



Memoria del 47º Taller de Actualización Bioquímica, Facultad de Medicina; UNAM

Proteínas con repeticiones de anquirina: estructura, función y retos bioquímicos.

Ankyrin repeat proteins: structure, function and challenges in biochemistry.

García-Torres, Itzhel^{1*}; Cervantes-López, M. Mercedes¹; Ortega-Arellano, Alejandra¹;
Hernández-Alcántara, Gloria²; Flores-López, Luis A.³; De la Mora-De la Mora, J. Ignacio¹;
Enríquez-Flores, Sergio¹ y López-Velázquez Gabriel¹.

1. Grupo de estudio en Biomoléculas y Salud Infantil, Laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz. Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud.
2. Laboratorio de Péptidos y Proteínas. Departamento de Bioquímica. Facultad de Medicina, UNAM
3. Cátedra CONACYT, Instituto Nacional de Pediatría, Secretaría de Salud.

*Correspondencia. Instituto Nacional de Pediatría, Av. Insurgentes Sur 3700 Letra C, Insurgentes Cuicuilco, Alcaldía Coyoacán, CDMX, CP 04530 Tel. +52 (55) 10840900 Ext 1726, garciaitzhel@gmail.com

Resumen

Las proteínas con repeticiones de anquirina son proteínas distribuidas ampliamente en la naturaleza cuya función principal es mediar interacciones proteína-proteína. Debido a esto, desde hace algunos años se han diseñado bibliotecas de este grupo de proteínas que forman andamiajes estructurales conformados por un giro- β seguido de dos hélices α antiparalelas y un asa que conecta con el giro- β de la siguiente repetición. Este dominio de anquirina tiene la peculiaridad de tener siete posiciones en donde los aminoácidos pueden ser variables, cuya combinación le confiere especificidad hacia diferentes blancos proteicos. Las anquirinas diseñadas se han producido exitosamente en *Escherichia coli* como proteínas monoméricas, solubles y estables con notables rendimientos, por lo que se han utilizado en diversas aplicaciones que van desde el diagnóstico mediante la identificación de proteínas blanco hasta la propuesta de nuevos tratamientos contra diferentes enfermedades. Estas proteínas aún no han sido estudiadas en nuestro país, por lo que es de nuestro interés utilizarlas en acercamientos para combatir algunas enfermedades que afectan a la población infantil en México. En ese sentido, proponemos utilizar anquirinas diseñadas para identificar blancos proteicos en leucemia y

Abstract

Ankyrin repeat proteins are widely distributed in nature; whose main function is to mediate protein-protein interactions. Because of this, some years ago, libraries of this group of proteins have been designed. Designed ankyrin repeat proteins consist of structural scaffolds formed by a β -turn followed by two antiparallel α -helices and a loop that connects with the β -turn of the next repetition. The ankyrin domain has the peculiarity of having seven positions with variable amino acid residues, the combination of which confers specificity to different protein targets. Designed ankyrins have been successfully produced in *Escherichia coli* as stable, soluble, monomeric proteins with remarkable yields, and they have been used in different applications ranging from diagnosis by identifying target proteins to proposing new treatments against different diseases. These proteins have not yet been studied in our country, so it is in our interest to use them in approaches against some diseases that affect the child population in Mexico. In this sense, we propose to use designed ankyrins to identify protein targets in leukemia and giardiasis. For this, a collection of proteins with a single ankyrin module was obtained, some of these proteins were selected and biochemically characterized, and two proteins with two and three ankyrin modules were obtained by a consensus design. These ankyrin proteins are being used to find protein

giardiasis. Para ello, se obtuvo una colección de anquirinas diseñadas con un módulo de repetición, se seleccionaron algunas de estas proteínas y se caracterizaron bioquímicamente, así mismo se obtuvieron dos proteínas con dos y tres módulos de repetición mediante un análisis por consenso. Estas proteínas se están usando en la búsqueda de blancos proteicos en extractos de cultivos de *Giardia lamblia* y cultivos celulares de la línea leucémica Jurkat. Actualmente, estamos identificando algunas proteínas que interactúan con las anquirinas seleccionadas para posteriormente evaluar la importancia de los blancos proteicos encontrados en las enfermedades de estudio. No obstante, la estabilidad y características de las anquirinas obtenidas nos han demostrado la capacidad de este grupo de proteínas para identificar blancos proteicos de importancia en medicina.

Palabras clave: Anquirinas diseñadas; blanco proteico; leucemia; giardiasis .

targets from *Giardia lamblia* trophozoite cultures and cell cultures from the Jurkat leukemic line. Currently, we are identifying some proteins that interact with selected ankyrins to subsequently evaluate the importance of the protein targets found in both diseases. However, the stability and characteristics of the designed ankyrins obtained have determined the ability of this group of proteins to identify protein targets of importance in medicine.

Key words: Designed ankyrin; protein target; leukemia; giardiasis.

Las proteínas con repeticiones de anquirina y su abundancia en la naturaleza.

El uso y estudio de las anquirinas como moléculas mediadoras de interacciones proteína-proteína comenzó en 1978, cuando se descubrió un fragmento de 72 kDa derivado de proteólisis que funcionaba como un sitio de anclaje de la espectrina a la membrana de los eritrocitos, a la cual se le denominó anquirina-R debido a su localización eritrocitaria (R: *red cells*) [1]. El término “anquirina” se utilizó para referirse a proteínas adaptadoras que se asociaban a proteínas de membrana. Las anquirinas forman parte del grupo de las proteínas repetitivas (*repeat proteins*). En general, estas proteínas poseen una estructura simple que las predispone a un diseño modular, de esta forma están compuestas por arreglos consecutivos con motivos estructurales repetidos. En algunos casos, las estructuras repetidas están estrechamente empaquetadas, algunos ejemplos de estos tipos de proteínas son: las repeticiones de anquirina (*ankyrin repeat*) (ANKs) [2], repeticiones ricas en leucina (*leucine rich repeats*) (LRRs) [3], repeticiones pumilio (PUMs) [4], y las repeticiones armadillo (ArmR) [5]. En otros casos, las repeticiones son estructuralmente autónomas y hacen contactos limitados con repeticiones vecinas; por ejemplo: las repeticiones sushi (SUs) [6], repeticiones del factor de crecimiento epidérmico (*epidermal growth factor repeats*) (EGFs) [7] y repeticiones de dedos de zinc (*zinc finger repeats*) (ZFs) [8]. Los motivos repetitivos varían en tamaño, por ejemplo, el motivo

LRR en bacteria consiste en sólo 20 residuos [9], mientras que los SUs están conformados por 60 residuos [6].

Las proteínas con repeticiones de anquirina se han encontrado en los tres dominios de la vida, por Archae, Bacteria y Eukarya [10] y al parecer sus genes son más abundantes en organismos eucariotes que en procariotes [11]. Aunque el origen de esta diferencia es desconocido, una de las teorías menciona que los intrones podrían ser los responsables. Tanto en procariotas como eucariotas, estas proteínas se encuentran involucradas en interacciones proteína-proteína claves en la naturaleza [12]. Estas proteínas están involucradas en diferentes eventos celulares como la traducción de señales, la regulación del ciclo celular, la respuesta inflamatoria y la regulación de la transcripción, entre otras [13].

Debido a su función y abundancia en la naturaleza, desde hace algunos años se comenzaron los estudios de ingeniería de proteínas con el fin de diseñar proteínas con repeticiones tipo anquirina a las que se les denominó DARPINAS (*Designed Ankyrin Repeat Proteins*) [14,15,16].

Las anquirinas diseñadas, moléculas con andamiajes estructurales repetitivos

A partir de las proteínas con repeticiones de anquirina naturales, se han diseñado moléculas con capacidad de reconocer blancos proteicos

denominadas: Proteínas con repeticiones de anquirina diseñadas. Se han generado colecciones de genes que codifican para dichas proteínas, insertados en vectores de sobreexpresión obteniendo una gran diversidad de estas proteínas de formas estables y solubles.

Las proteínas con repeticiones de anquirina diseñadas se caracterizan por tener módulos de 33 residuos de aminoácidos apilados consecutivamente. Cada repetición o módulo forma una unidad estructural que consiste en un giro- β seguido de dos hélices α antiparalelas y un asa que conecta con el giro- β de la siguiente repetición [17]. Además, presentan unas cubiertas de 28 aminoácidos en el extremo amino- y carboxilo-terminal (Figura 1), las cuales son esenciales para el plegamiento eficaz de estas proteínas en la célula y así evitar la agregación [18].

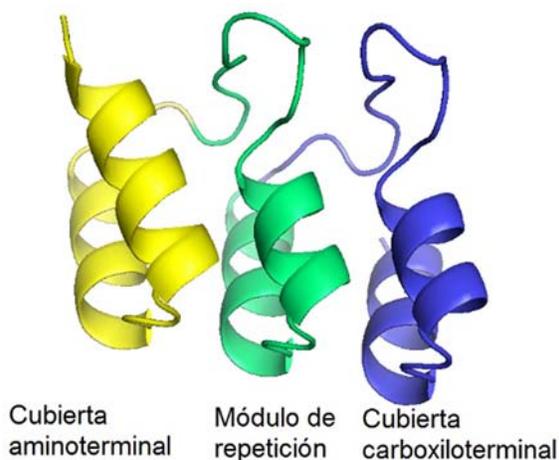


Figura 1. Ejemplo de una proteína con una repetición de anquirina diseñada. Las proteínas con repeticiones de anquirina están compuestas por una cubierta aminoterminal (amarillo), una cubierta carboxilo terminal (azul) y un número variable de módulos de repetición (verde). *Fuente:* modelo obtenido a través del programa I-TASSER y modificado con PyMOL.

El número de módulos de repetición puede adaptarse, permitiendo que la superficie de interacción de blanco potencial varíe en su dimensión. Se han creado bibliotecas con diferente número de módulos repetitivos, a partir de las cuales se han seleccionado proteínas con repeticiones de anquirina diseñadas que unen sus blancos con gran especificidad, selectividad y afinidad. Hasta el momento las anquirinas diseñadas reportadas en la literatura constan de 2, 3 y hasta 6 repeticiones.

