

GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE NANOANTICUERPOS INHIBIDORES DEL AUTOENSAMBLADO DE LA PROTEÍNA DE CÁPSIDE DEL VIRUS DE LA LEUCEMIA BOVINA

Lic. Federico Carrión



TESIS DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS / OPCIÓN BIOQUÍMICA
PEDECIBA / UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

Orientador

Dr. Otto Pritsch

Co-orientador

Dr. Gualberto González-Sapienza

Tribunal

Dr. Eduardo Osinaga

Dra. Rosario Durán

Dr. Rodney Colina

Abril de 2019

Portada: Obra del artista uruguayo Mario Giacoya.

1. RESUMEN

El Virus de la Leucemia Bovina (BLV, por sus siglas en inglés) es un deltaretrovirus oncogénico que infecta linfocitos B en ganado bovino en todo el mundo y es el agente causante de la leucosis bovina enzoótica (LBE). Esta es una enfermedad transmisible que permanece asintomática en el 65% de los animales infectados, causando una linfocitosis persistente caracterizada por la expansión de células B policlonales no malignas en el 30% de los animales infectados, mientras que el 5% restante muestra leucemia / linfoma letal después de un período largo y variable de varios años.

La LBE representa una amenaza importante para la industria láctea en países con alta prevalencia y falta de programas de control. Además, el BLV está altamente relacionado con el HTLV-1 (un retrovirus linfotrópico de células T de humanos), representando un excelente modelo animal para evaluar y comprender los procesos leucemogénicos y los detalles aún no revelados del ciclo viral. Uno de los pasos en el ciclo retroviral que permanece parcialmente comprendido es el desnudamiento de la cápside en la fase temprana del ciclo y el ensamblado de las proteínas Gag / CA durante el proceso de brotación / maduración.

Nuestro objetivo es desarrollar interactores contra la proteína de la cápside de BLV (CA_{BLV}), con el fin de generar herramientas para modular el auto-ensamblado de la cápside. Para ello, generamos y caracterizamos anticuerpos de cadena pesada (hcAb del inglés "*heavy chain antibodies*") contra CA_{BLV} y evaluamos su efecto inhibitorio de los dominios variables expresados en forma recombinante (VHHs o nanoanticuerpos), sobre el autoensamblado de CA_{BLV} *in vitro*.

Para este fin, inmunizamos una llama con CA_{BLV} recombinante y obtuvimos por "*phage display*" una biblioteca de VHHs específicos. Los mismos fueron clasificados y seleccionados de acuerdo con diversos criterios, expresados en el espacio periplásmico de *E. coli* y purificados. Dos de ellos fueron caracterizados en solución, así como su interacción con CA_{BLV} , utilizando técnicas bioquímicas, biofísicas y estructurales.

Los dos nanoanticuerpos purificados y caracterizados son capaces de reconocer específicamente diferentes dominios de CA_{BLV} , mostrando buena estabilidad y solubilidad incluso a altas concentraciones (80 mg/ml). Los experimentos de interacción mostraron baja afinidad de unión, con valores de K_d (cuando fue posible medirla) en el orden de μM bajo.

Por su parte el autoensamblado de CA_{BLV} *in vitro* se evaluó en condiciones de "*crowding*" macromolecular impuestas por la alta concentración de CA_{BLV} , en presencia de concentraciones subestequiométricas de nanoanticuerpos. El ensamblado se redujo en un 30-50% en presencia de VHHs a una relación subestequiométrica de 1:20 y fue completamente inhibido con VHHs a relaciones subestequiométrica de 1:5. Además se realizaron diversos abordajes para resolver la estructura tridimensional de los complejos por difracción de rayos X, resolviéndose la estructura de uno de los VHH a alta resolución.

Aquí mostramos que los nanoanticuerpos son muy buenos inhibidores del autoensamblaje de CA_{BLV} en un entorno con alta concentración de la proteína de cápside, tal como ocurre en las partículas retrovirales. En función de nuestros resultados proponemos estos VHHs como posibles "*hits*" para diseñar inhibidores de la maduración viral y no descartamos su capacidad para impedir el autoensamblado de la proteína Gag en la brotación viral, requiriéndose experimentos adicionales en un contexto celular.

2. ÍNDICE

1. RESUMEN.....	1
2. ÍNDICE	3
3. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	9
3.1. FIGURAS.....	9
3.2. TABLAS.....	10
4. LISTA DE ABREVIATURAS	12
5. INTRODUCCIÓN	15
5.1. LEUCOSIS BOVINA.....	15
5.2. RETROVIRUS Y CAPSIDES RETROVIRALES	19
5.2.1. GENOMA	19
5.2.2. LA PARTICULA RETROVIRAL	21
5.2.3. CICLO REPLICATIVO	25
5.2.3.1. FASE TEMPRANA DEL CICLO REPLICATIVO	26
5.2.3.1.1. UNIÓN AL RECEPTOR CELULAR Y FUSIÓN VIRAL.....	26
5.2.3.1.2. RETROTRANSCRIPCIÓN	27
5.2.3.1.3. DESENSAMBLADO O “DESNUDAMIENTO” DE LA CAPSIDE.....	28
5.2.3.1.4. IMPORTACIÓN NUCLEAR E INTEGRACIÓN	29
5.2.3.2. FASE TARDÍA DEL CICLO REPLICATIVO.....	30
5.2.3.2.1. TRANSCRIPCIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES VIRALES.....	30
5.2.3.2.2. ENSAMBLADO DE LA PARTICULA VIRAL.....	30
5.2.3.2.3. BROTAMIENTO Y LIBERACIÓN DEL VIRIÓN	33
5.2.3.2.4. MADURACIÓN DE LA PARTÍCULA VIRAL.....	35
5.2.4. CA EN DIAGNÓSTICO Y COMO BLANCO TERAPÉUTICO	37
5.3. ANTICUERPOS Y NANOANTICUERPOS.....	42
5.3.1. ANTICUERPOS CLÁSICOS.....	42
5.3.1.1. RESPUESTA HUMORAL Y ANTICUERPOS.....	42
5.3.1.2. ESTRUCTURA DE LOS ANTICUEPOS.....	42
5.3.1.3. GENERACIÓN DE DIVERSIDAD DE PARATOPES.....	44
5.3.1.4. APLICACIONES DE ANTICUERPOS	47
5.3.1.5. FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES	47
5.3.2. ANTICUERPOS DE CADENA PESADA.....	48

5.3.2.1. ASPECTOS EVOLUTIVOS	48
5.3.2.2. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE ANTICUERPOS DE CADENA PESADA DE CAMÉLIDOS	49
5.3.2.3. ORGANIZACIÓN DE GENES DE ANTICUERPOS DE CADENA PESADA EN CAMÉLIDOS Y GENERACIÓN DE DIVERSIDAD.....	51
5.3.2.4. SIMPLEZA ESTRUCTURAL VS RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO.	53
5.3.3. VHH RECOMBINANTES O NANOANTICUERPOS	53
5.3.4. APLICACIONES DE NANOANTICUERPOS.....	54
5.3.5. PHAGE DISPLAY	56
5.3.5.1. BACTERIOFAGO M13.....	58
5.3.5.2. FAGÉMIDO	58
5.4. IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA.....	59
6. OBJETIVOS.....	61
6.1. OBJETIVO GENERAL	61
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	61
7. METODOLOGÍA	63
7.1. GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES PARA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.	63
7.1.1. GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES DE CABLV Y SUS DOMINIOS.....	63
7.1.1.1. DISEÑO DE PRIMERS Y CLONADO DE LA PROTEÍNA DE CAPSIDE DE VLB (CAVLB) PARA SU EXPRESION EN FORMA NATIVA (CA _n) Y CON TAG DE PURIFICACIÓN (H6CA).	63
7.1.1.2. DISEÑO DE PRIMERS Y CLONADO DE NTD DE BLV PARA EXPRESION CON TAG DE PURIFICACIÓN (NTDH6).....	64
7.1.1.3. DISEÑO DE PRIMERS Y CLONADO DE CTD DE BLV PARA EXPRESION CON TAG DE PURIFICACIÓN (H6CTD).	65
7.1.1.4. PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS Y CONFIRMACIÓN DE SECUENCIA.	65
7.1.2. GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES DE NANOANTICUERPOS	65
7.1.2.1. DISEÑO DE PRIMERS Y CLONADO DE FRAGMENTOS VHH EN EL FAGÉMIDO pComb3x.....	65
7.1.2.2. DISEÑO Y CLONADO DE CONSTRUCCIÓN PARA EXPRESION DE NANOANTICUERPOS BIOTINILABLES CON HIS-TAG.	66
7.1.2.3. DISEÑO Y CLONADO DE CONSTRUCCIÓN PARA EXPRESION DE NANOANTICUERPOS SIN SITIO DE BIOTINILCIÓN Y CON HIS-TAG REMOVIBLE.....	67
7.2. EXPRESION DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	68
7.2.1. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE BLV	68
7.2.1.1. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA CON VECTORES DE EXPRESIÓN.....	68
7.2.1.2. EXPRESIÓN A MEDIANA ESCALA (1 litro).	68
7.2.2. EXPRESIÓN DE NANOANTICUERPOS	69
7.2.2.1. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA EN VECTORES DE EXPRESIÓN.....	69
7.2.2.2. EXPRESIÓN A BAJA ESCALA	69

