de CO₂. Se realizaron cambios de medio de cultivo conforme a la **Tabla 1**. Las células fueron revisadas diariamente mediante microscopía de inversión para localizar los pozos con híbridos viables (éstos se presentan como cúmulos de células) o decidir si se requería agregar medio de cultivo o identificar algún tipo de contaminación. La detección de los híbridos productores de anticuerpos se realizó por inmunoensayo enzimático (ELISA) indirecto con 100 µL del sobrenadante de los híbridos en cultivo (Khöler G and Milstein. 1975).

Tabla 1. Calendario de cambios de medio de cultivo utilizado en la selección bioquímica de los híbridos después de la fusión celular.

Día	Tipo de medio	Actividad
1	RPMI-SFB 20%	Fusión HAT 100X
3	RPMI-SFB 20% + HAT	Cambio de medio**
5	RPMI-SFB 20% + HAT	Cambio de medio
10	RPMI-SFB 15% + HAT	Cambio de medio
12	RPMI-SFB 10% + HT	Cambio de medio
14	RPMI-SFB 10% + HT	Cambio de medio
16	RPMI-SFB 10%	Cambio de medio

**** Los cambios de medio se realizaron quitando la mitad del volumen y ajustando al volumen original con medio nuevo.**

2.2.11 Clonación celular.

Se colocaron 100 μ L de medio de cultivo RPMI-1640 con SFB al 12% en la fila A de una placa de cultivo de 96 pozos. Fueron tomados 100 μ L de suspensión celular de aquellos híbridos que hayan sido positivos al Ag α -enolasa humana y se colocaron en la posición A1 y a partir de esta se realizaron diluciones dobles seriadas (1:2) hasta el final de la fila (posición A12). Las células reposaron durante 10 minutos y posteriormente se realizó el conteo celular en microscopio invertido y se localizaron los pozos que contenían 30-40 células, estas fueron diluidas en 18 mL de medio RPMI-1640 con SFB al 12%. De esta suspensión celular se sembraron 200 μ L/pozo en las 7 filas restantes de la placa (filas B a H). La placa se incubó a 37 °C con 95% de aire y 5% de CO₂ durante una semana. Posteriormente se seleccionaron mediante microscopía de inversión aquellos pozos que contenían 1 clona celular y fueron analizados los sobrenadantes

celulares por el método ELISA indirecto. De esta manera se identificaron las clonas que formaron Anticuerpos específicos. La técnica de clonación se repitió una vez más para aquellos cúmulos celulares que resultaron positivos, después se expandieron en cajas de cultivo (Gavilondo C. J. 1990).

2.2.12 Técnica para congelar células.

Una vez que las clonas celulares fueron crecidas en cajas de cultivo, se decidió congelar cinco viales de cada clona para preservarlas y utilizarlas en un caso necesario. De una caja de cultivo se despegaron las células y la suspensión obtenida se centrifugó 5 min a 3000 rpm. El sobrenadante obtenido fue conservado a -20 °C para su posterior utilización. El botón celular fue resuspendido y colocado en un criotubo, se adicionaron 500 µl de solución criopreservadora y se envolvió el criotubo con una capa de algodón de 1 cm de espesor aproximadamente. Se guardó en congelación a -80 °C y al día siguiente fue transferido a nitrógeno líquido (Gavilondo C. J. 1987).

2.2.13 Purificación de Anticuerpos Monoclonales.

El sobrenadante de cultivo recolectado a partir de 500 mL de cultivo celular fue concentrado con el sistema Ultrafiltration Device MILLIPORE con Nitrógeno líquido. La purificación se realizó mediante el Montage Antibody Purification Kit and Spin Columns with PROSEP-A media MILLIPORE. Brevemente, se filtró el sobrenadante con un tamaño de poro de 45 µm y se equilibró la columna con el Buffer A, se centrifugó a 1000 rpm por 10 min a 4°C. Se acopló el sobrenadante de cultivo concentrado y filtrado y se centrifugó a 1000 rpm por 10 min a 4°C repitiendo este paso 3 veces con el mismo sobrenadante. Se lavó la columna 2 veces con 10 ml de Buffer A

y a las tres fracciones colectadas se les midió la Absorbancia a $\lambda=280$ nm, finalmente se eluyó la proteína con 3 ml de Buffer B2 centrifugando a 1000 rpm por 10 min. La fracción colectada fueron leídas a longitud de onda de 280 nm.

El eluído se dializó con solución de PBS pH 7.2 a temperatura ambiente realizando cambio de Buffer cada 30 min. El AcM se conservó a -70°C .

CAPÍTULO III: RESULTADOS

3.1 Obtención de la α -Enolasa Humana

Se transformaron bacterias *E.coli BL21* competentes con el vector de expresión pET28a el cual fue donado por el Doctor Sang Jeon Chung, investigador del Instituto de Biociencia y Biotecnología de Korea; y para corroborar que este vector contenía el gen que codifica a la α -Enolasa Humana, se realizó una restricción de tipo enzimática con las enzimas *XhoI* y *NdeI*. En la **Figura 3.1** se puede observar la liberación del inserto HsENO1 obtenido a partir de la restricción enzimática.

3.1.1 Sobreexpresión de la α -Enolasa Humana en un Sistema Heterólogo

Posteriormente, se hicieron crecer estas bacterias en medio 2xYT con Kanamicina y cuando se alcanzó un crecimiento bacteriano con $D.O.600_{nm} = 0.6$ se indujo la sobreexpresión de la proteína mediante la adición de IPTG a una concentración final de 1 mM. El crecimiento bacteriano se incubó a 37°C, se obtuvo una alícuota de muestra del cultivo a las 0, 1, 2, 3, 4 y 24 horas y se evaluó la sobreexpresión de la α -Enolasa Humana mediante SDS-PAGE. Se presenta en la **Figura 3.2**, la imagen del gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de coomassie G250, donde se observan las proteínas del cultivo bacteriano antes de la adición del IPTG y 1, 2, 3, 4 y 24 horas posteriores a la inducción.

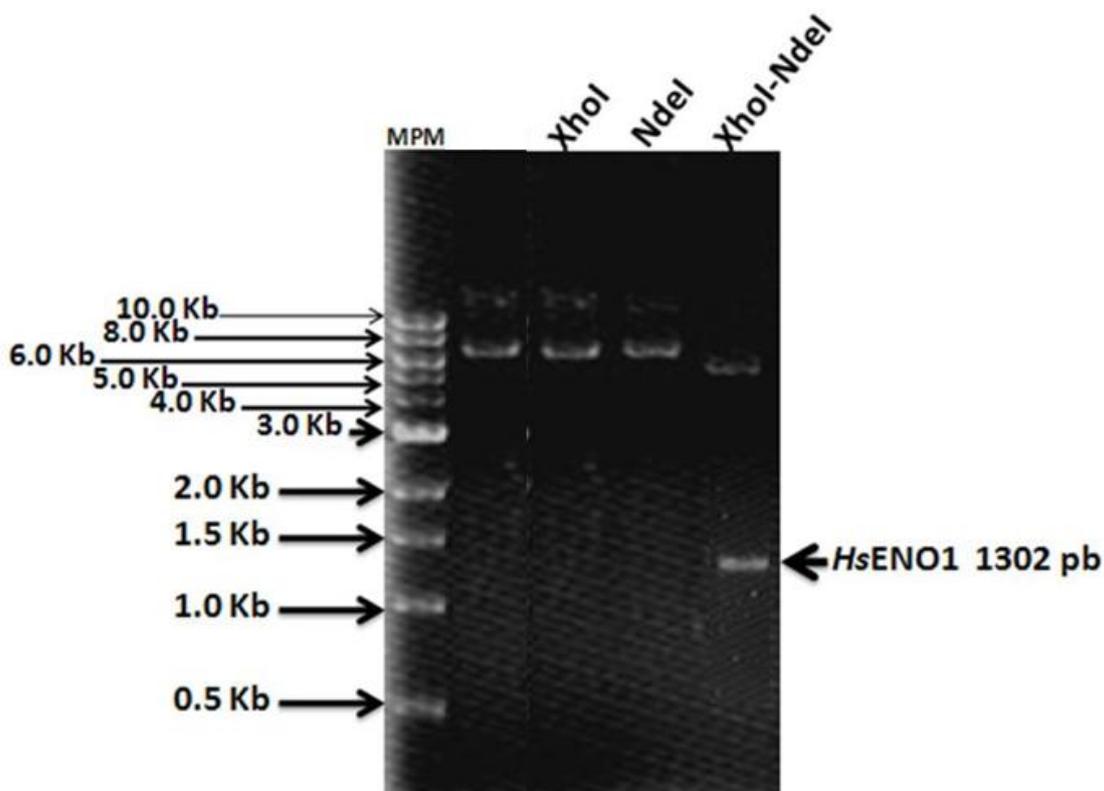


Figura 3.1. Restricción enzimática del vector pET28a y liberación del plásmido HsENO1.

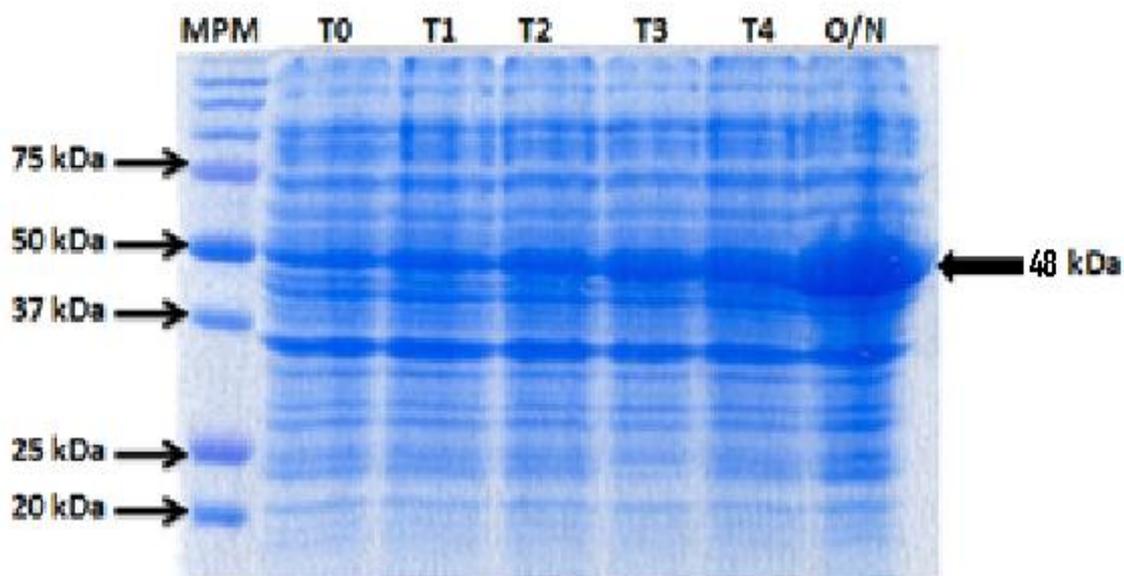


Figura 3.2. Perfil electroforético de la Enolasa Recombinante de α -enolasa humana. En el carril MPM) el marcador de masa molecular, en el T0) antes de

agregar IPTG, T1) 1 h de incubación con IPTG, T2) 2 h, T3) 3 h, T4) 4 h y O/N) 24 h después de adición de IPTG.