La superficie capaz de reconocer regiones en las proteínas blanco está definida principalmente por un núcleo hidrofóbico que posee 7 posiciones en donde

se localizan los aminoácidos variables que determinan su especificidad. La elucidación de estas posiciones son el resultado del trabajo de Binz y colaboradores (2003), quienes por medio de diferentes ciclos de alineamientos generaron una secuencia consenso partiendo de la idea de que aquellos aminoácidos conservados son los que influyen de manera importante en el plegamiento de la proteína y en el mantenimiento de la estructura repetitiva. Mientras que los aminoácidos que participan en las interacciones proteína-proteína no son conservados y son los que contribuyen a la diferente especificidad y afinidad de las darpinas con sus proteínas blanco [14,15]. La secuencia consenso fue afinada mediante un análisis estructural comparando a las secuencias obtenidas con proteínas cuyas coordenadas cristalográficas se encontraban en el PDB, para así tratar de definir los residuos de aminoácidos que se ven mayoritariamente involucrados en las interacciones de unión a blancos.

Durante el análisis de la estructura tridimensional, se observó que dentro de la secuencia consenso, las posiciones involucradas en las interacciones proteína-proteína son aquellas en las cuales puede haber casi cualquier residuo de aminoácido, las excepciones son glicina, prolina y cisteína, ya que pueden provocar modificaciones no deseadas a la estructura. El consenso final dio como resultado la secuencia de 33 aminoácidos que constituyen el módulo interno y repetitivo en las darpinas (Figura 2), de los cuales 26 son posiciones conservadas y siete posiciones son variables (Figura 3), dicho módulo sirvió como un bloque de construcción para las bibliotecas de anquirinas diseñadas.

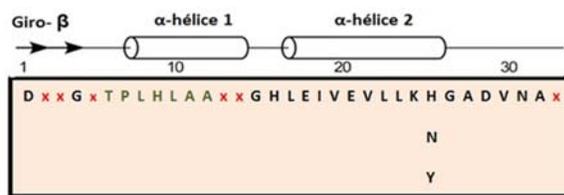


Figura 2. Secuencia consenso final del diseño del módulo de repetición de anquirina. Los elementos de la estructura secundaria se indican por encima de la secuencia. En rojo y con una letra x se indican las posiciones variables, los aminoácidos en color verde representan el motivo conservado TPLHLAA. *Fuente:* tomado y modificado de [14].

Otra de las características de las anquirinas diseñadas es la presencia de una región altamente conservada en los módulos de repetición, la cual se denomina el motivo $T_6 P_7 L_8 H_9 L_{10} A_{11} A_{12}$ por los residuos de aminoácidos que la conforman (Figura 4). Estos aminoácidos permiten la formación de una red de puentes de hidrógeno, los cuales junto a las

interacciones hidrofóbicas son responsables de mantener la estabilidad en la proteína [14].

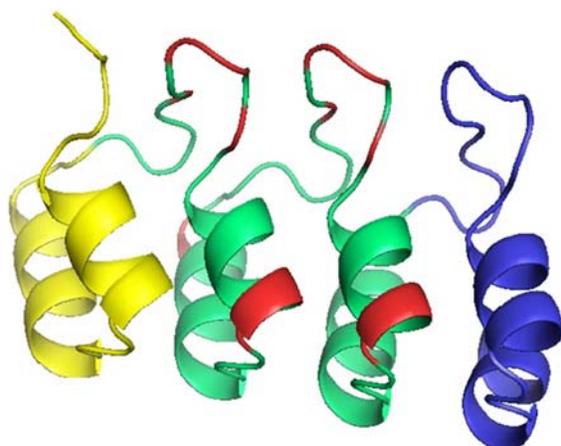


Figura 3. Posiciones de residuos de aminoácidos variables en los módulos de repetición de una anquirina diseñada. Se observa una proteína con dos repeticiones de anquirina (verde). En rojo se indican las posiciones variables. Fuente: modelo obtenido a través del programa I-TASSER y modificado con PyMOL.

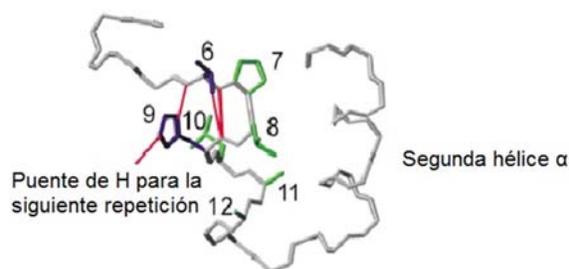


Figura 4. Motivo conservado en los módulos de repetición de las anquirinas. Los residuos de aminoácidos numerados (6-12) corresponden al motivo TPLHLAA, en líneas color rojo se señalan los puentes de hidrógeno formados entre la Histidina (H) y la Treonina (T). Fuente: tomado y modificado de [14].

El principal objetivo del diseño de anquirinas es la generación de bibliotecas de DNA que codifiquen para una colección de proteínas que conserven una estructura, pero que difieran en sitios específicos para el reconocimiento de blancos potenciales. Para las anquirinas con un módulo repetitivo, la diversidad calculada es de 7.2×10^7 , mientras que para aquellas de dos o tres repeticiones esta diversidad se encuentra en el rango de 5.2×10^{15} y 3.8×10^{23} , respectivamente [14].

Características sobresalientes de las anquirinas diseñadas como moléculas de reconocimiento.

El diseño final de las anquirinas originó la producción de proteínas con propiedades muy sobresalientes, entre las que se encuentran su expresión como monómeros solubles en el citoplasma de *Escherichia coli*, con rendimientos que

alcanzan los 200 mg de proteína purificada / L de cultivo [14,19]. Principalmente, se ha utilizado la cepa XL1-blue para sobreexpresarlas, por lo que su producción puede ser mejorada aún más utilizando cepas de expresión especializadas con enfoques de fermentación de alta densidad celular. La estabilidad de estas proteínas diseñadas permite protocolos simples de purificación a gran escala, rápidos y de bajo costo [18].

Por otra parte, la estabilidad térmica de las proteínas con repeticiones de anquirina diseñadas que hasta la fecha se han caracterizado (compuestas de 2 hasta 6 módulos de anquirina) por lo general es alta, con temperaturas medias de desnaturalización (T_m) entre 66 y 95.8 °C, con una notable tendencia que demuestra que las proteínas con mayor número de repeticiones son aún más estables [14, 20]. Por ejemplo, las proteínas con más de tres repeticiones internas son resistentes incluso a la desnaturalización por temperatura o agentes caotrópicos como el cloruro de guanidina hasta concentraciones de 5M [20,21].

El peso molecular de un módulo de repetición en las proteínas con repeticiones de anquirina diseñadas sin considerar las cubiertas amino y carboxilo terminales, está justo por encima de 3.5 kDa. Las generadas hasta hoy, se componen de dos a seis módulos, por lo tanto, su peso molecular incluyendo las cubiertas terminales oscila desde 14 hasta 21 kDa, que es aproximadamente un décimo del tamaño de un anticuerpo IgG convencional (≈ 150 kDa), o un tercio del tamaño de fragmento Fab que es el fragmento de anticuerpo más pequeño aprobado actualmente para su uso terapéutico [22]. En ese sentido, estas proteínas diseñadas poseen ventajas importantes con respecto a los anticuerpos; en primer lugar, se resalta el hecho de que estas proteínas no necesitan ser estabilizadas por puentes disulfuro, ya que dentro de su secuencia no se encuentra residuo alguno de cisteína. Por otro lado, las anquirinas diseñadas a diferencia de los anticuerpos, no interaccionan con sus blancos de manera bivalente; la interacción de estas proteínas con sus blancos de unión es bastante específica debido a la presencia de residuos no conservados en el núcleo hidrofóbico, que pueden ser manipulados con el fin de aumentar la diversidad y especificidad con los blancos de unión. Así mismo, estas posiciones de residuos no conservados son un blanco importante para la mutagénesis dirigida en donde se puede colocar cualquier aminoácido de interés para utilizarlos, por ejemplo, como sondas en el caso de las cisteínas; o bien para que en esas posiciones específicas se pueda hacer marcaje radiactivo y utilizar estas moléculas en

la radioterapia. Otra ventaja que se deriva de la ausencia de cisteínas en la secuencia de las anquirinas diseñadas es que mediante la inserción de un residuo de cisteína se puede facilitar la inmovilización de estas moléculas en diversas superficies con aplicaciones en el campo de los chips de proteínas o bien acoplar algún fluoróforo o alguna otra molécula que permita identificar a la proteína de interés [23].

Una característica importante de las anquirinas diseñadas que no podemos omitir, es que debido a los altos rendimientos de purificación que se pueden obtener de estas proteínas, se ha facilitado su cristalización. Por el contrario, muchos anticuerpos no se han podido cristalizar debido a que su composición multidominio es bastante flexible y presenta zonas hidrofílicas limitadas. El núcleo hidrofóbico de las anquirinas diseñadas, flanqueado por las cubiertas amino y carboxilo terminal, han permitido cocristalizar estas proteínas en presencia de sus blancos de unión [24,25]. El análisis de estas estructuras cristalográficas ha permitido caracterizar las interacciones entre las anquirinas y sus diferentes blancos, confiriendo información valuable en el campo del diseño racional de fármacos.

El diseño de anquirinas, permite una fácil manipulación de la secuencia de DNA con múltiples propósitos. Uno de los más útiles, es la incorporación de etiquetas que permitan su fácil purificación mediante métodos de cromatografía de afinidad, lo que incrementa los rendimientos de purificación y acorta los tiempos de obtención de la proteína pura. Mediante el uso de estas etiquetas, la purificación de las anquirinas diseñadas se puede llevar a cabo en un solo paso, partiendo simplemente de la fracción soluble del extracto bacteriano.

La arquitectura repetitiva de las proteínas con repeticiones de anquirina diseñadas y la adaptación de su tamaño, permite que la superficie de unión a una proteína blanco sea modular y variable, obteniéndose interacciones de alta afinidad. La selección de las anquirinas diseñadas que reconocen un blanco específico se ha llevado a cabo por medio de la técnica del despliegue del ribosoma, encontrando afinidad entre ambas moléculas en el orden de concentraciones nanomolares [26]. Debido a sus características tan versátiles estas proteínas han sido utilizadas en diferentes áreas, como la medicina, biotecnología y cristalización de proteínas; en trabajos donde se requiere una unión de alta afinidad entre un marcador y su blanco de interés [27].

