



24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

CARACTERIZACION DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-FOSFOTIROSINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE LICENCIATURA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

PRESENTA MICHELLE ANN SORIANO LESH

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS ROSALES LEDEZMA

MEXICO, D. F.

1998

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

269183



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres. . . gracias por guiarme siempre por el buen camino y por su amor.

“la mejor herencia siempre es la educación”

A mi hermano por su confianza en mi.

A Diego por su incondicionable apoyo, amor y comprensión.

Gracias.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Carlos Rosales por el tiempo dedicado a mí durante el trabajo de tesis y por su enseñanza.

A Nancy Mora por su apoyo técnico y su amistad.

A mis compañeros y amigos de la carrera y del laboratorio, en especial a Patricia por todos los gratos momentos.

Índice

1. RESUMEN

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Sistema Inmune

2.1.1 Respuesta Inmune

2.2 Anticuerpos

2.2.1 Genética molecular de las Inmunoglobulinas

2.2.2 Afinidad y Avidéz

2.2.3 Anticuerpos Monoclonales

2.2.4 Inmunización

2.2.5 Producción de Hibridomas

2.2.6 Selección de Hibridomas

2.2.7 Inducción de Ascitis

2.3 Transducción de Señales

2.3.1 Cinasas de Tirosina

2.3.1.1 Receptores Cinasa de Tirosina

2.3.1.2 Rutas de Señalamiento Mediadas por

Receptores Cinasas de Tirosina

2.3.1.3 Cinasas de Tirosina Intracelulares

2.3.2 Regulación de la Transcripción

por Fosforilaciones

3. OBJETIVO

4. PROCEDIMIENTO

5. MATERIAL Y MÉTODOS

6. RESULTADOS

6.1 Isotipo de los anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosinas

6.2 Determinación de condiciones óptimas para Western Blots anti-fosfotirosina

6.3 Purificación de los anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosinas

6.4 Western Blot anti-fosfotirosinas utilizando lisados celulares

6.4.1 Reconocimiento de proteínas fosforiladas en residuos de tirosina

6.4.2 Diferencia en la sensibilidad de los anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosinas

6.4.3 Reconocimiento de diferencias en patrones de fosforilación

6.4.4 Western Blots con el anticuerpo comercial anti-fosfotirosinas PY 20

6.5 Inmuno precipitaciones

2. CONCLUSIÓN

3. DISCUSIÓN

4. BIBLIOGRAFÍA

ILUSTRACIONES

Figura 1. Molécula de Inmunoglobulina (a) IgG y (b) IgM.

Figura 2. Organización de los genes humanos de Ig.

Figura 3. Respuesta inmune contra complejos hapteno-proteína acarreadora.

Figura 4. Bioquímica de la selección de hibridomas.

Figura 5. ELISA

Figura 6. Western Blot

Figura 7. Western Blot anti-fosfotirosinas.

Figura 8. Western Blot anti-fosfotirosinas con la disolución amortiguadora de bloqueo 5% leche en PBS.

Figura 9. Gel de poliacrilamida para ovalbúmina.

Figura 10. Contenido y pureza de la elución de la muestra pasada por cromatografía de afinidad (proteína G).

Figura 11. Western Blot anti-fosfotirosinas de lisados celulares de fibroblastos NIH3T3 estimuladas con PMA en presencia o ausencia de Tirfostina.

Figura 12. Reconocimiento específico de fosfotirosinas.

Figura 13. Western Blots anti-fosfotirosinas con los seis anticuerpos purificados.

Figura 14. Western Blot anti-fosfotirosinas de lisados celulares de macrófagos J774 estimulados y no estimulados con PMA.

Figura 15. Western Blot anti-fosfotirosinas con el anticuerpo comercial PY 20

Figura 16. Western Blot anti-fosfotirosinas con el anticuerpo comercial PY 20

Figura 17. Western Blot de las inmunoprecipitaciones con los anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina.

Figura 18. Inmunoprecipitación con el anticuerpo comercial anti-fosfotirosinas PY 20.

TABLAS

Tabla 1. Líneas celulares murinas de mielomas para fusión

Tabla 2. Proteínas efectoras de algunos receptores cinasas de tirosina

Tabla 3. Concentración de los Anticuerpos Monoclonales anti-fosfotirosina purificados

ABREVIATURAS

AMP.- Adenosina 5'-monofosfato

AMP_C.- Adenosina monofosfato cíclica

APS.- Amonio Persulfato

BSA.- Albúmina de suero de bovino.

DAG.- Diacilglicerol

DMEM.- Medio mínimo esencial de Dulbecco

EGF.- Factor de crecimiento epidermal

ELISA.- Enzyme-linked immunosorbent assay *

FGF.- Factor de crecimiento de fibroblastos

GMP.- Guanosina 5'-monofosfato; guanilato

GTP.- Guanosina 5'-trifosfato

HAT.- Medio selectivo hipoxantina, aminopterina, timidina.

HRP.- Horseradish peroxidase *

HGF.- Factor de crecimiento de hepatocitos

HGPRT.- Hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa

IGF-1. - Factor de crecimiento parecido a la insulina tipo 1

KLH.- Keyhole limpet hemacianine *

M-CSF.- Factor estimulador de colonias de macrófagos

MHC.- Complejo mayor de histocompatibilidad

NGF.- Factor de crecimiento de nervios

PBS.- Phosohate Buffer Saline *

PEG.- Polietilen glicol

PDGF.- Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PI3-K.- Cinasa de inositol trifosfato

PKC.- Proteína cinasa C

PLC γ .- Fosfolipasa C- γ

PMA.- 13-acetato forbol 12-miristato

RIA.- Radioinmuno ensayo

SDS-PAGE.- Soduim Dodecil sulfato- poliacrilamide gel electroforesis *

TBS.- Tris buffer saline *

TCR.- Receptor de célula T

TK.- Timidina cinasa

VEGF.- Factor crecimiento el endotelio vascular

* Términos en Inglés se utilizan sin traducción.

1. RESUMEN

El mecanismo por el cual algunos receptores celulares al interactuar con sus ligandos mandan señales al interior de la célula incluye cambios en el estado de fosforilación en residuos de tirosina en varias proteínas. Los receptores que utilizan este tipo de señalamiento se dividen en dos grupos: los receptores que son cinasas de tirosina y los receptores acoplados a cinasas de tirosina. Ejemplo de los primeros son receptores para factores de crecimiento y diferenciación (FGF, IGF-1, NGF, EGF Y M-CSF), mientras que otros receptores que no tienen dominio catalítico desencadenan cascadas bioquímicas que comienzan con la activación de cinasas de tirosina. Ejemplo de estos últimos son los receptores para citocinas que regulan la proliferación y la diferenciación en células del sistema hematopoyético, receptores para antígeno de linfocitos B y T, receptores Fc que reconocen al anticuerpo, e integrinas cuyos ligandos son las proteínas de la matriz extracelular. Una manera de estudiar las proteínas que participan en el mecanismo de transducción de señales es mediante la identificación de fosforilaciones en los residuos de tirosina. Existe toda una variedad de metodologías bioquímicas modernas que permiten identificar los cambios bioquímicos en las proteínas involucradas en la rápida activación de cascadas de señalamiento intracelular y que nos permiten estudiar estos procesos. Los anticuerpos monoclonales son herramientas importantes en este tipo de metodologías. Los anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina comerciales como el 4G10 y el PY 20 son muy costosos o presentan problemas de especificidad y sensibilidad en su detección, por lo cual se decidió fabricar nuevos anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina en el laboratorio.

En el laboratorio se obtuvieron hibridomas de la fusión de las células productoras de anticuerpos de animales previamente inmunizados, con células de mielomas. De estos

hibridomas se seleccionaron seis clonas que secretaban anticuerpos anti-fosfotirosina. Se purificaron y se determinaron los isotipos de los anticuerpos producidos por las clonas escogidas. La especificidad de los anticuerpos se probó empleando los ensayos de Western Blot con lisados totales de una línea celular de macrófagos (J774) y una línea celular de fibroblastos (NIH3T3). Todos los anticuerpos probados reconocen proteínas fosforiladas en tirosinas. Asimismo, los anticuerpos son capaces de distinguir las diferencias en los patrones de fosforilación en los extractos de células estimuladas y no estimuladas. En los Western Blots, uno de los anticuerpos monoclonales en particular da una señal clara y sin ruido de fondo. Con cuatro de los mejores anticuerpos se llevaron a cabo inmunoprecipitaciones de extractos celulares, encontrando que todos ellos son capaces de inmunoprecipitar las proteínas fosforiladas en tirosina en disolución.

En conclusión, los nuevos anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina son específicos y sensibles para la detección de proteínas fosforiladas en tirosinas por medio de Western Blots e inmunoprecipitaciones. Uno en particular da resultados superiores al anticuerpo comercial PY 20 probado en el laboratorio.

2. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune está expuesto constantemente a una enorme cantidad y variedad de antígenos. Una de las características principales del sistema inmune es su capacidad de sintetizar un repertorio extenso de distintos anticuerpos y receptores de superficie celular para muchos antígenos. La unión de los anticuerpos o de los receptores de células T a moléculas extrañas provee la especificidad molecular de la respuesta inmune (Harlow et al, 1988). Cuando un ligando interacciona con su receptor, se desencadenan eventos bioquímicos en el interior de la célula provocando cambios en ésta como una respuesta al estímulo. Los inmunólogos han desarrollado diferentes técnicas para inducir, medir y caracterizar la respuesta inmune y para alterar el sistema inmune a través de manipulaciones moleculares, celulares y genéticas. Los métodos inmunológicos toman ventaja de la especificidad de los anticuerpos, siendo muy útil tener una clona de células en cultivo que produzcan un tipo particular de anticuerpo constantemente. Los anticuerpos monoclonales sirven como herramientas valiosas para identificar modificaciones químicas en las proteínas involucradas en el mecanismo de señalamiento intracelular. La identificación de estas proteínas involucradas en la cascada bioquímica nos da información valiosa para entender el comportamiento celular bajo la influencia de un ligando específico y de esta manera poder manipular y estimular ciertas respuestas.

2.1. SISTEMA INMUNE

Los organismos vertebrados contienen un sistema elaborado que funciona como defensa contra la infección de algún microorganismo como virus, bacteria, hongo, parásito o contra los productos tóxicos de éstos. Este sistema, conocido como sistema inmune, ha diseñado varios mecanismos para localizar y erradicar los agentes extraños. El mecanismo de defensa se puede dividir funcionalmente en dos clases: el tipo de respuesta innata o natural que no discrimina al agente extraño patógeno y que actúa en primera línea de defensa y la inmunidad específica o adaptativa, que actúa cuando las primeras defensas se superan y su reconocimiento es mejorado por la infección repetida (Roitt et al, 1986). Debido a que la respuesta inmune puede ser muy agresiva, es necesario que las células que la constituyen sean capaces de distinguir a los agentes extraños de las moléculas propias. El reconocimiento específico se lleva a cabo por receptores y anticuerpos. La especificidad llega a tal grado que los receptores y los anticuerpos son capaces de diferenciar un amino ácido entre proteínas similares. Además, la respuesta inmune es regulada extensamente para que no se exceda o se limite su efecto. Alteraciones en cualquiera de los procesos regulados ocasionan patologías.

Las células que proveen la especificidad molecular de la respuesta inmune son los linfocitos. Estas células tienen un núcleo grande redondo y poco citoplasma. Los linfocitos son formados en la médula ósea, y de ahí migran a tejidos especializados del sistema inmune como son los ganglios linfáticos, el timo y el bazo. Durante las fases estimuladora y efectora de la respuesta inmune las células secretan productos proteicos con funciones similares a las hormonas llamados citocinas (Abbas et al, 1997). Existe una gran variedad de citocinas con mecanismos de acción muy diversos, son secretadas por múltiples tipos celulares y su acción

se lleva a cabo en varios tipos celulares (pleiotropismo) ya sea de forma autócrina, parácrina o endócrina. Cuando las citocinas son producidas por los monocitos se les denomina monocinas, mientras que las citocinas liberadas por linfocitos se llaman linfocinas.

2.1.1. RESPUESTA INMUNE

Las células que participan en los mecanismos de defensa natural, como los macrófagos y los neutrófilos tienen receptores en su superficie que les permite reconocer constituyentes comunes en la superficie de las bacterias y otros agentes extraños. La unión a los ligandos provoca que endociten las partículas y también induce a la secreción de citocinas y otros mediadores químicos por los macrófagos. Los linfocitos vírgenes (que nunca han sido expuestos al antígeno) tienen receptores en su superficie con una sola especificidad, al contrario de los macrófagos o neutrófilos. La respuesta inmune específica se puede clasificar en dos tipos esenciales, la inmunidad humoral mediada por anticuerpos secretados por los linfocitos B y la inmunidad celular mediada por linfocitos T. El control de la respuesta de los anticuerpos es regulada por la diferenciación de los linfocitos B a las células plasmáticas o células de memoria. Esta diferenciación es mediada por interacciones de su receptor con su ligando, interacciones célula-célula con macrófagos, linfocitos T y los precursores de células B y por las citocinas liberadas por los distintos leucocitos (De Franco, 1991). Se requiere de un contacto entre el linfocito B y la célula T para la regulación de la producción del anticuerpo. La unión de ambas células ocasiona que la célula B sintetice un receptor para el factor de crecimiento IL-4, citocina sintetizada por los linfocitos T. Posterior a la unión con IL-4, la célula B empieza a sintetizar el receptor para el factor de diferenciación IL-5, el cual también se produce por las células T ayudadoras

(Harlow et al, 1988). La estimulación por estas linfocinas ocasiona que la célula B proliferare y se diferencie. La célula B madura tiene la capacidad de secretar anticuerpos específicos contra el antígeno.

Los anticuerpos (IgM) secretados se pueden detectar en suero alrededor de siete días después de la exposición al antígeno, con un pico máximo a los 10 días que se mantiene por un periodo corto de aproximadamente 8 días dependiendo del antígeno. Cuando el sistema es expuesto una vez más por el antígeno aparece la clase de inmunoglobulinas IgG, el número de células B que presentan el anticuerpo en su superficie incrementa exponencialmente y los niveles de anticuerpo que se detectan en el suero también aumentan y persisten por 2 ó 3 semanas. La cantidad y la afinidad de los anticuerpos secretados aumenta con exposiciones repetitivas del mismo antígeno, fenómeno que se conoce como maduración de la respuesta inmune.

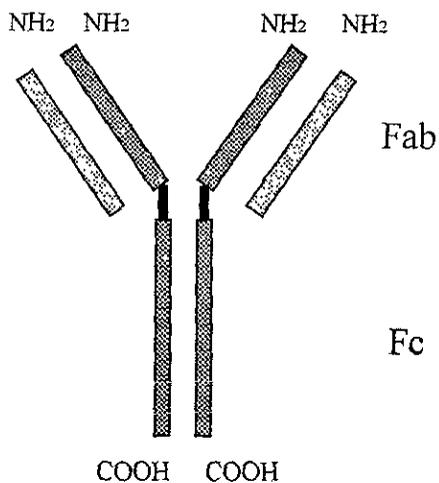
2.2. ANTICUERPOS

En 1890 Emil von Behring y Shibasaburo Kitasato descubrieron que en el suero de individuos infectados existían “substancias “ que se adherían específicamente al patógeno. Estas sustancias posteriormente fueron nombradas anticuerpos. Elvin Kabat demostró que la mayoría de los anticuerpos se encontraban en el tercer grupo de migración electroforética más rápido de las globulinas del suero, llamado gama globulinas, por lo cual se les llama también inmunoglobulinas (Abbas et al, 1997). Las inmunoglobulinas están formadas de cuatro cadenas polipeptídicas: dos cadenas pesadas (55 kDa) y dos ligeras (25 kDa) unidas entre sí por puentes de disulfuro. Las cadenas ligeras existen en dos clases denominadas κ y λ . Existen cinco clases de inmunoglobulinas llamadas IgA, IgD, IgE, IgG y IgM, de las cuales las inmunoglobulinas IgA e IgG cuentan con los subtipos IgA1 e IgA2, e IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 respectivamente (Abbas et al, 1997).

La molécula se divide en dos porciones: la parte Fab, la cual está relacionada con la fijación del antígeno; y la parte Fc, parte efectora de la molécula (Figura 1). Los sitios de fijación del antígeno se encuentran en las porciones amino terminal de la región variable de ambas cadenas. Dos clases de inmunoglobulinas contienen un componente polipeptídico adicional llamado cadena J. En las IgM, cinco de las unidades básicas se unen alrededor de la cadena J formando un pentámero y en IgA forman dímeros y trímeros alrededor de la cadena J y el componente secretor (polipéptido que proviene de las células epiteliales).

Figura 1. - Molécula de Inmunoglobulina (a) IgG e (b) IgM.

(a)



(b)

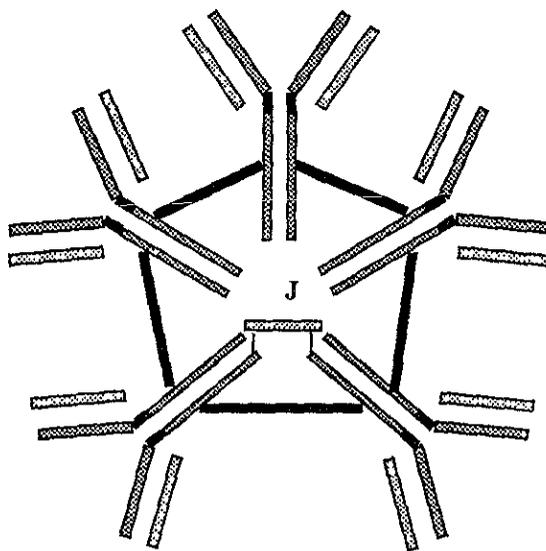


Figura 1. - (a) La molécula de inmunoglobulina está formada de dos cadenas polipeptídicas pesadas (negra) y dos ligeras (gris). Existen puentes de disulfuro (S-S) entre las cadenas pesadas y ligeras y entre las dos pesadas. Los extremos amino terminal de ambas cadenas se encuentran las regiones variables, las cuales son responsables de la interacción con el antígeno. (b) La molécula de IgM consta de cinco subunidades de inmunoglobulina unidas por puentes de disulfuro. La cadena J se requiere para el proceso de polimerización.

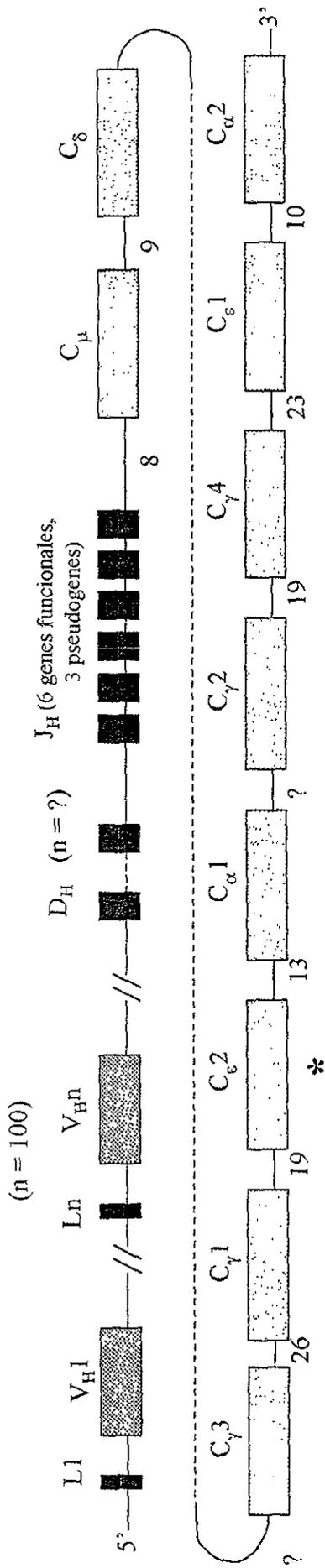
2.2.1. GENÉTICA MOLECULAR DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Cada molécula de anticuerpo tiene una gran especificidad para su ligando. La especificidad de un anticuerpo se define como la capacidad de éste de discriminar entre diferentes ligandos. Esta especificidad se determina genéticamente (Abbas et al, 1997). Las cadenas pesadas (H) y las ligeras (L) que conforman el anticuerpo contienen dominios constantes (C) y variables (V) (Figura 2). El exón que codifica para la porción variable de la cadena pesada (V_H) es un producto de tres genes; V, D y J. Uno de varios cientos de genes V se combina con uno de los 12 segmentos D y uno de los 6 segmentos J, para producir el gen funcional VDJ en células B. El segmento genético D codifica para la porción carboxilo terminal del dominio variable. El dominio constante de la cadena pesada (C_H) se deriva de los múltiples exones de C que confieren el isotipo de la inmunoglobulina ($C_{\alpha 1}$, $C_{\alpha 2}$, C_{δ} , C_{ϵ} , $C_{\gamma 1}$, $C_{\gamma 2}$, $C_{\gamma 3}$, $C_{\gamma 4}$ y C_{μ}).