3.1.2 Purificación de la α -Enolasa Humana

La purificación de la α -enolasa humana se realizó mediante cromatografía de afinidad ya descrita en la sección de materiales y métodos. Las fracciones obtenidas durante el proceso de purificación se analizaron mediante SDS-PAGE al 12% y fueron teñidas con azul de Coomassie G-250. En la **Figura 3.3** se observa que el proceso de purificación permitió eliminar todas aquellas proteínas que no correspondían a la banda buscada y obtener α -Enolasa Humana en una preparación homogénea.

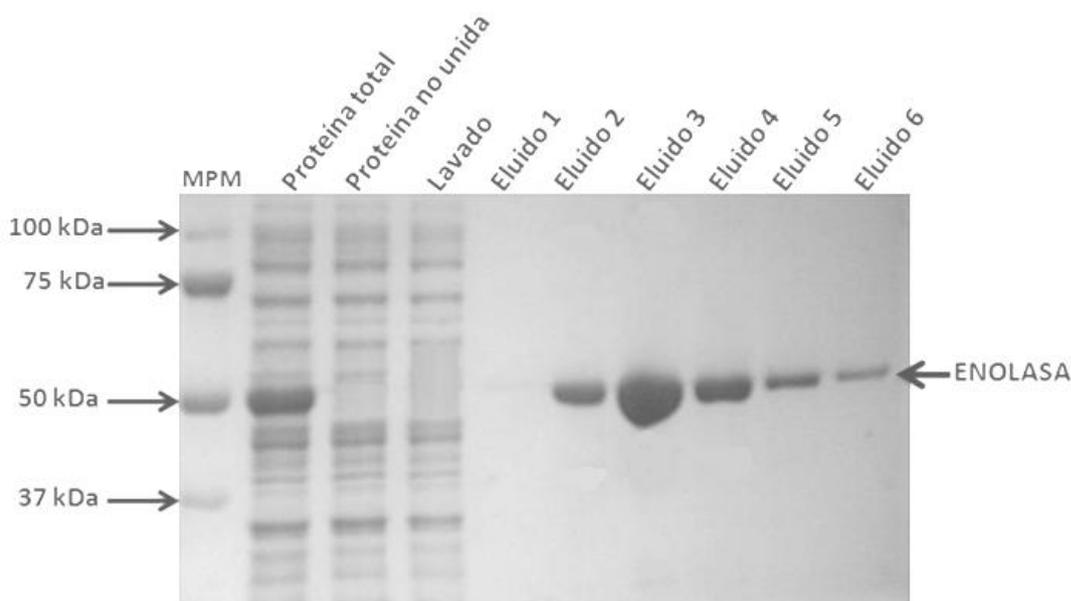


Figura 3.3. Análisis mediante SDS-PAGE de las fracciones obtenidas del proceso de purificación. En el carril MPM) se muestra el marcador de masa molecular, en el carril Proteína total) el extracto total de proteínas antes de purificar, en el carril Proteína no unida) la primera fracción de las proteínas no unidas a la columna de Ni-Agarosa, en el carril Lavado) una fracción de los lavados realizados a la columna, en los carriles Eluido 1), Eluido 2), Eluido 3), Eluido 4), Eluido 5) y Eluido 6) proteína purificada de α -enolasa humana.

3.1.3 Cuantificación de la α -Enolasa Humana.

La cuantificación de la proteína α -Enolasa Humana se realizó por triplicado con el método colorimétrico BCA Protein Assay Kit y se utilizó a la seroalbúmina como curva de calibración con la cual se determinó la concentración de la proteína purificada interpolando los resultados de absorbancia de la enolasa.

. La ecuación utilizada para determinar la concentración final de proteína fue:

$$y = mx + b$$

Donde y es igual a la intersección de la recta al origen, m indica el valor de la pendiente y x es la incógnita que pertenece al valor de la concentración que se determinó.

De esta manera se determinó que la concentración de la proteína purificada fue de 179.28 $\mu\text{g/mL}$ de un volumen total de 10 mL. El rendimiento final de la purificación se determinó multiplicando la concentración de proteína contenida en un mililitro por el volumen total de sobrenadante purificado de 10 mL:

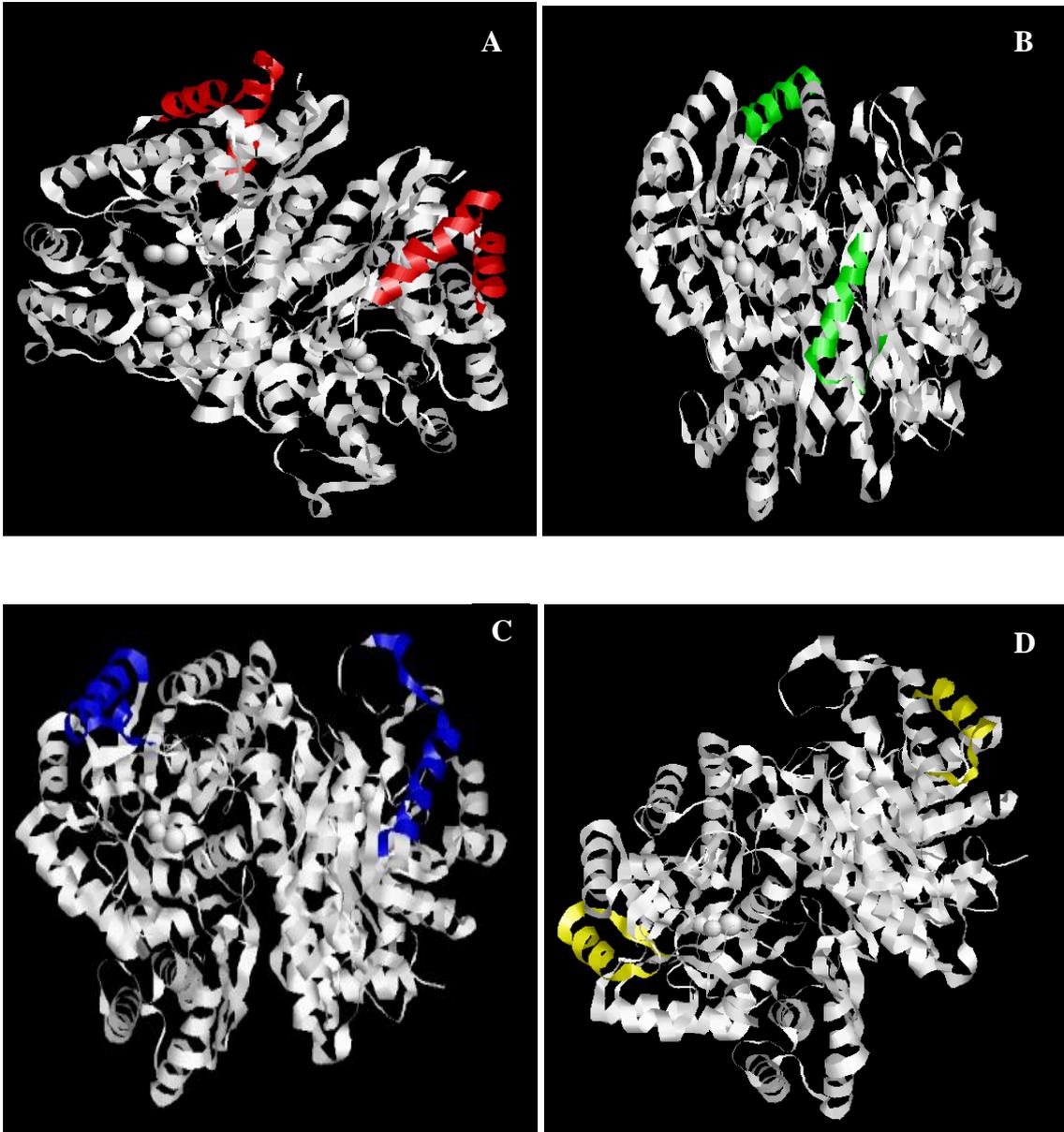
$$179.28 \mu\text{g/mL} * 10 \text{ mL} = 1792.8 \mu\text{g/mL}$$

Lo que es equivalente a 1.793 mg totales y tomando en cuenta que se obtuvieron a partir de 100 mL de cultivo, el rendimiento final de la purificación fue de 17.93 mg totales por litro de cultivo.

3.1.4 Diseño de péptidos mediante análisis *in silico* de la α -Enolasa Humana.

Para identificar las secuencias peptídicas menos conservadas e inmunogénicas en la proteína α -Enolasa Humana se tomaron en cuenta algunos criterios de selección

tales como el tamaño de la secuencia la cual debía ser de mínimo 20 aminoácidos, además esta secuencia debía ser lo menos conservada posible entre las tres isoformas de la proteína, por otro lado, esta región peptídica debía estar expuesta en la estructura tridimensional de la proteína y finalmente debía ser inmunogénica. El análisis *in silico* del alineamiento de secuencias utilizando el programa CLUSTAL W permitió identificar a 5 secuencias diferentes entre las tres isoformas de la enzima Enolasa humana. Estas cinco regiones cumplieron con los criterios de tener un tamaño mínimo de 20 aminoácidos y de ser regiones distintas entre las tres isoformas analizadas (**Figura 3.4**).



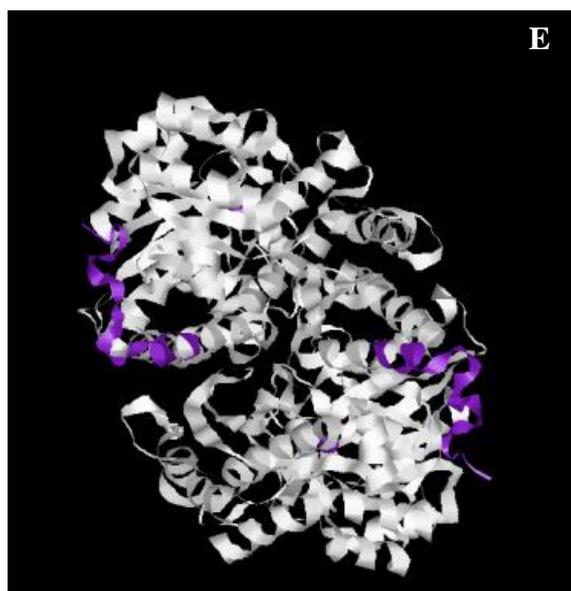


Figura 3.5. Estructuras tridimensionales evaluadas en el programa RasMol donde se resaltan en distintos colores las regiones analizadas mediante los alineamientos de secuencias.

