

COMO HERRAMIENTA PARA EL  
DISEÑO DE BIOSENSORES

# INGENIERÍA DE PROTEÍNAS

Pedro Jiménez-Sandoval <sup>1</sup>, Luis G. Brieba <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Apartado Postal 629, CP 36500, Irapuato, Guanajuato, México

## Resumen

Los anticuerpos son los elementos biológicos de reconocimiento por excelencia, su uso va desde la separación de componentes hasta la detección como biosensores. Sin embargo la aplicación a nivel industrial y médico de los anticuerpos presenta varios problemas, por ejemplo las inmunoglobulinas son moléculas de aproximadamente 150 kDa, lo cual limita su penetración celular y por ende su uso terapéutico; el plegado de las inmunoglobulinas se compone de cuatro polipéptidos que están unidos por enlaces disulfuro y además se encuentran glicosilados, por lo tanto requieren la expresión en células eucariotas.

La ingeniería de proteínas busca el cambio u optimización de la función. Con el crecimiento de las bases de datos que contienen información estructural de proteínas, la mayoría de trabajos en este campo se han enfocado en cómo la estructura determina la función. La idea de generar proteínas con capacidades de unión novedosas en base al diseño racional o dirigido con el fin de reemplazar las proteínas de la familia de las inmunoglobulinas o anticuerpos surgieron a finales de los años 90s. El objetivo de sustituir a los anticuerpos como moléculas de reconocimiento, por proteínas globulares es debido a diversas ventajas. Por

ejemplo, los andamios proteicos son proteínas globulares resistentes a la desnaturalización térmica y proteolítica, capaces expresarse en bacteria. Los andamios proteicos deben ser robustos en cuanto a la inserción de diversos polipéptidos sin disminuir la estabilidad general y sin alterar el plegado de la proteína. Ejemplos de proteínas usadas como andamios para el diseño de “anticuerpos sintéticos” son muy variables y e continuo crecimiento de secuencias de proteínas por técnicas de secuenciación masiva permite el obtener nuevos candidatos para ser usados como andamios proteicos.

**Palabras Clave:** Biosensor, Andamio proteico, Ingeniería de proteínas

## Abstract

Antibodies are biological recognition elements par excellence, since its use is the separation of components to detection as biosensors. However the application in manufacturing and medical antibody presents several problems, for instance immunoglobulins are macromolecules of approximately 150 kDa, which limits its cell penetration and therefore its therapeutic use.

The immunoglobulin fold consists of four polypeptides linked by disulfide bonds, they are glycosylated and therefore require expression in eukaryotic cells.

Protein engineering seeks change or optimization of their function. With the growth of databases containing protein structural information, most work in this field have focused on how the structure determines function. The idea of generating proteins with novel binding capabilities based on rational design or directed in order to replace family proteins or immunoglobulin antibody emerged in the late 90s. The aim of replacing antibodies as recognition molecules for globular proteins is due to several advantages. For example, protein scaffolds are resistant to thermal denaturation and proteolytic resistant globular proteins expressed in bacteria can be used. Protein scaffolds must be robust to allow the inclusion of various polypeptides without diminishing the overall stability without altering the folding of the protein. Examples of proteins used as scaffolds for the design of “synthetic antibodies” are highly variable and e continued growth of protein sequences by massive sequencing techniques allows to obtain new candidates for use as protein scaffolds.

## Introducción

Los anticuerpos son proteínas producidas por células del sistema inmune de los vertebrados en respuesta a una invasión de materiales extraños conocidos como antígenos. Los anticuerpos nos defienden de infecciones mediante su unión a toxinas, virus, bacterias o parásitos, inactivándolos de esta manera. La extrema especificidad mostrada por los anticuerpos hacia el antígeno correspondiente, la sencillez de la reacción antígeno-anticuerpo y la facilidad para detectar dicha reacción o los productos de la misma, han hecho de los anticuerpos herramientas ideales para el trabajo de rutina y de investigación en el área químico-biológica y han sido el modelo de las proteínas de unión con especificidades deseadas que puede ser de tipo nanomolar. En 1977 se resolvió la estructura de la primera inmunoglobulina humana completa (Silverton et al., 1977) y estudios posteriores han elucidado que el ángulo entre los ejes de los fragmentos de unión al antígeno es de  $115^\circ$ , produciendo una molécula en forma de Y distorsionada (Harris et al., 1998). Comparando esta estructura con la de otra inmunoglobulina (Harris et al., 1995) se observó que el anticuerpo actúa como una bisagra que permite cierta flexibilidad (Fig. 1).