Las aplicaciones de las anquirinas diseñadas abarcan enfoques estructurales, de diagnóstico y terapéuticos

Debido a las características que presentan las proteínas con repetición de anquirina, se han utilizado ampliamente en el reconocimiento de diferentes blancos para su uso en biomedicina e investigación básica y aplicada. Desde su surgimiento, las aplicaciones de las anquirinas diseñadas han avanzado de una forma acelerada y se han utilizado en acercamientos meramente bioquímicos en donde se han utilizado como chaperonas en cristalización, hasta ser propuestas como herramientas de diagnóstico y tratamiento en el área de la biomedicina, presentando importantes ventajas con respecto a las terapias convencionales.

Se han implementado diversas estrategias para utilizarlas (Figura 5), entre las que se incluyen adicionarles grupos que les permitan ejercer una función efectiva deseable, como toxinas o citocinas capaces de generar una respuesta inmunológica como terapia antitumoral [28]. Debido a su estructura y tamaño, poseen la ventaja de ser eliminadas rápidamente de los tejidos y de la circulación, y en dado caso que se requieran mayores concentraciones con el fin de alcanzar la dosis farmacocinética deseada, se pueden modificar mediante PEGilación lo que les brinda un tiempo de vida media mayor [29].

Como se mencionó anteriormente, la secuencia consenso de estas proteínas no incluye residuos de cisteína por lo que existe la posibilidad de insertar este residuo a través de mutagénesis dirigida con el fin de introducir grupos tiol, generando reactividad química en un sitio específico [30]. A estas proteínas sintéticas también se les ha podido acoplar moléculas pequeñas radioactivas que permiten identificarlas mediante métodos de imagen en tiempo real [31].

Estas proteínas sintéticas también se han producido como anquirinas biespecíficas y triespecíficas, que al estar compuestas por dos y tres proteínas sintéticas pueden reconocer con alta afinidad a más de un blanco a la vez. En el caso de las anquirinas biespecíficas, se han usado para reconocer dos marcadores tumorales diferentes que están presentes simultáneamente en un tumor y han demostrado ser selectivas con una unión limitada al tejido sano debido a que sólo expresa uno de los dos antígenos tumorales [32]. En el caso de las anquirinas triespecíficas, en donde se fusionan varios dominios funcionales en una misma molécula, las posibilidades de unión aumentan. Por ejemplo, un

dominio de anquirina puede identificar un antígeno expuesto en la superficie de membrana, un segundo dominio se puede unir a células efectoras del sistema inmune para el reconocimiento de la célula tumoral y un tercer dominio de anquirina se puede unir a una proteína sérica para aumentar su vida media [18].

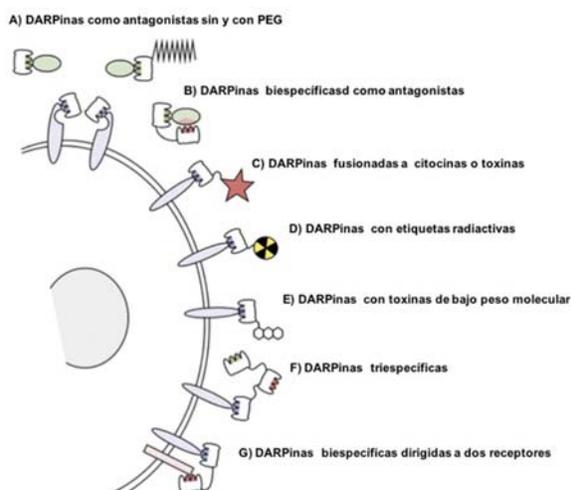


Figura 5. Usos de las proteínas de repetición de anquirina. (A) Proteínas de repetición monovalente, capaz de unirse a un receptor (azul) ejerciendo un efecto antagonista o un ligando (verde), puede estar PEGilada para aumentar su vida media. (B) Proteínas de repetición de anquirina biespecíficas, (C) Proteínas de repetición de anquirina que presenta unido un antígeno que puede ser una proteína (toxina, citocina o enzima), (D) Proteínas de repetición con un ligando radiactivo, o (E) con una toxina de bajo peso molecular. (F) Proteínas de repetición trispecíficas, (G) Proteínas de repetición biespecíficas. Imagen tomada y modificada de [18].

Debido a sus características estructurales, estas proteínas diseñadas han sido utilizadas en acercamientos de investigación básica, específicamente en estudios de estabilización de proteínas blanco para favorecer su cristalización, por lo que se les ha denominado chaperonas de cristalización. Existen numerosos ejemplos en la literatura, en donde se han empleado a estas proteínas para favorecer la cristalización de otras. Especialmente, la cristalización de proteínas membranales resulta compleja debido a su superficie hidrofóbica, de tal forma que para mantener estables las interacciones proteína-proteína y obtener resoluciones aceptables por difracción de rayos X, se han utilizado en numerosas ocasiones las proteínas con repeticiones de anquirina [25]. A la fecha, se encuentran alrededor de 30 estructuras cristalográficas en la base de datos del *Protein Data Bank* (PDB) de anquirinas sintéticas en complejo con sus proteínas blanco, lo que demuestra la habilidad de estas proteínas para promover la cristalización de sus blancos proteicos restringiendo su flexibilidad y previniendo interacciones no deseadas de las

moléculas blanco. Sin embargo, también se ha documentado, que las ventajas de estas proteínas tales como su tamaño, superficie hidrofílica y estructura repetitiva pudieran ser desventajas en el proceso de cristalización debido a que puede limitar la habilidad de las anquirinas para favorecer los contactos cristalográficos [33]. En ese sentido, se han diseñado estructuras de anquirinas repetitivas más rígidas fusionando la cubierta C-terminal de la anquirina diseñada al extremo N-terminal de una versión estabilizada de la β -lactamasa TEM-1 de *E. coli*. Estas fusiones se probaron en la co-cristalización con diferentes blancos, obteniendo estructuras cristalográficas con resoluciones que oscilan entre los 1.37 y 2.6 Å de resolución [34].

Así mismo, se han generado algunas anquirinas diseñadas que reconocen con alta afinidad a la proteína de unión a maltosa (MBP) de *E. coli* [24]. En ese sentido, se sabe que la MBP favorece la solubilidad y plegamiento de algunas proteínas y es ampliamente utilizada como proteína de fusión con estos fines. Partiendo de estas dos premisas, se ha demostrado que se puede favorecer la cristalización de proteínas fusionadas a la MBP en presencia de anquirinas diseñadas que reconocen a esta proteína de fusión. De esta forma, se pudieron obtener tres estructuras cristalográficas con una resolución moderada (2.2-2.5 Å) mediante co-cristalización del dominio catalítico de la fosfatasa 1 de humano de especificidad dual fusionada a la MBP y en presencia de anquirinas diseñadas de dos y tres módulos. Cabe resaltar que los intentos por cristalizar esta proteína fusionada con la MBP y en ausencia de las anquirinas sintéticas no había sido posible [35].

Utilizando el mismo enfoque de generar estructuras rígidas mediante la fusión con anquirinas diseñadas; en un estudio reciente, se utilizaron estas proteínas para rigidizar a una proteína con repeticiones armadillo. Esto con la finalidad de evitar contactos cristalográficos no deseados y proteger la superficie de unión y así favorecer la interacción con las posibles proteínas blanco. De esta forma, es la primera vez que se reporta que una anquirina diseñada pueda ser una chaperona de cristalización de otra proteína repetitiva diseñada, en este caso una proteína con repeticiones armadillo [36].

Entre los estudios más sobresalientes que ilustran la identificación de blancos terapéuticos por medio de anquirinas, se encuentran los trabajos de investigación que involucran la búsqueda de proteínas de unión que sirvan para la identificación y la eliminación de tumores. Esto en respuesta a la poca eficacia obtenida por los anticuerpos

terapéuticos utilizados con este fin. Se ha tomado a HER2 como molécula de estudio, ya que es una glicoproteína transmembranal de 185 kDa, receptor de tirosina cinasa que pertenece a la familia de los receptores del factor de crecimiento epidérmico. Este receptor juega un papel fundamental en el crecimiento de tumores de diferentes tipos de cáncer, principalmente en cáncer de ovario y mama, este último con una prevalencia cercana al 20% [37]. Dentro de las funciones a las que se asocia la activación de HER2 están la proliferación, diferenciación y migración celular en una amplia gama de tejidos. La porción extracelular de HER2 humano consta de cuatro subdominios designados: L1, CR1, L2 y CR2, L1 que son repeticiones ricas en leucina 1, CR1 ricas en cisteína 1 también conocidos como dominios I-IV [38].

Entre las alternativas terapéuticas propuestas hasta la fecha basadas en la interacción y sobreexpresión de HER2, se encuentran anticuerpos monoclonales humanizados como el Trastuzumab (Herceptin, Genentech) que se une al subdominio IV extracelular de HER2 (HER2_IV), el cual se usa de manera efectiva en la clínica para tratar pacientes con cáncer de mama con sobreexpresión de HER2 y el Pertuzumab (Perjeta, Genentech), cuyo sitio de unión es cercano al brazo de dimerización en el subdominio II de HER2. El efecto del Trastuzumab es citostático induciendo un arresto del ciclo celular en la fase G1 en células de cáncer con sobreexpresión de HER2. Sin embargo, se ha observado que las células tumorales se vuelven refractarias al tratamiento con este anticuerpo y se ha documentado que la resistencia puede ser promovida por el efecto citostático que el medicamento brinda, ya que le permite al tumor evolucionar de forma dirigida para escapar del tratamiento [39]. Por lo tanto, un fármaco óptimo contra las células cancerosas que sobreexpresan HER2 tendría que ser citotóxico en lugar de citostático, pero la citotoxicidad no debería apuntar ampliamente a todas las células que expresan HER2, sino específicamente a las células cancerígenas dependientes de HER2.

En ese sentido, mediante el método del despliegue del ribosoma, se identificaron algunas anquirinas diseñadas que se unen a HER2. Las anquirinas seleccionadas fueron de 14.5 kDa y reconocen al ectodominio soluble recombinante de HER2 con afinidades que oscilan entre 90 pmol/L y 270 nmol/L [40]. Así mismo, se realizaron experimentos con anquirinas sintéticas derivatizadas con polietilenglicol (PEG), en las cuales su radio hidrodinámico aumentó drásticamente, con el propósito de alargar su tiempo de vida media [26].