Finalmente se utilizó el software EMBOSS disponible en el sitio web: <http://emboss.bioinformatics.nl/emboss/output/806966> y con este programa se identificaron finalmente a tres secuencias peptídicas las cuales eran las más inmunogénicas de toda la secuencia de la proteína α -Enolasa Humana. De estas tres secuencias solo una cumplió con todos los criterios anteriormente mencionados en el apartado de Metodología sin embargo, también se decidió elegir aquella secuencia que era la más diferente en la α -Enolasa Humana con respecto a sus isoformas β y γ . El resultado de este análisis se muestra en la **Figura 3.6**. Para fines prácticos, a los péptidos seleccionados se les denominaron Péptido A y Péptido C. Estos dos péptidos fueron mandados a sintetizar en el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

P06733	MSILKIHAREIFDSRGNPTVEVDLFTSKGI	PEPTIDO A	60	ENOA_HUMAN
P09104	MSIEKIWAREILDSDRGNPTVEVDLYTAKGIFRAVFSLS		60	ENOG_HUMAN
P13929	MAMQKIFAREILDSDRGNPTVEVDLHTAKGRFRAAVPSGASTGIYEALERDGDGKGRYLK		60	ENOB_HUMAN
*::** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *****				
P06733	GVSRAVEHINKTIAPALVSKKLNVTQEKIKLMIEMDGTENKSKFGANAILGVSLAVCK		120	ENOA_HUMAN
P09104	GVLKAVDRNSTIAPALVSKKLNVTQEKIKLMIEMDGTENKSKFGANAILGVSLAVCK		120	ENOG_HUMAN
P13929	GVLKAVENINSTLGPALLQKLSVADQEKVDFKMIELDGTENKSKFGANAILGVSLAVCK		120	ENOB_HUMAN
*::** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *****				
P06733	AGAVEKGVPLYRHIADLAGNSEVILPVPFNVINGGSHAGNKLAMQEFMILPVGAANFRE		180	ENOA_HUMAN
P09104	AGAAERELPLYRHIADLAGNSDLILPVPFNVINGGSHAGNKLAMQEFMILPVGAESFRD		180	ENOG_HUMAN
P13929	AGAAEKGVPLYRHIADLAGNPDILPVPFNVINGGSHAGNKLAMQEFMILPVGASSEKE		180	ENOB_HUMAN
:** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *****				
P06733	AMRIGAEVYHNLKNVIKEYGKDATNVGDEGGFAPNILENKEGLELLKTAIGKAGYTDKV	PEPTIDO C	240	ENOA_HUMAN
P09104	AMRLGAEVYHTLKGVIKDKYGKDATNVGDEGGFAPNILENKEGLELLKTAIGKAGYTEKI		240	ENOG_HUMAN
P13929	AMRIGAEVYHHLKGVIKAKYGKDATNVGDEGGFAPNILENKEGLELLKTAIGKAGYTDKV		240	ENOB_HUMAN
:** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *****				
P06733	VIGMDVAASEFFRSKGYDLDFKSPDDPSRYTSPDQADLYKSEIKDPVVSIEDPFDQDD		300	ENOA_HUMAN
P09104	VIGMDVAASEFYRDKGYDLDFKSPDPSRYITGDQLGALYQDFVRDYPVVSIEDPFDQDD		300	ENOG_HUMAN
P13929	VIGMDVAASEFYRNGKYDLDFKSPDDPARHITGKELGELYKSEIKNYPVVSIEDPFDQDD		300	ENOB_HUMAN
***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *****				
P06733	WGAWQKFTASAGIQVVGDDLTVTNPKRIAKAVNFKSCNCLLKVNIQIGSVTESIQACKLA		360	ENOA_HUMAN
P09104	WAAWSKFTANVGIQIVGDDLTVTNPKRIERAVEREAKACNCLLKVNIQIGSVTEAIQACKLA		360	ENOG_HUMAN
P13929	WATWTSSELGVIQIVGDDLTVTNPKRIAQAVEREAKACNCLLKVNIQIGSVTESIQACKLA		360	ENOB_HUMAN
: * * :... ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *****				
P06733	QANGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQIKTGAPCRSERLAKYNQLLRIBEEELGSK		420	ENOA_HUMAN
P09104	QENGWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQIKTGAPCRSERLAKYNQLMRIBEEELGDE		420	ENOG_HUMAN
P13929	QSNWGMVSHRSGETEDTFIADLVVGLCTGQIKTGAPCRSERLAKYNQLMRIBEEELGDK		420	ENOB_HUMAN
* ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** ***** ** *****				
P06733	AKFAGRNFERNPLAK	434	ENOA_HUMAN	
P09104	ARFAGHNFRNPSVL	434	ENOG_HUMAN	
P13929	AIFAGRKERNPKAK	434	ENOB_HUMAN	
* *****				

Figura 3.6. Identificación de las tres regiones inmunogénicas de la α -Enolasa Humana las cuales se enmarcan en color azul. En color rojo se muestran las dos secuencias peptídicas seleccionadas y que fueron mandadas a sintetizarse.

Tabla 2. Secuencias de los péptidos seleccionados después de realizar el análisis *in silico* de la proteína α -Enolasa Humana.

NOMBRE DEL PÉPTIDO	SECUENCIA
Péptido A	INKTIAPALVSKKLVNTEQEKI
Péptido C	DDPSRYISPDQLADLYKSFIK

3.2 Generación del anticuerpo monoclonal

3.2.1 Estandarización del esquema de inmunización y la técnica de ELISA para determinar el anticuerpo anti α -enolasa humana.

Para obtener anticuerpos monoclonales específicos se inmunizaron ratones con la proteína recombinante α -enolasa humana obtenida anteriormente. Se realizó una fusión celular con las células de bazo y la línea X6Ag8.653.

La técnica de ELISA, mediante la cual se valoraron los sueros de los ratones para evitar falsos positivos y negativos, se estandarizó utilizando como sistema de bloqueo leche al 5% diluidas en PBS a pH 7.2. La concentración de Ag ideal para todos los ensayos de ELISA fue de 5 μ g con amortiguador de carbonatos a pH 9.6, como control positivo se utilizó el suero de ratón inmune 1:1000 y como control negativo se utilizó el suero de ratón no inmune o preinmune en dilución 1:200. En la **Figura 3.7** se muestran los resultados de absorbancia obtenidos por la técnica de ELISA indirecta de las inmunizaciones practicadas a los ratones. Se observa que en los sueros preinmunes de los ratones se presenta el antígeno α -enolasa humana en (absorbancia 0.012 ± 0.001) en bajas concentraciones que no intervienen con el trabajo. En las primeras inmunizaciones no se presentan diferencias apreciables de absorbancia entre los cinco ratones, a partir de la inmunización número tres los ratones muestran una respuesta

inmune diferente, en dónde los anticuerpos anti α -enolasa se presentan en diferentes proporciones. Es importante mencionar que los cinco ratones son sistemas independientes, así que cada uno tuvo diferente respuesta hacia el antígeno.

***Nota:** La respuesta inmunológica de cada ratón es directamente proporcional a las absorbancias.

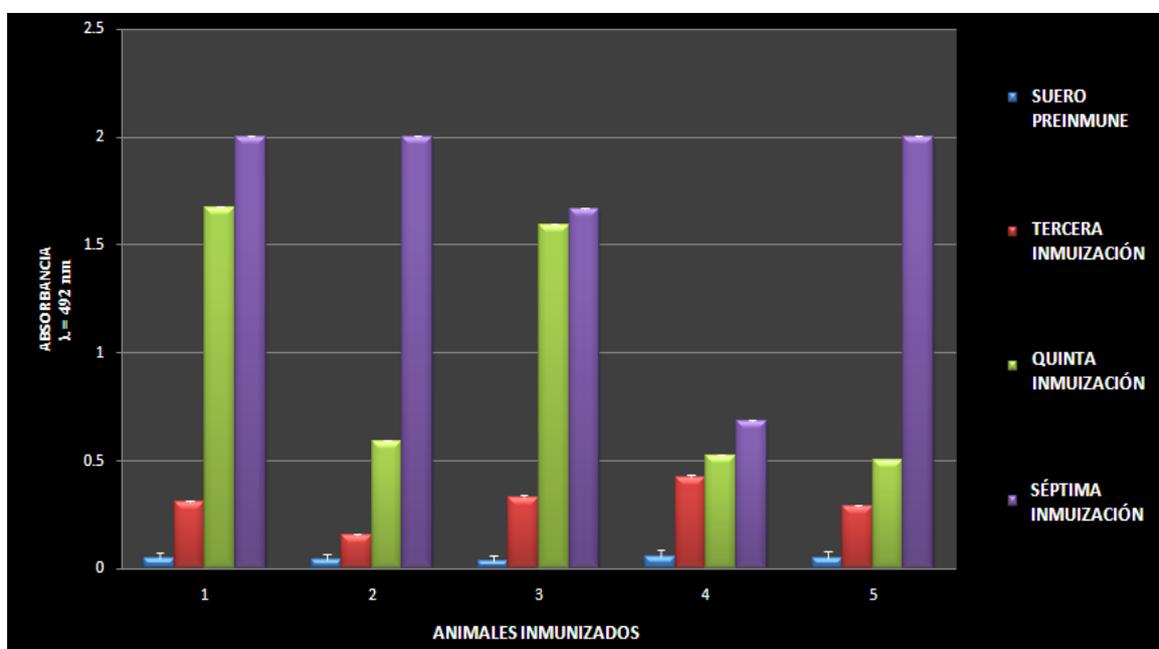


Figura 3.7. Resultados de las inmunizaciones practicadas a los cinco ratones Balb/c. Las muestras se analizaron por triplicado. Se muestran los sueros preinmunes de cada ratón (barra azul), los antisueros obtenidos después de la tercera inmunización (barra roja), antisueros obtenidos después de la quinta inmunización (barra verde), antisueros obtenidos después de la séptima inmunización (barra morada). Para graficar estos datos se multiplicaron los valores de absorbancia por el factor de dilución y se dividieron entre el valor más grande que en este caso es 2000. Las desviaciones estándar fueron 0.03, 0.05, 0.005 y 0.009.