## Anticuerpos como biosensores

Un biosensor incorpora un componente de reconocimiento biológico como el elemento funcional clave y un transductor que convierte la señal biológica en otra señal (fácilmente medible y cuantificable) y un dispositivo que permite la visualización de la señal o lectura (Turner, 2000), (Fig. 2).

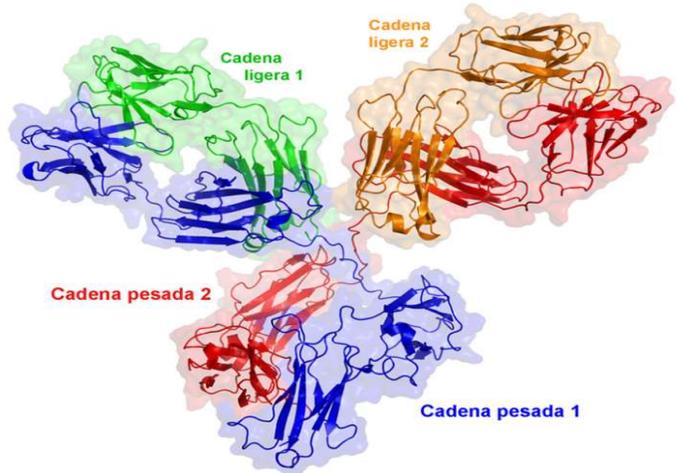


Figura 1. Estructura de una inmunoglobulina humana completa. Las cadenas pesadas se encuentran coloreadas de color azul y rojo, mientras que las cadenas ligeras de color naranja y verde. La región de reconocimiento a una molécula se encuentra en la cadena ligera. El plegado tipo inmunoglobulina se caracteriza por poseer una estructura cuya topología es semejante a un sándwich formado por 2 hojas  $\beta$  antiparalelas generalmente estabilizadas por puentes disulfuro.

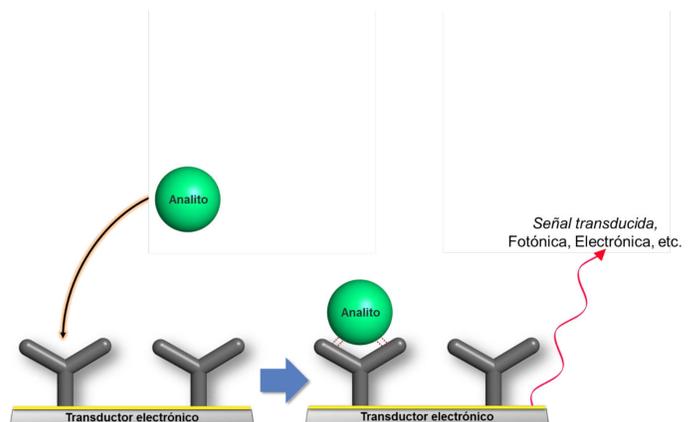


Figura 2. Esquema de los elementos de un biosensor. Las estructuras en forma de “Y” representan el elemento biológico dedicado al reconocimiento de la sustancia de interés, el analito. Una vez que el analito ha sido captado por el elemento biológico, este evento provoca un cambio en la señal transducida que es enviada a al dispositivo de lectura.

El ejemplo más común del biosensor es el que permite la cuantificación de la glucosa por medio de la enzima glucosa oxidasa en pacientes diabéticos (Yoo and Lee, 2010).

La importancia de determinar la presencia de proteínas por medio de biosensores es debido a que son la última fase de la expresión de un genoma y por lo tanto son los biomarcadores ideales. Por ejemplo, en la reciente epidemia de influenza en el país, fue relativamente sencillo el determinar a un individuo enfermo dado la presencia de ácidos nucleicos del virus por medio de reacciones enzimáticas como la reacción en polimerasa en cadena. Sin embargo, estas tecnologías requieren de horas o días (generalmente críticas en la efectividad del tratamiento) para proporcionar un dato que nos lleve a asegurarnos que un paciente es en verdad portador del virus y son muy susceptibles a la contaminación. Una de las alternativas a estos métodos, es el uso de sensores de proteínas como los anticuerpos. En la actualidad el uso de anticuerpos como método de detección es limitado, sin embargo existen en el mercado biosensores que permiten determinar la presencia de VIH-I, SARS, *Listeria monocytogenesis*, *Bacillus anthracis* y aflatoxinas (Byrne et al., 2013; Encarnacao et al., 2007).