7.2.2.3. EXPRESIÓN DE VHHs BIOTINILADOS A PEQUEÑA Y MEDIANA ESCALA.....	69
7.2.2.4. EXPRESIÓN A GRAN ESCALA (1L)	69
7.3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	70
7.3.1. PURIFICACIÓN DE CA NATIVA	70
7.3.1.1. EXTRACCIÓN CITOSÓLICA	70
7.3.1.2. INTERCAMBIO ANIÓNICO (IEX-DEAE)	70
7.3.1.3. CAMBIO DE BUFFER Y CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR (SEC).....	70
7.3.1.4. ANÁLISIS, CONCENTRACIÓN Y CUANTIFICACIÓN	70
7.3.2. PURIFICACIÓN DE CABLV Y SUS DOMINIOS POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.....	71
7.3.2.1. EXTRACCIÓN CITOSÓLICA	71
7.3.2.2. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD POR IONES METALICOS INMOVILIZADOS (IMAC).....	71
7.3.2.2.1. ELUCIÓN CON GRADIENTE DE IMIDAZOL.....	71
7.3.2.2.2. REMOCIÓN DEL HIS-TAG EN COLUMNA	72
7.3.2.3. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR (SEC).....	72
7.3.2.4. ANÁLISIS, CONCENTRACIÓN Y CUANTIFICACIÓN	72
7.3.3. PURIFICACIÓN DE NANOANTICUERPOS.....	72
7.3.3.1. EXTRACCIÓN PERIPLÁSMICA.....	72
7.3.3.2. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD POR IONES METÁLICOS INMOVILIZADOS (IMAC).....	73
7.3.3.3. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR (SEC).....	73
7.3.3.4. ANÁLISIS, CONCENTRACIÓN Y CUANTIFICACIÓN	73
7.4. GENERACIÓN DE NANOANTICUERPOS.....	73
7.4.1. INMUNIZACIÓN DE LLAMA CON CABLV.....	73
7.4.2. EVALUACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS	74
7.4.3. GENERACIÓN DE LA LIBRERÍA DE NANOANTICUERPOS ANTI CABLV.....	74
7.4.3.1. PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS Y EXTRACCIÓN DE ARN.....	74
7.4.3.2. OBTENCIÓN DE ADNc Y AMPLIFICACIÓN DE GENES VHH.....	74
7.4.3.3. CLONADO DE GENES VHH EN EL FAGÉMIDO pComb3x Y TRANSFORMACIÓN DE E. coli ER2738....	75
7.4.3.4. PRODUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA DE FAGOS PREINMUNE	75
7.4.3.5. PRODUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA DE FAGOS ESPECÍFICA CONTRA CABLV (PHAGE DISPLAY).....	75
7.4.3.6. CLONADO DE SECUENCIAS DE VHH EN PLASMIDO DE EXPRESIÓN	76
7.4.3.7. ANALISIS DE SECUENCIA DE NANOANTICUERPOS.....	76
7.5. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS PRODUCIDAS EN FORMA RECOMBINANTE....	77
7.5.1. ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).	77
7.5.2. ANALISIS DE PUREZA POR DENSITOMETRÍA	78
7.5.3. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR (SEC).....	78

7.5.4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS POR DESORCIÓN/IONIZACIÓN LÁSER ASISTIDA POR MATRIZ Y DETECCIÓN POR TIEMPO DE VUELO (MALDI-TOF).....	78
7.5.5. ANÁLISIS DE ESTADO DE OLIGOMERIZACIÓN POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS)	78
7.5.6. ANÁLISIS DE TERMOESTABILIDAD POR MICROCALORIMETRÍA DE BARRIDO DIFERENCIAL DE TEMPERATURA (DSC).....	79
7.6. ESTUDIO DE INTERACCIÓN ENTRE NANOANTICUERPOS Y ANTÍGENOS ESPECÍFICOS	79
7.6.1. ANALISIS POR ELISA.....	79
7.6.1.1. ELISA PARA EVALUAR LA EFICIENCIA DE LA SELECCIÓN POR PHAGE DISPLAY	79
7.6.1.2. ELISA PARA MAPEO ANTIGÉNICO DE VHHs	79
7.6.1.3. ELISA PARA ESTIMACIÓN DE LA AFINIDAD DE LOS VHHs	80
7.6.2. ANALISIS POR WESTERN BLOT	80
7.6.3. ANALISIS DE INHIBICIÓN DEL AUTENSAMBLADO DE LA CÁPSIDE IN VITRO	81
7.6.4. ANÁLISIS DE INTERACCIÓN POR RESONANCIA PLASMÓNICA DE SUPERFICIE (SPR).....	81
7.6.5. ANALISIS POR MICROCALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA (ITC).....	82
7.7. ANALISIS ESTRUCTURAL DE NANOANTICUERPOS	82
7.7.1. BÚSQUEDA Y OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DE CRISTALIZACIÓN (ROBÓTICA).....	83
7.7.2. OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DE CRISTALIZACIÓN (MANUAL)	83
7.7.3. DIFRACCIÓN DE RAYOS X Y DETERMINACIÓN DE ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS.....	83
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
8.1. OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES	85
8.1.1. CLONADO Y SECUENCIACIÓN.....	85
8.1.2. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	86
8.2. GENERACIÓN DE LA LIBRERÍA DE NANOANTICUERPOS.....	88
8.2.1. INMUNIZACIÓN DE LLAMAS CON CABLV Y ANÁLISIS DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS.....	88
8.2.2. PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS Y EXTRACCIÓN DE ARN	89
8.2.3. GENERACIÓN DE LA LIBRERÍA DE FAGOS PRESENTADORES DE NANOANTICUERPOS.....	90
8.2.4. SELECCIÓN DE FAGOS REACTIVOS POR PHAGE DISPLAY	90
8.2.5. EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LA BIBLIOTECA SELECCIONADA	91
8.2.6. CLONADO “EN MASSE” EN pINQ-BtH6 Y EXPRESION DE VHHs BIOTINILADOS	92
8.3. SELECCIÓN DE CLONES DE INTERÉS.....	93
8.3.1. CRITERIO DE SELECCIÓN 1: EXPRESIÓN A BAJA ESCALA	93
8.3.2. CRITERIO DE SELECCIÓN 2: MAPEO ANTIGÉNICO	94
8.3.3. CRITERIO DE SELECCIÓN 3: AFINIDAD RELATIVA	96
8.3.4. CRITERIO DE SELECCIÓN 4: VARIABILIDAD DE SECUENCIA	98
8.4. CARACTERIZACIÓN INICIAL DE VHHs 8c Y 19a.....	102
8.4.1. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE VHH8c A MEDIANA ESCALA	102

8.4.2. ANÁLISIS CUALITATIVO DE INTERACCIÓN.....	105
8.5. CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DE LOS VHHs 8c Y 19a.	106
8.5.1. PRODUCCIÓN DE VHHs A GRAN ESCALA.	107
8.5.2. ESTUDIOS BIOFÍSICOS EN SOLUCIÓN.....	110
8.6. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE LOS VHHs CON CABLV.	112
8.6.1. ANÁLISIS TERMODINÁMICO DE LA INTERACCIÓN.....	112
8.6.2. INHIBICIÓN DEL AUTOENSAMBLADO DE CABLV.....	115
8.6.3. ANÁLISIS ESTRUCTURAL.....	117
8.6.3.1. CRISTALOGÉNESIS.....	117
8.6.3.2. DIFRACCIÓN Y ANALISIS ESTRUCTURAL.....	119
9. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.....	123
10. PERSPECTIVAS.....	131
11. ANEXO.....	133
11.1. ALINEAMIENTO DE NANOANTICUERPOS (CLUSTAL OMEGA).....	133
12. BIBLIOGRAFÍA.....	135

3. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

3.1. FIGURAS

Figura 1: Análisis filogenético de retrovirus.....	15
Figura 2: Modelo de leucemogénesis por BLV	16
Figura 3: Genoma de BLV y sus productos de transcripción y traducción.....	20
Figura 4: Esquema de la partícula retroviral haciendo énfasis en los cambios estructurales durante la maduración.....	22
Figura 5: Morfología de las cápsides retrovirales	23
Figura 6: Estudio del autoensamblado de CA _{BLV} en solución	24
Figura 7: Ciclo Viral de Retrovirus.....	26
Figura 8: Relación de CA _{HIV} con los procesos de retrotranscripción e importación nuclear	28
Figura 9: Organización de los dominios de algunas proteínas Gag retrovirales	31
Figura 10: Aspectos estructurales de Gag y su interacción con IP6 durante el ensamblado y la maduración de partículas de HIV	32
Figura 11: Reclutamiento de la maquinaria ESCRT por parte de Gag para la liberación de la partícula retroviral	35
Figura 12: Maduración de retrovirus.....	36
Figura 13: Sitios de unión a CA _{HIV} de compuestos y péptidos con acción antiviral.....	38
Figura 14: Estructura de un anticuerpo clásico	43
Figura 15: Isotipos de Inmunoglobulinas	44
Figura 16: Variabilidad de los CDRs de Inmunoglobulinas.....	45
Figura 17: Generación de diversidad de paratopes	46
Figura 18: Fragmentos de Anticuerpos Recombinantes	48
Figura 19: Anticuerpos de Cadena Pesada	49
Figura 20: Anticuerpos de cadena pesada.....	52
Figura 21: Phage Display	57
Figura 22: Diseño de construcciones de antígenos de BLV expresados y purificados	63
Figura 23: Diseño de <i>primers</i> para el clonado de las distintas construcciones de proteínas virales de VLB.....	64
Figura 24: Diseño de <i>primers</i> para la amplificación de genes VHH y su clonado en vectores fagémidos y de expresión	67
Figura 25: Sistema de numeración IMGT	77
Figura 26: Secuencias aminoacídicas de los genes clonados para la purificación de proteínas	85
Figura 27: Expresión y purificación de proteínas de BLV	87
Figura 28: Título de anticuerpos de llama contra CA _{BLV}	88
Figura 29: Generación de una librería de fagos y clonado en el fagémido pComb3x para su selección	89
Figura 30: Análisis de especificidad de clones seleccionados a partir de la segunda ronda de panning	92
Figura 32: SDS PAGE para evaluar la purificación de 95 clones de VHH por cromatografía de afinidad a baja escala.	94
Figura 33: Mapeo antigénico de VHHs por ELISA	95
Figura 34: Análisis cualitativo por SPR de clones de VHH de alta y baja afinidad de acuerdo con la clasificación por ELISA. 98	
Figura 34: Análisis de secuencias aminoacídicas de los clones aislados	101
Figura 35: Purificación de VHHs expresados a mediana escala	104
Figura 36: Análisis cualitativo de interacción entre VHHs y CA _{BLV}	106
Figura 37: Expresión a gran escala y extracción periplásmica de VHHs	107
Figura 38: Purificación a gran escala de los VHH8c y BHH19a conteniendo sitio de biotilación y <i>His-tag</i>	108
Figura 39: Purificación de VHHs sin BAP ni <i>His-tag</i> a gran escala.....	110
Figura 40: Análisis biofísico de VHHs en solución	111
Figura 41: Análisis termodinámico de la interacción del VHH8c y el dominio *CTD	113