3.2.2 Técnica de fusión celular y obtención de hibridomas productores de los anticuerpos anti α -Enolasa Humana.

El ratón que presentó mejor respuesta inmunológica (ratón número 5) fue sacrificado por dislocación cervical. Posteriormente mediante esplenectomía se obtuvieron células del bazo del ratón y se realizó la hibridación con células de mieloma X6Ag8.653. En la fusión realizada los hibridomas formados se duplicaron lentamente de tal forma que en cinco semanas solo se observaron 10, de los cuales únicamente cinco fueron viables. A estos cinco hibridomas se les evaluó su reconocimiento por la α -enolasa humana mediante la técnica de ELISA indirecto y solo tres de estos hibridomas identificados como 3C5, 6F9 y 3C8 resultaron positivos para la expresión de anticuerpos ya que los dos restantes perdieron su actividad para formar anticuerpos específicos. Los tres hibridomas que reconocían a la α -enolasa humana, fueron evaluados también con los péptidos y sólo un hibridoma nombrado como 3C8 reconoció al Péptido C (diseñado mediante el análisis *in silico* para la selección de la clona celular que generaba anticuerpos anti α -enolasa humana, ver sección de Materiales y Resultados en el capítulo III), por lo que se eligió para realizar la primera clonación. En la **Figura 3.8** se muestran las absorbancias obtenidas mediante un análisis de ELISA indirecta a una longitud de onda de 490 nm, donde se puede apreciar que el hibridoma 3C8 reconoce a la α -enolasa humana con una absorbancia mayor a 0.7 y además reconoce al péptido C con una absorbancia de 0.287.

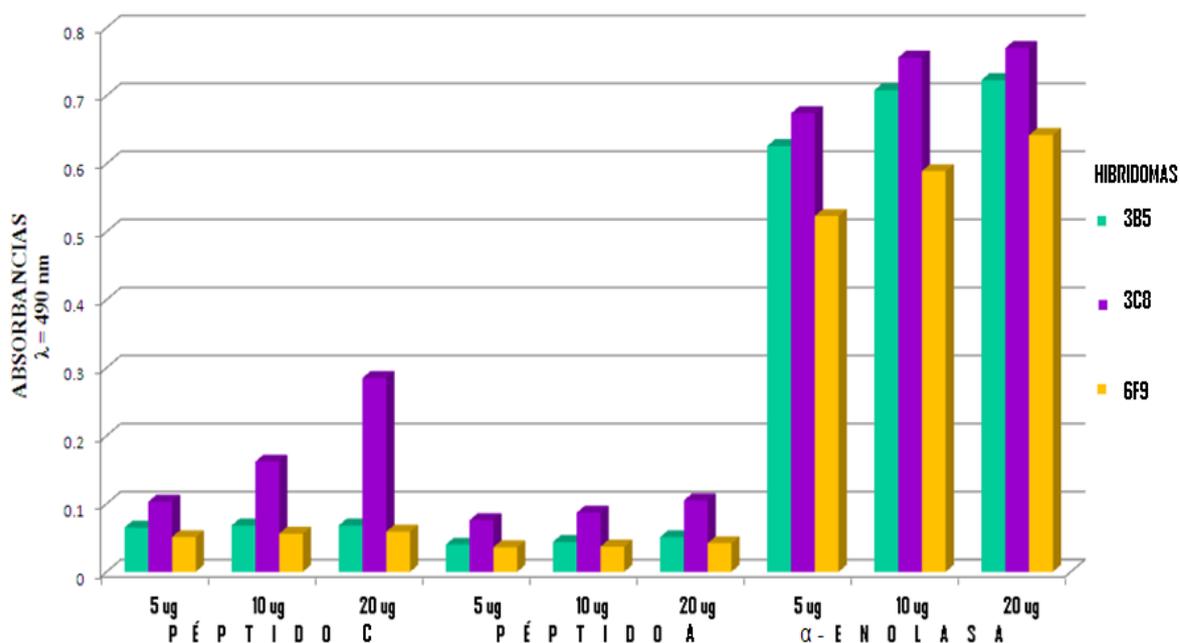


Figura 3.8. Evaluación de hibridomas mediante la técnica de ELISA indirecta. Los tres hibridomas fueron evaluados contra el reconocimiento de α -enolasa humana y los péptidos A y C sintetizados a distintas concentraciones. Hibridoma 3B5 (barras verdes), hibridoma 3C8 (barras moradas) e hibridoma 6F9 (barras amarillas).

3.2.3 Clonación y subclonación para obtener Anticuerpos Monoclonales.

El hibridoma 3C8 se clonó por la técnica de dilución limitante descrita en el capítulo de Materiales y las cinco clonas obtenidas denominadas 3C8B8, 3C8B6, 3C8D7, 3C8F8 y 3C8F12, fueron evaluadas por la técnica de ELISA indirecta utilizando como antígenos a la α -enolasa humana recombinante y al péptido C a una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ya que en el proceso de selección de hibridomas esos fueron los antígenos utilizados. Las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 492 nm fueron graficadas y de esta manera se seleccionó a una clona celular llamada 3C8B8 que reconoció con valores mayores de absorbancia a los antígenos α -enolasa humana recombinante **Figura 3.9** y al Péptido C **Figura 3.10**

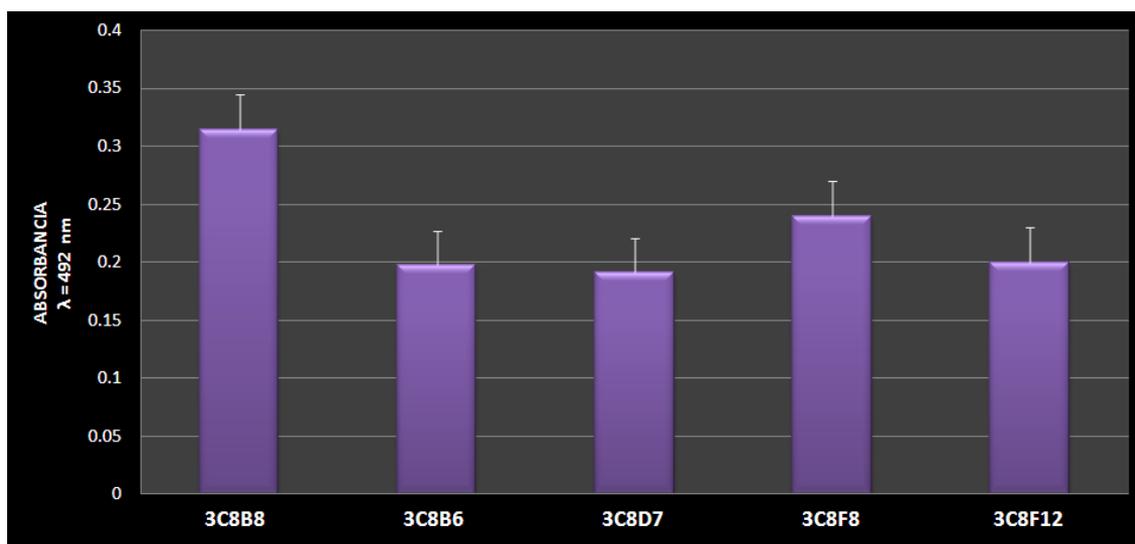


Figura 3.9. Evaluación de clonas celulares mediante la técnica de ELISA indirecta. Las cinco clonas obtenidas fueron evaluadas por triplicado contra el reconocimiento de α -enolasa humana donde se puede apreciar el reconocimiento con mayor afinidad hacia el antígeno de la clona 3C8B8. La desviación estándar fue de 0.003.

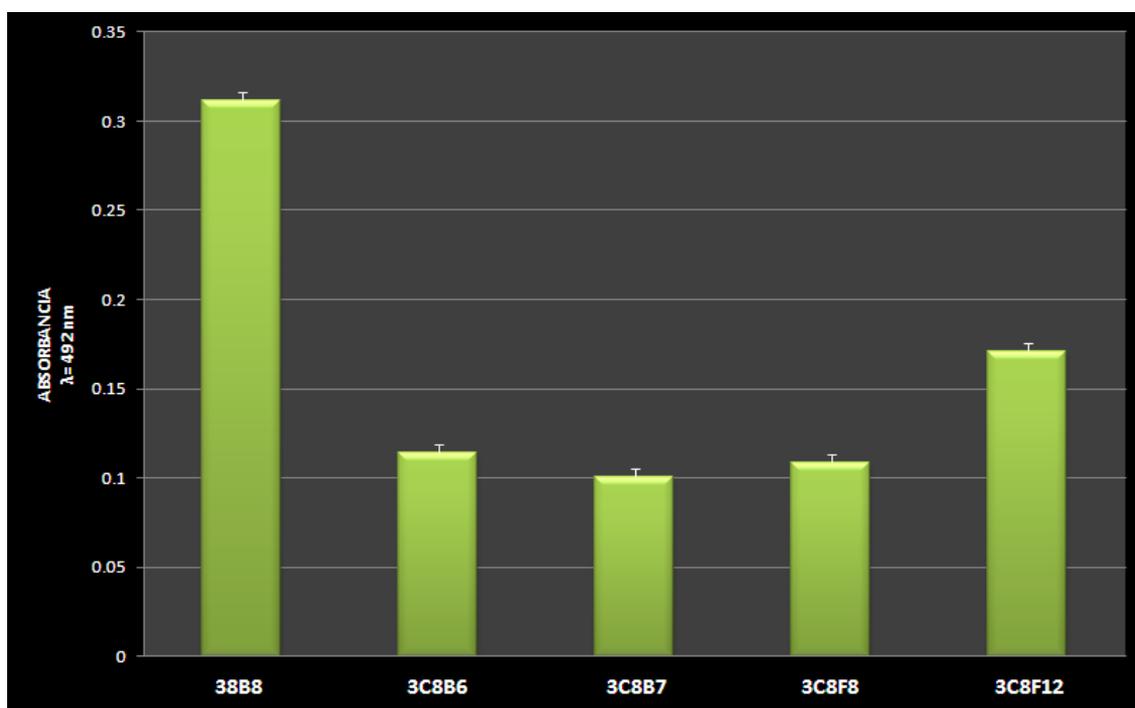


Figura 3.10. Evaluación de clonas celulares mediante la técnica de ELISA indirecta. Las cinco clonas obtenidas fueron evaluadas por triplicado contra el reconocimiento del Péptido C donde se puede apreciar el reconocimiento con mayor afinidad hacia el antígeno de la clona 3C8B8. La desviación estándar fue de 0.005.

Posteriormente, la clona celular 3C8B8 fue subclonada por la técnica de dilución limitante descrita en el capítulo de Materiales y las subclonas obtenidas fueron evaluadas mediante la técnica de ELISA indirecta utilizando como antígenos a la α -enolasa humana, al péptido C, enolasa de *Trichomona vaginalis* y enolasa de *Sacharomices cerevisiae* con una concentración de 10 $\mu\text{g/mL}$ de cada antígeno. Las absorbancias obtenidas a una longitud de onda de 492 nm fueron graficadas y en la **Figura 3.11** se puede apreciar el nivel de reconocimiento de la subclona 3C8B8F11 hacia los antígenos utilizados.