Los resultados de estos estudios indican que la acumulación de las anquirinas sintéticas en los tumores es directamente proporcional a su afinidad por éstos. Esta afinidad es independiente del tamaño y permeabilidad de las moléculas, ya que al probar las anquirinas derivatizadas con PEG, -en donde el radio hidrodinámico y su permeabilidad está aumentada-, no se observó una acumulación importante de estas proteínas en los tumores estudiados. Se ha concluido que las mejores propiedades que permiten a una molécula localizarse en este tipo de tumores, incluyen alta afinidad con un peso molecular pequeño, como las anquirinas monoméricas, cuyas afinidades se encuentran en el rango de concentraciones picomolares.

En el año 2013, se probaron anquirinas diseñadas biespecíficas, las cuales indujeron un efecto citotóxico específico uniéndose al subdominio I y al subdominio IV de HER2. Este efecto citotóxico no se basó en ninguna toxina conjugada, sino fue intrínseco al mecanismo de unión, induciendo apoptosis en células tumorales positivas para HER2 e inhibiendo el cáncer [39].

Estas proteínas también se han estudiado como inhibidores intracelulares, tal es el caso de los experimentos realizados con la fosfotransferasa de aminoglucósidos (3')-IIIa (APH). Esta cinasa bacteriana fosforila algunos antibióticos aminoglucosídicos como la estreptomina, kanamicina o amikacina confiriendo a las bacterias resistencia contra estos antibióticos; además presenta homología estructural con las proteínas-cinasas eucarióticas involucradas en un gran número de enfermedades como algunos tipos de cáncer, asma y enfermedades autoinmunes [41]. Se demostró que algunas anquirinas diseñadas inhiben a la APH tanto *in vitro* como *in vivo* [42]. Los inhibidores más potentes, fueron anquirinas diseñadas con dos y tres repeticiones del módulo variable, presentando constantes de disociación en el orden de concentraciones nanomolares. El fenotipo obtenido con estos inhibidores fue comparable con el que presenta cuando se elimina el gen (*knockout*). A pesar de que las anquirinas seleccionadas no pueden ser consideradas como antibióticos, si pueden ser moléculas líderes en el diseño de nuevos fármacos ya que gracias al análisis de la estructura cristalográfica se pudo obtener información acerca del sitio de acción de estos inhibidores en la APH.

Por su alta estabilidad y debido a que pueden estar acopladas a etiquetas de imagen aunado a su rápida eliminación de la circulación y los tejidos, han sido utilizadas con un enfoque diagnóstico. Por

mencionar un ejemplo, las anquirinas diseñadas se han utilizado en la búsqueda de pruebas alternativas para detectar anticuerpos inhibitorios del factor de coagulación VIII (FVIII) [43]. Estos anticuerpos se expresan en pacientes con hemofilia A, tratados con FVIII plasmático o recombinante para restituir la deficiencia o el mal funcionamiento de este factor de coagulación. Debido a que en estos pacientes se expresan tanto anticuerpos inhibitorios como no inhibitorios contra FVIII y a que las pruebas diagnósticas que los diferencian son poco sensibles y con alta variación entre laboratorios, surgió la necesidad de la búsqueda de nuevas pruebas diagnósticas. En este estudio, se identificaron anquirinas con dos módulos variables, que reconocieron el sitio de unión del anticuerpo monoclonal humano antiFVIII, Bo2C11. Así mismo, se generaron anquirinas diméricas que bloquearon específicamente la unión de Bo2C11 por su antígeno natural, FVIII, neutralizando así la actividad inhibitoria de este anticuerpo. Además, las proteínas seleccionadas se pudieron utilizar para detectar el anticuerpo Bo2C11 en plasma de individuos sanos. Estas moléculas serán útiles en estudios posteriores en los cuales se analicen muestras de sangre de pacientes con el fin de distinguir entre los anticuerpos inhibitorios y los no inhibitorios contra FVIII.

Hasta el momento, se han encontrado un importante número de anquirinas sintéticas que son capaces de inhibir moléculas cruciales para el desarrollo de infecciones. Uno de los ejemplos más relevantes a este respecto es el estudio que se ha realizado en la búsqueda de inhibidores de alguno de los eventos responsables de la infección por el VIH como CD4, CCR5 y CXCR4 que son los receptores de entrada del virus [44]. En estos estudios se utilizaron bibliotecas de anquirinas diseñadas con dos y tres módulos variables con el fin de seleccionar anquirinas específicas del receptor CD4 humano. Mediante dos ciclos de selección se encontraron proteínas con repetición de anquirina con capacidad de unión a CD4, con constantes de disociación en el rango de concentraciones nanomolares, comparables con las concentraciones obtenidas para anticuerpos con alta afinidad. Todas las proteínas seleccionadas inhibieron la entrada del VIH en ensayos con líneas celulares utilizadas como modelo de infección. Además, se demostró que las anquirinas que reconocen a CD4 son específicas para el VIH ya que no se detectó algún efecto inhibitorio cuando se hicieron experimentos con el virus murino de leucemia que es independiente de CD4. Estas proteínas específicas de CD4 ya han sido probadas en monos macacos Rhesus como modelo de infección

con notables resultados [45]. *In vivo*, estas anquirinas se unen a los receptores CD4 rápidamente y de la misma manera se encontró que en corto tiempo, después de la administración intravenosa de una solución con anquirinas-CD4, estas moléculas se localizan circulando en el torrente sanguíneo. Con estos estudios se abre un campo para el uso y aplicación del diseño de anquirinas sintéticas en la prevención y tratamiento de enfermedades de interés mundial, tal y como lo es la infección por VIH.

En el campo del tratamiento de las enfermedades metabólicas, estas proteínas se han usado como tratamiento de pacientes diabéticos complicados con retinopatía diabética. Esta enfermedad ocular se caracteriza por daño en la microvasculatura de la retina, produciendo hemorragias intrarretinianas, edema, vasos incompetentes con fugas y áreas isquémicas [46]. Esta falta de perfusión capilar progresiva y la isquemia retiniana resultante desencadenan la liberación de citocinas como el factor de crecimiento epitelial vascular (VEGF), interleucina (IL) -6 e IL-8; estos factores inducen la formación de vasos sanguíneos que carecen de uniones estrechas en las células endoteliales maduras y crecen en la superficie de la retina y el nervio óptico. La proliferación de estos vasos (denominada neovascularización retiniana) conduce a la pérdida de la visión en los pacientes debido a hemorragia vítrea y/o desprendimiento de retina [47, 48].

El tratamiento aprobado por la FDA incluye la utilización de anticuerpos monoclonales como Ranibizumab y Bevacizumab, sin embargo, estos tratamientos son costosos, y los pacientes requieren de inyecciones mensuales para controlar el edema. Por lo tanto, se necesitan tratamientos que proporcionen la supresión de VEGF para un tratamiento más eficiente. Debido a ello, se utilizó una proteína de repetición de anquirina denominada MP0112 con la finalidad de realizar una terapia contra la enfermedad ocular diabética. Se observó que esta anquirina se unió a todas las isoformas de VEGF de manera específica y con una alta afinidad de 2 pM. En este estudio, se encontró que después de una inyección intraocular única de 0,4 mg, MP0112 se detectaba aún después de 3 meses, con una concentración por encima de la concentración media inhibitoria máxima (IC₅₀). El efecto de esta anquirina fue acompañado de una reducción de VEGF-A y del edema y una mejoría significativa en la visión de los pacientes, superando los tratamientos basados en anticuerpos, con un potencial mejorado debido a su solubilidad, estabilidad y resistencia a la agregación. Desde entonces, la empresa *Molecular Partners AG*,

patentó dicha proteína de repetición de anquirina, con el nombre de Abicipar, que hoy en día se encuentra en fase clínica 2 y los pacientes que han recibido este fármaco presentan una mejoría significativa en la visión [49].

Debido a las características de estas proteínas diseñadas, han sido utilizadas en variados campos de la investigación alrededor del mundo. A la fecha, algunas de estas proteínas con repeticiones de anquirina diseñadas han sido patentadas, algunas otras se encuentran en pruebas de fase clínica. No obstante, en nuestro país este tipo de proteínas aún no se han estudiado y tampoco han sido utilizadas para abordar los principales problemas de salud que afectan a la población mexicana. De esta forma, nuestro objetivo es generar colecciones de proteínas con módulos de anquirina para utilizarlos en el diagnóstico y tratamiento de algunas enfermedades de importancia en salud pública en México.

El uso de las proteínas con repeticiones de anquirina en México, un campo aún no explorado

Al igual que en otros países del mundo, en México también se puede aplicar el uso de las proteínas con repeticiones de anquirina diseñadas con fines diagnósticos o terapéuticos. A la fecha no existen estudios en nuestro país que aborden problemáticas de salud con este tipo de proteínas, por tal razón es de nuestro interés aplicar esta tecnología en la búsqueda de blancos proteicos involucrados en enfermedades importantes a nivel nacional. De esta forma, nuestra línea de investigación se centra en dos enfermedades que, debido a su prevalencia, son de importancia en salud pública. En primer lugar, nos referimos a la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), que es el principal tipo de cáncer que se presenta en niños entre 5 y 14 años y la Giardiasis, parasitosis que afecta principalmente a la población pediátrica, con una prevalencia en países en vías de desarrollo del 20-30% en países en vías de desarrollo y del 3-7% en países desarrollados. De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), 200 millones de pacientes se encuentran afectados por esta enfermedad [50] y aunque la infección por *Giardia lamblia* no es causa de mortalidad importante, se considera una enfermedad de distribución homogénea en toda la República Mexicana [51]. Por consiguiente, en adelante se revisarán algunos detalles involucrados en ambas enfermedades para posteriormente hablar del abordaje utilizado para su estudio mediante el uso de proteínas con repeticiones de anquirinas diseñadas.