Figura 42: Análisis por ITC de la interacción del *VHH19a con el dominio NTDH6 y análisis de tamaño de NTDH6 en solución por DLS.....	115
Figura 43: Inhibición <i>in vitro</i> del autoensamblado de CA _{BLV}	117
Figura 44: Búsqueda de condiciones de cristalización de los VHH seleccionados en complejo con los dominios de CA _{BLV} ..	119
Figura 45: Análisis estructural del VHH8c.....	121

3.2. TABLAS

Tabla 1. Moléculas con actividad antiretroviral por unión a CA _{HIV}	41
Tabla 2: Correlación entre las propiedades biofísicas de los Nbs y sus aplicaciones.....	55
Tabla 3. Número de aminoácidos y valores teóricos de peso molecular (PM), absortividad molar (ϵ_{MOLAR}) y específica ($\epsilon_{\text{ESPECÍFICA}}$) para las proteínas de origen viral producidas en forma recombinantes.....	71
Tabla 4. Número de aminoácidos, valores teóricos de peso molecular (PM), absortividad molar (ϵ_{MOLAR}) y específica ($\epsilon_{\text{ESPECÍFICA}}$) para los nanoanticuerpos producidas.....	73
Tabla 5. Programa de inmunización de llamas con *CA.....	74
Tabla 6. Tamaño de la librería de fagos al final de cada ronda de panning.....	91
Tabla 7. Clasificación de clones por ELISA de acuerdo con el dominio de CA _{BLV} reconocido y su afinidad relativa definida de acuerdo a la sección 8.3.3.....	96
Tabla 8. Clones para los que se obtuvo la secuencia completa de genes VHH.....	99
Tabla 9. Parámetros termodinámicos obtenidos por ITC para la interacción de los nanoanticuerpos *VHH8c y *VHH19a con los dominios *CTD y NTDH6 de CA _{BLV} respectivamente.....	115
Tabla 10: Estadísticas de colección de datos y refinamiento para la obtención de estructuras atómicas.....	120

4. LISTA DE ABREVIATURAS

ADCC: respuesta a células T dependiente de anticuerpos	CCR5: C-C receptor de quimioquinas de tipo 5	DLS: dispersión dinámica de luz	FR: región "framework" conservada de dominios variables de anticuerpos
ADN: ácido desoxirribonucleico	CD: clúster de diferenciación (seguido de un número identificador)	DsbC: enzima disulfuro isomerasa	Gag, Pr44: proteína Gag
AGID: Inmunodifusión radial en gel de agarosa	CD: difracción circular	DSC: calorimetría de escaneo diferencial de temperatura	GLUT1: transportador de glucosa 1
AID: citidina deaminasa inducida por activación	CDR: región determinante de complementariedad	DSF: fluoroscopia de barrido diferencial de temperatura	GMP: guanosina monofosfato cíclico
AMP: adenosina monofosfato cíclico	CDS: secuencias codificantes	DTT: Ditioneitol	gp30, TM: glicoproteína de fusión
APOBEC: familia de citidina kinasas conservadas	cGAS: sintetasa de AMP y GMP	EDTA: ácido etilendiaminotetraacético	gp51, SU: glicoproteína de unión al receptor
ARN: ácido ribonucleico	CHCA: ácido α :ciano hidroxinámico	ELISA: inmunoensayo por asociación enzimática	gp72, Pr72: precursor Env
ATL: Leucemia a células T del adulto	cm: centímetros	Env: proteína Env (gp51:gp30)	HA: hemaglutinina
AUC: ultracentrifugación analítica	CPP: péptidos de penetración celular	EO/OH: pentaeritritol etoxilato	His-tag (o H₆): péptido de seis histidinas para purificación de proteínas recombinantes
BAP: péptido aceptor de biotina	CPSF6: subunidad 6 del factor de especificidad de corte y poliadenilación del ARN	epPCR: PCR propensa a error	HIV: virus de la inmunodeficiencia humana
BCR: receptor de células B	cryo-EM: criomicroscopía electrónica	ERK2: serina treonina quinasa 2	HLA: complejo de antígenos de linfocitos humanos
BI: interferometría de biocapa	CSR: recombinación de cambio de clase	ESCRT: Complejo de clasificación endosomal requerido para transporte	HPLC: cromatografía líquida de alta performance
BLV: virus de la leucemia bovina	CTL: linfocitos T citotóxicos	Fab: Fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno	HRP: peroxidasa de rábano picante
BoLA: antígeno leucocitario bovino	CXCR4: C-X-C receptor de quimioquinas de tipo 4	Fc: Fragmento cristizable de anticuerpos	hs: horas
BSA: seroalbúmina bovina	Da: Daltons	FPLC: cromatografía líquida convencional	HTLV: virus linfotrópico de células T humano

IAA: iodoacetamida	Kon: constante cinética de asociación	MoMLV: virus de la leucemia murina de Moloney	p12, NC: proteína de nucleocapside
ICAM-1: mlecula de adhesión intermolecular 1	LBE: leucosis bovina enzootica	M-PMV: virus del mono Mazon-Pfizer	p14, PRT o PR: proteasa de BLV
ICTV: Comité Internacional sobre Taxonomía de Virus	LEDGF/p75: factor de crecimiento derivado de epitelio del lente ocular	MS: espectrometría de masa	p15, MA: proteína de matriz
IEX: intercambio iónico	LP: Linfocitosis persistente	MST: termoforesis a microescala	p24, CA: proteína de capside
IFN: interferon	LS: linfosarcoma	MWCO: punto de corte por peso molecular	PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
Ig: inmunoglobulina	LTR: repetidos largos terminales	MxB: proteína B de resistencia a myxovirus inducible por IFN	MLV o MuLV: virus de la leucemia murina
IgNAR: inmunoglobulinas tipo NAR (por new antigen receptor) de tiburón	MA: matriz	NFkB: factor nuclear de la cadena Kappa en células B	mM: milimolar
IMGT: Sistema Internacional de Información Inmunogenética	mA: miliamperes	NK: células Natural Killers	PAGE: electroforesis en gel de poliacrilamida
IN: integrasa	mAb: anticuerpo monoclonal	nM: nanomolar	Pbs: sitio de unión al cebador
IPTG: Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido	MALDI: Desorción-Ionización láser asistida por una matriz-Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization	NMR: resonancia magnética nuclear	PBS: buffer fosfato salino
ITC: calorimetría de titulación isotérmica	mg: miligramos	NRP-1: neurofolina 1	PC: fosfaditilcolina
K: grado Kelvin	MHC: complejo mayor de histocompatibilidad	NUP153 y NUP358: nucleoporinas	PCR: reacción en cadena de la polimerasa
Kd: constante de disociación	MHR: región de homología principal	OmpA: péptido señal para envío cotraduccional de proteínas al espacio periplásmico	PDB: base de datos estructurales de proteínas (protein databank)
kDa: kilo daltons	min: minutos	ORF: marco abierto de lectura	PE: fosfatidiletanolamina
Koff: constante cinética de disociación	mL: mililitros	OUT: eluato de las rondas de panning por fage display	PEG: polietilenglicol

PI(4,5)P2: fosfatidilinositol 4,5-bifosfato	SAXS: dispersión de rayos X a bajo ángulo	TNF: factor de necrosis tumoral	°C: grado Celsius
pI: punto isoeléctrico	scFv: fragmentos variables de anticuerpos unidos por una cadena peptídica	TNPO3: transportina 3	ΔCp: cambio en la capacidad calórica del sistema
PIC: complejo de preintegración	SDS: dodecilsulfato de sodio	TOF: tiempo de vuelo	ΔG: cambio en energía libre del sistema
PKA: protein quinasa A	SEC: cromatografía de exclusión molecular (gelfiltración)	TPP: púrpura trombocitopénica trombótica	ΔH: cambio en la entalpía del sistema
PL: linfocitosis persistente	SFB: suero fetal bovino	RT: retrotranscriptasa	ΔS: cambio en la entropía del sistema
PM (o MW): peso molecular	SHM: hipermutación somática	TRIM5a: isoforma de la familia de proteínas codificadas por el gen TRIM5	μg: microgramos
ppt: secuencia de polipurinas	SIV: virus de inmunodeficiencia de simios	TSP/HAM: paraparesia espástica tropical o mielopatía asociada al virus HTLV-I	μL: microlitros
PR: proteasa	SPR: resonancia plasmónica de superficie	UV: ultravioleta	μm: micrómetros
PRR: receptores de reconocimiento de patrones	STLV: virus linfotrópico de células T de simio	V: Volts	μM: micromolar
PS: fosfatidilserina	T7: promotor T7 de E. coli	VH: dominio variable de anticuerpos	6HB: manojo de 6 hélices alfa
PVDF: fluoruro de polivinilideno	TCC: triclocarbán	VHH: dominio variable de anticuerpos de cadena pesada (nanoanticuerpos)	
RF-cloning: clonado libre de enzimas de restricción	TCR: receptor de células T	VLP: partículas vesiculares tipo virus	
RH: radio hidrodinámico	TdT: Deoxiribonucleotidil Transferasa Terminal	vWF: factor de Von Willebrand	
RSV: virus del sarcoma de Rous	TM: temperatura de "melting" o desnaturalización	WB: western blot	
RTC: complejo de retrotranscripción viral	TMB: 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina	Å: angstroms	