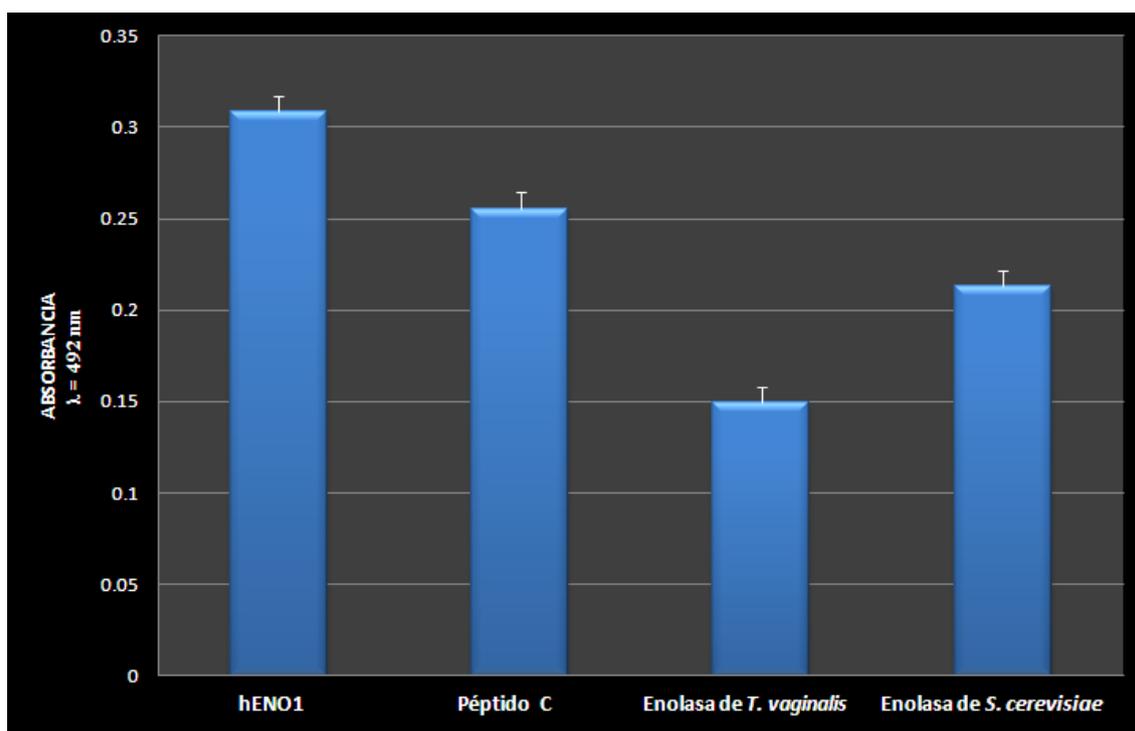


Figura 3.11. Evaluación de clonas celulares mediante la técnica de ELISA indirecta. La subclona 3C8B8F11 obtenida fue evaluada por triplicado contra el reconocimiento de distintos antígenos donde se puede apreciar el reconocimiento con mayor afinidad hacia el antígeno α -enolasa humana y péptido C. La desviación estándar fue de 0.009 ± 0.001 .

3.2.4 Purificación de anticuerpos α -enolasa humana.

La subclona 3C8B8F11 se purificó utilizando el Montage Antibody Purification Kit and Spin Columns with PROSEP-A media MILLIPORE. El eluido colectado fue analizado midiendo la Absorbancia a una longitud de onda de 280 nm y el volumen obtenido fue de 3 mL (**Figura 3.12**). La concentración del AcM obtenido fue estimada utilizando la siguiente ecuación:

$$[\text{proteína mg/mL}] = D.O_{280 \text{ nm}} * 0.800$$

Donde Abs es el valor de la absorbancia del eluido leída a $\lambda = 280 \text{ nm}$ la cual fue de 0.208, por lo tanto tenemos:

$$[\text{proteína mg/mL}] = 0.208 * 0.800$$

El valor obtenido se multiplica por el volumen total del eluido que en este caso fue de 3 mL y la concentración final estimada fue de **0.4992 mg/3mL**.

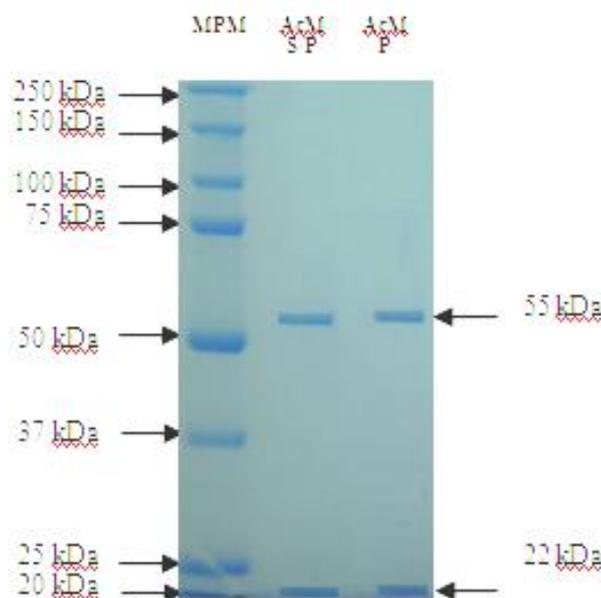


Figura 3.12. Purificación del AcM 3C8B8D11 analizado en un gel de SDS-PAGE al 12 %. En el carril MPM: Marcador de masa molecular, en el carril AcM S/P: AcM antes de ser purificado y en el carril AcM P: AcM después de la purificación. Se observan las cadenas pesadas a una altura de 55 kDa y las cadenas ligeras a una altura de 22 kDa.

CAPÍTULO IV: DISCUSIÓN

En este proyecto se estandarizó el procedimiento de sobreexpresión y purificación de la α -enolasa humana recombinante el cual se encuentra descrito en el capítulo de Materiales.

Por otro lado, se ha reportado en diversos estudios, que las células inmunitarias no interactúan con la totalidad de una molécula inmunógena sino que identifican sitios específicos en la macromolécula llamados epítomos o determinantes antigénicos (Butterfield & Lange 2009). Los epítomos pueden estar constituidos por residuos secuenciales contiguos a lo largo de la cadena peptídica o residuos no secuenciales de segmentos de la cadena que se acercan entre sí a causa de la conformación plegada de un antígeno. De este modo un epítomo en un antígeno puede incluir elementos de estructura primaria, secundaria, terciaria e incluso cuaternaria del antígeno (Sánchez-Miguel et al. 2010)

En este trabajo el análisis *in silico* de la proteína α -enolasa humana, permitió identificar a dos secuencias peptídicas que guardaban menor similitud entre las tres isoformas de la enolasa en humanos, sin embargo, estas regiones aún contienen aminoácidos conservados en las tres secuencias de las proteínas. Por otro lado, se realizó un alineamiento de las tres secuencias de la enolasa en humanos (α , β y γ) con respecto a la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* y enolasa de *Trichomona vaginalis* utilizando el software PRALINE disponible en la página web:

<http://zeus.few.vu.nl/jobs/66108c7d7aa6babdab3d3ec54c2fe9de/conservation0.pdf>

donde se pudo analizar la región peptídica que fue reconocida por el AcM (Péptido C). En particular se eligió esta región ya que el péptido C se utilizó para seleccionar la clona productora de anticuerpo anti α -enolasa de humano

En este alineamiento (**Figura 4.1**) se observó que la región que corresponde a la secuencia del péptido C se encuentra altamente conservada entre todas las enolasas, pero esta región se encuentra un poco más diferenciada entre la α -enolasa humana y la enolasa de *Trichomona vaginalis*, sin embargo en la evaluación de la reactividad del anticuerpo de la clona 3C8B8F11 utilizando como antígenos a la α -enolasa humana, Péptido C, enolasa de *Trichomona vaginalis* y enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (**Figura 3.11**), se apreció claramente un reconocimiento del AcM hacia α -enolasa humana, péptido C con absorbancias mayores (0.34 y 0.28 respectivamente), reconoció con menor afinidad a la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (0.245) y con respecto a la enolasa de *Trichomona vaginalis* hubo una diferencia mayor de reconocimiento (0.13) aunque siguió existiendo un reconocimiento del AcM hacia este antígeno, por lo que el grado de reconocimiento del AcM hacia las distintas enolasas coincide con el grado de conservación de las distintas enolasas.