Existe únicamente un segmento genético que codifica para el dominio constante de la cadena ligera κ , mientras que el locus de la cadena ligera λ contiene 6 diferentes regiones constantes. Cada gen de la región C tiene 3 a 4 exones. El exón de la porción variable de las cadenas ligeras está formado por una combinación de uno de los cientos de segmentos V y uno de los 5 ó 6 segmentos J de la cadena κ y λ respectivamente. La región J codifica para la porción carboxilo terminal del dominio variable.

Dos factores que provocan una mayor variabilidad son la mutación somática y que en los segmentos J hay veces que se añaden al azar nucleótidos no codificados.

Locus de la cadena H (cromosoma 14)



Locus de la cadena κ (cromosoma 2)



Locus de la cadena λ (cromosoma 22)

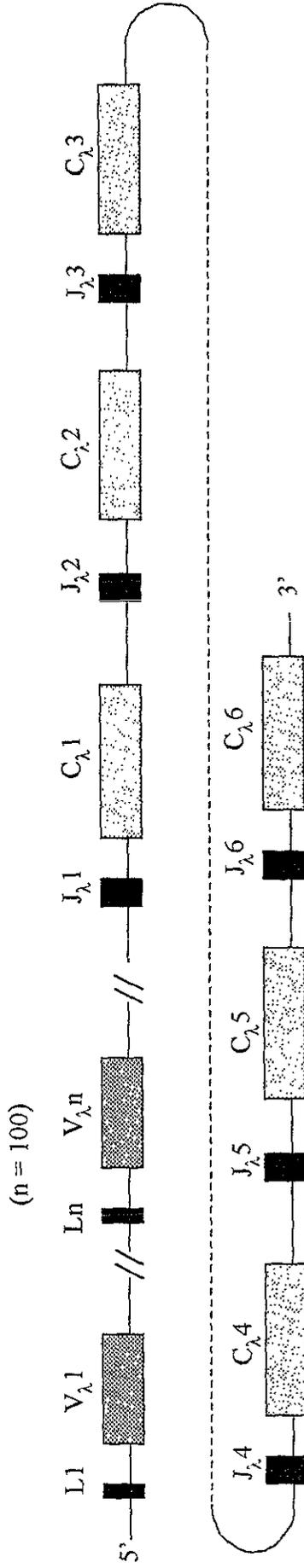


Figura 2.- Organización de los genes humanos de Ig (no a escala). Los números en *italico* representan las distancias de segmentos de DNA en kilobases. (*) Indica un pseudogen no funcional. Cada gen C_H mostrado en la figura esta compuesto de un conjunto de exones. Los segmentos se indican de la siguiente manera: L, líder (leader); V, variable; D, diversidad; J, unión (joining); C, constante.

2.2.2. AFINIDAD Y AVIDEZ

La fuerza de unión entre un antígeno y un anticuerpo monovalentes se refiere como afinidad. La afinidad de un anticuerpo está influenciada por varios factores como la estabilidad de la unión, el grado de encaje estereoquímico entre el sitio de unión y el epítipo y el tamaño de la región donde actúan las fuerzas de atracción y repulsión. La medida de la afinidad se determina por métodos termodinámicos utilizando la constante de equilibrio (K). La interacción entre el antígeno y el anticuerpo es una reacción química muy rápida y no covalente, lo que le permite que sea reversible.

La avidéz describe la tendencia de los anticuerpos en conjunto para combinarse con el antígeno. La avidéz está influenciada por la afinidad, la valencia del antígeno y anticuerpo, y la composición de los anticuerpos.

2.2.3. ANTICUERPOS MONOCLONALES

La sangre contiene diversas clonas de linfocitos B, cada una de las cuales secreta un solo tipo de anticuerpo (monoclonal) específico de un determinante antigénico (epítipo). El suero contiene distintas clonas de linfocitos B, por lo que es una fuente de anticuerpos policlonales. La utilización del suero dificulta la sensibilidad en algunas técnicas inmunoquímicas ya que además de contener una mezcla de diferentes anticuerpos que podrían interferir con la sensibilidad en la detección de algún antígeno en particular, contiene factores que pueden afectar inespecíficamente a células que se estén utilizando en algún ensayo.

Los linfocitos B no son capaces de sobrevivir por mucho tiempo en cultivo, por lo cual es difícil tener una fuente de anticuerpos específicos constantes *in vitro*. Estas

dificultades llevaron a la conclusión que para el análisis antigénico sería conveniente contar con soluciones de una forma única de cada anticuerpo, derivado de una sola clona de células B (anticuerpos monoclonales) que se pudiera mantener en cultivo por periodos largos. La solución a este problema fue posible gracias al desarrollo de la tecnología para fusionar células y formar heterocariontes estables, una herramienta que había sido desarrollada en el campo de la citogenética. El principio de la fusión celular radica en recuperar células híbridas que contengan la información genética de interés incorporada al genoma de la célula que sirve de acarreadora. En principio esta tecnología permitiría recuperar los cromosomas responsables de la síntesis de los anticuerpos.

En 1975 Georges Köhler y Cesar Milstein desarrollaron esta técnica para el crecimiento de células híbridas en cultivo que secretaran anticuerpos de especificidad definida (Köhler y Milstein, 1975). Los hibridomas (células fusionadas) se obtienen por la fusión de células B secretoras de anticuerpo y mielomas. Los mielomas son células tumorales de linfocitos B que secretan anticuerpos de una especificidad desconocida y que crecen *in vitro* indefinidamente. Actualmente para las fusiones se utilizan líneas celulares de mielomas que son incapaces de secretar anticuerpos. De esa manera el hibridoma que se obtiene sólo puede secretar un tipo de inmunoglobulina que deriva de la célula B fusionada (Köhler et al, 1976). Las líneas celulares de mielomas más utilizadas son X63/Ag8.653 y Sp2/O (Tabla 1).

La producción de hibridomas es un proceso que tiene varias condiciones para que funcione, además de ser largo y costoso, por lo cual es necesario tener los tipos celulares necesarios para la fusión, definir las condiciones de fusión eficientes, un sistema para seleccionar las células fusionadas de las no fusionadas y un método para identificar la clona

Tabla 1. - Líneas celulares murinas de mielomas para fusión

Línea celular	Expresión de Ig	Derivada de	Referencia
P3-X63/Ag8	gamma, kappa	MOPC-21	Köhler et al, 1975
NSI/1.Ag4.1	kappa (no secretada)	MOPC-21	Köhler et al, 1976
X63/Ag8.653	ninguna	X63-Ag8	Kearney et al, 1979
Sp2/O	ninguna	hibridoma Sp2	Shulman et al, 1978
NSO/U	ninguna	HSI/1.Ag4.1	Kearney et al, 1979
FO	ninguna	Clona de Sp2/O	de St. Groth et al, 1980
S194/5XXO Bul	ninguna	Balb/c	Trowbridge, 1978

de hibridoma específica que se desea. Cada hibridoma secreta solamente un tipo de anticuerpo. Al clonar los hibridomas, se obtienen las células que son todas idénticas (clona) y por lo tanto produce exclusivamente un tipo de anticuerpo (monoclonal). Debido a su origen monoclonal, a éstos se les llama anticuerpos monoclonales (Galfre et al, 1981) Los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas pueden ser utilizados para aislar o reconocer antígenos específicos.

La producción se puede dividir en tres etapas: la inmunización del ratón, la producción de hibridoma y finalmente el proceso de selección del hibridoma estable y que secreta anticuerpos específicos contra el antígeno deseado.

2.2.4. INMUNIZACIÓN

La inmunización es la inducción de una respuesta inmune deliberada, por ejemplo, al inyectar el antígeno en un animal. Para que el animal produzca anticuerpos específicos contra un antígeno es necesario que el antígeno pueda provocar una respuesta humoral. Esto se determina por la estructura química del compuesto, es decir si el compuesto está en su forma más reactiva puede provocar una respuesta inmune favorable. Existen compuestos que ayudan a aumentar la respuesta inmune ocasionada por un antígeno. Estos estimuladores no específicos se conocen como adyuvantes, que actúan promoviendo una presentación más eficiente del antígeno a las células del sistema inmune y ocasionando también un aumento en la concentración de linfocinas. El adyuvante de Freund es el más comúnmente utilizado (Freund, 1956).

Compuestos pequeños (haptenos) por sí solos no provocan una respuesta inmune, sino que requieren estar acoplados covalentemente a una proteína acarreadora o una cadena polipeptídica (Erlanger, 1980; Roitt et al, 1996). Las proteínas acarreadoras más utilizadas son albúmina de suero de bovino (BSA), y ovalbúmina (huevo), y la hemocianina del artrópodo *Megathura crenulata* denominada KLH (keyhole limpet hemocyanine). Estas proteínas tienen la característica de ser proteínas solubles y muy lejanas filogenéticamente a los animales que se utilizan para inmunizar (ratones, ratas o conejos), por lo cual son proteínas muy antigénicas.

Algunos haptenos se pueden acoplar a cualquiera de las proteínas acarreadoras mencionadas por medio de glutaraldehído. El glutaraldehído funciona como un puente entre un grupo amino del hapteno y un grupo amino de la proteína acarreadora (Avrameas, 1969; Korn et al, 1971).

Los animales se inyectan con la preparación del antígeno por diferentes vías (intraperitoneal, intramuscular y subcutánea). Tiempo después se va monitoreando la cantidad de anticuerpo específico producido, que se encuentra en el suero del animal.

Existen varias interacciones celulares involucradas en la producción de anticuerpos anti-hapteno después de la inmunización con un complejo hapteno-proteína acarreadora (Figura 3). Por una parte las células presentadoras de antígeno, como los macrófagos, endocitan inespecíficamente y procesan el complejo, formando péptidos de la proteína acarreadora. Cada uno de estos péptidos se presenta en la superficie celular acoplado al antígeno MHC clase II para ser reconocido por las células T ayudadoras, que al reconocerlos se activan y proliferan. Por otra parte (proceso en paralelo) los linfocitos B reconocen el complejo hapteno-proteína acarreadora por medio de su receptor (inmunoglobulina) específico contra el hapteno. El linfocito B como célula presentadora de antígeno también endocita y degrada el complejo, posteriormente expresando péptidos de la proteína acarreadora junto con antígenos MHC clase II. Los linfocitos T ayudadores activados reconocen el complejo péptido-MHC expresado por las células B y mandan señales de activación a las células B. Con la influencia de interacciones linfocito B-linfocito T y la unión de factores liberados por los linfocitos T, las células B proliferan y se diferencian a células maduras que son capaces de secretar anticuerpos anti-hapteno.

Figura 3. Respuesta inmune contra complejos hapteno-proteína acarreadora.

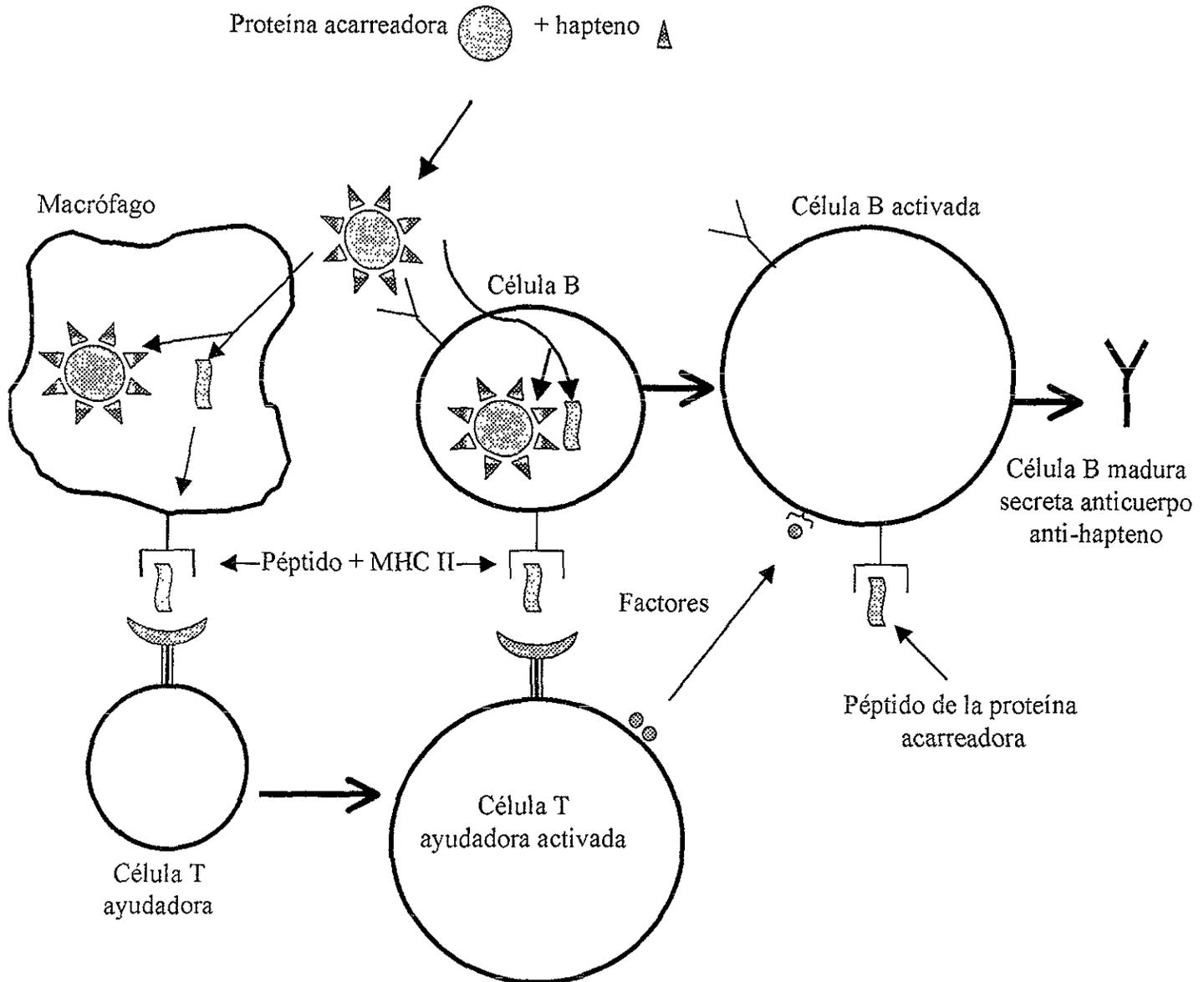


Figura 3. Respuesta inmune contra complejos hapteno-proteína acarreadora. El complejo proteína acarreadora-hapteno son reconocidos y endocitados inespecíficamente por macrófagos, y específicamente por células B (por medio de su receptor en la superficie de la membrana específico contra el hapteno). Las dos células procesan el antígeno y presentan péptidos de la proteína acarreadora junto con antígeno MHC clase II en la superficie celular. Posteriormente las células T ayudadoras reconocen este complejo (MHC-péptido) y se activan. Las células T activadas que reconocen el complejo en células B liberan factores estimuladores para que la célula B pueda proliferar y diferenciarse a célula capaz de secretar anticuerpos. Los anticuerpos secretados por la célula B madura van a ser específicos contra el hapteno.

2.2.5. PRODUCCIÓN DE HIBRIDOMAS

Cuando la concentración de anticuerpo detectada en el suero de los animales inmunizados es suficientemente alta, éstos se sacrifican. Los animales se disectan y se obtiene el bazo. En el bazo se encuentran macrófagos, células dendríticas y linfocitos B y T maduros. Dentro de la población de linfocitos B que se extrajeron del bazo se encuentran clonas que secretan anticuerpos específicos contra el antígeno inyectado. Todas las células extraídas del bazo son utilizadas para la fusión con los mielomas.

Las células B no son viables por mucho tiempo en cultivos celulares, mientras que los mielomas tienen la característica de ser inmortales. Para seleccionar las células fusionadas (células B-mieloma) de las células no fusionadas (mielomas), las células se crecen en un medio selectivo denominado HAT, por tener hipoxantina, aminopterina (o asazerina) y timidina (Littlefield, 1964) (Figura 4). Los mielomas utilizados para la fusión son líneas celulares deficientes en la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT) o en la enzima timidina cinasa (TK). La ruta de salvamento de las purinas adenina y guanina consiste de una reacción catalizada por la enzima HGPRT donde la guanina y la hipoxantina (producto desaminado de la base adenina) pasan a ser GMP y AMP respectivamente (Littlefield, 1964) (Figura 4). Los mielomas al carecer de HGPRT mueren en el medio HAT.

La deficiencia de los mielomas se logra por la selección de estas células con 8-azaguanina, que es un análogo de la base guanina. Por ser análogo de esta base, también es sustrato de la enzima HGPRT y se transforman en nucleótidos no funcionales. La incorporación de éstos en DNA provoca la muerte de la célula. Por lo tanto en presencia de 8-azaguanina, sólo las células deficientes de HGPRT pueden crecer, permitiendo la selección

positiva de líneas de mielomas genéticamente deficientes en esta enzima. De la misma manera se pueden aislar líneas de mielomas genéticamente deficientes en la ruta de salvamento de la timidina. En este caso se emplea al mutágeno bromodeoxiuridina que se metaboliza por la enzima timidina cinasa (TK) formando un producto letal para las células cuando se incorpora en el DNA, lo que permite la selección positiva de mielomas con deficiencia en la actividad de la enzima TK.

Los fármacos quimioterapéuticos como aminopterina, metotrexato o azaserina inhiben la síntesis de novo de nucleótidos. Una célula normal puede utilizar en estas condiciones la vía alterna de salvamento y sintetizar las purinas que requiere. Esto lo puede hacer si es que el medio de cultivo está suplementado con hipoxantina y timidina (medio HAT). Los mielomas que no se fusionaron no sobrevivirán en medio de cultivo suplementado con alguno de los fármacos quimioterapéuticos, ya que no tienen el gen HGPRT o TK, mientras que los híbridos de la fusión tendrán la capacidad de sobrevivir porque tienen los genes HGPRT y TK para sintetizar los nucleótidos de purina por la ruta de salvamento (Figura 4)

Köhler y Milstein fusionaron mielomas defectuosos en HGPRT con células B normales de animales inmunizados, utilizando el virus Sendai, que expresa una proteína que fusiona a las células. Actualmente se utiliza polietilén glicol (PEG) para la fusión (Gefter et al, 1977). Su uso fue demostrado por primera vez por Pontecorvo (Pontecorvo, 1975).

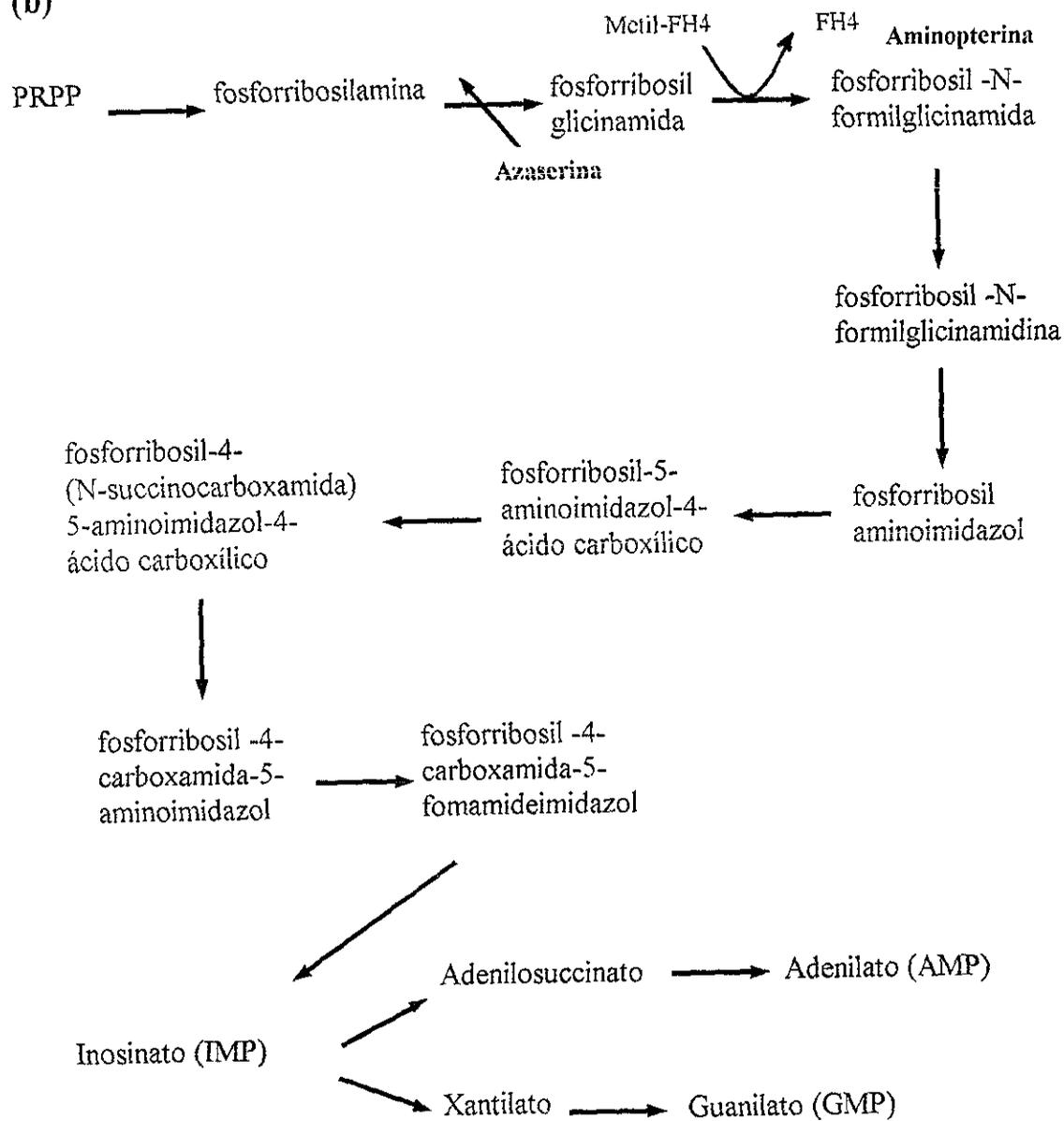
La fusión de las membranas de ambas células produce células multinucleadas. Durante la mitosis de estas células, la segregación de cromosomas no es homogénea provocando células hijas que difieren en su complemento cromosómico generando pérdida y/o ganancia de cromosomas además de haber ruptura de los mismos, que pueden perderse y en ocasiones también incorporarse a otros lados del genoma. En esta fase de selección algunas de las

Figura 4. - Bioquímica del medio HAT para la selección de hibridomas.

