

TESINA DE GRADO DE LA LICENCIATURA BIOQUÍMICA

**Desarrollo de líneas celulares
y vectores para la
biotinilación *in vivo* de fagos
filamentosos expresando
nanobodies y péptidos**

DANIELA OLIVERA DE LUCA

TUTOR: DR. GUALBERTO GONZÁLEZ-SAPIENZA

CO-TUTOR: DR. ANDRÉS GONZÁLEZ-TECHERA

CÁTEDRA DE INMUNOLOGÍA

INSTITUTO DE HIGIENE

UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

AGRADECIMIENTOS

A mi tutor, Gualberto, por aceptarme en el laboratorio y permitirme crecer en este grupo de trabajo. Gracias por tu apoyo, enseñanzas y horas de dedicación.

A mi co-tutor, Andrés, por las ideas aportadas y las enseñanzas en el laboratorio. Gracias por tu optimismo constante y tu disponibilidad para pensar juntos cuando las cosas no salían como esperábamos.

Al Dr. Mario Señorale, por aceptar corregir mi trabajo.

A todos los compañeros de la Cátedra de Inmunología, por crear un lindo ambiente de trabajo y los momentos compartidos. En especial agradezco a la “casita del fondo” por estar siempre dispuestos a ayudar, por sus consejos, y su buena onda.

A mis padres, por su apoyo incondicional durante toda la carrera y su interés constante, aún cuando no entendieran del todo de qué iba esto. A mi hermana, por siempre estar y escucharme cuando lo necesité.

A mis amigos de Facultad, por compartir mucho más que horas de estudio y hacer de ésta una tan linda etapa. En especial, a Meche, Caro, Flo y Lu, con quienes compartí toda la carrera, y que más que compañeras de estudio, se convirtieron en grandes amigas.

A los amigos de siempre, gracias por todos estos años juntos y por acompañarme en esta etapa de crecimiento que va más allá de lo académico.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------------|--|
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| BCCP | Del inglés: <i>Biotin Carboxyl Carrier Protein</i> |
| BPL | Botina Proteín-Ligasa |
| BSA | Seroalbúmina bovina |
| dNTPs | Desoxirribonucleótidos trifosfato |
| DO | Densidad Óptica |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| ELISA | Del inglés: <i>Enzyme Linked Immunosorbent assay</i> |
| FR | Forma Replicativa |
| HA | Hemaglutinina |
| IPTG | Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido |
| NHS | N-Hidroxisuccinimidil |
| OmpA | Del inglés: <i>Outer Membrane Protein A</i> |
| ON | Del inglés: <i>Overnight</i> |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PEG | Polietilenglicol |
| pelB | Del inglés: <i>Periplasmic pectate lyase</i> |
| PFU | Unidades formadoras de placa (Del inglés: <i>Plaque Forming Unit</i>) |
| SE | Señal Empaquetadora |
| TA | Temperatura Ambiente |

UA Unidad de Absorbancia

VHH Dominio variable de anticuerpos de camélido de cadena pesada

RESUMEN

Los bacteriófagos filamentosos han sido explotados como valiosas herramientas biotecnológicas y de investigación. Entre sus aplicaciones más conocidas destaca la presentación de fragmentos de anticuerpos y péptidos por la partícula viral (*phage-display*), que constituye una plataforma poderosa para la selección de ligandos contra distintos blancos. Esta se basa en la modificación del bacteriófago por ingeniería genética para expresar polipéptidos fusionados a alguna de sus proteínas de cápside. El desarrollo de bibliotecas de péptidos y anticuerpos empleando *phage-display*, es una de las grandes aplicaciones de esta tecnología. La presentación por fagos filamentosos permite la selección del anticuerpo o péptido y el aislamiento posterior de los mismos para ser usados como reactivos en diversas aplicaciones biotecnológicas.

Por otro lado, la biotinylación de proteínas *in vivo* constituye una herramienta biotecnológica de gran utilidad, dada la altísima afinidad que presenta la biotina por la estreptavidina o avidina. La adición de biotina puede realizarse químicamente *in vitro* reaccionando derivados de biotina con grupos reactivos de las proteínas, o a través de una adición metabólica durante su producción recombinante sobre-expresando la biotín ligasa de *E. coli*. Para esto se fusiona a la proteína de interés un péptido que actúa como aceptor de biotina. Una de las ventajas de la biotinylación *in vivo*, es que permite una adición específica y selectiva de la biotina a la proteína de trabajo.

La biotinylación *in vivo* de bacteriófagos ha sido reportada como una técnica muy útil que no compromete la infectividad del fago ni la presentación de otras proteínas de fusión en su superficie. Esta modificación permite ampliar las aplicaciones biotecnológicas de los bacteriófagos como reactivos de inmunoprecipitación y en inmunoensayos.

En este trabajo de grado se describe el desarrollo de un vector que permite la biotinylación *in vivo* de bacteriófagos, y la expresión simultánea de nanobodies fusionados a una de sus proteínas de cápside (pIII). A su vez, se

generó una nueva cepa de *E. coli* que permite la sobre-expresión de la *BirA* y que es infectable por bacteriófagos (AVB100F'). Por último, se exploró la utilidad de los bacteriófagos para ser utilizados como reactivos en un inmunoensayo competitivo, y se evaluó la capacidad de éstos para ser inmovilizados por beads magnéticos conjugados a estreptavidina.

Palabras Clave:

- Bacteriófagos
- Phage-display
- Biotinilación *in vivo*
- Inmunoensayos
- Biotecnología

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Biología del bacteriófago filamentoso | 1 |
| 1.2 Aplicaciones de fagos filamentosos: Phage-display | 5 |
| 1.3 El sistema estreptavidina/avidina-biotina..... | 9 |
| 1.4 Sistemas de biotinylación..... | 13 |
| 1.4.1 Biotinylación química | 13 |
| 1.4.2 Biotinylación enzimática | 14 |
| 1.4.3 Biotinylación in vivo | 17 |
| 1.5 Biotinylación <i>in vivo</i> de fagos filamentosos | 18 |
| 1.6 Nanobodies como herramientas biotecnológicas..... | 21 |
| 2. OBJETIVOS | 24 |
| 2.1 Objetivo General | 24 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 24 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS | 25 |
| 3.1 Buffers y soluciones..... | 25 |
| 3.2 Medios de cultivo | 26 |
| 3.3 Procedimientos generales..... | 26 |
| 3.3.1. Titulylación de fagos por placa | 26 |
| 3.3.2 Titulylación de fagos por espectrofotometría | 27 |
| 3.3.3 Análisis de bacteriófagos por ELISA | 27 |
| 3.3.4 Titulylación de fagos por qPCR | 28 |
| 3.4 Construcción del vector..... | 28 |
| 3.5 Producción de fagos biotinylados en células ER2738 | 29 |
| 3.6 Producción de pVIII-AviTag en células AVB100..... | 30 |
| 3.6.1 Visualización de pVIII biotinylada mediante western blot..... | 31 |
| 3.6.2 Visualización de las proteínas del fago mediante western blot..... | 31 |
| 3.7 Generación de la cepa AVB100F' | 32 |
| 3.8 Biotinylación de bacteriófagos en AVB100F' | 32 |
| 3.9 ELISA para la detección de nanobody soluble..... | 33 |
| 4.0 Optimización de condiciones para la obtención de bacteriófagos biotinylados | 33 |
| 4.0.1 Optimización del tiempo de inducción de la enzima BirA..... | 33 |
| 4.0.2 Inducción con distintas concentraciones de arabinosa. | 33 |

| | |
|--|-----------|
| 4.0.3 Inducción pre y post-infección con el fago helper. | 34 |
| 4.0.4 Producción de bacteriófagos a distintas temperaturas. | 34 |
| 4.0.5 Crecimiento en presencia de glucosa..... | 34 |
| 4.1 Clonado del nanobody A2 en el vector pINQ8b3..... | 34 |
| 4.2 Cambio de un codón amber por un codón codificante para ácido glutámico en el vector pINQ8b3, para que el fago exprese el nanobody fusionado a la proteína pIII | 35 |
| 4.3 Producción de stock concentrado de fagos biotinilados | 36 |
| 4.4 Biotinilación <i>in vitro</i> de bacteriófagos..... | 37 |
| 4.4.1 Producción del extracto crudo BL21-pBir | 37 |
| 4.4.2. Evaluación de la eficiencia del extracto crudo de BL21-pBir | 37 |
| 4.4.3 Biotinilación <i>in vitro</i> de bacteriófagos expresando pVIII-AviTag | 38 |
| 4.4.4 Post-biotinilación <i>in vitro</i> de fagos biotinilados <i>in vivo</i> previamente..... | 38 |
| 4.5 Estimación de la cantidad de biotinas en los bacteriófagos biotinilados <i>in vivo</i> | 39 |
| 4.5.1 Estimación de la cantidad de biotinas en los bacteriófagos biotinilados <i>in vivo</i> mediante western blot..... | 39 |
| 4.5.2 Estimación de la cantidad de biotinas en los bacteriófagos biotinilados <i>in vivo</i> mediante ELISA..... | 39 |
| 4.6 Captura de bacteriófagos biotinilados con beads magnéticas conjugadas a estreptavidina | 41 |
| 4.7 Ensayo competitivo con bacteriófagos biotinilados | 42 |
| 4.7.1 Titulación de la preparación de fagos biotinilados | 42 |
| 4.7.2 ELISA competitivo para la detección de microcistina | 42 |
| 5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 44 |
| 5.1 Se logró construir el vector pINQ8b3-H11 que permitiría la biotinilación <i>in vivo</i> de bacteriófagos y la expresión del nanobody H11 | 44 |
| 5.2 Los bacteriófagos producidos en <i>E.coli</i> ER2738 expresarían nanobody pero no se estarían biotinilando | 45 |
| 5.3 La biotinilación de pVIII-AviTag en <i>E. coli</i> AVB100 ocurre con baja eficiencia..... | 49 |
| 5.4 La conjugación de la cepa ER2738 con AVB100 permitió generar una nueva cepa con expresión de pili F'. | 52 |
| 5.5 Los bacteriófagos producidos en <i>E. coli</i> AVB100F' se biotinilan <i>in vivo</i> pero no expresan el nanobody | 52 |
| 5.6 La supresión del codón amber en pINQ8b3 permitió la correcta expresión de los nanobodies en las partículas virales. | 56 |
| 5.7 Optimización de la producción de bacteriófagos biotinilados en AVB100F' | 59 |
| 5.7.1 La inducción temprana de la enzima BirA da mayor señal para la presencia de biotina y la producción de bacteriófagos..... | 59 |

| | |
|--|-----------|
| 5.7.2 La señal de biotilación de los bacteriófagos mejora con el aumento de la concentración de arabinosa al inducir el cultivo, pero es un incremento marginal..... | 61 |
| 5.7.3 La inducción de las proteínas del fagémido post-infección con fago helper produjo sobrenadantes con mayor señal para la presencia de biotina y la producción de bacteriófagos..... | 63 |
| 5.7.4 El uso de 37°C a lo largo del cultivo produjo los mejores resultados | 65 |
| 5.7.5 El crecimiento en presencia de glucosa perjudicaría la biotilación <i>in vivo</i> de los bacteriófagos..... | 66 |
| 5.8 Biotilación <i>in vitro</i> de bacteriófagos expresando pVIII-AviTag producidos en AVB100F' | 68 |
| 5.8.1 El uso de un extracto de BirA permitió la biotilación <i>in vitro</i> de una proteína modelo. | 69 |
| 5.8.2 El uso del extracto de BirA permitió la biotilación <i>in vitro</i> de los fagos producidos con el fagémido pINQ8b3-H11..... | 70 |
| 5.8.3 La biotilación <i>in vitro</i> no incrementó el nivel de biotilación de bacteriófagos previamente biotilados <i>in vivo</i> | 71 |
| 5.9 Estimación del número de moléculas de biotina en la partícula viral. | 73 |
| 5.9.1 La proporción de pVIII biotilada parece ser muy baja para ser detectada por Western Blot | 73 |
| 5.9.2 La técnica de ELISA permitió estimar la cantidad de biotinas promedio por fago | 74 |
| 6.0 La captura de bacteriófagos biotilados con beads conjugados a estreptavidina parece indicar que una proporción importante de fagos no están biotilados. | 77 |
| 6.1 El ensayo montado para la determinación de microcistina con los fagos biotilados <i>in vivo</i> resultó muy poco sensible. | 80 |
| 7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS..... | 83 |
| BIBLIOGRAFÍA | 86 |

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Biología del bacteriófago filamentoso

Los bacteriófagos filamentosos son un grupo de virus pertenecientes al género Inovirus, clasificados como la familia Inoviridae. Dentro de ésta familia, se encuentran los fagos Ff - conocidos como M13, f1 y fd¹ - denominados así por su apariencia filamentososa e infectar bacterias gram-negativas como *E. coli* vía adsorción al pili F². Este último es una estructura bacteriana que permite la transmisión de ADN plasmídico entre bacterias³. Estos fagos se caracterizan por su morfología cilíndrica de 900 nm de largo y 6-10 nm de diámetro, donde se empaqueta una única molécula circular de ADN simple hebra¹. A su vez, tienen la particularidad de no realizar ciclos líticos, sino que establecen una relación con el huésped donde los viriones son liberados en forma continua⁴, con una productividad tal, que es posible alcanzar títulos de 10¹³ partículas virales por mL de cultivo⁵.

A nivel estructural, el ADN está cubierto por la proteína mayoritaria pVIII compuesta por 50 aminoácidos y de la cual existen aproximadamente 2700 copias en el fago maduro^{6,7}. Se ha determinado que pVIII tiene una estructura secundaria de α -hélice^{8,9}, donde las copias se disponen en forma helicoidal a lo largo de toda la cápside con el extremo N-terminal en la superficie del virión y el C-terminal en el interior, próximo al ADN¹⁰. Esta proteína es sintetizada junto con una secuencia señal amino-terminal de 23 aminoácidos, que dirige su inserción a membrana, donde es removida por una peptidasa señal¹¹. Las proteínas minoritarias pIII y pVI se disponen en el extremo distal del fago, mientras que pVII y pIX lo hacen en el proximal¹² y constan de tan sólo 3 a 5 copias en el fago maduro^{13,14}. A pesar de estar muy poco representadas cumplen funciones claves: pVII y pIX son necesarias para que el fago sea ensamblado y liberado, por otro lado, pVI y pIII intervienen en la estabilidad y median la infección^{7,12,15}.

Entre las proteínas de cápside, pIII es la de mayor tamaño, con 406 residuos aminoacídicos y tres dominios proteicos - N1, N2 y N3 - separados por regiones flexibles ricas en glicina¹⁶. Es sintetizada, así como pVIII, junto con una secuencia señal que dirige su inserción en la membrana, fenómeno que no ocurre para el resto de las proteínas de cápside¹¹. Los dominios N1 y N2 están dispuestos en la región amino-terminal y quedan expuestos en la superficie formando un complejo¹⁷, mientras que el dominio N3, de la región carboxi-terminal, ancla pIII a la partícula del fago¹⁸. Mientras que este último es clave para formar una partícula estable^{19,20}, los dominios amino-terminales son imprescindibles para que se de la infección^{7,19,21}.

Como ya se mencionó anteriormente, los bacteriófagos Ff infectan a su huésped por interacción con el pili F. La proteína involucrada en este proceso es pIII y la interacción inicial con su sitio de unión en la punta del pili F ocurre mediante su dominio N2^{16,22}. Esta interacción, que es de alta afinidad, dispara el proceso natural de retracción del pili que aproxima el fago a la membrana de la bacteria, a la vez que provoca un cambio conformacional en el complejo N1N2, que libera a N1 y permite su interacción con el co-receptor bacteriano TolA²³. Este último forma un complejo con otras proteínas de membrana, TolQ y TolR, que media la incorporación de las proteínas del fago así como la translocación del ADN al citoplasma, mediante un mecanismo poco entendido²⁴.

Una vez que el ADN viral ha accedido al citoplasma, las ARN y ADN polimerasas bacterianas dan lugar a una molécula de ADN doble cadena^{25,26}. Sobre esta molécula actúa una topoisomerasa tipo II que introduce superenrollamiento negativo, y genera la forma replicativa (FR)²⁷. En esta forma, la hebra negativa actúa como molde para la transcripción y los mRNAs resultantes se traducen en las proteínas del fago²⁷. Una de estas, pII, corta la hebra positiva en una región intergénica, y genera un extremo 3'OH que actúa como cebador para la síntesis de una nueva hebra vía replicación círculo rodante²⁵. Luego de una ronda, pII circulariza la nueva hebra positiva²⁸. Por otro lado, la hebra negativa es sintetizada empleando un cebador generado por la ARN polimerasa bacteriana, que permite iniciar la

síntesis en una región intergénica²⁹. Las hebras simples recién formadas son convertidas por las enzimas bacterianas a la FR, lo cual resulta en un incremento exponencial de FR y proteínas del fago³⁰.

La síntesis de esta FR continúa hasta que otra proteína del fago, pV, alcanza una concentración crítica; los dímeros de pV se unen cooperativamente a las hebras simples positivas recién sintetizadas y previenen su conversión a la FR^{31,32}. Este paso es clave, puesto que impide el acceso de las ADN polimerasas, formando un complejo similar al fago maduro ensamblado³³. Otra particularidad del complejo pV-ADN, es que contiene una región de ADN expuesta, que actúa como señal para el empaquetamiento del bacteriófago³⁴. Una vez formado el complejo, pX -variante traduccional de pII -, regula la cantidad de ADN viral producido y asegura la acumulación estable de hebras simples³⁵.

Cabe destacar que tanto pX, como pII y pV, son las únicas proteínas del fago involucradas en la replicación del ADN y de residencia citoplasmática. Por el contrario, el resto son sintetizadas e insertadas en la membrana externa o citoplasmática, y poseen un rol en el ensamblado de la partícula viral³⁶. El ensamblado del bacteriófago es un proceso asociado a la membrana, que requiere ATP, un gradiente de protones, al menos una proteína bacteriana (tioredoxina) y en el que participan proteínas de cápside, así como otras que no se empaquetan en la partícula final denominadas pI, pIV y pXI³⁷. Estas tres proteínas se integran a la membrana citoplasmática, e interactúan mediante sus regiones peri-plasmáticas para formar un sitio de ensamblado donde la membrana citoplasmática y externa hacen contacto³⁸. La proteína pIV tiene un tamaño de 406 aminoácidos y es sintetizada con un péptido señal amino-terminal que dirige su secreción hacia la membrana citoplasmática³⁹. Esta luego se integra en la membrana externa como un oligómero de 12 a 14 monómeros, donde las porciones amino-terminales quedan expuestas al periplasma⁴⁰. Se ha observado que los oligómeros de pIV forman un canal en la membrana externa, lo suficientemente grande como para permitir la extrusión del fago^{41,42}. La asociación de pIV con las proteínas, pI y pXI, forma el sitio de ensamble del fagos, las mismas constan de 253 y

108 aminoácidos respectivamente y tienen la particularidad de ser isoformas entre sí, donde la segunda resulta del inicio de la traducción en el codón 241 del gen codificante para pI y es homóloga a su carboxi-terminal^{43,44}. En las dos la síntesis ocurre sin péptido señal amino-terminal y una vez insertadas en la membrana, es su región carboxi-terminal la que se extiende hacia el periplasma⁴³.

Como se mencionó previamente, la unión de los dímeros de pV al ADN simple hebra es clave para que el ensamblado comience. La señal empaquetadora (SE) de este complejo se asocia con el dominio citoplasmático de pI, dando inicio a las reacciones de ensamblado, posiblemente vía remoción de los dímeros pV por acción de pI y/o pXI^{44,45}. También participarían aquí pVII y pIX, al asociarse con la SE, así como las primeras moléculas de pVIII^{12,46}. Si bien no está claro en qué orden se asociarían pVII, pIX y pVIII a la SE, se cree que pI podría dirigir un ensamblado ordenado para la formación de la punta de la partícula³⁶. Luego del inicio, la partícula es elongada por una serie de reacciones sucesivas que eliminan pV y la reemplazan por pVIII, lo que provoca que la partícula de fago naciente extruya a través del poro formado por pIV. El tamaño de este poro actúa como limitante para el tamaño de los polipéptidos que pueden ser expresados como fusiones con pVIII^{47,48}. Se postula que estas reacciones serían catalizadas por pI en forma dependiente de ATP y que la tiorredoxina bacteriana otorgaría procesividad a la elongación^{45,49}. Finalmente, cuando se alcanza el extremo del ADN, se adicionan las proteínas pVI y pIII que dan por terminado el ensamblado y permiten la liberación de la partícula viral madura al medio³⁷. A modo de resumen, en la **Figura 1** se esquematiza el ciclo de vida del fago M13 una vez ha ingresado a la célula huésped.

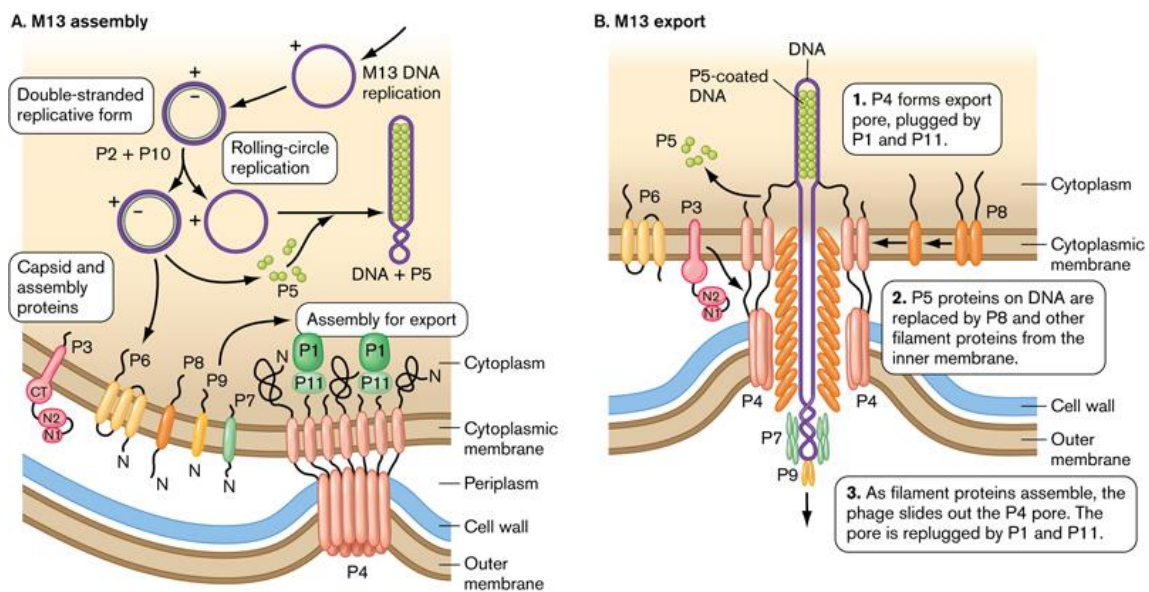


Figura 1. Ensamblado y salida de la progenie de fagos M13. A. Muestra la replicación del fago M13. La mayor parte del ensamblado es llevada a cabo por proteínas del fago dentro de la membrana celular. B. Se indica el ensamblado para la salida a través del poro formado por monómeros de pIV. pIV genera un canal que permite la extrusión de los fagos filamentosos sin lisar al huésped bacteriano. El ADN simple cadena del fago filamentosos es cubierto por subunidades de pVIII a medida que pasa a través de la membrana, hasta atravesar el canal formado por pIV del que emerge como fago infeccioso maduro. *Extraído y adaptado de Slonczewski & Foster (2012). Microbiology: An Evolving Science*⁵⁰.

1.2 Aplicaciones de fagos filamentosos: Phage-display

La estructura y ciclo de vida de los bacteriófagos filamentosos, los ha situado como valiosas herramientas biotecnológicas y de investigación. De hecho, gran parte del conocimiento obtenido sobre la biología del bacteriófago filamentosos, ha sido aprovechado por la tecnología de “Phage-display”. La tecnología de phage-display, desarrollada en 1985 por George Smith, se basa en el uso de fagos modificados genéticamente para expresar polipéptidos fusionados a alguna de sus proteínas de cápside⁵¹. Estas proteínas recombinantes, resultantes de esta fusión, son incorporadas durante el ensamblado de la partícula viral en formación y permiten establecer un vínculo directo entre el fenotipo y genotipo del bacteriófago. Si bien esta técnica ha sido empleada para varios bacteriófagos como λ , T4 y T7, los más utilizados han sido los filamentosos⁵².

Esta tecnología ha tenido muchas aplicaciones desde su invención como la identificación de epítopes antigénicos, estudios de interacción entre proteínas y la identificación de marcadores de tejidos, órganos y procesos bioquímicos, etc.⁵³. Sin embargo, uno de sus usos más empleados y conocidos es la selección de péptidos y anticuerpos a partir de bibliotecas de bacteriófagos filamentosos modificados, donde el más utilizado es el M13.

A pesar de que todas las proteínas de cápside pueden ser utilizadas para la presentación⁵⁴⁻⁵⁷, los vectores más usados emplean pVIII y pIII. Como se mencionó anteriormente, ambas proteínas son sintetizadas con secuencias señal amino-terminales que son posteriormente cortadas por una peptidasa señal, y por lo tanto, cualquier secuencia foránea debe ser insertada entre el péptido señal y la proteína. El *display* utilizando pIII es el elegido cuando se desea muestrear proteínas grandes, por tolerar fusiones de mayor tamaño sin afectar el ensamblado de la partícula viral. La fusión puede realizarse directamente al N-terminal de la proteína pIII entera, o bien a una versión truncada de la misma que sólo contiene el dominio C-terminal. La proteína mayoritaria de cápside, pVIII, también ha sido explotada para el *display* de proteínas y péptidos. Sin embargo, ésta tiene como limitante que sólo péptidos muy pequeños (6-7 aminoácidos) pueden ser presentados en todas las copias de pVIII^{58,59}. Esta restricción estaría mayormente impuesta por un impedimento estérico del canal formado por pIV en el ensamblado de la partícula viral, donde péptidos de mayor tamaño interfieren con el proceso⁶⁰. En vista de este inconveniente se han explorado diversas estrategias para el *display* en pVIII.

Entre los sistemas más comunes para lograr la presentación en pIII y/o pVIII destacan los vectores de fago y los vectores fagémidos.

Cuando la presentación se realiza a través de vectores de fago, la pIII wild-type es modificada en su amino-terminal para incorporar la secuencia de interés. Cuando sólo hay una copia de pIII en el fago se habla de Sistemas “Tipo 3” y si bien pIII puede tolerar grandes insertos - alrededor de 30 residuos aminoácidos⁶¹-, la presentación de proteínas más grandes resulta problemática, porque afectan la función de pIII al promover su degradación en

el periplasma o interfiriendo con sus roles en el ensamblado viral y la infección del huésped⁶². Para ello, pueden utilizarse vectores de fago “tipo 33”, donde pIII se encuentra en dos copias pero sólo una es sometida a la fusión amino-terminal de la proteína deseada⁶². Por otro lado, la presentación en pVIII empleando estos vectores seguiría estrategias similares a las descritas para pIII: En el sistema tipo 88, análogo al 33, un vector de fago porta dos copias de la proteína pVIII, una de ellas wild-type y la otra recombinante, fusionada al péptido a presentar en su porción amino-terminal. Como resultado se obtiene una partícula viral recubierta por pVIII wild-type y recombinante, la cual es capaz de tolerar grandes insertos foráneos.

Por otro lado, destacan los vectores fagémidos. El vector fagémido es un plásmido que tiene un origen de replicación que permite su propagación en *E. coli*, una resistencia a antibiótico que funciona como marcador de selección y un origen de replicación bacteriófago-derivado. Este plásmido se destaca por poder ser empaquetado en una partícula viral, de la misma forma que lo haría el ADN de un fago wild-type. Además, los fagémidos constan de un casete de expresión que codifica para la proteína de fusión a ser presentada, pero carecen de todas las otras proteínas estructurales y no-estructurales necesarias para generar el fago maduro. De este modo los fagémidos pueden ser empaquetados en partículas virales sólo cuando se adiciona un fago helper.

El fago helper es un bacteriófago modificado con un origen de replicación defectuoso, que resulta en un empaquetamiento ineficiente de su ADN, y que además provee de todas las proteínas necesarias para la replicación y empaquetamiento del virión. En esta estrategia la presentación en pIII se logra fusionando el polipéptido de interés tanto a la proteína wild-type como a una forma trunca de la misma en el fagémido, y recibe el nombre de sistema 3+3. Los vectores fagémidos también pueden ser empleados para la presentación en pVIII mediante un sistema 8+8, similar al 3+3, donde el fagémido codifica para la pVIII recombinante y un fago helper proporciona la pVIII wild-type. Por consiguiente, la progenie de bacteriófagos queda formada por un mosaico de pVIII recombinante y wild-type, al igual que en el sistema

88, que permite ampliar el tamaño de los insertos a presentar. En la **Figura 2**, se resumen los sistemas más usados para el phage-display.