### Ingeniería de proteínas para aplicaciones biotecnológicas basadas en el reconocimiento proteico

La ingeniería de proteínas ha evolucionado durante más de 3 décadas, con importantes aplicaciones en la medicina y la industria. A pesar de que los anticuerpos son las moléculas ideales para reconocer proteínas, éstos tienen severas deficiencias, entre las que se incluyen que no se expresan de forma adecuada en bacteria, son termolábiles, su plegado depende de la formación de puentes disulfuro y su costo de producción es extremadamente alto. La tecnología usada para generar anticuerpos por medio de hibridomas ha sido desplazada por el uso de técnicas de biología molecular y despliegue de fagos, sin embargo el uso de anticuerpos en el diagnóstico médico se encuentra rezagado por la dificultad de trabajar con proteínas de alto peso molecular y que requieren sistemas de expresión y purificación extenuantes. A pesar de lo anterior, existen ejemplos de anticuerpos como biosensores capaces de reconocer proteínas involucradas en cáncer de mama y de ovario (Diaconu et al., 2013) ya sea por medio de la cuantificación del antígeno específico total de próstata o proteínas sobre expresadas en cáncer (Reddy et al., 2012). Estudios clínicos indican que los epítopes más importantes para el diagnóstico del cáncer de mama son la chaperona Hsp60, la proteína p53, MDM2, anexina V

y la ubiquitina. Estudios de proteómica han identificado que un juego que comprende entre 7 a 31 proteínas son mayoritariamente identificadas en pacientes con cáncer de mama. Sin embargo solamente 4 de estas proteínas se encuentran sobre-expresadas en todos los pacientes. Estas son: el receptor de estrógeno, receptor de progesterona, ERBB2, y p53 (Bertucci et al., 2006). La detección de biomarcadores proteicos por “aptámeros peptídicos” o “módulos proteicos” tiene el potencial de remplazar al uso de anticuerpos en el diagnóstico de enfermedades como el cáncer. Las proteínas se componen de múltiples dominios o módulos y en la evolución estos se intercambian para dar lugar a proteínas con nuevas funciones. En este sentido los módulos proteicos pueden concebirse no como un ladrillo sino como una pared prefabricada en la construcción de una casa. El uso de estos adaptadores depende del correcto plegado del mismo y del péptido fusionado. La identificación de los andamios proteicos para presentar péptidos in vivo con el fin de retener su actividad biológica, han sido el foco de mucha investigación en los últimos años.

El concepto clave para que una proteína pueda servir como andamio proteico es que sea estable, presente asas expuestas y sea fácil de expresar y purificar. Ejemplos como tioredoxina, anticalina, inhibidores de proteasa, los dedos de zinc, el modulo de unión de carbohidratos de xilanasas, inhibidores de sintetasas de oxido nítrico, entre otros (Brown et al., 2010; Skerra, 2007, 2008; Souriau et al., 2005) o proteínas diseñadas por métodos computacionales (Desmet et al., 2014) han sido utilizadas con éxito (Fig. 3).

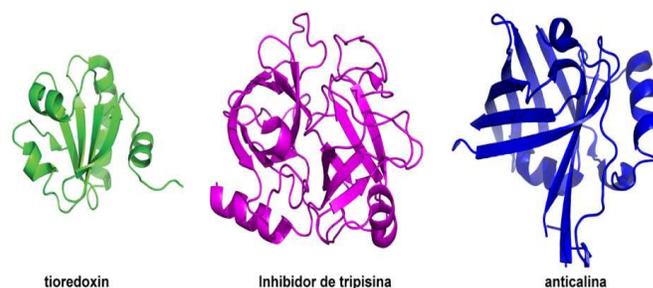


Figura 3. Ejemplos de estructuras que han sido utilizadas como andamios proteicos: tioredoxina, inhibidor de tripsina y anticalina. Todas estas proteínas tienen en común la presencia de asas en las cuales se puede introducir una nueva secuencia polipeptídica, una alta estabilidad térmica y un bajo peso molecular (entre 11 y 25 kDa)

En ese caso el concepto del andamio proteico es el de introducir la secuencia peptídica a las asas de cada proteína y esperar que esta nueva secuencia peptídica adopte un plegado correcto.