(a)



(b)



(c)

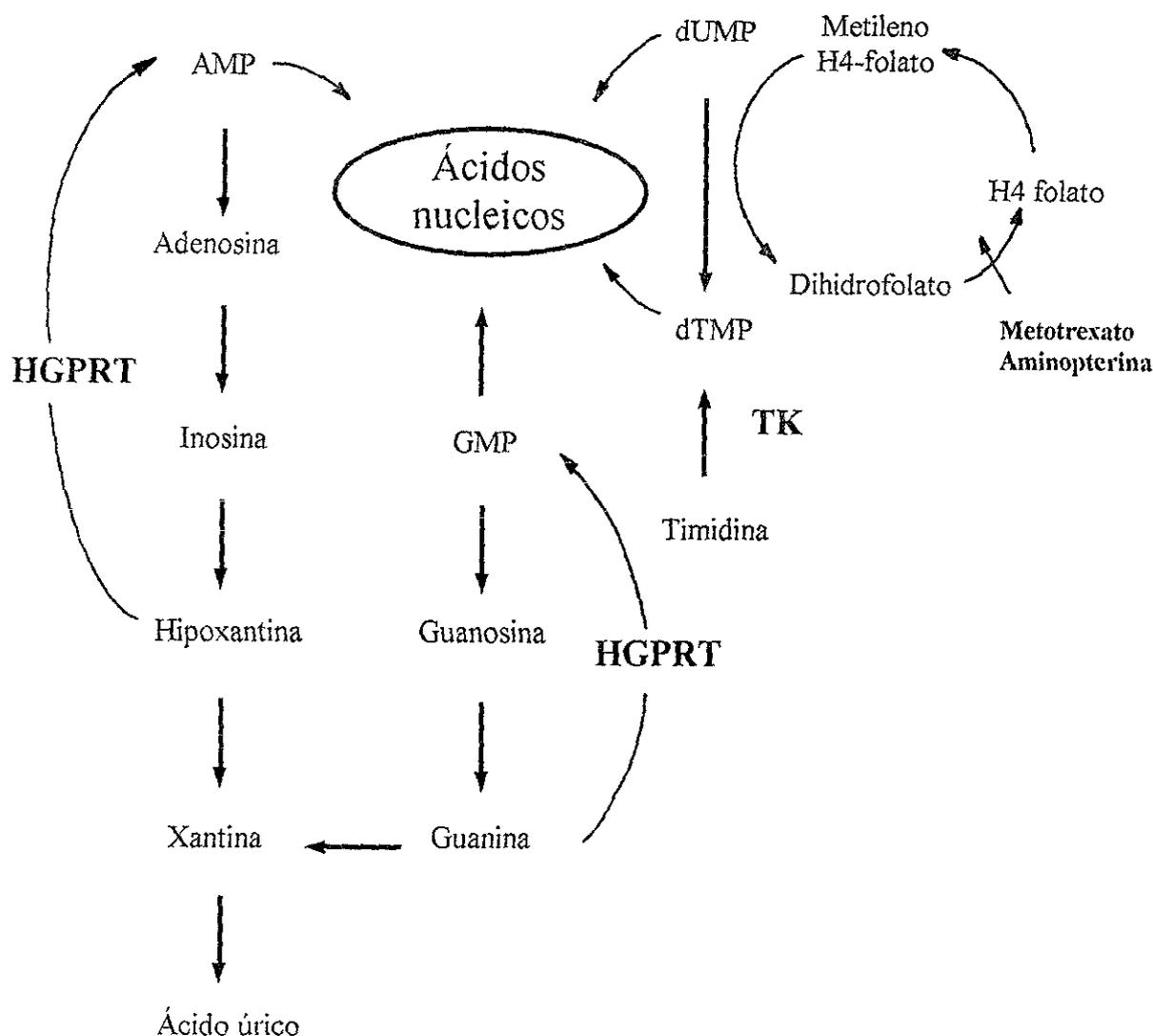


Figura 4. – (a) Durante la vía de las pentosas glucosa 6-fosfato junto con dos aceptores de electrones (NADP^+) y agua pasa a ser ribosa 5-fosfato. 5-fosforribosil 1-pirofosfato (PRPP) se sintetiza de ribosa 5-fosfato por medio de una reacción que requiere ATP. (b) PRPP inicia el anabolismo de nucleótidos purinas. Inositol (IMP) es el primer intermediario del anillo de purinas. De PRPP a IMP se llevan a cabo con 10 reacciones enzimáticas donde se utiliza glutamina y aspartato como fuentes de grupo amino y glicina como un precursor importante. IMP se utiliza para formar AMP o GMP. (c) Las bases AMP, GMP, dUMP y dTMP son los componentes necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos. Las enzimas (hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa) HGPRT y (timidina cinasa) TK son necesarias para la ruta de salvamento de los nucleótidos AMP y GMP y TMP respectivamente. En la figura se muestra a que nivel actúan los fármacos: aminopterina, azaserina y metotrexato inhiben esta vía de síntesis.

células pierden los genes que codifican para las inmunoglobulinas, mientras que otras pierden los genes de resistencia a drogas que son necesarios en el proceso de selección en un medio de cultivo. Por todas estas razones la frecuencia con la que se recupera una clona genéticamente estable capaz de sintetizar anticuerpos es muy baja. El índice de híbridos viables después de la fusión y del proceso de selección es de una célula de cada 10^5 células.

2.2.6. SELECCIÓN DE HIBRIDOMAS

Para seleccionar los hibridomas que secretan el anticuerpo de interés de las demás células fusionadas, se llevan a cabo radioinmunoensayos (RIA) o ensayos de ELISA (Engvall et al, 1972). En los ensayos de ELISA (ver material y métodos) se utilizan anticuerpos que están acoplados a enzimas para facilitar su detección. Las enzimas que normalmente se utilizan son peroxidasa (HRP) (Tijssen et al, 1984) y fosfatasa alcalina (Avrameas, 1972). Al añadirse el sustrato de la enzima se obtiene una señal positiva en los pozos donde hay anticuerpos específicos contra el antígeno. En los pozos positivos podría haber varias clonas de hibridomas, por lo cual se tienen que clonar por dilución limitante para asegurar la monoclonalidad.

2.2.7. INDUCCIÓN DE ASCITIS

Los hibridomas se pueden crecer en volúmenes grandes de cultivo, o bien como tumores dentro de ratones histocompatibles para producir grandes cantidades de líquido de ascitis con anticuerpo monoclonal. El líquido de ascitis es un fluido intraperitoneal ocasionado por un tumor en esa área afectada. Al inyectar los hibridomas en el peritoneo del ratón las células crecen a altas densidades y continúan secretando el anticuerpo de interés

en el líquido de ascitis formado. Las concentraciones del anticuerpo en el líquido de ascitis varían entre 1 y 10 mg/ml. De esta manera al extraer el ascitis de 1 a 2 semanas después de la inyección de la clona de hibridomas, tendrá una concentración elevada del anticuerpo.

Los animales se inyectan con 0.5 ml de Pristano (ácido 2,6,10,14-tetrametildecanoico) (Potter, 1972; Hoogeraad et al, 1986) para inducir inflamación una semana o una semana y media antes de inyectarles los hibridomas (Harlow et al, 1988). El pristano ocasiona que el ratón responda secretando nutrientes y reclutando monocitos y linfocitos al peritoneo. Esto crea un buen ambiente para el crecimiento del hibridoma. Los hibridomas en cultivo que se van a inyectar deben de estar en la fase logarítmica de crecimiento, y se inyectan aproximadamente 1×10^6 células por ratón.

Los anticuerpos en el líquido de ascitis se pueden purificar por cromatografía de afinidad con proteína G-sefarosa o proteína A-sefarosa. La proteína G es una proteína de 30 kDa que proviene de la pared celular de la cepa G148 de la bacteria *Staphylococcus aureus*. La proteína G tiene la capacidad de reconocer a todos los subtipos de inmunoglobulinas IgG por su parte Fc con gran afinidad (Björck et al, 1984; Åkerström et al, 1985). La proteína A es una proteína de 42kDa que está unida covalentemente a la pared celular de las cepas de *Staphylococcus aureus*. La proteína A se une a algunas subclases de inmunoglobulinas IgG por medio de su porción Fc con alta afinidad, aunque también se une a IgA e IgM (Ely et al, 1978; Goding, 1978).

2.3. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

Las respuestas dadas por las células en general de un organismo multicelular con respecto a su microambiente requieren de una red de comunicación que les permita trabajar en beneficio del organismo completo. Para ello las células cuentan con un sistema elaborado de proteínas que les permite responder a señales provenientes del medio externo (Nishizuka, 1992; Rosales et al, 1995). Estas señales determinan el comportamiento celular, es decir, su posición, activación, proliferación y respuestas. Las señales externas pueden ser transmitidas directamente a través de la activación de canales iónicos en la membrana celular, o con la entrada de sustancias (como hormonas esteroides) al interior de la célula. Cuando las sustancias externas no pueden entrar a la célula, éstas activan cascadas de reacciones bioquímicas en el interior de la célula. Estas cascadas bioquímicas llevan la señal externa al interior de la célula y se denominan vías de transducción de señal.

Muchas de las rutas de señalamiento están formadas por proteínas transmembranales que funcionan como receptores específicos que pueden o no tener actividad enzimática en su dominio intracelular, proteínas de unión a GTP, enzimas generadoras de segundos mensajeros (AMPc o DAG), cinasas de tirosina, treonina o serina y proteínas reguladoras. Las proteínas reguladoras que median la respuesta celular depende del tipo celular al que pertenezcan

Existen interacciones entre diferentes rutas de señalamiento que incluyen interacciones de cooperación, sinergismo, potenciación, antagonismo, co-transmisión y regulación (Cohen, 1992). La manera en que estas vías interaccionan se debe a que las proteínas de señalamiento o los segundos mensajeros son comunes en dichas vías (Karin et al, 1995).

2.3.1. CINASAS DE TIROSINA.

Uno de los mecanismos por los cuales los receptores envían señales del exterior hasta el núcleo de la célula, es la activación de una cascada de fosforilaciones en residuos de tirosina. Las cinasas de tirosina se encuentran en todos los organismos multicelulares y son parte importante de las proteínas involucradas en mecanismos de señalamiento que conectan las señales del exterior con blancos dentro de la célula. Las cinasas de tirosina se pueden dividir en dos tipos: las proteínas transmembranales que sirven como receptores específicos de factores de crecimiento, y cinasas intracelulares que participan como proteínas de transmisión de señales (Hunter, 1991). Las cinasas asociadas al proceso de transducción de la señal mitogénica se identificaron inicialmente como los componentes oncogénicos de retrovirus transformantes (Rodrigues et al, 1994).

2.3.1.1 RECEPTORES CINASAS DE TIROSINA

Este tipo de receptores consta de dos dominios importantes: el dominio extracelular que tiene la capacidad de reconocer a un ligando específico y el dominio intracelular que funciona como enzima al ser activado por su interacción con el ligando en el exterior (Pazin et al, 1992; Kazlauskas, 1994). Los ligandos de este tipo de receptores son factores de crecimiento, como el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidermal (EGF), factores de crecimiento de fibroblastos (FGFs), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), insulina, factor de crecimiento parecido a la insulina-1 (IGF-1), factor de crecimiento de nervios (NGF), factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y factor estimulador de macrófagos (M-CSF) (Alberts, 1994). Cuando el receptor cinasa de tirosina reconoce a su sustrato se activa su capacidad catalítica de cinasa

autofosforilándose en residuos específicos de tirosina. Los residuos de tirosina fosforilados son sitios de reconocimiento de proteínas efectoras intracelulares (Tabla 2). Las proteínas efectoras reconocen a las tirosinas fosforiladas y su secuencia cercana brindándoles una gran especificidad. Este reconocimiento se debe a que la proteína efectora cuenta con dominios SH2 (Src homology domain 2) que reconocen tirosinas fosforiladas (Dawson et al, 1992).

Tabla 2. - Proteínas efectoras de algunos receptores cinasas de tirosina.

Proteínas efectoras	Receptor PDGF (subunidad β)	Receptor EGF	Receptor IRS-1
PI3-K	+	+	+
PLC- γ 1	+	+	-
Ras-GAP	+	+	-
Grb 2	+	+	+
Fam Src	+	?	?
Syp/SH-PTP2	+	+	+
Nck	+	+	+
Shc	+	+	-
p91	+	+	-

2.3.1.2 RUTAS DE SEÑALAMIENTO MEDIADAS POR RECEPTORES CINASAS DE TIROSINA

Las proteínas que se unen al receptor fosforilado mandan la señal biológica. Por ejemplo, la proteína de unión al receptor de EGF es Grb2, la cual consiste de dominios SH3-SH2-SH3 (ver siguiente sección) y ocasiona la translocación del factor intercambiador de nucleótidos, Sos, a la membrana plasmática. Esto da como resultado la acumulación de Ras-GTP que se une a Raf-1 afectando su actividad de cinasa. Esto provoca la activación de una cascada de cinasas de treonina/serina que regulan vía fosforilaciones a factores de transcripción. Esta ruta es la clásica vía de Ras, que consiste en la activación secuencial de Ras, Raf-1, MEK, MAPK y factores nucleares de transcripción (Egan et al, 1993, Macdonald et al, 1993; McCormick, 1993; Vojtek et al, 1993).

Otra de las proteínas que se puede unir a algunos receptores cinasa activados es inositol trifosfato cinasa (PI3-K). Esta enzima está posiblemente involucrada con la activación de algunos miembros de la familia proteína cinasa C (PKC). La enzima fosfolipasa C- γ (PLC γ) interacciona con una variedad de receptores de factores de crecimiento y participa en la activación de algunas isoformas de PKC (Asaoka et al, 1992).

2.3.1.3 CINASAS DE TIROSINA INTRACELULARES

Varias cinasas intracelulares se han encontrado asociadas a proteínas transmembranales que funcionan como receptores los cuales no tienen actividad enzimática; quizá su función sea ayudar o facilitar la transmisión de señales al interior de la célula. Existen por lo menos 24 distintas cinasas de tirosina intracelulares que se dividen en 8 grupos y varían en tamaño desde 50 a 150 kDa. Varias de estas proteínas han sido descubiertas por ser oncogenes o genes supresores, lo cual indica que se encuentran

involucradas en algún tipo de señalamiento que modula el crecimiento y la diferenciación celular (Bolen, 1993). Las cinasas de tirosina pueden contener tres regiones: SH2, SH3 (Src homology domain 3), que reconocen péptidos ricos en prolina en otras proteínas y su parte catalítica (Schlessinger, 1994; Flaswinkel et al, 1995). Ejemplo de estas cinasas son: Jak 1, Jak 2, Syk, Zap70, Src, Fyn, etc.

2.3.2. REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN POR FOSFORILACIONES.

Muchas señales del medio externo inducen la activación de la transcripción de ciertos genes específicos para dichas señales. La meta de los mecanismos de señalamiento intracelular es hacer posible que la señal del medio externo llegue al núcleo. Existen tres niveles de regulación de la transcripción por fosforilaciones. Algunos factores se encuentran secuestrados en el citoplasma y necesitan librarse de la proteína secuestradora por algún mecanismo regulado de fosforilaciones para translocarse al núcleo y llevar a cabo su efecto. Otro mecanismo regulado por fosforilaciones es la actividad de unión al DNA del factor de transcripción. El tercer mecanismo de regulación de la transcripción por fosforilaciones es la interacción del dominio transactivador del factor de transcripción con la maquinaria de transcripción (Hunter et al, 1992).

3. OBJETIVO

En el laboratorio se han producido hibridomas que secretan anticuerpos anti-fosfotirosina diferentes a los comercialmente disponibles. El objetivo de este trabajo es caracterizar estos nuevos anticuerpos para determinar cuáles reconocen con mayor sensibilidad las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina de extractos celulares por medio de ensayos de Western Blot e inmunoprecipitaciones.

4. PROCEDIMIENTO

Para lograr el objetivo del proyecto se crecieron seis distintas clonas de células productoras de anticuerpos monoclonales (hibridomas) en un cultivo celular y se inyectaron a ratones BALB/c para producir una mayor cantidad de anticuerpos contenidos en el líquido de ascitis, inducido durante el proceso de inflamación. Posteriormente se purificaron los anticuerpos del líquido de ascitis por métodos de precipitación y cromatografía de afinidad. Estos anticuerpos purificados se probaron en Western Blots para detectar proteínas fosforiladas en residuos de tirosina con extractos totales de distintos tipos celulares estimulados a través de sus receptores Fc e integrinas. Asimismo se hicieron los ensayos de inmunoprecipitación para separar las proteínas fosforiladas en tirosina de otros componentes celulares

3. OBJETIVO

En el laboratorio se han producido hibridomas que secretan anticuerpos anti-fosfotirosina diferentes a los comercialmente disponibles. El objetivo de este trabajo es caracterizar estos nuevos anticuerpos para determinar cuáles reconocen con mayor sensibilidad las proteínas fosforiladas en residuos de tirosina de extractos celulares por medio de ensayos de Western Blot e inmunoprecipitaciones.

4. PROCEDIMIENTO

Para lograr el objetivo del proyecto se crecieron seis distintas clonas de células productoras de anticuerpos monoclonales (hibridomas) en un cultivo celular y se inyectaron a ratones BALB/c para producir una mayor cantidad de anticuerpos contenidos en el líquido de ascitis, inducido durante el proceso de inflamación. Posteriormente se purificaron los anticuerpos del líquido de ascitis por métodos de precipitación y cromatografía de afinidad. Estos anticuerpos purificados se probaron en Western Blots para detectar proteínas fosforiladas en residuos de tirosina con extractos totales de distintos tipos celulares estimulados a través de sus receptores Fc e integrinas. Asimismo se hicieron los ensayos de inmunoprecipitación para separar las proteínas fosforiladas en tirosina de otros componentes celulares

5. MATERIAL Y MÉTODOS

- ELISA

Los ensayos de ELISA se llevan a cabo en pozos de plástico tratados, donde se pueden adherir proteínas. Para el propósito de seleccionar los hibridomas que secreten anticuerpos con la especificidad deseada, en placas de 96 pozos para ELISAs, se adhiere el antígeno deseado y se adiciona posteriormente el medio con hibridomas. En algunos de los pozos habrá anticuerpos que reconozcan al antígeno, por lo cual se quedarán unidos a su antígeno. Estos anticuerpos se detectan añadiendo un segundo anticuerpo que reconoce la región Fc de las inmunoglobulinas de una especie determinada y que tiene acoplado una enzima. Las enzimas que se utilizan son peroxidasa (HRP) o fosfatasa alcalina (Figura 5).