Problemas de salud que afectan a la población infantil mexicana para ser abordados con las proteínas de repetición de anquirina diseñadas

Los problemas de salud a nivel nacional son diferentes entre la población adulta y la población infantil, como era de esperarse. De acuerdo con los datos estadísticos obtenidos de healthdata.org (<https://vizhub.healthdata.org>), hasta el año 2017, el mayor número de muertes en la población general es por causa de enfermedades cardíacas (14.25%), seguido por diabetes mellitus (9.01%) y en tercer lugar por enfermedades renales crónicas (9.14%). Mientras que, en la población infantil las causas que generan el mayor número de muertes en niños de 5-14 años, son los accidentes automovilísticos (12.96%), seguido de la violencia interpersonal (12.37%) y leucemia en tercer lugar (9.81%). Se estima que existen anualmente entre 5 y 6 mil casos nuevos de cáncer en menores de 18 años, entre los que destacan principalmente las leucemias, que representan el 52% del total de los casos; linfomas el 10% y los tumores del sistema nervioso central el 10% (Comisión Nacional de Protección Social en Salud, 2008-2013). La sobrevivencia nacional en niños y adolescentes según el Registro de Cáncer en Niños y Adolescentes (RCNA) es de 57.5%, en comparación con países desarrollados donde la probabilidad de que una niña, niño o adolescente con cáncer sobreviva es del 90%. Por otro lado, si nos enfocamos en las enfermedades parasitarias que causan diarrea, la giardiasis es la principal parasitosis que se presenta en la población infantil en nuestro país. Si bien, el número de muertes en niños de 5-14 años por diarrea sólo alcanza un 1.58% (<https://vizhub.healthdata.org>), datos del Boletín Epidemiológico Nacional de la Secretaría de Salud reflejan que el número de casos de giardiasis acumulados a la semana 51 del año 2019 fueron 10,786 y que hasta la semana epidemiológica 16 que abarca hasta el 18 de abril del 2020, se han presentado un número acumulado de 2494 casos de giardiasis y aunado a que esta enfermedad es una parasitosis distribuida en todo el país, resulta importante la búsqueda de blancos proteicos como candidatos para el estudio y propuesta de nuevas alternativas de diagnóstico y tratamiento.

La Leucemia Linfocítica Aguda, el tipo de cáncer más frecuente en la población infantil mexicana

Etiología

La leucemia se puede clasificar en aguda o crónica según el grado de diferenciación celular. La leucemia aguda es una transformación maligna que

ocurre en estadios precoces de diferenciación de los progenitores hematopoyéticos, por lo que las células neoplásicas son indiferenciadas (blastos) produciendo fallo medular e infiltración orgánica por acumulación. Las células malignas transformadas de la leucemia crónica conservan cierta capacidad de diferenciación, por lo que esta entidad es menos invasiva y los pacientes sufren un curso natural de la enfermedad más lento y crónico [52]. Esta enfermedad es rápidamente fatal sin tratamiento, pero en su mayoría responde a las terapias actuales. Así mismo, las leucemias agudas y crónicas pueden clasificarse en linfoides y mieloides. La leucemia linfocítica aguda (LLA) es una proliferación neoplásica de células linfoides inmaduras del sistema hematopoyético. En nuestro país, este tipo de leucemia representa el 48.3% de presentación en cáncer infantil. La edad más frecuente de presentación es entre los 2-4 años y entre los 10-14 años (Secretaría de Salud, 2014). Dentro de los signos y síntomas se encuentra la fiebre, las infecciones, el sangrado, dolor articular o linfadenopatías, las cuales se encuentran hasta en el 50% de los casos (GPC, 2008).

Diagnóstico

El diagnóstico de LLA requiere una valoración del estado físico del paciente, pruebas de laboratorio, aspirado medular y biopsia. El aspirado de médula ósea es el instrumento fundamental para establecer el diagnóstico morfológico de leucemia, ya que el 20% de los blastos en médula ósea lo confirman, esta muestra permite realizar estudios tales como la citometría de flujo para el análisis del inmunofenotipo, estudios citogenéticos o moleculares [53]. El aspirado de médula ósea valida el diagnóstico de leucemia y brinda información acerca de su pronóstico y plan terapéutico. Una aspiración de médula ósea es un procedimiento que extrae una muestra de la parte líquida de la médula ósea, generalmente se realiza en los huesos planos, ya que en ellos existe mayor cantidad de tejido adiposo esponjoso donde se lleva a cabo la producción de células sanguíneas. Suele extraerse en el manubrio del esternón o en la región posterior de la espina iliaca en niños, otros sitios de elección en adolescentes son la cresta iliaca y las apófisis espinosas vertebrales (C7, L1 o L2) y para niños menores de doce meses de edad, la tibia es el sitio de elección [54]. Debido a la frecuencia que presenta este tipo de cáncer en nuestro país y a lo invasivo que resulta la prueba diagnóstica de elección, es de nuestro interés buscar nuevos blancos proteicos de esta enfermedad mediante el uso de proteínas con repeticiones de anquirina que permitan proponer

nuevas alternativas en el diagnóstico y/o terapia de la LLA.

La Giardiasis, principal parasitosis en niños y las deficiencias actuales en el diagnóstico y terapia.

Etiología

Giardia lamblia es el agente causal de la giardiasis, es un protista unicelular flagelado cuyo ciclo de vida involucra dos estados metabólicos: el quiste y la fase vegetativa denominada trofozoito. Esta enfermedad se puede transmitir por contagio interpersonal y por ingestión de alimentos contaminados. *G. lamblia* coloniza el duodeno y la parte superior del intestino delgado, donde se encuentra endosado al epitelio mediante el disco suctorio. La infección causa atrofia de las microvellosidades, deficiencia de algunas enzimas lumenales como las disacaridasas, lo que desemboca en la disminución en la absorción de electrolitos y un retardo en la maduración de los enterocitos. Las manifestaciones clínicas de la infección aguda incluyen diarrea, dolor abdominal, náusea y vómito. Las infecciones crónicas pueden progresar al síndrome de mala-absorción con una pérdida importante de peso y desnutrición [55]. El tratamiento recomendado para combatir la giardiasis abarca compuestos nitroheterocíclicos como los nitroimidazoles entre los que se encuentran el metronidazol, tinidazol, ornidazol y el secnidazol, fármacos efectivos en una sola dosis [56]. Desde 1962 y hasta la fecha, el metronidazol ha sido utilizado como fármaco de elección contra la giardiasis, a pesar de las inconveniencias y efectos secundarios que ocasiona. A pesar de ser muy eficiente, se ha reportado que existen cepas de *Giardia* resistentes a este compuesto [57].

Algunos compuestos benzimidazólicos como el mebendazol o el albendazol también se han utilizado para el tratamiento de esta parasitosis. Al igual que el metronidazol, algunas desventajas de su uso involucran la aparición de cepas resistentes al albendazol [58]. Así mismo, ya se han reportado cepas resistentes a la nitazoxanida [59] y la paromomicina [60], fármacos que también se han utilizado para combatir la giardiasis [61]. En la actualidad existen diversos estudios enfocados al estudio de nuevas alternativas terapéuticas para combatir la giardiasis entre los que se incluyen el desarrollo de vacunas [62], extracción de compuestos terapéuticos de fuentes naturales [63], síntesis química de nuevos compuestos [64], diseño racional de fármacos [65] y reposicionamiento de fármacos, cuyo enfoque se centra principalmente en inhibir o

inactivar específicamente a componentes del parásito sin afectar el metabolismo del huésped [66, 67].

Diagnóstico

En cuanto al diagnóstico de la giardiasis, existen varios problemas en las pruebas utilizadas que se ven reflejados principalmente en la sensibilidad de los resultados. El origen de estas complicaciones radica principalmente a que en algunas ocasiones sólo se puede analizar una sola muestra, o bien a que la densidad parasitaria es muy baja, o la calidad de las preparaciones para microscopía es insuficiente. Si además de estas complicaciones se presenta una excreción intermitente de quistes o hay un ocultamiento de las formas parasitarias debido a los pigmentos biliares; el diagnóstico de *Giardia* en muestras fecales se vuelve un tanto ineficiente y complejo. Para incrementar la sensibilidad se recomienda hacer las pruebas de microscopía con tres muestras de materia fecal, lo que resulta complicado para el paciente además de retrasar considerablemente el diagnóstico. Los métodos que generalmente se usan en el diagnóstico de la giardiasis son la microscopía, la citometría de flujo (CF) y los ensayos de inmunofluorescencia directa (ID). Estudios en donde se han comparado las tres principales técnicas utilizadas en el diagnóstico de la giardiasis [68] han revelado que la ID es la técnica de microscopía más costosa que presenta la más alta especificidad y sensibilidad. De esta manera, esta técnica resulta ideal para la confirmación del diagnóstico cuando hay sospecha de la infección debido a la sintomatología y que resulta necesario identificar el agente causal. Así mismo, se ha reportado que la ID tiene un 100% de sensibilidad y especificidad en estudios de validación de las técnicas en humanos [69]. Dado lo anterior esta técnica se ha tomado como estándar de referencia en varios estudios [70]. Todos estos estudios concuerdan que la microscopía, también denominada comicroscopía es la técnica que presenta una menor sensibilidad debido a múltiples causas entre las que encuentran la intermitencia en la excreción de los quistes, el número de muestras fecales disponibles, la coloración de las muestras debido a los medicamentos antiparasitarios usados, entre otras muchas causas. La comicroscopía es el método más rápido y económico en el diagnóstico de *Giardia* que requiere personal con experiencia para realizarlo y a pesar de las mencionadas desventajas es considerado el método de primera elección. Todo lo anterior pone en evidencia la necesidad de alternativas para el diagnóstico de la giardiasis que combinen las técnicas antes mencionadas o bien nuevas alternativas que aseguren 100% de especificidad con

una alta sensibilidad. A este respecto, en este trabajo planteamos como nueva alternativa para el diagnóstico de esta parasitosis, el uso de anquirinas específicas que reconozcan blancos proteicos en *G. lamblia*.

