

03088

5
AM

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

UACPyP/CCH

CLONACION Y EXPRESION DE LA REGION
VARIABLE DEL ANTICUERPO MONOCLONAL
NEUTRALIZANTE BCF2, DIRIGIDO CONTRA
LA TOXINA 2 DEL ALACRAN *Centruroides*
noxius

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A

ALEXEI FEDOROVISH LICEA NAVARRO

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

RESUMEN

En esta tesis se reporta la caracterización del anticuerpo monoclonal BCF2 y la clonación y expresión de la región variable del mismo. El anticuerpo BCF2 es capaz de reconocer y neutralizar la toxina 2 del veneno del alacrán *Centruroides noxius*. En este trabajo se reporta la preparación de el anticuerpo completo y de los fragmentos Fab, para su utilización en experimentos de neutralización en ratones de la cepa CD1 utilizando la toxina Cn2 y el veneno completo. El anticuerpo monoclonal BCF2 es capaz de neutralizar 28 DL₅₀ por mg de anticuerpo, mientras que el fragmento Fab neutraliza 43 DL₅₀ por mg de fragmento. Se realizaron ensayos de neutralización con el antisero comercial, y para neutralizar 28 o 43 DL₅₀, se necesita nueve veces más de proteína, esto en términos molares.

Utilizando 1 gr de células productoras del anticuerpo BCF2, se realizó un banco de ADNc, del cual se aislaron los genes codificantes para la cadena pesada y ligera del anticuerpo monoclonal, se obtuvo la secuencia de nucleótidos de la región variable de ambas cadenas y se dedujo la secuencia de aminoácidos. Utilizando esta información, se realizó la construcción de un gen codificante de una proteína del tipo scFv, la cual inicia con la región variable de la cadena pesada, péptido de unión y región variable de la cadena ligera. Esto se clonó en un vector de expresión y se transformó en varias cepas de *E. coli*, lograndose inducir la producción de la proteína de interés y su purificación en una columna de afinidad.



Vo. Bo. Dr. Lourival D. Possani Postay
Dr. Baltazar Becerril Lujan

Este trabajo fué realizado en el laboratorio del Dr. Lourival D. Possani Postay, del Departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura del Instituto de Biotecnología/UNAM. Parte del trabajo fué realizada en el Laboratorio del Dr. Jorge V. Gavilondo, del departamento de Inmunodiagnóstico y Anticuerpos Recombinantes del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba.

COMITE TUTORIAL

Dr. Lourival D. Possani Postay
Dr. Baltazar Becerril Luján
Dr. Oscar Tonathiu Ramírez
Dr. Paul M. Lizardi
Dr. Edmundo de Ibis Lamoyi

JURADO DE EXAMEN

Dr. Lourival D. Possani Postay
Dr. Baltazar Becerril Luján
Dr. Eduardo Horjales Robledo
Dr. Edmundo de Ibis Lamoyi
Dr. Mario Zurita Ortega
Dra. Gloria Soberón Chavez
Dra. Yvonne Rosenstein Azoulay

RECONOCIMIENTO POR APOYO ECONOMICO

Parte de este trabajo fué financiado con auxilio recibido de la Universidad Nacional Autónoma de México (DGAPA IN 211996) y del Howard Hughes Medical Institute (No. 75191-527104).

El alumno recibió beca de doctorado del Consejo Nacional de Ciencias y Tecnología (CONACyT No. 85805), y fué admitido como candidato a investigador por el Sistema Nacional de Investigadores. Se agradece el apoyo específico otorgado por la Secretaría de Desarrollo y Bienestar Social del Estado de Baja California, durante el periodo del postgrado.

RESUMEN

En esta tesis se reporta la caracterización del anticuerpo monoclonal BCF2 y la clonación y expresión de la región variable del mismo. El anticuerpo BCF2 es capaz de reconocer y neutralizar la toxina 2 del veneno del alacrán *Centruroides noxius*. En este trabajo se reporta la preparación de el anticuerpo completo y de los fragmentos Fab, para su utilización en experimentos de neutralización en ratones de la cepa CD1 utilizando la toxina Cn2 y el veneno completo. El anticuerpo monoclonal BCF2 es capaz de neutralizar 28 DL₅₀ por mg de anticuerpo, mientras que el fragmento Fab neutraliza 43 DL₅₀ por mg de fragmento. Se realizaron ensayos de neutralización con el antisuero comercial, y para neutralizar 28 o 43 DL₅₀, se necesita nueve veces más de proteína, esto en términos molares.

Utilizando 1 gr de células productoras del anticuerpo BCF2, se realizó un banco de ADNc, del cual se aislaron los genes codificantes para la cadena pesada y ligera del anticuerpo monoclonal, se obtuvo la secuencia de nucleótidos de la región variable de ambas cadenas y se dedujo la secuencia de aminoácidos. Utilizando esta información, se realizó la construcción de un gen codificante de una proteína del tipo scFv, la cual inicia con la región variable de la cadena pesada, péptido de unión y región variable de la cadena ligera. Esto se clonó en un vector de expresión y se transformó en varias cepas de *E. coli*, lograndose inducir la producción de la proteína de interés y su purificación en una columna de afinidad.

SUMMARY

The characterization of BCF2 (a hybridoma cell line that produces a monoclonal antibody) is reported in this thesis, including the cloning and expression of the variable region of BCF2. This monoclonal antibody recognizes and neutralizes toxin 2 (Cn 2) from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius*. In this work, the preparation of the complete antibody molecule and its Fab fragments are reported. The use of both products for neutralization of the purified Cn 2 toxin and the whole soluble venom, in mice of the strain CD1, was investigated. The complete BCF2 molecule is capable of neutralizing 28 LD₅₀ per mg of antibody, whereas the Fab fragment neutralizes 43 LD₅₀ per mg of fragment. Comparatively, neutralization experiments were performed with polyclonal horse antiserum commercially available. For neutralization of 20 or 43 mice DL₅₀ values, respectively, when using the commercial antiserum, it was needed about nine times more protein (on molar amounts) than when the BCF2 antibody or its Fab fragment were used.

From 1 gram of BCF2 cultured cells, a cDNA bank was prepared. The genes encoding the heavy and light chains of this monoclonal antibody were cloned and sequenced. The nucleotide sequences of both the heavy and light chain variable regions were determined and the corresponding amino acid sequences were deduced. Based on this information, a new gene coding for a protein containing only the scFV region of the antibody molecule was prepared. It begins with the variable region of the heavy chain, has an additional linker peptide and finishes with the variable region of the light chain. This construct was cloned in an expression vector and various strains of *E. coli* were transformed with this new gene. The single-chain protein, containing the scFV part of BCF2, was finally expressed and purified by affinity column.

ABREVIATURAS

A	Alanina
ADN	Acido desoxirribonucleico
ADNc	Acido desoxirribonucleico complementario
ARNm	Acido ribonucleico mensajero
BSA	Albumina sérica bovina
C	Cisteina
CDR	Región determinante de la complementariedad
Ch. Os.	Choque osmótico
CH1	Primer dominio constante de la cadena pesada
CH2	Segundo dominio constante de la cadena pesada
CH3	Tercer dominio constante de la cadena pesada
CL	Región constante de la cadena ligera
Cn2	Toxina 2 de <i>Centruroides noxius</i>
COOH	Extremo carboxilo terminal
D	Acido aspártico
DTT	Ditiotreitol
E	Acido glutámico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etilendinitrilotetracetato disódico
F	Fenilalanina
Fab	Fracción de unión al antígeno
Fc	Fracción cristalizabile
FR	Región marco
Fv	Región variable
G	Glicina
h	Hora
H	Cadena pesada
H	Histidina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Acido clorhídrico
I	Isoleucina
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina tipo G
IPTG	Isopropil β-D-tiogalacto-piranosido
K	Lisina
Kb	Kilobases
KCl	Cloruro de potasio
KDa	Kilodaltons
L	Leucina
L	Cadena ligera
M	Molar
mg	Miligramos
µg	Microgramos
MgCl	Cloruro de magnesio

min	Minutos
mL	Mililitros
μ L	Microlitros
mM	Milimolar
μ M	Micromolar
N	Aspargina
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO_3	Bicarbonato de sodio
NaOH	Hidroxido de sodio
ng	Nanogramos
NH_2	Extremo amino terminal
Ni^{2+}	Niquel
O.N.	Toda la noche
$^{\circ}\text{C}$	Grados centigrados
P	Prolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Marcador de peso molecular
Q	Glutamina
R	Arginina
RPM	Revoluciones por minuto
S	Serina
scFv	Región variable de cadena sencilla
SDS	Dodexil sulfato de sodio
seg	Segundos
T	Treonina
UFP	Unidades formadores de placas
US	Ultrasonido
V	Región variable
V	Valina
VH	Región variable de la cadena pesada
VL	Región variable de la cadena ligera
W	Triptofano
Y	Tirosina
[^{35}S]dATP	Desoxiadenosintrifosfato radioactivo

INDICE DE FIGURAS

Fig.1.- Inmunoglobulina del tipo IgG.....	02
Fig.2.- Subdivisiones de la región variable.....	03
Fig.3.- Hidrólisis de anticuerpos.....	05
Fig.4.- Representación de un scFv.....	09
Fig.5.- Construcción de un scFv.....	11
Fig.6.- Secuencia de aminoácidos de la toxina 2.....	13
Fig.7.- Plásmido pPACIB.3.....	33
Fig.8.- Plásmido pPACIB.7.....	34
Fig.9.- Amplificación de las regiones variables de la cadena pesada y ligera.....	39
Fig.10.- Construcción del gen scFv.....	44
Fig.11.- Análisis de producción en varias cepas de <i>E. coli</i>	45
Fig.12.- Inducción y purificación del scFv.....	47
Fig.13.- ELISA de extractos celulares que contienen el scFv.....	48

INDICE

INTRODUCCION.....	01
1.- Estructura de las Inmunoglobulinas.....	01
2.- Clonación de los Genes Variables.....	07
ANTECEDENTES.....	12
OBJETIVOS.....	17
RESULTADOS PUBLICADOS	
" Fab Fragments of the Monoclonal Antibody BCF2 are Capable of Neutralizing the Whole Soluble Venom from the Scorpion <i>Centruroides noxius</i> Hoffmann".....	18
MATERIALES Y METODOS.....	23
1.- Búsqueda en el Banco de ADN.....	23
a) Crecimiento e Infección de la Cepa <i>E. coli</i> Y1090 con el Bacteriófago λ gt11.....	23
b) Levantamiento y Tratamiento de las Placas de Lisis.....	23
c) Prehibridación.....	24
d) Hibridación.....	24
2.- Reacción en Cadena de la Polimerasa.....	25
3.- Transformación de la cepa de <i>E. coli</i> DH5 α con el plásmido pKs.....	26
4.- Purificación de plásmido.....	26
5.- Secuencia de ADN de doble cadena.....	27
a) Desnaturalización del ADN.....	27
b) Hibridación de ologonucleótios con el ADN del plásmido.....	28
c) Reacción de secuencia (Extensión).....	28
d) Terminación.....	29
6.- Western Blot.....	29

7.- ELISA.....	30
8.- Plásmidos de Expresión Utilizados.....	31
a) Plásmido pPACIB.3.....	31
b) Plásmido pPACIB.7.....	32
9.- Oligonucleótidos Utilizados.....	35
RESULTADOS NO PUBLICADOS.....	37
1.- Búsqueda en el banco de ADNc.....	37
2.- Amplificación de las regiones variables.....	37
3.- Secuenciación de las regiones variables.....	38
a) Secuencia de nucleótidos de la región variable pesada.....	40
b) Secuencia deducida de aminoácidos de la cadena pesada.....	40
c) Secuencia de nucleótidos de la región variable ligera.....	41
d) Secuencia deducida de aminoácidos de la cadena ligera.....	41
4.- Construcción del gen scFv de BCF2.....	42
5.- Análisis de expresión en varias cepas de <i>E. coli</i>	44
6.- Purificación por columna de metales.....	46
DISCUSION.....	49
CONCLUSIONES.....	53
PERSPECTIVAS.....	54
BIBLIOGRAFIA.....	55
SOLICITUD DE DEPOSITO DE UNA PATENTE.....	60
ANEXOS.....	62

INTRODUCCION

Cuando una molécula extraña entra a un organismo vertebrado, se desencadenan una serie de reacciones para eliminar esta molécula o bien, para neutralizarla. Estos mecanismos de defensa están clasificados en dos tipos: respuesta de tipo celular y respuesta de tipo humoral. La respuesta de tipo celular comprende a los linfocitos T y la respuesta de tipo humoral comprende a los linfocitos B con la subsecuente producción de anticuerpos o inmunoglobulinas (Abbas, 1991).

En esta tesis se describirá la estructura de las inmunoglobulinas, así como las metodologías de ácido desoxirribonucleico (ADN) recombinante mediante las cuales se manipulan las porciones más relevantes de los anticuerpos.

1.- ESTRUCTURA DE LAS INMUNOGLOBULINAS

Una inmunoglobulina (Ig) monomérica (Fig. 1), está compuesta por cuatro cadenas polipeptídicas; dos cadenas pesadas idénticas (H, de su sigla en inglés heavy) y dos cadenas ligeras idénticas (L, de su sigla en inglés light). Ambas cadenas (L y H) se encuentran unidas entre sí por medio de enlaces disulfuro (Gally, 1973) y están organizadas en dominios, cada uno de ellos contiene una longitud aproximada de 110 aminoácidos (Edelman, 1970).

El dominio que se encuentra en la región amino terminal, tanto de la cadena H como de la cadena L, se denomina región variable (V), el cual tiene aproximadamente de 107 a 118 aminoácidos (Fig. 1) (Tonegawa, 1983). Dentro del dominio V, se encuentran tres áreas de alta variabilidad (regiones hipervariables), las cuales están separadas entre sí por secuencias de aminoácidos relativamente constantes, llamadas también regiones marco (FR) (Fig. 2) (Kabat, 1991). El conjunto de las regiones hipervariables de la cadena H y L, forman el sitio de unión al antígeno. A las regiones hipervariables se les conoce también como región determinante de la complementariedad (CDR, de sus siglas en inglés complementarity-determining regions) (Kabat, 1982).

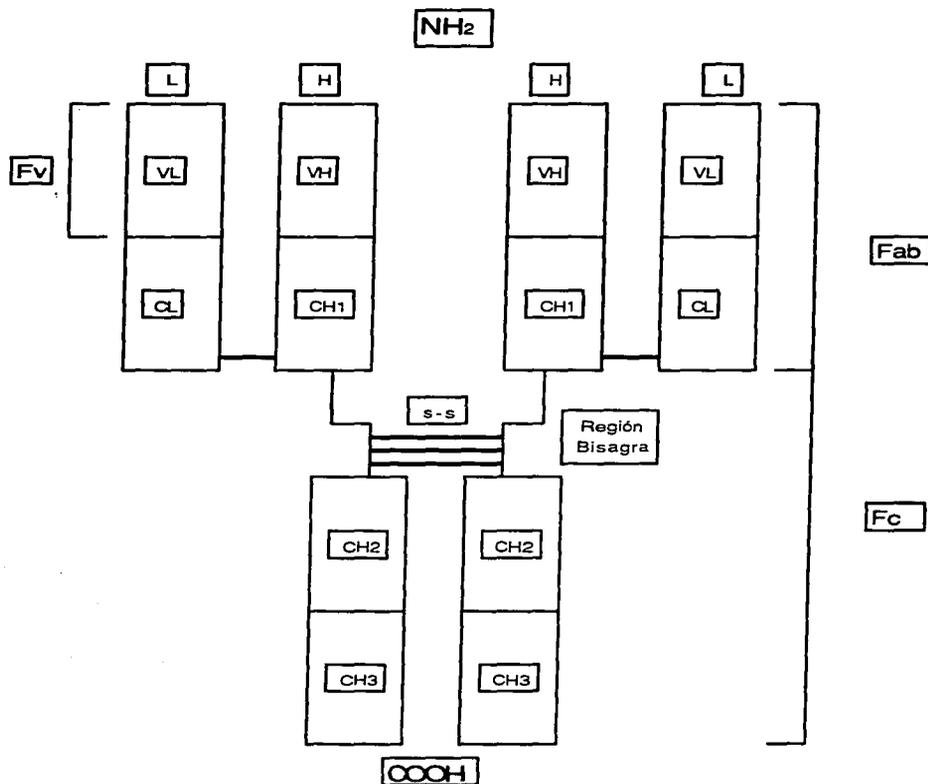


Fig.1.- Inmunoglobulina del Tipo IgG.- En la figura se aprecia una representación esquemática de una inmunoglobulina monomérica del tipo IgG, se muestran los dominios y subdominios más representativos.

La ubicación de los CDRs no es continua si se analiza desde el punto de vista de secuencia lineal, pero cuando se analiza la secuencia tridimensional de un anticuerpo, los CDRs forman asas que sobresalen sobre la estructura de los residuos más conservados (FR). Estos residuos conservados constituyen el 75% de toda la región V tanto en la cadena ligera, como en la cadena pesada (Chothia, 1989).

El sitio formado por la proyección de las asas de los CDRs es el que se encuentra en contacto directo con el antígeno. Estas asas varían en tamaño y en forma entre anticuerpo y anticuerpo. Se conoce que la contribución de los residuos de los CDRs de la cadena pesada es fundamental para la unión del antígeno. Sin embargo, no se excluye la importancia de los CDRs de la cadena ligera en la unión entre antígeno y anticuerpo. Se ha demostrado que algunos residuos de las regiones marco son importantes para una adecuada proyección de las asas, e incluso pueden interactuar directamente con el antígeno.

Los dominios restantes, no incluidos en la región V, tanto de la cadena H como de la cadena L, son relativamente conservados, por lo cual se les denomina regiones constantes (Fig 1). Sin embargo, existen varios tipos de regiones constantes, o bien, varios isotipos. Estos fueron clasificados originalmente de acuerdo a la reactividad que mostraban ante antisueros específicos (Kabat, 1991). Por ejemplo, en el ratón los distintos isotipos que se encuentran son: IgM, IgD, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG₃, IgE e IgA, y estos están determinados por la región constante de la cadena H. Para la cadena L existen solo dos isotipos, kappa (κ) y lambda (λ) (Gally, 1973).



Fig 2.- Subdivisiones de la Región Variable.- En esta figura se pueden apreciar las tres áreas hipervariables (CDR1, 2 y 3), las cuales se encuentran dentro de los dominios variables tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera. Estas áreas de alta variabilidad, se encuentran flanqueadas por regiones relativamente constantes (FR1, 2, 3 y 4).

Los dominios constantes 1 y 2 de la cadena pesada (CH1 y CH2) están unidos entre sí por una secuencia de aminoácidos llamada región "bisagra", esta comprende una secuencia rica en prolínas y tiene una longitud entre 10 y 60 aminoácidos. Es también dentro de esta región, donde se encuentran las cisteínas que dan lugar a los enlaces disulfuro para unir las dos cadenas pesadas entre sí (Fig. 1).