5. INTRODUCCIÓN

5.1. LEUCOSIS BOVINA

La “leucosis” bovina fue reportada por primera vez hace casi 150 años, como la presencia de nódulos amarillentos en el bazo agrandado en bovinos. Estos tumores tienen la capacidad de infiltrar otros tejidos (hígado, corazón, ojos, piel, pulmones y nodos linfáticos) y son el resultado de la acumulación de células B transformadas (leucémicas). Se han descrito dos formas de leucosis en bovinos: la **leucosis bovina esporádica** y la **leucosis bovina enzoótica (LBE)**. La ocurrencia de la leucosis bovina esporádica es baja, representa una enfermedad no transmisible y no se conoce su etiología, mientras que la leucosis bovina enzoótica es una enfermedad transmisible, cuyo agente etiológico es el virus de la leucemia bovina (BLV por “*bovine leukemia virus*”) [1-3].

El virus de la leucemia bovina (BLV) forma parte de la familia *Retroviridae* y pertenece al género *Deltaretrovirus* (Figura 1) el cual está además conformado por los virus linfotrópico de células T de humanos (HTLV-1, HTLV-2 y HTLV-3), los virus linfotrópicos de células T de simios (STLV-1, STLV-2 y STLV-3). [4]. Los virus BLV, HTLV-1 y STLV-1 son virus oncogénicos capaces de causar transformaciones malignas en las células infectadas (linfocitos B en el caso de BLV y linfocitos T en el caso de HTLV-1 y STLV-1).

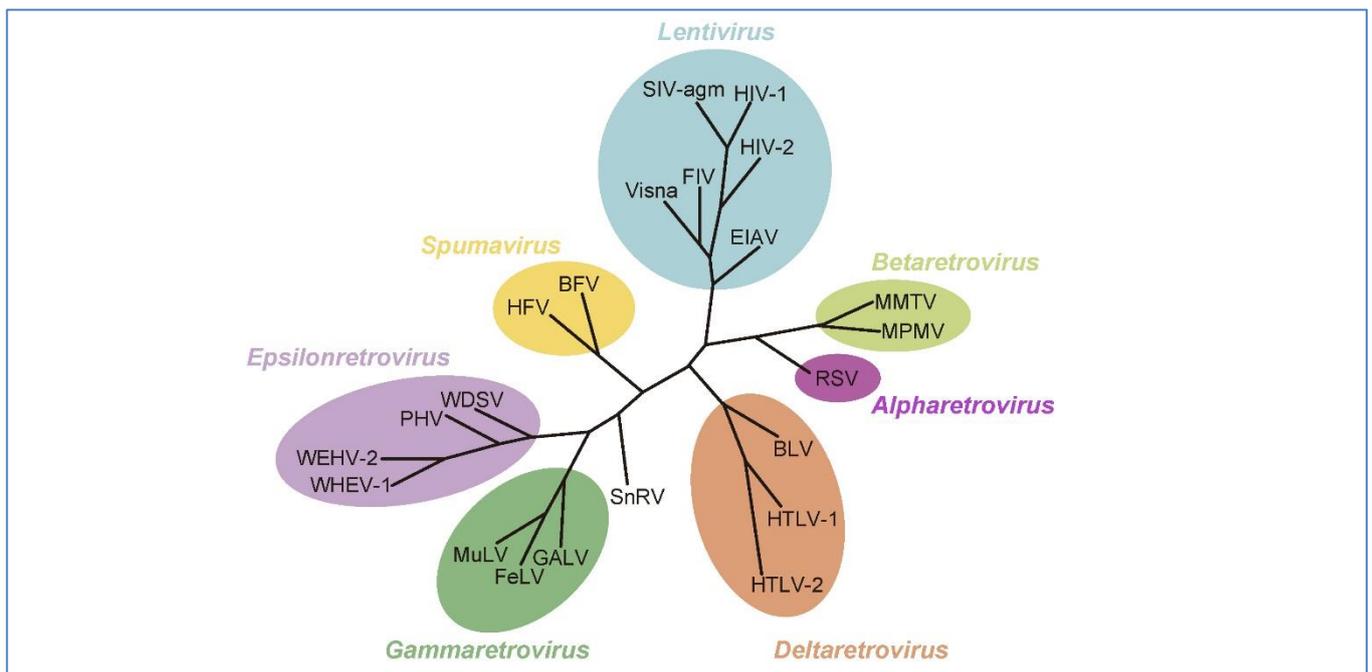


Figura 1: Análisis filogenético de retrovirus. El análisis de secuencias se realizó a partir de las secuencias del gen pol de diversos retrovirus. Extraído de [5].

BLV causa la antes mencionada leucosis bovina enzoótica mientras que HTLV-1 causa diversas patologías como leucemia a células T del adulto (ATL por “*adult T-cell leukemia/lymphoma*”), desórdenes inflamatorios como la paraparesia espástica tropical o mielopatía asociada al virus HTLV-I (TSP/HAM por “*tropical spastic paraparesis or HTLV-I-associated myelopathy*”) y uveítis, afecciones dermatológicas y otras afecciones (algunas asociadas a infecciones oportunistas)[6]. En simios STLV-1 causa una enfermedad linfoproliferativa con sintomatología similar a la observada en humanos infectados con HTLV-1 [7].

La forma más evidente de LBE es la proliferación local de células B en diversos tejidos y el agrandamiento de nodos linfáticos dando lugar a linfomas. Esta es considerada la fase clínica de la enfermedad y tiene consecuencias letales para el animal. Sin embargo, esta manifestación letal tiene lugar varios años después de la infección por BLV y su ocurrencia es baja (aproximadamente 5% de la población infectada con BLV). De hecho, la mayoría de los animales infectados (dos tercios) se presentan asintomáticos y apenas un tercio de estos presenta linfocitosis persistente (LP) caracterizada por un incremento permanente y relativamente constante del número de linfocitos B en sangre periférica, lo que se considera una manifestación benigna de la enfermedad [2]. La progresión de la enfermedad en el ganado infectado por BLV, se ve reflejada por el proceso leucemogénico descrito en forma resumida más adelante (Figura 2).

Los hospederos naturales de BLV son el ganado doméstico, cebú y búfalo de agua, no obstante otros animales como ovejas, conejos, ratas, pollos, cerdos, cabras y alpacas pueden infectarse experimentalmente [8]. En particular la infección de ovejas con BLV, da lugar al desarrollo de linfomas con alta frecuencia y en menor período de tiempo [9], constituyéndose en un modelo animal más accesible para estudiar los procesos de infección y leucemogénesis.