Estrategia para aplicar la tecnología de las anquirinas diseñadas a problemas de salud pública nacional

Para la generación de proteínas con uno, dos y tres módulos de repetición de anquirina se utilizaron dos principales estrategias. En primer lugar, se produjo una colección de anquirinas diseñadas de un módulo, tomando como base la estrategia reportada por Binz y cols en el 2003 [14], con importantes modificaciones que incluyen la utilización de un plásmido de expresión diferente (pET3aΔ/cubiertas amino-carboxilo) que contiene insertada la secuencia que codifica para las cubiertas amino y carboxilo terminal y la obtención del módulo variable por medio de PCR de ensamble. Por otro lado, para la obtención de anquirinas con dos y tres módulos se utilizó una estrategia completamente diferente; las secuencias de estas anquirinas diseñadas se obtuvo mediante un análisis por consenso, analizando las secuencias de anquirinas diseñadas depositadas en la base de datos del *Protein Data Bank* (PDB), de esta manera se obtuvieron secuencias consenso con aminoácidos en las posiciones variables que ya se documentó que mantuvieron interacciones con blancos proteicos. En la mayoría de los estudios en donde se han utilizado las anquirinas diseñadas para el reconocimiento de blancos, se ha utilizado como método de selección el despliegue del ribosoma [40]; este método resulta útil cuando previamente se ha seleccionado el blanco de estudio, se tiene purificado y de esta manera se retan contra bibliotecas de RNA mensajero codificantes para anquirinas diseñadas y que mediante la formación de un complejo ternario (RNA mensajero, anquirina diseñada y proteína blanco) se identifican las anquirinas con capacidad de interaccionar con la proteína de estudio. De manera alternativa, nuestra propuesta para la identificación de blancos se plantea desde diferente punto de vista, debido a que el problema de estudio se centra en identificar blancos proteicos, de esta forma se seleccionan anquirinas diseñadas a partir de la colección de proteínas con uno, dos y tres módulos de anquirina obtenidas previamente en el laboratorio y se utilizan para captar proteínas provenientes de cultivos de guardia o de líneas celulares leucémicas. Algunos detalles de la generación de anquirinas diseñadas de uno, dos y tres módulos de repetición, así como de la metodología por la cual se

identificarán proteínas blanco, se mencionan a continuación.

Generación de una colección de proteínas con un módulo de anquirina

Hasta la fecha, todas las anquirinas diseñadas reportadas en la literatura son proteínas con 2, 3 y hasta 6 módulos de anquirina flanqueadas por las cubiertas amino y carboxilo terminal. Las anquirinas que más se han utilizado para identificar blancos terapéuticos constan de 2 y 3 repeticiones. De esta forma, decidimos explorar y estudiar anquirinas diseñadas con un módulo de repetición; en el 2002 Mosavi y colaboradores [2] obtuvieron proteínas con repetición de anquirina de uno hasta cuatro repeticiones idénticas de anquirina sin embargo, aquéllas de un módulo resultaron ser poco solubles, con baja sobreexpresión y poco estables con tendencia a la agregación. A diferencia de las proteínas obtenidas por Mosavi y colaboradores, nuestro

diseño de proteínas con un módulo de anquirina incluyen las cubiertas amino y carboxilo terminal reportado por Binz y colaboradores en 2003 [14].

Para la generación de proteínas con un módulo de anquirina, se utilizó el plásmido denominado pET3aΔ/cubiertas amino-carboxilo, el cual contiene las secuencias que codifican para las cubiertas amino y carboxilo terminal flanqueadas por los sitios para las enzimas de restricción (NdeI y BamHI) respectivamente. Además, entre la secuencia amino y carboxilo terminal se encuentran las secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción BpI y BsaI, esto con el fin de insertar posteriormente el módulo variable (Figura 6). Así mismo, este plásmido se denominó pET3aΔ debido a que todos los sitios de restricción para las enzimas BpI y BsaI fueron mutados con la finalidad que sólo exista un solo sitio para ambas enzimas que corresponda al sitio de inserción del módulo variable.

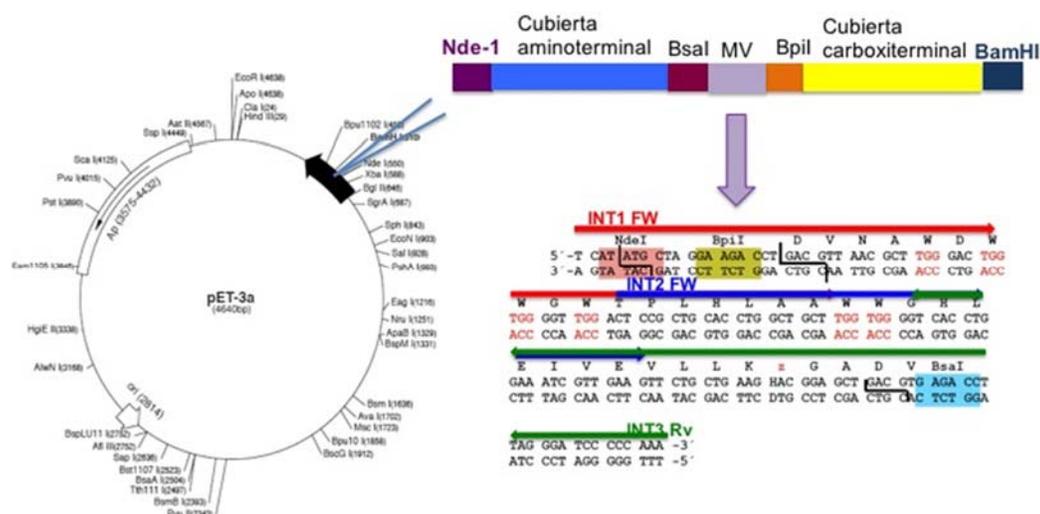


Figura 6. Generación de proteínas con un módulo de anquirina. La secuencia nucleotídica que codifica para las cubiertas amino y carboxilo terminal se inserta en el plásmido pET-3a, utilizando los sitios de restricción NdeI, BamHI. Por otro lado, el módulo variable de anquirina (MV) se genera mediante reacciones de PCR utilizando los oligonucleótidos degenerados Int 1, 2 y 3 a diferentes temperaturas de alineamiento. Una vez obtenido el módulo variable se inserta en el plásmido que contiene las cubiertas amino y carboxilo terminal con los sitios de restricción BsaI y BpI.

Por otra parte, el módulo variable se obtuvo por medio de un PCR de ensamble utilizando tres oligonucleótidos degenerados que se muestran en la Figura 6. Los oligonucleótidos Int 1 e Int 3 poseen en sus extremos los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción BpI y BsaI, respectivamente. Estas reacciones de PCR se hicieron a diferentes temperaturas de alineamiento en un rango de temperaturas entre 45 y 60 °C; así mismo, se utilizaron diferentes combinaciones de los oligonucleótidos degenerados para favorecer que se

incorporaran distintas bases en las posiciones variables. Una vez obtenido el DNA amplificado en las diferentes reacciones de PCR a distintas temperaturas de alineamiento, estos fragmentos fueron purificados y digeridos con las enzimas de restricción BsaI y BpI, para insertarlos en el plásmido de expresión pET3aΔ/cubiertas amino-carboxilo. Las clonas transformantes fueron monitoreadas mediante PCR utilizando los oligonucleótidos universales T7 Promotor y T7 Terminador para corroborar la presencia del gen que

codifica para las distintas anquirinas. Se obtuvieron 164 clonas transformantes de las cuales 122 resultaron positivas, presentando una eficiencia de ligación del 74%. Una vez que fue secuenciado el DNA de 96 clonas positivas, se obtuvieron 47 secuencias con diferentes combinaciones en los aminoácidos del módulo variable. Derivado del análisis de las secuencias de aminoácidos de los módulos de anquirina y de las características fisicoquímicas que presentaron algunas anquirinas purificadas, se seleccionaron algunas de ellas para ser utilizadas en la identificación de blancos en extractos de cultivos de giardia y de líneas celulares leucémicas.

Obtención de proteínas diseñadas con dos y tres módulos de anquirina

Con la finalidad de evaluar y estudiar el comportamiento de proteínas con dos y tres módulos de anquirina se llevó a cabo un diseño por consenso, para el cual se hizo una búsqueda de la estructura cristalográfica de proteínas diseñadas con módulos de anquirina en la base de datos del PDB. En total, y hasta la fecha de la búsqueda (agosto 2016), se encontraron 50 estructuras cristalográficas reportadas. Se obtuvo la secuencia de cada una y se analizó cuáles de ellas presentaban el arreglo establecido por Binz *et al.* (2003) [14], esto es, una cubierta N-terminal, determinado número de módulos variables (basado en la secuencia consenso establecida por Sedgwick y Smerdon en 1999 [18] y una cubierta C-terminal. De las 50 proteínas, 15 presentaron dicho arreglo, de las cuales 3 correspondieron a proteínas de dos módulos y 12 a proteínas de tres módulos. Con las secuencias obtenidas, se realizó un alineamiento múltiple de todos los módulos de anquirina de las proteínas reportadas utilizando el programa *Clustal Omega* (1.2.1).

Con el resultado del alineamiento se analizaron las posiciones variables en cada uno de los módulos (42 en total), para cada una de ellas se ordenaron de forma descendente los residuos de aminoácidos según la frecuencia encontrada. Derivado de este análisis, se seleccionaron los aminoácidos que conformarían las secuencias de la anquirina con dos y tres repeticiones (D2 y D3, respectivamente, Figura 7), siendo el principal criterio de selección su frecuencia; en segundo lugar, que hubiera suficiente variabilidad en cada módulo, así como en toda la proteína en general. Los genes codificantes para D2 y D3 fueron sintetizados por la compañía *Genscript* (Piscataway, NJ, EUA) e insertados en el plásmido de expresión pET3a-HisTEV [71]. Al igual que las

anquirinas diseñadas de un módulo, D2 y D3 fueron purificadas a partir de la fracción soluble de extractos de *E. coli* mediante cromatografía de afinidad a metal inmovilizado con rendimientos de purificación alrededor de los 15 mg de proteína por litro de medio de cultivo. Debido a que D2 y D3 poseen aminoácidos que han favorecido interacciones en otras anquirinas diseñadas, creemos que también son proteínas candidatas para el reconocimiento de proteínas blancas en las enfermedades de estudio.