Las inmunoglobulinas son moléculas glicosiladas, con los carbohidratos añadidos, generalmente, en el segundo dominio de la región constante (Fig. 1). Esta unión se forma generalmente en el grupo NH₂ de la asparagina y la N-acetilglucosamina. La glicosilación parece jugar un papel importante en la secreción de las inmunoglobulinas, y en el control de su catabolismo. No ha sido demostrado que la glicosilación sea importante para el reconocimiento del antígeno, aun cuando en muy pocas ocasiones esta se encuentre en el dominio CH1 de la región constante. El hecho de la no colaboración de el azúcar en el reconocimiento antígeno-anticuerpo, brinda la posibilidad de expresar fragmentos de anticuerpos en bacterias como *Escherichia coli* (Plückthum, 1992).

La región comprendida entre los dominios CH2 y CH3 de las dos cadenas H, se denomina Fc o región cristalizante, a su vez, la región comprendida por los dominios V de ambas cadenas (H y L) se llama Fv (Fig 1 y 3).

Mediante hidrólisis proteolítica de los anticuerpos se pueden obtener varios fragmentos dependiendo de donde es que actúe la enzima. Si la enzima hidroliza sobre el amino de la región bisagra (papaina), se obtienen dos fragmentos Fab y un fragmento Fc. El fragmento Fab comprende el Fv y los dos dominios constantes CL y CH1 (Fig. 3). Sin embargo, si la enzima actúa sobre el extremo carboxilo de la región bisagra (pepsina), se puede obtener un fragmento F(ab)'₂ y un fragmento Fc (Fig. 3) .

Los fragmentos Fab son fácilmente cristalizables, y son de gran utilidad en aquellas aplicaciones donde no se requiere de las funciones efectoras de los dominios constantes de los anticuerpos. Su menor talla favorece su manipulación y en el caso de usos

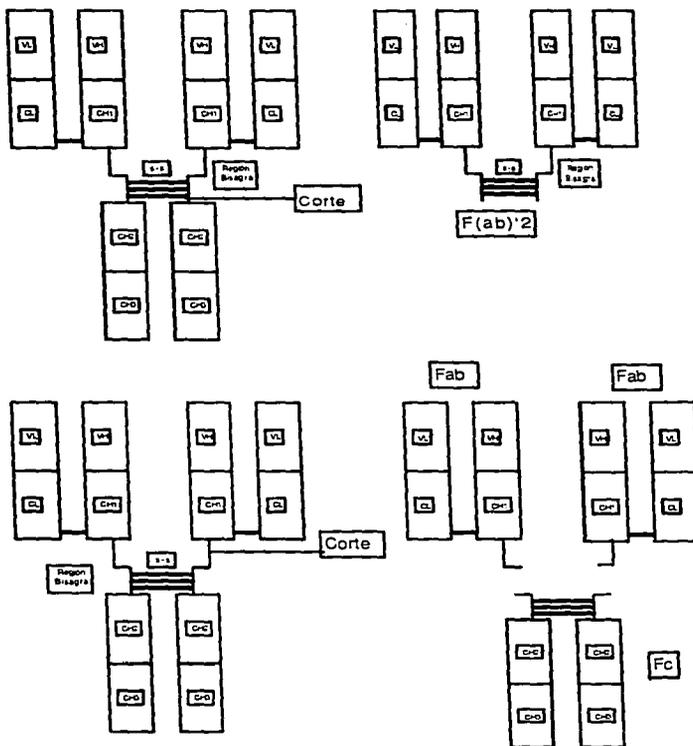


Fig. 3.- Hidrólisis de Anticuerpos.- Como se observa en la figura, dependiendo del sitio de corte de la enzima, serán los productos obtenidos. Si la enzima corta por el extremo amino de la región bisagra, se obtienen dos Fab y un Fc. En cambio, si el corte se produce por el extremo carboxilo de la región bisagra, se obtiene un F'(ab)₂ y el Fc se degrada.

terapéuticos su biodistribución, efectividad y depuración se ven incrementadas (Wright, 1992).

La obtención de los fragmentos Fab de un anticuerpo por digestión enzimática, se ve afectada por problemas de rendimiento, reproducibilidad y de la calidad que se requiere para su empleo de terapia en humanos, sin mencionar el elevado costo que representa su obtención (Adair, 1992).

No obstante todas las limitaciones, las perspectivas de aplicación de los fragmentos en lugar de la molécula completa son amplias. A continuación se enumeran algunas de las características que muestran estos fragmentos comparados con el anticuerpo completo.

- Los fragmentos presentan idéntica especificidad y afinidad por el antígeno.
- Su avidéz puede ser idéntica si se trata de un fragmento divalente.
- Al tener menor tamaño, poseen mayor poder de penetración en tejido.
- En casos de uso en terapia para detoxificación, son depurados del organismo mucho más rápido que el anticuerpo completo.
- Su manipulación genética permite sistemas de expresión como bacterias y levaduras, los cuales ofrecen grandes ventajas sobre la expresión en células linfoides.

Algunas de las aplicaciones que se le pueden dar a estos fragmentos son:

- Inmunodiagnóstico.
- Inmunoradioterapia.
- Terapia mediante inmunotoxinas y conjugados.
- Neutralización de toxinas.
- Detoxificación de fármacos.

- Catálisis de procesos bioquímicos.
- Inmunopurificación.

II.-CLONACION DE LOS GENES VARIABLES

Son varios los fragmentos de anticuerpos que se han clonado y son varias las modalidades que se han utilizado. Los primeros trabajos de clonación de genes de inmunoglobulinas que se realizaron provenían de bibliotecas de ADN genómico de varios linajes celulares. Estos podían ser hibridomas, linfocitos B o algunas líneas de tumores. Fundamentalmente se utilizaba el fago λ (Shin, 1992).

Este procedimiento era largo y tedioso, ya que era necesario identificar aquellas clonas portadoras de fragmentos con alelos arreglados, y luego, discriminar las construcciones que contenían genes funcionales completos. Por otra parte, la presencia de intrones y exones en las secuencias a clonar, dificultaba más la metodología.

Con la introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés polymerase chain reaction), se facilitó la manipulación de los genes variables de las inmunoglobulinas, lo cual a su vez, contribuyó al desarrollo de la ingeniería genética de anticuerpos.

El PCR puede ser utilizado para aislar genes individuales o familias completas de inmunoglobulinas. El único requisito es conocer previamente las secuencias que las flanquean. En los últimos años, se ha recopilado una gran cantidad de información respecto a estas secuencias, tal es así que existen varias bases de datos de secuencias de proteínas de interés inmunológico de varias especies. Por ejemplo, la base de datos más conocida y empleada en esta área, es la de Kabat (Kabat, 1991), la cual contiene información de secuencias para nueve especies diferentes, entre las cuales se encuentran de humano, ratón, rata y conejo. Esto por supuesto ha facilitado el diseño de

oligonucleótidos universales que amplifican regiones variables únicas o de familias de genes (Huse, 1989).

Las secuencias más utilizadas para amplificar las regiones variables son las que hibridizan en la región FR1 o en el péptido señal, esto para la región 5', y para el extremo 3' del gen se utilizan la secuencias del FR4 o los primeros nucleótidos de la región constante, de CH1 para la cadena pesada y de kappa o lambda para la cadena ligera.

El PCR también ha sido utilizado para la construcción de fragmentos variables de una sola cadena (scFv, de sus siglas en inglés single chain Fv) (Fig.4) y de algunos complejos de scFv y otras proteínas de fusión. La primera aplicación consistió en la obtención de genes de inmunotoxinas (Buchner, 1992), donde los oligonucleótidos empleados para la amplificación de las regiones variables, además de la información de hibridización de las regiones variables, contenían parte de la secuencia del péptido de unión y sitios de restricción apropiados para el ligamiento de los dominios amplificados.

Con la utilización de la ingeniería genética de anticuerpos, se pueden aislar anticuerpos que no podrían obtenerse por medios convencionales. Como por ejemplo, anticuerpos dirigidos contra antígenos propios (Weissenhorn, 1992); anticuerpos en cantidades suficientes para su estudio, como son IgD e IgE (Shin, 1992); anticuerpos quiméricos (Dübel, 1995; Lilliey, 1994; Knappik, 1994; Neri, 1995), se puede "camellizar" la región variable de la cadena pesada para expresarla como mínimo dominio de anticuerpo capaz de reconocer un antígeno (Davies, 1995) y se pueden obtener bancos de anticuerpos para "transformar" un anticuerpo murino en anticuerpo humano (Jespers, 1994). Estas son algunas de las muchas ventajas que ofrece la ingeniería genética de anticuerpos sobre la forma tradicional de obtención de anticuerpos.

En la fig. 5 se muestran las dos formas más utilizadas para construir un scFv. En la primera de ellas, el oligonucleótido que hibridiza con la región 3' de la región variable de la cadena pesada, contiene la mitad del gen codificante para el péptido de unión, también contiene un sitio de reconocimiento para una enzima de restricción (*Asc I*). Por otro lado, el oligonucleótido que se une a la parte 5' de la cadena ligera, contiene

la otra mitad codificante del péptido señal y el mismo sitio de reconocimiento enzimático. Una vez amplificadas las regiones variables por separado, se digiere con la enzima de restricción adecuada y se realiza una reacción de ligación. La otra metodología frecuentemente utilizada, es la de diseñar un oligonucleótido que contenga toda la secuencia codificante del péptido de unión, y que además contenga una región de hibridización para el extremo 3' de la cadena pesada y para el extremo 5' de la cadena ligera, esto siempre y cuando la construcción lleve el orden "pesada-péptido de unión-ligera".

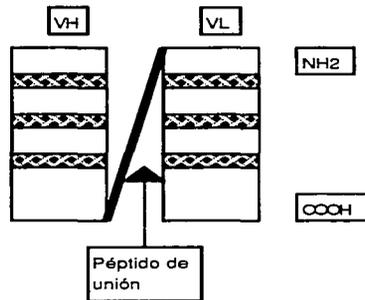


Fig. 4.- Representación de un scFv.- Esta proteína está formada por las dos regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera, se encuentran unidas entre si por un péptido de unión de generalmente 15 aminoácidos. En el esquema, se encuentra unido el extremo carboxilo de la cadena pesada con el extremo amino terminal de la cadena ligera. Puede realizarse una construcción similar, solo que colocando la cadena ligera como primer dominio.

Debido a que la glicosilación de los fragmentos de anticuerpos para el reconocimiento del antígeno no es necesaria (Plückthum, 1992), y teniendo en cuenta el establecimiento de los sistemas para la expresión de proteínas heterólogas en *Escherichia coli*, fué posible expresar los fragmentos de anticuerpo en esta célula hospedera. Esta concepción se extendió rápidamente hacia la manipulación en levadura, debido a su alto potencial secretor y a la posibilidad de que los fragmentos de anticuerpos, e incluso los anticuerpos completos se

produjeran con un plegamiento correcto y por consecuencia fueran activos (Wright, 1992). También se han expresado exitosamente anticuerpos en células de insecto (Carayannopoulos, 1994)

Muy pronto se demostró que en una bacteria como *E. coli* la expresión de los fragmentos podía tomar dos caminos: La expresión intracelular (Dueñas, 1994) y la expresión periplásmica (Skerra, 1988). Para la primera de estas vertientes, se obtenían altos niveles de producción de proteína inactiva o no plegada correctamente, a la cual se le debía de realizar un proceso de plegamiento *in vitro*. Para la segunda vertiente, se debían de utilizar construcciones genéticas que contuvieran secuencias codificantes para péptidos señales bacterianos, y donde, si bien los niveles de producción son bajos respecto a la producción citoplasmática, el producto se exporta a periplasma, de donde es recuperado el fragmento de anticuerpo en forma activa (Dueñas, 1994; Pérez-Pérez, 1994).

En este trabajo de tesis, se describe la clonación de los segmentos Fv correspondientes a la cadena pesada y ligera de un anticuerpo murino neutralizante. Este anticuerpo reconoce la toxina 2 del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann. Este anticuerpo se obtuvo a partir de un hibridoma denominado BCF2. La validación del proyecto se haya en el hecho de que los fragmentos Fab del hibridoma son capaces de neutralizar el efecto de la toxina Cn2.

El trabajo bioquímico de separación de las regiones Fc y Fab, así como los ensayos de protección en ratones, forma parte de un artículo publicado como primer autor que se anexa como resultados publicados de esta tesis. La parte de biología molecular comprende la clonación de los segmentos mencionados y la construcción de un gen que codifica para la molécula de scFv, esto forma parte de una patente, cuya solicitud está en registro y constituye parte de los resultados no publicados de esta tesis.

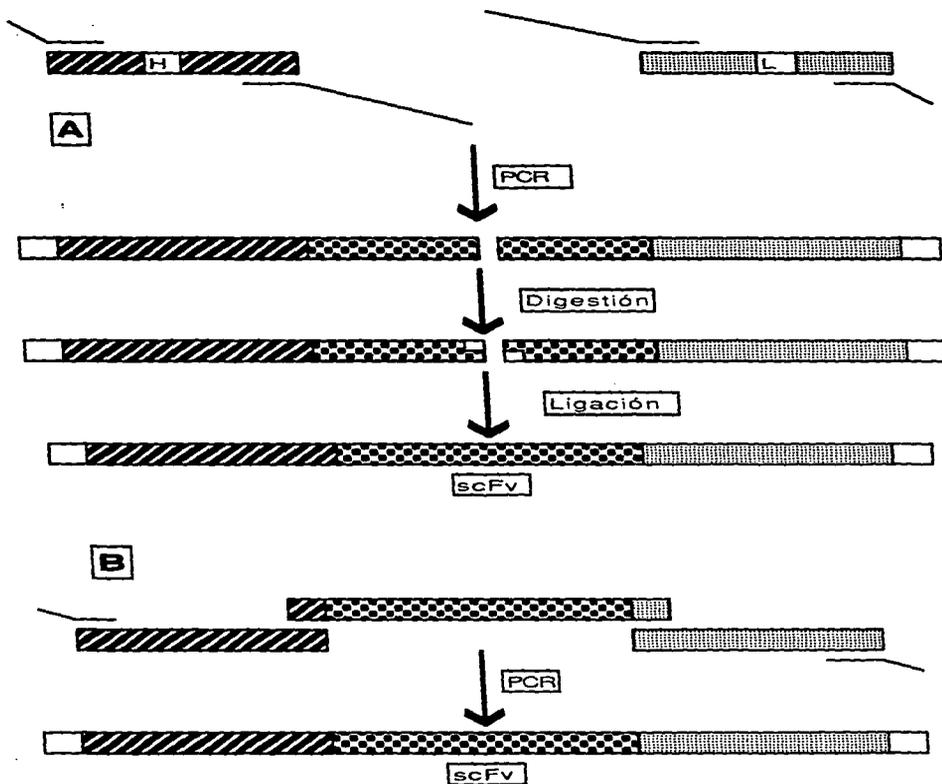


Fig. 5.- Construcción de un scFv.- Las dos formas más utilizadas para realizar un scFv son: A) Integrar la secuencia del péptido de unión en dos oligonucleótidos y unirlos mediante digestión/ligación. B) Utilizar un oligonucleótido que contenga la secuencia del péptido de unión y que contenga secuencias que hibridicen con la cadena pesada y ligera.

ANTECEDENTES

El alacranismo es un problema endémico de salud pública en México (Dehesa-Davila, 1989), también ocurre en algunos estados del sur de Estados Unidos de Norteamérica (Gateau, 1992).

De las 231 especies diferentes de alacranes mexicanos, solamente seis son peligrosas para el hombre (Stockwell, 1992). El veneno más potente es el del alacrán de Nayarit, *Centruroides noxius*, para el cual se determinó la dosis letal media, que es de 5 µg/20 g de peso corporal de ratón (Dent, 1980).

Se ha demostrado la existencia de al menos cuatro familias distintas de péptidos en el veneno de los alacranes (Possani, 1992), cuyo blanco de acción son canales iónicos de membranas excitables, estos canales iónicos pueden ser: canales de sodio (Catterall, 1976, Rochat, 1979; Possani, 1977), canales de potasio (Carbone, 1982), canales de calcio (Valdivia, 1992) y canales de cloro (DeBin, 1993). De estas familias de péptidos los más importantes en términos de cantidad presente en el veneno y en términos del efecto letal a mamíferos son los péptidos bloqueadores de canales de sodio (Possani, 1984). Por esta razón, nuestro grupo enfocó su interés en los péptidos bloqueadores de canales de sodio, particularmente en los del alacrán *C. noxius*, ya que este es el alacrán más peligroso de México (Possani, 1984).

En el año de 1991, se obtuvieron varios hibridomas productores de anticuerpos en contra de la toxina más abundante del veneno de *C. noxius* (Toxina 2). De los seis monoclonales producidos, el que demostró mayor capacidad neutralizante *in vivo*, fué el denominado BCF2 (Zamudio, 1992). Además, dichos anticuerpos producidos en contra del veneno del alacrán *C. noxius*, o de sus componentes, fueron capaces de producir reacción cruzada con el veneno y toxinas de otros alacranes peligrosos de México (Zamudio, 1992; Calderón-Aranda, 1993), pero no así, en contra del veneno de alacranes norteafricanos. Esta capacidad de reaccionar con otras toxinas sugiere una reactividad polivalente, la cual, puede ser utilizada para el tratamiento de picaduras de varios alacranes mexicanos.

En la fig. 6 se muestra la secuencia de aminoácidos de la toxina 2 de *C. noxius*, recientemente determinada (Vazquez, 1995).

Cn2
 1 10 20 30 40 50
 KEGYLVDKNTGCKYDECLKLGDNNDYCLRECKQQYGKGGAGGYCYAFACWCTHLYEQA
 60 66
 IVWPLPNKRCS-amida

Fig. 6.- Secuencia de aminoácidos de la toxina 2.- El código de una letra fué utilizado para la representación de la estructura primaria de la toxina 2 (Cn2) del alacrán *C. noxius*.

Como se mencionó anteriormente, se cuenta con un anticuerpo monoclonal antitoxina 2, el cual es capaz de neutralizar 7.5 dosis letales medias en una relación molar de 1:10 de toxina-anticuerpo (Zamudio, 1992). Este podría ser utilizado eficientemente en la terapia contra picaduras de alacrán. Sin embargo, presenta varias limitantes si se desea que se utilice como herramienta terapéutica en humanos.