Por otro lado, se realizó un alineamiento de las estructuras tridimensionales de las diferentes enolasas utilizadas como antígenos y se observó que todas se superponen casi en su totalidad, es decir, no se identificaron diferencias sobresalientes entre estas estructuras tridimensionales (**Figura 4.2**). En particular la región correspondiente al péptido C presenta una alta conservación estructural entre las distintas enolasas con las que se realizó el ensayo de reconocimiento del anticuerpo monoclonal obtenido.

```

      . . . . . 10 . . . . . 20 . . . . . 30 . . . . . 40 . . . . . 50
sp_P06733_ENOA_  -----  -----  -----  -----  MSIL  KIHAREIFDS
sp_P09104_ENOG_  -----  -----  -----  -----  MSIE  KIWAREILDS
sp_P13929_ENOB_  -----  -----  -----  -----  MAMQ  KIFAREILDS
sp_P00924_ENO1_  -----  -----  -----  -----  MAVS  KVYARSVYDS
tr_Q5EFD8_Q5EFD  MNAEHDAIVK  ECIAEAAKAE  DPIGTLVLL  KKKAPKAVIE  KVVGREVLDS
Consistency      0000000000  0000000000  0000000000  0000007674  *937*795**
    
```

```

      . . . . . 60 . . . . . 70 . . . . . 80 . . . . . 90 . . . . . 100
sp_P06733_ENOA_  RGNPTVEVDL  FTS-----  KG  LFRAAVPSGA  STGIYEAL  RDNDKTRYMG
sp_P09104_ENOG_  RGNPTVEVDL  YTA-----  KG  LFRAAVPSGA  STGIYEAL  RDGDKQRYLG
sp_P13929_ENOB_  RGNPTVEVDL  HTA-----  KG  RFRAAVPSGA  STGIYEAL  RDGDKGRYLG
sp_P00924_ENO1_  RGNPTVEVEL  TTE-----  KG  VFRAAVPSGA  STGVHEALEM  RDGDKSWMG
tr_Q5EFD8_Q5EFD  RGNPTVEVDV  YVKYLGRVTL  AARSSAPSGA  STGVGEAL  RDGDKARYGG
Consistency      *****88  4750000076  46*768****  ***95****8  **7**4875*
    
```

```

      . . . . . 110 . . . . . 120 . . . . . 130 . . . . . 140 . . . . . 150
sp_P06733_ENOA_  KGVSKAVEHI  NKTIAPALVS  KKLNVTEQEK  IDKLMIEDG  TENKSKFGAN
sp_P09104_ENOG_  KGVLKAVDHI  NSTIAPALIS  SGLSVVEQEK  LDNLMLELDG  TENKSKFGAN
sp_P13929_ENOB_  KGVLKAVENI  NSTLGPALLQ  KKLSVADQEK  VDKFMIELDG  TENKSKFGAN
sp_P00924_ENO1_  KGVLHAVKNV  NDVIAPAFVK  ANIDVKDQKA  VDDFLISLDG  TANKSKLGAN
tr_Q5EFD8_Q5EFD  KGTQQAANKV  TEKLSPALKG  --MCFCDPFA  LDKKICDTDG  TVLKKNIGGN
Consistency      **745*8669  75586**754  3274737656  7*547666**  *56*776*7*
    
```

```

      . . . . . 160 . . . . . 170 . . . . . 180 . . . . . 190 . . . . . 200
sp_P06733_ENOA_  AILGVSLAVC  KAGAVEKGV  LYRHIADLAG  NS-----  EV  ILPVPFNV
sp_P09104_ENOG_  AILGVSLAVC  KAGAAERELP  LYRHIADLAG  NS-----  DL  ILPVPFNV
sp_P13929_ENOB_  AILGVSLAVC  KAGAAEKGV  LYRHIADLAG  NP-----  DL  ILPVPFNV
sp_P00924_ENO1_  AILGVSLAAS  RAAAAEKNV  LYKHLADLSK  SK-----  TSPY  VLPVPFLNVL
tr_Q5EFD8_Q5EFD  ACTATSFALA  EAGAAVQEI  LFQYLAKAFY  GGCDKVPK  KLPSPFNIL
Consistency      *7777*7*65  7*7*867487  *8788*5754  6400000045  6**7*57*98
    
```

```

      . . . . . 210 . . . . . 220 . . . . . 230 . . . . . 240 . . . . . 250
sp_P06733_ENOA_  NGGSHAGNKL  AMQEFMILPV  GAANFREAMR  IGAEVYHNLK  NVIKEKYGKD
sp_P09104_ENOG_  NGGSHAGNKL  AMQEFMILPV  GAESFRDAMR  LGAEVYHTLK  GVIKDKYGKD
sp_P13929_ENOB_  NGGSHAGNKL  AMQEFMILPV  GASSFKEAMR  IGAEVYHHLK  GVIKAKYGKD
sp_P00924_ENO1_  NGGSHAGGAL  ALQEFMIAPT  GAKTFAEALR  IGSEVYHNLK  SLTKKRYGAS
tr_Q5EFD8_Q5EFD  NGGKHAGGNL  KFQEFMVTPT  RKVPFPDQLR  MVAEVYQKLG  GLLVKKYGLS
Consistency      ***7***65*  76***95*6  6744*4778*  768***74*6  676648**56
    
```

```

      . . . . . 260 . . . . . 270 . . . . . 280 . . . . . 290 . . . . . 300
sp_P06733_ENOA_  ATNVGDEGGF  APNILENKEG  LELLKTAIGK  AGYT--DKVV  IGMDVAASEF
sp_P09104_ENOG_  ATNVGDEGGF  APNILENSEA  LELVKEAIDK  AGYT--EKIV  IGMDVAASEF
sp_P13929_ENOB_  ATNVGDEGGF  APNILENNEA  LELLKTAIQA  AGYP--DKVV  IGMDVAASEF
sp_P00924_ENO1_  AGNVGDEGGV  APNIQTAEAA  LDLIVDAIKA  AGHD--GKIK  IGLDCASSEF
tr_Q5EFD8_Q5EFD  AKNLGDEGGF  APNLNDPEEA  LTVIEEAIKA  AGYEAGKDIM  IGMDVASSEF
Consistency      *4*8***7  ***94645*7  *68855**46  **84004795  **8*7*7***
    
```

```

      . . . . . 310 . . . . . 320 . . . . . 330 . . . . . 340 . . . . . 350
sp_P06733_ENOA_  FRSGKYDLDF  KSEID-DPSRY  ISPDQLADLY  KSFIRKDYF-V  VSIEDPFDQD
sp_P09104_ENOG_  YRDGKYDLDF  KSEID-DPSRY  ITGDQLGALY  QDFVRDYF-V  VSIEDPFDQD
sp_P13929_ENOB_  YRNGKYDLDF  KSEID-DPARH  ITGEKLGELY  KSFIRKDYF-V  VSIEDPFDQD
sp_P00924_ENO1_  FKDGKYDLDF  KNEIDSKSKW  LTGPQLADLY  HSLMKRYP-I  VSIEDPFAED
tr_Q5EFD8_Q5EFD  YDEEKLYEV  E----VGKF  LNADQMIDYF  DELLKHPA-I  VSIEDALAE
Consistency      8556*66787  8463064685  8656884578  4667848*09  *****77586
    
```

```

      . . . . . 360 . . . . . 370 . . . . . 380 . . . . . 390 . . . . . 400
sp_P06733_ENOA_  DWGAWQKFTA  SAG--IQVVG  DDLTVTNPKR  IAKAVNEKSC  NCLLLKVNQI
sp_P09104_ENOG_  DWAAWSKFTA  NVG--IQIVG  DDLTVTNPKR  IERAVEEKAC  NCLLLKVNQI
sp_P13929_ENOB_  DWATWTSFSL  GVN--IQIVG  DDLTVTNPKR  IAQAVEKKAC  NCLLLKVNQI
sp_P00924_ENO1_  DWEAWSHFFK  TAG--IQIVA  DDLTVTNPKR  IATAIEKKA  DALLLKVNQI
tr_Q5EFD8_Q5EFD  DYENWTKLNA  RLGQRVQLVG  DDLYTTNPIT  IKKLEGKWC  NALLLKVNQI
Consistency      *745*55736  367009*8*7  ***67**67  *557875*57  86*****
    
```

```

      . . . . . 410 . . . . . 420 . . . . . 430 . . . . . 440 . . . . . 450
    
```

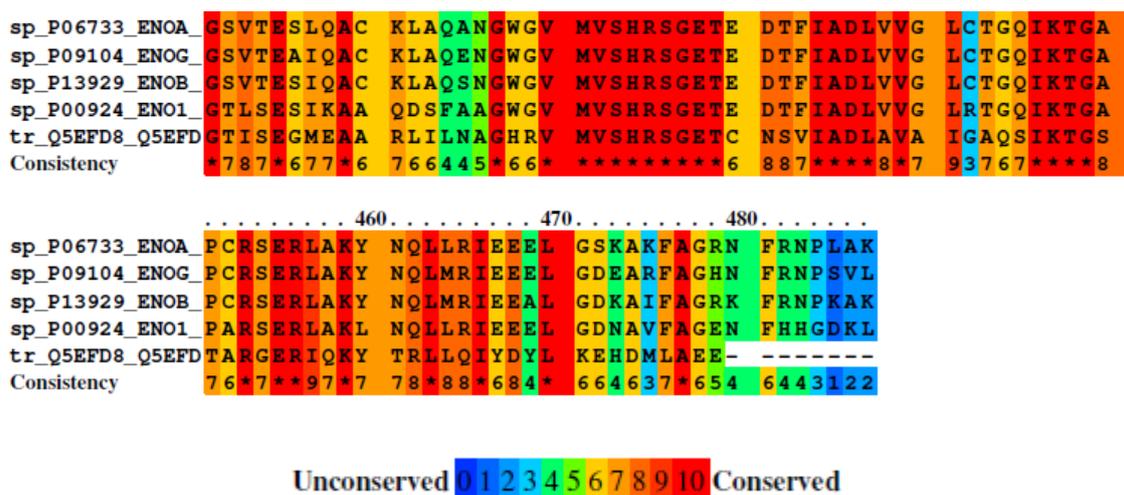


Figura 4.1. Alineamiento de las secuencias de los distintos Antígenos utilizados. El orden de aparición en la figura es α -enolasa (sp_P06733_ENOA), γ -enolasa (sp_P09104_ENOG), β -enolasa (sp_P13929_ENOB), enolasa de *Saccharomyces cerevisiae* (sp_P00924_ENO1) y enolasa de *Trichomona vaginalis* (tr_Q5EFD8_Q5EFD). Al pie de la figura aparece el código de colores de las regiones iluminadas. En un recuadro negro se muestra la secuencia correspondiente al Péptido C y la localización de este en la secuencia de las otras enzimas.



Figura 4.2. Alineamiento de las estructuras tridimensionales de distintas enolasas evaluadas mediante el software MOE (Molecular Operating Environment) 2008.10. En rojo se muestra la estructura tridimensional de la α -Enolasa Humana, en verde se la β -Enolasa Humana, en azul se representa a la estructura de la γ -Enolasa Humana y en color fucsia se muestra a la estructura de la enolasa de *Saccharomyces cerevisiae*. En color amarillo se representa a la secuencia del Péptido C en las cuatro estructuras de enolasa.

Con estos resultados se podría explicar la razón por la cual el anticuerpo a pesar de ser monoclonal y haber sido seleccionado por su reconocimiento por el péptido C, también reconoció a otros antígenos que guardan un 83% de identidad entre las isoformas humanas y un 65% con respecto a los antígenos de la misma familia de proteínas pero de otras especies diferentes al humano. Además también se tiene que

considerar que el epítoto del antígeno que al parecer podría ser la región del péptido C, podría estar constituido por más aminoácidos o bien la región del péptido C solo podría representar una pequeña parte del epítoto.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES

- ❖ Se sobreexpresó la α -enolasa humana en las condiciones de nuestro laboratorio.
- ❖ La purificación de la α -enolasa humana recombinante fue llevada a cabo con un alto rendimiento (17.93 mg a partir de 1 L de cultivo).
- ❖ Se lograron identificar las secuencias peptídicas más específicas y diferenciadas linealmente para la α -enolasa humana.
- ❖ Se logró producir un anticuerpo monoclonal anti α -enolasa humana (3C8B8F11) que reconoció además a uno de los péptidos diseñados en este trabajo.
- ❖ El anticuerpo monoclonal 3C8B8F11 además reconoce a la enolasa de las especies *Trichomona vaginalis* y *Saccharomyces cerevisiae*.