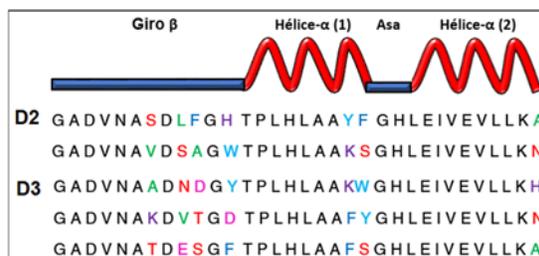


Figura 7. Aminoácidos que conforman los módulos variables de las anquirinas diseñadas D2 y D3. Se señala la naturaleza de cada aminoácido con un color distinto; rojo, polar; verde, alifático (no polar); rosa, ácido (polar); azul claro, aromático (polar); azul, aromático (no polar) y púrpura, básico (polar).

Avances en la identificación de nuevos blancos proteicos para el diagnóstico y tratamiento de leucemia y giardiasis.

Debido a las características bioquímicas de algunas de las anquirinas sintéticas obtenidas en nuestro laboratorio, las estamos utilizando para la identificación de blancos proteicos en dos modelos de estudio principalmente. Por un lado, para la identificación de posibles blancos en leucemia se utiliza la línea celular cancerígena: Jurkat y para la identificación de blancos proteicos útiles en el diagnóstico o tratamiento de la giardiasis, se utilizan extractos de cultivos de trofozoítos de la cepa WB de *G. lamblia*. En ambos modelos, se utiliza la misma metodología para el reconocimiento de posibles blancos (Figura 8), que consiste en la unión de las anquirinas diseñadas a una resina de níquel, gracias a la etiqueta de histidinas que presentan todas las proteínas diseñadas en el extremo aminoterminal. Una vez que las anquirinas se encuentran unidas a la fase estacionaria, se ponen a interactuar con extractos proteicos ya sea de los cultivos de las líneas cancerígenas o de los cultivos de trofozoítos de *G. lamblia*. Después de lavar exhaustivamente el sistema para eliminar aquellas proteínas que se unen de manera inespecífica, se eluyen las anquirinas junto con sus posibles blancos utilizando un amortiguador con alta concentración de imidazol. Las proteínas de interés se visualizan en geles SDS-PAGE y se identifican mediante espectrometría de masas.

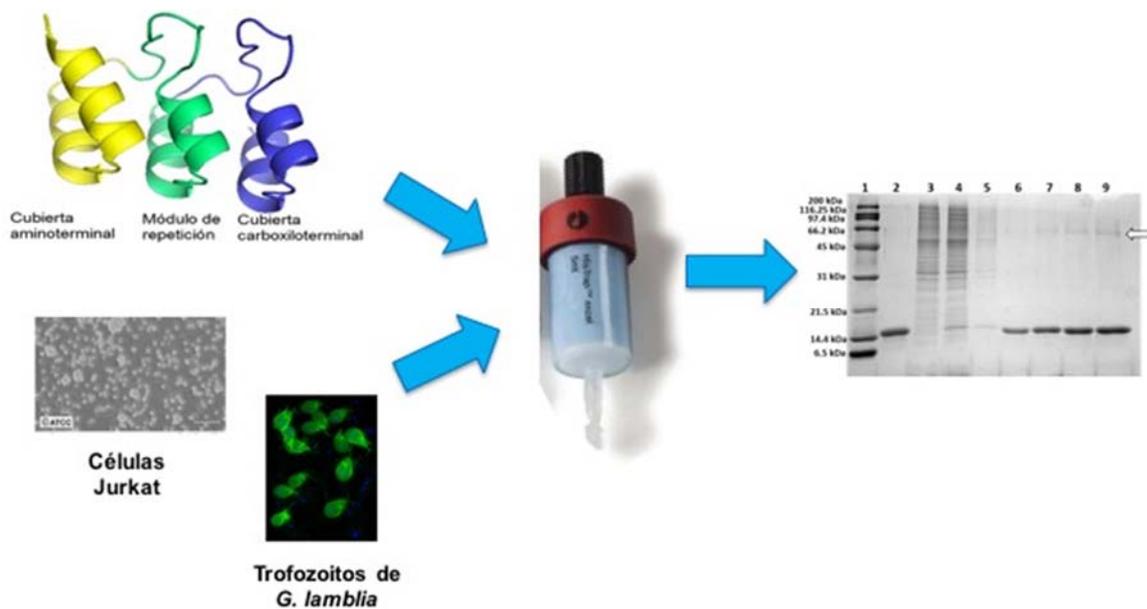


Figura 8. Estrategia utilizada para la interacción de anquirinas diseñadas con extractos proteicos provenientes de diferentes modelos de estudio. Las anquirinas diseñadas se unen a la resina de afinidad acoplada a níquel gracias a la etiqueta de His que poseen en su extremo aminoterminal. Una vez unidas, los extractos proteicos se ponen en contacto con la resina-anquirina, se colectan las proteínas no unidas, se realizan lavados exhaustivos para finalmente eluir de la resina los complejos que interaccionaron (anquirina-proteínas blanco) y visualizarlos en un gel SDS-PAGE.

Este acercamiento de mantener las anquirinas fijas a una matriz inerte y hacer interaccionar con extractos proteicos, no ha sido utilizado en la búsqueda de blancos mediante el uso de anquirinas diseñadas por lo que los hallazgos de esta investigación constituyen los primeros estudios en nuestro país utilizando la tecnología de las anquirinas diseñadas. De igual manera, esta estrategia puede ser utilizada para la identificación de blancos en

cualquier otro modelo de estudio, siempre y cuando se pueda tener acceso a extractos proteicos que den información de alguna enfermedad de interés.

Agradecimientos.

El presente proyecto se lleva a cabo gracias al financiamiento de los proyectos CONACYT: 221583 (G.-T., I.), 241343 (L.-V., G.) y 259105 (E.-F., S.).

Referencias

- Bennett V. (1978). *The Journal of biological chemistry*, 253(7), 2292-2299.
- Mosavi, L. K., Minor, D. L., Jr, & Peng, Z. Y. (2002). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(25), 16029-16034.
- Kobe, B., & Deisenhofer, J. (1993). *Nature*, 366(6457), 751-756.
- Wang, X., Zamore, P. D., & Hall, T. M. (2001). *Molecular cell*, 7(4), 855-865.
- Reichen, C., Hansen, S., & Plückthun, A. (2014). *Journal of structural biology*, 185(2), 147-162.
- Miljkovic-Licina, M., Hammel, P., Garrido-Urbani, S., Bradfield, P. F., Szeptowski, P., & Imhof, B. A. (2009). *FASEB Journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(12), 4105-4116.
- Sharma, A., Rangarajan, A., & Dighe, R. R. (2013). *The Biochemical journal*, 449(2), 519-530.
- Pan, H., & Wigley, D. B. (2000). *Structure (London, England: 1993)*, 8(3), 231-239.
- Kajava A. V. (1998). *Journal of molecular biology*, 277(3), 519-527.
- Jernigan, K. K., y Bordenstein, S. R. (2014). *PeerJ*, 2, e264.
- Marcotte, E. M., Pellegrini, M., Yeates, T. O., & Eisenberg, D. (1999). *Journal of molecular biology*, 293(1), 151-160.
- Andrade, M. A., Perez-Iratxeta, C., y Ponting, C. P. (2001). *Journal Of Structural Biology*, 134 (2-3), 117-131.
- Mosavi, L. K., Cammett, T. J., Desrosiers, D. C., y Peng, Z. (2004). *Protein Science: A Publication Of The Protein Society*, 13(6), 1435-1448.
- Binz, H. K., Stumpp, M. T., Forrer, P., Amstutz, P., y Plückthun, A. (2003). *Journal of Molecular Biology*, 332(2), 489-503.
- Forrer, P., Stumpp, M. T., Binz, H. K., & Plückthun, A. (2003). *FEBS letters*, 539(1-3), 2-6.
- Stumpp, M. T., Forrer, P., Binz, H. K., & Plückthun, A. (2003). *Journal of molecular biology*, 332(2), 471-487.
- Sedgwick, S. G. y Smerdon, S. J. (1999). *Trends Biochem. Sci.* 24, 311-316.
- Stumpp, M. T., Binz, H. K., y Amstutz, P. (2008). *Drug Discovery Today*, 13(15/16), 695-701.
- Kohl, A., Binz, H. K., Forrer, P., Stumpp, M. T., Plückthun, A., & Grütter, M. G. (2003). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(4), 1700-1705.
- Wetzel, S. K., Settanni, G., Kenig, M., Binz, H. K., y Plückthun, A. (2008). *Journal of Molecular Biology*, 376: 241-257.