La primera desventaja es que este anticuerpo es una proteína de origen animal (ratón), y por lo tanto puede desencadenar respuesta inmunológica al ser administrado en humanos (Scroff, 1985). Esto es debido a que las inmunoglobulinas son glicoproteínas de alto peso molecular (aproximadamente 150 KDa), y contienen una relación de 82-96% de polipéptido y de un 4-18% de carbohidratos. Los carbohidratos, como se mencionó en la introducción, se encuentran en la región constante del anticuerpo (Fc), siendo este uno de los dominios más inmunogénicas de la molécula. Si este anticuerpo se administrara en más de una ocasión a una persona, esta podría sufrir de enfermedad del suero y/o originar un choque anafiláctico (al ser administrada en más de una ocasión).

tiempo que se encuentra en el organismo se localiza en torrente sanguíneo. No siendo este el caso de las toxinas de alacrán, que al tener un peso molecular pequeño (entre 6 y 12 KDa) tienen un gran poder de penetración en tejido, y esto las pone fuera del alcance del anticuerpo neutralizante.

La tercer desventaja se presenta debido a que las moléculas de alto peso molecular, administradas en torrente sanguíneo, tienen un tiempo de vida media mucho más elevado que las proteínas de bajo peso molecular (Haber, 1992). Es decir, una vez que la inmunoglobulina reacciona con el antígeno y se forma el complejo antígeno-anticuerpo, este podría permanecer en torrente sanguíneo el tiempo suficiente para que se disocie el complejo, de esta manera, la toxina quedaría libre nuevamente para poder llegar a su sitio de acción (Haber, 1992). El tiempo de vida media de las toxinas en el organismo es de aproximadamente 14 h (Ismail, 1988)

Por otra parte, la producción de anticuerpos monoclonales en bio-reactores, tiene un precio muy elevado respecto a la producción de fragmentos de anticuerpos en bacterias.

Por las razones antes mencionadas, sería conveniente utilizar las metodologías de ADN recombinante para obtener un fragmento del anticuerpo, el cual sea producido en *E. coli* y de esta manera se eliminarían las desventajas antes citadas, ya que un fragmento del tipo scFv, podría reconocer a la toxina con la misma afinidad que el anticuerpo completo (Skerra, 1988). Al ser una molécula pequeña, presentaría baja antigenicidad. Por la misma característica del tamaño, tendría gran poder de penetración en tejidos, de esta manera sería factible que penetrara al tejido donde se encuentra la toxina y la alejaría de su sitio de acción. Al tener bajo peso molecular, sería más rápidamente depurado del organismo el complejo antígeno-anticuerpo. Un ejemplo de esto es el tratamiento de una intoxicación con digoxina, el complejo Fab-digoxina es depurado más rápidamente por el hígado que el complejo con el anticuerpo completo (Smith, 1979), de la misma manera, se espera que una molécula del tipo scFv sea depurada del organismo más rápidamente (Colcher, 1990). Una ventaja adicional, es que al ser producido este fragmento en una bacteria, los costos de producción se verían disminuidos

considerablemente. Este podría ser un producto biotecnológico de gran impacto en el país, ya que como se mencionó anteriormente, existe una gran incidencia de picaduras de alacrán y se requiere un uso muy grande de suero antialacrán.

Este tipo de proteína presentaría varias ventajas sobre el suero antialacrán que se utiliza actualmente como terapia. La principal de ellas es el tamaño, ya que el antisuero antialacrán está formado por fragmentos F(ab)[']₂ de inmunoglobulinas de caballo. Por todo lo anteriormente mencionado, se puede inferir que la efectividad del fragmento scFv del anticuerpo BCF2 podría ser mayor que la del fragmento F(ab)[']₂ comercial, esto siempre y cuando, las afinidades de ambos fragmentos sean similares.

Por otro lado, la metodología de obtención de fragmentos F(ab)[']₂ utilizada actualmente, produce muchos fragmentos de anticuerpos totalmente irrelevantes para la neutralización del veneno de alacrán, y todos estos fragmentos irrelevantes son administrados al organismo, incrementándose de esta manera la probabilidad de sufrir choque anafiláctico al recibir más de una dosis de la preparación. Esta gran cantidad de proteínas irrelevantes para la neutralización se obtienen por la forma de preparar el antisuero. Actualmente, se inmuniza un caballo con un macerado de telson de alacrán y se aplica la porción soluble de acuerdo al protocolo de inmunización utilizado. Al tener un elevado título de anticuerpos se realiza una purificación de anticuerpos totales del caballo y a estos se les realiza una digestión enzimática. Es por esto que se obtienen muchos F(ab)[']₂ que no reconocen a los péptidos tóxicos.

Al producir un fragmento de anticuerpo del tipo scFv, se trabaja con una sola proteína, la cual debe de estar totalmente purificada. De esta manera se resuelven muchas de las desventajas que podrían presentarse al utilizar un anticuerpo completo, un fragmento del tipo F(ab)[']₂, o incluso un fragmento del tipo Fab.

Sin embargo, como el anticuerpo BCF2 es un anticuerpo monoclonal, todavía era necesario probar si este anticuerpo (o sus fragmentos variables) eran capaces de neutralizar la acción del veneno completo, el cual posee muchas toxinas diferentes a la Cn2. Este punto fué

resuelto, como se indica en la publicación anexa. El Fab es capaz de neutralizar el veneno completo.

Para iniciar con este trabajo, se me proporcionó un banco de ADN complementario (ADNc), el cual provenía del hibridoma productor del anticuerpo monoclonal BCF2, este banco fué producido a partir de un gramo de células del hibridoma cultivado por la Dra. Ema Calderón. El banco fué elaborado por el Dr. Baltzar Becerril y el Ing. Renaud Condé. El tamaño del banco era de 10^8 unidades formadoras de placas (UFP).

Este reporte de tesis, se divide principalmente en una sección de resultados publicados, una sección de resultados no publicados, el depósito de una solicitud de patente y anexos de publicaciones no relacionadas con el tema pero realizadas durante el período de mi formación.

OBJETIVO GENERAL

Clonar, expresar y caracterizar la porción Fv del anticuerpo neutralizante BCF2 en *Escherichia coli*, dirigido contra la toxina 2 del alacrán mexicano *Centruroides noxius* .

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Comprobar que el fragmento Fab del anticuerpo monoclonal BCF2 es capaz de neutralizar la toxina 2 del alacrán *Centruroides noxius* Hoffman.
- 2.- Comprobar que el fragmento Fab del anticuerpo monoclonal BCF2 es capaz de neutralizar la porción soluble del veneno total del alacrán *Centruroides noxius* Hoffmann.
- 3.- Diseñar oligonucleótidos para la búsqueda de clonas en un banco de ADNc correspondientes a la cadena pesada y ligera del anticuerpo BCF2.
- 4.- Seleccionar las clonas del banco de ADNc del hibridoma BCF2.
- 5.- Caracterizar las clonas de ADNc seleccionadas.
- 6.- Diseñar oligonucleótidos para amplificar porciones de las cadenas por medio de PCR.
- 7.- Subclonar en *E. coli* los fragmentos amplificados.
- 8.- Inducir la producción del fragmento variable.
- 9.- Caracterizar el fragmento variable



FAB FRAGMENTS OF THE MONOCLONAL ANTIBODY BCF2 ARE CAPABLE OF NEUTRALIZING THE WHOLE SOLUBLE VENOM FROM THE SCORPION *CENTRUROIDES NOXIUS* HOFFMANN

ALENEI F. LICEA, BALTAZAR BECERRIL and
LOURIVAL D. POSSANI*

Department of Molecular Recognition and Structural Biology, Instituto de Biotecnología,
National Autonomous University of Mexico, Avenida Universidad, 2001, Apartado Postal
510-3, Cuernavaca 62271, Mexico

(Received 3 January 1996; accepted 29 February 1996)

A. F. Licea, B. Becerril and L. D. Possani. Fab fragments of the monoclonal antibody BCF2 are capable of neutralizing the whole soluble venom from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 34, 843-847, 1996.—BCF2 is a murine hybridoma cell line that produces a neutralizing antibody against toxin 2 (Cn2) from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann of Mexico. In this communication we report the preparation and use of the BCF2 antibody and its antigen binding fragments (Fab) in experiments aiming at obtaining protection of experimental albino mice (strain CD1) challenged with purified toxin Cn2, as well as, with whole soluble venom from *C. noxius*. The monoclonal antibody BCF2 in amounts of 1 mg neutralizes 28 LD₅₀ of soluble venom of *C. noxius*, whereas the Fab fragments of BCF2 (1 mg) are capable of neutralizing 43 LD₅₀ dose of the same venom. To reach the same level of neutralization, with the commercially available horse antiserum [F(ab')₂], we need to use about ninefold more material. Copyright © 1996 Elsevier Science Ltd

Since scorpion envenomation is a real health problem in Mexico, with >200,000 accidents per year (Dehesa-Davila and Possani, 1994; Dehesa-Davila *et al.*, 1995) our laboratory has been interested in obtaining a vaccine against scorpion toxins, and in improving pre-existing antisera. This has been approached either through glutaraldehyde modification of venoms (Possani *et al.*, 1981) or by chemical synthesis of peptides corresponding to the primary structure of scorpion toxins (Calderon-Aranda *et al.*, 1995). Studies on serotherapy were performed with polyclonal antibodies (Calderon-Aranda *et al.*, 1993) as well as with monoclonal antibodies (Zamudio *et al.*, 1992). The most dangerous scorpion in the country in terms of venom potency is *Centruroides noxius*, which has a LD₅₀ of 5 µg venom per 20 g mouse wt (Dent *et al.*, 1980). This value was determined *de novo* for albino mice of the strain CD1, used in this paper, and was shown to be 3.8 µg

*Author to whom correspondence should be addressed.

for 20 g mouse wt. The various fractions obtained by gel filtration on Sephadex G-50 of the venom from *C. noxius* were assayed in murine animals (mice and rats) as antigens, in order to generate protective effects. Fraction 11, which contains the Na⁺-channel specific toxins is the only one absolutely required for production of neutralizing antibodies (Calderon-Aranda *et al.*, 1993). Also, in this venom the most important toxic component is toxin 2, previously called component II.9.2.2 (Possani *et al.*, 1981), which makes about 6.8% of the whole venom (Zamudio *et al.*, 1992; Valdivia *et al.*, 1994) and has an estimated LD₅₀ value of 0.25 µg per 20 g mouse wt of the strain CD1 (this communication). Fortunately, a monoclonal antibody producing cell line, named BCF2, was prepared successfully against the action of toxin Cn2 (Zamudio *et al.*, 1992). This same monoclonal antibody has cross-reacting properties against venom from other dangerous species of scorpions (Zamudio *et al.*, 1992). Thus, we decided to verify three important questions:

1. to evaluate the protective effect of the intact BCF2 antibody against whole soluble venom;
2. to verify if the Fab fragments of BCF2 are capable of recognizing purified toxin Cn2; and
3. to verify how important was the neutralizing capacity of these Fab fragments against experimental envenomation of mice with the whole soluble venom of *C. noxius*.

To our knowledge this is the first report in the literature, where both the monoclonal antibody and the corresponding Fab fragments, obtained by enzymatic digestion, are shown to protect not only against the specific toxin, but also to produce a protecting effect against the whole soluble venom.

The series of experiments reported here started by the determination of the exact class and sub-class of immunoglobulin (Ig) to which BCF2 clone belongs. This was relevant because in the original publication by Zamudio *et al.* (1992), this BCF2 cell line was described to produce IgG₂ sub-class antibody, which has a high-affinity for receptors of the macrophage and of reticulo-endothelial systems, and for this reason was expected to facilitate the removal of the complex toxin-antibody from the circulation (Zamudio *et al.*, 1992). Using an enzyme immunoassay (ELISA) from the commercially available kit (Mouse titer, BioRad Lab., Richmond, CA, U.S.A.) the immunoglobulin class of monoclonal antibody BCF2 was definitively shown to be IgG₁ for heavy chain and kappa for light chain. Thus, the suggested mechanism previously described (Zamudio *et al.*, 1992) could not explain entirely the neutralizing capacity of BCF2, and the study of the putative protecting effect of the antigen binding fragments alone (Fab fragments) of BCF2 was then interesting to be assayed. It was also relevant to find out if the effect of the whole venom could be neutralized by the use of this monoclonal antibody.

For these experiments, monoclonal antibodies produced in the abdominal cavity of BALB/c mice, as ascites liquid, were obtained and purified as described (Harlow and Lane, 1988). Digestion of antibody (papain) and separation in an affinity column (protein A) were also performed as described by Harlow and Lane (1988). Purified BCF2 whole-antibody was mixed with purified toxin Cn2 [Fig. 1(A)] or whole soluble venom [Fig. 1(B)] for neutralization experiments, injecting six mice (20 g body wt each) per dose. All mixtures used for obtaining the data of Fig. 1 were incubated at 37°C for 30 min before injection into mice of strain CD1. One milligram of BCF2 antibody was capable of neutralizing the effect of 32 LD₅₀ values of purified toxin Cn2 [Fig. 1(A)], whereas the same amount of

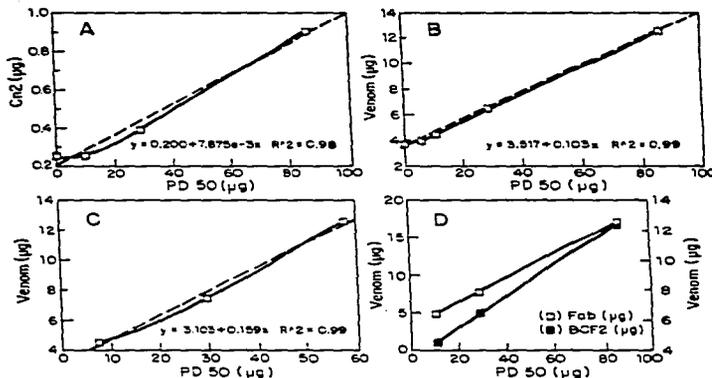


Fig. 1. Neutralization experiments with BCF2 and its Fab fragments. From this graphic representation the PD_{50} values (protective dose 50%), defined as the amount of monoclonal antibody necessary to protect 50% of the mice exposed to the indicated doses of toxin or whole venom, were calculated. Six female mice (20 g wt) were used for each of the points of the neutralization curves. (A) Increasing amounts of toxin Cn2 and monoclonal antibody (BCF2) were mixed in order to determine the PD_{50} for each point. (B) Same as (A) but using whole venom instead of toxin. (C) Increasing amounts of whole venom and the fraction Fab from BCF2 were mixed to obtain the corresponding PD_{50} . (D) Overlapping of panels (B) and (C). Continuous lines refers to experimental results, broken lines show the linear regression calculated for each curve.

1 mg could neutralize 28 LD_{50} of whole soluble venom [Fig. 1(B)]. This last data were not quite expected, since the soluble venom of *C. noxius* contains a mixture of many different toxins (Possani *et al.*, 1981; Valdivia *et al.*, 1994; Vázquez *et al.*, 1995). It was then of utmost importance to know if the Fab fragments were also capable of neutralizing the whole soluble venom. Figure 1(C) shows that, indeed, the Fab fragments obtained from BCF2 are capable of neutralizing the whole soluble venom. The values obtained in Fig. 1(C) indicate that 1 mg of Fab fragments can neutralize 43 LD_{50} dose of venom. These values were obtained from the graphic calculation applying the equation Cricket graph 1.3.1 (from Cricket Software, Malvern, PA, U.S.A.). Briefly, the constants for the straight-line equation are given by the experimental plots (see the insets of Fig. 1), where x is the amount in μg of antibody or Fab fragments for that particular case, e is the exponential ($\times 10$), and y is the amount of Cn2 or venom given in μg . Since the value in μg of one LD_{50} is known (0.25 μg , mouse of 20 g body wt for toxin Cn2, and 3.8 μg for soluble venom) it is easy to deduce the number of LD_{50} for each case. Figure 1(D) compares, in the same plot, the data obtained for whole soluble venom neutralized with Fab fragments with that of whole BCF2 antibody. It is also important to note that the Fab fragments were shown to be competent for recognizing pure toxin Cn2, as demonstrated by an ELISA assay (data not shown).

We have also correlated, in terms of molar ratio, the amount of protein (BCF2 IgG or Fab fragments) needed for the neutralization of a given amount of venom. In order to neutralize 1 mg of whole soluble venom it is necessary to use 124 μ moles of Fab fragments, whereas only 64 μ moles of BCF2 IgG are required. Considering that the intact IgG is bivalent ($64 \times 2 = 128$), this means that the molar ratio of Fab and IgG needed for the neutralization of the same amount of venom is practically the same.

Another relevant point was to verify the performance of this protecting monoclonal antibody BCF2 compared with that of commercially available horse antiserum (National Institute of Hygiene from the Ministry of Health, batch of serum number SAO46-9, valid until February 1999, Mexico City, Mexico). The neutralization experiments with this horse antiserum were performed using 2, 3 and 5 LD₅₀ values of whole soluble venom from *C. noxius*, incubated 30 min. at 37°C. with increasing quantities of serum (by a factor of three each time) and injecting mice of the same CD1 strain, used for the BCF2 monoclonal antibody. Five mice were used for each experiment. The amount of horse antiserum required to neutralize the various LD₅₀ values of venom assayed was always in the range of ninefold more than the Fab fragments from our monoclonal antibody. This value was also calculated in terms of molar ratio, assuming a molecular mass of about 50,000 for our Fab fragments and 100,000 for the F(ab')₂ fragments, from the horse antiserum.

The results we are reporting here, in our opinion, are very important for antivenom serotherapy in humans. This is even more relevant since the experimental vaccine obtained with soluble venom after polymerization with glutaraldehyde (Possani *et al.*, 1981) is not convenient for two main reasons. First, it is difficult (if not impossible) to obtain enough venom for preparing the 15 million doses of vaccine required in the country (Dehesa-Davila *et al.*, 1995); and second, the control of biological material (modified venom) for vaccination is extremely difficult to obtain in a reproducible manner, according to the good manufacturing quality required for human usage. This discouraging situation is worsened by the fact that synthetically prepared peptides, although producing a neutralizing effect in naive animals, do produce a sensitization phenomenon in pre-immunized mice (Calderon-Aranda *et al.*, 1995). Thus, until the adequate peptides are found, for synthesis and production of a real vaccine, the only way left for protection against scorpion stings in Mexico, is to keep using the existing horse antisera, or to develop a new antiserum based on the purified Fab fragments described here, which could eventually be produced by genetic engineering. One advantage of this protecting monoclonal antibody is the relatively low amount required for protection of mice, compared to commercially available horse antiserum. The amount of total foreign protein (immunoglobulin fragments) to be injected in the patients would be about tenfold less than the amount required now.

Acknowledgments—Supported in part by grants from Howard Hughes Medical Institute (No. 75191-527104), from National University of Mexico (DGAPA No. IN-205893 and IN-206994) and National Council of Research and Technology of Mexico (CONACYT No.4734-N). A. Licea received a scholarship from CONACYT.