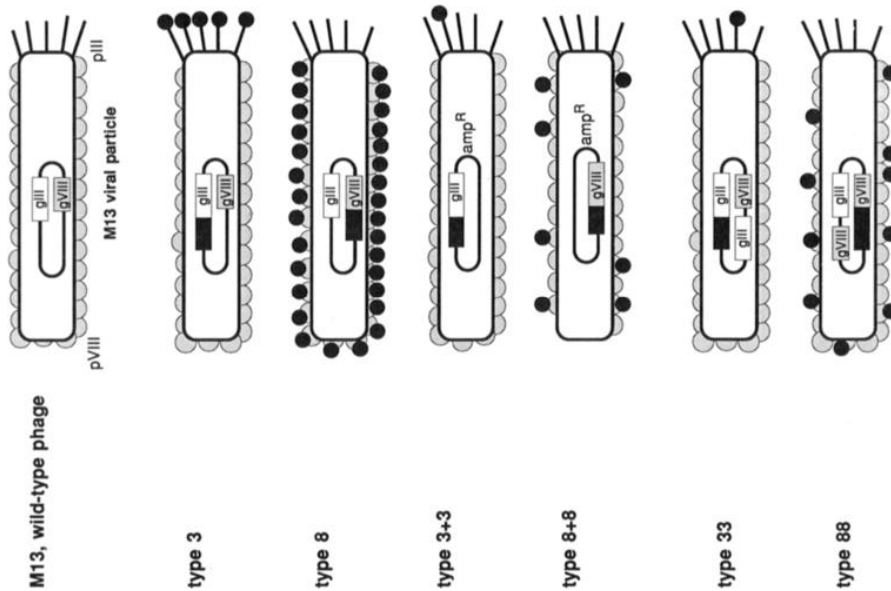


Figura 2. Comparación de distintos vectores de phage-display. Los cuadrados y esferas negras se corresponden con los elementos genéticos foráneos y los péptidos codificados, respectivamente. Las proteínas, péptidos o dominios proteicos son fusionados a las proteínas III o VIII. Cada sistema de vector es clasificado como tipo 3 o 8, dependiendo si la fusión se realiza a las proteínas III o VIII, respectivamente. Mientras que los vectores tipo 3 y 8 tienen una única copia del gen de la proteína de cápside, los vectores 33 y 88 tienen dos copias. Los vectores 3+3 y 8+8 son de tipo fagémido, y las partículas virales sólo se forman cuando células que portan el genoma fagémido son infectadas con fago helper. *Extraído y adaptado de Kay, Winter & McCafferty (1996) "Phage Display of Peptides and Proteins: a Laboratory Manual" ¹¹.*

1.3 El sistema estreptavidina/avidina-biotina

La biotina es una vitamina hidro-soluble requerida por todos los organismos conocidos, que funciona como co-factor de un conjunto de enzimas, las carboxilasas y decarboxilasas dependientes de biotina⁶³. Estas enzimas transfieren CO₂ entre metabolitos y utilizan la biotina unida covalentemente como transportador del grupo carboxilo activado, participando en reacciones metabólicas claves de la gluconeogénesis, degradación de aminoácidos y transducción energética⁶⁴.

Si bien las enzimas dependientes de biotina están muy extendidas en la naturaleza, la biotinilación es una modificación poco frecuente, con tan sólo 1 a 5 proteínas biotiniladas por organismo⁶⁵. La biotina proteín-ligasa (BPL), u holocarboxilasa sintetasa, es la enzima encargada de catalizar la adición de biotina a estas proteínas vía modificación post-traducciona. Dada la escasa cantidad de proteínas biotiniladas por organismo, cabe pensar que la reacción catalizada por la BPL es de extrema especificidad. Esta particularidad ha sido explotada para marcar proteínas recombinantes, para su posterior purificación, cuantificación y análisis empleando las tecnologías del sistema (estrept)avidina-biotina.

El sistema (estrept)avidina-biotina ha sido utilizado a lo largo de los años en diversas aplicaciones biotecnológicas, entre las que se destaca su empleo en técnicas de ELISA, inmunohistoquímica, western, Southern y northern blot, inmunoprecipitación y purificación por afinidad. También se la ha empleado para marcar superficies celulares, realizar separaciones celulares por fluorescencia (FACS) y en ensayos electroforéticos de movilidad retardada (EMSA)⁶⁶. Esto se basa en la capacidad de la avidina, una proteína encontrada en la clara del huevo y la estreptavidina, proteína similar proveniente de *Streptomyces avidinii*, para unir biotina con alta afinidad. Se estima que esta interacción representa un mecanismo de defensa, puesto que la unión de avidina o estreptavidina a proteínas biotiniladas que participan en el metabolismo las inactiva e inhibe el crecimiento bacteriano dependiente de estas enzimas⁶⁷.

De todos modos, más allá de su utilidad biológica, el sistema ha cobrado mayor relevancia por sus aplicaciones biotecnológicas. De hecho, si bien se han reportado otras interacciones macromolécula-ligando, el sistema biotina-avidina/estreptavidina representa una de las interacciones con mayor afinidad conocidas entre proteína-ligando en la naturaleza como se muestra en la **Figura 3**. Esta alta afinidad asegura que una vez formado el complejo, éste no sea afectado por cambios en el pH, agentes caotrópicos o lavados múltiples cuando el complejo se encuentra inmovilizado.

Table 1
Hierarchy of protein–ligand affinity interactions

| Affinity interaction | Affinity constant (K_a , M^{-1}) |
|--------------------------|--|
| Avidin–biotin | 1.7×10^{15} |
| Streptavidin–biotin | 2.5×10^{13} |
| Protease–inhibitor | 10^{10} – 10^{13} |
| Receptor–ligand | 10^9 – 10^{12} |
| Antibody–antigen | 10^7 – 10^{11} |
| Transport protein–ligand | 10^6 – 10^8 |
| Lectin–sugar | 10^3 – 10^6 |
| Enzyme–substrate | 10^3 – 10^5 |

Figura 3. Jerarquía de la afinidad en las interacciones proteína-ligando. En la tabla se muestran las constantes de afinidad para distintos sistemas proteína-ligando, siendo el sistema Avidina-biotina el de mayor afinidad. *Extraído y adaptado de Wilchek & Bayer (1999) “Foreword and introduction to the book (strept)avidin-biotin system”* ⁶⁸.

Además de poseer una constante de afinidad notable, el sistema consta de otras características adicionales que lo hace un blanco muy atractivo para su aplicación biotecnológica. Entre éstas, se encuentra la especificidad de la unión, asegurando que ésta solo ocurra para la molécula de interés. A su vez, la biotina es una molécula pequeña que al ser introducida en macromoléculas biológicamente activas, no suele afectar su actividad⁶⁷. Por otro lado, la estreptavidina y avidina suelen ser modificadas químicamente para su conjugación con moléculas de alto o bajo peso molecular, así como soportes sólidos. Dado que ambas proteínas son

sumamente estables, estas modificaciones no afectan su capacidad de unir biotina⁶⁹.

A pesar de su similitud, la avidina y estreptavidina presentan diferentes cualidades que les hacen mejores o peores para su utilización según el caso. Para empezar, la avidina es una proteína tetramérica de 67 kDa, donde cada subunidad consta de 128 aminoácidos. Se caracteriza por estar glicosilada con grupos manosa y N-acetilglucosamina⁷⁰, y posee un punto isoeléctrico próximo a 10⁷¹. Estas propiedades son problemáticas para algunas aplicaciones, puesto que resultan en una alta unión inespecífica. Como alternativa, es posible usar avidina no-glicosilada, que mantiene su capacidad para unir biotina y reduce gran parte de la unión inespecífica^{72,73}. Por otro lado, la estreptavidina también es una proteína tetramérica, con un tamaño estimado de 60 kDa⁷⁴ para la proteína obtenida por precipitación con sulfato de amonio y de 75 kDa para la estreptavidina purificada por afinidad⁷⁵. Actualmente se sabe que la proteína nativa tiene una masa de 66-75 kDa, que puede ser convertida a una versión más pequeña por digestión en sus porciones amino y carboxi-terminal (ej. 60 kDa)⁶⁷. A diferencia de la avidina, no contiene carbohidratos y su punto isoeléctrico es próximo al pH neutro (5-6) donde ocurren gran parte de las reacciones de interés. Consecuentemente, la estreptavidina presenta menor inespecificidad de unión respecto a la avidina⁷⁴. Esto ha resultado en una amplia sustitución de la avidina por la estreptavidina, si bien la primera tiene una capacidad sutilmente mayor para unir biotina.

Dada la utilidad de este sistema, se han desarrollado numerosas técnicas para la biotinilación de proteínas, glúcidos, lípidos e inclusive ácidos nucleicos. Esto ha permitido implementarlo con distintos fines ya sea como sistema de detección o como sistema de afinidad. En el primer caso, la interacción (estrep)avidina-biotina permite la detección de blancos de interés de tres modos principalmente⁷⁶⁻⁷⁸. La forma más común implica marcar la estreptavidina o avidina con una molécula que permita la detección, por ejemplo una enzima, un fluoróforo, una molécula quimioluminiscente o una sonda radiactiva. Un ejemplo común de esto es el empleo de estreptavidina

conjugada a peroxidasa o fosfatasa alcalina. La biotina, por otro lado, estará conjugada a otro reactivo (proteína, anticuerpo, lectina etc.) y funcionará como puente entre la molécula blanco y el sistema de detección. Este formato es muy útil en inmunoensayos, citometría de flujo, ensayo de hibridación del ADN entre otros. Otra posibilidad es usar la estreptavidina sin marcar como nexo entre el reactivo y la molécula de detección, donde ambos están biotinilados. Esta técnica también es empleada en inmunoensayos y ensayos de hibridación del ADN, principalmente con sondas fácilmente biotinilables. Existe un tercer método que combina los dos mencionados y consiste en mezclar en forma controladas estreptavidina/avidina sin marcar y el reactivo de detección biotinilado. Dado que tanto estreptavidina como avidina unen 4 biotinas por molécula, es posible generar un polímero con sitios de unión libres. Aquí, el polímero puede ser usado como reactivo de detección y debido al aumento en el número de moléculas que generan la señal, dan lugar a ensayos de mayor sensibilidad⁶⁹.

Por otro lado, la interacción estreptavidina/avidina-biotina puede ser explotada como sistema de afinidad⁷¹. La inmovilización de estreptavidina y avidina es útil para recuperar, purificar y caracterizar moléculas de interés. Un ejemplo de esto es el aislado de una proteína blanco a partir de un cultivo celular, donde se incuba con un anticuerpo específico biotinilado y se purifica posteriormente mediante columnas o beads magnéticas con estreptavidina/avidina inmovilizada ^{71,79}.

1.4 Sistemas de biotinyilación

En vista de la utilidad del sistema estreptavidina/biotina, se han desarrollado múltiples técnicas de biotinyilación. Dado el foco de este trabajo, se comentará principalmente su empleo para la biotinyilación de proteínas.

1.4.1 Biotinyilación química

La técnica más simple y comúnmente usada es la biotinyilación química que se basa en la conjugación de la biotina a ciertos residuos aminoacídicos o grupos funcionales proteicos mediante el empleo de reactivos que favorecen la reacción. En general, los reactivos para la biotinyilación proteica están estructurados de la siguiente forma: En un extremo contienen el anillo bicíclico de la biotina y la cadena lateral del ácido pentanoico, y en el otro extremo el grupo químico reactivo que media la unión covalente de la biotina a los grupos químicos apropiados en las proteínas. Los reactivos de biotinyilación también poseen grupos espaciadores, que se encuentran entre la cadena lateral del ácido valérico y el grupo reactivo. La longitud de los espaciadores puede afectar la accesibilidad de los compuestos biotinyilados para la unión eficiente de la avidina o estreptavidina⁸⁰. En algunas aplicaciones, el empleo de largos espaciadores en el reactivo de biotinyilación resulta en un aumento de la sensibilidad del ensayo y puede incrementar 5 veces la interacción con la estreptavidina⁸¹.

Una de las técnicas más comúnmente usadas comprende la modificación de los grupos amino primarios en las proteínas con N-hidroxisuccinimidil (NHS) ésteres de biotina. Su amplio empleo responde a numerosas ventajas: Los grupos amino primarios suelen estar en los extremos N-terminales de los polipéptidos y en las cadenas laterales de los residuos lisina, que son muy abundantes en las proteínas animales y tienden a ocupar posiciones expuestas en las mismas. Como se indica en la **Figura 4** los NHS-ésteres de biotina reaccionan con la molécula blanco por ataque nucleofílico de las aminas y

resultan en la liberación del grupo NHS y la formación de un enlace amida estable con la porción que porta biotina.

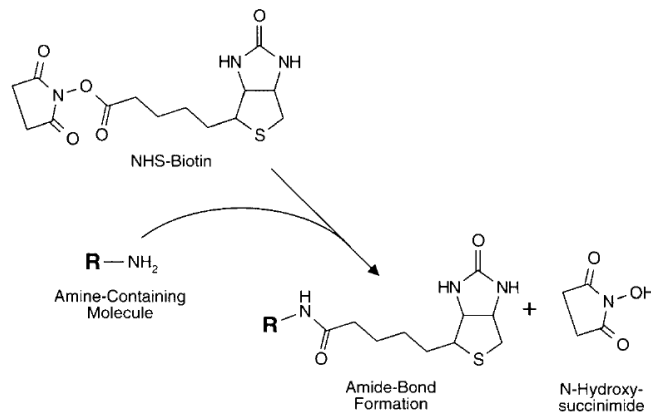


Figura 4. Biotinilación química. El grupo éster del NHS-biotina reacciona con los grupos amino de las proteínas, para dar lugar a un enlace amida con la porción que contiene biotina y a la liberación de N-hidroxisuccinamida. *Extraído y adaptado de Hermanson G. T. (2008) “Bioconjugate Techniques”⁸².*

Si bien este método de biotinilación es simple y accesible, la modificación química biotinilará cualquier residuo de lisina que encuentre accesible. Si estos residuos aminoacídicos se ubican en sitios catalíticos, o de unión a ligando, su biotinilación podría afectar la actividad de la proteína en cuestión. A su vez, dado que las lisinas son residuos muy comunes en las proteínas, puede ocurrir la sobre-biotinilación que en altos niveles también comprometería la actividad proteica^{83,84}. El empleo de bajas relaciones biotina:proteína puede mejorar este problema, pero es difícil de ajustar. Una alternativa para evitar este inconveniente es el método de biotinilación enzimática sitio específica.

1.4.2 Biotinilación enzimática

La biotinilación enzimática aprovecha la maquinaria natural de las células para la conjugación de la biotina. En el caso de *E. coli*, la transferencia está dada por una enzima citoplasmática, la biotín ligasa BirA⁸⁵(Uniprot ID P06709). El sustrato natural de esta enzima es la Biotin Carboxyl Carrier Protein (BCCP), que forma parte de la Acetil-CoA Carboxilasa como proteína carrier

para la biotina y carboxi-biotina, y media la carboxilación dependiente de ATP del acetil-CoA en el metabolismo de biosíntesis de ácido grasos⁶⁴. Este método se aplica principalmente a la biotilación de proteínas recombinantes, puesto que estas pueden fusionarse a secuencias peptídicas reconocidas por la BirA y permitir que sean, consecuentemente, biotinizadas. Si se empleara el sustrato natural, la biotilación de proteínas recombinantes requeriría la fusión de al menos 66 residuos aminoacídicos⁸⁶. Sin embargo, las tecnologías de phage-display han permitido encontrar una serie péptidos aceptores de biotina⁸⁷, dentro de los cuáles se identificó un péptido de 14 aminoácidos (GLNDIFEAQKIEWH) como sustrato mínimo de la BirA. Este péptido no sólo es pequeño y puede ser fácilmente fusionado a proteínas recombinantes, sino que también es biotilado en forma más eficiente por la BirA que la BCCP. En general, este sustrato mínimo funciona bien, pero comúnmente se emplea un péptido extendido de 15 aminoácidos (GLNDIFEAQKIEWHE) - AviTag - como se muestra en la **Figura 5**, cuya eficiencia de biotilación es un poco mejor⁸⁸.

Figure 1

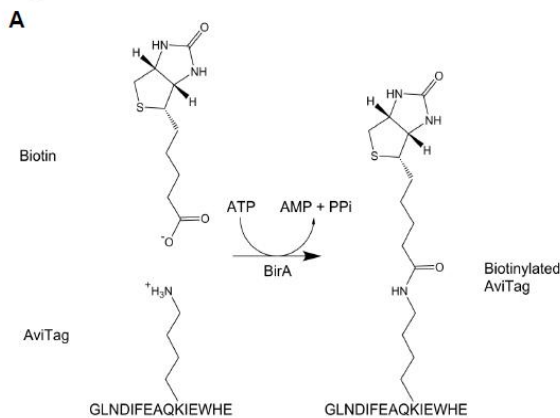


Figura 5. Biotinilación sitio-específica. La presencia del AviTag es reconocida por la enzima BirA, que cataliza la unión de la biotina al grupo amino de la lisina de este péptido y da lugar al AviTag biotilado. *Extraído y adaptado de Fairhead M., Howarth M. (2015) Site-Specific Biotinylation of Purified Proteins Using BirA⁸⁹.*

Las fusiones pueden realizarse tanto en el N-terminal como C-terminal de la proteína de interés. En el N-terminal debe incluirse un codón ATG de iniciación, que puede estar acompañado por un codón Alanina o Serina si se

expresa en *E. coli*. Estos codones confieren estabilidad a la proteólisis, en el caso que la Metionina N-terminal sea removida por la metionina aminopeptidasa^{90,91}. Por su parte, en las fusiones C-terminales, el péptido suele estar conectado por un pequeño linker Glicina-Glicina, aunque no está clara su necesidad⁹². El AviTag también puede ser incorporado en otras regiones proteicas, pero aquí los resultados son variables y dependen del plegamiento proteico que adquiera el péptido y por tanto de la capacidad de la BirA para acceder a su sustrato.

Las proteínas que contienen el AviTag pueden ser biotiniladas eficientemente *in vitro* empleando la enzima BirA de *E. coli*. Si bien la reacción puede ser realizada sobre una mezcla compleja de proteínas, se aconseja hacerlo sobre proteínas purificadas para minimizar la contaminación por proteasas y concentrar el sustrato para aumentar la eficiencia de la reacción. De todos modos, aún cuando las proteínas han sido purificadas, la presencia de proteasas puede ser un problema. De hecho, el inconveniente más común para la biotinilación *in vitro* de proteínas purificadas es la degradación del AviTag por estas enzimas durante la purificación. Como solución, se pueden usar inhibidores de proteasas o añadir más pasos de purificación⁹².

La biotinilación *in vitro* ha sido optimizada en varios puntos. Uno de éstos es el empleo del péptido LCDIFESQKIEWHSA, que sería más eficiente que el AviTag mencionado anteriormente⁸⁷. A su vez, la cantidad de enzima empleada en relación al sustrato también mejoraría la reacción. Típicamente 2.5 µg de biotina ligasa biotinarán completamente más del 95% de 10 nmol de sustrato (a una concentración 40 µM) durante 30-40 min a 30 °C⁹². A su vez, la concentración de biotina determina qué tanto tiempo le tomará a la enzima completar la biotinilación.

La gran ventaja de este sistema está dada por la biotinilación sitio-específica, que permite que la proteína recombinante permanezca intacta. A su vez, si se desea, la proteína puede ser inmovilizada en forma orientada según el lugar que ocupe el péptido aceptor, vía su interacción con estreptavidina o avidina. Esto es de particular utilidad en la biotinilación de anticuerpos o proteínas a

emplear en inmunoensayos, dado que permite que todos los parátopes o epítopes según corresponda, estén expuestos en forma homogénea para interactuar. Entre las limitaciones de este sistema se encuentra la necesidad de fusionar un péptido aceptor a la proteína de interés, lo que restringe su aplicación a la biotinylación de proteínas recombinantes.

1.4.3 Biotinylación *in vivo*

La biotinylación enzimática también puede ser realizada *in vivo* si la proteína es sobre expresada en el citoplasma de *E. coli*, ahorrando tiempo y eliminando la necesidad de adquirir la enzima BirA ya sea por purificación o comercialmente. En este caso, basta con que el sistema biológico sobre-exprese la BirA, se adicione biotina libre al medio y la proteína a biotinylar esté fusionada a un AviTag. La sobre-expresión de la enzima es muy importante para que la biotinylación sea eficiente. De hecho, en *E. coli* con niveles endógenos de *BirA*, las proteínas con AviTag expresadas en cantidades pequeñas o moderadas sólo se biotinylan con una eficiencia de 10-30%. Peor aún, cuando estas proteínas están sobre-expresadas, en algunos casos la eficiencia es de tan sólo 2-6%⁹².

En *E. coli* la enzima BirA puede ser sobre-expresada en conjunto con la proteína de fusión como un mensajero bi-cistrónico o desde su propio promotor en el mismo plásmido que la proteína de fusión^{93,94}. Otra estrategia comúnmente usada, emplea un plásmido de bajo número de copia (ej. pBirAcm de la compañía Avidity) que está diseñado para sobre-expresar la enzima BirA desde un promotor Tac fuerte. El plásmido pBirAcm es compatible con otros plásmidos con orígenes de replicación ColE1 como los vectores pBR322 y pUC, útiles para expresar las fusiones proteína-AviTag y por tanto permite la expresión de la enzima en conjunto con la proteína a biotinylar. El plásmido pBirAcm es además, inducible por IPTG, y porta resistencia a cloranfenicol, lo cual disminuye la toxicidad celular asociada a la expresión de la enzima y permite la selección de bacterias que porten el plásmido, respectivamente. Otra posibilidad es utilizar cepas de *E. coli* que

sobre-expresen la BirA, pero que en lugar de portar un plásmido adicional, posean el gen de la enzima integrado a su cromosoma. Este es el caso de cepas como las AVB100 (Avidity), donde la integración de la BirA al cromosoma permite prescindir del uso de antibióticos para mantener al gen y además cuentan con un sistema inducible por L-arabinosa que evita la expresión constitutiva de la enzima y su consecuente toxicidad celular. En general, las proteínas expresadas en el citoplasma se biotinilan muy bien *in vivo*, sin embargo, cuando su producción ocurre en el periplasma la biotinilación es pobre (<25%), pero puede llegarse al 100% con una etapa adicional de biotinilación *in vitro* incubando el lisado celular⁹⁵.

Dado que el AviTag es reconocido específicamente por la BirA, si se desea usar otros sistemas de expresión distintos de *E. coli*, las células deben portar un plásmido que codifique para esta enzima. En la actualidad, se han biotinilado proteínas *in vivo* de forma exitosa, expresadas tanto en sistemas de mamíferos⁹⁶⁻⁹⁸ como de insecto^{99,100}.

1.5 Biotinilación *in vivo* de fagos filamentosos

Hasta el momento, se han considerado las tecnologías asociadas a los bacteriófagos filamentosos y al sistema biotina-(estrept)avidina en forma separada. Considerando el posicionamiento de estas partículas virales como herramientas tecnológicas y la explotación de la biotinilación proteica como modificación que permite la detección, inmovilización y purificación de proteínas, cabe pensar que la biotinilación de bacteriófagos filamentosos abriría nuevas vías para su aplicación biotecnológica, y dicho desarrollo constituye el foco del presente trabajo.

En el pasado, se ha reportado la biotinilación de bacteriófagos. La mayor parte de estos estudios implican la biotinilación química a partir de reactivos como el N-hidroxisuccinimida éster de biotina^{101,102} y han permitido diversos avances, que van desde el estudio de la infección de bacteriófagos en *E. coli*,

hasta la captura de células bacterianas empleando beads conjugadas a estreptavidina. Si bien este método es una forma eficiente de incorporar la biotina a los fagos, la biotinilación química no es específica y como se ha mencionado previamente, cualquier lisina expuesta podrá biotinilarse. A su vez, la incorporación de biotina a algunos residuos de lisina críticos podrían interferir con la función del bacteriófago. De hecho, Sun et al.¹⁰² reportaron que la biotinilación química de los grupos aminos resultaba en la inactivación parcial del fago, probablemente por la modificación de grupos implicados en la interacción con sus células blanco.

En vista que estos virus infectan bacterias, se ha hecho posible su biotinilación *in vivo*, dentro de sus células huésped, mediante la incorporación de péptidos aceptores que sean sustratos de la BirA fusionados a alguna de sus proteínas de cápside. Curiosamente, los primeros reportes de biotinilación *in vivo* de bacteriófagos fueron los que permitieron identificar el tamaño mínimo de los péptidos necesarios para la biotinilación proteica *in vivo*^{86,87}. En estos estudios, se generaron bibliotecas de bacteriófagos que expresaban dominios aceptores de biotina mediante técnicas de phage display, y se analizó la capacidad de éstos para biotinilarse *in vivo*.

Desde estos estudios, se han reportado varios experimentos de biotinilación *in vivo* de bacteriófagos. Scholle et. al.¹⁰³ desarrollaron una biblioteca de bacteriófagos M13 que presentaba el AviTag unido a una serie de péptidos heptaméricos en la porción N-terminal de la proteína de cápside pIII, que les permitía mapear sustratos de proteasas como la neurolisina y el factor humano Xa. Los bacteriófagos se biotinilaron *in vivo* en una cepa de *E. coli* transformada con el plásmido pBirAcm y una vez producidos, se inmovilizaron en un soporte cubierto por estreptavidina. De este modo, si las proteasas reconocía el péptido heptamérico los bacteriófagos se liberaban y podía identificarse qué sustratos había reconocido la proteasa, gracias al vínculo fenotipo-genotipo que proveen estos virus. Más recientemente, Løset et al.¹⁰⁴ ampliaron los usos del phage-display y generaron bacteriófagos filamentosos bi-específicos capaces de realizar el display en forma convencional en las

proteínas pIII o pVIII, pero que a su vez estuviesen biotinilados en pVII. Para lograrlo, utilizaron un sistema de fagémido-helper, donde el helper fue modificado en su proteína pVII para expresar el péptido aceptor de biotina AviTag y el fagémido, por su parte, presentaba proteínas fusionadas en pIII o pVIII. Para la producción de fagos se utilizó una cepa de *E. coli* AVB100FmkII que sobre-expresa la BirA y posee el pili F' - que permite la infección. Durante la infección por helper, se introducen todas las proteínas del bacteriófago y la pVII que porta el AviTag es biotinilada *in vivo*. Como consecuencia, se obtiene una progenie de fagos que expresan fusiones a pIII o pVIII, codificadas por el fagémido, y biotinilados en pVII. Sumado a esto, Smelyanski y Gershoni¹⁰⁵ reportaron la biotinilación *in vivo* del bacteriófago filamentoso fd en las proteínas de cápside III, VII, VIII y IX. A diferencia de los autores anteriores, estos no emplearon el AviTag, sino otro péptido aceptor "BT" con una secuencia de 13 aminoácidos LASIFEAQKIEWR. Aquí también se utilizó una cepa de *E. coli* que portaba el plásmido pBirAcm y sobre-expresaba la BirA. El BT fue incorporado a alguna de las proteínas de cápside mencionadas anteriormente, modificando el vector de fago fth1. Este vector tiene la particularidad de expresar dos copias de pVIII, donde una puede ser modificada para fusionar péptidos a pVIII y la otra permanece en su forma wild-type, constituyendo el sistema 8+8 descrito previamente.

Considerando lo reportado hasta el momento, la biotinilación *in vivo* de bacteriófagos constituye una técnica muy útil, que no parecería comprometer la infectividad del fago ni la presentación de otras proteínas de fusión en su superficie. De este modo, la biotinilación *in vivo* ampliaría las aplicaciones biotecnológicas de los bacteriófagos como sigue: a) Posibilitando su uso como reactivos de inmunoprecipitación, donde se exprese un anticuerpo fusionado a pIII y se incorpore el AviTag en alguna de sus otras proteínas de cápside, como pVIII. b) Permitiendo usarlos como agentes de detección en inmunoensayos, donde el anticuerpo fusionado a pIII reconozca el antígeno de interés y las biotinas presentes en la cápside, sean detectadas por un conjugado de estreptavidina (ej. estreptavidina-peroxidasa). Si el número de biotinas es alto, estas podrían amplificar la señal y dar lugar a ensayos muy sensibles.

c) Utilizando la biotinyación sitio específica para marcar una punta u otra del fago e inmovilizarlos en forma orientada. Esta inmovilización orientada sería importante en inmunoensayos donde se use el bacteriófago como reactivo, o en el desarrollo de otras tecnologías como el empleo de fagos como biosensores. De hecho, Tolba et. al. generaron un sistema, donde la biotinyación de la cabeza del bacteriófago T4 permitía su inmovilización orientada y daba lugar a un sistema, por el que podían detectarse bacterias con alta sensibilidad¹⁰⁶.

Por otra parte, esta tecnología abriría nuevas puertas para la selección por bibliotecas de péptidos y anticuerpos mediante phage-display. Considerando que los bacteriófagos biotinyados pueden ser inmovilizados en superficies que contengan avidina/estreptavidina, podría hacerse lo mismo con bibliotecas enteras que se biotinyasen *in vivo*. La inmovilización de bibliotecas de anticuerpos, por ejemplo, posibilitaría el enfrentamiento con bibliotecas de péptidos y la selección de clones de esta última biblioteca, específicos para clones presentes en la biblioteca de anticuerpos. Luego, los clones identificados de la biblioteca de péptidos podrían también biotinyarse *in vivo*, inmovilizarse y enfrentarse a la biblioteca de anticuerpos por la que fueron seleccionados pero sin biotinyar. De este modo, se aislarían los clones de la biblioteca de anticuerpos que reaccionaron con mayor afinidad con los clones de la biblioteca de péptidos. Así, y mediante sucesivas rondas donde se enfrenta una biblioteca a la otra, donde una está biotinyada y la otra no, podrían aislarse pares de péptidos y anticuerpos afines el uno por el otro.

Por último, la biotinyación *in vivo* de bacteriófagos constituiría una herramienta muy útil para profundizar en cómo ocurre su biosíntesis y ensamblado viral, puesto que podría seguirse el camino desde que las proteínas son traducidas, transportadas por la membrana a ensambladas para formar la partícula viral.

1.6 Nanobodies como herramientas biotecnológicas

Los camélidos y algunos peces cartilaginosos poseen, además de los anticuerpos convencionales, anticuerpos que carecen de cadenas livianas y

del primer dominio de la cadena pesada¹⁰⁷. Como se ilustra en la **Figura 6**, el sitio de unión al antígeno está compuesto por un único dominio, que se corresponde con el N-terminal de la cadena pesada, y se denomina VHH o *nanobody*, en el caso de los anticuerpos de camélidos.