21. Boersma, Y. L., y Plückthun, A. (2011). *Current Opinion In Biotechnology*, 22(6), 849-857.
22. Leader, B., Baca, Q. J., y Golan, D. E. (2008). *Nature Reviews. Drug Discovery*, 7(1), 21-39.
23. Abedi, M. R., Caponigro, G., & Kamb, A. (1998). *Nucleic acids research*, 26(2), 623-630.
24. Binz, H. K., Amstutz, P., Kohl, A., Stumpp, M. T., Briand, C., Forrer, P., Grütter, M. G., & Plückthun, A. (2004). *Nature biotechnology*, 22(5), 575-582.
25. Kohl, A., Amstutz, P., Parizek, P., Binz, H. K., Briand, C., Capitani, G., Forrer, P., Plückthun, A., & Grütter, M. G. (2005). *Structure (London, England: 1993)*, 13(8), 1131-1141.
26. Zahnd, C., Kawe, M., Stumpp, M. T., de Pasquale, C., Tamaskovic, R., Nagy-Davidescu, G., Dreier, B., Schibli, R., Binz, H. K., Waibel, R., & Plückthun, A. (2010). *Cancer research*, 70(4), 1595-1605.
27. Tamaskovic, R., Simon, M., Stefan, N., Schwill, M., & Plückthun, A. (2012). *Methods in Enzymology*, 503, 101-134.
28. Kaspar, M., Zardi, L., & Neri, D. (2006). *International journal of cancer*, 118(6), 1331-1339.
29. Chapman A. P. (2002). *Advanced drug delivery reviews*, 54(4), 531-545.
30. Orlova, A., Nilsson, F. Y., Wikman, M., Widström, C., Ståhl, S., Carlsson, J., & Tolmachev, V. (2006). *Journal of nuclear medicine: official publication, Society of Nuclear Medicine*, 47(3), 512-519.
31. Tolmachev, V., Orlova, A., Pehrson, R., Galli, J., Baastrup, B., Andersson, K., Sandström, M., Rosik, D., Carlsson, J., Lundqvist, H., Wennborg, A., & Nilsson, F. Y. (2007). *Cancer research*, 67(6), 2773-2782.
32. Wolf, E., Hofmeister, R., Kufer, P., Schlereth, B., & Baeuerle, P. A. (2005). BiTEs: bispecific antibody constructs with unique anti-tumor activity. *Drug discovery today*, 10(18), 1237-1244.
33. Bukowska, M. A., & Grütter, M. G. (2013). 23(3), 409-416.
34. Balyuk, A., Wu, Y., Honegger, A., Heberling, M. M., & Plückthun, A. (2016). *Journal of molecular biology*, 428(8), 1574-1588.
35. Gumpena, R., Lountos, G. T., & Waugh, D. S. (2018). *Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications*, 74(Pt 9), 549-557.
36. Ernst, P., Honegger, A., van der Valk, F., Ewald, C., Mittl, P., & Plückthun, A. (2019). *Scientific reports*, 9(1), 16162.
37. Weigel, M. T., & Dowsett, M. (2010). *Endocrine-related cancer*, 17(4), R245-R262.
38. Meric-Bernstam, F., Johnson, A. M., Dumbava, E., Raghav, K., Balaji, K., Bhatt, M., Murthy, R. K., Rodon, J., & Piha-Paul, S. A. (2019). *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, 25(7), 2033-2041.
39. Jost, C., Schilling, J., Tamaskovic, R., Schwill, M., Honegger, A., & Plückthun, A. (2013). *Structure (London, England: 1993)*, 21(11), 1979-1991.
40. Zahnd, C., Wyler, E., Schwenk, J. M., Steiner, D., Lawrence, M. C., McKern, N. M., Pecorari, F., Ward, C. W., Joos, T. O., & Plückthun, A. (2007). *Journal of molecular biology*, 369(4), 1015-1028.
41. Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., & Sudarsanam, S. (2002). *Science (New York, N.Y.)*, 298(5600), 1912-1934.
42. Amstutz, P., Binz, H. K., Parizek, P., Stumpp, M. T., Kohl, A., Grütter, M. G., Forrer, P., & Plückthun, A. (2005). *The Journal of biological chemistry*, 280(26), 24715-24722.
43. Hausammann, S., Vogel, M., Kremer Hovinga, J. A., Lacroix-Desmazes, S., Stadler, B. M., & Horn, M. P. (2013). *PLoS one*, 8(4), e60688.
44. Schweizer, A., Rusert, P., Berlinger, L., Ruprecht, C. R., Mann, A., Corthésy, S., Turville, S. G., Aravantinou, M., Fischer, M., Robbiani, M., Amstutz, P., & Trkola, A. (2008). *PLoS pathogens*, 4(7), e1000109.
45. Pugach, P., Krarup, A., Gettie, A., Kuroda, M., Blanchard, J., Piatak, M., Jr, Lifson, J. D., Trkola, A., & Robbiani, M. (2010). *PLoS one*, 5(8), e12455.
46. Jenkins, A. J., Joglekar, M. V., Hardikar, A. A., Keech, A. C., O'Neal, D. N., & Januszewski, A. S. (2015). *The review of diabetic studies: RDS*, 12(1-2), 159-195.
47. Altmann, C., & Schmidt, M. (2018). *International Journal of Molecular Sciences*, 19(1), 110.
48. Rudge, J. S., Holash, J., Hylton, D., Russell, M., Jiang, S., Leidich, R., Papadopoulos, N., Pyles, E. A., Torri, A., Wiegand, S. J., Thurston, G., Stahl, N., & Yancopoulos, G. D. (2007). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(47), 18363-18370.
49. Campochiaro, P. A., Channa, R., Berger, B. B., Heier, J. S., Brown, D. M., Fiedler, U., Hepp, J., & Stumpp, M. T. (2013). *American journal of ophthalmology*, 155(4), 697-704.e7042.
50. Cacciò, S. M., & Ryan, U. (2008). *Molecular and biochemical parasitology*, 160(2), 75-80.
51. Cedillo-Rivera, R., Leal, Y. A., Yépez-Mulia, L., Gómez-Delgado, A., Ortega-Pierres, G., Tapia-Conyer, R., & Muñoz, O. (2009). *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 80(1), 6-10.
52. Aberuyi, N., Rahgozar, S., Ghodousi, E. S., & Ghaedi, K. (2020). *Frontiers in oncology*, 9, 1496.
53. Helgestad, J., Rosthøj, S., Johansen, P., Varming, K., & Østergaard, E. (2011). *Pediatric blood & cancer*, 57(2), 224-226.
54. Bai, Y., Zhang, H., Sun, X., Sun, C., & Ren, L. (2014). *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 436, 207-216.
55. García-Torres I, Gómez-Manzo S, Castillo-Villanueva A, Hernández-Alcántara G, Enríquez-Flores S, et al. Novel therapeutic approaches for protozoan parasitic diseases. En: Téllez-Valencia A, Pedraza-Reyes M, editors. *Current Topics of Drug Design in Parasitic and Bacterial Diseases*. Kerala; India: Transworld Research Network; 2012. P. 49-66.
56. Rossignol J. F. (2010). *Experimental parasitology*, 124(1), 45-53.
57. Upcroft P. (1998). *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, 1(3), 166-168.
58. Upcroft, J., Mitchell, R., Chen, N., & Upcroft, P. (1996). *Microbial drug resistance (Larchmont, N.Y.)*, 2(3), 303-308.
59. Müller, J., Wastling, J., Sanderson, S., Müller, N., & Hemphill, A. (2007). *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(6), 1979-1986.
60. Mineno, T., & Avery, M. A. (2003). *Current pharmaceutical design*, 9(11), 841-855.
61. Müller, J., Ley, S., Felger, I., Hemphill, A., & Müller, N. (2008). *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 62(1), 72-82.
62. Serradell, M. C., Rupil, L. L., Martino, R. A., Pucca, C. G., Carranza, P. G., Saura, A., Fernández, E. A., Gargantini, P. R., Tenaglia, A. H., Petiti, J. P., Tonelli, R. R., Reinoso-Vizcaino, N., Echenique, J., Berod, L., Piaggio, E., Bellier, B., Sparwasser, T., Klatzmann, D., & Luján, H. D. (2019). *Nature communications*, 10(1), 361.
63. Harris, J. C., Plummer, S., & Lloyd, D. (2001). *Applied microbiology and biotechnology*, 57(5-6), 614-619.
64. Rocha-Garduño, G., Hernández-Martínez, N. A., Colín-Lozano, B., Estrada-Soto, S., Hernández-Núñez, E., Prieto-Martínez, F. D., Medina-Franco, J. L., Chale-Dzul, J. B., Moo-Puc, R., & Navarrete-Vázquez, G. (2020). *Molecules (Basel, Switzerland)*, 25(4), E793.
65. Flores-Carrillo, P., Velázquez-López, J. M., Aguayo-Ortiz, R., Hernández-Campos, A., Trejo-Soto, P. J., Yépez-Mulia, L., & Castillo, R. (2017). *European journal of medicinal chemistry*, 137, 211-220.

66. García-Torres, I., de la Mora-de la Mora, I., Marcial-Quino, J., Gómez-Manzo, S., Vanoye-Carlo, A., Navarrete-Vázquez, G., Colín-Lozano, B., Gutiérrez-Castrellón, P., Sierra-Palacios, E., López-Velázquez, G., & Enríquez-Flores, S. (2016). *Biochimica et biophysica acta*, 1860(1 Pt A), 97–107.
67. López-Velázquez, G., Fernández-Lainez, C., de la Mora-de la Mora, J. I., Caudillo de la Portilla, D., Reynoso-Robles, R., González-Maciél, A., Ridaura, C., García-Torres, I., Gutiérrez-Castrellón, P., Olivos-García, A., Flores-López, L. A., & Enríquez-Flores, S. (2019). *Scientific reports*, 9(1), 8922.
68. El-Nahas, H. A., Salem, D. A., El-Henawy, A. A., El-Nimr, H. I., Abdel-Ghaffar, H. A., & El-Meadawy, A. M. (2013). *Cytometry. Part B, Clinical cytometry*, 84(1), 44–49.
69. Soares, R., & Tasca, T. (2016). *Journal of microbiological methods*, 129, 98–102.
70. Johnston, S. P., Ballard, M. M., Beach, M. J., Causer, L., & Wilkins, P. P. (2003). *Journal of clinical microbiology*, 41(2), 623–626.
71. Enríquez-Flores, S., Rodríguez-Romero, A., Hernández-Alcántara, G., Oria-Hernández, J., Gutiérrez-Castrellón, P., Pérez-Hernández, G., de la Mora-de la Mora, I., Castillo-Villanueva, A., García-Torres, I., Méndez, S. T., Gómez-Manzo, S., Torres-Arroyo, A., López-Velázquez, G., & Reyes-Vivas, H. (2011). *Proteins*, 79(9), 2711–2724.



DRA. ITZHEL GARCÍA TORRES

Egresada de la carrera de Químico Farmacéutico Biológica de la Facultad de Química, UNAM. Realizó sus estudios de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

Actualmente es investigadora en Ciencias Médicas C, en el laboratorio de Errores Innatos del Metabolismo y Tamiz e investigadora fundadora del

grupo de estudio de Biomoléculas y Salud Infantil del Instituto Nacional de Pediatría.

Es miembro de la Sociedad Nacional de Bioquímica y del Sistema Nacional de Investigadores nivel I.

Ha participado en la formación de alumnos como profesora de asignatura de Bioquímica y Biología Molecular en la Facultad de Medicina, UNAM y como profesora de tópicos y cursos fundamentales en el Posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM.

Cuenta con 19 artículos en revistas de arbitraje e indizadas, y dos artículos de libro. Ha participado en 25 trabajos orales y en formato de póster en congresos internacionales y nacionales.

Ha estudiado enzimas glucolíticas de diferentes parásitos, como *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Giardia lamblia* y actualmente su línea de investigación se centra en la búsqueda de blancos proteicos mediante el uso de proteínas con repeticiones de anquirina diseñadas.