REFERENCES

- Calderon-Aranda, E. S., Hozbor, D. and Possani, L. D. (1993) Neutralizing capacity of murine sera induced by different antigens of scorpion venom. *Toxicon* 31, 327-337.
Calderon-Aranda, E. S., Olamendi-Portugal, T. and Possani, L. D. (1995) The use of synthetic peptides can be a misleading approach to generate vaccines against scorpion toxins. *Vaccine* 13, 1198-1206.
Dehesa-Davila, M. and Possani, L. D. (1994) Scorpionism and serotherapy in Mexico. *Toxicon* 32, 1015-1018.

- Dehesa-Davila, M., Alagon, A. C. and Possani, L. D. (1995) Clinical toxicology of scorpion stings. In: *Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons*, pp. 201-238 (Meier, J. and White, J., Eds). New York: CRC Press.
- Dent, M. A. R., Possani, L. D., Ramirez, G. A. and Fletcher, P. L. Jr (1980) Purification and characterization of two mammalian toxins from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 18, 343-350.
- Harlow, E. and Lane D. (1988) In: *Antibodies. A Laboratory Manual*. Chaps 7 and 8, pp. 245-318 (Harlow, E. and Lane D., Eds). New York: Cold Spring Harbor.
- Possani, L. D., Fernández de Castro, J. and Juliá, J. Z. (1981) Detoxification with glutaraldehyde of purified scorpion (*Centruroides noxius* Hoffmann) venom. *Toxicon* 19, 323-329.
- Valdivia, H. H., Martín, B. M., Ramirez, A. N., Fletcher, P. L. and Possani, L. D. (1994) Isolation and pharmacological characterization of four novel Na⁺ channel-blocking toxins from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *J. Biochem. (Japan)* 116, 1388-1391.
- Vázquez, A., Tapia, J. V., Eliason, W. K., Martín, B. M., Lebreton, F., Delepierre, M., Possani, L. D. and Becerril, B. (1995) Cloning and characterization of the cDNAs encoding Na⁺ channel-specific toxins 1 and 2 of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 33, 1161-1170.
- Zamudio, F., Saavedra, R., Martín, B. M., Gurrula-Briones, G., Herion, P. and Possani, L. D. (1992) Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Eur. J. Biochem.* 204, 281-292.

MATERIALES Y METODOS

1.- Búsqueda en el Banco de ADNc

a) Crecimiento e infección de la cepa *E. coli* Y1090 con el Bacteriófago λ gt11

Se realiza un crecimiento bacteriano de la cepa en medio Luria líquido durante toda la noche (O.N.), el medio va suplementado con ampicilina (60 μ g/mL) y maltosa (2 mg/mL). Pasado este tiempo, se realiza un cultivo fresco de tres mL tomando 100 μ L del O.N. y agregándolo a medio fresco suplementado. Se deja tres horas a 37°C con agitación vigorosa.

En un tubo "eppendorf" se colocan 300 μ L de una solución de Ca, Mg y se añaden 300 μ L de células, a esto se agregan de 1 a 10 μ L del fago (dependiendo del título del fago). Se incuban a 37°C durante 20 minutos sin agitación. Pasado este tiempo, se agregan 7.5 mL de medio de cultivo Luria-agarosa a una temperatura de 45-50 °C, se mezcla y se agrega sobre una placa grande de Luria sólido suplementado con ampicilina. Se Deja solidificar y se incuba a 37°C durante 12-16 h

b) Levantamiento y Tratamiento de las Placas de Lisis

Una vez que se observan claramente las placas de lisis, se procede a su levantamiento siguiendo estos pasos:

- Se coloca un filtro de "nylon" sobre la caja Petri tratando de que no se forme ninguna burbuja de aire. Auxiliado con una aguja, se marca de dos a tres puntos de referencia utilizando tinta china.
- Una vez realizado el paso anterior, se deja un minuto sobre las placas y se levanta con cuidado de que no se pliegue el "nylon" sobre si mismo
- Se coloca el "nylon" sobre una solución desnaturalizante por un minuto, la cual contiene NaOH 0.5M y NaCl 1.5M
- Se enjuaga con Tris.HCl 1M, pH 7.5

- Posteriormente, se coloca un minuto en una solución neutralizante, cuya composición es Tris.HCl 0.5M y NaCl 1.5M

- Se enjuaga con una solución de citrato de sodio (90 mM) y NaCl (0.9 M). A esta solución también se le llama SSC 6X

El "nylon" debe permanecer con la cara que tocó las placas hacia arriba todo el tiempo. Una vez que se ha pasado por todas las soluciones, se fija el ADN con luz ultravioleta al "nylon". Una vez fijado se realiza una prehibridación y posteriormente se hibridiza con una sonda marcada radioactivamente.

c) Prehibridación

Se coloca el "nylon" dentro de una bolsa de plástico y agregar la solución de prehibridación para oligonucleótidos. Sellar la bolsa y colocarla a 37°C durante cuatro horas mínimo.

Solución de Prehibridación:

	Volumen	"Stock"
SSC 6X	4.95 mL	20X
Denhardts 5X	1.50 mL	50X
Pirofosfato de Sodio	1.50 mL	0.5%
SDS	0.75 mL	10%
ADN timo ternera	0.15 ml	10mg/mL
Agua	6.15 mL	

d) Hibridación

Una vez que transcurrió el tiempo de la reacción de prehibridación, se elimina y se agrega la solución de hibridación, se coloca a 42°C por un tiempo de 16-20 h.

Solución de Hibridación:

	Volumen	"Stock"
SSC 6X	4.95 mL	20X
Denhardts 5X	0.30 mL	50X
Pirofosfato de Sodio	1.50 mL	0.5%

	Volumen	"Stock"
SDS	0.15 mL	10%
ADN timo ternera	0.15 ml	10mg/mL
Agua	6.15 mL	
Oligonucleótido marcado	100-500 μ L	

Una vez pasado el tiempo de incubación, se lava el "nylon" con SSC 6X a 55°C, esto con el fin de eliminar el pegado inespecífico. Posteriormente, se coloca una película sensible y se deja exponer por 12 h. Pasado este tiempo, se revela la película y se identifican las placas de lisis positivas.

2.- Reacción en Cadena de la Polimerasa

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, de sus siglas en inglés Polimerase Chain Reaction) que se realizó durante toda la investigación, fué utilizando el siguiente programa:

95°C	2 min.	
95°C	30 seg.	
55°C	30 seg.	25 ciclos
72°C	30 seg.	
72°C	10 min.	

Todos los PCR's se elaboraron con la enzima termoestable "Vent", se utilizó su amortiguador segun las indicaciones de la casa comercial "New England Biolabs". Los deoxinucleótidos utilizados son de "Boheringer Mannheim" y se emplearon a una concentración final de 200 μ M. Los oligonucleótidos se emplearon a una concentración final de 2 μ M.

3.- Transformación de la cepa de *E. coli* DH5 α con el plásmido pKs

Se toman 200 μ L de células competentes y se colocan en un tubo de plástico, a estas células se les agrega el plásmido (generalmente con 1 μ L es suficiente) y se coloca el tubo en baño de hielo durante 30 minutos.

Posteriormente se da un choque térmico colocando el tubo a 42 $^{\circ}$ C durante 30 segundos, y se pasa nuevamente a hielo. Se agregan 800 μ L de medio SOC y se dejan recuperar las células durante 1 h a 37 $^{\circ}$ C. La composición del medio SOC es la siguiente:

Triptona	2.0%
Extracto de Levadura	0.5%
NaCl	10mM
KCl	2.5mM
MgCl	20mM
Glucosa	20mM

Nota: La glucosa y el MgCl deben de esterilizarse por separado y ser agregados al momento de utilizar el medio.

Transcurrida la hora de incubación se colocan 200 μ L del cultivo como máximo en una caja Petri, la cual contiene medio Luria sólido suplementado con 100 μ L/caja de Xgal (20 mg/mL en dimetilformamida) y 30 μ L/caja de IPTG (200 mg/mL). Se coloca de 12 a 16 h a 37 $^{\circ}$ C, se separan las colonias positivas (Blancas) de las negativas (Azules).

4.- Purificación de Plásmidos

Los plásmidos se purificaron utilizando el método de lisis alcalina, el cual se describe a continuación:

Se coloca un cultivo celular en medio Luria, suplementado con ampicilina, el tiempo de incubación es de 12-16 h

Una vez transcurrido este tiempo, se toma 1.5 mL y se coloca en un tubo "eppendorf", se centrifuga a 12 000 RPM durante cinco minutos.

Se elimina el sobrenadante y el sedimento se resuspende en 1mL de SET (Sacarosa 20%, EDTA 50mM y Tris.HCl 50 mM pH 7.5), se vuelve a centrifugar en las mismas condiciones y se elimina el sobrenadante.

Se resuspende en 150 μ L de SET y se agregan 5 μ L de la enzima ARNasa, se deja incubando cinco minutos a 37°C. Pasado el periodo de incubación, se agregan 350 μ L de mezcla lítica (SDS 1% y NaOH 0.2M), una vez agregado esto, se mezcla por inversión varias veces y se deja 10 min. en hielo.

Se le añade 250 μ L de acetato de sodio (3M pH 4.8), se mezcla por inversión y se incuba en hielo durante 30 min. Posteriormente se centrifuga durante 10 min a 12 000 RPM.

Se toma el sobrenadante pasándolo a un tubo "eppendorf" nuevo, a este se le agrega un volumen igual de isopropanol (700 μ L). Se mezcla por inversión y se centrifuga 10 min a 12 000 RPM.

Se elimina el sobrenadante y el precipitado se lava con etanol frío (-20°C) al 70%, esto se repite en dos ocasiones. Se deja secar y se puede resuspender en 30 μ L de agua, siempre y cuando se vaya a utilizar en ese momento el plásmido, de no ser así, se guarda seco a -20°C.

5.- Secuenciación de ADN de Doble Cadena

a) Desnaturalización del ADN

Para desnaturalizar el ADN, se requiere tener alrededor de 3-5 μ g de ADN de plásmido por reacción de secuencia, esto en no más de 150 μ L de agua.

A esto se agrega 1/4 de volumen de solución de desnaturalización (NaOH 2M y EDTA 2mM), y se incuba de 15-20 min. a 37°C.

Pasado el tiempo de incubación, se agrega un volumen de acetato de amonio 5M. Posteriormente se añaden tres volúmenes de etanol absoluto frío.

Se precipita el ADN colocando la reacción 15 min. a -70°C , se centrifuga a 4°C durante 30 min. a 12 000 RPM. Una vez precipitado, se lava con etanol frío al 70%. Por último se guarda a -20°C hasta utilizarlo.

b) Hibridación del Oligonucleótido con el ADN del Plásmido

Se mezclan en un tubo "eppendorf" 6 μL de agua, 2 μL del amortiguador adecuado (Kit de secuencia Amersham) y 10 ng del oligonucleótido. Se agrega esta mezcla al tubo que contiene el ADN del plásmido seco y se incuba de 15 a 30 minutos a 37°C , posteriormente se pasa a hielo.

c) Reacción de Secuencia (Extensión)

En un tubo "eppendorf" se prepara la siguiente mezcla de premarcaje:

DTT (0.1M)	1.0 μL
Agua	1.6 μL
Lab. Mix	0.4 μL
[^{35}S]dATP	0.5 μL
Secuenasa	0.25 μL
Amortiguador	1.75 μL

Todo esto se mezcla sin hacer burbujas, se agregan 5.5 μL de esta mezcla de premarcaje a los tubos con la mezcla de hibridación. Se incuba de 4 a 5 minutos a temperatura ambiente y se pasa a hielo.

d) Terminación

Se ponen a precalentar los tubos con 2.5 μ L de los cuatro dideoxinucléotidos (un tubo por cada dideoxinucléotido), cuando menos un minuto a 37°C.

A los tubos previamente calentados, se les agregan 3.5 μ L de la mezcla de extensión. Se centrifuga brevemente y rápidamente se pasa a 37°C, incubando por un lapso de 3 a 5 minutos.

Para detener la reacción se agregan 4 μ L de mezcla de detención (especial para parar la reacción). Se calienta la muestra 3 minutos a una temperatura de 75-90°C, y se aplican 5 μ L en un gel de secuencia.

6.- Western Blot

Para los ensayos de Western Blot se corre previamente un gel de acrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes y reductoras. El gel se corre a 20 mA hasta que el frente del colorante haya salido. Se calcula el área del gel y se recortan seis fragmentos de papel Whatman 3MM y un fragmento de nitrocelulosa de las mismas dimensiones que el gel.

Se sumerge el gel, los papeles Whatman y la nitrocelulosa en el amortiguador de transferencia por lo menos cinco minutos. El amortiguador utilizado para transferir está compuesto por glicina 0.192M, Trisma base 0.025M y Metanol 20%; el pH de la solución es de 8.4-8.6

Se coloca en el centro de la lamina metálica que actúa como ánodo del sistema de transferencia, y en este orden, tres papeles Whatman, la nitrocelulosa, el gel y los tres papeles Whatman restantes. Se coloca la tapa del equipo que contiene el cátodo.

La corriente se fija dependiendo de las dimensiones del gel, y se utiliza en general 0.8 mA/cm² del gel. La transferencia se realiza durante media hora.

Se sumerge la nitrocelulosa en BSA 3% para bloquear la membrana, se agita durante una hora a temperatura ambiente y se lava con PBS tres veces, cada lavado de dos a tres minutos.

Se agrega el antisuero de conejo anti-Fab de BCF2 en BSA 3%, esto se realiza durante dos horas a temperatura ambiente y se repiten los lavados.

Se añade el anticuerpo conjugado de cabra anti-conejo diluido en PBS (1:3000), se incuba durante una hora a temperatura ambiente. Después se lava de 5-6 veces. Finalmente se realiza un último lavado de cinco minutos.

Se añade la solución de revelado. Para eso se disuelven 5mg de diamino-benzidina en 10 mL de PBS, se agregan 5 µL de H₂O₂ al 30%, esto se mezcla antes de agregárselo a la nitrocelulosa, hay que esperar a que el color se desarrolle. Para detener la reacción se decanta la solución y se lava 5-6 veces con PBS.

7.- ELISA

Se disuelve la toxina Cn2 en NaHCO₃ 20mM, pH 9.5. la concentración final es de 3µg/mL, se agregan 100 µL de esta solución a los pozos de la placa de poliestireno y se incuba 2 h a 37°C o toda la noche a 4°C.

Se elimina la solución de la toxina y se bloquea con BSA 1%; se aplican 100 µL por pozo y se incuba durante 1 h a 37°C.

Se lava con PBS/Twen 20 (0.05%) de 4-5 veces. Se agrega la muestra a analizar, la cual puede ser la fracción periplásmica o la fracción citoplásmica provenientes de un choque osmótico. También puede ser la fracción soluble o insoluble de un producto de un sonicado de

células. Se añaden 100 μL por pozo de estas muestras y se deja tres horas a temperatura ambiente.

Se lava nuevamente y se agregan 100 μL de un anticuerpo de conejo anti-Fab de BCF2. Se incuba 1 h a 37°C y se lava nuevamente.

Se agrega el anticuerpo de cabra anti-conejo conjugado a peroxidasa en una dilución de 1:3000 en PBS. Se colocan 100 μL /pozo y se incuba a 37°C durante una hora.

Pasado este tiempo, se lava y se revela agregando 100 μL /pozo de una solución de 0-fenildiamida (0.4 mg/mL) y H_2O_2 (0.4 $\mu\text{L}/\text{mL}$) en un amortiguador de fosfatos 100 mM pH 5. Se agrega la mezcla y se protege de la luz hasta observar color. Se para la reacción agregando 50 μL de HCl 6 M.

8.- Plásmidos de Expresión Utilizados.

Los plásmidos de expresión que se emplearon fueron construidos por el Dr. Jorge Gavilondo en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba.

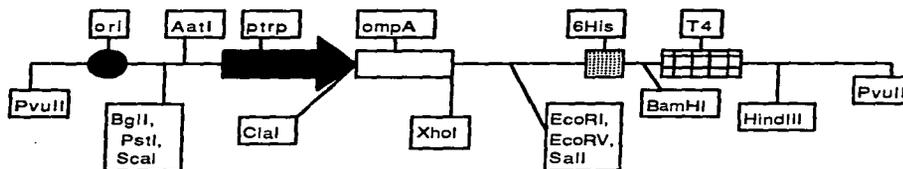
a) Plásmido pPACIB.3 (2.8 Kb)

El vector para *E. coli* pPACIB.3 fué diseñado para la clonación de productos de PCR, dirigiendo la proteína producida hacia periplasma por medio de la secuencia señal de omp A. El producto queda fusionado a una secuencia de seis histidinas en el extremo carboxilo terminal. Posee un promotor de triptófano y la secuencia de terminación del fago T4. Los sitios de restricción enzimática utilizados para la clonación de fragmentos son EcoRI, EcoRV y Sall, las histidinas pueden ser utilizadas para purificación por una columna de iones metálicos (Ni). El marcador de selección con que cuenta es el antibiótico ampicilina. El plásmido pPACIB.3 es un derivado del plásmido pBR322.

En la figura 7 se muestra un esquema de la región del plásmido donde se encuentran los sitios de clonaje, así como el promotor y el terminador.

b) Plásmido pPACIB.7 (2.8 Kb)

El plásmido pPACIB.7 proviene también del plásmido pBR322, al igual que el vector pPACIB.3 tiene el promotor de triptófano y el terminador del fago T4. Este vector fue diseñado para la expresión exclusiva de fragmentos de anticuerpos del tipo scFv, ya que posee la secuencia de un péptido de unión entre las dos regiones variables de las inmunoglobulinas. Este péptido tiene la secuencia Glu-Gli-Lis-Ser-Ser-Gli-Ser-Gli-Ser-Glu-Ser-Lis-Val-Asp. La expresión va orientada hacia periplasma por la secuencia del péptido señal de ompA. En la figura 8 se muestra un esquema de como es que se encuentran los sitios de restricción para la clonación de las dos regiones variables por separado.



- 21

Met Lis Lis Tre Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gli Fen Ala Tre
 ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC

Sitio de corte de Peptidasa

- 1 /

Val Ala Gln Ala/Ser Ser

GTA GCG CAG GCG TCG AGC
 XhoI

GAATTC GATATC
 EcoRI EcoRV

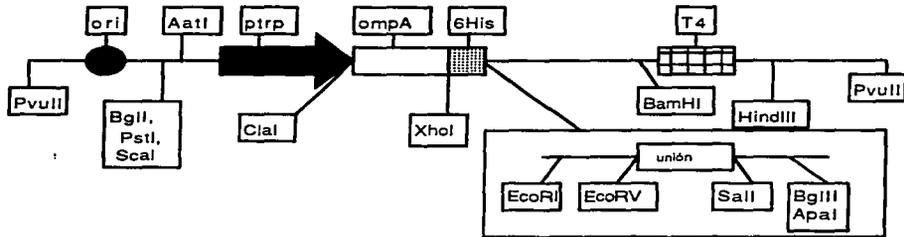
GTCGAC
 Sall

Gli Gli His His His
 GGG GGG CAC CAC CAC

His His His

CAC CAC CAC TAA TAG GGATCC
 Parada BamHI

FIG. 7.- Plásmido pPACIB.3.- En la figura se muestran algunas secuencias del plásmido pPACIB.3, donde se pueden observar los sitios de clonaje, la secuencia del péptido señal ompA, las histidinas y los codones de terminación. El fragmento puede ser clonado utilizando los sitios EcoRI-EcoRV, o bien, EcoRI-Sall para darle direccionalidad al fragmento. El fragmento puede ser diseñado como VH-unión-VL, o VL-unión-VH.