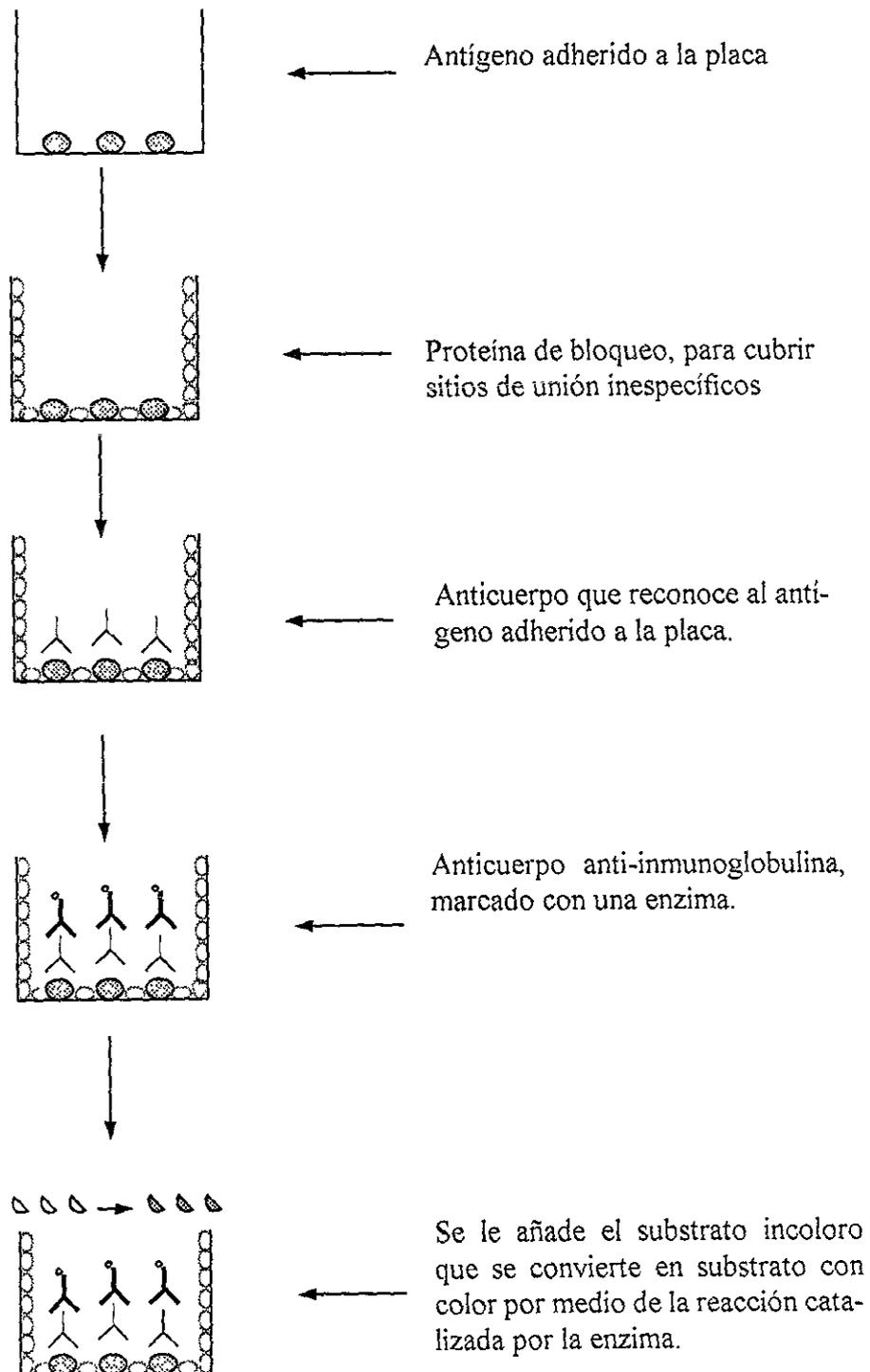
Disoluciones: Disolución amortiguadora de bloqueo: 1% BSA (Miles Laboratories) en Bicarbonato de Sodio 0.1M pH = 9.6

Disolución amortiguadora para lavado: PBS y Tween-20 (Bio-Rad) al 0.05%

Bicarbonato de Sodio 0.1M pH= 9.6

Procedimiento: Se agrega a la placa de 96 pozos 100 μ l de una disolución de antígeno a una concentración de 5 a 10 μ g/ml en bicarbonato de sodio 0.1 M y se incuba toda la noche a 4° C. Posteriormente se satura la placa con 1% BSA en una disolución amortiguadora de bicarbonato de sodio y se incuba 2 h a temperatura ambiente. A continuación se lava cuatro veces con la disolución amortiguadora de lavado. Se le agrega 50 a 100 μ l del anticuerpo específico contra el antígeno de elección y se incuba 2 h a temperatura ambiente. Se lava cuatro veces con la disolución amortiguadora de lavado. Posteriormente se le añade 50 μ l del anticuerpo anti-IgG acoplado a la enzima peroxidasa (HRP anti-IgG) en una dilución 1/1000 en PBS + tween 0.05% +1% BSA y se incuba 2 h a temperatura ambiente. Se lava

Figura 5. ELISA



cuatro veces con la disolución amortiguadora de lavado. Finalmente se le pone 50 μ l el substrato (5 mg o-fenilendiamina + 25 ml de agua + 50 μ l H₂O₂) y se espera la reacción de color. Se detiene la reacción con 100 μ l de ácido sulfúrico 1.8 M. Se lee la absorbancia a 490 nm.

- Cultivo Celular

Las líneas celulares NIH3T3 y J774 se mantienen en cultivo en medio DMEM (Gibco BRL) que se prepara según las instrucciones de fabricante. Cuando se va a utilizar el medio se suplementa con 5% de suero bovino fetal (Gibco BRL), L-Glutamina 2mM y los antibióticos Penicilina (50 unidades/ml) y Estreptomina (50 μ g/ml) (Gibco BRL).

Las células NIH3T3 y J774 se adhieren a los matraces de cultivo. Para que se despeguen se les agrega aproximadamente 1 ml de una disolución 0.05% tripsina/ 0.53mM EDTA (Gibco BRL) al matraz. Las células NIH3T3 se despegan fácilmente, mientras que las células J774 son difíciles de despegar. Las células J774 se incuban con la tripsina/EDTA a 37 °C aproximadamente 5 min. Para parar el efecto de la tripsina y el EDTA se agrega medio de cultivo DMEM con suero.

- Purificación de anticuerpos:

- Precipitación con ácido octanoico (caprílico) (Sigma)

Disoluciones : Ácido acético 2M

Procedimiento : Se mide el volumen de la muestra con anticuerpos, que puede ser suero o ascitis (=X). Se lleva la muestra a pH=4.8 con ácido acético. Se calcula la cantidad de ácido octanoico (OA) que se le agregará con la fórmula:

$$OA \text{ (ml)} = 7.56 \times X/100$$

Se añade el ácido octanoico gota por gota a la muestra con agitación constante. Se deja agitar 30 min a temperatura ambiente. La muestra se centrifuga a 272 xg durante 20 min. Posteriormente la muestra se filtra por papel Whatman #1 y luego por un filtro millipore de 0.45 μm para remover los precipitados. La muestra filtrada se dializa contra PBS a 4 °C para remover el ácido octanoico con tres cambios.

- Purificación de inmunoglobulinas por cromatografía de afinidad

Disoluciones : Glicina 0.1 M a pH=3

Tris (Bio-Rad) 1 M pH=8

Reactivo Bradford (Bradford, 1976): 0.01% de Azul de Coomasie G-250 (Bio -Rad), 4 7% Etanol y 8.5% Ácido Fosfórico.

Proteína G-sefarosa (Pharmacia Biotech), capacidad de la columna es de > 20 mg de IgG / ml de gel drenado.

Procedimiento: La columna de proteína G sefarosa se lava con PBS (5 volúmenes de columna) a un flujo de 1 ml/min antes de utilizarse. Posteriormente se pasa la muestra con anticuerpos dos veces a un flujo de 0.7 ml/min. A continuación se lava la columna con PBS para eliminar el pegado inespecífico (4 volúmenes de columna). Para determinar si la columna está limpia se prueban 10 μl de muestra con 150 μl del reactivo Bradford. Para eluir las inmunoglobulinas pegadas a la columna se le pasa 3 volúmenes de columna de Glicina 0.1M a pH= 3 a un flujo de 0.7 ml/min. La elución (aproximadamente 0 7 volúmenes de columna) se recolecta en tubos donde se le había puesto previamente 20 μl de Tris 1 M pH= 8 para neutralizar la muestra. Las fracciones de la elución fueron de 0 7 ml. Se deja lavando la columna con PBS aproximadamente con 20 volúmenes de columna.

- Medición de la concentración de proteína.

Disoluciones: Albúmina (Pierce)

BCA protein assay reagent (Pierce)

Procedimiento: Se prepara una curva standard de albúmina de 0-300 $\mu\text{g/ml}$ en PBS. Posteriormente se hacen las diluciones de la muestra. En placas de 96 pozos se le agrega 10 μl de la dilución de la muestra y 200 μl del reactivo BCA. Se incuba a 37 °C 30 min y se lee la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm en un espectrofotómetro. El ensayo con BCA es un método colorimétrico muy sensible para la cuantificación de proteína.

- Estimulación de células NIH3T3 y J774

Disoluciones: DMEM suplementado.

Forbol 12-Miristato 13-Acetato (PMA) (Sigma) a 50 ng/ml.

Disolución amortiguadora de lisis: RIPA con inhibidores de proteasas y fosfatasa.

Procedimiento: Estas células se encuentran adheridas al plástico de los matraces de cultivo por lo cual se quita el medio únicamente aspirándolo y se les agrega 2 ml ó 5 ml (suficiente para cubrir el matraz de cultivo) de medio DMEM sin suero. Si se utiliza un inhibidor como Herbamicina A o Tirfostina se agrega el inhibidor a una concentración de 10 μM por 1 h antes de la estimulación. Las células (NIH3T3 y J774) se estimulan con PMA a una concentración de 50 ng/ml, agregándolo al medio y dejándolo el tiempo requerido de estimulación (1, 3, 5 ó 10 min) a 37 °C. Después se aspira el medio y se le añade 100 ó 150 μl de la disolución amortiguadora de lisis. Inmediatamente después se pasa el matraz al hielo y se usa un gendarme para raspar las células. Se colecta el lisado y se deja 15 min a 4

°C. Posteriormente se centrifuga 16,000 xg durante 5 min a 4°C en una microcentrífuga (Ependorff). Se colecta el sobrenadante y se congela a -80°C.

- Estimulación de THP-1

Disoluciones : PBS frío

RPM1-1640 (Gibco)

Complejos inmunes insolubles: Se incuban suero de conejo anti-ferritina y ferritina a 37 °C por una hora. Posteriormente se pasan a 4 °C por 24 horas. Se centrifuga la muestra de antígeno-anticuerpo y se elimina el sobrenadante. El inmunoprecipitado se lava con PBS y se resuspende en el volumen deseado.

Anticuerpos: anti-integrina β_1 (TS2/16) y anti-integrina β_3 (IB4) utilizados a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$

Buffer de lisis RIPA: NaCl 150 mM, Nonidet P-40 al 1%, Deoxicolato de sodio al 0.5%, EDTA 5 mM y HEPES 50 mM

Inhibidores: Inhibidor de fosfatasas vanadato de sodio (Na_3VO_4) 1.0 mM

Inhibidores de proteasas: Aprotinina 25 $\mu\text{g/ml}$, Pepstatina A 25 $\mu\text{g/ml}$, Leupeptina 25 $\mu\text{g/ml}$ y PMSF 1 mM

Procedimiento: Las células THP-1 en cultivo se centrifugan a 308 xg durante 5 min a 4 °C. Se retira el medio y las células se resuspenden en 10 ml de RPMI-1640 sin suero y se cuentan. Las células se ajustan a una concentración de 1×10^6 células por ml. Las células se estimulan con complejos inmunes insolubles por 3 min o 1 min con anticuerpos TS2/16 o IB4 (10 $\mu\text{g/ml}$) a 37 °C con movimiento constante. La reacción se detiene con PBS frío. Posteriormente se centrifugan a 308 xg durante 5 min a 4 °C y las células se resuspenden en

buffer de lisis RIPA con inhibidores de proteasas y fosfatasa (100 μ l/10 millones de células). Se incuba en hielo durante 15 min y posteriormente se centrifuga a 16,000 xg durante 5 minutos a 4 °C. El sobrenadante que constituye el lisado celular se guarda a -80 °C.

- SDS-PAGE

Disoluciones: Disolución amortiguadora de electrodo: Tris base (Sigma) 25mM. Glicina (Sigma) 190 mM y SDS al 1%

Disolución amortiguadora de corrida: HCl 0.48 M y Tris base 3 M. Se ajusta a pH= 8.9

Disolución amortiguadora espaciadora: Tris base 500 mM a pH= 6.7

Acrilamida al 40%: Acrilamida (Bio-Rad) y Bis-acrilamida (Bio-Rad) disueltas en agua a una proporción 37.5:1 (Acrilamida: Bisacrilamida)

Persulfato de Amonio (APS) (Bio-Rad) al 10 % en agua.

TEMED (Bio-Rad).

Procedimiento: Se ensambla el aparato para hacer minigeles (Bio-Rad) como lo indica el fabricante. Para hacer los geles de poliacrilamida al 10% se mezcla 1.25 ml de la disolución amortiguadora de corrida, 2.5 de acrilamida, 100 μ l de SDS, 100 μ l de APS, 10 μ l de TEMED y se afora a 10 ml con agua. Se pone la mezcla en el aparato y se le agregan aproximadamente 100 μ l de n-butanol (J.T Baker) para que el gel gelifique horizontal. Una vez que el gel polimeriza se elimina el n-butanol y se le pone el peine para definir los pozos del gel. Posteriormente se hace la mezcla de poliacrilamida al 3% con 1.25 ml de la disolución amortiguadora espaciadora, 0.75 ml de acrilamida, 100 μ l de SDS, 100 μ l de APS, 10 μ l de TEMED y se afora a 10 ml con agua. Esta mezcla se agrega y se espera a

que polimerize. El gel se monta al aparato de electroforesis y se remueve el peine. Las muestras se ponen en los pozos formados por el peine. El gel se corre a 25 mAmps/gel durante aproximadamente 1 hora.

- Inmunoanálisis “Western Blot” anti-fosfotirosinas.

El ensayo del Western Blot es la transferencia electroforética de proteínas de un gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa (Bittner et al, 1980) y la detección de las proteínas en la membrana a través de anticuerpos (Burnette, 1981). Normalmente se tiene un anticuerpo que reconozca las proteínas en la membrana de nitrocelulosa y otro anticuerpo que reconozca inmunoglobulinas y que esté acoplado a una enzima o a un isótopo radioactivo (Scouten, 1987). Las inmunoglobulinas normalmente están acopladas a enzimas como la peroxidasa o contienen un isótopo como ^{35}S . Si se utiliza una Inmunoglobulina acoplada a una enzima, se tiene que agregar un sustrato colorido para detectar las proteínas, o bien un sustrato quimioluminiscente para detectar las proteínas en una película fotográfica (Figura 6).

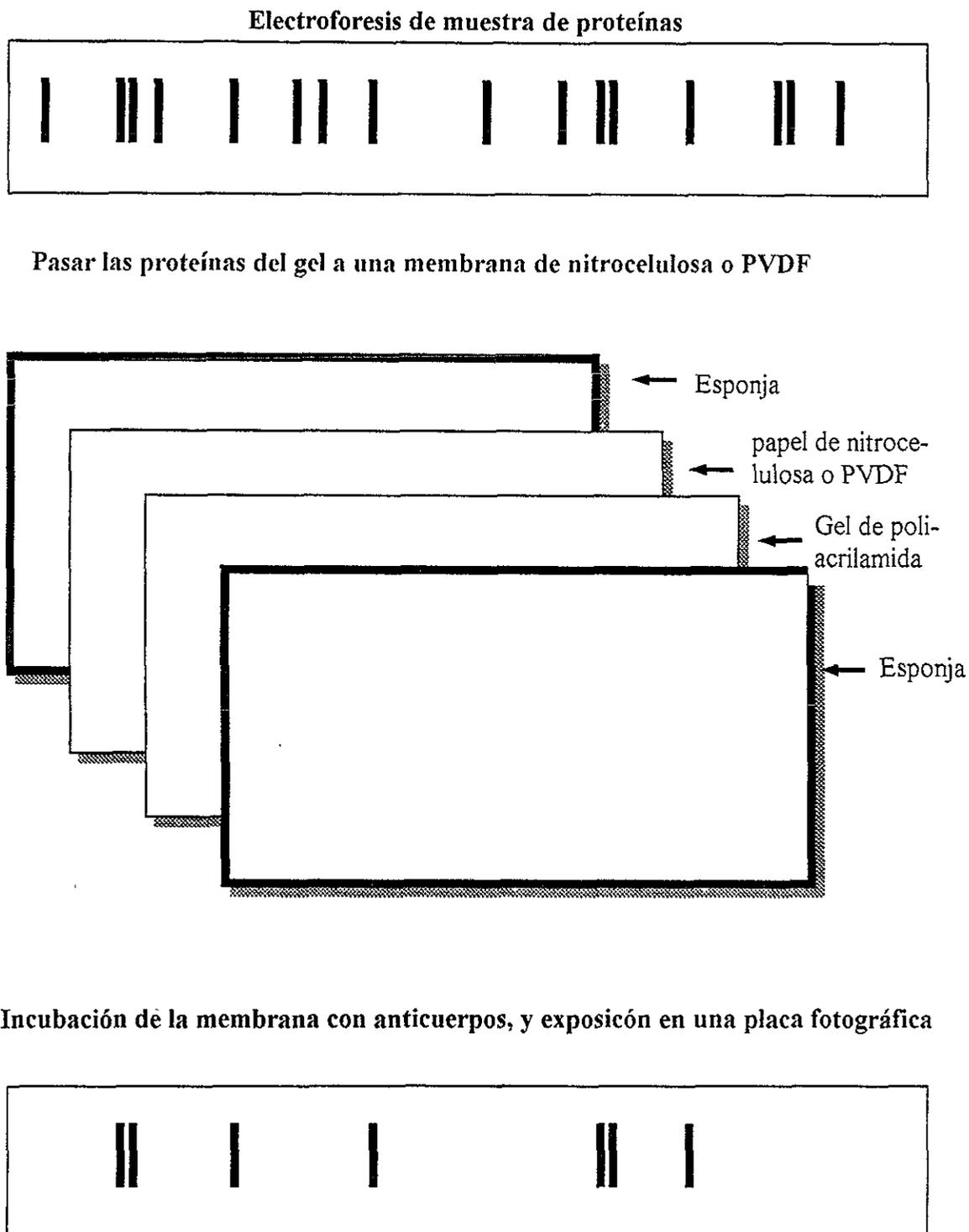
Disoluciones: TBS: Tris 10 mM y NaCl 50 mM a pH = 7.5

Disolución amortiguadora de Transferencia: 25 mM de Tris-HCl (Sigma), 192 mM Glicina (Sigma) y 20% Metanol (Merck) pH=8.3

Disolución amortiguadora de Bloqueo: 5% de leche (Carnation) en TBS

Procedimiento: Se hidrata la membrana PVDF (difloruro de polivinilideno) (Millipore) con metanol por un minuto. A continuación se enjuaga la membrana con agua destilada y se pone en la disolución amortiguadora de transferencia por lo menos 15 min antes de

Figura 6. Inmunoanálisis "Western Blot"



utilizarse. El gel que se necesita transferir se enjuaga con agua destilada y después con la disolución amortiguadora de transferencia. Se ensambla el aparato con la membrana hacia el electrodo positivo. Se transfiere a 500 mA con el aparato para minigeles de Bio-Rad durante 2 h. Posteriormente se satura la membrana con la disolución amortiguadora de bloqueo por lo menos 3 h. Se lava la membrana seis veces con TBS cambiando la disolución amortiguadora cada 5 min. A continuación se le agrega el anticuerpo anti-fosfotirosinas, ya sea el sobrenadante de los hibridomas en cultivo o al anticuerpo purificado a una concentración de 7 µg/ml en la disolución amortiguadora de bloqueo. Se deja incubando con el anticuerpo a 4 °C toda la noche. Posteriormente se lava seis veces con TBS a intervalos de 5 min y se le agrega el anticuerpo secundario (HRP anti-IgG) (Cappel laboratories) en una dilución 1/3000 en la disolución amortiguadora de bloqueo. Se incuba mínimo una hora a temperatura ambiente. Se lava seis veces con TBS en intervalos de 5 min y se incuba con el substrato quimioluminiscente comercial "super signal" de PIERCE por 5 min. Por último se expone a la placa fotográfica 5 min.

- Inmunoprecipitaciones

Disoluciones : PBS

Disolución amortiguadora de lisis RIPA con inhibidores de proteasas y fosfatasa

Proteína A-Sefarosa (Pharmacia Biotech)

Procedimiento: Se mide el volumen del lisado que se va a utilizar y se lleva a 200 µl con la disolución amortiguadora de lisis. Posteriormente se le añade el anticuerpo a una concentración de 10 µg/ml y se incuba a 4 °C por 2 h con agitación en la rueda "Roto-Torque" (Cole-Parmer). Después de las 2 h se le añade 20 µl de proteína A-Sefarosa y se

incuba 3 h. Finalmente se centrifuga a 735 xg por 1 min y se hacen lavados (cinco veces) con PBS (entre cada lavado se centrifuga a 735 xg durante 1 min). Después de la última centrifugación se resuspende la pastilla de sefarosa en la disolución amortiguadora de muestra para la electroforesis y se hierve por 5 min. Se centrifuga a 735 xg por 1 min y tomando el sobrenadante se carga en un gel desnaturalizante (SDS-PAGE). Posteriormente se lleva a cabo el Western Blot.