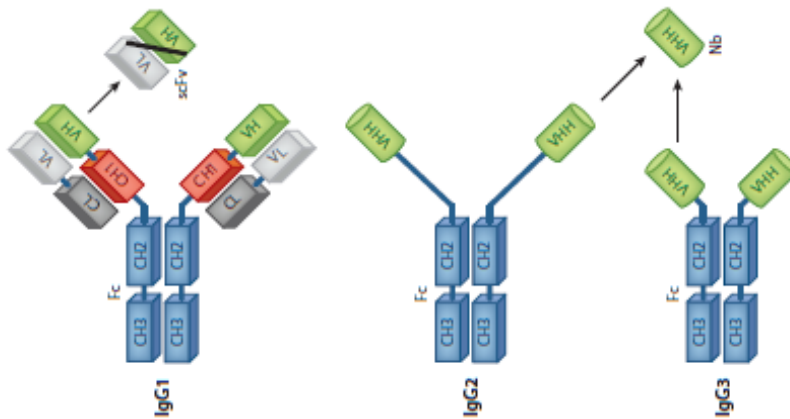


Figura 6. Representación esquemática de los anticuerpos de camélidos. Los anticuerpos convencionales (IgG1) están formados por dos cadenas livianas y dos cadenas pesadas, y el sitio de unión al antígeno está formado por los dominios VH y VL. Los anticuerpos de cadena pesada (IgG2 e IgG3) están compuestos por tan sólo dos cadenas pesadas, que carecen del dominio CH1, y constan de un dominio variable (VHH) que media el reconocimiento antigénico. *Extraído y adaptado de Muyldermans S. "Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies"* ¹⁰⁸

Los nanobodies han sido muy explotados como herramientas biotecnológicas, dado que tienen un tamaño mínimo, muy buena estabilidad, son muy solubles en soluciones acuosas y pueden reconocer epítopes únicos con afinidad subnanomolar¹⁰⁹. A su vez, su manipulación genética es muy sencilla y pueden ser producidos en bacterias, lo cual permite obtener grandes cantidades de fragmentos de anticuerpos y reducir los costos¹¹⁰. En general, la obtención de nanobodies se basa en la inmunización de camélidos con el o los antígenos de interés, seguida por el clonado del repertorio de genes variables de los linfocitos circulantes en sangre, y la selección a través de phage display¹¹¹. Mediante phage-display se fusionan los VHH provenientes de la llama inmunizada a alguna de las proteínas de cápside del bacteriófago, típicamente pIII. A partir de esto, se realizan rondas de selección contra un antígeno

particular, donde sólo los bacteriófagos que expresen nanobody con afinidad por el antígeno serán seleccionados y finalmente permite aislar nanobodies con muy buena afinidad por el antígeno de interés.

Si bien el phage-display suele emplearse como método de selección para aislar nanobodies con buena afinidad, también puede emplearse para expresar nanobodies de interés en un bacteriófago que desee utilizarse como reactivo. Este sería por ejemplo, el caso de un bacteriófago bi-específico donde el nanobody expresado en pIII permite la interacción con el antígeno blanco, y una segunda proteína del fago que se biotinile *in vivo* permite la detección o separación del complejo antígeno:bacteriófago.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

Generación de fagos filamentosos que se biotinilen *in vivo* durante su producción y que expresen a su vez, un nanobody fusionado a su proteína de cápside pIII.

2.2 Objetivos Específicos

- Construcción de un vector que permita la biotinilación *in vivo* de los bacteriófagos filamentosos en la proteína mayoritaria de cápside, pVIII, y que expresen a su vez, un nanobody específico para microcistina fusionado a la proteína pIII.
- Generar líneas celulares que permitan la producción de bacteriófagos que se biotinilen durante su producción.
- Optimizar las condiciones para la biotinilación *in vivo* de los bacteriófagos filamentosos.
- Evaluar el nivel de biotinilación *in vivo* de los bacteriófagos
- Comparar el nivel de biotinilación *in vivo* de los bacteriófagos con la biotinilación *in vitro*.
- Emplear el bacteriófago biotinilado como reactivo en un inmunoensayo competitivo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Buffers y soluciones

- Buffer fosfato salino (PBS) 10X: 2 g KCl, 11 g Na₂HPO₄ y 80 g de NaCl en H₂O destilada c.s.p. 1 litro. pH 7,5.
- Buffer Tris-Acetato (TAE) 50X: 242 g Tris Base, 57,1 mL ácido acético glacial y 100 mL EDTA 0.5 M en agua MilliQ c.s.p. 1 litro, pH 8,0
- TBS 10X: 60,6 g Tris y 87,6 g NaCl en agua milliQ c.s.p. 1 litro, pH 7,6.
- Buffer de carga 6X para geles de agarosa: 0,7 mL TAE 50X, 1,5 mL glicerol y 12,5 mg azul de bromofenol en agua milliQ c.s.p. 5 mL
- Buffer de corrida 10X para SDS-PAGE: 30,2 g Tris base, 144 g glicina (calidad electroforesis) y 10 g SDS en agua destilada c.s.p. 1 litro.
- Buffer de carga 6x para SDS-PAGE: 0,35 M Tris-Cl, 10% SDS, 30% v/v glicerol, 0,175 mM azul de bromofenol y 0,1 M DTT.
- Buffer de transferencia para western blot: 2,9g Tris Base, 1,4g glicina, 0,187g SDS y 100 mL metanol en agua destilada c.s.p. 500 mL.
- Solución colorante para la tinción con azul de Coomassie: 0,1% Coomassie blue, 10% acético y 40% metanol.
- Solución decolorante para la tinción con azul de Coomassie: 7,5% v/v ácido acético y 5% v/v metanol.

- Sustrato DAB para la enzima peroxidasa (revelado western blot): 6 mg DAB (*Sigma*) en 9 mL Buffer Tris-HCl 0,01 M pH 7,6. Añadir 1 mL de NiCl₂ 0,3% y 10 µL de H₂O₂ al 30%.
- Sustrato TMB para la enzima peroxidasa (revelado ELISA): 200 µL de solución 6 mg/mL de TMB (*Sigma*) en DMSO, 8,67 µL de H₂O₂ 6% y 12 mL de buffer acetato 0,1 M pH 5,5.
- PEG-NaCl para la precipitación de fagos. PEG 8000 al 20% con NaCl 2,5 M.

3.2 Medios de cultivo

- Luria Bertani Broth (LB, *Sigma*).
- Luria Bertani Agar (LB Agar, *Sigma*)
- Medio Super Broth (SB): 30 g triptona (*Sigma*), 20 g extracto de levadura (*Sigma*) 10 g MOPS (*Sigma*) en agua MilliQ c.s.p. 1 L, pH 7,0.
- Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC): 20 g Triptona, 5 g extracto de levadura, 0,5 g NaCl, en agua MilliQ c.s.p. 1L, pH 7,0. Luego de autoclavar, se agregan 10 mL MgCl₂ 1M y 20 mL de glucosa 1 M previamente filtrados.

3.3 Procedimientos generales

3.3.1. Titulación de fagos por placa

Se crecieron células ER2738 en medio SB a 37°C 250 rpm hasta una Densidad óptica (DO) 600 nm de 0,5 UA. Se tomaron alícuotas de 100 µL de estas células y se las incubó con 10 µL de diluciones seriadas de los fagos a titular a 37°C

durante 30 minutos. Luego se plaqueó en LB Agar con ampicilina (100 µg/mL) para la titulación del fagémido o con kanamicina (50 µg/mL) para la titulación de fago helper. Se incubó las placas a 37°C overnight y al día siguiente se contaron las colonias obtenidas y se realizó el cálculo correspondiente tomando en cuenta las diluciones realizadas.

3.3.2 Titulación de fagos por espectrofotometría

Se precipitaron los fagos con 0,2 volúmenes de PEG 20%-NaCl 2,5 M durante 1 hora en agua-hielo, y tras su centrifugación (20018g, 20 minutos a 4°C) el *pellet* de partículas virales se resuspendió en TBS 1X, concentrándolo 50 veces en relación al volumen de partida. La concentración de la suspensión de fagos se determinó por espectrofotometría mediante la fórmula establecida por George P. Smith:

$$\text{virions/ml} = \frac{(A_{269} - A_{320}) \cdot 6 \times 10^{16}}{\text{number of bases/virion}}$$

Para esto se empleó el equipo *Nanodrop 1000 Spectrophotometer* (*ThermoFisher Scientific*).

3.3.3 Análisis de bacteriófagos por ELISA

Se sensibilizaron pocillos de placas de ELISA (Greiner) con 100 µL de BSA-microcistina 0,5 µg/mL en PBS 1X y se incubó a 4° overnight (ON). En paralelo se sensibilizaron otros pocillos con un anticuerpo anti-M13 policlonal a 5 µg/mL en PBS 1X. Al día siguiente se lavó 5 veces con PBS-Tween 0,05% y se bloqueó con PBS-BSA 1% durante una hora a temperatura ambiente (TA). Se lavó 5 veces con PBS-Tween 0,05 %, se sembraron 100 µL de las muestras de bacteriófagos diluidas en PBS-Tween 0,05% o PBS-Tween 0,05% solo (Blanco) y se incubó durante 1 hora a TA. Se lavó nuevamente con PBS-Tween 0,05% y para la detección se empleó un anticuerpo-α-M13 conjugado a peroxidasa (, *GE Healthcare*) como control de la producción de fagos, o con estreptavidina conjugada a peroxidasa (*Pierce*) para verificar que estuviesen biotinilados. En

ambos casos se sembraron 100 μ L en una dilución 1/5000 del stock y se incubó durante una hora TA. Se lavó nuevamente con PBS-Tween 0,05% y se agregaron 100 μ L del sustrato TMB para la enzima peroxidasa y se dejó transcurrir la reacción durante 15 minutos. La reacción se cortó con 50 μ L de H₂SO₄ 2N. La absorbancia de las reacciones colorimétricas se midió a 450 nm en el equipo FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Germany).

3.3.4 Titulación de fagos por qPCR

La reacción de qPCR se realizó empleando 0,4 μ M del cebador directo 5' GTTACTCGCGGCCAGGCGGCCATG 3' y 0,4 μ M del cebador reverso 5' CCACGATTCTGGCCGGCCTGGCCTGAG 3', 1 μ L de molde, 10 μ L del Kit Luna qPCR Master Mix (NEB) y H₂O para completar 20 μ L finales. Las muestras se corrieron por duplicado en el equipo Corbett Rotor-Gene 6000 (QIAGEN) en las condiciones resumidas en la **Tabla 1**. Los resultados se analizaron posteriormente con el programa Rotor-Gene Q series Software.

Tabla 1. Condiciones empleadas para la qPCR de bacteriófagos

| 1 ciclo | | 40 ciclos | | |
|-------------|---------------------------|-------------------|-------------|-------------|
| Etapa | Desnaturalización inicial | Desnaturalización | Hibridación | Extensión |
| Temperatura | 95 °C | 95 °C | 60 °C | 72 °C |
| Tiempo | 5 minutos | 15 segundos | 30 segundos | 60 segundos |

3.4 Construcción del vector

Se partió del vector fagémido - pCOMb3XSS-H11 - que permite la expresión de un nanobody (H11), específico para la microcistina-LR, fusionado a la proteína pIII del bacteriófago. En paralelo, se diseñó un casete de expresión que codifica para la proteína pVIII fusionada a un péptido aceptor de biotina

(AviTag). Este casete fue sintetizado por la empresa General Biosystems y provisto clonado en el vector pUC57. El pCOMb3XSS y el vector conteniendo al casete se digirieron con la enzima de restricción *EcoRI* (*Thermo*) y fueron visualizados y purificados a partir de un gel de agarosa al 1%, empleando el kit comercial QIAquick Gel Extraction Purification (*Qiagen*) según el protocolo establecido. El vector pCOMb3XSS-H11 cortado con *EcoRI* se desfosforiló con la enzima SAP (*Thermo*) y se procedió a ligar el cassette.

El casete se ligó con el vector digerido empleando la T4 ADN Ligasa (*Thermo*) en una relación molar 5:1 inserto:vector, de manera que se sometieron 100 ng de vector y 39,5 ng de inserto a 1 U de enzima durante 4 horas a 22 °C en termociclador (*BIORAD*), seguido por 10 minutos a 80 °C para inactivar la enzima. En paralelo se realizaron controles de re-ligación (misma preparación en ausencia de inserto) y de vector (misma preparación en ausencia de inserto y ligasa). El producto de ligación o los controles se electroporaron en células *E. coli* DH5α electrocompetentes, utilizando el equipo Micro Pulser™ (*BIORAD*) y cubetas de electroporación de 1 mm (*Sigma-Aldrich*). Las células se incubaron durante 1 hora en medio de recuperación SOC a 37 °C con agitación, tras lo cual se sembraron diluciones seriadas en placas de LB Agar-Ampicilina que permanecieron a 37 °C ON. Se seleccionaron colonias aisladas de la reacción de ligación, se extrajo el ADN plasmídico mediante el kit comercial QIAprep spin miniprep (*Qiagen*) y se obtuvieron las secuencias a través del servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo. Al vector obtenido se le denominó pINQ-8b3.

3.5 Producción de fagos biotinilados en células ER2738

Se co-transformaron células *E. coli* ER2738 (*Lucigen*) con clones positivos para el pINQ8b3-H11 ó con el pCOMb3XSS-H11 y el vector pCY-216. Se incubaron las bacterias en SOC durante 1 hora a 37 °C a 250 rpm y se plaquearon en LB Agar-ampicilina (100 µg/mL) para su selección. Como control, también se plaquearon células que pasaron por el mismo proceso pero que fueron electroporadas sin plásmidos. Al día siguiente se crecieron clones individuales

en medio SB, a 37°C 250 rpm, en presencia de ampicilina (100 µg/mL), cloranfenicol (35 µg/mL) y tetraciclina (30 µg/mL) overnight. La ampicilina selecciona la incorporación de pINQ8b3-H11, el cloranfenicol de pcy-216 y la tetraciclina al plásmido F', que confiere susceptibilidad a la infección por bacteriófagos. En paralelo, los clones aislados se replicaron en una placa de LB Agar-Ampicilina.

A partir del cultivo overnight se realizó una dilución 1/100 en medio SB fresco con biotina en exceso (100 µM), tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina y arabinosa 0,04%. El cultivo se creció a 37 °C 250 rpm, hasta una DO600nm=0,5, y se agregaron 10-20 µL de fago helper M13K07 (1x10¹² pfu/mL; *Pharmacia Biotec*) y se dejó reposar 30 minutos a 37°C sin agitación. Se agregó kanamicina (40 µg/mL) para seleccionar las células infectadas por fago helper e IPTG (1mM) para inducir la expresión de las proteínas del fagémido y se dejó crecer los cultivos ON. Al día siguiente, se centrifugaron los cultivos a 20000 g y en el sobrenadante se obtuvieron los fagos. Los sobrenadantes obtenidos se evaluaron por ELISA (sección 3.3.3).

3.6 Producción de pVIII-AviTag en células AVB100

Se electroporaron células AVB100 (*Avidity*) electrocompetentes con el plásmido pINQ8b3-H11, siguiendo el protocolo de electroporación mencionado para las células DH5α (Sección 3.4). Se creció una colonia aislada de AVB100 - pINQ8b3-H11 en medio SB con ampicilina (100 µg/mL) y estreptomina (100 µg/mL) a 37°C y 250 rpm ON. A partir del cultivo overnight se realizó una dilución 1/100 y se creció en 500 mL de SB fresco con ampicilina (100 µg/mL), arabinosa 0.4% y biotina en exceso (100 µM) a 37°C 250 rpm, hasta llegar a una DO600nm=0.5. En este punto se indujo la expresión proteica con IPTG (1 mM) y se dejó crecer durante 4 horas. En paralelo, se realizó el mismo procedimiento para las células AVB100 sin vector. Se centrifugaron las células a 5000g durante 10 minutos y se descartó el sobrenadante. El pellet se trató con el reactivo B-PER (*Thermo*) en una relación de 4 mL/g pellet y una vez

obtenida una solución homogénea, se centrifugó a 15000g y se conservó la fracción soluble.

3.6.1 Visualización de pVIII biotinilada mediante western blot

Se sembraron 30 μ L sin diluir y de la dilución 1/10 de la fracción soluble de AVB100 - pINQ8b3-H11 y de AVB100 sin electroporar en un gel SDS-PAGE. Se sembró como control positivo 1 μ g, 100 ng y 10 ng del nanobody H11 biotinilado y se añadió un marcador de peso molecular pre-teñido (*Fermentas*). Las muestras se hirvieron durante 5 minutos y se corrieron a 100 V en un gel SDS-PAGE con gel de resolución 15% y stacking 5%. Finalizada la electroforesis, se incubó el gel y una membrana de nitrocelulosa durante 5 minutos en buffer de transferencia, y se dejó transferir durante 40 minutos a 14 V. La membrana se bloqueó con PBS-leche 5% a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, se realizaron 5 lavados de 1 minuto con PBS-Tween 0,05% y se incubó con estreptavidina conjugada a peroxidasa (1/5000) en PBS-Tween 0,05% durante 1 hora. Se realizaron 5 lavados de 1 minuto con PBS-Tween 0.05% y se incubó con el sustrato DAB hasta que aparecieron bandas específicas. Luego, se cortó la reacción lavando con abundante agua destilada.

3.6.2 Visualización de las proteínas del fago mediante western blot

Se corrió un gel SDS-PAGE donde se sembró: el marcador de peso molecular pre-teñido, 30 μ L sin diluir, de la dilución 1/20 ó 1/400 de una preparación de bacteriófagos M13KO7 como control positivo, y 30 μ L de la fracción soluble de las células AVB100-pINQ8b3-H11 y AVB100 sin electroporar. El procedimiento para la electroforesis SDS-PAGE y el western blot fue prácticamente el mismo al descrito en la sección anterior, difiriendo únicamente en la detección. En este caso se empleó como anticuerpo primario un α -M13 policlonal de conejo 1/5000 y se lo incubó durante 1 hora a TA. Se realizaron 5 lavados de 1 minuto con PBS-Tween 0,05% y se agregó un anticuerpo- α -conejo-peroxidasa 1/5000 y se lo incubó durante 1 hora a TA. Se lavó 5 veces y se procedió al revelado con el sustrato DAB.

3.7 Generación de la cepa AVB100F'

Se crecieron las cepas ER2738 y AVB100 en forma separada, en LB a 37°C con agitación a 250 rpm sin antibiótico. Cuando estas alcanzaron una DO600 nm de 0,4-0,6, se mezclaron 100 µL del cultivo de cada cepa y se incubó durante 2 horas a 37°C sin agitación. En paralelo, se realizó lo mismo para las cepas parentales solas como control. La mezcla se plaqueó en LB agar-tetraciclina (30 µg/mL)-estreptomina (100 µg/mL) y se realizó lo mismo para los controles de las cepas parentales. La validación de los clones experimentales se verificó por la ausencia de crecimiento en los controles parentales. A partir de la nueva cepa generada - AVB100F' - se produjeron células electrocompetentes según el protocolo establecido por el Laboratorio Untergrasser¹¹².

3.8 Biotinilación de bacteriófagos en AVB100F'

Se electroporaron células AVB100F' electro-competentes con el plásmido pINQ8b3-H11 ó con el pCOMb-H11 y se plaqueó LB agar- ampicilina-tetraciclina.

Se crecieron clones aislados en SB-ampicilina-tetraciclina-estreptomina ON. Al día siguiente, se realizó una dilución 1/100 del cultivo y se lo creció en 10 mL de SB fresco a 37°C 250 rpm con biotina en exceso (100 µM), ampicilina, tetraciclina y arabinosa 0,4%. Los cultivos se crecieron hasta alcanzar una DO600nm=0,5 donde se hizo la infección con 10-20 µL de fago helper M13K07 y se los dejó 30 minutos a 37°C sin agitación. Luego se agregó kanamicina (40 µg/mL) e IPTG (1 mM) y se dejó crecer ON. Los cultivos se centrifugaron a 20000 g y en el sobrenadante se obtuvieron los fagos. Los sobrenadantes de fagos se evaluaron por ELISA acorde a lo indicado en la sección 3.3.3.

3.9 ELISA para la detección de nanobody soluble

Se sensibilizaron pocillos de una placa de ELISA (Greiner) a 4° overnight (ON) con 100 µL de BSA-microcistina 0,5 µg/mL en PBS 1X. Al día siguiente se lavó 5 veces con PBS-Tween 0,05% y se bloqueó con PBS-BSA 1% durante una hora a TA. Se lavó 5 veces con PBS-Tween 0,05 %, se sembraron 100 µL de las muestras diluidas en PBS-Tween 0,05% y se incubó durante 1 hora a TA. Se lavó nuevamente con PBS-Tween 0,05% y se sembraron 100 µL de un anticuerpo-α-HA conjugado a peroxidasa (1/3000). Se incubó durante una hora a TA. Se lavó nuevamente con PBS-Tween 0,05%, se agregaron 100 µL del sustrato TMB y se dejó transcurrir la reacción durante 15 minutos. La reacción se cortó con 50 µL de H₂SO₄ 2N. La absorbancia de las reacciones colorimétricas se midió a 450 nm en el equipo FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Germany).

4.0 Optimización de condiciones para la obtención de bacteriófagos biotinilados

4.0.1 Optimización del tiempo de inducción de la enzima BirA.

Se crecieron los fagos en AVB100F' como se señaló anteriormente (sección 3.8), pero se varió el momento en que se adicionó la arabinosa. En el primer caso, la arabinosa se adicionó en forma temprana, al mismo tiempo que la ampicilina y tetraciclina en el SB fresco. En el segundo caso, se realizó una co-inducción: la arabinosa (0.4%) se agregó junto con el IPTG (1 mM) luego de la infección por fago helper.

4.0.2 Inducción con distintas concentraciones de arabinosa.

Se crecieron los fagos en AVB100F' como se señaló en 2.8, pero se varió la concentración de arabinosa. Se empleó una concentración final de 0%, 0,04%, 0,1%, 0,4% y 1% de concentración final de arabinosa.

4.0.3 Inducción pre y post-infección con el fago helper.

Se crecieron los fagos en AVB100F' como se mencionó en la sección 3.8, pero se varió el momento de añadir IPTG. En el primer caso, las condiciones se mantuvieron iguales, mientras que en el segundo caso se añadió el IPTG cuando las células llegaron a una $DO_{600nm}=0.5$ y luego de 1 hora se infectó con el fago helper.

4.0.4 Producción de bacteriófagos a distintas temperaturas.

Se crecieron los fagos en AVB100F' como se señaló en 2.8, pero luego de inducir las proteínas del fagémido, uno se dejó crecer a 30°C overnight y otro a 37°C.

4.0.5 Crecimiento en presencia de glucosa.

Los bacteriófagos se crecieron como se indicó previamente (sección 3.8) pero en distintas condiciones según la presencia de glucosa: **A.** No se adicionó glucosa en ningún momento. **B.** Se adicionó glucosa al 4% de concentración final en el cultivo de partida overnight. **C.** Se adicionó glucosa al 4% e concentración final en el cultivo de partida overnight y en el cultivo diluido a partir de éste. Las células se dejaron crecer hasta una $DO_{600nm}=0,5$, se infectaron con fago helper y previo a realizar la inducción con IPTG se centrifugaron a 5000 g y se re-suspendieron en SB fresco sin glucosa, pero con ampicilina-tetraciclina-kanamicina, y se las dejó crecer overnight.

4.1 Clonado del nanobody A2 en el vector pINQ8b3

Se digirió el plásmido pINQ8b3 con la enzima de restricción *SfiI* (*Thermo*) y se purificó el vector cortado a partir de un gel de agarosa 1% (GeneJET Gel Extraction Kit, *QIAGEN*). Dado que ya se contaba con el ADN del nanobody A2 purificado y cortado por *SfiI*, se procedió a realizar la ligación con la enzima *T4 DNA Ligasa* (*Thermo*) acorde a lo descrito en la sección 3.4. La incorporación del inserto se verificó por Colony PCR para 10 colonias

aisladas. Cada colonia se levantó de la placa y se resuspendió en 10 μ L de H₂O milliQ, se la repicó en una placa de LB Agar-Ampicilina y se la utilizó como molde para la PCR. La reacción de PCR se realizó utilizando 0,8 μ M del cebador directo: 5'-AATGTTGCGGGCTGGTACCGTC-3', 0,8 μ M del cebador reverso: 5'-AATTCATATGGTTTACCAGCGCCAAAGAC-3', 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 2,5 U de la enzima *Taq ADN polimerasa (Thermo)* y Buffer Taq 1X en un volumen final de 20 μ L. El cebador directo fue específico para el nanobody A2 y el cebador reverso para el vector. La reacción de PCR se desarrolló en termociclador (BIORAD) bajo el siguiente programa: 94°C durante 1 minuto, 30 segundos a 94°C, 60°C y 72°C en un total de 30 ciclos y para finalizar 72°C durante 10 minutos.

4.2 Cambio de un codón amber por un codón codificante para ácido glutámico en el vector pINQ8b3, para que el fago exprese el nanobody fusionado a la proteína pIII

Se realizó una mutagénesis dirigida del codón *amber* para que en lugar de detenerse la traducción, se expresara el codón para el ácido glutámico (Figura 7). Se preparó una miniprep (*GeneJET Plasmid Miniprep Kit, Thermo*) a partir de células DH5 α que fueron electroporadas con el vector de interés. Luego se realizó una PCR con la enzima *Pfu (Thermo)* sobre el plásmido entero con las siguientes condiciones: 95°C 3 minutos, seguidos por 20 ciclos de 30 segundos 95°C, 30 segundos 57°C, 12 minutos 72 °C, y un paso final de 10 minutos a 72°C. Se empleó 1 ng de molde, 0,2 mM de dNTPs, 0,8 μ M de cebadores y buffer *Pfu 1X* con MgSO₄ en un volumen final de 20 μ L. Los cebadores empleados fueron los siguientes:

| | | | | |
|---------|----------|----|-----------------------------|----|
| Cebador | Directo: | 5' | GGACTACGCTTCTCAGGAGGGTGGTGG | 3' |
| Cebador | Reverso: | 5' | CCACCACCCTCCTGAGAAGCGTAGTCC | 3' |

Una vez finalizada la PCR se trató con 20 U de la enzima *DpnI* para digerir el plásmido parental. Se dejó transcurrir la reacción durante 2 horas a 37°C, seguida por 20 minutos a 80°C para inactivar la enzima. En paralelo, se

realizó un control negativo sin cebadores que pasó por los mismos ciclos de PCR y la digestión por *DpnI*. El producto de PCR y el control negativo se electroporaron en células AVB100F' y se plaquearon en LB agar-ampicilina-tetraciclina. El vector obtenido por mutagénesis dirigida se denominó pINQ8b3gxs-H11 ó pINQ8b3gxs-A2 según el nanobody presente en el vector de partida.

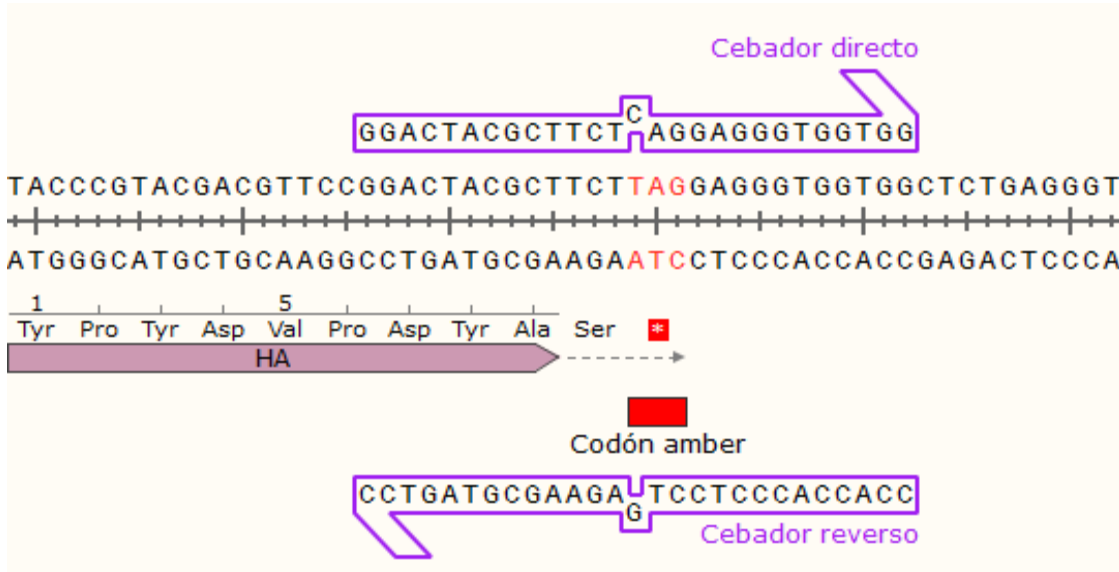


Figura 7. Cebadores para la PCR de mutagénesis dirigida. Se visualiza una porción de la secuencia de ADN del pINQ8b3-H11, donde a la porción antigénica HA sigue el codón *amber*, marcado en rojo. En violeta se indican los cebadores que incluyen una mutación puntual, que cambia el codón *amber* por uno codificante para el ácido glutámico.

La eficacia de esta corrección se evaluó para colonias aisladas del pINQ8b3gxs-A2 y pINQ8b3gxs-H11. Se las creció para producir bacteriófago como se indicó en la sección 3.8 y se analizaron los sobrenadantes de bacteriófagos por ELISA (Sección 3.3.3) mediante captura con BSA-microcistina y detección con estreptavidina-peroxidasa ó un anticuerpo-anti-M13 monoclonal.

4.3 Producción de stock concentrado de fagos biotinilados

Se creció un cultivo overnight de clones AVB100F' - pINQ8b3-H11, en 10 mL de medio SB en presencia de ampicilina, estreptomycin y tetraciclina. Se

realizó una dilución 1:100 en 500 mL de SB fresco con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), tetraciclina (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$), arabinosa (0.4%) y biotina (100 μM). Se dejó crecer el cultivo hasta una $\text{DO}_{600\text{nm}}=0.5$ y se le infectó con 10-20 μL de fago helper M13KO7 durante 30 minutos a 37°C sin agitación. Luego, se agregó IPTG (1mM) y se dejó crecer el cultivo overnight. Al día siguiente, se centrifugó el cultivo a 5000g, se descartó el pellet y se conservó el sobrenadante donde se encontraba la fracción de fagos. El sobrenadante se precipitó durante 1 hora en agua hielo con 0,2 volúmenes de PEG-NaCl y se centrifugó a 12000 g. El pellet se resuspendió en 10 mL de TBS 1X y se volvió a precipitar 1 hora en agua hielo con 0,2 volúmenes de PEG-NaCl y se centrifugó a 12000g. El pellet se resuspendió en 5 mL de TBS 1X, se filtró por 0,22 μM y se agregó trehalosa (0,33 M), azida de sodio (0,01%) e inhibidores de proteasas (Roche).