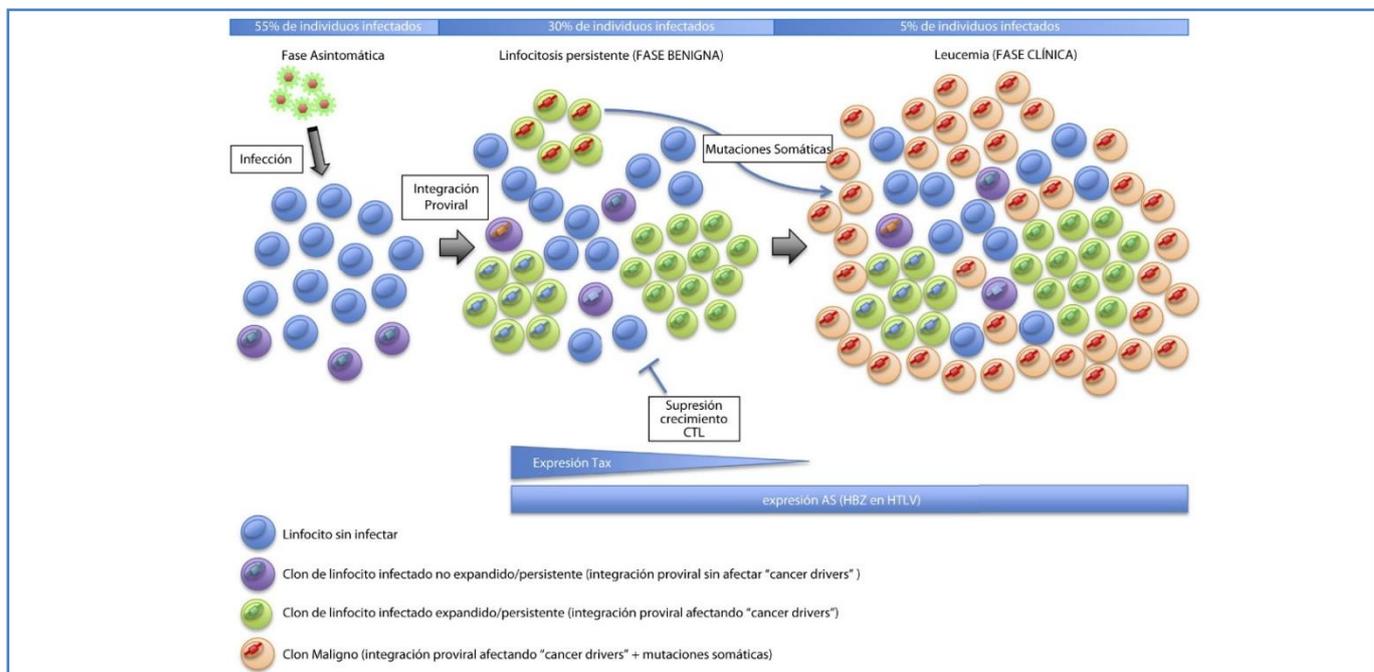


Figura 2: Modelo de leucemogénesis por BLV. Después de la infección viral, el destino de los linfocitos depende del sitio de integración proviral. Aproximadamente 30% de las células infectadas entran en la fase policlonal asintomática cuando el virus se integra en sitios cercanos a genes asociados a cáncer (*"cancer drivers"*). Cuando la inserción afecta la funcionalidad de estos genes, dichos clones ven alterada su persistencia/supervivencia/expansión (clones verdes). Por su parte los clones en los que la inserción no afecta estos genes muestran una supervivencia moderada (clones violetas). La contribución relativa de cada clon infectado a la población policlonal de células infectadas está dada por diversos factores: perturbación de genes relacionados con cáncer (*cáncer drivers*), expresión de proteínas promotoras del crecimiento celular: Tax y AS (HBZ en HTLV-1) y selección negativa de clones a cargo de la respuesta inmune por linfocitos T citotóxicos (respuesta CTL por *"cytotoxic T lymphocytes"*). La supervivencia de los linfocitos seleccionados favorece la acumulación de mutaciones somáticas (clones verdes con inserciones rojas) para dar lugar a la fase leucémica o fase clínica (clones naranjas con inserciones rojas). Se considera que esta etapa se alcanza en aproximadamente el 5% de los individuos infectados después de varios años (décadas en el caso de HTLV-1) conduciendo rápidamente a la muerte del individuo. Adaptado de [10] con aportes de [3].

La **transmisión del BLV** se da tanto en forma vertical (gestación, parto y lactancia) como horizontal (entre individuos). La transmisión vertical por transferencia transplacentaria o durante el periparto ha sido documentada y podría representar entre 10-25% de las infecciones [11-13], mientras que la alimentación de terneros vía calostro es una oportunidad para recibir anticuerpos específicos contra BLV pero también una fuente de transmisión,

requiriéndose la aplicación de procedimientos de inactivación como congelado/descongelado, secado o pasteurización[14].

Sin embargo, la principal forma de transmisión de BLV es la horizontal por transferencia de células infectadas presentes en sangre, semen o secreciones mucosas. Algunos insectos hematófagos podrían jugar también un rol importante en la propagación del virus. La principal causa de transmisión horizontal depende de la realización de procedimientos veterinarios iatrogénicos utilizando materiales contaminados con sangre de animales infectados (jeringas, instrumentos para tatuaje o desguampado, guantes para palpación rectal, etc.) [13]. La implementación de prácticas que apunten a reducir la transmisión por esta vía ha sido identificada como la principal vía para reducir la prevalencia del BLV en rodeos ganaderos[15, 16].

Los eventos tempranos que dan lugar al establecimiento de la infección por BLV en un nuevo individuo son desconocidos. La primoinfección ocurre con la entrada de células alogénicas infectadas a través de sangre, semen o leche materna. El establecimiento de la infección en los nodos linfáticos es importante en diversos virus linfotrópicos (HIV, SIV o HTLV-1) y BLV no es la excepción. En ovejas infectadas con BLV se detecta una rápida respuesta inmune (4-6 días post infección) no obstante la transmisión de BLV a linfocitos B productores de IgM continúa en paralelo, demostrando la capacidad del virus de evadir la respuesta del hospedero en las etapas tempranas del ciclo infeccioso [17]. Si bien BLV puede infectar diversos tipos celulares (monocitos/macrófagos)[18], las principales células infectadas por este virus son los linfocitos B (MHCII+, IgM+, CD5+, CD11b+)[2].

La detección de proteínas y partículas de BLV en el hospedero es muy baja, sin embargo, existe una fuerte respuesta inmune celular y humoral, lo cual lleva a pensar que una baja proporción de células productoras de partículas son constantemente eliminadas en forma eficiente por el sistema inmune. Sin embargo aquellas células infectadas conteniendo el ADN proviral en forma silente, no pueden ser eliminadas y mantienen un reservorio de células potencialmente productoras de virus gracias a la expansión clonal de los linfocitos[2].

Ciertos retrovirus animales (*Alpharetrovirus* y *Gammaretrovirus*) generan tumores mediante la activación de oncogenes virales o activación insercional de protooncogenes celulares. Históricamente se ha considerado que BLV (al igual que HTLV) se inserta en el genoma hospedero en forma aleatoria, siendo poco probable que el proceso oncogénico sea disparado por activación insercional de proto-oncogenes celulares[19]. Además estos virus no poseen secuencias de origen celular típicas de oncogenes[20, 21]. Actualmente se sabe que la región pX del genoma de deltaretrovirus, ubicada entre *env* y el LTR 3', posee genes reguladores que juegan un rol fundamental en el proceso de leucemogénesis. En BLV esta secuencia codifica diversas proteínas reguladoras: Tax (activador transcripcional de la expresión viral y de la vía NF- κ B), Rex (exportación nuclear de ARNm virales), R3 y G4 (relacionadas con el mantenimiento de la carga viral). Las proteínas Tax y G4 poseen además potencial oncogénico, y de hecho Tax ha sido propuesta como la responsable de la inmortalización selectiva de linfocitos B CD5+ (productores de IgM) en la etapa de linfocitosis persistente, dando ventaja a éstos para que un segundo evento de selección (mutación de p53, polimorfismos del gen BoLA –homólogo de MHC tipo II en vaca- y del promotor de gen TNF- α) complete el proceso de transformación leucémica [3]. La organización genómica y los mecanismos leucemogénicos de BLV y HTLV-1 son muy similares, sobresaliendo la presencia de un gen codificado por la cadena negativa del genoma de HTLV-1, cuyo ARN y la proteína expresada tienen junto a Tax, gran relevancia en el proceso leucemogénico: el gen *hbz*[22]. Recientemente fue reportado un ARN antisentido con similares características en BLV[23] y su implicancia en el proceso tumorigénico señalada como de gran relevancia junto con la activación insercional (Figura 2)[10]. En referencia a este último punto, estos autores detectaron que la inserción del ADN proviral no ocurre absolutamente al azar, sino que se da en ciertos "hotspots", muchos de ellos afectando la actividad de genes relacionados con cáncer o "cancer drivers". Por último, destacamos la presencia de una región ubicada a 3' de *env* que bajo el control del promotor de la ARNpol III es capaz de codificar micro ARN con capacidad de regular el proceso oncogénico[8].

La **epidemiología de la LBE** presenta una distribución mundial con valores de prevalencia variables. En Europa se han aplicado importantes y exitosas campañas de control y vigilancia, logrando erradicar la LBE en la mayoría de los países de Europa Occidental (en algunos países existen regiones declaradas libres de LBE) y reducir notoriamente su prevalencia en el resto de los países miembros[13, 24]. Asimismo, Nueva Zelanda (libre de LBE desde 2008) y Australia (declarada libre de LBE en el 99.7% de los rodeos lecheros en 2013) han aplicado igualmente programas de control y erradicación desde 1996 y 1983 respectivamente. En Norteamérica, EE.UU. y Canadá reportan una alta prevalencia de LBE sobre todo en rodeos lecheros. Por su parte Sudamérica presenta también altos valores de prevalencia en la mayoría de los países, mientras que en Asia y África algunos países se presentan como libres de BLV[24].

En Uruguay no hay datos oficiales de prevalencia de infección por BLV, no obstante algunos reportes y estudios previos indican que la situación no es muy diferente de los demás países con sistemas de producción similar y sin programas de erradicación: valores de prevalencia muy variables entre establecimientos, con mayor prevalencia individual en establecimientos de mayor tamaño y manejo más intensivo (>50%) y una elevada prevalencia a nivel de rodeos (muy pocos establecimientos presentan un 100% de resultados negativos)[25-27]. La prevalencia de BLV en los rodeos tiende a aumentar con el tiempo como consecuencia de la edad de los animales y el mayor tiempo de exposición a las técnicas de manejo iatrogénicas [28]. A esto se suma la selección de animales negativos para exportación de ganado en pie (impuesta por algunos mercados), haciendo que la prevalencia de BLV en Uruguay tienda a aumentar (Acta N°84, Comisión Nacional Honoraria de Salud Animal, (CONAHSA), 2005). Un estudio reciente sobre la situación en EE.UU. muestra resultados de prevalencia similares y destacan el aumento de la misma a nivel país, haciendo hincapié en la importancia de esta enfermedad en la industria láctea y la necesidad de tener en cuenta estos resultados para tomar acciones que tiendan a revertir la situación, atendiendo principalmente a la implementación de medidas para disminuir la transmisión del virus[29].

La LBE tiene un impacto significativo desde un punto de vista económico en el descenso de la productividad a nivel local y la pérdida de mercados internacionales, en relación al aumento de la mortalidad [30], la alteración del sistema inmune del ganado infectado y el aumento concomitante de otras patologías infecciosas [31], la restricción de la exportación de ganado en pie infectado y la restricción de la exportación de semen y de embriones infectados. Varios trabajos muestran una clara asociación entre la infección con BLV y la disminución de la producción de leche (2,5 a 3,5%), la disminución de los tiempos de sobrevida y el aumento de enfermedades infecciosas (mastitis, diarrea y neumonía)[32-34].