- 21

Met Lis Lis Tre Ala Ile Ala Ile Ala Val Ala Leu Ala Gli Fen Ala Tre
 ATG AAA AAG ACA GCT ATC GCG ATT GCA GTG GCA CTG GCT GGT TTC GCT ACC

Sitio de corte de Peptidasa

-1 /

Val Ala Gln Ala/Ser Ser His His His His His His Gli Gli
 GTA GCG CAG GCC TCG AGC CAC CAC CAC CAC CAC CAC GGG GGGATTC
 XhoI EcoRI

----- Péptido de unión -----

Glu Gli Lis Ser Ser Gli Ser Gli Ser Glu Ser Lis Val Asp
 GATATC GAG GGT AAA TCC TCA GGA TCA GGCTCC GAA TCC AAA GTCGAC AGATCT
 EcoRV Sall BglII

GGGCCC TAATAG GGATCC
 Apal Parada BamHI

Fig. 8 Plásmido pPACIB.7.- El plásmido pPACIB.7 está diseñado para clonar por separado la región variable de la cadena pesada y ligera, ya que como se aprecia, posee la secuencia codificante para el péptido de unión. La estrategia de clonado puede ser cadena Pesada-Péptido-Ligera, o bien, cadena Ligera-Péptido-Pesada. El primer fragmento se clona con los sitios EcoRI-EcoRV y el segundo con los sitios Sall-BglIII ó Sall-Apal.

9.- Oligonucleótidos Utilizados.

Fueron varios los oligonucleótidos que se utilizaron durante el proyecto, algunos de ellos se emplearon para realizar la identificación de las clonas en el banco de ADNc, otros para realizar PCRs y otros para obtener la secuencia de nucleótidos. A continuación se muestra la secuencia de cada uno de ellos.

Secuencia	Clave
ACT GGA TGG TGG GAA GAT GGA	ratón-CK
GGC CAG TGG ATA GAC AGA TGG	ratón-CH1
GAG CTT ACA CGT TCG GAG GGG	mCDR3-K-ABE
GGT GGC GAC GAC TCC TGG AGC CCG	1218
TTG ACA CCA GAC CAA CTG GTA ATG	1222
TTC ACG GGC AAG GCC ACA TT	Ext-H
AGC GAA TTC GAC ATT GTG TTG ACC CAA TCT CCA	NHKB.3
CGA GGC GCG CCC TCC CGA TCC TCC TCC TTT CAG CTC CAG GTT GGT CCC AGC	COOHK
GGG CGC GCC TCG GGA GGA GGA TCG GTA CCA TGG CTG CAA CAG TCT GGT	NHCH
GAC GTC GAC TGA GGA GAC GGT GAC TGA GGT	FR4H B.3
TCC TGG TTT CTG TTG GTA CCA	Ext. K
TCC ATG GCT CTG CTT CAC CCA	Ext-linker
TCC CCC GGG TGA GGA GAC GGT GAC TGA GG	FR4Sma3
TCC CCC GGG CTA TTA TGA GGA GAC GGT GAC TGAGG	FR4Sma1

Secuencia

ATC ATC GAA CTA GTT AA

GGT CAT TCA AAA GGT CAT CCA C

**GGG AAT TCT (GC)A(AG) GTG (CA)(TA)G CT(CG)
(CG)(AT)(AG) (CG)A(AG) (CT)C(CG) GG**

ATGGG CCC TTT (TC)A(TG) (TC)TC CAG CTT GGT

**CGTCGAAC GAC ATT GTG (CA)TG (AT)C(AC) CAG
TCT CC**

**AAC CTG GAG CTG AAA GGA GGA GGA GGA TCG
GGA GGA GGA GGA TCG GGA GGA GGA GGA TCG
GTA CCA TGG CTG CAA**

Clave

Prom-Trp

Term-T4

VHB

FR4 K-Apal

FR1 K Sall

Linker

RESULTADOS NO PUBLICADOS

1.- Búsqueda en el banco de ADNc

Se utilizaron los oligonucleótidos ratón-CK y ratón-CH1 para aislar las clonas de fagos que contenían la secuencia codificante de la cadena ligera y de la cadena pesada. El oligonucleótido ratón-CK hibridiza en la región constante de la cadena K, mientras que el oligonucleótido ratón-CH1, hibridiza en la región codificante para el primer dominio constante de la cadena pesada (CH1). Se fueron realizando enriquecimiento de dichas placas hasta que todas las placas eran positivas. Esto se realizó para las dos cadenas por separado.

Antes de tener totalmente enriquecidas las placas, se realizó una hibridación con el oligonucleótido mCDR3-K-ABE, el cual hibridiza en el CDR3 de la cadena aberrante kappa. Dicha cadena proviene del mieloma con el cual se realizó la fusión para la inmortalización de la clona. Por lo cual, el hibridoma produce dos ARNm codificantes para cadenas ligeras de inmunoglobulinas, uno de la cadena aberrante (Carrol 1988) y el otro de la inmunoglobulina de interés. De esta manera, se elimina la posibilidad de trabajar con la secuencia equivocada. Esta cadena aberrante se presenta en todos los hibridomas derivados del mieloma MOPC-21 (Carrol 1988).

Después de cuatro ciclos de enriquecimiento, se logró tener totalmente aisladas las dos clonas, la de la cadena pesada y la de la cadena ligera de interés.

2.- Amplificación de las regiones variables

Se utilizaron los oligonucleótidos 1222 y ratón-CK, así como la combinación 1218 y ratón-CK para amplificar la región variable de la cadena ligera. De la misma manera fueron utilizados los oligonucleótidos 1218 y 1222 en combinación con el oligonucleótido ratón-CH1 para amplificar la región variable de la cadena pesada. El

sitio de unión del oligonucleótido 1218 se encuentra en el extremo 5' del sitio de clonación; mientras que el sitio de unión para el oligonucleótido 1222, se encuentra en el extremo 3' del sitio de clonación. Es por este motivo que al querer amplificar las regiones variables de la inmunoglobulina, se debe de utilizar la combinación 1218 y ratón-CK. Así como la combinación 1222 y ratón-CK. Solo una de estas reacciones nos dara el gen de interes, y será aquella que contenga los oligonucleótidos en sentido opuesto. La misma estrategia se utiliza para la amplificación de la cadena variable pesada, solo que se utiliza el oligonucleótido ratón-CH. En la figura 9 se observa la amplificación de la regiones variables de la cadena pesada y ligera.

3.- Secuenciación de las regiones variables

Una vez amplificadas las regiones variables de ambas cadenas, se procedió a su clonación en el vector comercial pKs (Stratagene), el cual da una pigmentación azul a las colonias que no tienen un fragmento de ADN clonado, sin embargo, cuando el plásmido contiene algun gen clonado en la región de complementación de la β -galactosidasa, este da colonias blancas al ser transformado.

Se realizó una purificación de plásmido de las colonias blancas y se realizó un análisis de restricción con las enzimas *HindIII* y *BamHI*, los cuales son sitios de restricción que se encuentran flanqueando el sitio de clonación (*EcoRV*). Posteriormente al análisis de restricción se procedió a realizar la secuencia de las regiones variables de ambas cadenas. Para realizar las reacciones de secuenciación del gen de la cadena ligera, se utilizaron los siguientes oligonucleótidos: ratón-CK, 1218 y Ext. K. Para las reacciones de secuenciación de la cadena pesada, se utilizaron los oligonucleótidos: ratón-CH1, 1222 y Ext-H. Se utilizaron estos oligonucleótidos debido a que hibridizan dentro de estas secuencias a analizar. A continuación se muestra la secuencia de nucleótidos obtenida para cada una de las secuencias, así como la secuencia de aminoácidos deducida para cada una de ellas.

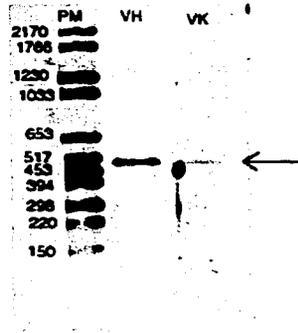


Fig.9.- Amplificación de las regiones variables de la cadena pesada y ligera. En la figura se observa la amplificación por medio de PCR de ambas cadenas. En el primer carril se observa el marcador de peso molecular, en el segundo carril se encuentra el gen codificante para la región variable de la cadena pesada, en el tercer carril se observa el gen codificante para la región variable de la cadena ligera. Los productos de PCR se señalan con una flecha. Los marcadores moleculares están expresados en pares de bases.

a) Secuencia de nucleótidos de la región variable pesada.

5'
 GTA CCA TGG CTG CAA CAG TCT GGT CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGA
 GCT TCA ATG AAG ATA TCC TGC AAG GTT TCT GGT TAC TCA TTC ACT
 GAC CAC ACC ATG AAC TGG GTG AAG CAG AGC CAT GGA AAG AAC CTT
 GAG TTG ATT GGA CTT ATT AAT CCT TTC AAT GGT GAT GCT ACC TAC
 AAA CAG AAG TTC ACG GGC AAG GCC ACA TTA ACT GTA GAC AGG TCA
 TCC AGC ACA GCC TTC ATG GAG CTC CTC AGT CTG ACA TCT GAG GAC
 TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA AGA TAT GGT AAC TAC GCT ATG GAC
 TACTGG GGT CAA GGA ACC TCA GTC ACC GTC TCC TCA 3'

b) Secuencia deducida de aminoácidos de la cadena pesada.

1 10
 Val Pro Trp Leu Gln Gln Ser Gln Pro Glu Leu Val Lis Pro Gln Ala Ser Met
 20 30
Lis Ile Ser Cis Lis Val Ser Gln Tir Ser Fen Tre Asp His Tre Met Asn Trp
 40 50 52 A
 Val Lis Gln Ser His Gln Gln Asn Leu Glu Leu Ile Gln Leu Ile Asn Pro Fen
 60 70
 Asn Gln Asp Ala Tre Tir Lis Gln Lis Fen Tre Gln Lis Ala Tre Lue Tre Val
 80 82 A B C
 Asp Arg Ser Ser Ser Tre Ala Fen Met Glu Leu Leu Ser Leu Tre Ser Glu Asp
 90 100
 Ser Ala Val Tir Tir Cis Ala Arg Tir Gln Asn Tir Ala Met Asp Tir Trp Gln
 110
 Gln Gln Tre Ser Val Tre Val Ser Ser

c) Secuencia de nucleótidos de la región variable ligera.

5'
 GAC ATT GTG TTG ACC CAA TCT CCA GTT TCT TTG GCT GTG TCT GTA GGG
 CAA GGG GCC ACC ATC TCC TGT AAG GCC AGC CAA AGT GTT GAT TTT
 GAT GGT GAA ACT TAT ATG AAC TGG TAC CAA CAG AAA CCA GGA CAG
 CCA CCC AAA CTC CTC ATT TAT GTT GTA TCC AAT CTA GAA TCT GGG
 ATC CCA GCC AGG TTT AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC ACC
 CTC AAC ATC CAT CCT GTG GAG GAG GAT GCT GCA ACC TAT TAC
 TGT CAG CAG AGT AAT GAG GAT CCG CTC ACG TTC GGT GCT GGG ACC
 AAC CTG GAG CTG AAA 3'

d) Secuencia deducida de aminoácidos de la cadena ligera.

1	<u>Asp</u>	Ile	Val	Leu	<u>Tre</u>	<u>Gln</u>	Ser	Pro	Val	10	Ser	Leu	Ala	<u>Val</u>	Ser	Val	<u>Gli</u>	Gln	Gli
	20								27	A	B	C	D				30		
	Ala	Tre	<u>Ile</u>	<u>Ser</u>	<u>Cis</u>	Lis	Ala	<u>Ser</u>	Gln	Ser	Val	Asp	Fen	Asp	Gli	Glu	Tre	<u>Tir</u>	
								40											50
	Met	Asn	<u>Trp</u>	Tir	Gln	<u>Gln</u>	Lis	<u>Pro</u>	<u>Gli</u>	<u>Gln</u>	Pro	<u>Pro</u>	Lis	Leu	<u>Leu</u>	<u>Ile</u>	Tir	Val	
								60											
	Val	<u>Ser</u>	Asn	Leu	Glu	<u>Ser</u>	<u>Gli</u>	Ile	Pro	Ala	<u>Arg</u>	<u>Fen</u>	Ser	<u>Gli</u>	<u>Ser</u>	<u>Gli</u>	<u>Ser</u>	<u>Gli</u>	
		70									80								
	<u>Tre</u>	Asp	<u>Fen</u>	<u>Tre</u>	<u>Leu</u>	Asn	<u>Ile</u>	His	Pro	Val	Glu	Glu	<u>Asp</u>	Ala	Ala	Tre	<u>Tir</u>		
			90										100						
	Tir	<u>Cis</u>	Gln	<u>Gln</u>	Ser	Asn	Glu	Asp	<u>Pro</u>	Leu	<u>Tre</u>	<u>Fen</u>	<u>Gli</u>	Ala	<u>Gli</u>	<u>Tre</u>	Asn	<u>Leu</u>	
	<u>Glu</u>	Leu	<u>Lis</u>																

Los aminoácidos subrayados, son aquellos que se encuentran conservados en más de un 98% en las secuencias de regiones variables reportadas (Kabat 1991). Aquellos aminoácidos de la cadena pesada que se encuentran con una letra sobre ellos (A, B, C), se debe a que son

inserciones que se realizaron durante el arreglo genómico de la inmunoglobulina. Los aminoácidos de la cadena ligera que se encuentran con una letra sobre ellos (A, B, C, D), se debe a las distintas longitudes que presentan las familias de las regiones variables (Kabat 1991).

Se realizó un análisis de alineamiento de ambas cadenas en el servidor de kabat (<http://immuno.bme.nwu.edu>), y se encontró que la región variable de la cadena pesada pertenece a la familia V y al subgrupo IIa de las inmunoglobulinas. De la misma manera, la región variable de la cadena ligera, pertenece a la familia IX y al subgrupo III de las inmunoglobulinas.

4.- Construcción del gen scFv de BCF2

Para la construcción del gen del tipo scFv se emplearon tres estrategias. En la primera de ellas, se amplificaron las regiones variables por separado, introduciendo dos sitios de restricción en cada una de ellas. Se adicionó el sitio *EcoRI* y *Asc I* para la cadena ligera, y los sitios *Asc I* y *Sal I* para la cadena pesada. Cada una de las regiones amplificadas poseía la mitad del péptido de unión. Los oligonucleótidos utilizados para la región variable ligera fueron NHKB.3 y COOH K, estos hibridizan en el extremo 5' y 3' respectivamente. Para la amplificación de la cadena pesada, se utilizaron los oligonucleótidos NHCH y FR4H B.3, estos hibridizan en la región 5' y 3' respectivamente de la región variable pesada. En la figura 5a se muestra un esquema con este tipo de estrategia.

Sin embargo, por medio de este tipo de metodología, no fué posible obtener la construcción del gen. Por lo tanto, se decidió emplear otro tipo de estrategia, la cual consiste en realizar la síntesis de un oligonucleótido que codifique para el péptido de unión, este oligonucleótido debe de poseer en sus extremos, secuencias que hibridizen con parte de las regiones variable de la cadena ligera por un extremo, y por el otro debe de hibridizar con la cadena pesada. Una vez que se tiene sintetizado el oligonucleótido (este oligonucleótido se

denominó: "Linker"), se realiza un PCR recursivo, utilizando como ADN de molde la secuencia variable de ambas cadenas. Así en una sola reacción de PCR, se puede obtener el gen codificante para la proteína scFv de BCF2. En la figura 5b se observa un esquema que ejemplifica esta estrategia. En la figura 10 se observa un gel de agarosa 1% con el gen sintetizado por esta estrategia.

La tercer metodología empleada fué utilizando un vector de expresión que ya poseía la secuencia codificante para el péptido de unión, este vector es el vecor pPACIB.7, el cual se muestra en la figura 8. Por medio de estas dos últimas metodologías, se obtuvo la construcción del gen codificante para la proteína del scFv. A la primer construcción se le denominó scFv.3, ya que se encuentra en el vector de expresión pPACIB.3. De la misma manera, a la segunda construcción se le denominó scFv.7 por encontrarse en el vector pPACIB.7.

El gen scFv.3 codifica para una proteína del tipo cadena ligera-unión-pesada, mientras que el gen scFv.7 codifica para la expresión de una proteína del tipo cadena pesada-unión-ligera. Otra diferencia es la secuencia de aminoácidos del péptido de unión, mientras que en la construcción scFv.3 se tiene la secuencia Gli-Gli-Gli-Gli-Ser-Gli-Gli-Gli- Gli-Ser-Gli-Gli-Gli-Gli-Ser para establecer la unión entre las dos cadenas, en la scFv.7 se tiene Glu-Gli-Lis-Ser-Ser-Gli-Ser-Gli-Ser-Glu- Ser-Lis-Val-Asp. La diferencia entre estas dos construcciones, se analizará en la sección de discusiones.

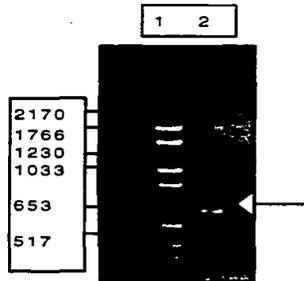


Fig. 10.- Construcción del gen scFv.- En esta figura se observa la banda que representa el gen scFv, este gen fué obtenido por medio de PCR recursivo, los valores de el patrón de peso molecular, estan dados en pares de bases. El patrón de peso molecular se encuentra en el carril 1, en el carril 2 se observa la banda de amplificación señalada por una flecha.

5.- Analisis de expresión en varias cepas de *E. coli*.