### Búsqueda en la naturaleza de nuevos plegados para mimetizar anticuerpos

El plegado tipo inmunoglobulina es uno de los motivos estructurales más comunes en la naturaleza. Este plegado se caracteriza por estar constituido por 2 hojas  $\beta$  formadas por 7 hebras  $\beta$  antiparalelas, aunque en algunas proteínas existen hasta 3 hebras extra, las cuales se pliegan en torno a un núcleo central (Bork, Holm et al. 1994). Proteínas con plegado de tipo inmunoglobulina se encuentran en numerosas proteínas que no son anticuerpos. Por ejemplo, en la proteína externa de membrana de insectos de *Leptospira* (LigB) (Mei et al.,

robustos, versátiles y que tengan un gran potencial en su uso biotecnológico así como terapéutico. Los andamios proteicos modificados ofrecen un potencial uso como sensores moleculares. Las nuevas secuencias de proteínas que se encuentran disponibles día a día en las crecientes bases de datos permitirán el uso y diseño de nuevos andamios proteicos.

### Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado por el proyecto “Productos de Valor Biotecnológico y Biomédico a partir de Proteínas Modulares” de la convocatoria “Ciencia y Tecnología para la Capital del Conocimiento 2012: Programa Ciudad Saludable” (ICYTDF PICSA12-092 ).

### Referencias

- Batori, V., Koide, A., Koide, S., 2002. Exploring the potential of the monobody scaffold: effects of loop elongation on the stability of a fibronectin type III domain. *Protein Eng* 15, 1015-1020.
- Bertucci, F., Birnbaum, D., Goncalves, A., 2006. Proteomics of breast cancer: principles and potential clinical applications. *Mol Cell Proteomics* 5, 1772-1786.
- Brown, C.J., Dastidar, S.G., See, H.Y., Coomber, D.W., Ortiz-Lombardia, M., Verma, C., Lane, D.P., 2010. Rational design and biophysical characterization of thioredoxin-based aptamers: insights into peptide grafting. *J Mol Biol* 395, 871-883.
- Byrne, H., Conroy, P.J., Whisstock, J.C., O’Kennedy, R.J., 2013. A tale of two specificities: bispecific antibodies for therapeutic and diagnostic applications. *Trends Biotechnol* 31, 621-632.
- Casados-Vazquez, L.E., Lara-Gonzalez, S., Briebe, L.G., 2011. Crystal structure of the cysteine protease inhibitor 2 from *Entamoeba histolytica*: functional convergence of a common protein fold. *Gene* 471, 45-52.
- Desmet, J., Verstraete, K., Bloch, Y., Lorent, E., Wen, Y., Devreese, B., Vandenbroucke, K., Loverix, S., Hettmann, T., Deroo, S., Somers, K., Henderikx, P., Lasters, I., Savvides, S.N., 2014. Structural basis of IL-23 antagonism by an Alphabody protein scaffold. *Nat Commun* 5, 5237.
- Diaconu, I., Cristea, C., Harceaga, V., Marrazza, G., Berindan-Neagoe, I., Sandulescu, R., 2013. Electrochemical immunosensors in breast and ovarian cancer. *Clin Chim Acta* 425, 128-138.
- Encarnacao, J.M., Rosa, L., Rodrigues, R., Pedro, L., da Silva, F.A., Goncalves, J., Ferreira, G.N., 2007. Piezoelectric biosensors for biorecognition analysis: application to the kinetic study of HIV-1 Vif protein binding to recombinant antibodies. *J Biotechnol* 132, 142-148.
- Harris, L.J., Skaletsky, E., McPherson, A., 1995. Crystallization of intact monoclonal antibodies. *Proteins* 23, 285-289.