Desde el punto de vista zoonótico, el BLV ha estado bajo la lupa debido a la importancia del ganado vacuno en la dieta humana (carne, leche y derivados). La idea de que el BLV no es transmisible a humanos y que no existen enfermedades humanas atribuibles a este virus, se ha edificado gracias al rigor de múltiples trabajos científicos [35-37]. De todos modos la presencia de ADN proviral en leche fresca y carne cruda para consumo humano [38] y la detección de anticuerpos contra proteínas de BLV en humanos [39] ha mantenido un velo de incertidumbre en torno al tema. En los últimos años, la duda ha sido reavivada debido a la asociación de este virus con cáncer de mama en humanos, por parte de algunos autores [40-44]. Otros han presentado evidencia en contra de esta asociación [45, 46] manteniendo cierto grado de controversia que ha propiciado la revisión de evidencia a favor y en contra, por parte de diversos autores. Diferentes virus con potencial oncogénico (entre ellos BLV) han sido relacionados con cáncer de mama en humanos, sin embargo a la fecha no existen evidencias concluyentes de asociación directa entre virus y esta enfermedad [13, 47, 48]. Para terminar la controversia al respecto, sería necesario aislar una partícula de BLV a partir de tejido mamario, leche materna o leche/carne para consumo humano [49], lo cual se ve dificultado por la baja producción de viriones por parte de BLV.

HTLV-1 es uno de los virus más oncogénicos y probablemente uno de los carcinógenos humanos más potentes [50]. La biología de HTLV-1 y los procesos leucemogénicos que conducen al estado tumoral de las células infectadas

permanecen aun parcialmente esclarecidos, requiriéndose aplicar estrategias en forma conjunta para erradicar dicha enfermedad [51]. BLV representa un excelente modelo animal para el estudio de HTLV, teniendo en cuenta que pertenecen a la misma subfamilia de retrovirus, poseen similar organización genómica y comparten la característica de infectar y transformar células hematopoyéticas [52].

El estudio de BLV puede aportar información extrapolable a otros retrovirus menos relacionados. Un ejemplo de esto es el estudio estructural a nivel atómico de la cápside nativa de BLV realizado por nuestro grupo [53] y publicado junto al trabajo de Gres en HIV [54], aportando información respecto a los contactos moleculares entre proteínas de la cápside, aplicable a retrovirus en general.

5.2. RETROVIRUS Y CAPSIDES RETROVIRALES

En esta sección haremos una revisión general de los retrovirus, aprovechando la vasta bibliografía relacionada con HIV-1 e intentando contrastar con datos relacionados a BLV (o HTLV-1) en la medida que sea posible. Para ello dedicaremos tres secciones a describir el genoma retroviral, la partícula madura y el ciclo replicativo, haciendo hincapié en aquellos aspectos relacionados con la cápside o donde esta juega un rol protagónico. Finalmente dedicaremos dos secciones a resaltar la importancia de ésta en el diagnóstico de la LBE y como posible blanco terapéutico contra este retrovirus.

5.2.1. GENOMA

El genoma de BLV está formado por dos copias idénticas de ARN simple hebra de polaridad positiva (ARNss+) lineal y no segmentado, con tamaño relativamente pequeño de alrededor de 8 Kb. La **Figura 3** presenta en forma esquemática el genoma de BLV con elementos característicos de retrovirus (además de elementos propios de este virus) y también los respectivos productos de transcripción y traducción.

El ARN viral es generado por la maquinaria transcripcional de la célula hospedera y por ende contiene elementos propios de los ARNm en los extremos 5' y 3'. La región codificante consta fundamentalmente de tres genes principales: **gag** (por “*group specific antigen*”), **pol** (por “*polymerase*”) y **env** (por “*envelope*”) además de un conjunto de genes reguladores codificados por la región X, característica de los llamados “retrovirus complejos” (*deltaretrovirus*, *epsilonretrovirus*, *lentivirus* y *spumavirus*). La región codificante se encuentra flanqueada por elementos con funciones importantes para el ciclo replicativo. Las secuencias cortas repetidas **R** (por “*repeated region*”) y las regiones **U5** y **U3** (por “*unique 5'* y *unique 3' regions*”), las cuales presentan diferencias características entre sí, pero comparten las secuencias att necesarias para la integración proviral; U3 posee además elementos actuantes en *cis*, implicados en la expresión de los genes virales. Entre U5 y la región codificante se encuentran el sitio de unión al cebador **pbs** (por “*primer binding site*”) donde inicia la síntesis de la cadena de ADN negativo durante la retrotranscripción y la secuencia **psi** (**Ψ**) responsable de la encapsidación del ARN viral. A continuación de la región codificante y justo antes de U3 se encuentra una corta secuencia de polipurinas **ppt** (por “*polypurine tract*”), resistente a la actividad endonucleasa de la retrotranscriptasa viral (RT) donde inicia la síntesis del ADN de la cadena positiva durante la retrotranscripción. Durante este proceso ocurre una duplicación y translocación de los bloques U5 y U3, dando como resultado la formación de una molécula de ADN bicatenaria que contiene dos terminales idénticos **LTR** (por “*Long Terminal Repeats*”) con las secuencias U3, R y U5 que serán conservadas luego de la integración [55].

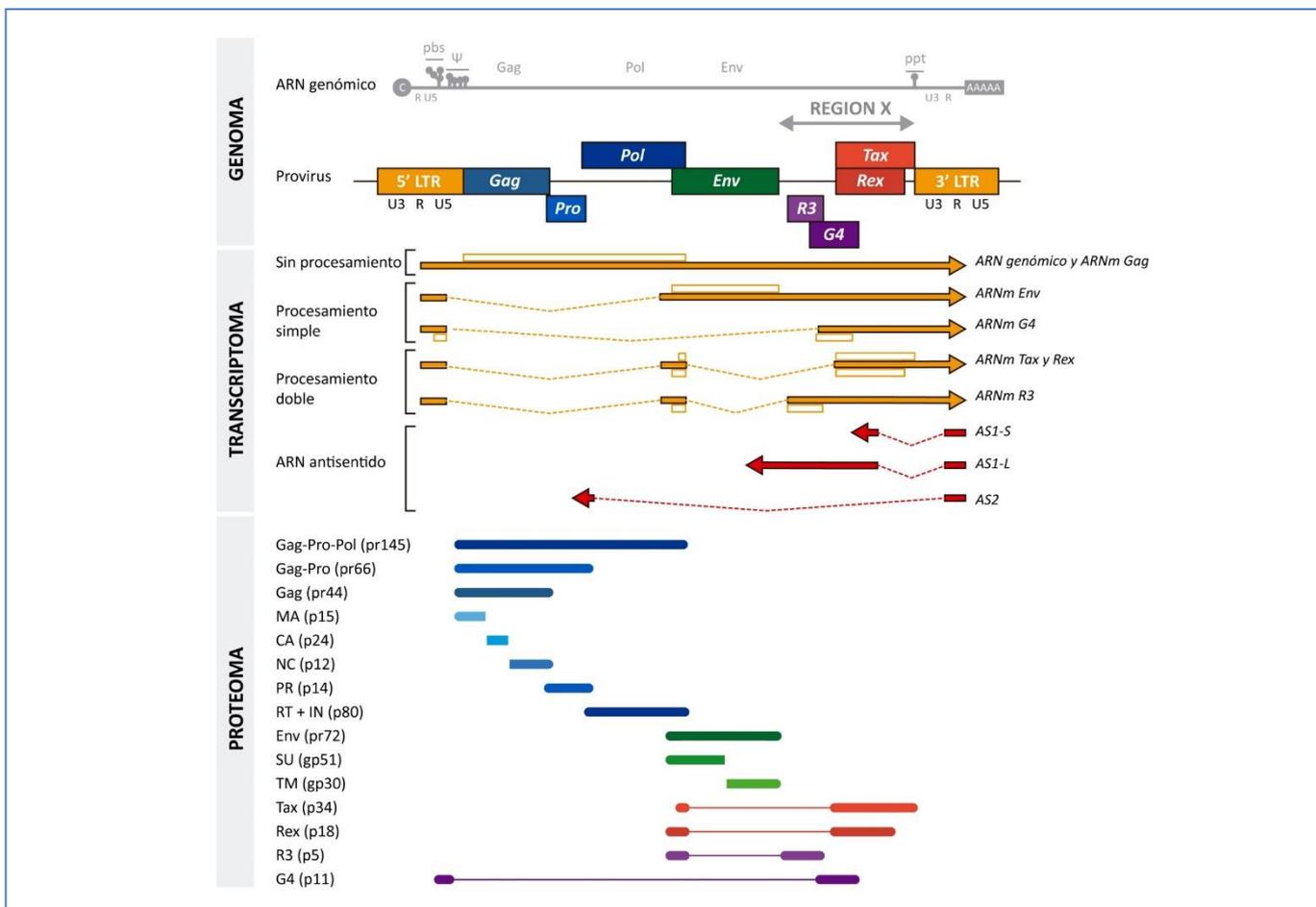


Figura 3: Genoma de BLV y sus productos de transcripción y traducción. Se representa el genoma de BLV con sus elementos característicos y los genes que codifica. Se incluyen los diferentes ARNs transcritos (flechas anaranjadas) con sus respectivas regiones codificantes o CDS (rectángulos sin relleno del mismo color) y los intrones eliminados por eventos de *splicing* (líneas discontinuas). Por último, se presentan las diferentes proteínas traducidas, incluyendo precursores y los respectivos productos de proteólisis que dan lugar a proteínas funcionales. Aquellas proteínas cuyas secuencias codificantes (CDS) integran dos exones diferentes se presentan como bloque unidos por una línea delgada del mismo color (representando la región intrónica). Adaptado de [2] con aportes de [56] y [23].