Una vez que se tiene la construcción del gen y éste se encuentra clonado en un vector de expresión, es necesario realizar un análisis de expresión en varias cepas de *E. coli*, ya que se puede dar el caso que una misma proteína sea expresada en una cepa y en otra no (Dueñas 1994). Se probaron las cepas MM294, W3110, LE392, BMH71.18, TG1, C600 y ColiB. Este análisis se realizó para las dos construcciones. Al realizar el análisis para la construcción scFv.7, se observó que posteriormente a la transformación, las cepas LE392 y ColiB dejaban de crecer, es decir, parece ser que se inhibía el crecimiento por la proteína expresada. En las demás cepas se observó producción del fragmento esperado, sin embargo, aparentemente se produce una lisis de las bacterias después de cinco horas de inducción. Esto solo sucedió con las cepas W3110 y BMH 71.18. Todas las demás cepas crecieron y produjeron la proteína sin ningún problema aparente. En la figura 11 se observa un análisis de expresión de algunas de las cepas transformadas antes y después de la inducción.

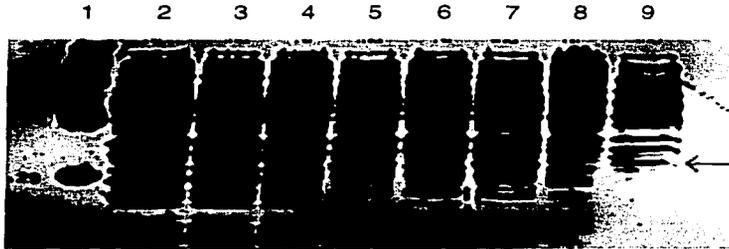


Fig.11.- Análisis de producción en varias cepas de *E. coli*. En la figura se aprecia la inducción de la proteína scFv en varias cepas de *E. coli*. Carril 1: marcador de peso molecular expresado en KDa. Carril 2 y 3: Cepa W3110 transformada con el plásmido silvestre pACIB.7 antes y después de la inducción respectivamente. Carril 4 y 5: Cepa C600 transformada con el plásmido scFv.7 antes y después de la inducción respectivamente. Carril 6 y 7: Cepa TG1 transformada con el plásmido scFv.7 antes y después de la inducción respectivamente. Carril 8 y 9: Cepa W3110 transformada con el plásmido scFv.7 antes y después de la inducción respectivamente. La proteína de interés, se muestra por medio de una flecha.

Para el caso de la construcción scFv.3, se observó expresión en todas las cepas a excepción de la cepa C600. Una vez que se realizaron estos análisis, se seleccionó la cepa TG1 para expresar la construcción scFv.7

En la figura 12 se muestra la expresión de la proteína scFv.7 y un Western Blot del mismo. Solo se muestran los resultados de la construcción scFv.7, debido a que la expresión de la construcción scFv.3 se perdió por completo. En la sección de discusiones se analizará el por qué de esta pérdida en la expresión.

6.- Purificación por columna de metales

Se realizó la purificación de la proteína por medio de una columna de metal (Ni^{2+}). Cuando se utilizó el protocolo para la purificación de proteínas en estado nativo, no se logró purificar la proteína recombinante. Antes de realizar la purificación, se verificaba por medio de un gel SDS-PAGE15% que se hubiera llevado a cabo la inducción de forma satisfactoria.

Se decidió purificar la proteína recombinante utilizando el protocolo para purificación en condiciones desnaturizantes. Esta utiliza 8M de Cloruro de Guanidinio. Mediante esta metodología, se logró purificar la banda correspondiente a la proteína recombinante como se puede observar en la figura 12, así como se puede confirmar por medio de un análisis con anticuerpos por el método de Western Blot (Fig. 12 B)

Se realizó un ensayo de ELISA para observar si la construcción era activa, por lo cual se lisaron las células una vez realizada la inducción. Se utilizaron dos metodologías, choque osmótico (Ch. Os) y ultrasonido (US). Con el choque osmótico se obtuvieron las fracciones periplásmicas y citoplásmicas, mientras que con el ultrasonido se obtuvieron las fracciones solubles e insolubles. Se probaron los cuatro extractos. Como se observa en la figura 13, el control negativo de la fracción soluble es muy similar a las muestras problema. Mediante estas dos metodologías se podría detectar si el anticuerpo es activo, ya que debería de estar en su forma nativa.

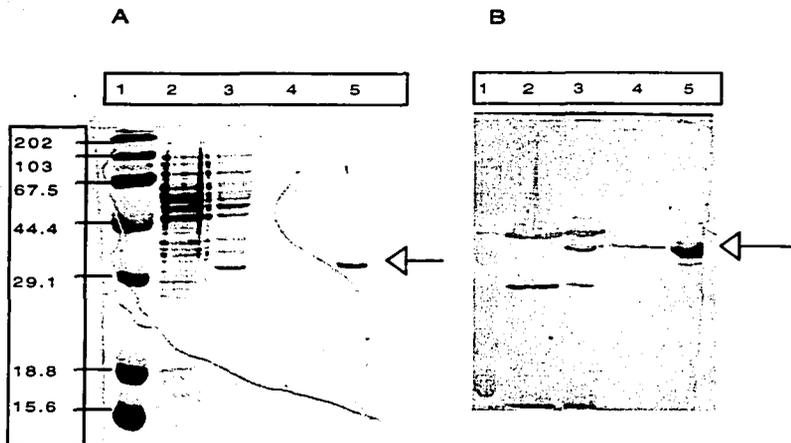


Fig. 12.- Inducción y purificación del scFv. En el panel A se muestra en un gel SDS-PAGE al 15%, en el cual se puede apreciar en el primer carril, el marcador de peso molecular; en el segundo carril, la cepa TG1 sin transformar; en el tercer carril, la cepa TG1 transformada e inducida; en el cuarto carril, el primer eluido de la columna de metales (pH 5.9) y en el quinto carril, el segundo eluido de la columna (pH4.5). En el panel B se muestra el Western Blot de lo descrito en el panel A. Los marcadores de peso molecular se encuentran indicados en el panel A. La flecha indica la presencia de la proteína recombinante

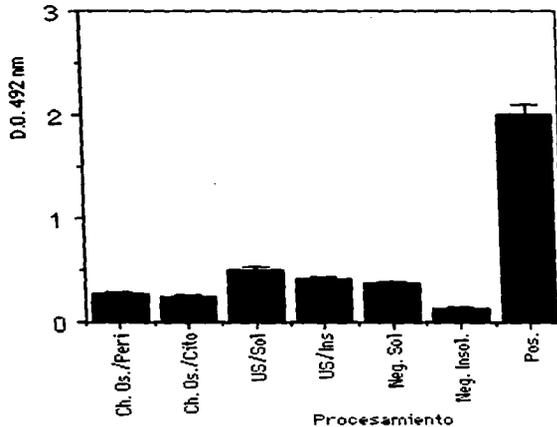


Fig.13.- ELISA de extractos celulares que contienen el scFv. En la gráfica se muestran las barras representativas de la actividad de la fracción scFv. La primera barra representa el extracto periplásmico, la segunda representa el extracto citoplásmico celular, la tercera representa la fracción soluble celular obtenida por ultrasonido, la cuarta indica la fracción soluble obtenida por ultrasonido. Se pusieron dos controles negativos, uno de fracción soluble y otro de fracción insoluble obtenidos por ultrasonido de células transformadas con el plásmido pACIB.7. El control positivo esta representado por el anticuerpo BCF2 completo en una concentración de 3 µg/mL.

DISCUSION

Mediante los ensayos de neutralización *in vivo* pudo apreciarse algo que era totalmete inesperado. Este hecho es que el anticuerpo BCF2 fuera capaz de neutralizar la fracción soluble del veneno completo del alacrán *Centruroides noxius* Hofmann. Este es un dato no esperado, debido a que el veneno completo del alacrán es una mezcla de péptidos tóxicos (aproximadamente 100). Por este motivo, aunque el anticuerpo BCF2 es capaz de neutralizar el efecto de la toxina Cn2 (Zamudio 1992), no se esperaba que neutralizara todo el veneno. La explicación probable para esto es que la toxina Cn2 es la toxina que se encuentra en mayor proporción dentro del veneno (7.5%) (Valdivia 1994) y es una de las más tóxicas (DL₅₀ de 0.25 µg/20 gr de peso de ratón).

Por estos motivos, podría ser que al neutralizar a la toxina Cn2 con el anticuerpo BCF2, no se vea el efecto de las demás toxinas, ya que para observarlo se necesitaría una mayor dosis de veneno administrado. Tampoco puede descartarse la posibilidad de una neutralización por reactividad cruzada con las otras toxinas, ya que el anticuerpo BCF2 puede reconocer otras toxinas (Zamudio 1992).

El hecho de que el Fab del anticuerpo BCF2 sea capaz de neutralizar el veneno completo del alacrán *Centruroides noxius* Hofmann, lo convierte en una herramienta con muchas posibilidades para ser utilizado en el tratamiento terapéutico de la picadura de alacrán. Este ofrecería ventajas sobre el suero hiper-inmune utilizado actualmente, ya que el suero comercial necesita una dosis aproximada de 10 veces mayor que el Fab de BCF2 para neutralizar la misma cantidad de veneno.

Basados en el tipo de ensayo que se realizó para determinar la capacidad neutralizante tanto del anticuerpo completo, del fragmento Fab, como del suero comercial [F(ab')₂], en la práctica, el Fab puede presentar una ventaja adicional sobre el suero comercial. Esta ventaja se basa en el tamaño de la molécula (50 KDa para el Fab y 100 KDa para el F(ab')₂). El Fab muestra una mayor capacidad de penetración a tejidos respecto a el antisuero comercial. Esta capacidad de penetración es de

suma importancia cuando se trata a un paciente que fué picado por un alacrán, ya que las toxinas una vez que son administradas pueden penetrar en los tejidos y realizar su acción. De esta manera, si se aplica una molécula neutralizante de gran tamaño y sin poder de penetración, solo neutralizará las toxinas que se encuentren en su entorno (torrente sanguíneo), pero sin embargo, si se aplica una molécula neutralizante con mayor poder de penetración, esta podrá llegar al sitio de acción de la toxina y lograr una mejor depuración (Smith 1979, Colcher 1990, Haber 1992).

Sin embargo, la producción de Fab de BCF2 por hidrólisis proteica para ser utilizado como terapia, representa altos costos, ya que se tiene que realizar por medio del cultivo de el hibridoma productor del anticuerpo BCF2, realizar la purificación del anticuerpo y hacer la digestión con papaína. Una vez hecho esto se procede a la purificación del Fab. Este es un proceso laborioso y que lleva varias semanas para realizarlo.

Tomando en cuenta ésto y analizando las ventajas que podría ofrecer una molécula más pequeña, fué que se decidió realizar la clonación de los genes que codifican para las regiones variables del anticuerpo neutralizante BCF2.

La primer construcción realizada, tiene el péptido de unión de la secuencia (Gli₄-Ser)₃. Se seleccionó esta secuencia debido a que no se ha reportado que sea inmunogénico, tiene flexibilidad debido al alto número de glicinas que posee en su secuencia y no se ha reportado que este péptido de unión interfiera con la estructuración de las regiones variables. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera, posee una región rica en glicinas y serinas, esta región se encuentra en el FR3 de la cadena ligera, y son los aminoácidos 63 al 67 (Ver secuencia en resultados). Cuando se tiene esta región de serinas-glicinas, no es recomendable utilizar este péptido de unión, ya que se corre el riesgo de que exista recombinación entre la secuencia de ADN que codifica para el péptido de unión y la que codifica para la región del FR3 de la cadena ligera (aminoácidos 63-67), si se llega a dar el caso, se pueden perder aproximadamente 120 pares de bases. Este fué el caso

con el cual nos enfrentamos, ya que en un principio teníamos producción del fragmento scFv en el plásmido pPACIB.3, sin embargo, al ocurrir la recombinación se perdió la expresión. Esto lo comprobamos por medio de una reacción de PCR, la banda obtenida tenía 100 pares de bases menos de lo que tenía originalmente.

Se realizó la construcción en el plásmido pPACIB.7, el cual tiene integrada la secuencia codificante para el péptido de unión, esta secuencia de aminoácidos es distinta a la de $(Gli_4-Ser)_3$ (Fig. 8).

Al realizar las inducciones para obtener la proteína se intentó realizar una purificación en condiciones nativas, sin embargo esto no fué posible, la construcción no se adhirió a la resina de afinidad por metales. Esto podría deberse a que las histidinas, que son las que interactúan con los iones de Ni^{2+} , se encuentran insertadas en la estructura terciaria de la proteína. Para resolver esto se realizó una purificación en condiciones desnaturizantes. Los resultados pueden observarse en la figura 10, donde empieza a aparecer la proteína de interés en el amortiguador con pH 5.9, sin embargo, se obtiene la mayoría de ella en pH 4.5. Basandonos en este resultado, podemos inferir que efectivamente, las histidinas se pueden encontrar internalizadas en la estructura del scFv.

La desventaja de purificar en condiciones desnaturizantes, es que se tiene que realizar un replegamiento *in vitro*, y esto en ocasiones es muy problemático. Lo ideal es obtener la proteína plegada en periplasma y poder purificarla en estas condiciones para probar su actividad. Por otra parte, al purificar la proteína en condiciones desnaturizantes y realizar posteriores renaturalizaciones *in vitro*, no asegura que las histidinas no interactuen con la estructura terciaria de la proteína y afecten su actividad, ya que se encuentran en el extremo amino terminal de la proteína. Una probable solución, es la de realizar una construcción que codifique para las histidinas en el extremo carboxilo terminal de la proteína.

Con los resultados obtenidos en el ELISA para detectar la actividad de la molécula expresada, no se puede concluir que el fragmento no esté activo, debido a que la proteína no se encuentra purificada y además pudiera estar muy diluida. Sería necesario purificar el fragmento por alguna otra metodología y obtenerlo plegado, para de esta manera poder realizar los ensayos de reconocimiento del antígeno y posteriormente de neutralización. En la figura 13 se observa la gráfica indicando los valores obtenidos en el ELISA. Con este ELISA se esperaba encontrar buena actividad en la fracción periplásmica y en la fracción soluble, ya que la construcción esta diseñada para que el producto de expresión sea dirigido a periplasma, y se esperaba que este producto se encontrara soluble.

CONCLUSIONES

- Se demostró que el fragmento Fab del anticuerpo BCF2, es capaz de reconocer a la toxina Cn2.
- Se comprobó que el fragmento Fab del anticuerpo BCF2, es capaz de neutralizar la fracción soluble del veneno total del alacran *Centruroides noxius* en ensayos realizados *in vivo* en ratones de la cepa CD1.
- Se demostró que la capacidad de neutralización del Fab no disminuyó respecto a la de anticuerpo completo.
- Se observó que se requiere nueve veces más del antisuero comercial que del fragmento Fab del anticuerpo BCF2 para neutralizar la misma cantidad de veneno, esto en términos molares.
- Se comprobó que la estrategia de construcción del gen codificante para un scFv, del tipo PCR-Ligación-PCR, no funciona para todos los casos, como se pudo observar en el nuestro.
- Se concluyó que mientras exista la posibilidad de recombinación, ya sea por parte de una de las secuencias codificantes de la región variable con la secuencia codificante para el péptido de unión. O de una de las secuencias codificantes de la región variable con el vector, se debe de tratar de modificar alguna de ellas para evitar recombinación y perder de esta manera un fragmento del gen.
- Se demostró que la metodología de PCR recursivo es eficaz para la construcción del gen codificante para una proteína del tipo scFv.
- Se comprobó indirectamente, que la secuencia de seis histidinas se encuentra interaccionando con la proteína scFv.

PERSPECTIVAS

Entre las perspectivas de este trabajo se preveen:

- La purificación del fragmento scFv por medio de una columna de afinidad.
- La purificación del fragmento por una columna de unión a metales y realizar una renaturalización *in vitro*.
- La demostración de que el fragmento scFv nativo, es capaz de neutralizar la acción de la fracción soluble del veneno total del alacran *Centruroides noxius*.
- Si el fragmento scFv no resulta ser activo, realizar una construcción en la cual se encuentren las histidinas en el extremo carboxilo terminal de la molécula y volver a probar si es neutralizante.
- Finalmente, se espera producir el anticuerpo por fermentación, optimizar el sistema y eventualmente poder comercializarlo.

BIBLIOGRAFIA

Abbas A.K., Pober J. S., (1991) Cellular and molecular Immunology. W. B. Saunders Company.

Adair, J. R. (1992). Engineering antibodies for therapy. Immunological reviews, 130, 5.

Buchner J., B. U., Pastan I. (1992). Renaturation of a single-chain immunotoxin facilitated by chaperones and protein disulfide isomerase. Biotechnology, 10, 682.

Calderon E.S., H. D., Possani L.D. (1993). Neutralizing capacity of murine sera induced by different antigens of scorpion venoms. Toxicon, 31, 327.

Carayannopoulos L., Max E.E. and Capra J.D. (1994). Recombinant human IgA expressed in insect cells. Proc. Natl.Acad. Sci. USA, 91, 8348.

Carbone E., W. E., Prestipino G., Possani L.D., Maelicke A. (1982). Selective blockage of voltage-dependent K channels by a novel scorpion toxin. Nature, 296, 90.

Carroll W.L., M. E., Levy S. (1988). Hibridoma Fusion Cell Lines Contain an Aberrant Kappa Transcript. Molecular Immunology, 25(10), 991.

Caterrall, W. (1976). Purification of a toxic protein from scorpion venom which activates the action potential Na ionophore. J. Biol. Chem., 251, 5528.

Chothia C., L. A. M., Tramontano A., Levitt M., Smith S., Air G., Sheriff S., Padlan E.A., Davies D., Tulip W., Colman P.M., Spinelli S., Alzari P.M., Poljak R.J. (1989). Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. Nature, 342, 877883.

Colcher D., Bird R., Roselli M., Hardman K. D., Johnson S., Pope S., Dodd S., Pantoliano M., Milenic D. and Scholm J., (1990). *In vivo* tumor targeting of a recombinant single-chain antigen-binding protein. *J. Natl. Cancer Ins.* 82, 1191.

Davies J. and Riechmann L. (1995). Antibody VH domains as small recognition units. *Bio/Technology* 13, 475.

Davis G.T., Bedzyk W.D., Voss E.W. and Jacob T.W. (1991). Single chain antibody (SCA) encoding genes: One-Step construction and expression in eukaryotic cells. *Bio/Technology* 9, 165.

DeBin J.A., M. J. E., Stricahrtz G. (1993). Purification and characterization of chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am. J. Physiol*, 264, C3361.

Dehesa-Davila M. (1989). Epidemiological characteristics of scorpion stings in León, Guanajuato, México. *Toxicon*, 27, 281.

Dehesa-Davila M. and Possani L.D., (1994). Scorpionism and serotherapy in México. *Toxicon* 32, 1015.

Dent M.A.E., P. L. D., Ramirez G.A. and Fletcher P.L. (1980). Purification and characterization of two mammalian toxins from the venom of the mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffman. *Toxicon*, 18, 343.