6. RESULTADOS

En el laboratorio del Dr. Carlos Rosales se inmunizaron ratones de la cepa BALB/c con KLH-PY (KLH con fosfotirosinas). Las células del bazo de estos animales se utilizaron para obtener hibridomas. Durante el proceso de selección se eligieron tres clonas de hibridomas (1B6, 1C2 y 1C6) para la clonación, que secretaban anticuerpos anti-fosfotirosina (determinado por pruebas de ELISA). Durante la clonación se probó continuamente la especificidad de los anticuerpos secretados por medio de pruebas de ELISA. Las clonas con una mayor señal en estas pruebas se nombraron: 1B6.5.1, 1B6 5.2, 1C2.3.1, 1C2.4.1, 1C6.1.1 y 1C6.2.1.

En este proyecto de tesis se purificaron y caracterizaron los anticuerpos secretados por las clonas de hibridomas obtenidas en el laboratorio.

6.1. ISOTIPO DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-FOSFOTIROSINA

Se caracterizaron los isotipos de los anticuerpos secretados por los hibridomas seleccionados por medio de un ensayo de ELISA. En una placa de 96 pozos para el ensayo de ELISA se adhirió ovalbúmina-PY en cada pozo, posteriormente se agregó el sobrenadante de los hibridomas en cultivo. Una vez que los anticuerpos del medio reconocen a su ligando, se le agrega un anticuerpo de diferente especificidad a cada uno de los pozos. Se utilizaron los anticuerpos comerciales anti-IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM. Los resultados del experimento mostraron que los anticuerpos 1B6 5.1, 1B6 5.2, 1C2.4.1 y 1C2.3.1 son IgG1 mientras que 1C6.1.1 y 1C6.2.1 son IgG2a.

6.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES ÓPTIMAS PARA WESTERN BLOTS ANTI-FOSFOTIROSINA

Con el fin de determinar si los anticuerpos secretados por los hibridomas en cultivo reconocen ovalbúmina con fosfotirosinas y no la ovalbúmina por sí sola, se hicieron Western Blots anti-fosfotirosina. Las muestras se corrieron en un gel desnaturalizante (SDS-PAGE) y en condiciones reductoras; posteriormente se llevó a cabo el Western Blot. Todas las clonas de hibridomas crecieron adecuadamente en cultivo y en especial la clona de hibridomas 1B6.5.1.

Al inicio se tuvieron que determinar las condiciones óptimas para los Western Blots ya que en los primeros experimentos realizados había mucho ruido de fondo (Figura 7). La disolución amortiguadora de bloqueo original contenía 5% de leche descremada (Carnation), 1% BSA y 0.05% Tween -20 en PBS. Se exploraron varias disoluciones con el fin de eliminar el ruido de fondo de los Western Blots (referirse a la sección de material y métodos). Se pensó que el contenido de la disolución amortiguadora de bloqueo estaba de alguna manera interfiriendo con la sensibilidad de los anticuerpos por las fosfotirosinas. Otra posibilidad era tal vez que algunos de los componentes del medio de cultivo donde se encontraban los anticuerpos estaban siendo reconocidos por los anticuerpos anti-fosfotirosina que se estaban probando, o por el anticuerpo anti-IgG o por el sustrato quimioluminiscente (reactivo "Super signal") (Pierce). Se probaron distintas disoluciones amortiguadoras de bloqueo como: 5% leche o 1% gelatina con Tween-20 en PBS. Probando las distintas soluciones amortiguadoras de bloqueo se descartaron algunas posibilidades de reconocimiento inespecífico del anticuerpo anti-IgG o de que el sustrato quimioluminiscente estuviera reaccionando con algunas de las proteínas de la leche, el BSA

o el Tween-20. La mejor disolución amortiguadora de boqueo que se encontró para los Western Blots anti-fosfotirosina con los sobrenadantes de los hibridomas en cultivo que contenían los anticuerpos fue 5% de leche descremada (Carnation), en PBS (Figura 8).

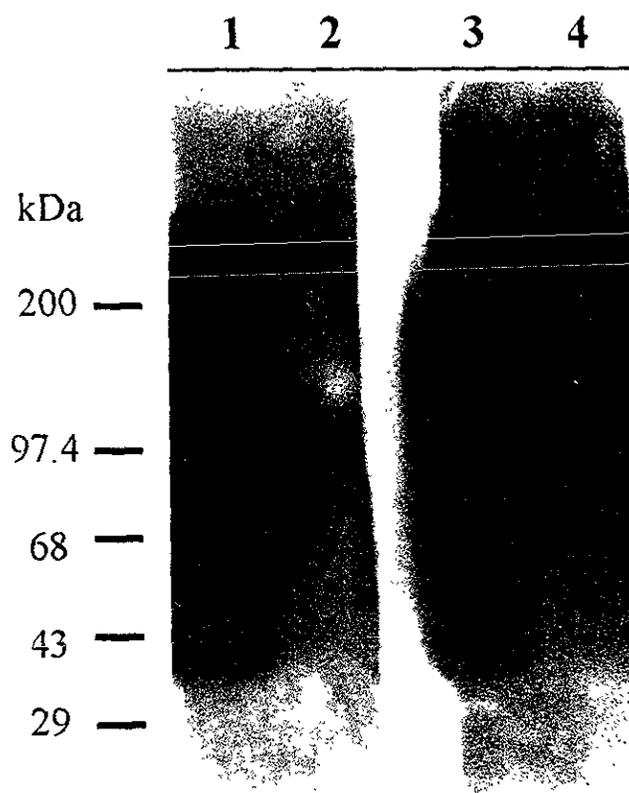


Figura 7. Western Blot anti-fosfotirosinas. Gel de poliacrilamida al 7.5% desnaturizante y en condiciones reductoras. Carriles 1 y 3 ovalbúmina con fosfotirosinas (control positivo). Carriles 2 y 4 ovalbúmina sin fosfotirosinas (control negativo). Muestras de proteínas 10 μ g por carril. Disolución amortiguadora de bloqueo en el Western Blot: 5% de leche, 1% de BSA y 0.05% tween-20 en PBS. Como anticuerpos anti-fosfotirosina se utilizaron los sobrenadantes de los hibridomas en cultivo sin diluir: 1B6.5.2 (carriles 1 y 2) y 1C6.1.1(carriles 3 y 4).

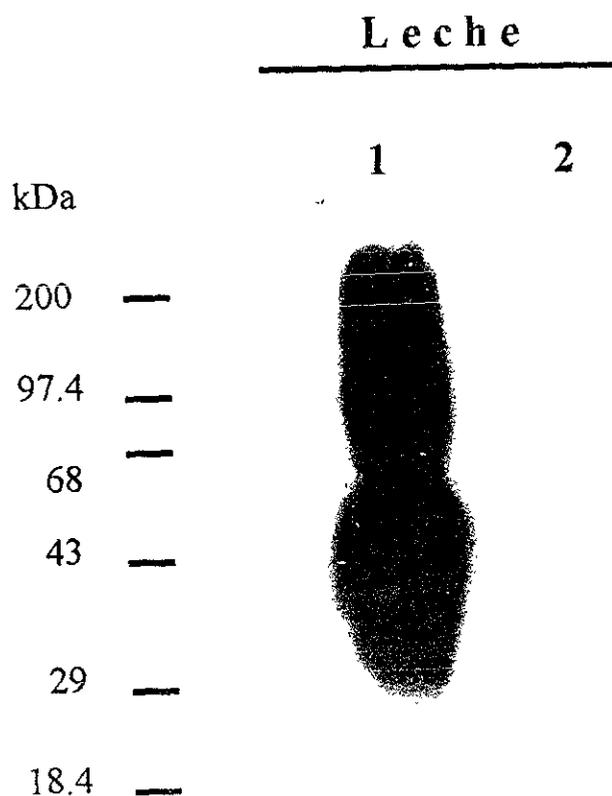


Figura 8. Western Blot anti-fosfotirosinas con la disolución amortiguadora de bloqueo de 5% leche en PBS. Gel de poliacríamida al 7.5% desnaturalizante y en condiciones reductoras. Carril 1 ovalbúmina con fosfotirosinas y carril 2 ovalbúmina sin fosfotirosinas (control negativo). Como anticuerpo anti-fosfotirosinas se utilizó el sobrenadante sin diluir de la clona de hibridomas 1B56.5.2. Muestras de proteína (ovalbúmina con y sin fosfotirosinas) a 10 μ g por carril.

Como se observa en estos Western Blots existe una sola mancha a lo largo del carril y no bandas definidas. La proteína ovalbúmina con y sin fosfotirosinas tuvieron el mismo tratamiento con glutaraldehido. Esto podría sugerir que tal vez la proteína se encontraba formando polímeros y/o se cargó un exceso de proteína en el gel. Para confirmar estas posibilidades se llevó a cabo un experimento de electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) y se tino con el colorante azul de Coomasie. Al teñir el gel se observó que la proteína se encontraba distribuida a lo largo del carril, pero concentrándose al final del carril con un peso molecular aproximado de 43kDa (Figura 9). Una posible explicación es la presencia de polímeros formados durante la reacción del glutaraldehido con la proteína, y por otro lado el exceso de proteína en el gel.



Figura 9. - Gel de poliacrilamida para ovalbúmina. Gel de poliacrilamida al 7.5% desnaturizante y en condiciones reductoras. Carriles 1 y 2: ovalbúmina con fosfotirosinas (20 μ g); carriles 3 y 4: ovalbúmina sin fosfotirosinas (20 μ g). Tinción del gel con azul de Coomasie.

6.3. PURIFICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-FOSFOTIROSINAS

Con el fin de poder manipular concentraciones exactas de anticuerpo se purificaron los anticuerpos secretados por las seis clonas de hibridomas. Para esto, se inyectaron diez ratones BALB/c en el peritoneo con el aceite pristano una semana previa a la inyección de los hibridomas. Después de aproximadamente una semana de haberles inyectado los hibridomas, los ratones generaron líquido de ascitis que se acumula en el peritoneo. El líquido de ascitis contiene los anticuerpos secretados por las células que están creciendo en el peritoneo del ratón. El líquido de ascitis se extrae con una aguja introducida directamente en la cavidad peritoneal del ratón. Los anticuerpos IgG del líquido de ascitis se purificaron por el método de precipitación con ácido octanoico (Caprílico) (Russ et al, 1983) y cromatografía de afinidad con proteína G-sefarosa (Björck et al, 1984). Las IgG unidas a la proteína G pueden ser eluidas con cambios de pH utilizando Glicina 0.1 M, pH=3. Posteriormente se llevó a cabo un gel de SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras para comprobar la pureza y la integridad de los anticuerpos (Figura 10). Como se puede observar en la figura 10 la proteína eluida (referirse a sección de material y métodos) está pura y no se encuentra degradada. En los carriles 1 y 2 los pesos moleculares calculados por regresión lineal ($r^2 = 0.994$) (distancia contra logaritmo del peso molecular) fueron: carril 1 : 52.2 kDa y 26.4 kDa; carril 2 : 169.9 kDa. Esto comprueba que la proteína es un anticuerpo ya que en condiciones reductoras se ven dos bandas: 52 kDa (cadenas pesadas) y 26 kDa (cadenas ligeras), mientras que en condiciones no reductoras esta una banda del peso molecular total .aproximado de un anticuerpo.

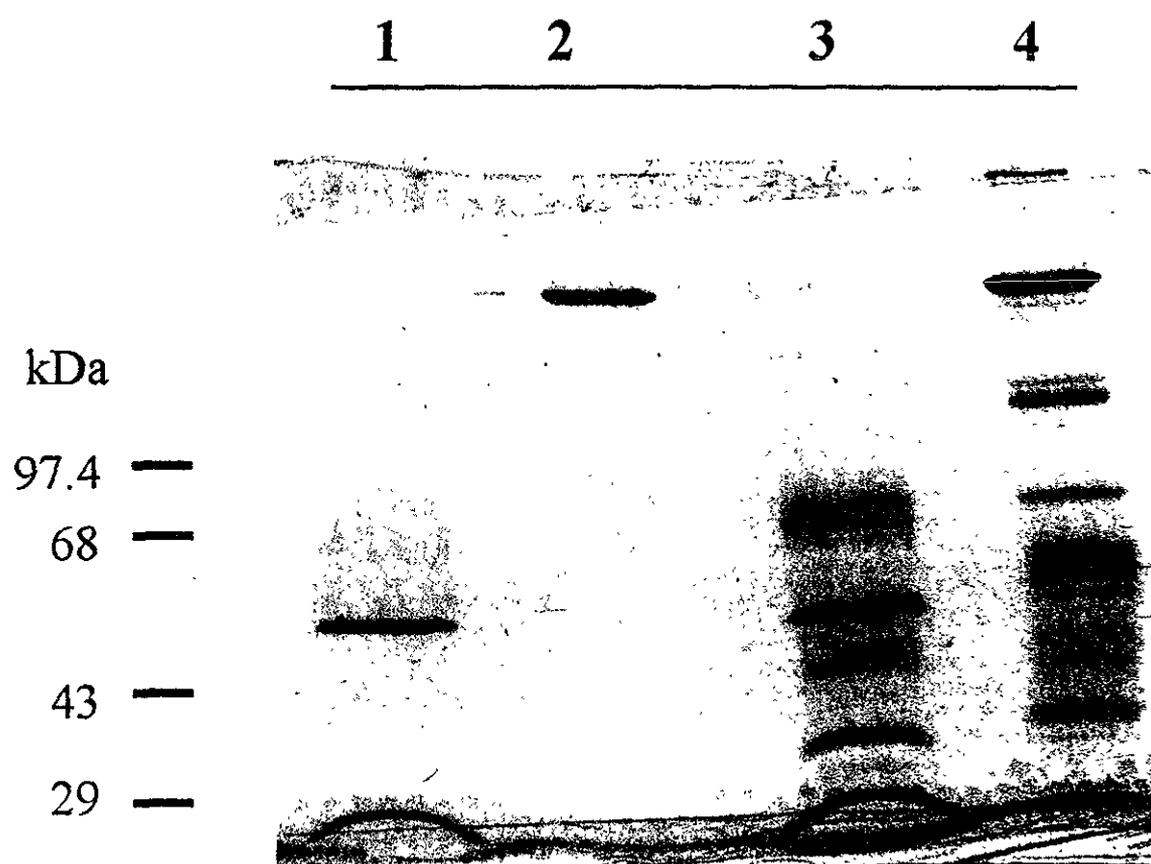


Figura 10. - Contenido y pureza de la elución de la muestra (1B6.5.1) pasada por cromatografía de afinidad (proteína G). Gel de poliacrilamida desnaturalizante al 7.5%. Carril 1 muestra de la elución en condiciones reductoras. Carril 2 muestra de la proteína eluida en condiciones no reductoras. Carril 3 muestra antes de pasar por la columna de proteína G, en condiciones reductoras. Carril 4 muestra antes de pasar por la columna de proteína G, en condiciones no reductoras. Se cargó en el gel 4 μ l de cada muestra

Finalmente se midió la concentración de proteína de los anticuerpos purificados (Tabla 3). Los anticuerpos se guardan en alícuotas a -20°C .

Tabla 3. – Concentración de los Anticuerpos Monoclonales anti-fosfotirosina purificados.

mAb	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)
1B6.5.1	800
1B6.5.2	1275.6
1C2.3.1	820
1C2.4.1	2000
1C6 1.1	1660.7
1C6 2.1	1720

6.4. WESTERN BLOTS ANTI-FOSFOTIROSINA UTILIZANDO LISADOS CELULARES

Consultando bibliografía, se observó que en algunos laboratorios que llevan a cabo Western Blots anti-fosfotirosina, utilizando la disolución amortiguadora TBS (Tris Buffer Saline) en lugar de PBS (Kornberg et al, 1992). Se probó esta nueva condición en el laboratorio para ver si se mejoraban. Resultó conveniente utilizar TBS para este tipo de ensayos ya que los Western Blot salían más limpios.

Hasta este punto sabíamos que los anticuerpos anti-fosfotirosina eran capaces de reconocer fosfotirosinas en ovalbúmina, pero queríamos ver si también podían reconocer proteínas fosforiladas en tirosina de lisados celulares. Los Western Blots se llevaron a cabo con lisados de diferentes tipos de células que se tenían en el laboratorio. Las células que se utilizaron fueron las líneas celulares de macrófagos de ratón (J774), de fibroblastos de ratón (NIH3T3) y de monocitos humanos (THP-1).

6.4.1. RECONOCIMIENTO DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS EN RESIDUOS DE TIROSINA

Para comprobar que los anticuerpos purificados estaban reconociendo específicamente a proteínas fosforiladas en tirosina, se llevaron a cabo dos experimentos: en el primero se probó la especificidad del anticuerpo 1B6.5.1 utilizando inhibidores de cinasas de tirosina como herbamicina A (Gibco BRL) y tirfostina (Gibco BRL). Herbamicina A es un inhibidor de cinasas de tirosina oncogénicas como Src, Alb, Fbs, Yes y Erb B en una variedad de tipos celulares (Uehara et al, 1987). El compuesto sintético tirfostina es un potente inhibidor de proteínas tirosinas cinasas que se asocian al factor de crecimiento epidermal (EGF) (Gazit, 1989; Levitzki et al, 1991). Este experimento (Figura 11) nos sugiere que la estimulación de las células con 3 min de acetato de forbol miristato (PMA)

induce la activación de cinasas de tirosina, ya que en el lisado de estas células hay un incremento en la intensidad de algunas de las bandas de proteínas, principalmente las de un peso molecular mayor 46.9 kDa. De la misma manera nos sugiere que la acción del inhibidor específico de cinasa de tirosina, tirfostina, se puede detectar con el anticuerpo 1B6.5.1, ya que los lisados de las células tratadas con tirfostina y estimuladas 3 min con PMA tienen el mismo patrón de fosforilación que los de las células no estimuladas.

El segundo experimento para comprobar la especificidad para fosfotirosinas del anticuerpo 1B6.5.1 se llevó a cabo un Western Blot donde se inhibió la interacción antígeno-anticuerpo con un exceso del hapteno en solución (figura 12). También se pensó que las bandas de proteínas identificadas no estaban siendo reconocidas por el anticuerpo 1B6.5.1, sino por el segundo anticuerpo anti-IgG o tal vez era cuestión de isotipos por lo que otro anticuerpo del mismo isotipo que 1B6.5.1 (IgG1) también pudiera reconocer las mismas proteínas. Como se observa en la figura no hay reconocimiento inespecífico de proteínas por el anticuerpo anti-integrinas $\alpha 3$ (IgG1), ni por el anticuerpo anti-IgG que se utiliza en el laboratorio. También se observa que el reconocimiento del anticuerpo 1B6.5.1 se inhibe casi totalmente al agregar fosfotirosinas en solución. Con esta figura podemos concluir que no hay reconocimiento inespecífico por los anticuerpos anti-IgG, o por otro IgG1, y que el anticuerpo 1B6.5.1 está reconociendo específicamente fosfotirosinas ya que con exceso del hapteno se elimina la señal.

Como los patrones de reconocimiento del anticuerpo 1B6.5.1 son relativamente iguales (unos con menor sensibilidad en el reconocimiento) que los otros cinco anticuerpos, podemos decir que los nuevos anticuerpos monoclonales son específicos contra proteínas fosforiladas en residuos de tirosina.