4.4 Biotinilación *in vitro* de bacteriófagos

4.4.1 Producción del extracto crudo BL21-pBir

Se crecieron bacterias BL21-pBIR en medio LB con cloranfenicol (35 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 37° 250 rpm overnight. Al día siguiente se realizó una dilución 1/100 y se las volvió a crecer en medio LB-cloranfenicol (35 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 37° 250 rpm hasta llegar a una $\text{DO}_{600\text{nm}}=0,5$. Llegada esta DO se agregó IPTG a una concentración final 1mM para inducir la expresión de la enzima BirA y se dejó crecer durante 4 horas. Las células se centrifugaron a 5000g durante 20 minutos y el pellet se resuspendió en un volumen de PBS 10 veces menor al del cultivo inicial. Se lisó las células mediante 2 ciclos de congelado-descongelado y posterior sonicación. Se centrifugó nuevamente a 5000g durante 20 minutos y se conservó la fracción soluble. Esta fracción se almacenó a 4°C y se le adicionó inhibidor de proteasas (Roche).

4.4.2. Evaluación de la eficiencia del extracto crudo de BL21-pBir

Se crecieron bacterias BL21 transformadas con el vector pINQ-BtH6-E11 en medio LB-Kanamicina (50 µg/mL) para seleccionar el vector, a 37° 250 rpm ON. Al día siguiente, se realizó una dilución 1/100 del cultivo ON y se creció nuevamente en LB-Kanamicina a 37° 250 rpm hasta llegar a una DO600nm=0,5, y luego se procedió de igual modo a lo descrito en la sección anterior.

El extracto crudo de BL21- pINQ-BtH6-E11 se incubó en una relación 1:1, 2:1 y 4:1 con el extracto crudo BL21-pBir en presencia de biotina (100 µM) durante 1 hora a 37°C. A su vez, como control negativo se incubó el extracto BL21-E11 en una relación 1:1 con PBS-Biotina (100 µM). La eficiencia de la biotinilación se evaluó vía ELISA, empleando Hemoglobina (1 µg/mL) para la captura y estreptavidina-peroxidasa (1/5000) para la detección. El resto de las etapas transcurrieron acorde a lo indicado en la sección 3.3.3.

4.4.3 Biotinilación in vitro de bacteriófagos expresando pVIII-AviTag

Se incubó un extracto de BL21-pBir con una preparación de fagos que expresaban pVIII-AviTag sin biotinar en una relación 1:1 y en presencia de biotina (100 µM) a 37°C ON. Los fagos se produjeron acorde a lo descrito en la sección 3.8 pero no se adicionó arabinosa ni biotina en ninguna parte del proceso. Como control se incubó la preparación de fagos con PBS-Biotina sin extracto enzimático.

4.4.4 Post-biotinilación in vitro de fagos biotinizados in vivo previamente.

Se incubó una preparación de bacteriófagos biotinizados *in vivo* con un extracto crudo de BL21-pBir en una relación 1:1 a 37°C overnight y en presencia de biotina (100 µM). Esto mismo se realizó para una preparación de bacteriófagos expresando la pVIII-AviTag que no fueron biotinizados *in vivo* (control positivo) y a su vez, esta preparación de bacteriófagos se incubó con PBS1X-biotina (100 µM) (control negativo). Las preparaciones se evaluaron por duplicado mediante ensayo ELISA, donde el procedimiento coincidió con lo descrito en la sección 3.3.3 y se sensibilizó con BSA-microcistina (0,5 µg/mL)

y se reveló con estreptavidina-peroxidasa (1/5000). A modo de comparación, se midió también por ELISA la preparación de fago biotinilado *in vivo* sin post-biotinilación.

4.5 Estimación de la cantidad de biotinas en los bacteriófagos biotinilados *in vivo*.

4.5.1 Estimación de la cantidad de biotinas en los bacteriófagos biotinilados *in vivo* mediante western blot.

Se corrió un gel de poliacrilamida, con gel de resolución 15% y stacking 5% en condiciones desnaturalizantes y reductoras. Se sembró un marcador de peso pre-teñido (*Thermo*), y 30 μ L de la preparación de bacteriófagos pINQ8b3-H11 no diluidas, o diluidas 1/10. A su vez, se sembraron distintas concentraciones del nanobody H11 biotinilado para una concentración final de 1 μ g, 0,5 μ g, 0,1 μ g, 0,05 μ g y 0,01 μ g con el objetivo de construir una curva de calibración de la señal obtenida por western blot en función de la cantidad de biotinas. Las muestras se incubaron previamente con buffer de muestra 5 minutos a 100°C y el gel se corrió a 100 V. Se incubó el gel y la membrana en buffer de transferencia durante 5 minutos y luego se realizó la transferencia durante 45 minutos a 14 V, en presencia del mismo buffer. Finalizada la transferencia se bloqueó con una solución PBS1X-Leche 5% overnight a 4°C. Luego se realizaron 5 lavados de 1 minuto con PBS-Tween 0,05% y se incubó con estreptavidina-peroxidasa (*Pierce*) 1/5000 durante 1 hora con agitación a TA. Se realizaron nuevamente 5 lavados con PBS-Tween 0,05% y se agregó el sustrato DAB. Se incubó con agitación hasta que aparecieron las bandas específicas y se cortó la reacción lavando con abundante agua destilada.

4.5.2 Estimación de la cantidad de biotinas en los bacteriófagos biotinilados *in vivo* mediante ELISA

Los pocillos de una placa de ELISA (*Greiner*) se sensibilizaron con 100 μ L de PBS-BSA-microcistina (0,5 μ g/mL) a 4°C durante toda la noche. Luego, se lavó 5 veces con PBS-Tween 0,05% y se bloqueó con 250 μ L de PBS-BSA 1% durante

una hora a temperatura ambiente. Finalizada la etapa de bloqueo se lavó nuevamente con PBS-Tween 0,05% y se sembraron 100 μL /pocillo de las muestras.

Para determinar la cantidad de biotina, se construyó una curva de calibración empleando el nanobody H11 biotinilado. Se partió de una dilución de nanobody 0,08 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS-Tween 0,05% y se realizaron diluciones al medio por duplicado. Sabiendo que el nanobody H11 biotinilado posee una única biotina por nanobody y su concentración, se puede determinar una relación entre la señal por ELISA y la cantidad de moléculas de biotina. Por otro lado, se partió de diluciones al medio de las preparaciones de fago pINQ8b3-A2 y pINQ8b3-H11 y a partir de estas se realizaron diluciones al medio por duplicado en PBS-Tween 0,05%. Las muestras se incubaron durante 1 hora a TA. Luego, se lavó con PBS-Tween 0,05% y se agregaron 100 μL /pocillo de un conjugado estreptavidina-peroxidasa (Pierce) 1/5000, que se incubó también 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se volvió a lavar con PBS-Tween 0,05% y se agregaron 100 μL /pocillo de sustrato TMB, que se incubó durante 10 minutos con agitación en la oscuridad y a TA.

A su vez, para poder evaluar la cantidad de biotinas por fago debió determinarse la cantidad de fagos por pocillo. En paralelo, se sembraron las mismas diluciones de fago pINQ8b3-A2/H11 empleadas anteriormente y se las hizo pasar por casi todos los pasos descritos anteriormente para el ELISA. Sin embargo, en lugar de agregar el conjugado estreptavidina-peroxidasa sólo se agregó PBS-Tween 0,05% y no se adicionó la solución de sustrato TMB. En cambio, en la etapa de revelado se procedió a eluir los fagos adsorbidos a la placa incubándolos durante 15 minutos con 100 μL /pocillo de buffer glicina 0,2 M pH=2,2 y luego neutralizando mediante la adición de 5,8 μL de Tris-Base 2M, acorde a lo descrito por Kim, HJet. al¹¹³. Los fagos eluidos se titularon por qPCR (sección 3.3.4), y la cantidad de biotinas por fago se determinó como el $(n^\circ \text{ biotinas totales/pocillo}) / (n^\circ \text{ fagos totales/pocillo})$. En la **Figura 8** se ilustra brevemente cómo se llevó a cabo este procedimiento.

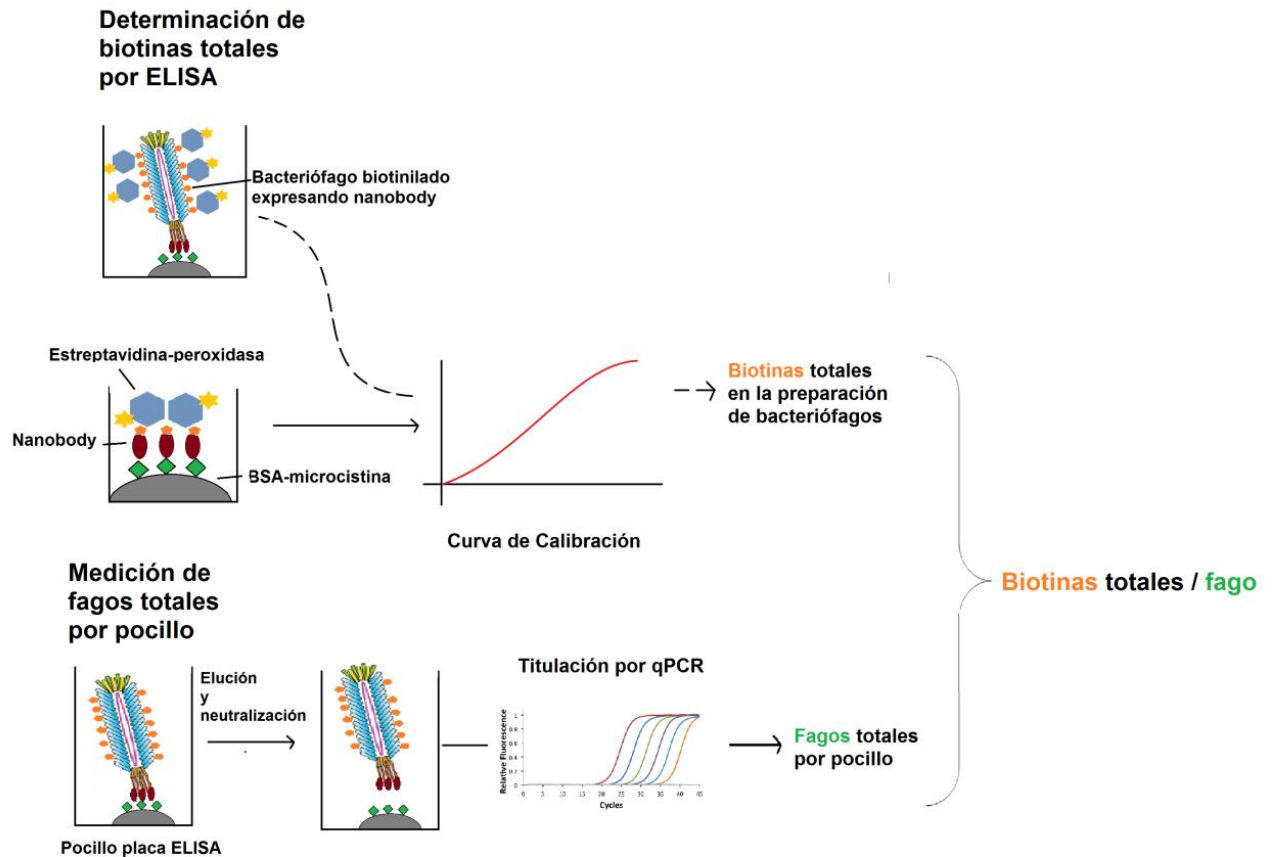


Figura 8. Representación esquemática del procedimiento seguido para determina el número de biotinas por fago.

4.6 Captura de bacteriófagos biotinilados con beads magnéticas conjugadas a estreptavidina

Se sometió a una preparación de bacteriófagos pINQ8b3-H11 biotinilados a diálisis para remover cualquier remanente de biotina. Para esto se incubó 1 mL del stock de fagos en una membrana de celulosa (cut-off=12000 Da) (*Sigma*) en 500 mL de TBS 1X durante 1 hora con agitación a 4°C. Luego, se reemplazó el TBS1X por 500 mL de TBS1X fresco, se dejó overnight con agitación a 4°C y se recuperaron los fagos dializados que fueron titulados por espectrofotometría (sección 3.3.2).

Para la captura se emplearon 5 µL de beads magnéticas conjugadas a estreptavidina (*Thermo*) y se las incubó con 200 µL de una dilución apropiada

de fagos, de modo que los sitios de unión a biotina estuviesen en exceso (1000 veces aproximadamente) ON a TA. Al día siguiente, se separó la fracción no unida de las beads magnéticas mediante *pull-down* aplicando un imán. Se realizaron 3-4 lavados de 5 minutos con 300 μL de TBS-Tween 0,05%. Se determinó la cantidad de fago en cada una de las fracciones mediante titulación por placa (sección 3.3.1) y qPCR (sección 3.3.4). El porcentaje de fagos retenidos se calculó como $\% \text{Retenido} = [(\text{Fagos totales} - \text{Fagos no retenidos}) / \text{Fagos totales}] \times 100$.

4.7 Ensayo competitivo con bacteriófagos biotinilados

4.7.1 Titulación de la preparación de fagos biotinilados

Se realizó un ELISA acorde a lo descrito en la sección 3.3.3 donde se capturó con 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BSA-microcistina y se empleó estreptavidina-peroxidasa (1/5000) para la detección. Se determinó a qué dilución la preparación de bacteriófagos presentaba una Absorbancia 450 nm = 1, y se usó esta concentración para en el ensayo competitivo.

4.7.2 ELISA competitivo para la detección de microcistina

Se sensibilizó overnight a 4°C con BSA-microcistina a 0,05 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se lavó 5 veces con PBS-Tween 0.05% y luego se bloqueó con PBS-BSA 1% durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego del lavado se lavó 5 veces con PBS-Tween 0,05%. En placa de dilución se sembró 30 $\mu\text{g}/\text{L}$ de microcistina y se realizaron diluciones al medio en PBS-Tween 0,05%. Luego se tomaron 50 μL de estas diluciones y se agregaron a la placa de ELISA, junto con 50 μL del stock de bacteriófagos biotinilados expresando el nanobody H11, y se dejó incubar durante 1 hora a temperatura ambiente. Luego se volvió a lavar 5 veces con PBS-Tween 0,05%, se agregó 100 μL de un conjugado estreptavidina-peroxidasa 1/5000 y se lo incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó el conjugado con PBS-Tween 0,05% cinco veces, se agregaron 100 μL del sustrato TMB para la enzima peroxidasa y se dejó transcurrir la reacción durante 15 minutos. La reacción se cortó con 50 μL de

H₂SO₄ 2N. La absorbancia de las reacciones colorimétricas se midió a 450 nm en el equipo FLUOstar OPTIMA (BMG Labtech, Germany). Como control del ELISA se incluyó un blanco donde se agregó PBS-Tween 0,05% en lugar de bacteriófago y se midió la absorbancia en ausencia de inhibidor, es decir, se agregaron 50 µL de PBS-Tween en lugar de microcistina a los 50 µL de bacteriófago.

5.0 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Se logró construir el vector pINQ8b3-H11 que permitiría la biotinylación *in vivo* de bacteriófagos y la expresión del nanobody H11

Con el objetivo de producir partículas virales de M13 que expresen simultáneamente polipéptidos en pIII y pVIII se diseñó un vector de expresión policistónica (pINQ8b3), tomando como base el vector pComb3XSS que contenía la secuencia del nanobody “H11” que es específico para la microcistina-LR (pComb3XSS-H11) (Figura 9). Para esto se diseñó un casete de expresión sintético, que se insertó en el sitio EcoRI del pComb3XSS-H11. Este casete estaba flanqueado por dos sitios EcoRI, y codificaba en dirección 5’-3’: la secuencia Shine-Dalgarno de unión al ribosoma, el péptido señal PelB, el péptido sustrato de la biotín ligasa (AviTag), una secuencia separadora (G₃S)₂ y la secuencia de la proteína pVIII (Figura 9A).

El casete fue clonado exitosamente en el plásmido pCOMb3XSS-H11, obteniéndose abundantes colonias para la reacción de ligación y ninguna en los controles de re-ligación (sin inserto) o de vector (sin inserto ni ligasa). A su vez, la presencia del inserto en el vector con la orientación deseada se confirmó para varios clones por secuenciación. De 8 clones secuenciados se obtuvieron 2 que poseían el casete en la orientación deseada denominados clon 6 y 7, y que permitieron confirmar el correcto ensamblado del vector portando el nanobody H11 (pINQ8b3-H11).

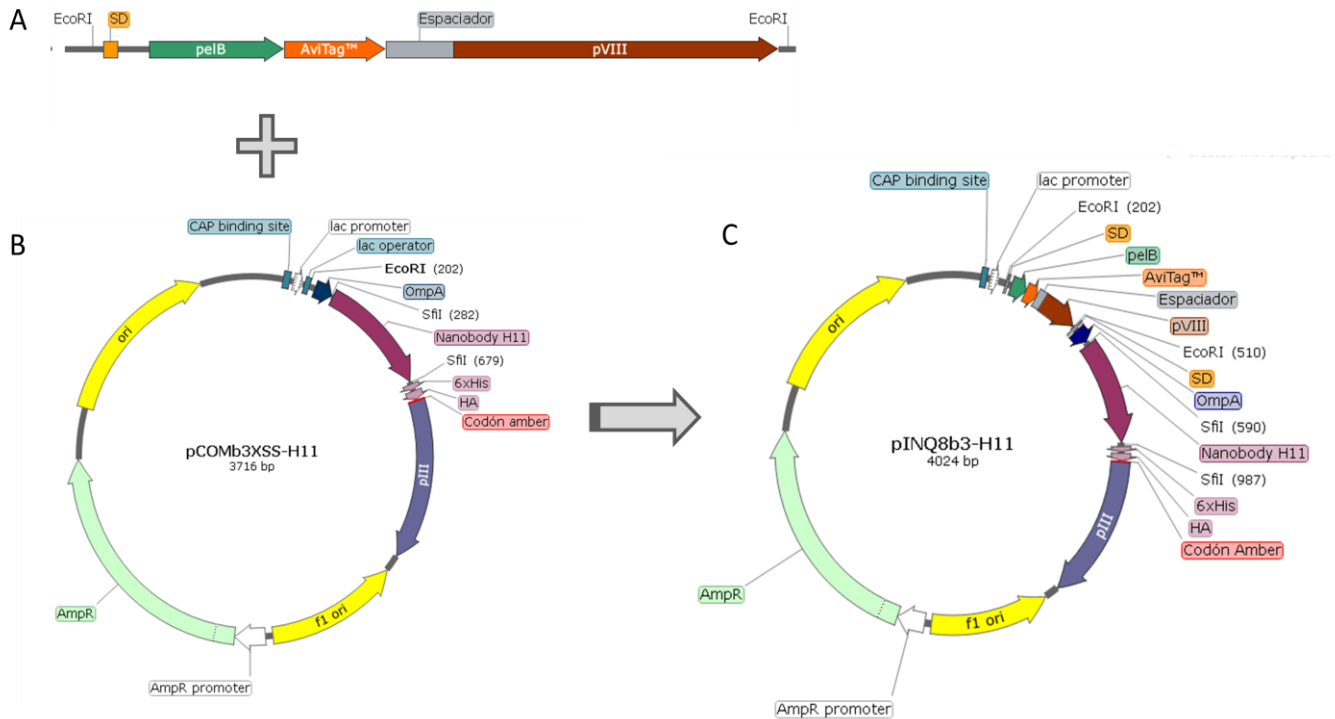


Figura 9. Esquema de construcción del vector pINQ-8b3. Se resume brevemente la construcción del vector pINQ8b3-H11 a partir del pCOMb3XSS-H11 y un casete de expresión. En la figura 9A se ilustra el casete de expresión que consta del péptido líder pelB, seguido por el aceptor de biotina AviTag, una secuencia separadora y la proteína pVIII, flanqueado por sitios de corte para la enzima EcoRI. En la figura 9B se ilustra el vector fagémido de partida pCOMb3XSS-H11 que permite la expresión del nanobody H11 fusionado a la proteína pIII. Para esto, el vector consta de un sitio de unión al ribosoma, seguido por el péptido señal ompA que dirige la exportación al periplasma, el nanobody H11 y la proteína viral pIII. Finalmente, en la figura 9C se ilustra el vector obtenido, pINQ8b3-H11, que permite la co-expresión del péptido AviTag fusionado a pVIII y del nanobody H11 fusionado a pIII. Esta figura fue realizada con el software Snapgene Viewer 3.0.3

5.2 Los bacteriófagos producidos en *E.coli* ER2738 expresarían nanobody pero no se estarían biotinilando

Una vez obtenidos dos clones positivos (6 y 7) para el pINQ8b3-H11, se doble-transformaron células *E. coli* ER2738 junto con el vector pCY-216, que

permite la sobre-expresión de la enzima *BirA*. Las bacterias transformadas se plaquearon en placas de LB conteniendo ampicilina y cloranfenicol para seleccionar los dobles transformantes. Se prosiguió tomando 2 colonias aisladas de los clones 6 y 7 (6/7A, B) y creciéndolas en medio SB para obtener los sobrenadantes de fagos como se mencionó en la sección 3.5. Los sobrenadantes de fagos se analizaron por ELISA (sección 3.3.3), utilizando placas cubiertas con un anticuerpo- α -fago M13 policlonal. Para la detección se empleó estreptavidina-peroxidasa ó bien un anticuerpo monoclonal- α -M13-peroxidasa.

En los casos donde se empleó estreptavidina-peroxidasa para detectar fagos biotinilados, no se detectó señal alguna (resultado no ilustrado). Por otro lado, como se observa en la **Figura 10**, cuando el ELISA fue revelado con un anticuerpo- α -M13-peroxidasa monoclonal sí se detectó señal, lo cual indicó la presencia de fagos en los sobrenadantes analizados. Estos resultados sugieren una ausencia de biotinilación en los fagos o un problema con el conjugado estreptavidina-peroxidasa. Esta última posibilidad se descartó, dado que a pesar de no contar con un control positivo se sabía que el reactivo funcionaba bien por otros experimentos realizados en el laboratorio bajo las mismas condiciones.

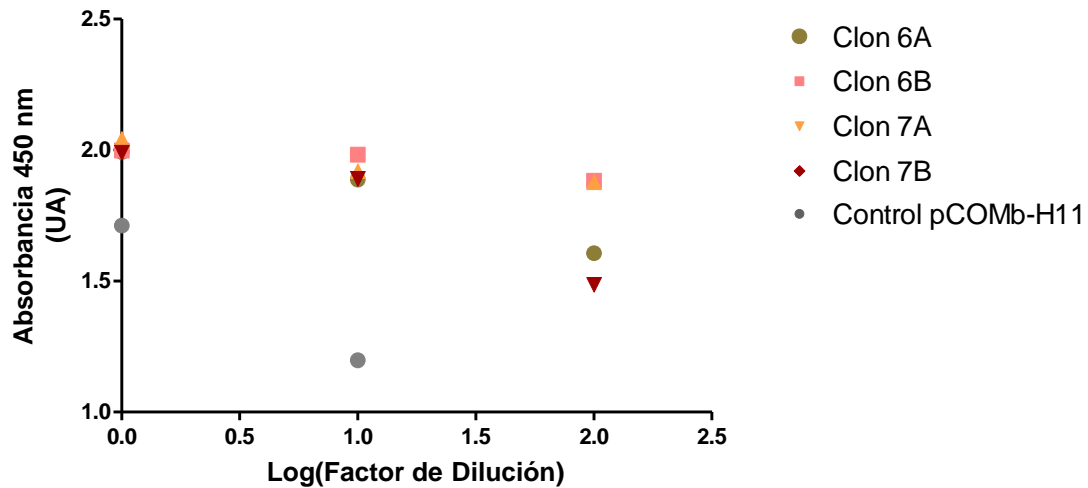


Figura 10. Evaluación de la producción de bacteriófagos. Se indican las mediciones obtenidas por ELISA para los sobrenadantes de fagos obtenidos a partir del pINQ8b3-H11 ó del pCOMb3XSS-H11 (pCOMb-H11) a una absorbancia de 450 nm, cuando se sensibilizó con un anticuerpo anti-M13 policlonal (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se reveló con un anticuerpo anti-M13 conjugado a peroxidasa (1/5000)

Como no se observó biotilación de bacteriófagos y la expresión de la pVIII-AviTag y del nanobody es bicistrónica, se procedió a analizar si el nanobody se estaba expresando. Para esto, se evaluó la expresión del nanobody para bacteriófagos producidos a partir del pCOMb3XSS-H11 (pCOMb-H11) ó del pINQ8b3-H11 en ER2738, así como de bacteriófagos producidos a partir del pINQ8b3-H11 en ER2738-*pcy216*. Los sobrenadantes ricos en fagos fueron analizados por ELISA, utilizando placas cubiertas con BSA-microcistina y revelando con un anticuerpo monoclonal- α -M13-peroxidasa (**Figura 11A**). En paralelo, se controló la producción de bacteriófagos en estos sobrenadantes, en un ELISA similar al descrito anteriormente, donde se sensibilizó con un anticuerpo- α -M13 policlonal y se empleó un anticuerpo monoclonal- α -M13-peroxidasa (**Figura 11B**). En estos experimentos se pudo inferir que el nanobody se estaba expresando en las tres preparaciones de bacteriófagos. Cualitativamente, la mayor señal se apreció para el pINQ8b3-H11 en ER2738, y esta disminuyó cuando los mismos bacteriófagos fueron producidos en ER2738-*pcy216*.

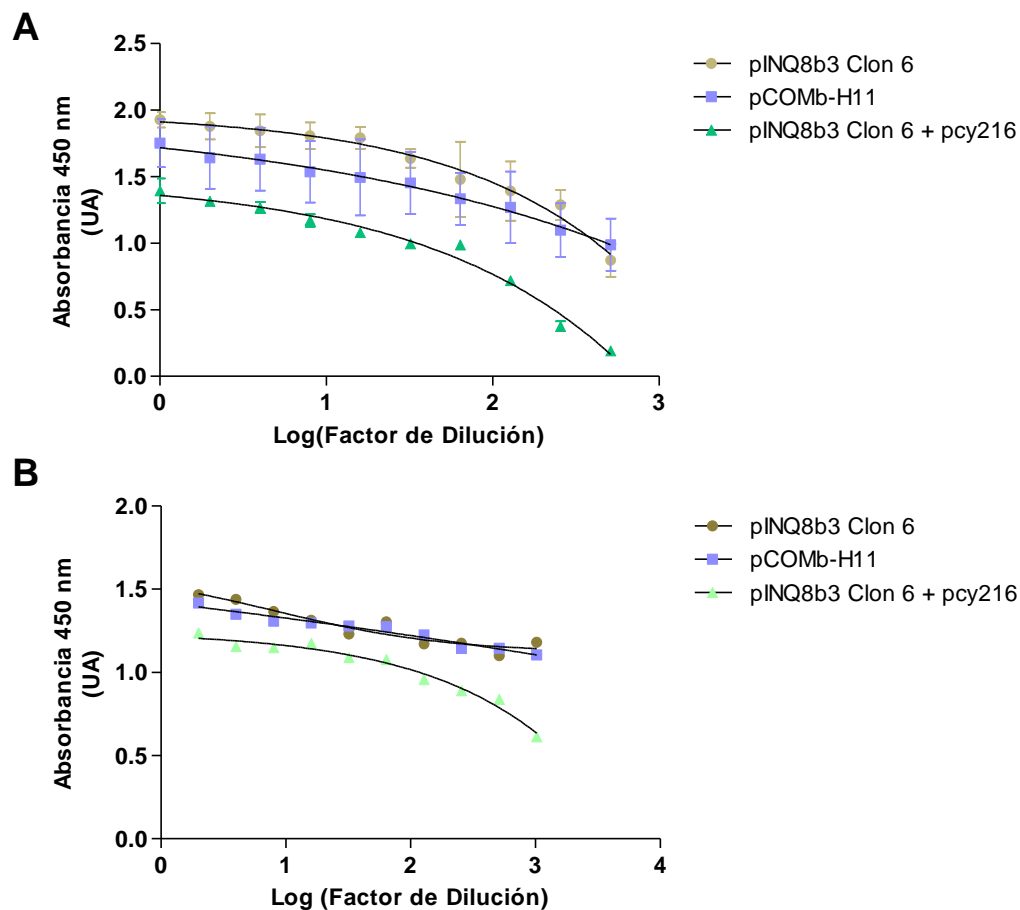


Figura 11. Evaluación de la expresión de nanobody en distintas preparaciones de bacteriófagos. Se muestran los resultados obtenidos por ELISA para evaluar la presencia del nanobody en los fagos. En la Figura 11A se sensibilizó con BSA-microcistina (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se reveló con un anticuerpo anti-M13-peroxidasa monoclonal (1/5000). En la Figura 11B se controló la producción de bacteriófagos, al sensibilizar con un anticuerpo- α -M13 policlonal (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y revelar con un anticuerpo monoclonal- α -M13-peroxidasa. Se evaluaron bacteriófagos producidos a partir del pCOMb3XSS-H11 (pCOMb-H11) y pINQ8b3 en ER2738, así como del pINQ8b3 en ER2738-*pcy216*.

Una posible explicación para la falta de biotilación es que esta se viese afectada porque las células tienen una alta carga metabólica: Para la selección de los plásmidos fue necesario crecerlas en presencia de 4 antibióticos, a lo cual se sumó la expresión de 2 proteínas recombinantes (pIII-nanobody, pVIII-AviTag) así como de la enzima BirA codificada en el *pcy216*. Como consecuencia de la carga metabólica, podría estar afectándose la expresión de la *BirA* y por lo tanto la biotilación. Asimismo, la carga metabólica podría estar afectando la generación de bacteriófagos. De hecho,

la cantidad de bacteriófagos parecería ser menor cuando son producidos en ER2738-*pcy216* (**Figura 11B**). Por último, el estrés metabólico podría estar afectando la expresión de la pVIII-AviTag, que sumado a otros factores como una baja eficiencia de biotilación por la enzima *BirA*, resulta en una ausencia de biotilación *in vivo* de los bacteriófagos.