CAPÍTULO VI: PERSPECTIVAS

- ✍ **Caracterizar la subclase de IgG que se obtuvo.**

- ✍ **Realizar ensayos de reconocimiento del anticuerpo hacia los antígenos mediante Western Blot.**

- ✍ **Determinar los parámetros catalíticos de la actividad enzimática de la α -enolasa humana en ausencia y presencia del anticuerpo monoclonal.**

- ✍ **Analizar mediante un modelo computacional la posible interacción del anticuerpo monoclonal con el antígeno α -enolasa humana.**

- ✍ **Cristalizar el anticuerpo monoclonal en presencia del antígeno α -enolasa humana, o en presencia del péptido C.**

BIBLIOGRAFÍA

1. Aaronson, R.M. et al., 1995. Non-neuronal enolase is an endothelial hypoxic stress protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 270(46), p.27752-27757. Available at: [Accessed May 31, 2011].
2. Arza, B. et al., 1997. Identification of an epitope of alpha-enolase (a candidate plasminogen receptor) by phage display. *Thrombosis and Haemostasis*, 78(3), p.1097-1103. Available at: [Accessed May 31, 2011].
3. Benítez-Cardoza C. G., (2006) Capitulo: Resonancia Magnética Nuclear para el estudio de constantes de velocidad de plegamiento, *Libro de Física Biológica, publicado por El Colegio de México*. 157-176 [Accessed May 31, 2011]
4. Benítez-Cardoza C. G., (2006) Capitulo: Termodinámica y Cinética en el Análisis del Mecanismo de Plegamiento Proteínas. *Libro de Física Biológica, publicado por El Colegio de México*. 177-191 [Accessed May 31, 2011]
5. Berzofisky. et al., 1999. Immunogenicity and antigen structure. In *Fundamental Immunology*, 4 th ed. W.E. Paul, ed. Lippincott-Raven, Philadelphia.
6. Boyle, M.D. & Lottenberg, R., 1997. Plasminogen activation by invasive human pathogens. *Thrombosis and Haemostasis*, 77(1), p.1-10. Available at: [Accessed May 31, 2011].

7. Brewer, J.M., 1981. Yeast enolase: mechanism of activation by metal ions. *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 11(3), p.209-254. Available at: [Accessed May 24, 2011].
8. Brown, C.K. et al., 1998. A model of the quaternary structure of enolases, based on structural and evolutionary analysis of the octameric enolase from *Bacillus subtilis*. *Journal of Protein Chemistry*, 17(8), p.855-866. Available at: [Accessed May 31, 2011].
9. Butterfield, D.A. & Lange, M.L.B., 2009. Multifunctional roles of enolase in Alzheimer's disease brain: beyond altered glucose metabolism. *Journal of Neurochemistry*, 111(4), p.915-933. Available at: [Accessed May 31, 2011].
10. Dernotz. et. al., 1989. Characterization of a naturally processed MHC class II-restricted T-cell determinant of hen egg lysozyme. *Nature*, p.342-682.
11. Ehinger, S. et al., 2004. Plasmin(ogen)-binding alpha-enolase from *Streptococcus pneumoniae*: crystal structure and evaluation of plasmin(ogen)-binding sites. *Journal of Molecular Biology*, 343(4), p.997-1005. Available at: [Accessed May 31, 2011].
12. Feo, S. et al., 2000. ENO1 gene product binds to the c-myc promoter and acts as a transcriptional repressor: relationship with Myc promoter-binding protein 1 (MBP-1). *FEBS Letters*, 473(1), p.47-52. Available at: [Accessed May 31, 2011].
13. Fischetti, V.A., Pancholi, V. & Schneewind, O., 1990. Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from gram-positive cocci. *Molecular Microbiology*, 4(9), p.1603-1605. Available at: [Accessed May 31, 2011].

14. Frazer. et. al., 1999. Immunoglobullins structure and function. In *Fundamental Immunolog*, 4th ed. W. E. Paul.
15. Gavilondo C. J. 1987. Aspectos básicos y avances recientes en la tecnología de producción de anticuerpos monoclonales. *Interferón y Biotecnología* (4) 1-16
16. Gavilondo C. J. 1990. Second generation monoclonal antibodies. *Investigación y ciencia*.
17. Giallongo, A. et al., 1986. Isolation and partial characterization of a 48-kDa protein which is induced in normal lymphocytes upon mitogenic stimulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 134(3), p.1238-1244. Available at: [Accessed May 31, 2011].
18. Graven, K.K. et. al., 1993. Endothelial cell hypoxia associated proteins are cell and stress specific. *Journal of Cellular Physiology*, 157(3), p.544-554. Available at: [Accessed May 31, 2011].
19. Grey. et. al., 1989. How T cells see antigen. *Scientific American*, p. 261(5)56
20. Heijne, G. von & Blomberg, C., 1979. Trans-membrane translocation of proteins. The direct transfer model. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 97(1), p.175-181. Available at: [Accessed May 31, 2011].
21. Hori, T., Nguyen, J.H. & Uemoto, S., 2011. Muromonab-CD3 for the successful treatment of early chronic rejection after pediatric liver transplantation: report of a case. *Surgery Today*, 41(4), p.585-590. Available at: [Accessed May 31, 2011].
22. Kindt. et. al., 1984. The Antibody Enigma. *Plenum press*, New York.

-
23. Kolberg, J. et al., 2006. Streptococcus pneumoniae enolase is important for plasminogen binding despite low abundance of enolase protein on the bacterial cell surface. *Microbiology (Reading, England)*, 152(Pt 5), p.1307-1317. Available at: [Accessed May 31, 2011].
24. Köhler G and Milstein. 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, p. 256-495.
25. Lebioda, L., Stec, B. & Brewer, J.M., 1989. The structure of yeast enolase at 2.25-Å resolution. An 8-fold beta + alpha-barrel with a novel beta beta alpha alpha (beta alpha)₆ topology. *The Journal of Biological Chemistry*, 264(7), p.3685-3693. Available at: [Accessed May 31, 2011].
26. Lehninger A., 1990. Bioquímica. Ediciones Omega Barcelona.
27. Lindquist, S. & Craig, E.A., 1988. The heat-shock proteins. *Annual Review of Genetics*, 22, p.631-677. Available at: [Accessed May 31, 2011].
28. Lohman K. and Meyerhof O. 1934, *Biochem. Z.* 273:60-72
29. Malmstrom, B.G., 1955. Metal-ion specificity in the activation of enolase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 58(2), p.381-397. Available at: [Accessed May 31, 2011].
30. Marcu, K.B., Bossone, S.A. & Patel, A.J., 1992. myc function and regulation. *Annual Review of Biochemistry*, 61, p.809-860. Available at: [Accessed May 31, 2011].

31. Marshall, K.E. & Serpell, L.C., 2009. Structural integrity of beta-sheet assembly. *Biochemical Society Transactions*, 37(Pt 4), p.671-676. Available at: [Accessed May 31, 2011].
32. Navarre, W.W. & Schneewind, O., 1999. Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 63(1), p.174-229. Available at: [Accessed May 31, 2011].
33. Ong, A., Quach, H. & Leech, M., 2011. Reversal of Transfusion Dependence by Tumor Necrosis Factor Inhibitor Treatment in a Patient With Concurrent Rheumatoid Arthritis and Primary Myelofibrosis. *Journal of Clinical Rheumatology: Practical Reports on Rheumatic & Musculoskeletal Diseases*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21617547> [Accessed May 31, 2011].
34. Pancholi, V., 2001. Multifunctional alpha-enolase: its role in diseases. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 58(7), p.902-920. Available at: [Accessed May 24, 2011].
35. Petrak, J. et al., 2008. Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics*, 8(9), p.1744-1749. Available at: [Accessed May 31, 2011].
36. Ping H. et al., 2003. Thermal, chemical and chemothermal denaturation of yeast enolase. *Spectroscopy* 17, 453-467 [Accessed May 31, 2011]
37. Plow, E.F., Felez, J. & Miles, L.A., 1991. Cellular regulation of fibrinolysis. *Thrombosis and Haemostasis*, 66(1), p.32-36. Available at: [Accessed May 31, 2011].

38. Rattner, J.B. et al., 1991. Autoantibodies to the centrosome (centriole) react with determinants present in the glycolytic enzyme enolase. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 146(7), p.2341-2344. Available at: [Accessed May 31, 2011].
39. Ricart, A.D., 2011. Immunoconjugates against solid tumors: mind the gap. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 89(4), p.513-523. Available at: [Accessed May 31, 2011].
40. Rodríguez H. M., 2010. Modulation of Lysyl Oxidase-Like2 Enzymatic Activity by an Allosteric Antibody Inhibitor, *The J. Biol. Chem.*, 285(27), p.p. 20964-20974.
41. Sánchez-Miguel, D.S. et al., 2010. Chemical unfolding of enolase from *Saccharomyces cerevisiae* exhibits a three-state model. *The Protein Journal*, 29(1), p.1-10. Available at: [Accessed May 31, 2011].
42. Sayers T.C. 2011. Targeting the extrinsic apoptosis signaling pathway for cancer therapy. *Cancer Immunology*,
43. Schreier, B. & Höcker, B., 2010. Engineering the enolase magnesium II binding site: implications for its evolution. *Biochemistry*, 49(35), p.7582-7589. Available at: [Accessed May 31, 2011].
44. Schurig, H. et al., 1995. Octameric enolase from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima*: purification, characterization, and image processing. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 4(2), p.228-236. Available at: [Accessed May 31, 2011].
45. Seweryn, E. et al., 2008. Distribution of beta-enolase in normal and tumor rat cells. *Folia Histochemica Et Cytobiologica / Polish Academy of Sciences*,

- Polish Histochemical and Cytochemical Society*, 46(4), p.519-524. Available at: [Accessed May 31, 2011].
46. Seweryn, E. et al., 2009. Localization of enolase in the subfractions of a breast cancer cell line. *Zeitschrift Für Naturforschung. C, Journal of Biosciences*, 64(9-10), p.754-758. Available at: [Accessed May 31, 2011].
47. Terrier, B. et al., 2007. Alpha-enolase: a target of antibodies in infectious and autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 6(3), p.176-182. Available at: [Accessed May 31, 2011].
48. Veronese, F.M. et al., 1984. Enzymatically active subunits of *Bacillus stearothermophilus* enolase bound to Sepharose. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 24(6), p.557-562. Available at: [Accessed May 31, 2011].
49. Vick, J.E. & Gerlt, J.A., 2007. Evolutionary potential of (beta/alpha)₈-barrels: stepwise evolution of a “new” reaction in the enolase superfamily. *Biochemistry*, 46(50), p.14589-14597. Available at: [Accessed May 31, 2011].
50. Vinarow D.A. 1998. pH Dependence of the reaction Catalyzed by Yeast Mg-Enolase. *Biochemistry*. (37) p. 15238-15246.
51. Wistow, G.J. et al., 1988. Tau-crystallin/alpha-enolase: one gene encodes both an enzyme and a lens structural protein. *The Journal of Cell Biology*, 107(6 Pt 2), p.2729-2736. Available at: [Accessed May 31, 2011].
52. Wistow, G. & Piatigorsky, J., 1987. Recruitment of enzymes as lens structural proteins. *Science (New York, N.Y.)*, 236(4808), p.1554-1556. Available at: [Accessed May 31, 2011].

- 53. Wold, F., 1975. Enolase from fish muscle. *Methods in Enzymology*, 42, p.329-334. Available at: [Accessed May 31, 2011].**

ANEXOS.

Preparación de reactivos utilizados en este trabajo.