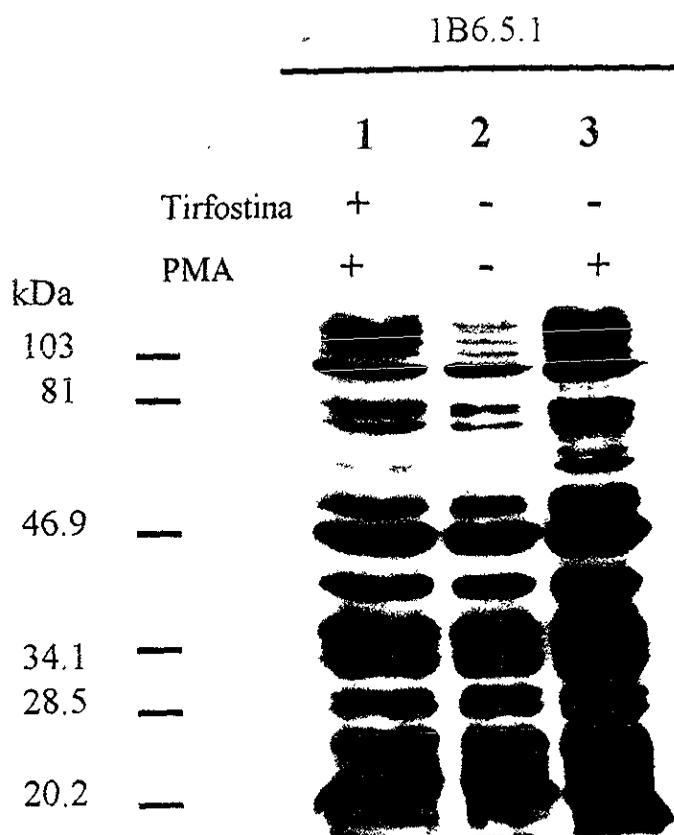


Figura 11. - Western Blot anti-fosfotirosinas de lisados de células NIH3T3 estimuladas con PMA (50 ng/ml) en presencia o ausencia de tirfostina 10 μ M. Carril 1 células tratadas con tirfostina y estimuladas con PMA 3 min (30 μ g). Carril 2 células no estimuladas (30 μ g) Carril 3 células estimuladas (30 μ g) 3 min con PMA. Anticuerpo 1B6 5.1 utilizado a una concentración de 7 μ g/ml.

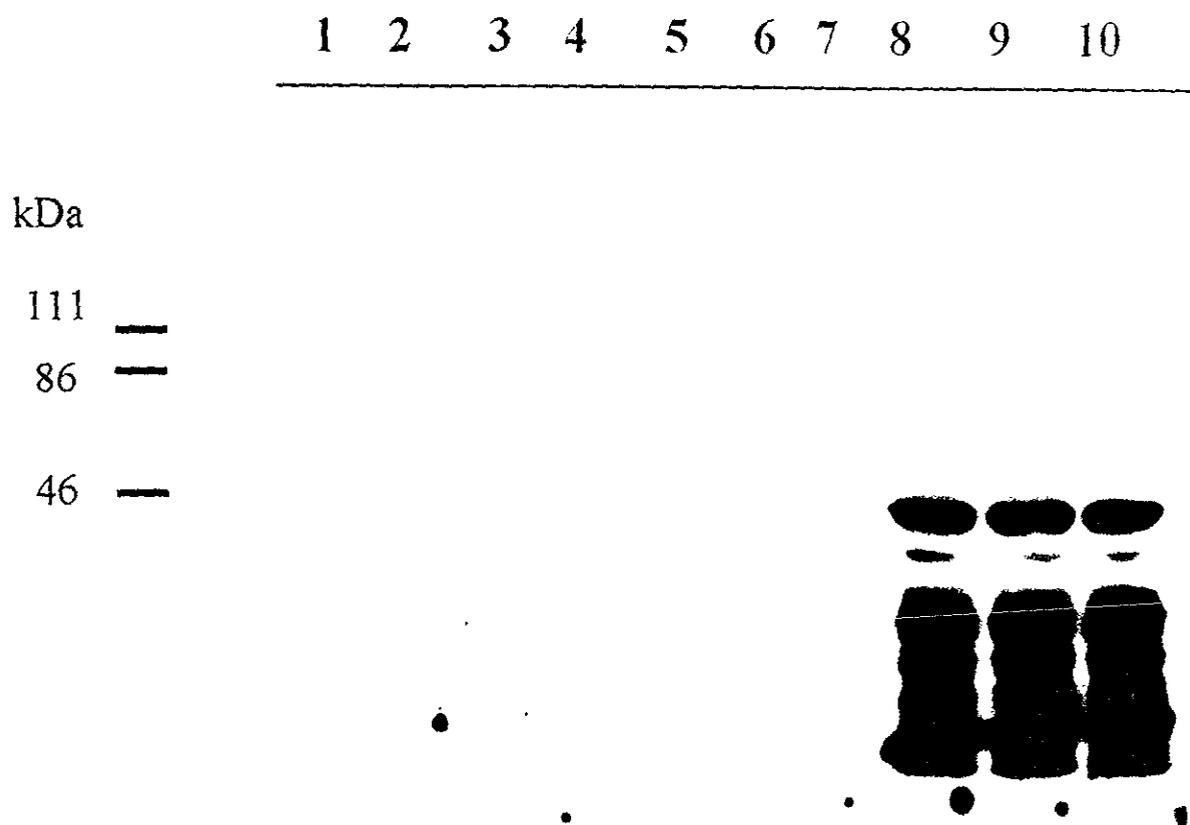


Figura 12. – Reconocimiento específico de fosfotirosinas. Western Blot anti-fosfotirosina con el anticuerpo 1B6.5.1 con lisados de NIH3T3 (30 $\mu\text{g}/\text{carril}$). Carril 1 y 2 utilizando anticuerpo anti-IgG. Carril 3, 4 y 5 fosfotirosina (1.2mM) y anticuerpo 1B6 5.1 (7 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Carril 6 y 7 utilizando anticuerpo anti-integrina $\alpha 3$ (7 $\mu\text{g}/\text{ml}$) isotipo IgG1. Carril 7, 8 y 9 utilizando el anticuerpo 1B6.5.1 (7 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

6.4.2. DIFERENCIA EN LA SENSIBILIDAD DE LOS ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-FOSFOTIROSINA

Con el fin de comparar la sensibilidad de los seis anticuerpos purificados se llevaron a cabo varios Western Blots (Figura 13). En la figura 13a, se puede observar la diferencia de la cantidad de bandas que reconocen los anticuerpos 1C2.4.1, 1B6.5 1 y 1B6.5 2 de los lisados de fibroblastos (NIH3T3). Los anticuerpos anti-fosfotirosina se utilizaron a una

concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ y de muestra se utilizó 30 $\mu\text{g/carril}$. Se observa que en las condiciones del Western Blot (ver Material y Métodos), los anticuerpos 1C2.4.1 y 1B6.5.2 reconocen un menor número de bandas que el anticuerpo 1B6.5.1, lo que sugiere que tienen menor sensibilidad en este tipo de ensayos, bajo las condiciones establecidas. De la misma manera se observa que el Western Blot con el anticuerpo 1C2.4.1 tiene mucho ruido de fondo, lo cual podría ser provocado por pegado inespecífico

Cuando comparamos los anticuerpos 1C6.2.1 y 1B6.5.1 (figura 13b), al utilizar lisados de la línea celular J774 (30 $\mu\text{g/carril}$), observamos que el Western Blot con el anticuerpo 1C6.2.1 (10 $\mu\text{g/ml}$) hay mucho más ruido de fondo y reconoce menos bandas en comparación con el anticuerpo 1B6.5.1 (10 $\mu\text{g/ml}$). En este experimento la porción de la membrana revelada con el anticuerpo 1B6.5.1 mostró un poco de ruido de fondo, pero las bandas aún se distinguen claramente. También se puede observar que comparando los dos anticuerpos, el anticuerpo 1C6.2.1 no es capaz de detectar algunas de las bandas como las de 40 kDa y de 62 kDa. Los resultados de este experimento nos sugieren que el anticuerpo 1C6.2.1, en comparación con el 1B6.5.1, es capaz de identificar la mayor parte de las bandas con buena definición, aunque con mucho ruido de fondo.

Al comparar los anticuerpos 1B6.5.1 y 1C6.1.1 (7 $\mu\text{g/ml}$) en la figura 13c, la diferencia en el reconocimiento de bandas es muy diferente. El anticuerpo 1C6.1.1 reconoce, sin ruido de fondo, un menor número de bandas en comparación con el 1B6.5.1. Así mismo el anticuerpo 1C6.1.1 no es capaz de reconocer diferencias en patrones de fosforilación entre lisados de células estimuladas y células no estimuladas, mientras que el anticuerpo 1B6.5.1 identifica diferencias claramente. Esto nos sugiere que el anticuerpo 1C6.1.1 es menos sensible que el anticuerpo 1B6.5.1.

En el último inciso de la figura 13 la diferencia entre los anticuerpos 1C2.3.1 y 1B6.5.1 no es tan evidente como en los demás Western Blots. En este Western Blot con lisados de fibroblastos (NIH3T3) se puede observar que ambos anticuerpos identifican el mismo número de bandas, pero el anticuerpo 1B6.5.1 es más limpio que el anticuerpo 1C2.3.1 ya que la membrana no presenta ruido de fondo.

Existe una diferencia en el reconocimiento de bandas entre la figura 13a y 13b con el anticuerpo 1B6.5.1, donde en ambos casos se utiliza el anticuerpo a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. Las bandas reconocidas por el anticuerpo 1B6.5.1 en la figura 13a son más intensas y parece ser que se utilizó un exceso de anticuerpo, mientras que en la figura 13b las bandas reconocidas por el mismo anticuerpo son más definidas y más limpias. Pensamos que esta diferencia se dio porque son lisados de distintos tipos celulares: fibroblastos (NIH3T3) en la figura 13a y macrófagos (J774) en la figura 13b y por lo tanto existen diferencias tanto en el nivel de fosforilación de las proteínas como en la cantidad de proteínas fosforiladas. Esto sugiere que en Western Blots con lisados de macrófagos (J774) es conveniente utilizar el anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosinas 1B6.5.1 a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ y en Western Blots con lisados de fibroblastos (NIH3T3) es mejor utilizar el mismo anticuerpo a una concentración menor, por lo cual se bajó la concentración a 7 $\mu\text{g/ml}$ en los Western Blots subsecuentes con este tipo de anticuerpos.

Con esta figura 13 podemos concluir que el mejor anticuerpo para Western Blots anti-fosfotirosinas bajo las condiciones establecidas en el laboratorio es el 1B6.5.1. Así mismo la concentración de anticuerpo óptima para los Western Blots con lisados celulares de fibroblastos (NIH3T3) es de 7 $\mu\text{g/ml}$ y con los macrófagos (J774) es de 10 $\mu\text{g/ml}$ al utilizar 30 μg de muestra por carril.

(a)

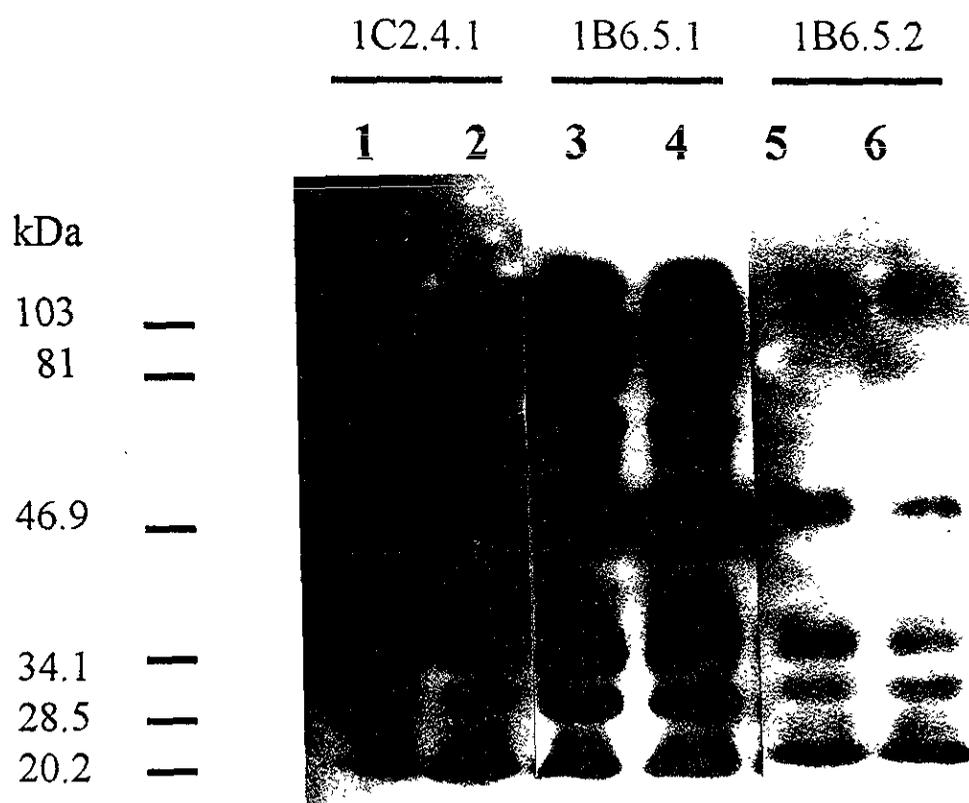


Figura 13a. - Western Blots anti-fosfotirosinas con los seis anticuerpos purificados. Western Blot con lisados de células NIH3T3 (30 $\mu\text{g}/\text{carril}$) utilizando anticuerpos 1C2.4.1, 1B6.5.1 y 1B6.5.2 a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

(b)

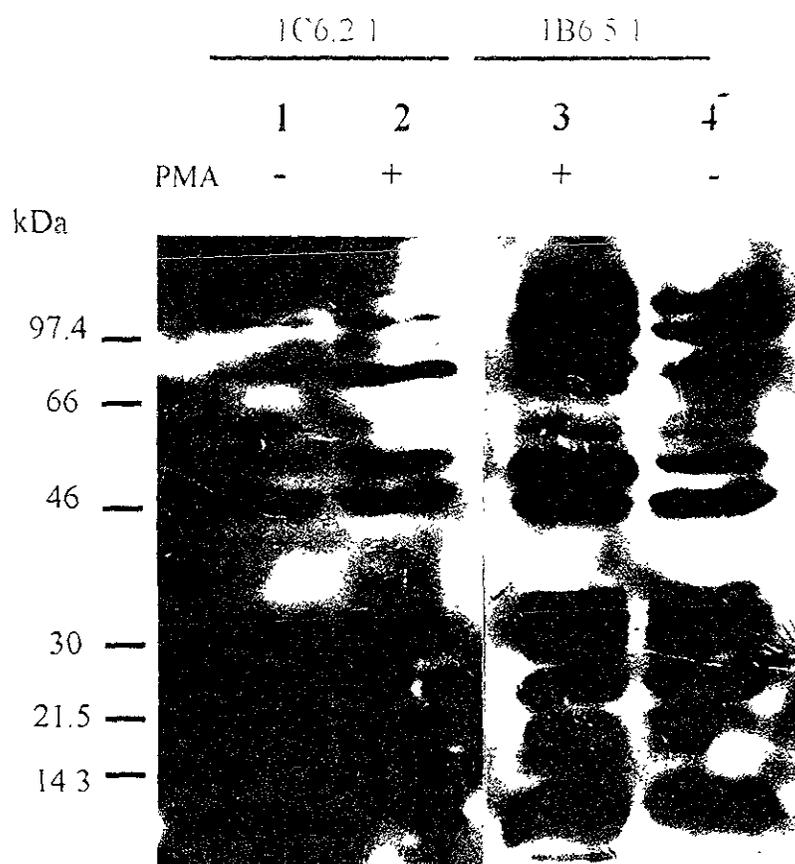


Figura 13b. -Western Blot con lisados de células J774 (30 μ g/carril) utilizando anticuerpos 1C6.2.1 (carriles 1 y 2) y 1B6.5.1 (carriles 3 y 4) a 10 μ g/ml. Carriles 1 y 4: células no estimuladas. Carriles 2 y 3: células estimuladas con PMA (50ng/ml) por 10 min.

(c)

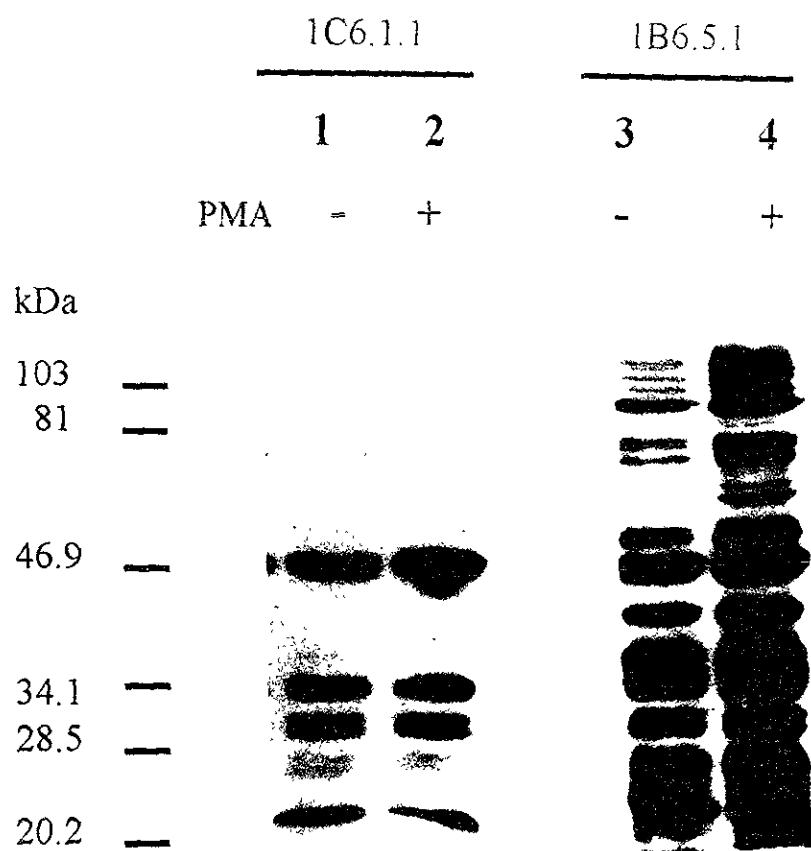


Figura 13c. -Western Blot con lisados de células NIH3T3 (30 $\mu\text{g}/\text{carril}$) utilizando anticuerpos 1C6.1.1 y 1B6.5.1 a 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Carriles 1 y 3: lisados de células no estimuladas. Carriles 2 y 4: lisados de células estimuladas con PMA (50 ng/ml) por 3 min.

(d)

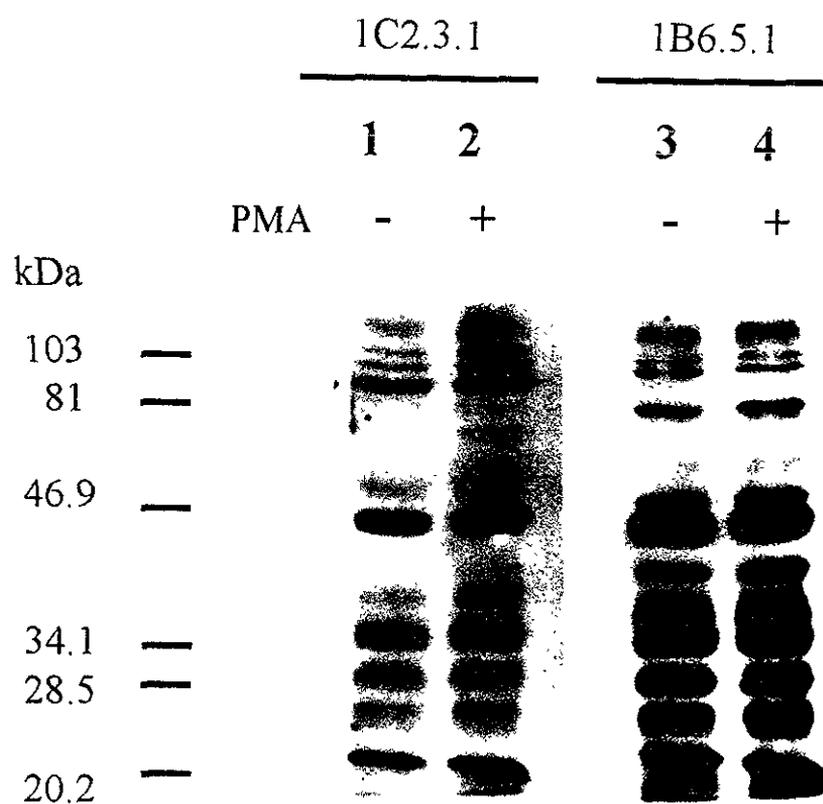


Figura 13d. - Western Blot con lisados de células NIH3T3 (30 mg/carril) utilizando los anticuerpos 1C2.3.1 y 1B6.5.1 a 7 $\mu\text{g/ml}$. Carriles 1 y 3: lisados de células sin estímulo. Carriles 2 y 4: lisados de células estimuladas con PMA (50 ng/ml) por 3 min.

6.4.3. RECONOCIMIENTO DE DIFERENCIAS EN PATRONES DE FOSFORILACIÓN

Sabemos que al estimular una célula se producen cambios en fosforilaciones de algunas proteínas intracelulares (ver Introducción), por lo cual algunas de las células utilizadas se estimulaban antes de hacer los lisados. Para ver si nuestros anticuerpos reconocían esas diferencias se llevaron a cabo Western Blots con lisados de células estimuladas y no estimuladas. Todos los anticuerpos purificados reconocían diferencias en los patrones de fosforilación, aunque algunos con menor sensibilidad. Un ejemplo se muestra en la figura 12 donde se utilizaron para el Western Blot lisados de macrófagos (J774) estimulados 10 min con PMA. Este ensayo se llevó a cabo con el anticuerpo 1B6.5.1 a una concentración de 10 µg/ml.