5.3 La biotilación de pVIII-AviTag en *E. coli* AVB100 ocurre con baja eficiencia.

Para disminuir el número de plásmidos a utilizar en la producción de los fagos (reduciendo así el número de antibióticos) se exploró si el vector generado permitía la biotilación de la proteína pVIII-AviTag en otra cepa de *E. coli* que sobre-expresa constitutivamente la *BirA*. Para esto, se electroporó el plásmido pINQ8b3-H11 en la cepa AVB100 que codifica para la enzima *BirA* en su cromosoma y la sobre-expresa. Inicialmente, la eficiencia de la biotilación de la pVIII-AviTag se evaluó para la fracción soluble del lisado celular mediante Western Blot (**Figura 12**) dado que esta cepa carece del pili F' y por tanto no puede ser infectada por fago helper para producir bacteriófagos.

De estos ensayos, no parecería que la proteína pVIII-AviTag se estuviera biotilando en AVB100 en forma significativa, porque si bien en la **Figura 12** se observa señal para la fracción soluble de las AVB100-pINQ8b3, hay una señal similar (aunque más tenue) que también está presente en el control de las células AVB100 que se crecieron en las mismas condiciones pero que no fueron electroporadas con el vector. Además, comparando con la señal generada con distintas concentraciones del nanobody biotilado de control, la señal correspondiente a la pVIII biotilada aparece como muy débil.

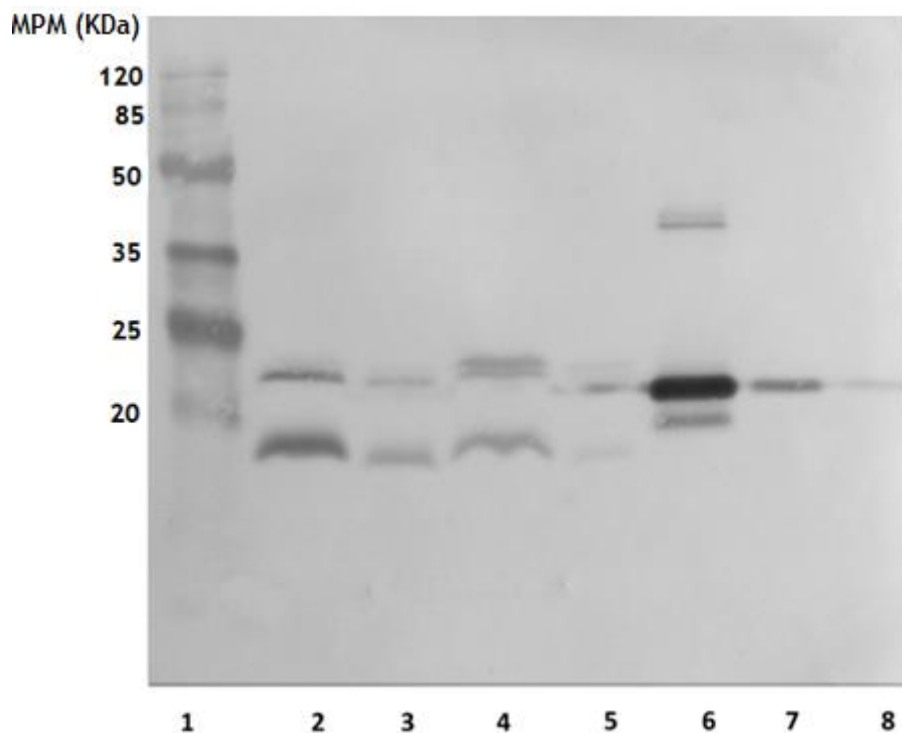


Figura 12. Análisis de presencia de pVIII-AviTag biotinilada en la fracción soluble del lisado de AVB100-pINQ8b3. Se realizó un western blot a partir de un gel de poliacrilamida al 15% donde se sembró el marcador de peso molecular pre-teñido (MPM; Pierce #26612) (1), 30 μ L (2) o 3 μ L (3) de la fracción soluble del lisado de AVB100-pINQ8b3, 30 μ L (4) o 3 μ L (5) del lisado de la fracción soluble de AVB100 sin electroporar crecidas en las mismas condiciones. A su vez se incluyó 1 μ g (6), 100 ng (7) y 10 ng (8) del anticuerpo H11 biotinilado como control positivo. El ensayo se reveló con un conjugado estreptavidina-peroxidasa (1/3000) y la adición del sustrato DAB.

Dado este resultado, se procedió a verificar que la proteína pVIII estuviera siendo expresada. Para esto, se analizaron distintas preparaciones por Western Blot empleando como anticuerpo primario un anticuerpo- α -M13 policlonal de conejo (que presenta alta reactividad contra la proteína pVIII), y un anticuerpo- α -IgG de conejo conjugado a peroxidasa (**Figura 13**). En este se logró observar distintas bandas para el control positivo, pero en particular, se detectó una banda muy intensa por debajo de los 20 kDa que se correspondería a la proteína pVIII, que es mayoritaria en el fago y posee un peso próximo a los 7 kDa¹. En cuanto a la fracción soluble del lisado AVB100-pINQ8b3H11 se observaron tres bandas muy tenues, una de las cuales, por debajo de los 20 kDa, se correspondería a la pVIII-AviTag, con un peso

estimado de 7,5 kDa, y una migración similar a la proteína pVIII del control positivo. Estos resultados sugieren que la proteína pVIII es expresada pobremente por las células AVB100-pINQ8b3, al menos en la fracción soluble. Esta baja expresión dificultaría evidenciar su biotilación y por lo tanto podría explicar el resultado mostrado en la **figura 12**.

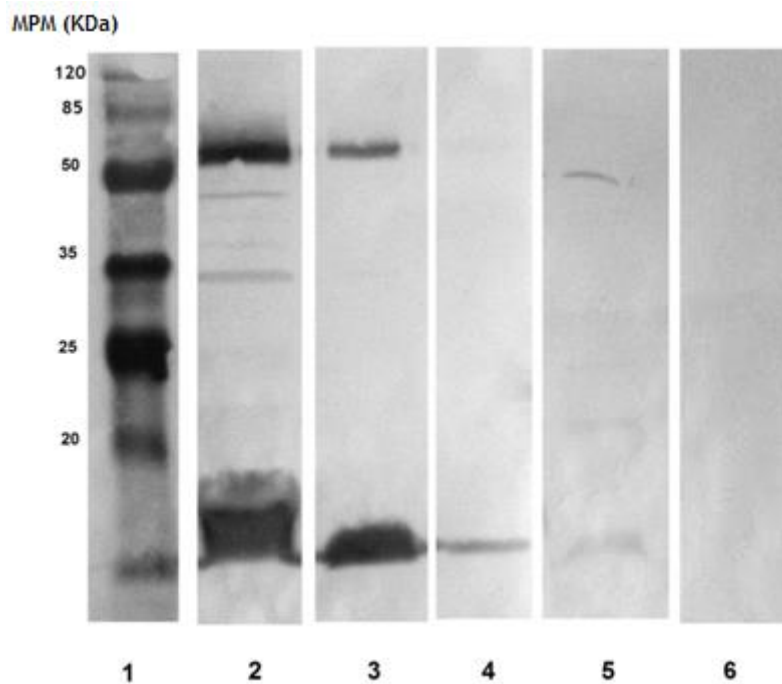


Figura 13. Análisis de presencia de pVIII en la fracción soluble del lisado de AVB100-pINQ8b3. Se realizó un Western blot a partir de un gel de poliacrilamida al 15% donde se sembró el marcador de peso molecular pre-teñido (MPM; *Pierce* #26612) (1), 30 μ L sin diluir (2) de la dilución 1/20 (3) o 1/400 (4) de una preparación de bacteriófagos M13KO7 (control positivo), 30 μ L del lisado de la fracción soluble de AVB100-pINQ8b3-H11 (5) y 30 μ L del lisado de la fracción soluble de células AVB100. El ensayo se reveló con un anticuerpo- α -M13 policlonal de conejo (1/5000), y un anticuerpo- α -IgG de conejo conjugado a peroxidasa, y la adición del sustrato DAB.

5.4 La conjugación de la cepa ER2738 con AVB100 permitió generar una nueva cepa con expresión de pili F'.

Si bien no se confirmó que la pVIII-AviTag se estuviese biotinilando en la cepa AVB100, y a pesar de constatarse una baja expresión en la fracción soluble, se procedió a generar partículas de fagos para verificar la presencia de biotina en los mismos. Para esto fue necesario modificar la cepa AVB100 de *E. coli* para que expresase el pili F', lo cual se llevó a cabo mediante su conjugación con la cepa ER2738 quien funcionó como donadora. La conjugación entre ambas cepas se desarrolló como se describe en Materiales y Métodos, resultando exitosa, ya que no se observó crecimiento en las placas con tetraciclina/estreptomicina para los controles de las cepas parentales, pero sí para la cepa conjugada. A esta cepa se la denominó AVB100F' y a partir de clones aislados se prepararon células electrocompetentes.

5.5 Los bacteriófagos producidos en *E. coli* AVB100F' se biotinilan *in vivo* pero no expresan el nanobody

Una vez generada la cepa *E. coli* AVB100F', se procedió a testear su capacidad para producir bacteriófagos biotinilados *in vivo* en pVIII y que expresaran el nanobody H11 en pIII. Esto se evaluó mediante ELISA capturando los fagos con un anticuerpo- α -M13 policlonal y empleando estreptavidina-peroxidasa para la detección. Como se puede apreciar en la **Figura 14**, se obtuvieron bacteriófagos biotinilados para el clon 6, aunque no para el clon 7. Si bien este resultado fue inesperado, puesto que los clones son de secuencia idéntica, se especuló que el clon 7 podría haber generado alguna mutación durante su crecimiento en placa y se prosiguieron los ensayos con el clon 6. Acorde con lo esperado, los bacteriófagos producidos a partir del vector pCOMb-H11 (control negativo) no se biotinilaron.

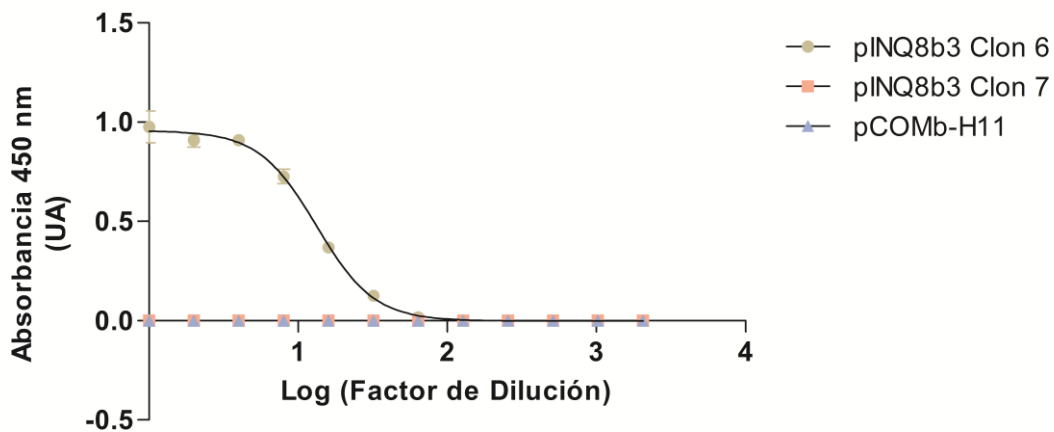


Figura 14. Evaluación de la presencia de fago biotinilado producido en AVB100F'. Se muestran los resultados obtenidos por ELISA para los sobrenadantes de fagos producidos en AVB100F' cuando se sensibilizó con un anticuerpo anti-M13 policlonal y se reveló con estreptavidina conjugada a peroxidasa.

Por otro lado, cuando el mismo ensayo se realizó capturando los fagos a través de la unión del nanobody a la microcistina-BSA inmovilizada, no se observó señal (resultado no ilustrado), indicando que el nanobody no se estaría expresando en el fago. Tomando en consideración estos resultados, se procedió a analizar por ELISA la expresión de nanobody para bacteriófagos producidos en células AVB100F' transformadas con pINQ8b3-H11 ó pCOMb-H11 (control positivo). Como referencia, se analizaron además sobrenadantes de fagos producidos en ER2738 a partir del pCOMb-H11. Al realizar su captura con el anticuerpo anti-M13, se observó que los bacteriófagos producidos en AVB100F' se produjeron en cantidades, similares a los producidos en ER2738 (**Figura 15A**). No obstante, cuando se usó microcistina-BSA para capturarlos, **Figura 15B**, quedó claro que los bacteriófagos producidos en AVB100F' no expresan nanobody, mientras que los producidos en ER2738 sí lo hacen.

Ante estos resultados, se revisaron las características de la cepa AVB100, constatándose que la misma no es supresora para el codón *amber*. El codón *amber* es un codón stop, que en algunas cepas de *E. coli*, “supresoras”, es leído como un aminoácido más. Este es el caso de las células *E. coli* ER2738 que como se ilustra en la **Tabla 2** tienen el genotipo (*glnV*) que les permite

leer el codón stop como el aminoácido glutamina y proseguir la traducción proteica. Sin embargo, esto no sucede para la cepa AVB100 donde el codón *amber* es leído como un stop. En el pINQ8b3-H11 existe un codón *amber* que se encuentra entre el gen del VHH y el de la proteína pIII (**Figura 9**). Por tanto, cuando este codón es leído como un aminoácido el nanobody queda fusionado a pIII y se expresa en la cápside del fago, mientras que cuando es leído como codón stop el nanobody se expresa en forma soluble. Esto se constató al evaluar los sobrenadantes del bacteriófago producido en AVB100F' en placas cubiertas con BSA-microcistina y empleando un anticuerpo- α -HA-peroxidasa para la detección. En este ensayo (**Figura 15C**) todos los sobrenadantes mostraron señal, sustentando la idea de que todo el nanobody estaría expresándose en forma soluble, como era de esperar dado que la cepa AVB100F' no es supresora para el codón *amber*.

Tabla 2. Genotipo de las cepas *E. coli* ER2738 y AVB100

| Cepa | Genotipo |
|--------|--|
| ER2738 | F' <i>proA+B+</i> <i>lacIq</i> $\Delta(lacZ)M15$ <i>zzf::Tn10(Tet^R)</i> / <i>fhuA2 glnV</i> $\Delta(lac-proAB)$ <i>thi-1</i> $\Delta(hsdS-mcrB)5$ |
| AVB100 | K12 MC1061 <i>araD139</i> $\Delta(ara-leu)7696$ $\Delta(lac)l74$ <i>galU galK hsdR2(rK- mK+)</i> <i>mcrB1 rpsL(Str^r)</i> |

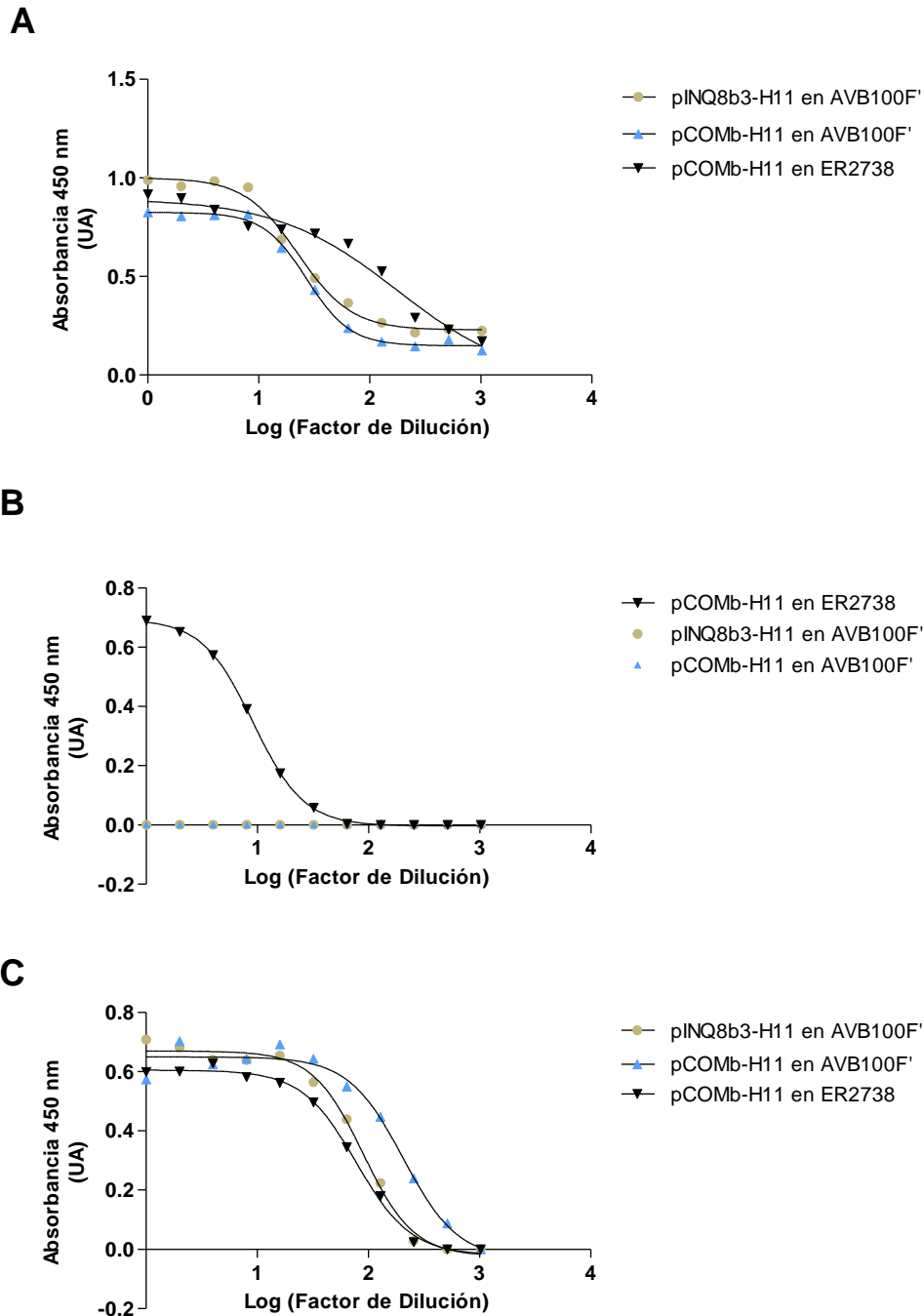


Figura 15. Análisis de la expresión de nanobody en los bacteriófagos producidos en AVB100F'. En la Figura 15A se muestran las medidas obtenidas por ELISA cuando se evaluaron los sobrenadantes de bacteriófagos sensibilizando con un anticuerpo anti-M13 policlonal y revelando con un anticuerpo anti-M13-peroxidasa. En la Figura 15B se muestran los resultados obtenidos cuando se sensibilizó con BSA-microcistina y se reveló con un anticuerpo anti-M13-peroxidasa. Finalmente, en la figura 15C, se muestran las medidas obtenidas para los sobrenadantes de fago cuando se sensibilizó con BSA-microcistina y se reveló con un anticuerpo anti-HA conjugado a peroxidasa.

5.6 La supresión del codón amber en pINQ8b3 permitió la correcta expresión de los nanobodies en las partículas virales.

Una vez se constató que la cepa AVB100F' era no supresora para el codón *amber* fue necesario corregir el vector para que el nanobody se expresara fusionado a la proteína pIII del bacteriófago. Sin embargo, previo a realizar esta corrección se optó por clonar el nanobody A2 para generar el plásmido pINQ8b3-A2, donde se sustituyó el nanobody H11 por el A2. Este nanobody, presenta mayor afinidad por la microcistina-LR que H11 y da lugar a mejores límites de detección de microcistinas cuando se utiliza en inmunoensayos, por lo que podría mejorar el uso del fago biotinilado como reactivo¹¹⁴. El clonado se verificó por colony PCR, donde los 10 clones testeados dieron positivos y mostraron un producto del tamaño esperado (700-800 pb) como se indica en la **Figura 16**.

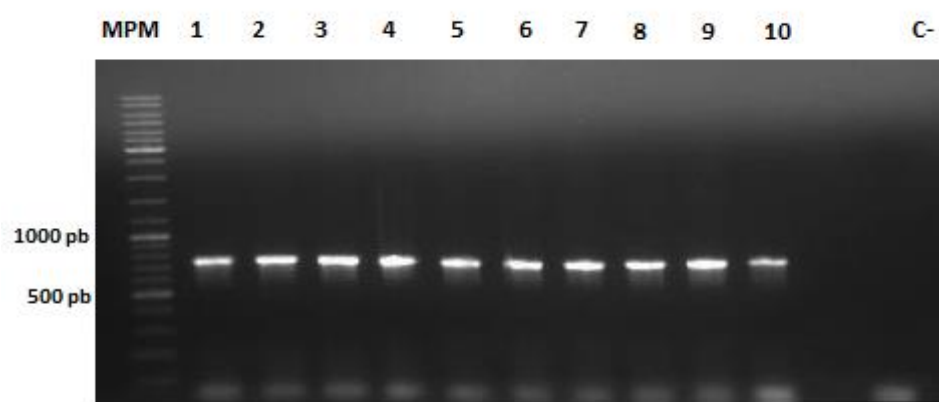


Figura 16. Resultados Colony-PCR sobre el inserto A2. En el primer carril se sembró el marcador de peso molecular (MPM) y luego los clones 1 a 10. En el último carril se sembró el control negativo de la PCR (C-) donde no se añadió molde.

Una vez obtenido el pINQ8b3-A2, el codón *amber* se cambió a un codón para ácido glutámico. Esto se realizó mediante mutagénesis dirigida por PCR como se describe en la sección de métodos, y los vectores así obtenidos se denominaron pINQ8b3gxs-A2 y pINQ8b3gxs-H11 según el nanobody presente en el vector de partida. La reacción de PCR se llevó a cabo sobre el pINQ8b3 que contenía el nanobody H11 ó A2 y se incluyeron controles negativos que no

contenían cebadores pero que pasaron por las mismas reacciones enzimáticas. Los vectores modificados se electroporaron en células AVB100F', obteniéndose colonias para vectores amplificados con cebadores, pero no para los controles negativos. Luego, se procedió a analizar si las colonias que parecían contener el vector modificado permitían la producción de bacteriófagos capaces de expresar nanobody y biotinilarse *in vivo*. Para ello, se tomaron cuatro colonias del pINQ8b3gxs-A2 y del pINQ8b3gxs-H11, se las dejó crecer para que produjeran bacteriófago (sección 3.8) y se las analizó por ELISA sensibilizando con BSA-microcistina y empleando estreptavidina-peroxidasa (**Figura 17A**). Este ensayo permitió constatar qué clones expresaban nanobody y se biotinilaban. Aquí se observa que todos los clones del pINQ8b3gxs-H11 mostraron algún grado de señal, mientras que sólo el clon 3 y el clon 4 del pINQ8b3gxs-A2 lo hicieron. De todos éstos, el clon 2 del pINQ8b3gxs-H11 y el clon 3 del pINQ8b3gxsA2 fueron los que presentaron mayor absorbancia a 450 nm.

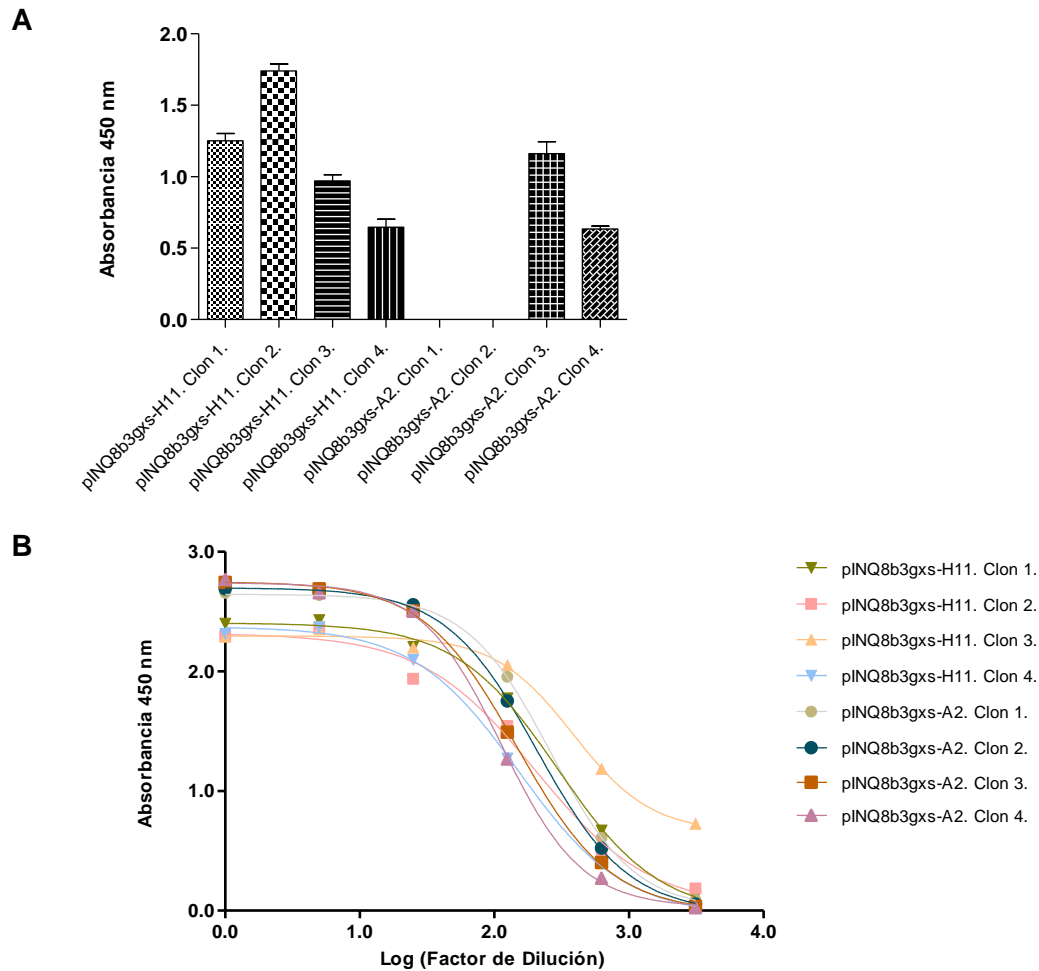


Figura 17. Evaluación de la producción de bacteriófagos a partir del vector modificado para el codón *amber*. En la Figura 17A se muestran los resultados obtenidos por ELISA para los sobrenadantes sin diluir de fago, obtenidos a partir del pINQ8b3gxs codificando el nanobody H11 o A2, según se indica. La placa de ELISA se sensibilizó con BSA-microcistina (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se reveló con estreptavidina-peroxidasa (1/5000). En la Figura 17B se muestran los resultados obtenidos por ELISA cuando se sensibilizó con un anticuerpo anti-M13 policlonal (5,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se reveló con un anticuerpo monoclonal α -M13-peroxidasa (1/5000).

En paralelo, se controló que la producción de fagos no hubiese sido afectada para ninguno de los clones, a modo de descartar que esta pudiese ser causante de la ausencia de señal en la **Figura 17A**. Para comparar las concentraciones relativas de fagos en los distintos sobrenadantes, estos se analizaron mediante un ELISA capturándolos con un anticuerpo α -M13 policlonal y revelándolos con un anticuerpo- α -M13 monoclonal (**Figura 17B**).

Como resultado, se observó que todos los clones presentaron buena señal para la producción de fagos, incluso los clones 1 y 2 del pINQ8b3gxs-A2 que no mostraron señal en la **Figura 15A**. Esto último podría deberse a que la PCR no funcionó y por tanto no se está expresando nanobody, o que durante la PCR se introdujeron mutaciones que afectaron la biotilación *in vivo* del bacteriófago.

Estos resultados indican que la eliminación del codón amber fue exitosa, y aquellos clones en los que se obtuvo mayor señal fueron estriados y conservados en placas de LB-Agar.

5.7 Optimización de la producción de bacteriófagos biotinilados en AVB100F'

Con motivo de optimizar la producción de bacteriófagos biotinilados en AVB100F', se buscó la condición donde el ELISA revelado con estreptavidina-peroxidasa diera la señal más alta y donde fuese mejor la producción de bacteriófagos.

5.7.1 La inducción temprana de la enzima BirA da mayor señal para la presencia de biotina y la producción de bacteriófagos.

Teniendo en cuenta que la enzima responsable de la biotilación, *BirA*, es inducible por arabinosa, se buscó determinar cuándo era mejor inducir su expresión. Para esto se crecieron fagos pINQ8b3-H11 en AVB100F' y se agregó la arabinosa en forma temprana, al crecer las bacterias a partir del cultivo overnight, o en forma tardía, co-induciendo la expresión de esta enzima junto con la de las proteínas del fagémido. Además, a modo de control se crecieron fagos pCOMb-H11 bajo las mismas condiciones. Los sobrenadantes de fagos obtenidos para cada condición se analizaron mediante un ensayo ELISA capturándolos con un anticuerpo- α -M13 policlonal y detectándolos con estreptavidina-peroxidasa (**Figura 18A**). A su vez, como control de la producción de fagos se realizó un ELISA sensibilizando con un anticuerpo- α -

M13 policlonal y revelando con un anticuerpo monoclonal α -M13-peroxidasa (Figura 18B).

El análisis reveló que la inducción temprana de la enzima *BirA* mostró una mayor señal para la presencia de biotina (Figura 18A) que la co-inducción, mientras que los controles negativos no presentaron señal alguna. Al realizar un ajuste no-lineal de la absorbancia 450 nm vs. Log (Factor de dilución), la inducción temprana mostró un $\log IC_{50}=1,31 (\pm 0,019)$, mayor al obtenido para la co-inducción que tuvo un valor de $\log IC_{50}=1,12 (\pm 0,03)$. A su vez, dado que la producción de bacteriófagos (Figura 18B) también fue sutilmente mayor cuando la *BirA* se indujo en forma temprana, se determinó que esta era la condición óptima respecto al tiempo de inducción de la enzima.