Dueñas M., V. J., Ayala M., Söderlind., Ohlin M., Perez L., Borrebaeck C.A.K. and Gavilondo J.V. (1994). Intra- and extracellular expression of an scFv antibody fragment in *E. coli*: Effect of bacterial strains and pathway engineering using GroES/L Chaperonins. *BioTechniques*, 16, 476.

Edelman, G. M. (1970). The covalent structure of a human Ig-immunoglobulin XI. Functional implications. *Biochemistry*, 9, 3197.

Gally, J. A. (1973). Structure of immunoglobulins. In *The Antigens.*, 1, 162.

- Gateau T., B. M., Clarck R. (1992). Action of specific *Centruroides sculpturatus* antivenom in the treatment of scorpion stings. A review of 151 cases. Recent advances in toxinology research, 2, 12.
- Haber E. (1992). Engineered antibodies as pharmacological tools. Immunological Reviews. 130, 189.
- Huse W. D, L. S., S. A. Iverson, A.S. Kang, M.A. Mees, D.R. Burton, S.J. Benkovic, R.A. Lerner (1989). Generation of a large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire in phage lambda. Science, 246, 1275.
- Ismail M. (1993). Serotherapy of the scorpion envenoming syndrome is irrationally convicted without trial. Toxicon 31, 1077.
- Jespers L.S., Roberts A., Mahler M.S., Winter G. and Hoogenboom H.R. (1994) Guiding the selection of human antibodies from phage display repertoires to a single epitope of an antigen. Bio/Technology 12, 899.
- Kabat, E. A. (1982). Antibody diversity versus antibody complementarity. Pharmacology, 34, 23.
- Kabat, E. A., Wu T.T., Perry H.M., Gottesman K.S. and Foeller C. (1991). Sequences of proteins of immunological interest. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service, National Institute of Health. Fifth Edition.
- Knappik A. and Plückerthun A. (1994). An improved affinity tag based on the FLAG peptide for the detection and purification of recombinant antibody fragments. BioTechniques 17, 754.
- Neri D., Lalla C., Petrucci H., Neri P and Winter G. (1995). Calmodulin as a versatile tag for antibody fragments. Bio/Technology 13, 373
- Pérez-Pérez J., M. G., Barbero J., Gutierrez J. (1994). Increasing the efficiency of protein export in *Escherichia coli*. Bio/Technology, 12, 178.

- Plückthum, A. (1992). Mono- and bivalent antibody fragments produced in *E. coli*: Engineering, folding and antigen binding. *Immunological reviews*, 130, 151.
- Possani L.D., A. A., Fletcher P., Erickson B.W. (1977). Purification and properties of mammalian toxins from the venom of the brazilian scorpion *Tityus serrulatus*. *Arch. Biochem. and Bioph.*, 180, 394.
- Possani L.D. (1984). Structure of scorpion toxins. *Handbook of natural toxins*, 2, 513.
- Possani L.D. (1992). Structure-function relationship of scorpion toxins. Abstract from VII PAABS Congress, Ixtapa, México, 1, 01PLSu.
- Rochat H., B. P., Couraud F. (1979). Scorpion Toxins: Chemistry and mode of action. *Advances in citopharmacology*, 3, 325.
- Scroff R.W., F. K. H., Beaty S.M., Olkham R.K., Morgan A.C. (1985). Human anti-murine immunoglobulin responses in patients receiving monoclonal antibody therapy. *Cancer Res.*, 45, 879.
- Shin S.U., Wriqth A., Bonagura V. and morrison S.L. (1992). Genetically-engineered antibodies: Tools for the study of diverse properties of the antibody molecule. *Immunological Reviews* 130, 87.
- Skerra A., Plückthum A. (1988). Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in *Escherichia coli*. *Science*, 240, 1038.
- Smith T.W., Lloyd B.L., Spicer N. and Haber E. (1979). Immunogenicity and kinetics of distribution and elimination of sheep digoxin-specific IgG and Fab fragments in the rabbit and baboon. *Clin. Exp. Immunol.* 36, 384.
- Stockwell S.A. (1992), Systematic observations on north american scorpionida with a key and checklist of the families genera. *J. Med. Entomology*, 29, 407.

Tonegawa, S. (1983). Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 302, 575.

Vazquez A., Tapia J.V., Eliason W.K., Martin B.M., Lebreton F., Delepierre M., Possani L.D. and Becerril B. (1995). Cloning and characterization of the cDNA encoding Na⁺ channel-specific toxins 1 and 2 of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffman. *Toxicon*, 33, 1161.

Valdivia H.H., K. M., Lederer WJ., Coronado R. (1992). Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca-release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 89, 12185.

Valdivia H.H., M. B. M., Ramirez A.N., Fletcher P.L., Possani L.D. (1994). Isolation and pharmacological characterization of four novel Na channel-blocking toxins from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffman. *J. Biochem. (Japan)*, 116, 1388.

Wright A., S. S. U., Morrison S. L. (1992). Genetically engineered antibodies: Progress and prospects. *Critical Reviews in Immunology*, 12, 125.

Zamudio F., S. R., Martin B.M., Gurrola G., Herion P., Possani L.D. (1992). Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffman. *Eur. J. Biochem*, 204, 281.

ESTA TERCIA NO DEBE
SER DE LA BIBLIOTECA

SOLICITUD DE DEPOSITO DE UNA PATENTE



Instituto de Biotecnología
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

A QUIEN CORRESPONDA:

Por este conducto hago constar que en esta oficina se está estructurando el documento de patente denominada "ADNc y fragmento Fab del anticuerpo BCF2 y su uso en composiciones farmacéuticas neutralizantes de venenos de alacranes", fungiendo como inventores de la misma Alexei F. Licea, Baltazar Becerril y Lourival D. Possani.

Esta solicitud será presentada en breve ante las autoridades en materia de propiedad industrial.

Sin otro particular se extiende la presente a los 15 días del mes de octubre de 1996.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cuernavaca, Mor., a 13 de diciembre de 1996.

ING. ELENA ARRIAGA ARELLANO
SECRETARIA TECNICA DE GESTION
Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGIA



ANEXOS

Modulation of cell membrane potential in cultured vascular endothelium

Anexas

L. VACA, A. LICEA, AND L. D. POSSANI

Department of Molecular Physiology and Biophysics, Baylor College of Medicine, Houston, Texas 77030; Departamento de Bioenergética y Biomembranas, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico DF 04510; and Department of Molecular Recognition and Structural Biology, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos 62271, México

Vaca, L., A. Licea, and L. D. Possani. Modulation of cell membrane potential in cultured vascular endothelium. *Am. J. Physiol.* 270 (Cell Physiol. 39): C619–C624, 1996.—The present study explores the role of different ionic conductances in the regulation of membrane potential under resting conditions and after bradykinin (BK) or thapsigargin (TG) stimulation of cultured bovine aortic endothelial cells. Under resting conditions, the cell membrane potential observed was -62 ± 5 mV. The main conductance under these conditions is an inwardly rectifying potassium (IRK) channel. Application of 50 nM BK induced a transient hyperpolarization to -87 ± 4 mV followed by a sustained depolarization to -35 ± 5 mV. The transient hyperpolarization was eliminated by 1 μ M nifedipine, a blocker of calcium-activated potassium channels (K_{Ca}). The sustained depolarization induced by BK was prevented by incubating the cells with the calcium channel blocker lanthanum. TG evoked a similar response in membrane potential, with the exception that the onset of the hyperpolarization was slower compared with BK. The results presented here indicate that the cell resting potential is maintained at -62 ± 2 mV by the IRK channel. BK or TG stimulation induces a transient hyperpolarization of approximately -20 mV produced by activation of a K_{Ca} . This hyperpolarization is followed by a sustained depolarization produced by activation of a calcium-selective channel sensitive to lanthanum.

bradykinin

THE ROLE OF ENDOTHELIAL cells in the regulation of vascular smooth muscle tone is widely accepted (7). Several agonists can modulate the activity of the endothelium by binding to specific receptors in the plasma membrane of these cells, resulting in the activation of second messenger cascades (21). One of the final events is the rise in the intracellular calcium concentration as a result of release of calcium from intracellular compartments and calcium influx from the extracellular space (20).

Bradykinin (BK) is a nonapeptide and is perhaps the best known member of the kinin family that comprises several naturally occurring peptides (9). BK is an agonist with activity in a wide variety of tissues (9). In gastrointestinal smooth muscle, BK stimulates contractility (4). In epithelia, BK stimulates chloride secretion (28). BK has been shown to play a role in inflammation and pain (1). In vascular endothelium, BK stimulates the secretion of potent vasoactive substances such as prostaglandins and nitric oxide (15).

Agonists, such as BK, also induce complex changes in the electrical properties of vascular endothelium (2, 3,

12, 17, 26). These changes involve the activation of several ionic conductances such as a calcium-activated potassium channel (3, 26) and a calcium-selective channel (25). Activation of these conductances results in fluctuations in the cell membrane potential. In guinea pig coronary endothelial cells, BK induces a transient hyperpolarization from the resting value of about -50 to -80 mV followed by a depolarization to -40 mV (17). Similar results have been observed in porcine coronary endothelial cells in response to substance P (23). In endothelium from rat aorta, acetylcholine stimulation induces a transient hyperpolarization followed by oscillations in the cell membrane potential (14). The mechanisms underlying the different responses to agonists remain unclear.

Changes in cell membrane potential play an important role in the regulation of calcium homeostasis in vascular endothelium (13, 22) and human melanoma cells (18). Cell depolarization reduces calcium influx, whereas cell hyperpolarization increases calcium influx (16, 22). Changes in the endothelial cell membrane potential can be transmitted to the underlying smooth muscle through the myoendothelial gap junctions (2). It has been previously shown that transient hyperpolarization of the endothelium by kinins is transmitted to the smooth muscle layer (2). Thus changes in the endothelial cell membrane potential may play an important role in the vascular response to specific agonists.

The relative contribution of each one of the ionic channels found in vascular endothelium to the observed changes in membrane potential has not been determined thus far. The present study takes advantage of specific blockers for some of these channels in an attempt to determine the relative contribution of each ionic conductance to the fluctuations of membrane potential observed after stimulation of single endothelial cells with BK or thapsigargin (TG), a specific inhibitor of the microsomal calcium-ATPase.

METHODS

Cell preparation. Bovine aortic endothelial cells (BAEC) were prepared according to methods previously published (6). Cells were maintained in culture and used from passages 3 to 20. Cells were grown to confluency and used immediately after. Cells were cultured using Dulbecco's modified Eagle's medium (GIBCO) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (HyClone, Logan, UT), 50 μ g/ml streptomycin, 50 μ g/ml penicillin, 50 μ g/ml neomycin, and 2 mM glutamine. The monolayer was mechanically dispersed with a plastic pipette, and single cells were transported to the

patch-clamp dish, allowing cell reattachment to the dish for 30 min at 37°C. In experiments with 1,2-bis(2-amino-phenoxy)ethane-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid-acetoxymethyl ester (BAPTA-AM), cells were incubated in 20 μ M BAPTA-AM for 30 min at 37°C. Then the culturing medium was replaced with the extracellular solution. Only single cells were utilized in the studies to be described.

Solutions. The intracellular (pipette) solution contained (in mM) 145 potassium aspartate, 1 MgCl₂, 10 *N*-2-hydroxyethyl-piperazine-*N'*-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 5 NaCl, 2 CaCl₂, and 2 ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA). The extracellular solution contained (in mM) 145 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2 CaCl₂, and 10 HEPES. For experiments in low extracellular calcium, the 2 mM calcium from the extracellular solution was replaced with 2 mM EGTA. The pH in all solutions was adjusted to 7.2 and the osmolarity to 290 mosM. A rapid perfusion system was used to deliver the substances described in these studies.

Reagents. All salts used were analytical grade (Sigma). BK, TG, EGTA, and BAPTA-AM were purchased from Calbiochem. Noxustoxin (NTX) was obtained as previously described (19), with an additional separation through high-performance liquid chromatography using a C18 reverse-phase column (Vydac, Hesperia, CA) in a Waters, model 600E, chromatographer (Millipore, Bedford, MA). A linear gradient from solution A (0.1% trifluoroacetic acid (TFA) in water) to 60% solution B (0.1% TFA in acetonitrile) was applied for 60 min.

Electrophysiology. Cell membrane potential was measured in single endothelial cells using the patch-clamp technique in current-clamp mode (10). Glass electrodes were obtained after pulling and fire polishing no. 7052 glass (World Precision Instruments). Electrode resistances in the order of 2–4 MΩ were used. The reference electrode was an Ag-AgCl plug connected to the bath solution via a 150 mM KCl agar bridge. Junction potentials were usually <2 mV and were not corrected. The amplifier used was the Axopatch 200A (Axon Instruments). Measurements were recorded on tape using a PCM recorder (Vetter). After a gigaohm seal was obtained with the amplifier in voltage-clamp mode, the membrane was disrupted by suction to gain electrical access into the cell (whole cell configuration). Current-voltage relationships were obtained in voltage-clamp mode. After this, the amplifier was switched to current-clamp mode to begin recordings of cell membrane potential. Under these conditions, no current was applied. All experiments were conducted at room temperature.

RESULTS

Inward rectifier potassium channel controls membrane potential in resting conditions. Under resting conditions the cell membrane potential observed in 90% of the cells explored was -62 ± 5 mV (36/40); in the remaining cells (4/40), the cell membrane potential observed was more depolarized (-81 ± 3 mV). Cells with membrane potentials more depolarized than -50 mV were not used in the present study. In these conditions, the main conductance detected in voltage-clamp experiments was the inward rectifier potassium (IRK) channel, which was reversibly blocked by micromolar concentrations of extracellular barium (Fig. 1, A and B). This result is in agreement with previously published data on BAEC (3). Perfusion of single BAEC with 100 μ M barium blocked ~90% of the current

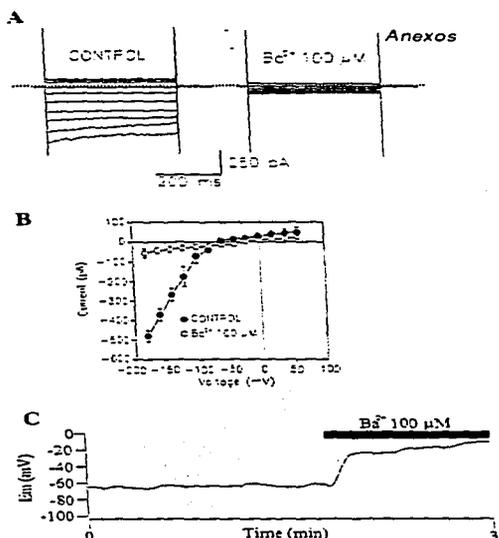


Fig. 1. Effect of Ba²⁺ on cell membrane potential (E_m) under resting conditions. A: example of current recordings in voltage-clamp mode in response to voltage steps from -150 to -60 mV in 20-mV steps with a duration of 400 ms. Holding potential was -60 mV. Left: control; right: 1 min after addition of 100 μ M Ba²⁺. Dotted line, zero current level. B: Current-voltage relationships obtained from experiments like one shown in A. Bars on data points represent SD; where not shown, SD are smaller than symbol. C: Effect of 100 μ M Ba²⁺ on E_m of a single cell under current-clamp. Solid bar, time in which cell was perfused with Ba²⁺. Substances were applied to cell using a rapid perfusion system.

measured at more hyperpolarized potentials than -120 mV and resulted in a shift in the reversal potential toward more positive values, as shown in the current-voltage relationship curve in Fig. 1B. The remaining current after barium had a linear current-voltage relationship and a reversal potential of -15 ± 5 mV (n (no. of experiments) = 5). Addition of barium in current-clamp experiments produced depolarization of the cell membrane potential from a control value of -61 ± 3 to -10 ± 3 mV ($n = 5$, Fig. 1C). Removing barium slowly recovered the cell membrane potential, and, after ~ 2 min, the cell hyperpolarized to control values before the addition of barium (data not shown).

Fluctuations in membrane potential evoked by BK. Stimulation of single BAEC with 50 nM BK resulted in a biphasic response in cell membrane potential (Fig. 2A). Immediately after BK stimulation, the cell membrane potential hyperpolarized from a control value

of -64 ± 2 to -87 ± 4 mV followed by a sustained depolarization to -35 ± 5 mV ($n = 5$). The depolarization remained for ~ 2 min and slowly returned to control values, even in the continued presence of BK. Repeated stimulation with BK in the same cell resulted in multiple biphasic responses of the cell membrane potential; however, the magnitude of the response declined with each BK application (Fig. 2B). In 80% of the cells (4 of 5), no response was detected after the fourth stimulation with BK. In 2 of 4 cells, the response could be recovered by maintaining the cell in BK-free solution for 10 min (data not shown). These results may represent desensitization of the BK receptor, which has been shown to be a relatively fast event (27).

Approximately 20% of all the cells tested did not respond to BK stimulation. The lack of response may indicate that those cells do not have functional BK receptors or that one or several of the steps in the inositol cascade system are impaired.

Role of calcium-activated potassium channel in the hyperpolarization of membrane potential. Under resting conditions, addition of $1 \mu\text{M}$ NTX, a blocker of calcium-activated potassium channels (K_{Ca}), had no effect on cell membrane potential (Fig. 3). This result suggests that NTX has no effect on the IRK channel, the main conductance observed in resting conditions (Fig. 1). In cells preincubated with NTX, BK stimulation produced a sustained depolarization from a control value of -63 ± 4 to -35 ± 3 mV ($n = 4$). Under these conditions, NTX prevented the BK-induced hyperpolarization previously observed in cells not exposed to NTX (compare Fig. 24 with Fig. 3). The cell membrane potential slowly returned toward control values after 2 min of BK exposure, even in the continued presence of BK in the bathing solution (data not shown). We have previously shown that NTX is a specific blocker of K_{Ca} in BAEC (24). This result strongly suggests that the BK-induced hyperpolarization is mediated through activation of K_{Ca} .

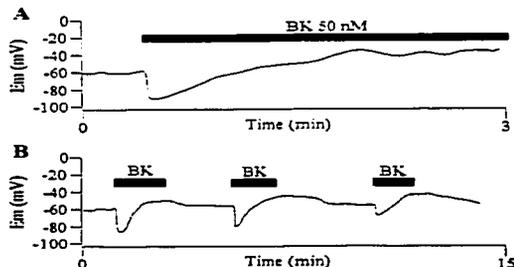


Fig. 2. Responses on cell E_m evoked by bradykinin (BK). A: effect of 50 nM BK on E_m of a single cell. B: effect of multiple, brief, consecutive applications of 50 nM BK on a single cell under current clamp. Solid bars, time of BK application. Substances were applied to cell using a rapid perfusion system.