El gen *gag* codifica la poliproteína estructural Gag precursora de la proteína de matriz (MA), la proteína de la cápside (CA) y nucleocápside (NC), mientras que el gen *pol* codifica otra poliproteína precursora de las enzimas replicativas esenciales: transcriptasa reversa (RT) e integrasa (IN) así como la proteasa aspártica (PR) responsable del procesamiento de Gag y Pol.

El gen *env* da lugar a la glicoproteína Env, una poliproteína que es clivada por una proteasa celular tipo furina para dar lugar a las subunidades superficie (SU) y transmembrana (TM) responsables de mediar la unión al receptor celular y fusionar la envoltura viral con la membrana plasmática celular.

En cuanto a las proteínas codificadas por la región reguladora X, Tax está implicada en la replicación viral y los procesos de oncogénesis, y Rex controla el transporte nuclear y la traducción de los ARN virales, mientras que R3 y G4 están relacionados con los procesos patogénicos [55, 57].

Además un conjunto de tres ARN antisentido (codificados por la cadena de ADN proviral positivo) han sido identificados recientemente, homólogos a los que codifican HBZ en HTLV-1, una proteína relacionados con el proceso leucemogénico [23].

5.2.2. LA PARTICULA RETROVIRAL

La partícula de BLV posee morfología relativamente esférica al igual que todos los retrovirus ([Figura 4.A](#) y [Figura 5](#)) y consta de una envoltura lipídica proveniente de la célula hospedera, adquirida durante la etapa de brotamiento. Su diámetro es variable, con valores entre 60-125 nm [[2](#), [58](#)]. La envoltura presenta un número variable de glicoproteínas de superficie, embebidas y agrupadas en forma de trímeros. Este número ha sido estimado en lentivirus como HIV o SIV entre 8-14 trímeros por partícula, lo cual representa un número excepcionalmente bajo en comparación con otros virus, reduciendo la eficiencia de transmisión pero también la capacidad de desplegar una respuesta de anticuerpos neutralizantes eficiente [[59](#), [60](#)].

El precursor Env es expresado con un péptido líder para su presentación en superficie y posee ambos dominios SU y TM separados por un sitio de corte por proteasas celulares tipo subtilina/kexina como es el caso de la furina; no obstante en BLV se ha evidenciado el procesamiento de Env también por otras proteasas relacionadas en células carentes de esta enzima [[61](#)]. La interacción de SU y TM es débil en algunos retrovirus como HIV, no obstante en deltaretrovirus como HTLV-1 [[62](#)] o BLV [[63](#)], ambas permanecen unidas entre sí por un puente disulfuro entre secuencias conservadas, conocidas como dominios de isomerización de cisteínas. Dicha isomerización de cisteínas y la concomitante formación de puentes disulfuro inter-cadenas ha sido propuesta como una de las modificaciones ocurridas en SU y TM a raíz de la unión al receptor para dar lugar a la fusión de membranas [[64](#), [65](#)].

La subunidad TM atraviesa la envoltura y se dispone con un pequeño dominio expuesto hacia el espacio citosólico, mientras que el ectodominio forma homo-trímeros donde cada uno se mantiene ligado a una subunidad SU. Las subunidades SU, encargadas de unirse a los receptores celulares en forma específica exponen en su parte distal dominios tipo mucina fuertemente glicosilados [[66](#), [67](#)].

Si bien la partícula retroviral es producida en su forma inmadura (no infectiva) y pasa a su estado maduro mediante una serie de re-arreglos estructurales en el interior de esta ([Figura 4](#)), en la presente sección nos ocuparemos únicamente de la versión madura de la misma. La cara interior de la envoltura viral se encuentra recubierta por MA, uno de los productos de la proteólisis de Gag a cargo de la proteasa viral PR. La proteína MA posee un peso molecular de 15-17 kDa y se ancla a la cara interna de la membrana plasmática de la célula gracias a la adición co-traducciona de un grupo miristoílo en el extremo N-terminal. La interacción electrostática de MA a través de un parche de residuos básicos con las cabezas polares de ciertos fosfolípidos de membrana como fosfatidilserina (PS), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilcolina (PC) y fosfatidilinositol 4,5-bifosfato [PI(4,5)P₂], también favorecen la interacción de Gag con la membrana [[68](#)] y explica la abundancia en el virión, de lípidos poco frecuentes en la membrana celular como PI(4,5)P₂ y PC.

En el interior de la partícula madura encontramos el núcleo viral o “*core*”, conformado por la cápside conteniendo al genoma viral y el resto de los componentes virales. La cápside retroviral es una estructura supramolecular cerrada y pleomórfica, formada exclusivamente por subunidades CA (otro de los productos proteolíticos de Gag) mayoritariamente dispuestas en arreglos cuasi-hexagonales semi-planares, con suficiente curvatura para formar una estructura cerrada tipo fullereno [[69](#)]. Esto es geoméricamente posible gracias a la introducción de doce arreglos pentaméricos de CA [[70](#)] con ubicación variable, lo cual resulta en cápsides con estructuras muy diversas [[71](#)] ([Figura 5](#)) en contraposición con las cápsides icosaédricas de otros virus (con forma y dimensiones definidas). Estas unidades hexaméricas y pentaméricas representan los capsómeros de los retrovirus.

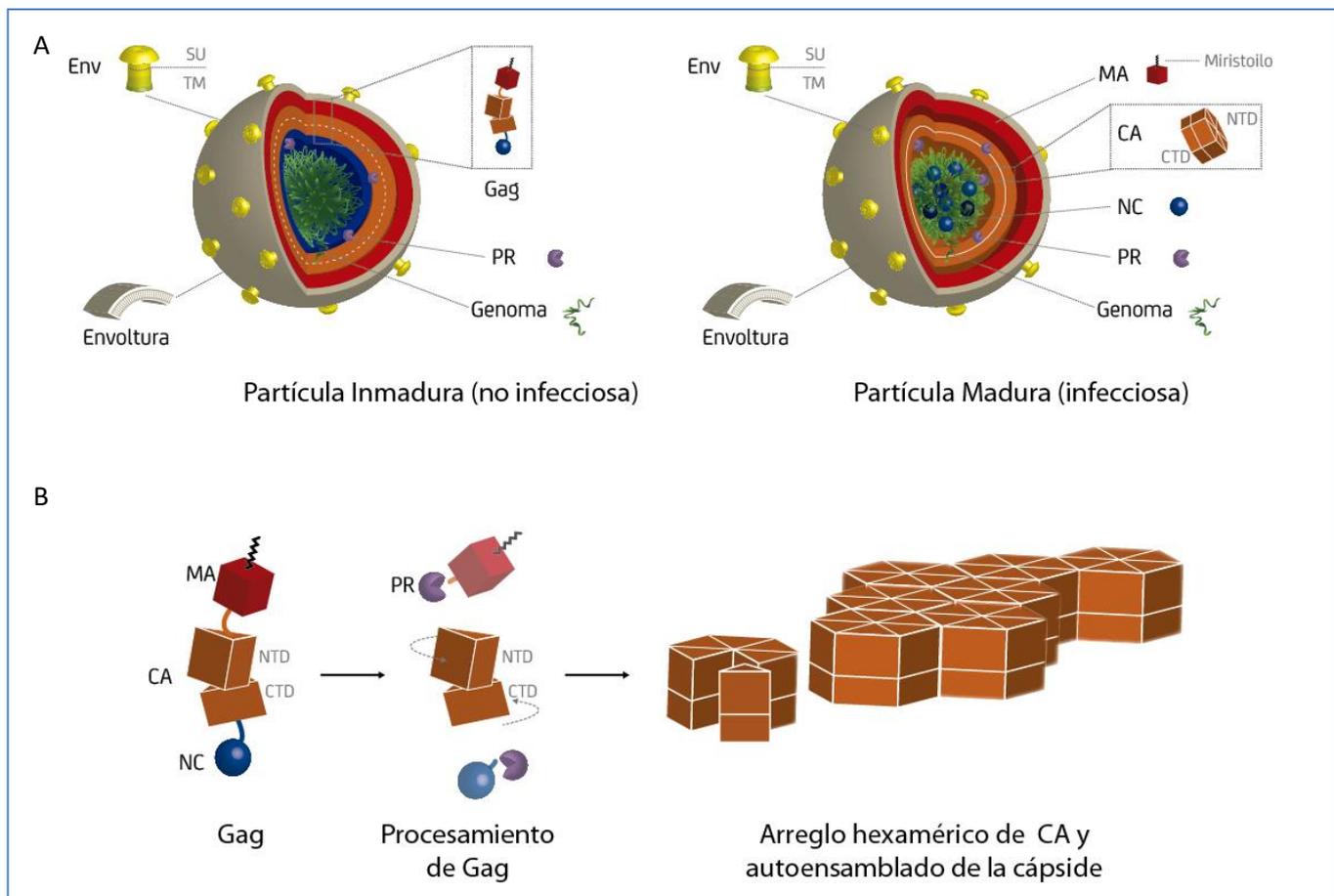


Figura 4: Esquema de la partícula retroviral haciendo énfasis en los cambios estructurales durante la maduración.