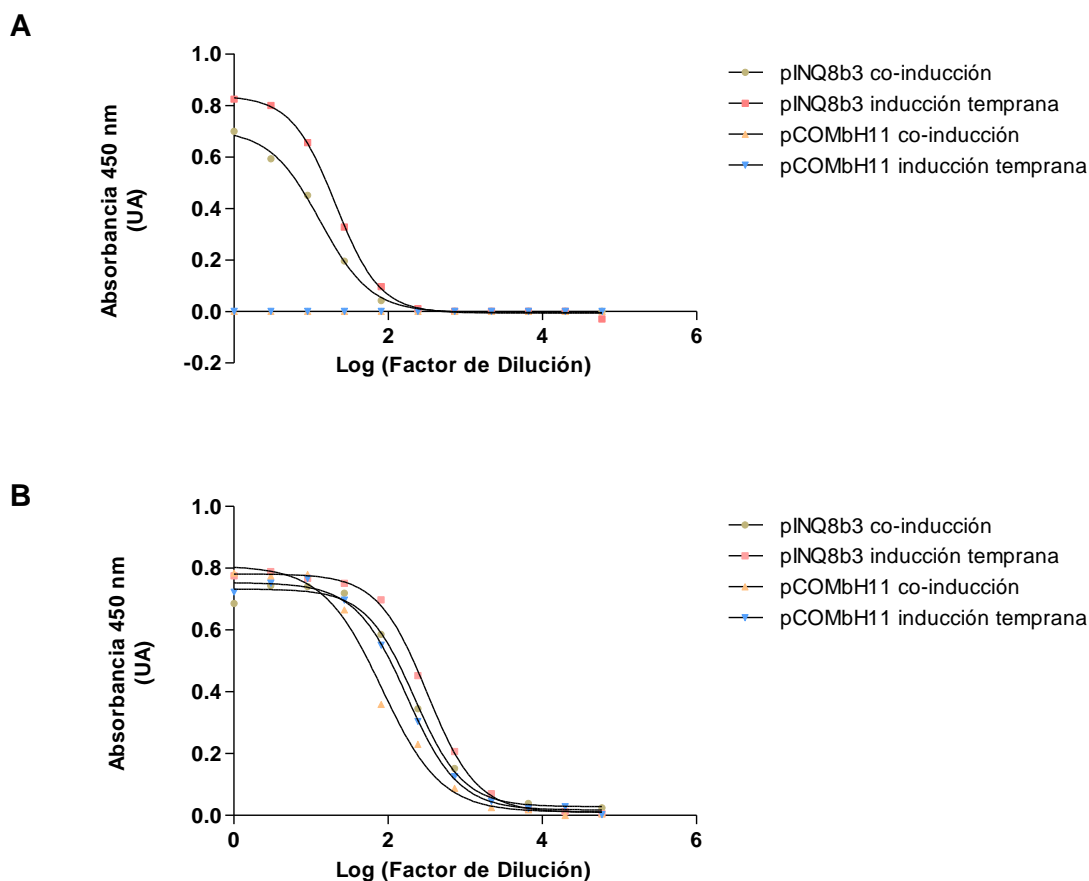


Figura 18. Inducción de la enzima *BirA*. En la Figura 18A se muestran los resultados obtenidos por ELISA, para los distintos sobrenadantes de fagos cuando se sensibilizó con un anticuerpo- α -M13 policlonal (5 μ g/mL) y se reveló con un conjugado estreptavidina-peroxidasa(1/5000). En la Figura 18B se indica el control de la producción de bacteriófagos, donde se analizaron los mismos sobrenadantes mencionados anteriormente

pero en un ELISA donde se sensibilizó con un anticuerpo- α -M13 policlonal (5 μ g/mL) y se reveló con un anticuerpo- α -M13 monoclonal (1/5000).

5.7.2 La señal de biotinilación de los bacteriófagos mejora con el aumento de la concentración de arabinosa al inducir el cultivo, pero es un incremento marginal.

Se investigó cómo la concentración de arabinosa, inductor de la enzima *BirA*, afectaba la señal de biotinilación para los sobrenadantes de bacteriófagos. Para esto se produjeron sobrenadantes de bacteriófagos a distintas concentraciones de arabinosa y se los analizó mediante un ensayo ELISA, donde se sensibilizó con un anticuerpo- α -M13 policlonal y reveló con estreptavidina-peroxidasa (**Figura 19A**). Se observó un moderado aumento de señal cuando la arabinosa se agregaba a 0.4% y 1% de concentración final, constatándose que el promotor de arabinosa está fuertemente reprimido en ausencia de este azúcar. El ajuste no-lineal sobre las curvas permitió estimar el LogIC50 (**Tabla 3**). Los valores resultaron muy similares, mostrando que los cambios en este parámetro dan lugar a variaciones marginales.

Tabla 3. Parámetros obtenidos del ajuste no-lineal para los sobrenadantes de fagos crecidos a distintas concentraciones de arabinosa

| Concentración de Arabinosa | LogIC50 |
|----------------------------|---------------|
| 1,0% | 0,63 +/- 0,03 |
| 0,4% | 0,74 +/- 0,01 |
| 0,1% | 0,56 +/- 0,04 |
| 0,04% | 0,70 +/- 0,03 |

A su vez, también se controló la producción de fagos para los sobrenadantes analizados y como se observa en la **Figura 19B**, se constató que esta fue prácticamente igual en todos los casos, exceptuando la condición en donde no se adicionó arabinosa.

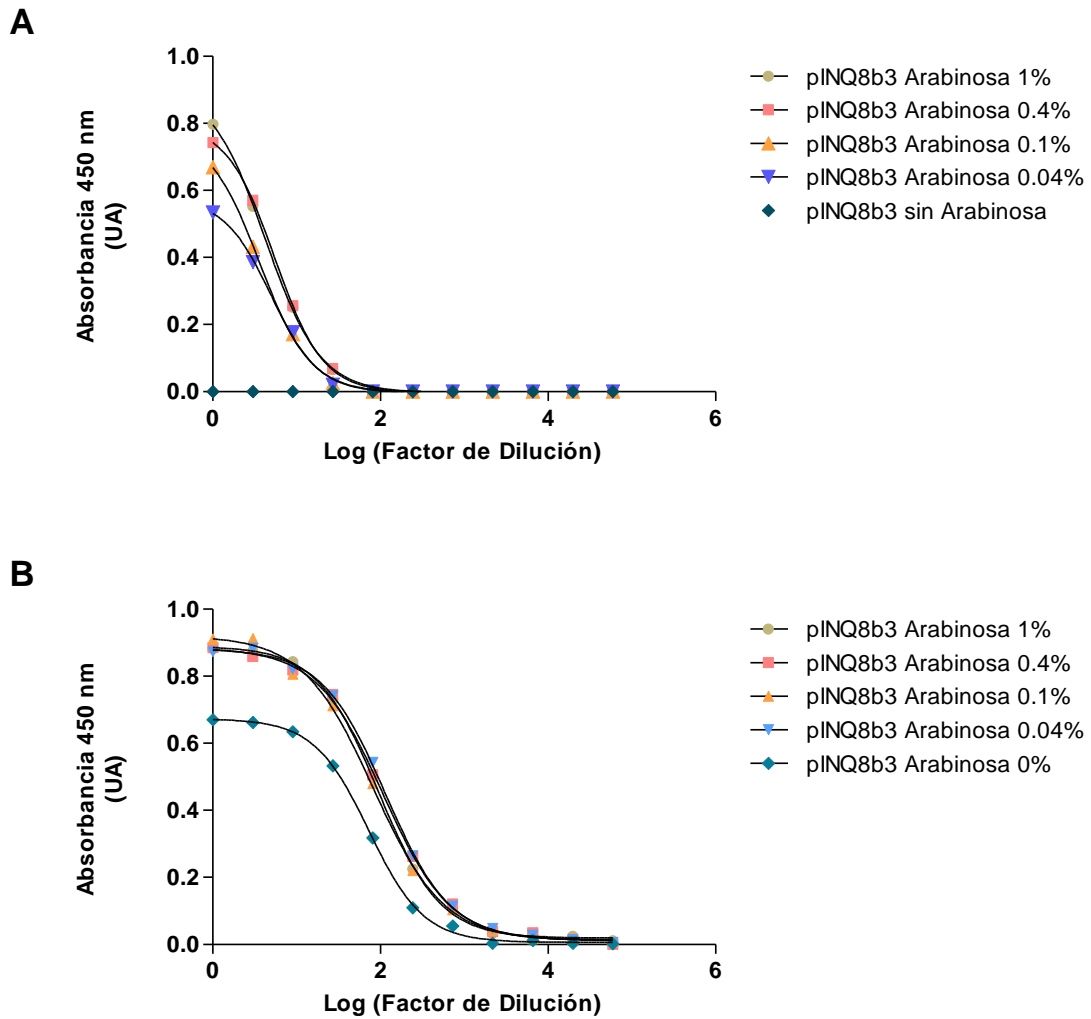


Figura 19. Inducción de la enzima BirA con distintas concentraciones de arabinosa. Se analizaron por ELISA los sobrenadantes de fago obtenidos a partir del pINQ8b3-H11, con distintas concentraciones de arabinosa. En la Figura 19A el ELISA se sensibilizó con un anticuerpo- α -M13 policlonal y se reveló con un conjugado estreptavidina-peroxidasa. En la Figura 19B se controló la producción de fagos, sensibilizando con un anticuerpo- α -M13 policlonal y sensibilizando con un anticuerpo- α -M13 conjugado a peroxidasa.

5.7.3 La inducción de las proteínas del fagémido post-infección con fago helper produjo sobrenadantes con mayor señal para la presencia de biotina y la producción de bacteriófagos

Una vez determinadas las condiciones óptimas para inducir la enzima *BirA*, se exploró cuándo era mejor inducir con IPTG las proteínas del fagémido. Para esto se produjeron sobrenadantes de bacteriófagos donde las proteínas del fagémido se indujeron previo a la infección de fago helper o luego de ésta y se las analizó mediante ELISA sensibilizando con un anticuerpo- α -M13 policlonal y empleando estreptavidina-peroxidasa para la detección (**Figura 20A**). De acuerdo con lo observado en la **Figura 20A**, la inducción de las proteínas del fagémido post-infección da lugar a una mayor señal para la presencia de biotina en los sobrenadantes de bacteriófagos, en relación a la inducción pre-infección. Esto se evidenció también con los valores de LogIC_{50} , $0,51 \pm 0,03$ y $1,17 \pm 0,02$, para la inducción pre-infección y post-infección, respectivamente.

Por otro lado, cuando se controló la producción de fagos (**Figura 20B**) se apreció una menor señal para la inducción pre-infección, lo cual sugiere que lo obtenido en la **Figura 20A** se debe en parte a una menor producción de bacteriófagos. Esto cobra sentido al considerar que la expresión previa de proteínas recombinantes podría estar interfiriendo con la infección por fago helper, así como con la producción de sus proteínas y el empaquetamiento viral. En vista de estos resultados, se consideró que la inducción post-infección era la más adecuada.

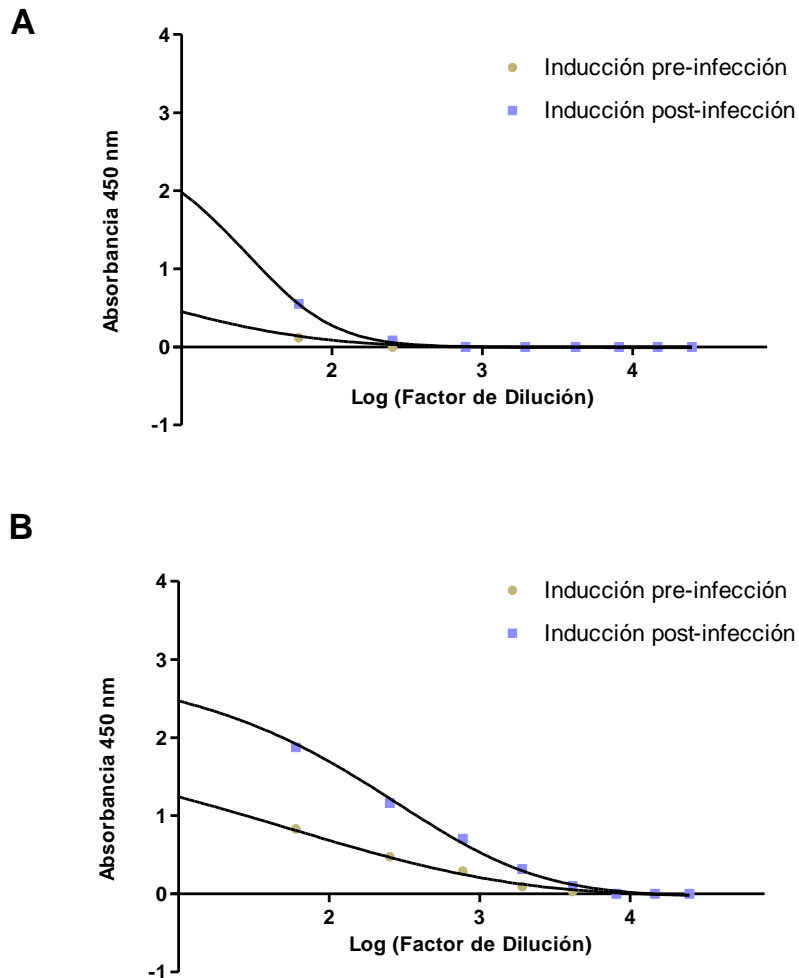


Figura 20. Efecto de la inducción de las proteínas del fagémido post y pre-infección con fago helper. Se analizaron los sobrenadantes de fagos obtenidos a partir del vector pINQ8b3-H11, cuando se adicionó IPTG previo y posteriormente a la infección con fago helper, para inducir la expresión de las proteínas del fagémido. En la Figura 20A se muestran los resultados obtenidos por ELISA cuando se sensibilizó con un anticuerpo- α -M13 policlonal y se reveló con un conjugado estreptavidina-peroxidasa. En la Figura 20B se muestran los resultados obtenidos por ELISA cuando se sensibilizó con un anticuerpo- α -M13 policlonal, pero se reveló en su lugar, con un anticuerpo- α -M13 monoclonal. En ambas figuras todas las curvas fueron sujetas a un ajuste no-lineal con el software Graphpad Prism 5.0.

5.7.4 El uso de 37°C a lo largo del cultivo produjo los mejores resultados

Se estudió si el crecimiento a 30°C post-infección con helper, en lugar de a 37°C, podía aumentar la cantidad de biotina en los sobrenadantes de bacteriófagos. Se especuló que dado que el nanobody-pIII como la pVIII-Avitag son proteínas recombinantes, temperaturas menores podrían favorecer la producción de proteína soluble y por ende, su empaquetamiento en el bacteriófago. Para esto se crecieron bacteriófagos a partir del pINQ8b3-H11 en AVB100F' como se describió previamente (sección 3.8), pero luego de inducir las proteínas del fagémido, unos se dejaron a 30°C overnight y otros a 37°C. Además, se crecieron fagos a partir del pCOMb-H11 como control negativo de biotilación en las distintas condiciones. En la **Figura 21A** se observa que los sobrenadantes de bacteriófagos generados a partir del pINQ8b3-H11 dan mayores señales al detectarlos a través de la biotina unida a su superficie cuando se crecen a 37°, que a 30 °C post-infección. El LogIC50 no se estimó en este caso dado que la curva sigmoidea para el experimento a 37°C no está bien definida. Por otro lado, los bacteriófagos producidos a partir del vector de partida, pCOMb-H11, no mostraron señal de biotilación a ninguna temperatura como era de esperarse.

En este experimento también se controló la producción de fagos por ELISA (**Figura 21B**) y se evidenció que la producción de fagos fue buena para todos los sobrenadantes analizados, aunque mucho mejor en el caso de pCOMb-H11 crecido a 30°C. Teniendo esto en cuenta, y dado que la señal al revelar con estreptavidina-peroxidasa fue considerablemente mayor cuando se empleó 37°C a lo largo de todo el cultivo, se definió esta condición como óptima.

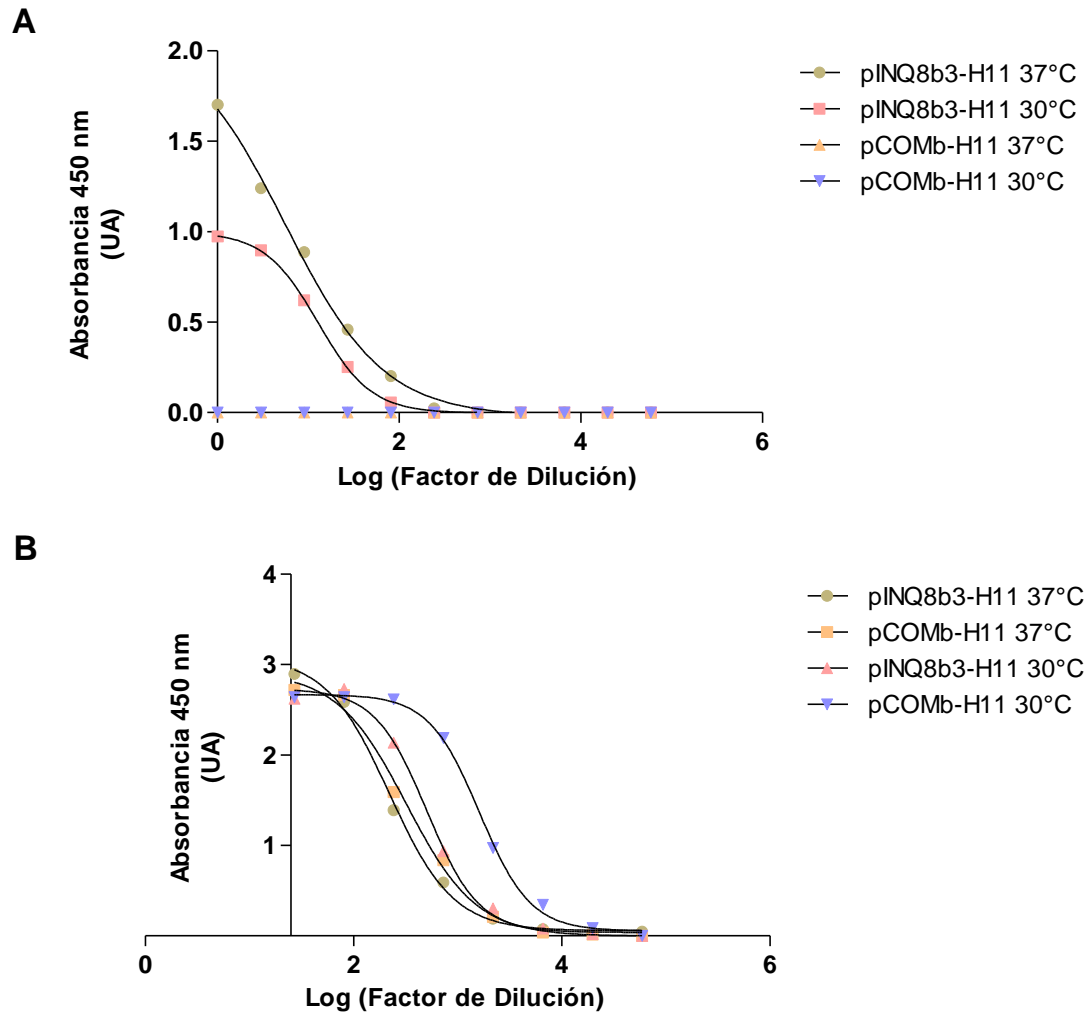


Figura 21. Efecto de la temperatura en la producción de bacteriófagos biotinilados. Se analizaron los sobrenadantes de fagos producidos a 30°C y 37°C a partir del vector pINQ8b3-H11 y el vector de partida pCOMb-H11. En la Fig. 19A. se muestran los resultados obtenidos por ELISA cuando se sensibilizó con un anticuerpo- α -M13 policlonal y se reveló con un conjugado estreptavidina-peroxidasa. En la Fig. 19B se muestran los resultados obtenidos por ELISA cuando se sensibilizó con un anticuerpo- α -M13 policlonal, pero se reveló en su lugar, con un anticuerpo- α -M13 monoclonal. En ambas figuras se realizó un ajuste no-lineal con Graphpad Prism 5.0.

5.7.5 El crecimiento en presencia de glucosa perjudicaría la biotinilación *in vivo* de los bacteriófagos

Por último, se procedió a determinar si el crecimiento en presencia de glucosa podía mejorar el nivel de biotinilación de los bacteriófagos. Esta condición se exploró al considerar que la glucosa inhibe la expresión de proteínas del

fagémido al actuar sobre el promotor *lac*. En consecuencia, la presencia de este azúcar, podría disminuir la carga metabólica bacteriana previo a la inducción de estas proteínas y una vez inducidas, favorecer su expresión en forma soluble. Con este objetivo, se crecieron bacteriófagos en AVB100F' como se indicó previamente (sección 3.8) sin adición de glucosa, con adición de glucosa en el cultivo overnight de partida ó adicionando glucosa tanto en el cultivo overnight de partida como en la dilución a partir de éste. Luego, las células se dejaron crecer, se infectaron con helper y previo a la inducción con IPTG, se centrifugaron los cultivos y re-suspendieron en SB fresco en ausencia de glucosa para permitir la expresión proteica.

Estos sobrenadantes se analizaron por ELISA sensibilizando con BSA-microcistina y empleando estreptavidina-peroxidasa para la detección (**Figura 22**). Para evitar diferencias debidas a la concentración de fagos y no a su grado de biotinilación, en este ensayo se comparó directamente la señal generada con las cantidades de fagos preparados en distintas condiciones. Para esto se titularon previamente los sobrenadantes mediante plaqueo en LB agar (sección 3.3.1). Esta aproximación, debió haberse utilizado en los experimentos anteriores, ya que hubiese proporcionado una noción directa sobre el nivel de biotinilación de los bacteriófagos, en forma independiente de su producción.

Al analizar la **Figura 22** se puede apreciar que el nivel más alto de señal se obtuvo cuando los cultivos estuvieron exentos de glucosa. A su vez, el ajuste no-lineal sobre esta curva arrojó un $\text{LogIC}_{50}=9,05\pm 0,19$, superior al obtenido cuando se adicionó glucosa sólo en el cultivo overnight ($\text{LogIC}_{50}=8,52\pm 0,13$). Por último, cuando se agregó glucosa tanto en el cultivo de partida overnight, como en el crecimiento al día siguiente, se observó un mayor decaimiento en cuanto a la señal obtenida y la curva presentó un $\text{LogIC}_{50}=8,97\pm 0,33$. Si bien este valor es próximo al obtenido cuando los cultivos se crecen en ausencia de glucosa, debe tenerse en cuenta que la señal máxima aquí es muy baja, lo cual indica una baja biotinilación.

En resumen, la mejor biotinilación parecería darse cuando nunca se agrega glucosa al medio. Esto podría estar dado porque a pesar de cambiarse el

medio previo a la inducción todavía podría quedar algo de glucosa presente reprimiendo al promotor *lac*. Otra posibilidad, es que la expresión proteica basal, previo a la inducción con IPTG, favorezca el empaquetamiento de pVIII biotinilada una vez dada la infección con fago helper.

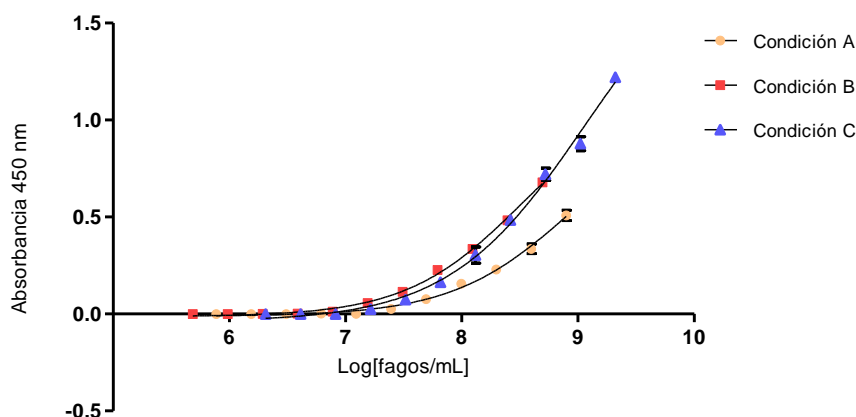


Figura 22. Efecto del crecimiento en presencia de glucosa, en la biotinilación *in vivo* de bacteriófago. Se muestran los resultados obtenidos por ELISA cuando se sensibilizó con BSA-microcistina 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se reveló con un conjugado estreptavidina-peroxidasa 1/5000. Las condiciones evaluadas fueron: A. Presencia de glucosa en el cultivo overnight de partida y en la dilución a partir de éste B. Presencia únicamente en el cultivo overnight de partida y C. Crecimiento en ausencia de glucosa. En todos los casos los datos fueron sujetos a un ajuste log (dose) vs. Response- variable slope con el software Graphpad prism 5.0.

5.8 Biotinilación *in vitro* de bacteriófagos expresando pVIII-AviTag producidos en AVB100F'

A modo de constatar la eficacia de la biotinilación *in vivo* de los bacteriófagos, se decidió compararla con la biotinilación *in vitro*. Esta condición se exploró al considerar que la proteína pVIII-AviTag es exportada constantemente al periplasma, mientras que la enzima *BirA* reside en el citoplasma. La distinta compartimentalización de ambas proteínas presentaría un problema para la biotinilación *in vivo* pero no para la biotinilación *in vitro*, donde el bacteriófago ya se ha formado y se incuba con un extracto de la

enzima *BirA*. Este último camino, además de permitir evaluar la eficacia relativa de la biotinylación *in vivo*, podría mejorar la biotinylación de estos bacteriófagos ya biotinylados. Si bien este camino no es tan elegante, reportes previos del grupo dieron muy buenos resultados llegando hasta un 100% de biotinylación en el caso de la producción de proteínas recombinantes⁹⁵. Para emplear la biotinylación *in vitro* fue necesario ponerla a punto como se describe a continuación.

5.8.1 El uso de un extracto de *BirA* permitió la biotinylación *in vitro* de una proteína modelo.

A modo de poner a punto la biotinylación *in vitro*, se preparó un extracto de *BirA* a partir de un cultivo de células BL21 transformadas con el plásmido pCY216 (BL21-*BirA*) y se determinó su eficiencia evaluando el nivel de biotinylación para un nanobody “E11” que expresaba el péptido aceptor de biotina (E11-AviTag), obtenido por la Lic. Triana Delfín en su tesis de maestría (Triana Delfin, Manuscrito en preparación).

El nanobody E11-AviTag se produjo en células BL21 y el lisado celular se incubó con distintas dosis del extracto BL21-pBir en presencia de biotina. El nivel de biotinylación obtenido se evaluó en un ELISA donde se sensibilizó con hemoglobina (proteína para la cual es específica el nanobody) y se reveló con estreptavidina-peroxidasa (**Figura 23**). A modo de asegurar que la biotinylación era específica por el extracto BL21-pBir, se incubó el extracto E11-AviTag con PBS-Biotina en ausencia del extracto BL21-pBir y se empleó esta condición como control negativo.

En la **Figura 23** se observa que el nivel de biotinylación *in vitro* del nanobody E11 dependió fuertemente de la dosis del extracto crudo de BL21-pBir. La mayor señal se detectó cuando se empleó una relación 1:1 (extracto nanobody:extracto *BirA*). Cuando se redujo la dosis de extracto a la mitad (relación 2:1) también lo hizo la señal de biotinylación para el nanobody E11, y cuando se empleó una relación 4:1 la señal de biotinylación fue próxima a 0. A su vez, el control negativo no mostró señal alguna, asegurando que la biotinylación del nanobody fue específica por el extracto BL21-pBir. En base a

estos resultados, se concluyó que el extracto BL21-pBir debía utilizarse en una relación 1:1.

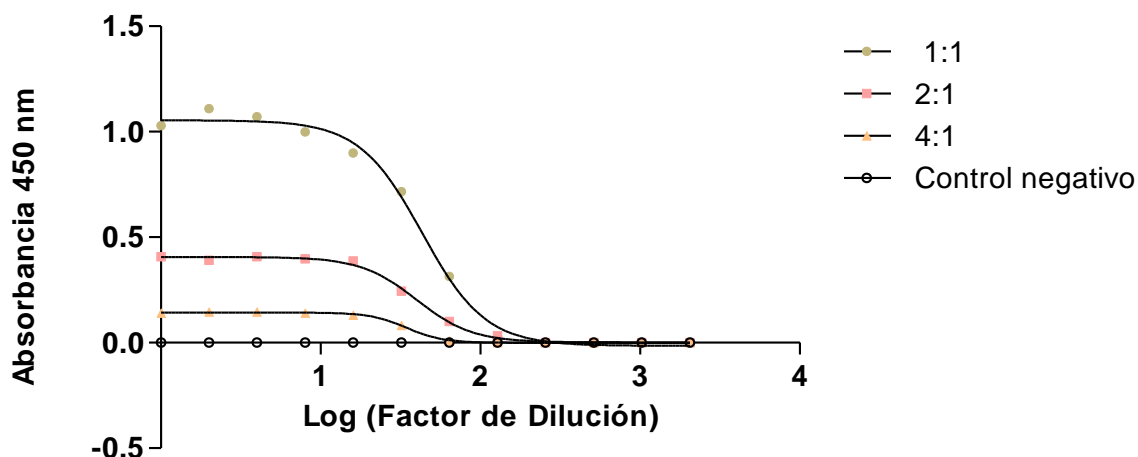


Figura 23. Biotinylación *in vitro* en función de la dosis del extracto BL21-pBir. Resultados obtenidos por ELISA al sensibilizar con Hemoglobina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y empleando un conjugado estreptavidina-peroxidasa (1/5000). Se muestran los resultados obtenidos al incubar el extracto de BL21-E11AviTag en una relación extracto nanobody:enzima 1:1, 2:1 y 4:1. Como control negativo se incubó el extracto BL21-E11AviTag con PBS-Biotina.