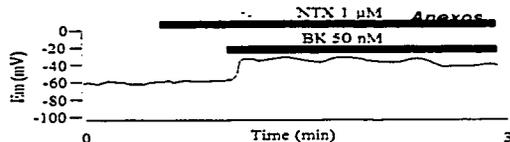


Fig. 3. Effect of noxustoxin (NTX) on response to BK. Effect of $1 \mu\text{M}$ NTX on response in E_m to stimulation with 50 nM BK. Solid bars, time of NTX and BK application. Substances were applied to cell using a rapid perfusion system.

Lanthanum prevents depolarization of membrane potential evoked by BK. Under resting conditions, lanthanum had no effect on the cell membrane potential, suggesting that, at the concentration of $50 \mu\text{M}$, lanthanum has no effect on the IRK channel (Fig. 4). At this concentration, lanthanum had no effect on K_{Ca} (data not shown). However, in BK-stimulated cells, lanthanum modified the BK response in two ways. First, lanthanum reduced the BK-induced hyperpolarization. In lanthanum-treated cells, the membrane potential hyperpolarized from a control value of -61 ± 3 to -74 ± 5 mV ($n = 4$). This result contrasts with the result obtained in the absence of lanthanum in which the cells hyperpolarized to -87 ± 4 mV (Fig. 2). Second, in lanthanum-treated cells, no BK-induced depolarization was observed (Fig. 4). After the transient hyperpolarization, the cell membrane potential slowly returned toward control values. We have previously shown that in BAEC lanthanum is a potent blocker of the depletion-activated calcium current (I_{CaT}) (25). This result suggests that the BK-induced depolarization is mediated through the activation of I_{CaT} and confirms previous reports indicating that activation of calcium influx tends to depolarize the cell membrane potential (16, 22).

In cells treated with both lanthanum and NTX, no change in membrane potential was observed after stimulation with BK (Fig. 5). A second BK stimulation after lanthanum and NTX were removed from the bath solution resulted in a biphasic response similar to the response presented in Fig. 2 (data not shown). This result demonstrates that the cells could produce a typical membrane potential response evoked by BK but such response was prevented by the treatment with lanthanum and NTX (Fig. 5). This result indicates that

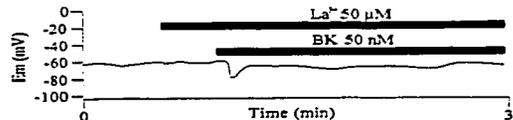


Fig. 4. Effect of La^{3+} on response to BK. Effect of preincubating with $50 \mu\text{M}$ La^{3+} on response in E_m to stimulation with 50 nM BK. Solid bars, time of La^{3+} and BK application. Substances were applied to cell using a rapid perfusion system.

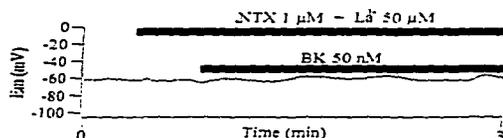


Fig. 5. Effect of simultaneous incubation with NTX and La^{3+} on response to BK. Effect of 1 μ M NTX and 50 μ M La^{3+} on response in E_m to stimulation with 50 nM BK. Solid bars, time of NTX, La^{3+} , and BK application. Substances were applied to cell using a rapid perfusion system.

the two main conductances involved in the response in membrane potential to BK stimulation are K_{Ca} and I_{Ca} .

Fluctuations in cell membrane potential evoked by TG. TG, a specific inhibitor of the microsomal calcium-ATPase, activates calcium influx in BAEC by depleting the intracellular calcium stores, therefore activating I_{Ca} (5). Stimulation of single BAEC with 200 nM TG resulted in a slow hyperpolarization of the cell membrane potential from a control value of -64 ± 3 to -53 ± 4 mV followed by a slow depolarization toward control values (Fig. 6, $n = 4$). The onset of the TG-evoked hyperpolarization was ~ 20 – 30 s and contrasts with the rapid hyperpolarization induced by BK (compare Fig. 2 with Fig. 6). The changes in membrane potential in response to TG presented here resemble those previously reported for endothelium from rat aorta (14).

Effect of calcium influx on cell membrane potential fluctuations evoked by BK and TG. To test the effect of calcium influx in the fluctuations of membrane potential, a series of experiments was designed in which the extracellular calcium concentration was rapidly changed from 2 mM to a solution containing 2 mM EGTA (no added calcium) and back to 2 mM calcium using a rapid perfusion system.

Removing the extracellular calcium during the peak of the hyperpolarization induced by BK and TG resulted in a rapid depolarization from -85 ± 4 to -56 ± 3 mV for BK-treated cells ($n = 4$) and from -80 ± 4 to -60 ± 5 mV for TG-treated cells ($n = 4$) (Fig. 7, A and B). Restoring the extracellular calcium concentration to 2 mM resulted in further depolarization of the membrane potential to -43 ± 3 mV for BK-treated cells and to -46 ± 4 mV for TG-treated cells (Fig. 7, A and B).

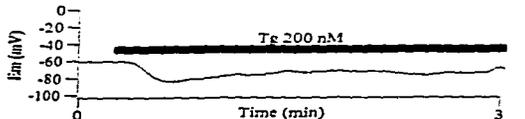


Fig. 6. Response in E_m evoked by thapsigargin (TG). Effect of 200 nM TG on E_m of single current-clamped cells. Solid bars, time of TG application. Substances were applied to cell using a rapid perfusion system.

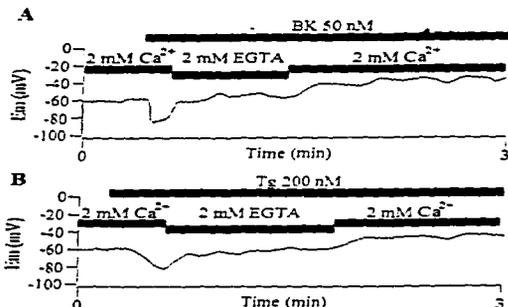


Fig. 7. Effect of changing extracellular calcium in E_m response evoked by TG and BK. Effect of changing extracellular solution from one containing 2.5 mM calcium to one with 2 mM EGTA and no calcium added on cell E_m . A: effect of extracellular calcium on E_m of a single cell stimulated with 50 nM BK. B: effect of extracellular calcium on E_m of a single cell stimulated with 200 nM TG. Solid bars, time of application of BK and TG and time in which extracellular solution was replaced using a rapid perfusion system.

To evaluate the role of intracellular calcium in response to BK and TG, a series of experiments was performed in which the cells were incubated with 20 μ M BAPTA-AM as indicated in METHODS. BAPTA-AM incubation prevents changes in the intracellular calcium concentration (25). To prevent the influx of calcium from the extracellular space, the calcium from the extracellular solution was replaced with 2 mM EGTA. Under these conditions, the hyperpolarization evoked by either BK or TG was either completely abolished or greatly reduced, as shown in Fig. 8. The cell membrane

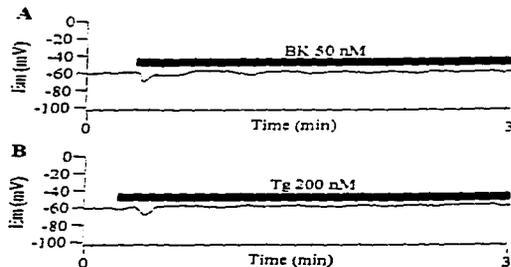


Fig. 8. E_m response evoked by TG and BK in 1,2-bis(2-aminophenoxy)ethane- N,N,N',N' -tetraacetic acid-acetoxymethyl ester (BAPTA-AM)-loaded cells. Fluctuations in cell E_m in cells loaded with 20 μ M BAPTA-AM produced by TG and BK. A: response in E_m of a single cell evoked by 50 nM BK. B: response in E_m of a single cell evoked by 200 nM TG. Solid bars, time of application of BK and TG using a rapid perfusion system.

potential changed from -63 ± 4 to -68 ± 3 mV for cells treated with BK ($n = 4$) and from -62 ± 2 to -65 ± 3 mV for cells treated with TG ($n = 4$). Under these conditions, the depolarization evoked by BK or TG was not observed (Fig. 3, A and B).

DISCUSSION

Under resting conditions, the main conductance observed in BAEC was the IRK channel, as we and others have previously shown (3, 26). Under these conditions, the cell membrane potential observed in current-clamp mode was -62 ± 5 mV. Similar values have been previously reported for the same cell type (3).

When one considers that the main conductance under resting conditions is the IRK channel, it is puzzling that the cell membrane potential in resting conditions is at least -20 mV depolarized from the expected potassium equilibrium potential (E_K ; Ref. 11). However, BK stimulation moved the membrane potential close to the expected E_K . This indicates that the cell can be hyperpolarized to E_K but, under resting conditions, something prevents the membrane potential from reaching E_K . One possible explanation is that either an active transport system or ionic conductance may drive the membrane potential away from E_K . A small nonselective cation current would be sufficient to depolarize the membrane potential away from E_K . Such nonselective current has been previously observed in many endothelia (12). In experiments in which the IRK channel was blocked with barium, a small linear conductance with a reversal potential of -15 ± 5 mV remained. This small linear conductance with reversal potential near 0 mV may be responsible for preventing the membrane potential from reaching E_K . Thus it appears that, under resting conditions, a combination of IRK channel and the linear nonselective conductance determines the cell membrane potential of -65 mV observed in this study. This observation is consistent with previously published data indicating that the current-voltage relationship of an endothelial cell can be fitted with a sum of the equation for the inward rectifier (8) and a linear component with a reversal potential near 0 mV (12).

Stimulation of single, current-clamped BAEC with 50 nM BK resulted in a biphasic response in the cell membrane potential. The first phase of the response consisted of a rapid hyperpolarization followed by a sustained depolarization that lasted several minutes before returning slowly to resting values. The initial phase of the response was prevented by incubating the cells in 1 μ M NTX, a blocker of K_{Ca} . The second phase of the response was abolished with 50 μ M of the calcium channel blocker, lanthanum, or by replacing the extracellular calcium with 2 mM EGTA. A combination of lanthanum and NTX prevented any change in the cell membrane potential after stimulation with BK.

We have previously shown that depletion of the intracellular calcium storage compartment with agonists, such as BK, or inhibitors of the microsomal calcium-ATPase, such as TG, activates a calcium-selective current in BAEC (25). This current, which is blocked with micromolar concentrations of lanthanum,

may be responsible for the BK- and TG-induced depolarization of the cell membrane potential; however, we cannot discard the possibility that other conductances may contribute to this depolarization. In fact, other reports have shown agonist-activated nonselective cation channels in endothelial cells (12).

Similar biphasic responses in the cell membrane potential have been reported for guinea pig coronary endothelial cells after stimulation with BK (17) and in porcine coronary artery endothelial cells stimulated with substance P (23). In endothelial cells from rat aorta, acetylcholine stimulation induced a biphasic response similar to the response presented here, followed by oscillations in the cell membrane potential (14).

Repeated, brief stimulations with BK on the same cell resulted in reduction in the magnitude of each response so that, by the fourth application, no response in membrane potential was obtained in 80% of the cells tested. This observation may reflect desensitization of the BK receptor, which has been shown to occur rapidly (27). The fact that maintaining the cells in BK-free solution for several minutes recovered the response to BK further supports this possibility.

Calcium plays a major role in the fluctuations of the cell membrane potential evoked by BK and TG. This conclusion is supported by experiments with BAPTA-AM-loaded cells in which BK or TG stimulation evoked only a very small, transient hyperpolarization and no depolarization was observed. BAPTA-AM is very effective in preventing changes in the intracellular calcium concentration in BAEC (25).

Changes in the cell membrane potential play a dynamic role in the regulation of calcium influx in a variety of nonexcitable cells, such as endothelial cells (13, 22), mast cells (16), and human melanoma cells (18). On the other hand, the influx of calcium has an important depolarizing effect on the cell membrane potential, as indicated in the experiments in which lanthanum was used to block I_{Ca} and in the experiments in which the extracellular calcium was replaced with 2 mM EGTA. The depolarizing effect of calcium influx is compensated by the activation of K_{Ca} , which would drive the membrane potential close to E_K . This idea is consistent with the biphasic response in membrane potential observed after BK or TG stimulation. Intracellular calcium concentration peaks a few seconds after BK stimulation, which results in maximum activation of K_{Ca} (26). This result is consistent with the rapid hyperpolarization observed in the present study. After the initial peak, calcium declines slowly toward a sustained plateau, which correlates with the sustained depolarization observed in the results presented here (26). Finally, after the plateau phase, the intracellular calcium declines slowly toward baseline, which correlates with the slow decline of membrane potential toward resting values.

Changes in membrane potential may not only contribute to the modulation of calcium influx but may also affect the underlying muscle through the myoendothelial gap junctions (2). A bidirectional electrical commu-

nication between the smooth muscle and the endothelium has been reported for pig coronary arteries (2). In these studies, BK induced a biphasic response in membrane potential similar to the response presented here.

Helpful discussions with Dr. Georgina Gurrola were greatly appreciated.

This study was supported by Grant HL-51949 from the National Heart, Lung, and Blood Institute and Grant IN205495 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, National University of Mexico (DGAPA-UNAM) to Luis Vaca. This work was partially supported by Grant 75191-527104 from Howard Hughes Medical Institute and Grant IN206994 from DGAPA-UNAM to L. D. Possani.

Address for reprint requests: L. Vaca, Departamento de Bioenergética y Biomembranas, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-600, Mexico DF 04510, México.

Received 16 August 1995; accepted in final form 20 September 1995.

REFERENCES

1. Armstrong, D., R. M. L. Dry, C. A. Keele, and J. W. Markham. Pain-producing substances in blister fluid and in serum. *J. Physiol. Lond.* 117: 4P-5P, 1952.
2. Beny, J. L., and C. Pacicca. Bidirectional electrical communication between smooth muscle and endothelial cells in pig coronary artery. *Am. J. Physiol.* 266 (*Heart Circ. Physiol.* 35): H1465-H1472, 1994.
3. Colden-Stanfield, M., W. P. Schilling, L. D. Possani, and D. L. Kunze. Bradykinin-induced potassium current in cultured bovine aortic endothelial cells. *J. Membr. Biol.* 116: 227-235, 1990.
4. Couture, R., J. Mizrahi, D. Regoli, and G. Debroede. Acute effects of peptides on the rat colon. *Pharmacology* 24: 230-242, 1982.
5. Dolor, R. J., L. M. Hurwitz, Z. Mirza, H. C. Strauss, and A. E. Whorton. Regulation of extracellular Ca^{2+} entry in endothelial cells: role of intracellular Ca^{2+} pools. *Am. J. Physiol.* 262 (*Cell Physiol.* 31): C171-C181, 1992.
6. Eskin, S. G., H. D. Sybers, L. Trevino, T. Lie, and J. E. Chimoskey. Comparison of tissue-cultured bovine endothelial cells from aorta and saphenous vena. *In Vitro* 14: 903-910, 1978.
7. Furchgott, R. F., and J. Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature Lond.* 228: 373-376, 1980.
8. Hagiwara, S., and K. Takahashi. The anomalous rectification and cation selectivity of the membrane of starfish egg cell. *J. Membr. Biol.* 15: 61-80, 1974.
9. Hall, J. M. Bradykinin receptors: pharmacological properties and biological roles. *Pharmacol. Ther.* 56: 131-190, 1992.
10. Hamill, D. P., E. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F. J. Sigworth. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.* 391: 85-100, 1981.

11. Hille, B. *Ionic Channels of Excitable Membranes* (2nd ed.). Sunderland, MA: Sinauer Associates, 1992.
12. Himmler, H. M., A. B. Whorton, and H. C. Strauss. Intracellular calcium currents, and stimulus-response coupling in endothelial cells. *Hypertension Dallas* 22: 112-127, 1993.
13. Lückhoff, A., and R. Busse. Calcium influx into endothelial cells and formation of endothelium-derived relaxing factor is controlled by membrane potential. *Pflügers Arch.* 416: 305-311, 1990.
14. Marchenko, S. M., and S. O. Sage. Mechanism of acetylcholine action on membrane potential of endothelium of intact rat aorta. *Am. J. Physiol.* 266 (*Heart Circ. Physiol.* 35): H2385-H2395, 1994.
15. Margolius, H. S. Tissue kallikreins and kinins: regulation and roles in hypertensive and diabetic diseases. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 29: 343-364, 1989.
16. Mathews, G., E. Neher, and R. Fenner. Second messenger-activated calcium influx in rat peritoneal mast cells. *J. Physiol. Lond.* 418: 105-130, 1989.
17. Mehrke, G., and J. Daut. The electrical response of cultured guinea-pig coronary endothelial cells to endothelium-dependent vasodilators. *J. Physiol. Lond.* 430: 251-272, 1990.
18. Nilius, B., G. Schwarz, and G. Droogmans. Control of intracellular calcium by membrane potential in human melanoma cells. *Am. J. Physiol.* 265 (*Cell Physiol.* 34): C1501-C1510, 1993.
19. Possani, L. D., B. M. Martin, and I. Svenden. The primary structure of noxiustoxin: a K^{+} channel blocker peptide purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Res. Commun.* 47: 255-259, 1982.
20. Putney, J. W. A model for receptor regulated Ca^{2+} entry. *Cell Calcium* 7: 1-12, 1986.
21. Putney, J. W., and G. S. Bird. The inositol phosphate Ca^{2+} signaling system in nonexcitable cells. *Endocr. Rev.* 14: 610-631, 1993.
22. Schilling, W. P. Effect of membrane potential on cytosolic calcium of bovine aortic endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 257 (*Heart Circ. Physiol.* 26): H776-H784, 1989.
23. Sharma, N. R., and M. J. Davis. Mechanism of substance P-induced hyperpolarization of porcine coronary endothelial cells. *Am. J. Physiol.* 266 (*Heart Circ. Physiol.* 35): H156-H164, 1994.
24. Vaca, L., G. B. Gurrola, L. D. Possani, and D. L. Kunze. Blockade of a K_{Ca} channel with synthetic peptides from noxiustoxin: a K^{+} channel blocker. *J. Membr. Biol.* 134: 123-129, 1993.
25. Vaca, L., and D. L. Kunze. Depletion and refilling of intracellular Ca^{2+} stores induce oscillations of Ca^{2+} current. *Am. J. Physiol.* 264 (*Heart Circ. Physiol.* 33): H1319-H1322, 1993.
26. Vaca, L., W. P. Schilling, and D. L. Kunze. G-protein-mediated regulation of a Ca^{2+} -dependent K^{+} channel in cultured vascular endothelial cells. *Pflügers Arch.* 422: 66-74, 1992.
27. Weintraub, W. H., F. A. Negulescu, and T. E. Machen. Calcium signaling in endothelial: cellular heterogeneity and receptor internalization. *Am. J. Physiol.* 263 (*Cell Physiol.* 32): C1029-C1039, 1992.
28. Zeitlin, I. J., and A. N. Smith. Mobilization of tissue kallikrein in inflammatory disease of the colon. *Gut* 14: 133-136, 1973.