En la figura 12 se nota un incremento en la fosforilación de proteínas de pesos moleculares aproximados de 97.4, 60 y 50 kDa y en proteínas de peso molecular entre 35 y 40 kDa. Hay una proteína de peso molecular de 14kDa que aparece fosforilada en macrófagos estimulados con PMA, mientras que en macrófagos no estimulados, no está presente. También se detecta una diferencia en fosforilación de las proteínas entre los pesos moleculares aproximados de 19 y 22 kDa, donde aparentemente hay menos fosforilación en células estimuladas con PMA.

En los lisados de estimaciones de las células NIH3T3 no se detectaban diferencias en los patrones de fosforilación entre células estimuladas 10 min con PMA (50 ng/ml) y células no estimuladas, por lo cual se pensó que la estimulación de la célula se lleva a cabo antes de los 10 min y por lo tanto se redujo el tiempo de estimulación a 1, 3 y 5 min. En la figura 13c el anticuerpo 1B6.5.1 detecta diferencias en los patrones de fosforilación de células NIH3T3 estimuladas 3 min con PMA, con respecto a las células control (sin

estímulo). Esto concuerda con lo reportado en la bibliografía, ya que se sabe que los eventos bioquímicos de la estimulación celular son rápidos y transientes.

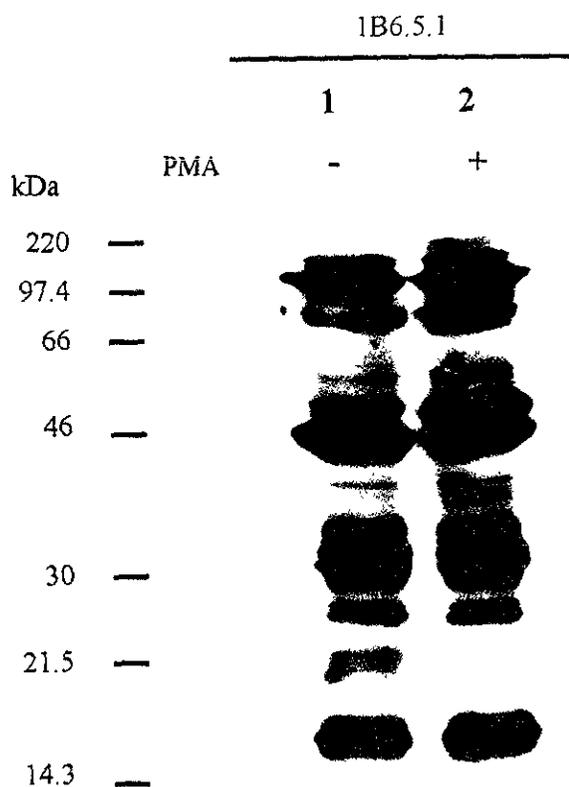


Figura 14. - Western Blot anti-fosfotirosinas de lisados celulares de J774 estimados y no estimados con PMA. Carril 1 células no estimuladas y Carril 2 células estimuladas 10 min con PMA a una concentración de 50 ng/ml. Anticuerpo 1B6 5.1 a una concentración de 10 µg/ml.

6.4.4. WESTERN BLOTS CON EL ANTICUERPO COMERCIAL ANTI-FOSFOTIROSINA PY 20

Con el fin de comparar nuestros nuevos anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina, en especial el anticuerpo 1B6.5.1, con el anticuerpo comercial anti-fosfotirosinas PY-20 se hicieron ensayos de Western Blots. Los resultados con el anticuerpo PY 20 no eran consistentes. En la mayoría de los ensayos no había una buena señal (Figura 15); en otros pocos identificaba bandas, pero con menor sensibilidad que el anticuerpo monoclonal 1B6.5.1 (Figura 16). La figura 15 muestra una comparación entre proteínas control (con tirosinas fosforiladas) y extractos de varias células tratadas con estímulos que se sabe activan cinasas de tirosina, como son los receptores Fc (que reconocen complejos inmunes de antígeno-anticuerpo) y las integrinas (que reconocen proteínas de matriz extracelular) (Kornberg et al, 1992; Juliano et al, 1993). Únicamente las proteínas control (carriles 4 y 7) son detectadas adecuadamente por el anticuerpo PY-20, mientras que con extractos celulares se ve una detección poco sensible.

En la figura 16, al contrario de los resultados anteriores, vemos que efectivamente el anticuerpo PY-20 reconoce proteínas fosforiladas de lisados celulares. Sin embargo, nuestro anticuerpo 1B6.5.1 puede ser más sensible a la concentración de proteína que se utilizó. Se utilizaron las concentraciones óptimas de cada anticuerpo: PY 20 a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$ (recomendada por el fabricante), y 1B6.5.1 a una concentración de 7 $\mu\text{g/ml}$ para lisados de fibroblastos.

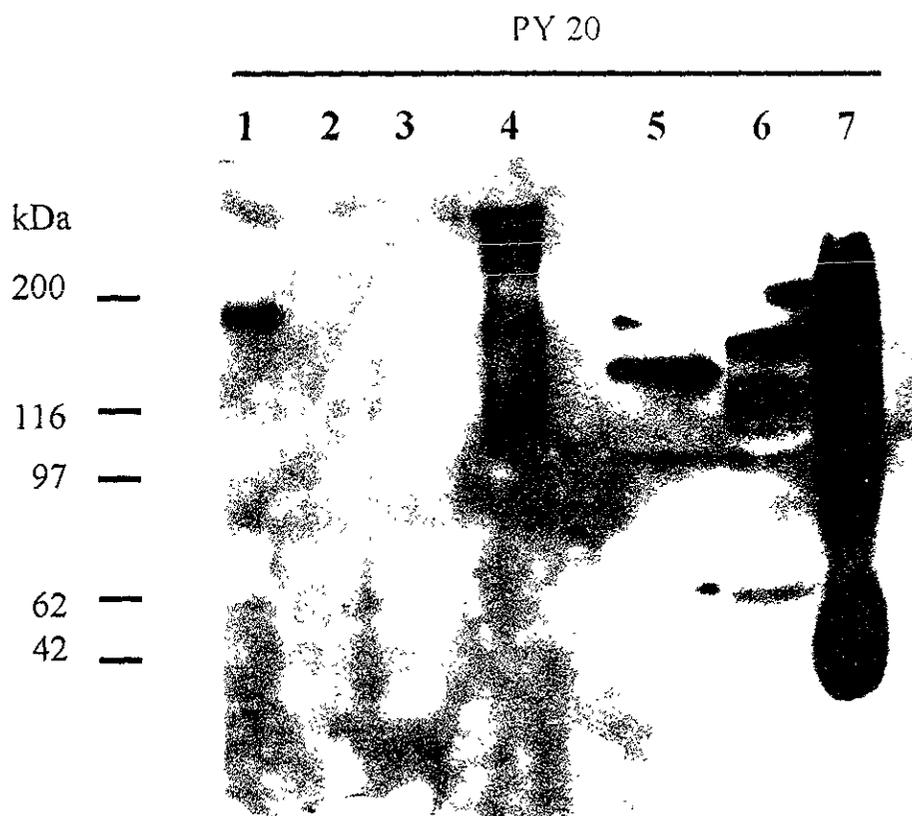


Figura 15. – Western Blot anti-fosfotirosinas con el anticuerpo comercial PY 20. Extracto total de línea celular de monocitos (THP-1) (carril 1); monocitos sin estímulo (carril 2), y estimulados con complejos inmunes insolubles (carril 3), proteína KLH fosforilada en tirosinas (carril 4); monocitos estimulados con anticuerpo monoclonal anti-integrinas β_1 (TS2/16) (carril 5) y anti-integrina β_2 (IB4) (carril 6); ovalbúmina fosforilada en tirosinas (carril 7). Cada carril con una concentración de proteína de 20 μg y el anticuerpo PY 20 a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Muestra a 10 $\mu\text{g}/\text{carril}$.

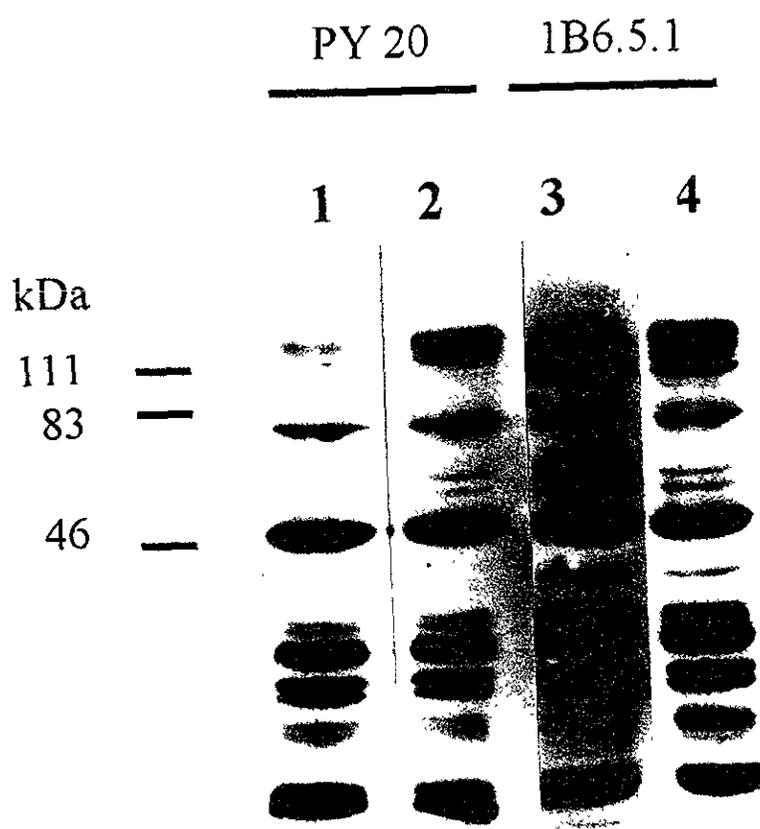


Figura 16. - Western Blot anti-fosfotirosinas con el anticuerpo comercial PY 20. Lisados celulares de fibroblastos NIH3T3 (30 μ g/ carril). Carriles 1 y 3: lisados de NIH3T3 estimulados 1 min con PMA (50 ng/ml). Carriles 2 y 4: lisados de NIH3T3 estimulados 5 min con PMA (50 ng/ml). Carriles 1 y 2 revelado con el anticuerpo monoclonal PY 20 (2 μ g/ml) y carriles 3 y 4 revelado con el anticuerpo monoclonal 1B6.5.1 (7 μ g/ml).

6.5. INMUNOPRECIPITACIONES

Se deseaba también saber cuál de los anticuerpos anti-fosfotirosina podía ser usado para inmunoprecipitaciones. Para probar esto se hicieron ensayos de inmunoprecipitaciones con cuatro de los mejores anticuerpos en ensayos de Western Blot: 1B6.5.1, 1B6.5.2, 1C2.3.1, y 1C6.1.1. Para la inmunoprecipitación los anticuerpos se utilizaron a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$. Después de tener los inmunoprecipitados se llevaron a cabo Western Blots de éstos utilizando el anticuerpo 1B6.5.1. a una concentración de 7 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 17b y parte de la 17a) y PY 20 a una concentración de 2mg/ml (Figura 17a).

Como se observa en la Figura 17 los anticuerpos son capaces de reconocer e inmunoprecipitar proteínas fosforiladas en residuos de tirosina y el anticuerpo 1B6.5.1 que se utilizó para el Western Blot detecta las proteínas inmunoprecipitadas con gran sensibilidad y sin ruido de fondo. En la Figura 17a se puede observar que el anticuerpo PY 20 reconoce las mismas bandas que el anticuerpo 1B6.5.1, aunque con menor intensidad las bandas de peso molecular aproximado de 46 kDa. Como controles de la inmunoprecipitación (carriles 3 y 4 de la figura 16a), el lisado que se utilizó para el carril 3 no se le agregó el anticuerpo sino que únicamente se incubó con la proteína A sefarosa, mientras que en el carril 4 se incubó el lisado toda la noche con la proteína A sefarosa y posteriormente se eliminó la proteína, tomando el sobrenadante que se incubó una vez más con la proteína A sefarosa. Estos resultados nos indican que existe pegado inespecífico de proteína con la proteína A sefarosa, y que las proteínas que se pegan inespecíficamente son de un peso menor de 46 kDa, aunque con lavados extensos se puede eliminar el pegado inespecífico (figura 18).

(a)

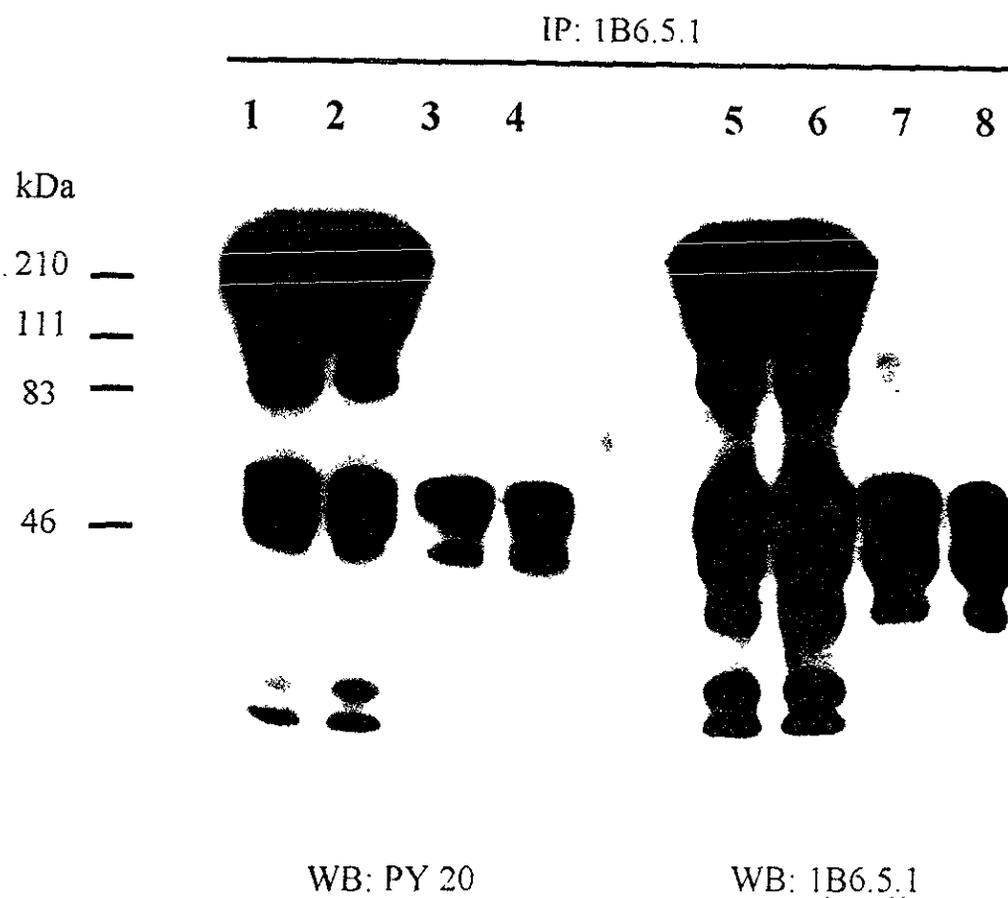


Figura 17. Western Blot de las inmunoprecipitaciones con los anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina. (a) Carriles 1, 2, 5 y 6: inmunoprecipitación de lisados de células NIH3T3 sin estímulo con anticuerpo monoclonal 1B6.5.1. Carriles 3 y 7: lisados de células NIH3T3 sin estímulo con incubación de 2 hrs con la proteína A sefarosa. Carriles 4 y 8 lisados de células NIH3T3 con una incubación previa de 12hrs con proteína A-sefarosa. posteriormente se eliminó la sefarosa y se trabajó con el lisado restante. Western Blot con anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosinas 1B6.5.1 a una concentración de 7 $\mu\text{g/ml}$.

(b)

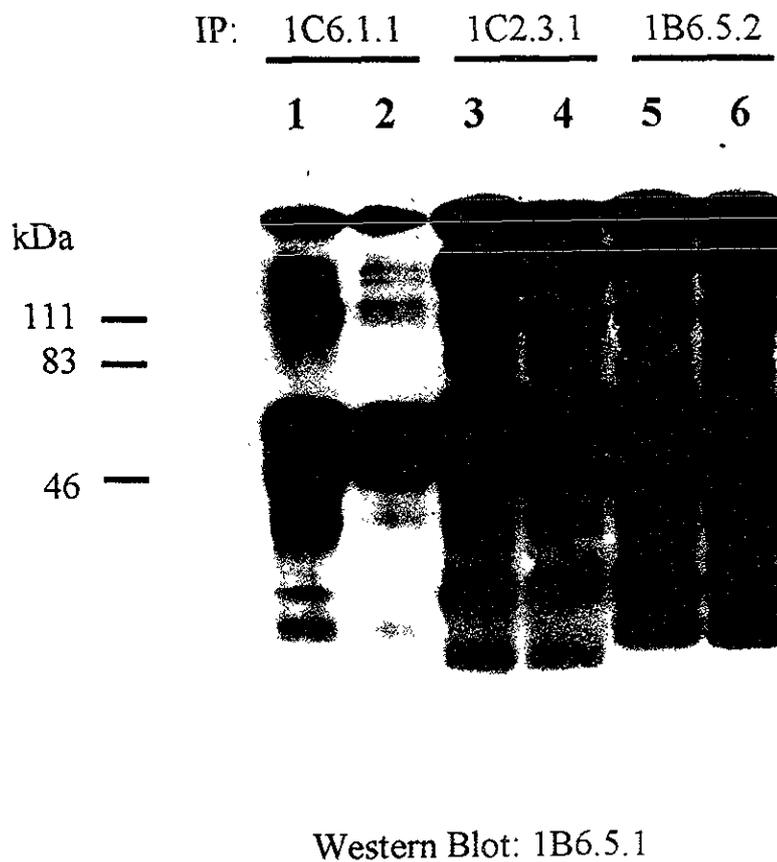


Figura 17b. - Inmunoprecipitación con anticuerpos 1B6.5.2, 1C2.3.1, y 1C6 1.1. (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) de lisados de células NIH3T3. Carriles 1, 3 y 5 lisados de células NIH3T3 sin estímulo y carriles 2, 4 y 6 lisados de células NIH3T3 estimuladas 3 min con PMA (50 ng/ml). Western Blot con anticuerpo monoclonal anti-fosfotirosinas 1B6 5.1 a una concentración de 7 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Por último se llevaron a cabo inmunoprecipitaciones con el anticuerpo anti-fosfotirosinas comercial (PY 20) (Figura 18) a una concentración de $10\mu\text{g/ml}$. Como se puede observar que el anticuerpo no inmunoprecipita muchas proteínas (comparar con Figura 16) y el Western Blot con el anticuerpo PY 20 tiene más ruido de fondo que el Western Blot de las inmunoprecipitaciones con el anticuerpo 1B6.5.1. En este experimento no se detectan las proteínas que se que se unían a la proteína A sefarosa, lo cual creemos que fue porque se hicieron más lavados durante la inmunoprecipitación (ver sección de material y métodos).

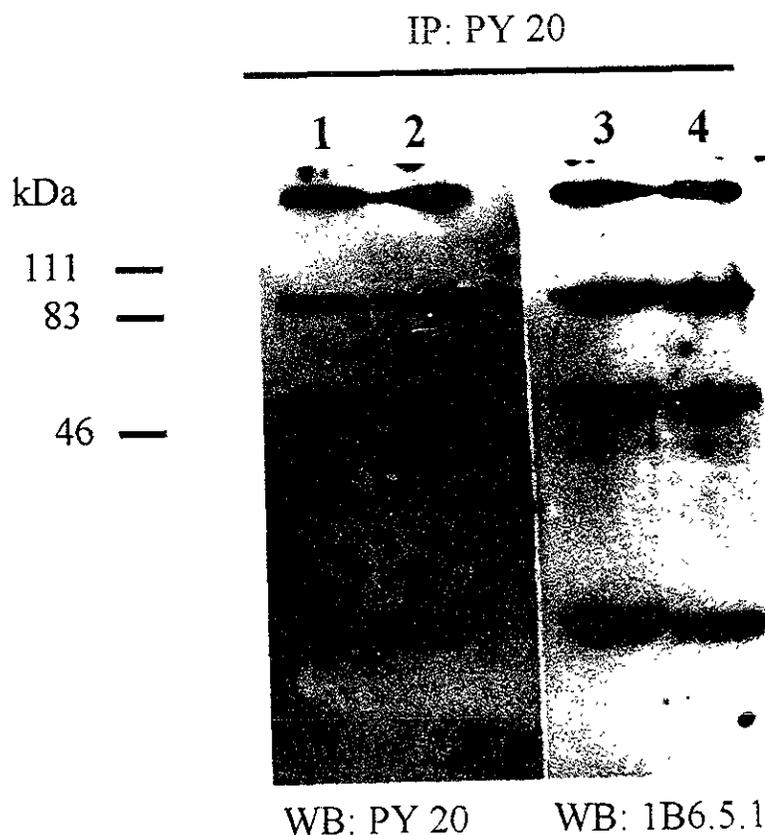


Figura 18. - Inmunoprecipitación con anticuerpo comercial anti-fosfotirosinas PY 20. Lisados celulares de fibroblastos NIH3T3 sin estímulo por duplicado. Para inmunoprecipitar se utilizó el anticuerpo PY 20 a $10\mu\text{g/ml}$. Western Blot con anticuerpo PY 20 ($2\mu\text{g/ml}$) lado izquierdo y 1B6.5.1 ($7\mu\text{g/ml}$) lado derecho.