5.8.2 El uso del extracto de BirA permitió la biotinylación *in vitro* de los fagos producidos con el fagémido pINQ8b3-H11

Una vez determinada la dosis de extracto a utilizar, se procedió a explorar la biotinylación *in vitro* de fagos. Para esto, se produjeron bacteriófagos pINQ8b3-H11 en AVB100F' donde no se indujo la expresión de la *BirA* pero sí de pVIII-AviTag, de modo que pudiesen ser biotinylados *in vitro*. Los bacteriófagos se incubaron en una relación 1:1 con un extracto de BL21-pBir en presencia de biotina y para asegurar la especificidad de la biotinylación, se incubó la misma preparación de bacteriófagos con PBS-biotina. La evaluación mediante ELISA capturando los fagos con BSA-microcistina y estreptavidina-

peroxidasa para la detección mostró la eficiencia del proceso (Figura 24).

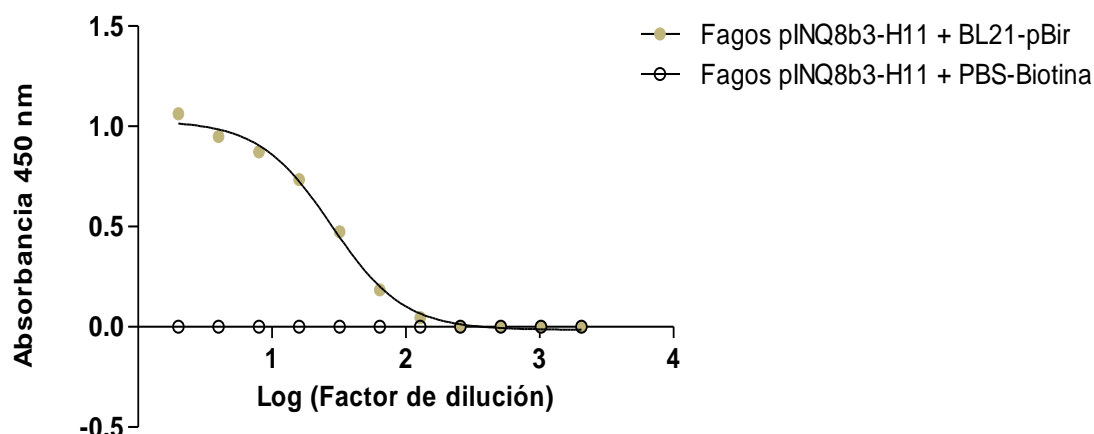


Figura 24. Biotinilación *in vitro* de fagos expresando pVIII-AviTag. Resultados obtenidos mediante ELISA cuando se sensibilizó con BSA-microcistina (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se empleó un conjugado estreptavidina-peroxidasa. Se muestran los resultados obtenidos para una preparación de fagos pINQ8b3 al incubarlos con un extracto de BL21-pBir ó con PBS-Biotina (control negativo).

5.8.3 La biotinilación *in vitro* no incrementó el nivel de biotinilación de bacteriófagos previamente biotinilados *in vivo*

En base a lo visto anteriormente, se procedió a determinar si la biotinilación *in vitro* podía aumentar el nivel de biotinilación de una preparación de fagos biotinilada previamente *in vivo*. En busca de esto, bacteriófagos pINQ8b3-H11 previamente biotinilados *in vivo* se incubaron con un extracto BL21-BirA en una relación 1:1 en presencia de biotina. En paralelo, se realizó una preparación de bacteriófagos pINQ8b3-H11 que también expresaban la pVIII-AviTag pero que no fueron biotinilados *in vivo*. Esta preparación a) se biotiniló *in vitro* con el extracto BL21-BirA, o b) se incubó con PBS-biotina como control negativo. Las preparaciones se evaluaron en un ELISA donde se capturó con BSA-microcistina y se empleó estreptavidina-peroxidasa para la detección (Figura 25). A modo de comparación, también se midió por ELISA la preparación de bacteriófagos biotinilados *in vivo* sin post-biotinilación *in vitro*. A excepción del control negativo, todas las preparaciones mostraron señales equivalentes. Esto indicó un nivel de biotinilación similar o idéntico

para los bacteriófagos biotinilados *in vivo* con o sin post-biotinilación *in vitro* (Esto es válido porque las concentraciones de fago en ambos casos fueron iguales). Los resultados expuestos sugieren que el nivel de biotinilación de las partículas virales está limitada por el grado de expresión de pVIII-AviTag en la superficie del fago. Por tanto, la biotinilación *in vivo*, funciona con alta eficiencia y luego de la misma no habría copias del péptido sin biotinar. Esto a su vez, permite inferir que la biotinilación de pVIII-AviTag previo al ensamblado viral, no actúa como una limitante para su incorporación en la cápside viral, dado que el número de copias de pVIII-AviTag incorporados en ausencia de biotinilación, parecería ser el mismo o muy similar, ya que luego de ser biotinilados *in vitro* la señal generada en el ELISA es la misma.

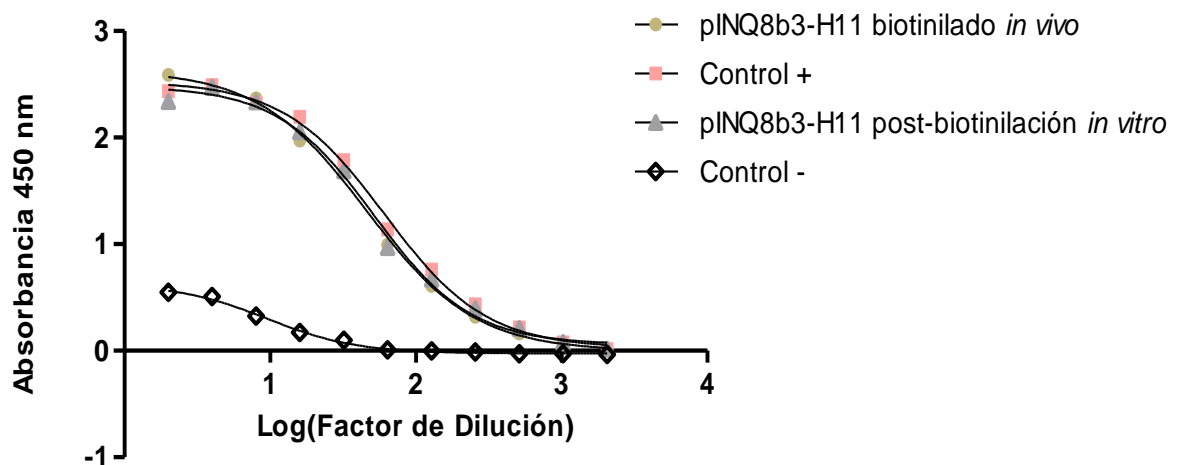


Figura 25. Ensayo de post-biotinilación *in vitro*. Se sometió a una preparación de fago biotinilado *in vivo* a post-biotinilación *in vitro* por incubación con un extracto crudo de BL21-pBir en una relación 1:1 y biotina. Como control positivo de la biotinilación *in vitro* se incubó con el extracto una preparación de fago con pVIII-AviTag sin biotinar y como control negativo se incubó a la misma preparación con PBS-biotina. Todas las incubaciones se realizaron overnight a 37°C. Las preparaciones se midieron por ELISA, sensibilizando con BSA-microcistina 0,5 µg/mL y empleando un conjugado estreptavidina-peroxidasa (1/5000). A modo de comparación, se midió también en ELISA la preparación de fago biotinilado *in vivo* sin post-biotinilación.

5.9 Estimación del número de moléculas de biotina en la partícula viral.

La estimación del número de biotinas promedio por bacteriófago se abordó mediante medición por ELISA o Western Blot.

5.9.1 La proporción de pVIII biotinilada parece ser muy baja para ser detectada por Western Blot

Aquí se buscó determinar el número de biotinas totales en las preparaciones de bacteriófagos por Western Blot. Para esto, se sembraron 30 μL sin diluir o de la dilución 1/10 de fagos pINQ8b3-A2 ó pINQ8b3-H11 lo que correspondería a aproximadamente a $2,0 \times 10^{11}$ fagos. Para correlacionar la señal con la cantidad de biotina, se construyó una curva de calibración sembrando distintas concentraciones de nanobody A2 biotinilado, que consta de una única biotina por molécula de nanobody. En la **Figura 26** se observa el Western Blot obtenido que permitió detectar hasta 0,05 μg de nanobody biotinilado (equivalente a 3 picomoles de biotina). A pesar de la alta sensibilidad, la presencia de pVIII biotinilada en la preparación de bacteriófagos no fue detectable.

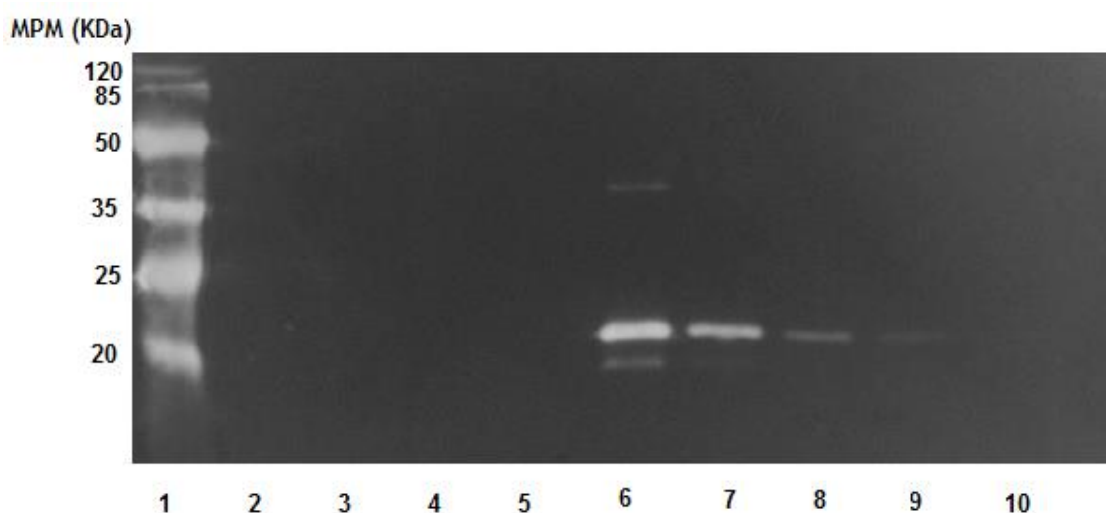


Figura 26. Western blot para la determinación de biotinas totales. Se muestran los resultados obtenidos por Western Blot donde se sembró el marcador de peso molecular (MPM; Pierce #26612) (1), 30 μL de la preparación del pINQ8b3-H11 (2) ó pINQ8b3-A2 (4), 30 μL de la dilución 1/10 de la preparación del pINQ8b3-H11 (3) ó pINQ8b3-A2 (5), y

distintas cantidades del nanobody H11 biotinilado: 1 μg (6) 0,5 μg , (7) 0,1 μg (8), 0,05 μg (9) y 0,01 μg (10).

5.9.2 La técnica de ELISA permitió estimar la cantidad de biotinas promedio por fago

Se realizó un ELISA en placas sensibilizadas con BSA-microcistina y revelado con estreptavidina-peroxidasa. En este, se sembraron distintas diluciones de las preparaciones de bacteriófagos y se construyó una curva de calibración con el nanobody H11 biotinilado. En paralelo, se sembraron las mismas diluciones de preparaciones de bacteriófagos y se las sometió todos los pasos del ELISA pero en lugar de agregar el conjugado de estreptavidina, los fagos se eluyeron con pH 2.7 y se neutralizaron para luego cuantificarlos mediante qPCR (sección 3.3.4). La cantidad obtenida se consideró representativa de la presente en el pocillo que sí fue revelado y para el cual se cuantificó el total de biotina.

En la **Figura 27** se muestra la curva de calibración obtenida para el número de moléculas de biotina, a partir del nanobody H11 biotinilado, que permitió interpolar la cantidad de biotinas para distintas diluciones de la preparación de bacteriófagos pINQ8b3-H11 como se describe en la **Tabla 4**.

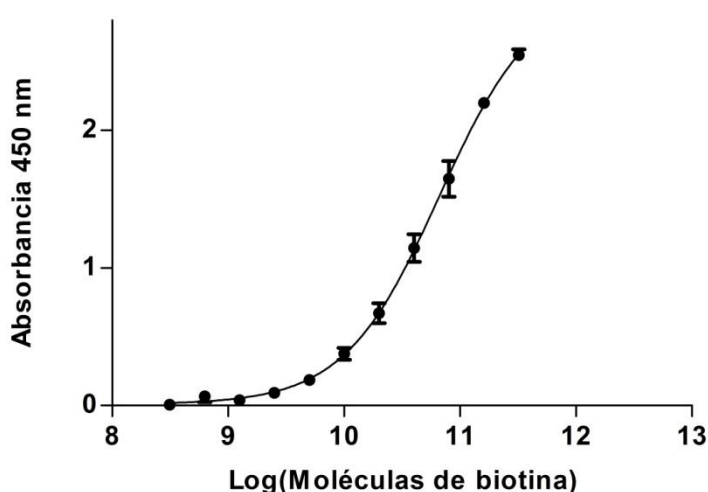


Figura 27. Curva de calibración moléculas de biotina. Se muestran los resultados obtenidos por ELISA al sensibilizar con BSA-microcistina (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y usando estreptavidina-peroxidasa (1/5000) para la detección. Se construyó una curva de

calibración para la cantidad de moléculas de biotina empleando cantidades conocidas del nanobody H11 biotinilado.

Tabla 4. Cantidad de moléculas de biotina obtenida para distintas diluciones del stock de fagos pINQ8b3-H11 a partir de la curva de calibración

| Factor de dilución preparación de fagos | Absorbancia 450 nm | Log(Moléculas de Biotina) | Moléculas de Biotina totales | Promedio Moléculas Biotina |
|---|-----------------------|------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| 8 | 1,464 | 10,79 | $6,2 \times 10^{10}$ | $6,7 \times 10^{10}$ |
| 8 | 1,584 | 10,86 | $7,2 \times 10^{10}$ | |
| 16 | 0,975 | 10,51 | $3,2 \times 10^{10}$ | $3,7 \times 10^{10}$ |
| 16 | 1,137 | 10,61 | $4,1 \times 10^{10}$ | |

En la **Figura 28** se ilustran las curvas obtenidas mediante qPCR para los bacteriófagos que fueron eluidos, así como las obtenidas con concentraciones conocidas de los mismos. A partir del Ct de estas curvas se construyó una curva de calibración, ilustrada en la **Figura 29**, que permitió determinar la cantidad de bacteriófagos en las distintas diluciones, que se detallan en la **Tabla 5**, junto al número estimado de biotinas por fago en cada caso. En base a esto, se estimó una cantidad media de 52 biotinas/fago. Si bien este valor es esperable, es relativamente bajo, dado que se ha reportado que la densidad de proteínas pVIII recombinantes puede ir desde 1000/fago a menos de 100/fago en sistemas fagémido, lo que depende en gran medida del tamaño del vector y del promotor empleado para la expresión proteica^{115,116}.

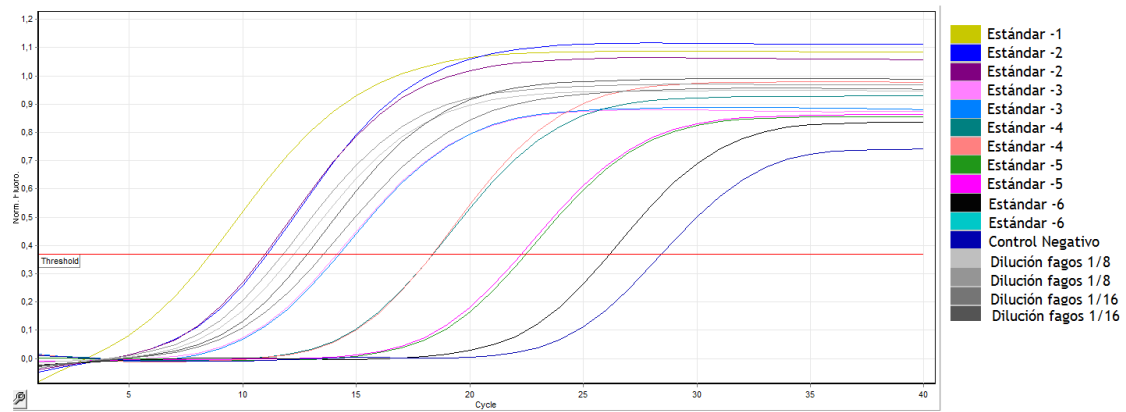


Figura 28. Curvas obtenidas para la medición de bacteriófagos por qPCR. Se muestran los gráficos de fluorescencia en función de los ciclos de amplificación de diluciones seriadas de una preparación de bacteriófagos de concentración conocida, así como de las muestras de bacteriófagos de concentración a determinar. El umbral se fijó en 0,037.

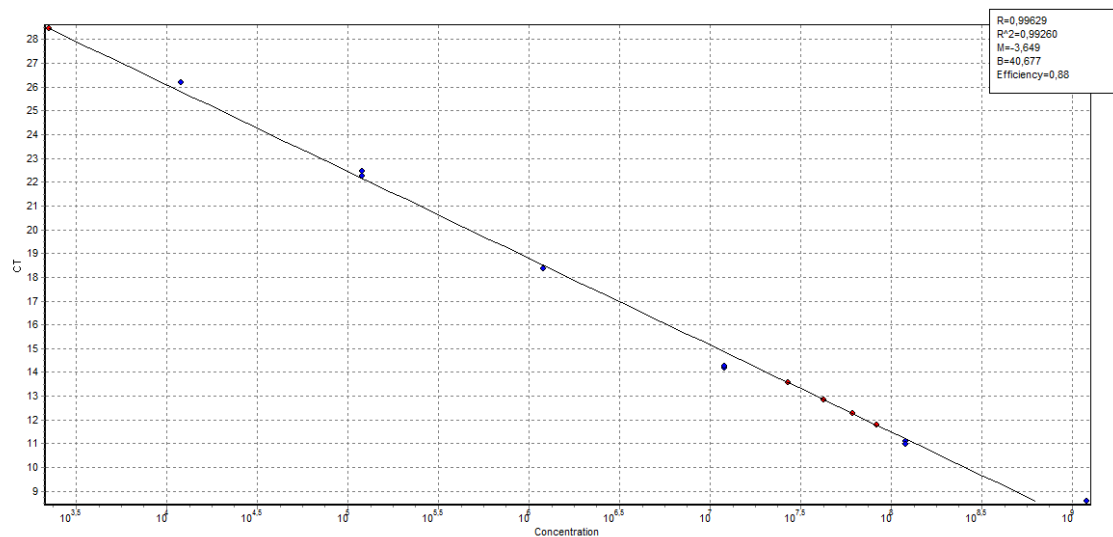


Figura 29. Curva de calibración para la medición de bacteriófagos por qPCR. En azul se muestran los puntos de concentración conocida, mientras que en rojo los de concentración a determinar.

Tabla 5. Estimación de la cantidad de biotinas por fago, mediante titulación qPCR.

| <i>Determinación mediante qPCR</i> | | | |
|------------------------------------|-----------------------|-------------------------|----------------------|
| Biotinas/fago | Fagos totales | Biotinas totales | Biotinas/fago |
| 8 | 1,22 x10 ⁹ | 6,7x10 ¹⁰ | 54,9 |
| 8 | 1,66 x10 ⁹ | | 40,4 |
| 16 | 5,36 x10 ⁸ | 3,7x10 ¹⁰ | 69,0 |
| 16 | 8,44 x10 ⁸ | | 43,8 |

6.0 La captura de bacteriófagos biotinilados con beads conjugados a estreptavidina parece indicar que una proporción importante de fagos no están biotinilados.

Con el fin de continuar evaluando la biotinilación *in vivo* de los bacteriófagos, se estudió la capacidad de estos para ser retenidos por beads magnéticas conjugadas a estreptavidina. Este ensayo permite no sólo saber qué porcentaje de la preparación de bacteriófagos están biotinilados, sino también valorar el potencial de esta tecnología para lograr el enfrentamiento de bibliotecas de péptidos con bibliotecas de anticuerpos, vía inmovilización de una de estas como se mencionó en la introducción. Para esto, una cantidad conocida de bacteriófagos pINQ8b3-H11 se incubó con un exceso de estas beads (asumiendo 100 biotinas/fago se utilizó un exceso de 1000 veces de la capacidad de unión a biotina de las beads). Luego, se recuperó la fracción no retenida y se hicieron 3 lavados con TBS-Tween 0,05%. Todas las fracciones fueron tituladas por placa (2.3.1) y qPCR (2.3.4), como se ilustra en la **Tabla 6 y 7**, respectivamente. A su vez, en la **Figura 30** se ilustran las curvas obtenidas mediante qPCR para los ciclos de amplificación en función de la fluorescencia, de concentraciones de fago estándar y de las distintas fracciones. En estas curvas se observa que el control negativo tuvo un valor de Ct muy próximo al de los lavados, por lo que las fracciones de lavado no se

tomaron en cuenta para la titulación por qPCR. En la **Figura 31** por otro lado, se muestra la curva de calibración obtenida cuando se graficó el Ct obtenido para concentraciones conocidas de bacteriófagos.

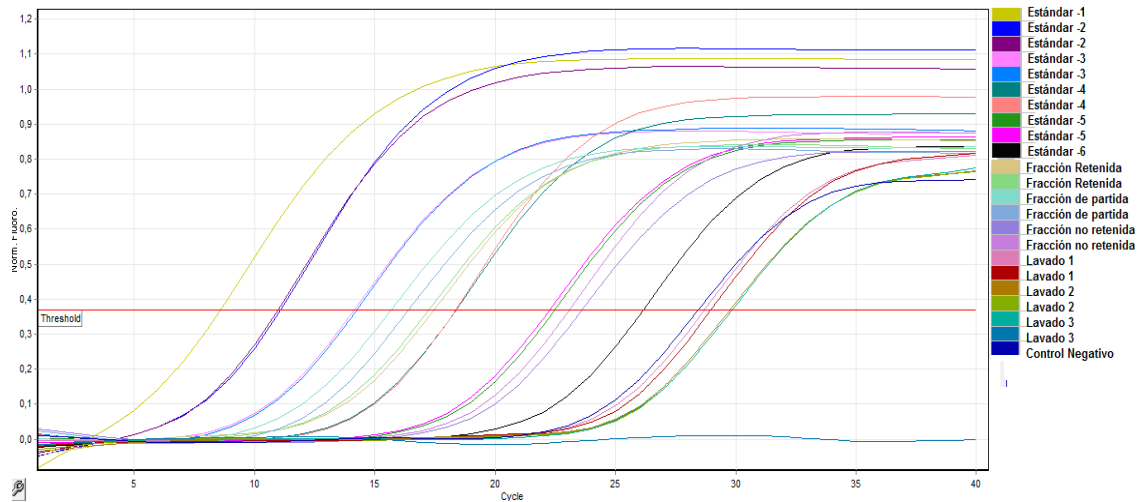


Figura 30. Curvas obtenidas mediante qPCR para la medición de bacteriófagos en las distintas fracciones. Se muestran los ciclos de amplificación en función de la intensidad de fluorescencia para concentraciones conocidas de bacteriófagos y para las fracciones a determinar la concentración. El umbral se fijó en 0,37.

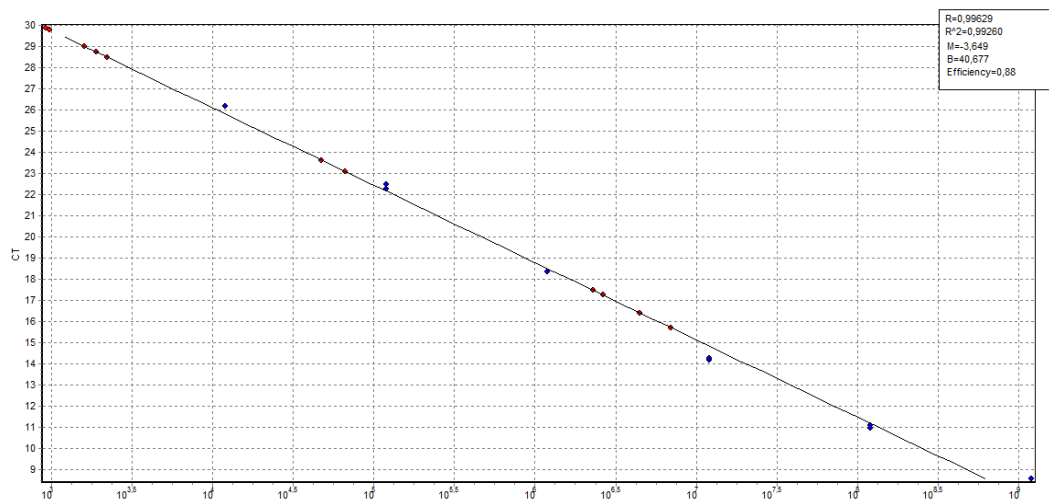


Figura 31. Curva de calibración para la medición de bacteriófagos por qPCR. En azul se muestran los puntos de concentración conocida y en rojo aquellos a determinar.

Al intentar capturar los fagos biotinilados con beads conjugadas a estreptavidina, se observó que la cantidad de fagos retenida por las beads parecería ser muy poca, tan sólo un 10% del total de fagos iniciales al titular

por placa. Sin embargo, esto podría deberse a que la presencia de beads dificulta la infección de las bacterias por parte de los fagos. Al calcularse el porcentaje de fagos retenidos como $\% \text{Retenido} = (\text{Fagos totales} - \text{fagos no unidos} / \text{fagos totales}) \times 100$ la cantidad de fagos retenidos llegaría a un 50%, es decir que la mitad de los fagos estarían siendo retenidos por las beads. La titulación por qPCR reafirma esta hipótesis, donde se obtuvo un 43% de fagos recuperados en la fracción incubada con las beads. En este caso, al calcular el % retenido se obtuvo un 60%. Nuevamente, este número es mayor al 43% obtenido al titular por qPCR la fracción incubada con las beads. Se estima que esto podría deberse también a que las beads de algún modo afecten la reacción de PCR catalizada por la polimerasa.

De todos modos, resulta desconcertante que el total de los fagos no sea retenido por las beads, siendo que estas se encontraban en exceso y que de acuerdo al resultado previo (estimación por ELISA) los fagos estarían biotinilados con decenas de moléculas de biotina en promedio. La posibilidad de que existan bacteriófagos que no cuenten con ninguna biotina resulta por tanto contraintuitiva, dado que se esperaría una incorporación relativamente uniforme de las mismas. Podría ser que durante la producción de partículas virales, en algún momento del cultivo la carga metabólica celular inhiba la actividad de la *BirA* y de este modo, los fagos producidos en forma más tardía no estén biotinilados. Otra explicación más probable sería que la cantidad de pVIII biotinilada haya sido sobre-estimada en la determinación por ELISA. De todas formas, sería importante confirmar este resultado, por ejemplo tratando de confirmar la ausencia de retención de la fracción no retenida con un volumen adicional de beads para descartar posibles artefactos, dado lo desconcertante de este resultado.

Tabla 6. Titulación por Placa de las distintas fracciones de fagos obtenidas mediante incubación con beads magnéticas conjugadas a estreptavidina.

| <i>Titulación por placa</i> | | | |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Fracción | Fagos/mL | Fagos totales | %Fagos Recuperados |
| Solución de partida | $1,3 \times 10^7$ | $2,6 \times 10^6$ | - |
| No retenida | $5,5 \times 10^6$ | $1,1 \times 10^6$ | 42,3 |
| Retenida | $1,3 \times 10^6$ | $2,6 \times 10^5$ | 10,0 |
| Lavado 1 | $5,0 \times 10^5$ | $1,0 \times 10^5$ | 3,8 |
| Lavado 2 | $1,0 \times 10^5$ | $2,0 \times 10^4$ | 0,8 |
| Lavado 3 | $4,0 \times 10^5$ | $8,0 \times 10^4$ | 3,1 |

Tabla 7. Titulación por qPCR de las distintas fracciones de fagos obtenidas mediante incubación con beads magnéticas conjugadas a estreptavidina.

| <i>Titulación por qPCR</i> | | | | | |
|----------------------------|-------------------------------|---------------------|-------------------|-------------------|---------------------|
| Muestra | Fagos/ μ L | xFactor de Dilución | Fagos totales | Promedio | % Fagos Recuperados |
| Solución de partida | $7,0 \times 10^6$ | $7,0 \times 10^6$ | $1,4 \times 10^9$ | $1,1 \times 10^9$ | |
| Solución de partida | $4,5 \times 10^6$ | $4,5 \times 10^6$ | $8,9 \times 10^8$ | | |
| Retenida | $2,3 \times 10^6$ | $2,3 \times 10^6$ | $4,6 \times 10^8$ | $4,9 \times 10^8$ | 43% |
| Retenida | $2,6 \times 10^6$ | $2,6 \times 10^6$ | $5,3 \times 10^8$ | | |
| No retenida | $4,7 \times 10^4$ | $1,9 \times 10^6$ | $3,8 \times 10^8$ | $4,5 \times 10^8$ | 40% |
| No retenida | $6,6 \times 10^4$ | $2,6 \times 10^6$ | $5,3 \times 10^8$ | | |
| Lavados | Se superponen con el negativo | | | | |

6.1 El ensayo montado para la determinación de microcistina con los fagos biotinilados *in vivo* resultó muy poco sensible.

Con el bacteriófago biotinilado *in vivo* se desarrolló un ELISA competitivo para la detección de microcistina-LR. Dado que existían muy buenos antecedentes del grupo para este tipo de inmunoensayo con el nanobody H11 y A2

biotinilados¹¹⁴, se hipotetizó que la presencia de numerosas biotinas en el fago podría aumentar aún más la sensibilidad conseguida hasta el momento.