✎ Solución amortiguadora de carbonatos 0.1 M, pH 9.6

Pesar 3.18 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) más 5.86 g de bicarbonato de sodio (NaHCO_3). Disolver los carbonatos en 800 mL de agua bidestilada. Ajustar el pH a 9.6 y aforar a 1000 mL. Mantener a 4°C.

✎ Solución de fosfatos (PB 10X).

Pesar 2.62 g de $\text{NaH}_2\text{HPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Fosfato de sodio monobásico monohidratado) y 11.5 g de Na_2HPO_4 (Fosfato de sodio dibásico anhidro). Disolver en 200 mL de agua bidestilada (calentar un poco hasta disolver los cristales) y aforar a 1000 mL con agua bidestilada.

✎ Solución salina de fosfatos (NaCl 0.15 M, fosfatos 0.001 M, pH 7.2 (PBS)

Medir 800 mL de agua destilada, agregar 100 mL de PB 10X y 8.75 g de NaCl. Disolver las sales y ajustar el pH a 7.2. Aforar a 1000 mL con agua bidestilada. Guardar a 4°C.

✎ Solución amortiguadora de lavado (PBS-tween 20, 0.05%)

A un litro de PBS pH 7.2 añadir 500 μL de Tween 20. Guardar a 4 °C.

✎ Solución de bloqueo (Leche descremada al 5 %).

Pesar 5 g de leche descremada en polvo y disolverla en 100 mL de PBS-Tween.
Guardar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

 ***Solución de cromógeno/sustrato (ELISA) para peroxidasa.***

Pesar 4 mg de orto-fenilendiamina (OPD), añadir 5 mL de ácido cítrico 0.1 M y 5 mL de citrato de sodio 0.1 M. Adicionar 4 μL de H_2O_2 al 30 %.

***Nota: La solución se prepara inmediatamente antes de usarla y se mantiene en la oscuridad antes y durante su uso.**

 ***Solución de ácido sulfúrico 2 N.***

Cálculos tomando los siguientes datos del H_2SO_4 :

Peso molecular : 98

Pureza: 95 %

Densidad: 1.84 g/mL

Tomar 56.06 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4). Añadir cuidadosamente a 850 mL de agua bidestilada y aforar a 1000 mL.

 ***Medio RPMI 1640***

Disolver un sobre de medio RPMI 1640 (GIBCO BRL No. Cat. 31800-022) en 800 mL de agua tridestilada y desionizada. Añadir 2 g de bicarbonato de sodio (GIBCO BRL No. Cat. 895-18101P), 2 g de HEPES (Sigma No. Cat. H3375), 10 mL de antibióticos-antimicótico 100X (GIBCO BRL, 15240-062) o sustituirse por:

- Penicilina G sódica (ampolleta de 1,000,000 UI) 1 mL

- Estreptomicina (ampolleta de 1 g) 1 mL
- Anfotericina B 100 X 10 mL

Añadir 16 mL de L-Glutamina 200 mM, 1 mL de β -mercaptoetanol 50 mM estéril, 10 mL de aminoácidos esenciales 100 X (GIBCO), 0.2 g de piruvato de sodio o:

- Piruvato de sodio 100 mM 18.2 mL

Adicionar 1 mL de tilosina 1000 X. Ajustar el pH a 6.8 (con NaOH 1N o con HCl 1N). Aforar a 1000 mL con agua tridestilada y desionizada. Esterilizar por filtración en membrana de 0.22 μ m. Almacenar en frascos estériles de 100 mL y guardar a 4 °C.

Suero Fetal Bovino Descomplementado.

Suero de ternera fetal grado cultivo celular (Hyclone No. Cat. SH30070-03), mantener durante 30 min. a 56 °C en baño María para descomplementarlo. Fraccionar en tubos estériles de 50 mL y almacenarlos a -20°C.

Solución de Criopreservación.

Mezclar 9 partes de suero fetal descomplementado con 1 parte de dimetil-sulfóxico (DMSO, calidad cultivo celular) estéril, v/v. Conservar a 4°C.

Solución de polietilenglicol (PEG 1300-1600 Sigma No. Cat. P7777).

Derretir el reactivo en baño María a 50-60 °C. Diluir al 42-43 % con medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, preparar como lo indica el

fabricante y esterilizar por filtración) sin suero a 45 °C. Ajustar el pH a 7.5-8 hasta que el reactivo, después de 10 min. adquiera una coloración rojizo-violeta. Fraccionar en volúmenes de 0.5 mL. Almacenar a 4 °C (hasta 6 meses).

 ***Medio selectivo con hipoxantina, aminopterina y timina (HAT).***

Agregar 2 mL de HAT 50 X (Sigma N-0262) a 100 mL de RPMI complementado con SFB. Conservar a 4 °C.

 ***Medio selectivo con hipoxantina y timina (HT).***

Agregar 2 mL de HT 50 X (Sigma No. Cat. H-0137) a 100 mL de RPMI complementado con SFB. Conservar a 4 °C.

 ***Azul de tripano.***

Pesar 0.1 g de azul tripano y aforar a 5 mL con agua bidestilada. El día de uso tomar 100 µL de la solución anterior y añadir 1.9 mL de PBS.

 ***Persulfato de Amonio (APS) al 10 %***

Pesar 1 g de persulfato de amonio y disolver en 8 mL de agua desionizada. Aforar a 10 mL. Almacenar a -20 °C.

 ***Solución Buffer de Corrida para geles de Poliacrilamida SDS-PAGE 10X.***

Pesar 30.3 g de Tris Base, 144 g de Glicina y 3.72 g de EDTA, disolver en 800 mL de agua desionizada. Agregar 10 g de SDS y continuar agitando. Aforar a 1000 mL con agua desionizada. Almacenar a temperatura ambiente.

 ***Azul de Coomassie G-250.***

Pesar 0.3 g de azul de coomassie y disolver en 50 mL de metanol. Agregar 100 mL de agua desionizada y 25 g de $(\text{NaH}_4)_2\text{SO}_4$ y mezclar perfectamente. Adicionar 17.46 mL de H_3PO_4 y aforar a 200 mL con agua desionizada. Para usarse mezclar 40 mL de la solución anterior con 10 mL de agua desionizada. Almacenar a temperatura ambiente cubierto de la luz.

 ***Azul de Coomassie R-250.***

Disolver 0.25 g de azul de coomassie R-250 en 125 mL de metanol, adicionar 25 mL de ácido acético. Aforar a 250 mL con agua desionizada. Almacenar a temperatura ambiente cubierto de la luz.

 ***Amortiguador de muestra 6 X (6 % de β -mercaptoetanol + SDS).***

Mezclar 7 mL de Tris 4 X Cl/SDS, pH 6.8, 3 mL de glicerol, 1 g de SDS, 0.6 mL de β -mercaptoetanol y 1.2 mg de azul de bromofenol. Almacenar en congelación.

 ***Solución Tris 4X Cl/SDS (0.5 M Tris, 0.4 % SDS) pH 6.8.***

Pesar 6.05 g de Tris base y disolver en 40 mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 6.8 con HCl 1N y aforar a 100 mL. Agregar 0.4 g de SDS y almacenar en refrigeración.

 ***Solución Tris 4 X Cl/SDS (1.5 M Tris, 0.4 %SDS) pH 8.8.***

Pesar 91 g de Tris base y disolver en 300 mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl 1 N y aforar a 500 mL. Agregar 2 g de SDS y almacenar en refrigeración.

 ***Solución Stock de PMSF [1 M].***

Pesar 0.87 g de PMSF y disolver en 10 ml de DMSO. Almacenar a 4 °C. Para utilizarlo deberán tomarse 0.5 ml para llevarse a concentración final de 1mM.

 ***Solución Buffer de Lisis.***

Pesar 3.94 g de Tris-HCl, 11.1825 g de KCl y 0.681 g de Imidazol. Disolver en 300 mL de agua desionizada. Añadir 250 µL de β-mercaptoetanol, 25 mL de glicerol y 0.5 mL de la solución Stock de PMSF. Ajustar el pH a 8.0 con HCl 1 N. Aforar a 500 mL y filtrar con membrana de 0.45 µ. Almacenar a 4 °C cubierto de la luz.

***Nota: El Imidazol es altamente reactivo a la luz por lo que todo el proceso de preparación del buffer deberá realizarse protegido de la luz.**

 ***Solución Buffer de Lavado 20 mM de Imidazol.***

Pesar 7.88 g de Tris-HCl, 22.365 g de KCl y 1.362 g de Imidazol. Disolver en 500 mL de agua desionizada. Agregar 1 mL de PMSF y ajustar el pH a 8.0 con HCl. Aforar a 1000 mL y filtrar con membrana de 0.45 µ. Almacenar a 4 °C cubierto de la luz.

***Nota: El Imidazol es altamente reactivo a la luz por lo que todo el proceso de preparación del buffer deberá realizarse protegido de la luz.**

✎ Solución Buffer de Lavado 50 mM de Imidazol.

Pesar 7.88 g de Tris-HCl, 22.365 g de KCl y 3.405 g de Imidazol. Disolver en 500 mL de agua desionizada. Agregar 1 mL de PMSF y ajustar el pH a 8.0 con HCl. Aforar a 1000 mL y filtrar con membrana de 0.45 μ . Almacenar a 4 °C cubierto de la luz.

***Nota: El Imidazol es altamente reactivo a la luz por lo que todo el proceso de preparación del buffer deberá realizarse protegido de la luz.**

✎ Solución Buffer de Elución 250 mM de Imidazol

Pesar 7.88 g de Tris-HCl, 22.365 g de KCl y 17.025 g de Imidazol. Disolver en 500 mL de agua desionizada. Ajustar el pH a 8.0 con HCl y aforar a 1000 mL. Filtrar con membrana de 0.45 μ . Almacenar a 4 °C cubierto de la luz.

***Nota: El Imidazol es altamente reactivo a la luz por lo que todo el proceso de preparación del buffer deberá realizarse protegido de la luz.**

✎ Acrilamida-Bisacrilamida 29:1

Pesar 1 g de Bisacrilamida y 29 g de Acrilamida. Disolver en 50 mL de agua desionizada. Aforar a 100 mL y almacenar a temperatura ambiente.

✎ Gel de poliacrilamida al 12 %

Para 3 geles de 1mm

REACTIVO	GEL SEPARADOR 12%	GEL CONCENTRADOR 4 %
Acrilamida-Bisacrilamida 29:1	6 ml	650 μ L

Tris 4 X Cl/SDS pH 8.8	3.75 ml	-----
Tris 4 X Cl/SDS pH 6.8	-----	1.25 mL
H₂O desionizada	5.25 mL	3 mL
APS 10%	50 µL	25 µL
TEMED	10 µL	5 µL

***Nota: Almacenar los geles en refrigeración hidratados con Solución Buffer de corrida.**