7. DISCUSIÓN

Las células de un organismo son capaces de recibir señales químicas del exterior. Algunas de estas señales químicas activan a receptores en la superficie de la célula, lo cual induce una serie de mecanismos de transducción de señales intracelulares. Muchas veces estas señales llegan a influir sobre la expresión génica. Estos complejos mecanismos de señalamiento intracelular han sido estudiados a un nivel molecular en varios tipos celulares. Se ha encontrado que estas rutas moleculares juegan un papel muy importante en una variedad de fenómenos biológicos. Uno de los mecanismos de transducción de señales es por medio de las fosforilaciones de proteínas en residuos de tirosina, treonina y serina.

Una manera de detectar la participación de proteínas específicas durante el proceso de la transducción de la señal es por medio de su fosforilación en residuos de tirosina. Con la experiencia de varios trabajos se ha visto que la detección de las proteínas involucradas en estos eventos mediante ensayos de Western Blot es más eficiente con anticuerpos anti-fosfotirosina, en lugar que anti-fosfoserina o anti-fosfotreonina. Se han podido generar anticuerpos que reconocen tirosinas fosforiladas. Sin embargo los anticuerpos anti-fosfoserina y fosfo-treonina que se conocen no son muy específicos y en general presentan baja afinidad.

Existen anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina comerciales como el PY 20 y el 4G10. El problema con estos anticuerpos es el alto precio y en el caso del anticuerpo PY 20 la detección de las proteínas en Western Blots no es consistente de experimento a experimento lo cual dificulta la eficiencia del trabajo en el laboratorio. Por estas razones en el laboratorio se decidió obtener anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina que fueran capaces de detectar e inmunoprecipitar proteínas fosforiladas en tirosina sin que presentaran

los problemas de los anticuerpos anti-fosfotirosina comerciales en cuanto a consistencia y costo. Para esto se generaron hibridomas que secretaran anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina.

Este trabajo consistió en la purificación y caracterización de los anticuerpos monoclonales anti-fosfotirosina que se obtuvieron en el laboratorio (1B6.5.1, 1B6.5.2, 1C6.1.1, 1C6.2.1, 1C2.3.1 y 1C2.4.1). Como primer paso se determinaron los isotipos de anticuerpos con los que estabamos trabajando por medio de ensayo de ELISA. No es sorprendente encontrar que los anticuerpos 1B6.5.1 y 1B6.5.2 eran del mismo isotipo (IgG1), al igual que 1C6.1.1 y 1C6.2.1 (IgG2a) y 1C2.3.1 y 1C2.4.1 (IgG1), ya que son clonas de 1B6, 1C6 y 1C2 respectivamente.

Posteriormente se purificaron los anticuerpos empleando técnicas de precipitación y de separación por medio de cromatografía de afinidad. A continuación se quiso comprobar que los anticuerpos monoclonales obtenidos reconocían específicamente fosfotirosinas por lo cual se llevaron a cabo Western Blots con lisados de células tratadas con un inhibidor de cinasas de tirosina específico (tirfostina) antes de ser estimuladas. Se observó que las células estimuladas presentaban una diferencia en los patrones de fosforilación que en células no estimuladas. Pero cuando las células tratadas con el inhibidor de cinasas de tirosina y posteriormente estimuladas se observó que los patrones de fosforilación eran como el control (sin estímulo), lo que nos sugiere fuertemente que los anticuerpos monoclonales reconocen proteínas fosforiladas en tirosina. Otro experimento más directo fue el bloqueo de la unión antígeno-anticuerpo con el hapteno (fosfotirosinas) en un ensayo de Western Blot. En este experimento se observó que cuando se agregó el hapteno, las bandas que anteriormente fueron reconocidas por el anticuerpo desaparecían. Esto nos indica que el

anticuerpo reconoció y se unió al hapteno en solución, lo que ocasionó la falta de identificación de las proteínas fosforiladas. Por otra parte también se puede observar que cuando se compara el anticuerpo monoclonal comercial PY 20 con el 1B6.5.1 los patrones de reconocimiento son similares, lo cual también nos indica que el anticuerpo 1B6.5.1 reconoce específicamente fosfotirosinas.

Con los seis nuevos anticuerpos purificados se llevaron a cabo varios experimentos de Western Blots para ver cuál era el anticuerpo que reconocía más bandas de proteínas fosforiladas en tirosina de extractos celulares. Los lisados celulares se obtuvieron de células estimuladas con el éster de forbol PMA. Se sabe que los ésteres de forbol atraviesan la membrana celular hasta llegar al citosol donde interaccionan con la cinasa serina/treonina PKC. Lo que sucede posterior a esta estimulación no se ha definido, pero se sabe que PKC está involucrada en mecanismos de señalamiento intracelular que lleva a secreción de hormonas o enzimas, en diferenciación celular y en promoción de tumores, entre otras funciones. Por estas razones es muy probable que varias cinasas de tirosina sean activadas directa o indirectamente por la acción de ésteres de forbol como PMA.

Cuando se compararon los resultados de varios de los Western Blots de los seis diferentes anticuerpos monoclonales producidos, concluimos que bajo las condiciones establecidas del Western Blot el mejor anticuerpo era el 1B6.5.1, ya que los demás identificaban un menor número de proteínas fosforiladas en tirosinas o había mucho pegado inespecífico lo que ocasionaba ruido de fondo en los experimentos.

Se sabe que un anticuerpo que reconoce el hapteno en proteínas desnaturalizadas en una membrana de nitrocelulosa o PVDF no garantiza que sea capaz de inmunoprecipitar proteínas en forma nativa fosforiladas en tirosinas de un lisado celular. Por esta razón se

hicieron inmunoprecipitaciones con algunos de los anticuerpos monoclonales: 1B6.5.1, 1B6.5.2, 1C6.2.1 y 1C2.3.1, y se observó que todos eran capaces de inmunoprecipitar una gran cantidad de proteínas fosforiladas en tirosina. Para este tipo de ensayos pensamos que los mejores anticuerpos son 1C2.3.1 y 1B6.5.2, ya que inmunoprecipitan un mayor número de proteínas.

El anticuerpo 1B6.5.2, en el ensayo de Western Blot (figura 13a), no fue capaz de reconocer muchas de las proteínas, pero como en la inmunoprecipitación (figura 18b) es capaz de precipitar un gran número de proteínas, pensamos que las condiciones que se utilizaron en el Western Blot no eran óptimas para el anticuerpo y que al encontrar esas condiciones también funcione en este tipo de ensayos. De la misma manera pensamos que cada uno de los seis anticuerpos anti-fosfotirosina purificados tienen una condición óptima para Western Blot, pero bajo las condiciones establecidas, el mejor es el 1B6.5.1.

También se hicieron inmunoprecipitaciones con el anticuerpo comercial PY 20 y se puede observar que no es capaz de inmunoprecipitar la misma cantidad de proteínas fosforiladas en tirosina como los anticuerpos monoclonales obtenidos en el laboratorio

En los controles de la inmunoprecipitación es claro que algunas proteínas se unen inespecíficamente a la proteína A sefarosa. Aunque se hizo una incubación previa con la proteína A-sefarosa para tratar de que las proteínas que se pudieran pegar inespecíficamente fueran eliminadas; encontramos que aún hay algunas proteínas que se unen a la sefarosa inespecíficamente (Figura 17). Sin embargo, en la figura 18 no se observan las bandas de unión inespecífica. Nosotros pensamos que esto se debe a que se hicieron más lavados durante el ensayo de la figura 18, y que además había mucha más proteína en el lisado de la figura 17. Para eliminar esta unión inespecífica se puede utilizar procedimientos generales

reportados en la literatura, como es el bloque de sitios de unión inespecíficos con una proteína a alta concentración, por ejemplo BSA, gelatina, ovalbúmina, etc. También se puede disminuir las interacciones inespecíficas aumentando la fuerza iónica de la reacción. Esto se logra con la adición de una sal, comúnmente NaCl.

Con esto podemos concluir que el anticuerpo con mayor sensibilidad para ensayos de Western Blot es el 1B6.5.1, ya que identifica un mayor número de bandas y sin ruido de fondo. También se confirma que es específico contra fosfotirosinas y que es más sensible que el anticuerpo comercial PY 20. Para ensayos de inmunoprecipitación los mejores anticuerpos son 1B6.5.2 y 1C2.3.1, ya que son capaces de inmunoprecipitar una gran cantidad de proteínas. Sin embargo el anticuerpo 1B6.5.1 es capaz de inmunoprecipitar muchas más proteínas fosforiladas en tirosinas que el anticuerpo comercial PY 20. Con la producción de estos nuevos anticuerpos monoclonales tenemos la ventaja de producir más anticuerpos, ya que contamos con las clonas de hibridomas.

8. CONCLUSIONES

Los anticuerpos purificados de los hibridomas 1B6.5.1, 1B56.5.2, 1C2.3.1, 1C2.3 1, 1C6 1.1 y 1C6.2.1, reconocen con diferente sensibilidad a proteínas fosforiladas en residuos de tirosina. El anticuerpo 1C2.4.1 identifica bandas de proteínas fosforiladas en Western Blots, y los ensayos tienen mucho ruido de fondo la mayoría de veces. En general la calidad de los Western Blots con este anticuerpo no es muy buena.

El anticuerpo 1C6.2.1 identifica muy pocas bandas de proteínas fosforiladas, pero los Western Blots son muy limpios. El anticuerpo 1B6.5.2 identifica bandas y el ruido de fondo varía en los Western Blots. El anticuerpo 1C2.3.1 identifica bandas definidas, pero con mucho ruido de fondo. El anticuerpo 1C6.1.1 identifica pocas bandas sin ruido de fondo. Y por último el anticuerpo de la clona 1B6.5.1 fue el mejor para pruebas de Western Blot, pues identifica proteínas fosforiladas con gran sensibilidad y los resultados son muy limpios. Todos los anticuerpos probados también pueden inmunoprecipitar proteínas fosforiladas, aunque los mejores son 1B6.5.2 y 1C2.3.1 seguidos por 1B6.5.1. La inmunoprecipitación con estos anticuerpos resulta ser mejor que las inmunoprecipitaciones con el anticuerpo comercial PY 20.

Los anticuerpos fueron nombrados durante el proceso de selección. El mejor de los anticuerpos para Western Blots anti-fosfotirosina, el 1B6.5.1 se denominó finalmente AFT8 (anti fosfotirosina 8). El anticuerpo AFT8 fue utilizado en uno de Western Blots anti-fosfotirosina de un trabajo publicado (Sánchez-Mejorada et al, 1998).

ESTA TESIS DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

9. BIBLIOGRAFÍA

1. ABBAS A., LICHTMAN A., POBER J.: **Cellular and Molecular Immunology**. 3rd Edition. 1997, W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania. Chapter 5,12
2. ASAOKA Y., NAKAMURA S., YOSHIDA K., NISHISUKA Y.: **Protein Kinase C, calcium and phospholipid degradation**. *Trends Biochem. Sci.* 1992, 17: 414-417.
3. ÅKERSTRÖM B., BRODIN T., REIS K., BJÖRCK L.: **Protein G: A powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies**. *J. Immunol.* 1985. 135:2589- 2592.
4. AVRAMEAS S.: **Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies**. *Immunochimistry* 1969. 6: 43-52
5. AVRAMEAS S.: **Enzyme markers: Their linkage with proteins and use in immunohistochemistry**. *Histochem. J.* 1972, 4: 321-330.
6. BITTNER M., KUPFERER P., MORRIS C.: **Electrophoretic transfer of proteins and nucleic acids from slab gels to diazobenzyloxymethyl cellulose or nitrocellulose sheets**. *Anal. Biochem.* 1980, 102: 459-471.
7. BJÖRCK L., KRONVALL G.: **Purification and some properties of streptococcal protein G, a novel IgG- binding reagent**. *J. Immunol.* 1984, 133: 969-974
8. BOLEN J.: **Nonreceptor tyrosine kinases**. *Oncogene* 1993, 8:2025-2031
9. BRADFORD M.: **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding**. *Anal. Biochem.* 1976, 72: 248-254.

10. BURNETTE W.: **"Western Blotting": Electrophoretic transfer of proteins from SDS-PAGE to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioionated protein A.** *Anal. Biochem.* 1981, **112**: 195-203.
11. COHEN P.: **Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates.** *Trends Biochem. Sci.* 1992, **17** :408-413
12. DAWSON T., GISH G.: **SH2 and SH3 domains : from structure to function.** *Cell* 1992, **71** : 359-362.
13. DE FRANCO A.: **Between B cells and T cells.** *Nature* 1991, **351** : 603-604.
14. DE ST. GROTH S.F., SCHEIDEGGER D.: **Production of monoclonal antibodies. Strategy and tactics.** *J. Immunol. Methods.* 1980, **35** : 1-21.
15. EGAN S , WEINGERG R.: **The pathway to signal achievement.** *Nature* 1993, **365**. 781-783.
16. ELY P., PROWSE S., JENKIN C.: **Isolation of of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using protein A sepharosa.** *Biochemistry* 1978. **15**: 429-436.
17. ENGVALL E, PERLAMAN P.: **Enzyme-linked immosorbent assay (ELISA) quatitative assay of immonoglobulin G.** *Immunochemistry* 1972, **8** : 871-879.
18. ERLANGER B.F.: **The preparation of antigenic hapten-carrier conjugates: a survey.** *Meth. Enzymol.* 1980, **70**: 85-104.
19. FLASWINKEL K., BARNER M., RETH M.: **The tyrosine activation motif as a target of protein tyrosine kinases and SH2 domains.** *Seminars in Immunol.* 1995. **7** 21-27.
20. FREUND J : **The mode of action of immunologic adjuvants.** *Adv. Tubec. Res.* 1956. **7** 130-148.

21. GALFRE G, MILSTEIN C.: **Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures.** *Methods. Enzymol.* 1981, **73** : 3-46.
22. GAZIT A. **Tyrphostins I: synthesis and biological activity of protein tyrosine kinase inhibitors** *J. Med. Chem.* 1989 **32**: 2344-2352.
23. GEFTER M. L., MARGULIES D., SCHAFF M : **A simple method for polyethylene glycol hybridization of mouse myeloma cells.** *Somatic Cell Genet.* 1977, **3** .231-136
24. GODING J.: **Use of staphylococcal protein A as an immunological reagent.** *J. Immunol. Methods* 1978, **20** : 241-253.
25. HARLOW E., LANE D.: **Antibodies : A Laboratory Manual**, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988 New York Cap 3 al 7
26. HOOGERAAD N., WRAIGH C.: **The effect of pristane on ascites tumor formation and monoclonal antibody production.** *Methods Enzymol.* 1986, **121**: 375-381
27. HUNTER T.: **Protein Kinase classification.** *Methods Enzymol.* 1991, **200**: 3-37.
28. HUNTER T., KARIN M.: **The regulation of transcription by phosphorylation.** *Cell* 1992, **70**:375-387.
29. JULIANO R. L. HASKILL S.: **Signal transduction from extracellular matrix** *J. Cell. Biol.* 1993, **120**: 577-585.
30. KARIN M., HUNTER T.: **Transcriptional control by protein phosphorylation : signal transduction from the cell surface to the nucleus.** *Current Biology* 1995, **5**: 747-757.
31. KAZLAUSKAS A. **Receptor tyrosine and their targets.** *Current Biology* 1994, **4**. 5-14
32. KEARNEY J.F., RADBRUCH A., LIESEGANG B., RAJEWSKY K.. **A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits the construction of antibody-secreting hybrid cell lines.** *J. Immunol.* **132**: 1548-1550.

33. KLEIN J.: **Immunology**. First Edition. Blackwell Scientific Publications, Cambridge. Massachusetts.
34. KÖHLER G., MILSTEIN C.: **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity**. *Nature* 1975, **256**: 495-497.
35. KÖHLER G., HOWE S.C., MILSTEIN C.: **Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines**. *Eur. J. Immunol.* 1976, **6**: 292-295.
36. KORN A., FEARHELLER S., FILACHIONE: **Glutaraldehyde: Nature of the reagent**. *J. Mol. Biol.* 1971, **65**: 525-529.
37. KORNBERG L., EARP H., TURNER C., PROCKOP C., JULIANO R. L.: **Signal transduction by integrins: Increased protein tyrosine phosphorylation caused by clustering of β_1 integrins**. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1991, **88**: 8392-8396.
38. KORNBERG L., EARP H., PARSONS J.T., SCHALLER M., JULIANO R.: **Cell adhesion or Integrine clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase**. *J. Biol. Chem.* 1992, **267**: 23439-23442.
39. LEVITZKI A., GAZI A., OSHEROV N., POSHER I., GILON C.: **Inhibition of protein tyrosine kinases by tyrosine phosphatases**. *Meth. Enzymol.* 1991, **201**: 347-361.
40. LITTLEFIELD J. W.: **Selection of hybrids from matings in vitro and their presumed recombinants**. *Science* 1964, **145**: 709.
41. MACDONALD S., CREWS C., WU L., DRILLER J., CLARCK R., ERICKSON R., MCCORMICK F.: **Reconstitution of the Raf-1- MEK-ERK signal transduction pathway in vitro**. *Mol. Cell Biol.* 1993, **13**: 6615-6620.
42. MCCORMICK F.: **How receptors turn Ras on**. *Nature* 1993, **363**: 15-16
43. NISHIZUKA Y.: **Signal transduction crosstalk**. *Trends Biochem. Sci.* 1992, **17**: 367

44. PAZIN M., WILLIAMS L.: **Triggering signaling cascades by receptor tyrosine kinases.** *Trends Biochem. Sci.* 1992, **17** : 374-378.
45. PONTECORVO G.: **Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment.** *Somatic cell Genetics* 1975, **1**: 397-400.
46. POTTER M.: **Immunoglobulin-producing tumors and myeloma proteins of mice.** *Physiol. Rev.* 1972, **52**: 631-719
47. RODRIGUES G., PARK M.: **Oncogenic activation of tyrosine kinases.** *Curr. Op. Gen. Develop.* 1994, **4** :15-24.
48. ROITT L., BROSTROFF J., MALE D.: **Inmunología.** 1996 MEDSI. Barcelona. España. Cap. 1 pp 1.1-1.12 y 25.2.
49. ROSALES C., O'BRIEN V., KORNBERG L , JULIANO R.: **Signal transduction by cell adhesion receptors.** *Bioch. Biophys. Acta* 1995, 77-98.
50. RUSS C., CALLEGRO I, LANZA B., FERRONE S.: **Purification of IgG monoclonal antibody by caprylic acid precipitation.** *J. Immunol. Methods* 1983, **65**: 269-271.
51. SÁNCHEZ -MEJORADA G., ROSALES C.: **Fcγ receptor-mediated mitogen activated protein kinase activation in monocytes is independent of Ras.** *J. Biol. Chem.* 1998. **273**: 27610-27619.
52. SCHLESSINGER J.: **SH2/SH3 signaling proteins.** *Curr. Op. Gen. Develop* 1994, **4** 25-30.
53. SCOUTEN W.: **A survey of enzyme coupling techniques.** *Methods Enzymol.* 1987. **135**: 30-65.
54. SHULMAN M., WILDE C.D., KÖHLER G.: **A better cell line forming hybridomas secreting specific antibodies.** *Nature* , 1978 **276**: 269-270.

55. TIJSEN P., KURSTAK E.: **Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates for enzyme immunoassays.** *Anal. Biochem.* 1984, **136**: 451-457.
56. TROWBRIDGE I.: **Interspecies spleen-myeloma hybrid producing monoclonal antibodies against mouse lymphocyte surface glycoprotein T200.** *J. Exp. Med.* 1978, **148**: 313-323.
57. UEHARA Y., MURAKAMI Y., SUGIMOTO Y., UMEZAWA H. : **Mechanism of reversion of Rous Sarcoma virus transformation by herbamycin A: reduction of total phosphorylation levels due to reduced kinase activity and increased turnover of p60^{src1}** *Cancer Res.* **43**: 614.
58. VOJTEK A., HOLLENBERG S., COOPER J.: **Mammalian Ras interacts directly with the serine/threonine kinase Raf.** *Cell* 1993, **74**: 205-214.