Para realizar este ensayo se trabajó con los vectores corregidos conteniendo el nanobody A2 y H11 (pINQ-8b3gxs-A2/H11). Sin embargo, cuando se retomó el trabajo sobre el pINQ-8b3gxs-A2, las producciones de bacteriófagos dejaron de mostrar señal por ELISA al revelar con el conjugado estreptavidina-peroxidasa (Resultado no ilustrado) y por tanto se prosiguió el ensayo con bacteriófagos expresando el nanobody H11. Para esto, primero se tituló el stock de fagos pINQ8b3-H11 mediante ELISA en placas cubiertas con microcistina-BSA y revelando con estreptavidina-peroxidasa, para determinar la concentración de bacteriófagos que arrojaba una Absorbancia 450nm de ~1 UA, la cual sería óptima para emplear en el inmunoensayo competitivo. Una vez determinada esta concentración, se procedió a evaluar el bacteriófago como reactivo para la detección de microcistina. En la **Figura 32** se muestran los resultados obtenidos para el ELISA competitivo para la detección de Microcistina-LR. En este se graficó el Log (MC-LR) contra el %A/A₀, donde A es la absorbancia a 450 nm para una concentración dada de microcistina-LR y A₀ es la absorbancia a 450 nm en ausencia de competidor. Al realizar un ajuste no-lineal sobre esta curva con el software GraphPad Prism se obtuvo un Log(IC₅₀)=1,526±0,019, que se corresponde con un IC₅₀ en el rango de (30-37 µg/L) para un 95% de confianza. Este valor es considerablemente mayor al conseguido en el inmunoensayo desarrollado previamente con el nanobody recombinante, donde se obtuvo un IC₅₀=0,63 µg/L con este mismo nanobody H11¹¹⁴. El límite de detección (LD) del ensayo, calculado como la concentración de microcistina-LR que se corresponde con el valor obtenido para A₀ menos 3 desvíos estándar, dio un valor de 1,82 µg/L. Este valor también fue considerablemente menos sensible a lo reportado con el nanobody recombinante, donde se obtuvo un LD=0,08 µg/L ¹¹⁴.

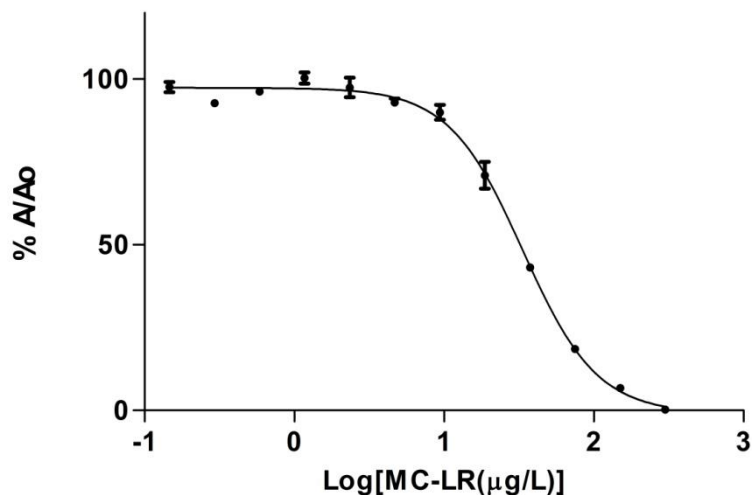


Figura 32. Ensayo ELISA competitivo para la detección de Microcistina-LR. Se muestra la curva obtenida por ELISA competitivo para la detección de Microcistina-LR empleando bacteriófagos pINQ8b3-H11 biotinilados *in vivo*. Se graficó el logaritmo de la concentración de microcistina vs. %A/Ao, donde A se corresponde a la absorbancia 450 nm en presencia de microcistina y Ao en ausencia.

Esta disminución en la sensibilidad, contraria a lo esperado, podría deberse a que la población de bacteriófagos no se encuentra homogéneamente biotinilada y que existan bacteriófagos no biotinilados. Estos últimos podrían competir con los bacteriófagos biotinilados por los sitios de unión en la placa, y al unirse a la microcistina soluble se liberarían sin provocar una disminución de señal. De hecho, esta observación concuerda con lo observado para la captura de bacteriófagos mediante beads conjugadas a estreptavidina, donde un 50% de los fagos no estarían siendo retenidos y sustenta la idea de que exista una población de bacteriófagos sin biotinar. Si en efecto, este fuese el mayor problema, podría mejorarse la calidad del reactivo mediante purificación por cromatografía de afinidad de forma de obtener una fracción que contenga sólo bacteriófagos biotinilados.

7. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

En este trabajo se buscó generar bacteriófagos capaces de biotinilarse *in vivo* y que expresasen a su vez un nanobody en su superficie, por su potencial para ser usados como reactivos en inmunoensayos y en la selección de bibliotecas de anticuerpos por *phage-display*.

Se logró construir un vector fagémido (pINQ8b3) que permite la biotinilación de bacteriófagos *in vivo* y la expresión simultánea de un nanobody a elección, como en este caso fueron el nanobody H11 y A2. La biotinilación *in vivo* de los fagos se exploró en dos cepas distintas de células *E. coli* como fueron las ER2738-*pcy216* y las AVB100F'. En las primeras no se pudo constatar que los bacteriófagos se estuviesen biotinilando a pesar de que estos expresaban el nanobody H11. Por otro lado, en las células AVB100F' se logró obtener bacteriófagos biotinilados *in vivo* pero que en un principio no expresaban nanobody. Se constató que esto se debía a que la cepa AVB100F' - a diferencia de las ER2738 - no es supresora para el codón stop *amber* y por tanto siempre lo lee como una señal de finalización de la traducción. Como consecuencia, todo el nanobody se expresa en forma soluble y nunca fusionado a pIII. Este inconveniente se resolvió modificando el vector por mutagénesis dirigida, donde se cambió el codón *amber* por un codón codificante para el ácido glutámico. Como resultado, se logró generar bacteriófagos biotinilados expresando el nanobody A2 ó H11.

A modo de determinar la eficacia de la biotinilación, se estimó la cantidad de biotinas por partícula viral, constatándose un promedio de 52 biotinas/fago en la preparación de bacteriófagos expresando el nanobody H11. Se exploró si este grado de biotinilación podía ser aumentado por post-biotinilación *in vitro*, y se constató que la post-biotinilación *in vitro* no fue capaz de aumentarlo. Estos resultados indicaron que la biotinilación *in vivo* funciona con alta eficiencia, y que luego de la misma no habría copias de péptido sin biotinar. A su vez, sugiere que el nivel de biotinilación está limitado por el grado de expresión de pVIII-AviTag en la partícula viral.

Se estudió también la capacidad de las preparaciones de bacteriófagos biotinilados para ser inmovilizados por beads magnéticas conjugadas a estreptavidina. En este experimento se estimó que aproximadamente la mitad de los bacteriófagos no estarían siendo inmovilizados en las beads. Esta observación resultó desconcertante y teniendo en cuenta que nuestra estimación es de un promedio de ~50 biotinas por fago, es muy poco probable que un alto número de fagos no tengan al menos algunas proteínas pVIII biotiniladas. Esto podría sugerir que se ha sobre-estimado la cantidad de biotinas por fago, o que ocurrió algún artefacto, pero en cualquier caso debería estudiarse en mayor profundidad.

Por otra parte, se emplearon bacteriófagos biotinilados expresando el nanobody H11 como reactivo en un inmunoensayo competitivo para la detección de microcistina-LR. Este inmunoensayo arrojó un límite de detección de 1,82 $\mu\text{g/L}$, constatándose una sensibilidad considerablemente menor a la reportada cuando se utilizó directamente al nanobody recombinante ($\text{LD}=0,08 \mu\text{g/L}$)¹¹⁴. Esto también parece indicar que la biotinilación puede ser inferior a las ~50 moléculas de biotina por fago, lo que daría lugar a una modesta señal al utilizar estreptavidina-peroxidasa para la detección.

A futuro, la generación de bacteriófagos biotinilados para su empleo como reactivos podría mejorarse de distintas formas. Una posibilidad es aumentar el display de la proteína pVIII recombinante en la superficie del fago. Esto podría lograrse empleando un péptido líder distinto al pelB, de hecho, Steiner et. al.¹¹⁷ reportaron que el cambio de péptidos líder que dirigen la exportación por la vía *Sec* - como lo hace el pelB - por otros que actúan por la vía *SRP* logró aumentar la presentación hasta 700 veces. Otra posibilidad sería emplear un promotor arabinosa, en lugar del promotor *lac*; Fagerlund et. al.¹¹⁸ reportaron que este cambio podía aumentar 10 veces la presentación respecto a la del vector original. Por último, una posibilidad muy atractiva sería el empleo de vectores de fago modificados, que expresen la proteína pIII fusionada al nanobody de interés y que consten con dos copias de la proteína pVIII, una wild-type y otra recombinante, fusionada al AviTag. Este tipo de

sistema fue empleado por Smelyianski & Garshoni, dando muy buenos resultados¹¹⁹.

BIBLIOGRAFÍA

1. MARVIN, D. A. & HOFFMANN-BERLING, H. A FIBROUS DNA PHAGE (FD) AND A SPHERICAL RNA PHAGE (FR) SPECIFIC FOR MALE STRAINS OF E COLI. II. PHYSICAL CHARACTERISTICS. *Zeitschrift fur Naturforschung. Teil B, Chemie, Biochemie, Biophysik, Biologie und verwandte Gebiete* **18**, 884-93 (1963).
2. LOEB, T. Isolation of a bacteriophage specific for the F plus and Hfr mating types of Escherichia coli K-12. *Science (New York, N.Y.)* **131**, 932-3 (1960).
3. HAYES, W. Recombination in Bact. coli K 12; unidirectional transfer of genetic material. *Nature* **169**, 118-9 (1952).
4. HOFFMANN BERLING, H. & MAZE, R. RELEASE OF MALE-SPECIFIC BACTERIOPHAGES FROM SURVIVING HOST BACTERIA. *Virology* **22**, 305-13 (1964).
5. Rakonjac, J., Bennett, N. J., Spagnuolo, J., Gagic, D. & Russel, M. Filamentous bacteriophage: biology, phage display and nanotechnology applications. *Current issues in molecular biology* **13**, 51-76 (2011).
6. Newman, J., Swinney, H. L. & Day, L. A. Hydrodynamic properties and structure of fd virus. *Journal of molecular biology* **116**, 593-603 (1977).
7. Pratt, D., Tzagoloff, H. & Beaudoin, J. Conditional lethal mutants of the small filamentous coliphage M13. II. Two genes for coat proteins. *Virology* **39**, 42-53 (1969).
8. Opella, S. J., Stewart, P. L. & Valentine, K. G. Protein structure by solid-state NMR spectroscopy. *Quarterly Reviews of Biophysics* **19**, 7 (1987).
9. Glucksman, M. J., Bhattacharjee, S. & Makowski, L. Three-dimensional structure of a cloning vector. *Journal of Molecular Biology* **226**, 455-470 (1992).
10. Makowski, L. Structural constraints on the display of foreign peptides on filamentous bacteriophages. *Gene* **128**, 5-11 (1993).
11. Kay, B. K., Winter, J. & McCafferty, J. *Phage display of peptides and proteins: a laboratory manual*. (1996). doi:10.1016/B978-012402380-2/50014-9
12. Lopez, J. & Webster, R. E. Morphogenesis of filamentous bacteriophage f1: Orientation of extrusion and production of polyphage. *Virology* **127**, 177-193 (1983).

13. Makowski, L. Terminating a macromolecular helix. *Journal of Molecular Biology* **228**, 885-892 (1992).
14. Simons, G. F., Beintema, J., Duisterwinkel, F. J., Konings, R. N. & Schoenmakers, J. G. Genes VI, VII and IX of bacteriophage M13: identification of their products as minor capsid proteins. *Progress in clinical and biological research* **64**, 401-11 (1981).
15. Rakonjac, J. & Model, P. Roles of pIII in filamentous phage assembly. *Journal of Molecular Biology* **282**, 25-41 (1998).
16. Stengele, I., Bross, P., Garces, X., Giray, J. & Rasched, I. Dissection of functional domains in phage fd adsorption protein. *Journal of Molecular Biology* **212**, 143-149 (1990).
17. Gray, C. W., Brown, R. S. & Marvin, D. A. Adsorption complex of filamentous fd virus. *Journal of Molecular Biology* **146**, 621-627 (1981).
18. Marvin, D. Filamentous phage structure, infection and assembly. *Current Opinion in Structural Biology* **8**, 150-158 (1998).
19. Crissman, J. W. & Smith, G. P. Gene-III protein of filamentous phages: Evidence for a carboxyl-terminal domain with a role in morphogenesis. *Virology* **132**, 445-455 (1984).
20. Kremser, A. & Rasched, I. The Adsorption Protein of Filamentous Phage fd: Assignment of Its Disulfide Bridges and Identification of the Domain Incorporated in the Coat. *Biochemistry* **33**, 13954-13958 (1994).
21. Armstrong, J., N. Perham, R. & Walker, J. E. Domain structure of bacteriophage fd adsorption protein. *FEBS Letters* **135**, 167-172 (1981).
22. Deng, L.-W., Malik, P. & Perham, R. N. Interaction of the Globular Domains of pIII Protein of Filamentous Bacteriophage fd with the F-Pilus of *Escherichia coli*. *Virology* **253**, 271-277 (1999).
23. Riechmann, L. & Holliger, P. The C-Terminal Domain of TolA Is the Coreceptor for Filamentous Phage Infection of *E. coli*. *Cell* **90**, 351-360 (1997).
24. Webster, R. E. The tol gene products and the import of macromolecules into *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **5**, 1005-1011 (1991).
25. Geider, K. & Kornberg, A. Conversion of the M13 viral single strand to the double-stranded replicative forms by purified proteins. *The Journal of biological chemistry* **249**, 3999-4005 (1974).
26. Brutlag, D., Schekman, R. & Kornberg, A. A possible role for RNA polymerase in the initiation of M13 DNA synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **68**, 2826-2829 (1971).

27. Lin, N. S.-C. & Pratt, D. Role of bacteriophage M13 gene 2 in viral DNA replication. *Journal of Molecular Biology* **72**, 37-49 (1972).
28. Meyer, F. CLEAVAGE of Gene II-Protein homogeneous inhibited. **254**, 12642-12646 (1979).
29. Horiuchi, K. Initiation mechanisms in replication of filamentous phage DNA. *Genes to Cells* **2**, 425-432 (1997).
30. Marvin, D. A. Hohn, B. Filamentous Bacterial viruses. *Bacteriological reviews* **33**, 172-209 (1969).
31. Alberts, B., Frey, L. & Delius, H. Isolation and characterization of gene 5 protein of filamentous bacterial viruses. *Journal of Molecular Biology* **68**, 139-152 (1972).
32. Cavalieri, S. J., Neet, K. E. & Goldthwait, D. A. Gene 5 protein of bacteriophage fd: A dimer which interacts Co-operatively with DNA. *Journal of Molecular Biology* **102**, 697-711 (1976).
33. Pratt, D., Laws, P. & Griffith, J. Complex of bacteriophage M13 single-stranded DNA and gene 5 protein. *Journal of Molecular Biology* **82**, 425-439 (1974).
34. Bauer, M. & Smith, G. P. Filamentous phage morphogenetic signal sequence and orientation of DNA in the virion and gene-V protein complex. *Virology* **167**, 166-175 (1988).
35. Fulford, W. & Model, P. Gene X of bacteriophage f1 is required for phage DNA synthesis. *Journal of Molecular Biology* **178**, 137-153 (1984).
36. Barbas, C. F., Burton, D. R., Scott, J. K. & Silverman, G. J. Phage Display: A Laboratory Manual. in *Phage Display: A Laboratory Manual* 1.13-1.15 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2004).
37. Model, P. & Russel, M. Filamentous bacteriophage. in *The bacteriophages* (ed. Calendar, R.) **2**, 375-456 (Plenum Publishing, 1988).
38. Lopez, J. & Webster, R. E. Assembly site of bacteriophage f1 corresponds to adhesion zones between the inner and outer membranes of the host cell. *Journal of Bacteriology* **163**, 1270-1274 (1985).
39. Brissette, J. L. & Russel, M. Secretion and membrane integration of a filamentous phage-encoded morphogenetic protein. *Journal of Molecular Biology* **211**, 565-580 (1990).
40. Russel, M. & Kazmierczak, B. Analysis of the Structure and Subcellular Location of Filamentous Phage. *Microbiology* **175**, 3998-4007 (1993).

41. Marciano, D. K. An Aqueous Channel for Filamentous Phage Export. *Science* **284**, 1516-1519 (1999).
42. Marciano, D. K., Russel, M. & Simon, S. M. Assembling filamentous phage occlude pIV channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 9359-9364 (2001).
43. Guy-Caffey, J. K., Rapoza, M. P., Jolley, K. A. & Webster, R. E. Membrane localization and topology of a viral assembly protein. *Journal of Bacteriology* **174**, 2460-2465 (1992).
44. Rapoza, M. P. & Webster, R. E. The Products of Gene I and the Overlapping in-Frame Gene XI are Required for Filamentous Phage Assembly. *Journal of Molecular Biology* **248**, 627-638 (1995).
45. Russel, M. Filmentous phage assembly. *Molecular Microbiology* **5**, 1607-1613 (1991).
46. Russel, M. & Model, P. Genetic analysis of the filamentous bacteriophage packaging signal and of the proteins that interact with it. *Journal of virology* **63**, 3284-95 (1989).
47. Greenwood, J., Willis, A. E. & Perham, R. N. Multiple display of foreign peptides on a filamentous bacteriophage. *Journal of Molecular Biology* **220**, 821-827 (1991).
48. Malik, P., Terry, T. D., Bellintani, F. & Perham, R. N. Factors limiting display of foreign peptides on the major coat protein of filamentous bacteriophage capsids and a potential role for leader peptidase. *FEBS Letters* **436**, 263-266 (1998).
49. Russel, M. & Model, P. Thioredoxin is required for filamentous phage assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 29-33 (1985).
50. Slonczewski, J. L. and J. F. *Microbiology An Evolving Science*. W. W. Norton & Company 114-145 (2012). doi:10.1109/ISMAR-AMH.2012.6483991
51. Smith, G. P. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* **228**, 1315-1317 (1985).
52. Ebrahimizadeh, W. & Rajabibazl, M. Bacteriophage vehicles for phage display: Biology, mechanism, and application. *Current Microbiology* **69**, 109-120 (2014).
53. Pande, J., Szewczyk, M. M. & Grover, A. K. Phage display: Concept, innovations, applications and future. *Biotechnology Advances* **28**, 849-858 (2010).

54. McCafferty, J., Griffiths, A. D., Winter, G. & Chiswell, D. J. Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. *Nature* **348**, 552-554 (1990).
55. Gao, C. *et al.* Making artificial antibodies: A format for phage display of combinatorial heterodimeric arrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**, 6025-6030 (1999).
56. Gao, C. *et al.* A method for the generation of combinatorial antibody libraries using pIX phage display. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 12612-12616 (2002).
57. Hufton, S. E. *et al.* Phage display of cDNA repertoires: the pVI display system and its applications for the selection of immunogenic ligands. *Journal of Immunological Methods* **231**, 39-51 (1999).
58. Kay, B. K., Kasanov, J. & Yamabhai, M. Screening Phage-Displayed Combinatorial Peptide Libraries. *Methods* **24**, 240-246 (2001).
59. Iannolo, G., Minenkova, O., Petruzzelli, R. & Cesareni, G. Modifying Filamentous Phage Capsid: Limits in the Size of the Major Capsid Protein. *Journal of Molecular Biology* **248**, 835-844 (1995).
60. Kazmierczak, B. I., Mielke, D. L., Russel, M. & Model, P. pIV, a Filamentous Phage Protein that Mediates Phage Export Across the Bacterial Cell Envelope, Forms a Multimer. *Journal of Molecular Biology* **238**, 187-198 (1994).
61. Kay, B. K. *et al.* An M13 phage library displaying random 38-amino-acid peptides as a source of novel sequences with affinity to selected targets. *Gene* **128**, 59-65 (1993).
62. Smith, G. P. Surface display and peptide libraries. *Gene* **128**, 1-2 (1993).
63. Wood, H. G. & Barden, R. E. Biotin Enzymes. *Annual Review of Biochemistry* **46**, 385-413 (1977).
64. Samols, D. *et al.* Evolutionary conservation among biotin enzymes. *The Journal of biological chemistry* **263**, 6461-4 (1988).
65. Cronan, J. E. Biotination of proteins in vivo. A post-translational modification to label, purify, and study proteins. *The Journal of biological chemistry* **265**, 10327-33 (1990).
66. Wilchek, M. & Bayer, E. A. Avidin-Biotin Technology. in *Methods in Enzymology* **184**, 1-34 (Academic Press).
67. Diamandis, E. P. & Christopoulos, T. K. The biotin-(strept)avidin system: principles and applications in biotechnology. *Clinical chemistry* **37**, 625-36 (1991).

68. Analysis, G. & Engineering, B. Foreword and introduction to the book (strept) avidin - biotin system. *16*, 1-4 (1999).
69. Diamandis, E. P. & Morton, R. C. Time-resolved fluorescence using a europium chelate of 4,7-bis-(chlorosulphophenyl)-1,10-phenanthroline-2,9-dicarboxylic acid (BCPDA). *Journal of Immunological Methods* **112**, 43-52 (1988).
70. DeLange, R. J. Egg white avidin. I. Amino acid composition; sequence of the amino- and carboxyl-terminal cyanogen bromide peptides. *The Journal of biological chemistry* **245**, 907-16 (1970).
71. Bayer, E. A. & Wilchek, M. Application of avidin-biotin technology to affinity-based separations. *Journal of chromatography* **510**, 3-11 (1990).
72. Hiller, Y., Bayer, E. A. & Wilchek, M. [6] Nonglycosylated avidin. in 68-70 (1990). doi:10.1016/0076-6879(90)84260-N
73. Hiller, Y., Gershoni, J. M., Bayer, E. A. & Wilchek, M. Biotin binding to avidin. Oligosaccharide side chain not required for ligand association. *Biochemical Journal* **248**, 167-171 (1987).
74. Chaiet, L. & Wolf, F. J. The properties of streptavidin, a biotin-binding protein produced by Streptomyces. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **106**, 1-5 (1964).
75. Bayer, E. A., Ben-Hur, H. & Wilchek, M. [8] Isolation and properties of streptavidin. in 80-89 (1990). doi:10.1016/0076-6879(90)84262-F
76. Preissner, C. M., Klee, G. G. & Krco, C. J. Nonisotopic 'sandwich' immunoassay of thyroglobulin in serum by the biotin-streptavidin technique: evaluation and comparison with an immunoradiometric assay. *Clinical chemistry* **34**, 1794-8 (1988).
77. Fehskens, E. & Burgett, M. W. Measurement of serum chorionic gonadotropin by a biotin-avidin labeled enzyme immunoassay. *Annals of clinical and laboratory science* **15**, 241-5
78. Guesdon, J. L., Ternynck, T. & Avrameas, S. The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **27**, 1131-1139 (1979).
79. Gretch, D. R., Suter, M. & Stinski, M. F. The use of biotinylated monoclonal antibodies and streptavidin affinity chromatography to isolate herpesvirus hydrophobic proteins or glycoproteins. *Analytical Biochemistry* **163**, 270-277 (1987).
80. Green, N. M., Konieczny, L., Toms, E. J. & Valentine, R. C. The use of bifunctional biotinyl compounds to determine the arrangement of subunits in avidin. *The Biochemical journal* **125**, 781-91 (1971).

81. Bonnard, C., Papermaster, D. S. & Kraehenbuhl, J.-P. The streptavidin-biotin bridge technique: Application in light and electron microscope immunocytochemistry. in *Immunolabelling for Electron Microscopy* (eds. Polak, J. M. & Varndell, I. M.) 95-111 (Elsevier, 1984).
82. Hermanson, G. T. Bioconjugate Techniques. in *Bioconjugate Techniques* 510 (Elsevier, 2008).
83. Bayer, E. A. & Wilchek, M. [14] Protein biotinylation. in 138-160 (1990). doi:10.1016/0076-6879(90)84268-L
84. Jokiranta, T. S. & Meri, S. Biotinylation of monoclonal antibodies prevents their ability to activate the classical pathway of complement. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **151**, 2124-31 (1993).
85. Barker, D. F. & Campbell, A. M. The birA gene of *Escherichia coli* encodes a biotin holoenzyme synthetase. *Journal of Molecular Biology* **146**, 451-467 (1981).
86. Stolz, J., Ludwig, A. & Sauer, N. Bacteriophage lambda surface display of a bacterial biotin acceptor domain reveals the minimal peptide size required for biotinylation. *FEBS Letters* **440**, 213-217 (1998).
87. Schatz, P. J. Use of Peptide Libraries to Map the Substrate Specificity of a Peptide-Modifying Enzyme: A 13 Residue Consensus Peptide Specifies Biotinylation in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology* **11**, 1138-1143 (1993).
88. Beckett, D., Kovaleva, E. & Schatz, P. J. A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Science* **8**, 921-929 (2008).
89. Fairhead, M. & Howarth, M. Site-Specific Biotinylation of Purified Proteins Using BirA. in 171-184 (2015). doi:10.1007/978-1-4939-2272-7_12
90. Tobias, J., Shrader, T., Rocap, G. & Varshavsky, A. The N-end rule in bacteria. *Science* **254**, 1374-1377 (1991).
91. Sherman, F., Stewart, J. W. & Tsunasawa, S. Methionine or not methionine at the beginning of a protein. *BioEssays* **3**, 27-31 (1985).
92. Cull, M. G. & Schatz, P. J. [26] Biotinylation of proteins in vivo and in vitro using small peptide tags. in 430-440 (2000). doi:10.1016/S0076-6879(00)26068-0
93. Tsao, K.-L., Debarbieri, B., Michel, H. & Waugh, D. S. A versatile plasmid expression vector for the production of biotinylated proteins by site-specific, enzymatic modification in *Escherichia coli*. *Gene* **169**, 59-64 (1996).

94. Smith, P. A. *et al.* A plasmid expression system for quantitative in vivo biotinylation of thioredoxin fusion proteins in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research* **26**, 1414-1420 (1998).
95. Rossotti, M. *et al.* Streamlined method for parallel identification of single domain antibodies to membrane receptors on whole cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1850**, 1397-1404 (2015).
96. de Boer, E. *et al.* Efficient biotinylation and single-step purification of tagged transcription factors in mammalian cells and transgenic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 7480-7485 (2003).
97. Predonzani, A., Arnoldi, F., López-Requena, A. & Burrone, O. R. In vivo site-specific biotinylation of proteins within the secretory pathway using a single vector system. *BMC Biotechnology* **8**, 41 (2008).
98. Barat, B. & Wu, A. M. Metabolic biotinylation of recombinant antibody by biotin ligase retained in the endoplasmic reticulum. *Biomolecular Engineering* **24**, 283-291 (2007).
99. Duffy, S., Tsao, K.-L. & Waugh, D. S. Site-Specific, Enzymatic Biotinylation of Recombinant Proteins in *Spodoptera frugiperda* Cells Using Biotin Acceptor Peptides. *Analytical Biochemistry* **262**, 122-128 (1998).
100. Yang, J., Jaramillo, A., Shi, R., Kwok, W. W. & Mohanakumar, T. In vivo biotinylation of the major histocompatibility complex (MHC) class II/peptide complex by coexpression of BirA enzyme for the generation of MHC class II/tetramers. *Human Immunology* **65**, 692-699 (2004).
101. Nakamura, M., Tsumoto, K., Kumagai, I. & Ishimura, K. A morphologic study of filamentous phage infection of *Escherichia coli* using biotinylated phages. *FEBS Letters* **536**, 167-172 (2003).
102. Sun, W., Brovko, L. & Griffiths, M. Use of bioluminescent *Salmonella* for assessing the efficiency of constructed phage-based biosorbent. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* **27**, 126-128 (2001).
103. Scholle, M. D. *et al.* Mapping Protease Substrates by Using a Biotinylated Phage Substrate Library. *ChemBioChem* **7**, 834-838 (2006).
104. Løset, G. Å., Bogen, B. & Sandlie, I. Expanding the Versatility of Phage Display I: Efficient Display of Peptide-Tags on Protein VII of the Filamentous Phage. *PLoS ONE* **6**, e14702 (2011).
105. Smelyanski, L. & Gershoni, J. M. Site directed biotinylation of filamentous phage structural proteins. *Virology Journal* **8**, 495 (2011).
106. Tolba, M., Minikh, O., Brovko, L. Y., Evoy, S. & Griffiths, M. W. Oriented Immobilization of Bacteriophages for Biosensor Applications. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 528-535 (2010).

107. Hamers-Casterman, C. *et al.* Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature* **363**, 446-448 (1993).
108. Muyldermans, S. Nanobodies: Natural Single-Domain Antibodies. *Annual Review of Biochemistry* **82**, 775-797 (2013).
109. Hassanzadeh-Ghassabeh, G., Devoogdt, N., De Pauw, P., Vincke, C. & Muyldermans, S. Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine* **8**, 1013-1026 (2013).
110. Harmsen, M. M. & De Haard, H. J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Applied Microbiology and Biotechnology* **77**, 13-22 (2007).
111. Holliger, P. & Hudson, P. J. Engineered antibody fragments and the rise of single domains. *Nature Biotechnology* **23**, 1126-1136 (2005).
112. Untergrasser, A. Preparation of Electrocompetent Cells. (2008).
113. Kim, H.-J., McCoy, M., Gee, S. J., González-Sapienza, G. G. & Hammock, B. D. Noncompetitive Phage Anti-Immuno-complex Real-Time Polymerase Chain Reaction for Sensitive Detection of Small Molecules. *Analytical Chemistry* **83**, 246-253 (2011).
114. Pérez-Schirmer, M. *et al.* Comparison of Three Antihapten VHH Selection Strategies for the Development of Highly Sensitive Immunoassays for Microcystins. *Analytical Chemistry* **89**, 6800-6806 (2017).
115. Cesareni, G. Peptide display on filamentous phage capsids. *FEBS LETTERS* **5** (1992).
116. Qi, H., Lu, H., Qiu, H.-J., Petrenko, V. & Liu, A. Phagemid Vectors for Phage Display: Properties, Characteristics and Construction. *Journal of Molecular Biology* **417**, 129-143 (2012).
117. Steiner, D., Forrer, P., Stumpp, M. T. & Plückthun, A. Signal sequences directing cotranslational translocation expand the range of proteins amenable to phage display. *Nature Biotechnology* **24**, 823-831 (2006).
118. Fagerlund, A., Myrset, A. H. & Kulseth, M. A. Construction and characterization of a 9-mer phage display pVIII-library with regulated peptide density. *Applied Microbiology and Biotechnology* **80**, 925-936 (2008).
119. Smelyanski, L. & Gershoni, J. M. Site directed biotinylation of filamentous phage structural proteins. *Virology journal* **8**, 495