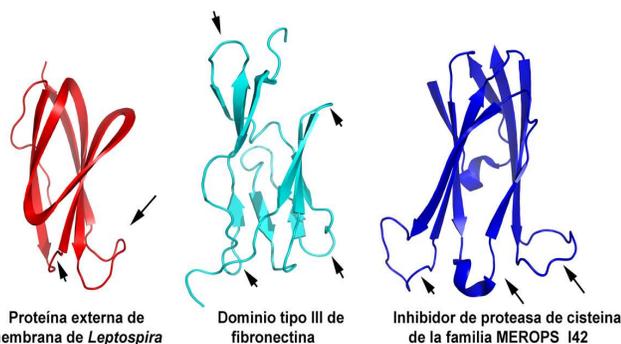


Figura 4. Ejemplos de proteínas con plegamiento tipo inmunoglobulina, mostrando las 2 hojas  $\beta$  antiparalelas del plegado. Con flechas se indican posibles zonas de introducción de péptidos para servir como sitios de unión.

2015), el dominio tipo III de la fibronectina humana (Batori et al., 2002) y los inhibidores de proteasas de cisteína de la familia MEROPS 42 (Casados-Vazquez et al., 2011) entre muchos otros (Fig. 4).

El plegado de inhibidores de proteasas de cisteína de tipo chagasina es un plegado estable a la desnaturalización que permite la introducción de tres epítopes entre los conectores denominados asas DE, BC y FG. Sorprendentemente este inhibidor presenta una estructura simétrica, lo cual es único con respecto a otros inhibidores de la misma familia o de familias distintas que presentan 7 en lugar de 8 láminas beta, lo cual presentaría una ventaja para la estabilidad de la proteína al introducir péptidos quiméricos.

### Conclusiones

La mejor práctica para generar nuevas proteínas de unión que mimeticen anticuerpos es el uso de andamios proteicos novedosos, que además sean

Harris, L.J., Skaletsky, E., McPherson, A., 1998. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *J Mol Biol* 275, 861-872.

Mei, S., Zhang, J., Zhang, X., Tu, X., 2015. Solution structure of a bacterial immunoglobulin-like domain of the outer membrane protein (LigB) from *Leptospira*. *Proteins* 83, 195-200.

Reddy, P.J., Sadhu, S., Ray, S., Srivastava, S., 2012. Cancer biomarker detection by surface plasmon resonance biosensors. *Clin Lab Med* 32, 47-72.

Silverton, E.W., Navia, M.A., Davies, D.R., 1977. Three-dimensional structure of an intact human immunoglobulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5140-5144.

Skerra, A., 2007. Anticalins as alternative binding proteins for therapeutic use. *Curr Opin Mol Ther* 9, 336-344.

Skerra, A., 2008. Alternative binding proteins: anticalins - harnessing the structural plasticity of the lipocalin ligand pocket to engineer novel binding activities. *FEBS J* 275, 2677-2683.

Souriau, C., Chiche, L., Irving, R., Hudson, P., 2005. New binding specificities derived from Min-23, a small cysteine-stabilized peptidic scaffold. *Biochemistry* 44, 7143-7155.

Turner, A.P., 2000. Tech.Sight. *Biochemistry. Biosensors--sense and sensitivity. Science* 290, 1315-1317.

Yoo, E.H., Lee, S.Y., 2010. Glucose biosensors: an overview of use in clinical practice. *Sensors (Basel)* 10, 4558-4576.



Científica Senna S.A. de C.V. ofrece soluciones para la investigación científica, nuestra compañía ofrece productos de marcas con renombre internacional, como son:



Anticuerpos, Lisados, Peptidos, RNAi, marcadores, Proteínas y Kits



Líneas celulares, bacterias, cepas de Referencia, sueros y medios de cultivo



Microarreglos de Anticuerpos y Proteínas Peptidos, EIA y Kits de Elisa



Anticuerpos para detectar actina y proteínas, proteínas motoras



Material de Plástico, cajas de cultivo celular, multiplacas y cristalería Pyrex



Medios de Cultivo, suplementos, buffers, antibióticos, Suero fetal



Reactivos, antibióticos, enzimas, factores de crecimiento, cromatografía



Extracción de ácidos nucleicos, medios de cultivo, enzimas, reactivos



Reactivos para biología molecular; electroforesis, medios de cultivo

Para mayor información de productos o marcas que ofrecemos favor de comunicarse a: Tel: (55) 5740-2603  
[info@cientificasenna.com](mailto:info@cientificasenna.com) [www.cientificasenna.com](http://www.cientificasenna.com)