A) Representación esférica de una partícula viral de retrovirus con la envoltura viral proveniente de la bicapa lipídica de la célula hospedera, presentando en la superficie los trómeros de Env (amarillo) responsables de la unión al receptor celular y de la fusión de la partícula con la célula. A la izquierda se presenta una partícula inmadura con Gag (en rojo, naranja y azul para distinguir sus dominios MA, CA y NC) tapizando la cara interna del virión y el genoma formado por 2 copias de ARN simple hebra ubicado en el centro (verde). La proteasa viral PR (violeta) es la encargada de clivar la poliproteína Gag durante el proceso de maduración para dar origen a las proteínas estructurales. A la derecha se representa la partícula viral madura con Gag clivada. Tapizando la cara interna de la envoltura se encuentra MA, y CA formando la cápside cerrada. NC se representa ahora como esferas azules interactuando directamente con el genoma condensado en el interior del virión. La interfaz entre los dominios NTD y CTD de CA se representa como una línea blanca discontinua en la partícula inmadura y continua en la partícula madura para remarcar los cambios estructurales a este nivel. **B)** Representación de la proteína Gag y los cambios sufridos durante la maduración. La proteasa PR cliva Gag liberando MA (representada como un cubo rojo con el grupo miristoílo) que permanece unida a la envoltura y NC que colapsa hacia el interior unida al ARN viral. Por su parte CA liberada, sufre re-arreglos conformacionales que le permite desencadenar un proceso de autoensamblado para formar una red hexamérica que dará lugar a la estructura cerrada conocida como “cápside” cuyo rol en las etapas posteriores de la infección son vitales.

CA es una proteína de unos 24 kDa, formada por dos dominios globulares identificados como NTD y CTD (por “N-terminal domain” y “C-terminal domain” respectivamente). Los mismos se encuentran conectados por una región bisagra o “linker” flexible de 4-6 residuos carente de estructura definida. La estructura secundaria de CA está formada casi exclusivamente por α -hélices; en HIV el NTD está formado por siete ($\alpha 1$ a $\alpha 7$) y el CTD por cuatro ($\alpha 8$ a $\alpha 11$) [72-74]. Por su parte en deltaretrovirus no se encuentra el loop de unión a ciclofilina ni la hélice 6, sin embargo, se mantiene la numeración de HIV. Las únicas dos cadenas beta se encuentran en los primeros doce residuos del extremo N-terminal, formando un bucle o β -hairpin estabilizado por un puente salino entre la prolina inicial (Pro1) y un aspartato conservado en la α -hélice 3 (Asp₅₁ en HIV, Asp₅₃ en BLV o Asp₅₄ en HTLV) [75]. La estructura β -hairpin ha sido observada por difracción de rayos X en arreglos hexaméricos de CA nativa de HIV-1

[54] y de BLV ([53]). A nivel de retrovirus, CA posee baja identidad de secuencia aminoacídica (con excepción del dominio MHR por “*major homology region*” ubicado al inicio del CTD), sin embargo, su estructura terciaria (y su función) son altamente conservadas.

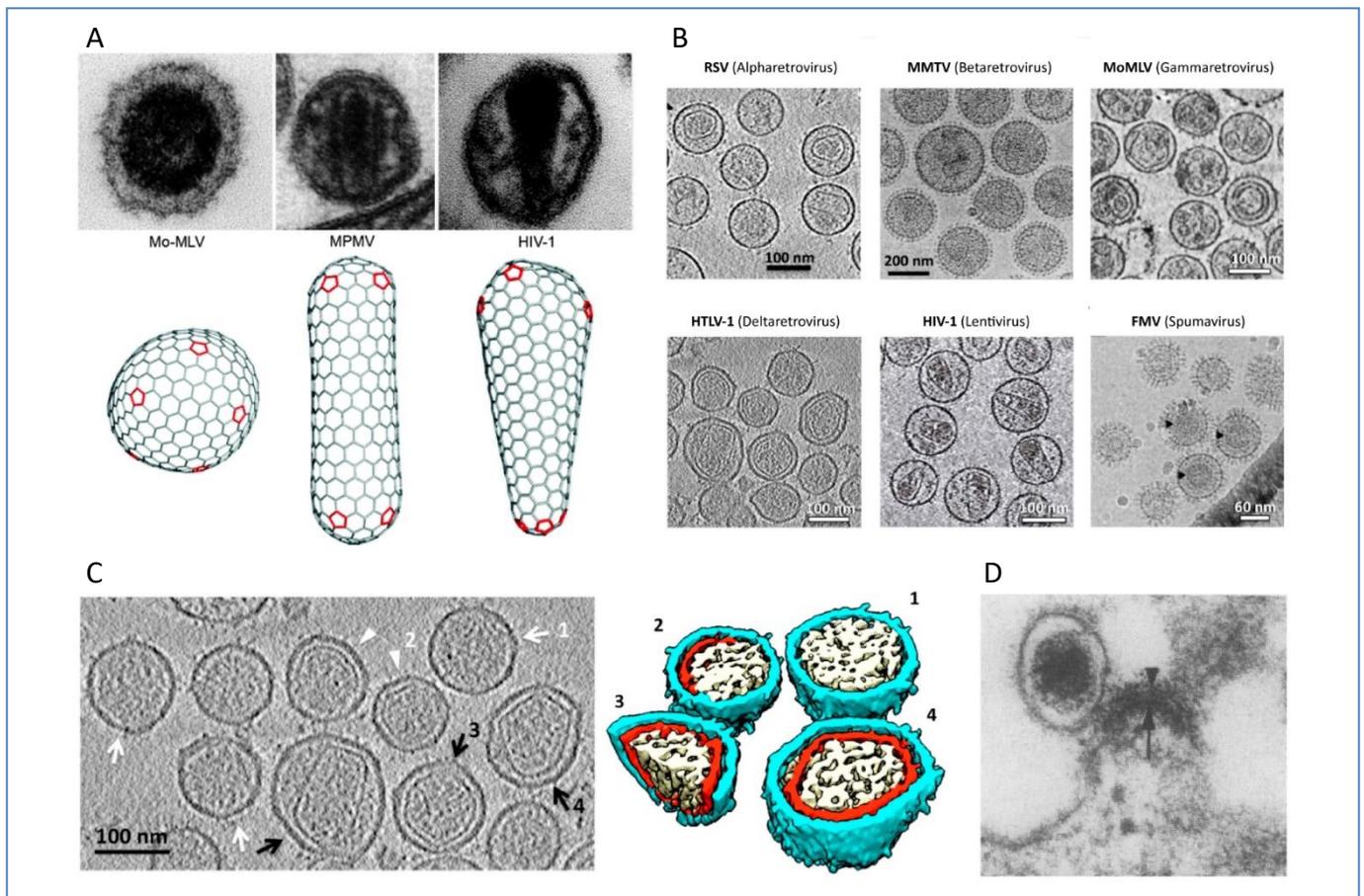


Figura 5: Morfología de las cápsides retrovirales: **A)** Imágenes de partículas virales maduras obtenidas por microscopía electrónica (*arriba*) y modelos fullereno (*abajo*) para tres retrovirus: Moloney murine leukemia virus (Mo-MLV, gammaretrovirus), Mason-Pfizer monkey virus (MPMV, betaretrovirus), y HIV-1 (lentivirus). Las cápsides están conformadas por un número variable de capsómeros hexaméricos y doce pentámeros necesarios para cerrar la estructura (en rojo) [76]. **B)** Imágenes de partículas maduras de diferentes géneros retrovirales obtenidas por microscopía electrónica. Los spumavirus se diferencian del resto de los ortoretrovirus debido a que la Gag no es procesada en las tres proteínas clásicas MA, CA y NC, tal como lo muestran las cabezas de flecha negras [77]. **C)** A la izquierda se presenta una ampliación de la imagen de partículas maduras de HTLV-1 (presentada en B), destacando los viriones con la cápside completa (flechas negras), aquellos donde no se distingue la cápside (flechas blancas) y aquellos donde la misma se distingue parcialmente (cabezas de flecha blancas). A la derecha se presenta un modelado de las partículas numeradas, destacando la envoltura nuclear (cian), la cápside (rojo) y su interior ribonucleoproteico (beige) [78]. **D)** Microscopía electrónica de una partícula de BLV junto a una partícula en proceso de ensamblado (flechas negras) obtenidas a partir de linfocitos de una vaca presentando linfocitosis persistente. [79].

En solución la CA retroviral tiende a formar agregados ordenados que emulan los arreglos que dan lugar a la cápside [80-83], y en tal sentido contamos con información estructural de alta resolución tanto para CA nativa de HIV-1 como BLV, mostrando arreglos similares [53, 54]. Sin embargo los mecanismos para llegar a estas estructuras no son iguales: la CA de HIV-1 forma dímeros a concentraciones por encima de 10-30 μM mientras que en deltaretrovirus se mantiene como monómero incluso a altas concentraciones (1mM) [84]. Las condiciones fisicoquímicas que disparan este ensamblado en solución pueden ser diversas: temperatura, sales, pH, ácidos nucleicos, alta concentración local de macromoléculas o “macromolecular crowding” [85], lípidos [86, 87], etc.

El auto-ensamblado de CA_{BLV} han sido estudiado en detalle en nuestro laboratorio por Gonzalo Obal mediante el seguimiento de la formación de arreglos supramoleculares ordenados por turbidimetría [88, 89]. La medida de A_{340} a través del tiempo permite demostrar que CA_{BLV} mantenida en HEPES 20 mM pH 7,4, 50mM NaCl es capaz de

autoensamblar de modo concentración dependiente, y diversas condiciones como temperatura, pH, fuerza iónica e incluso la presencia de iones divalentes de diversa naturaleza son capaces de modular dicho ensamblado (Figura 6).

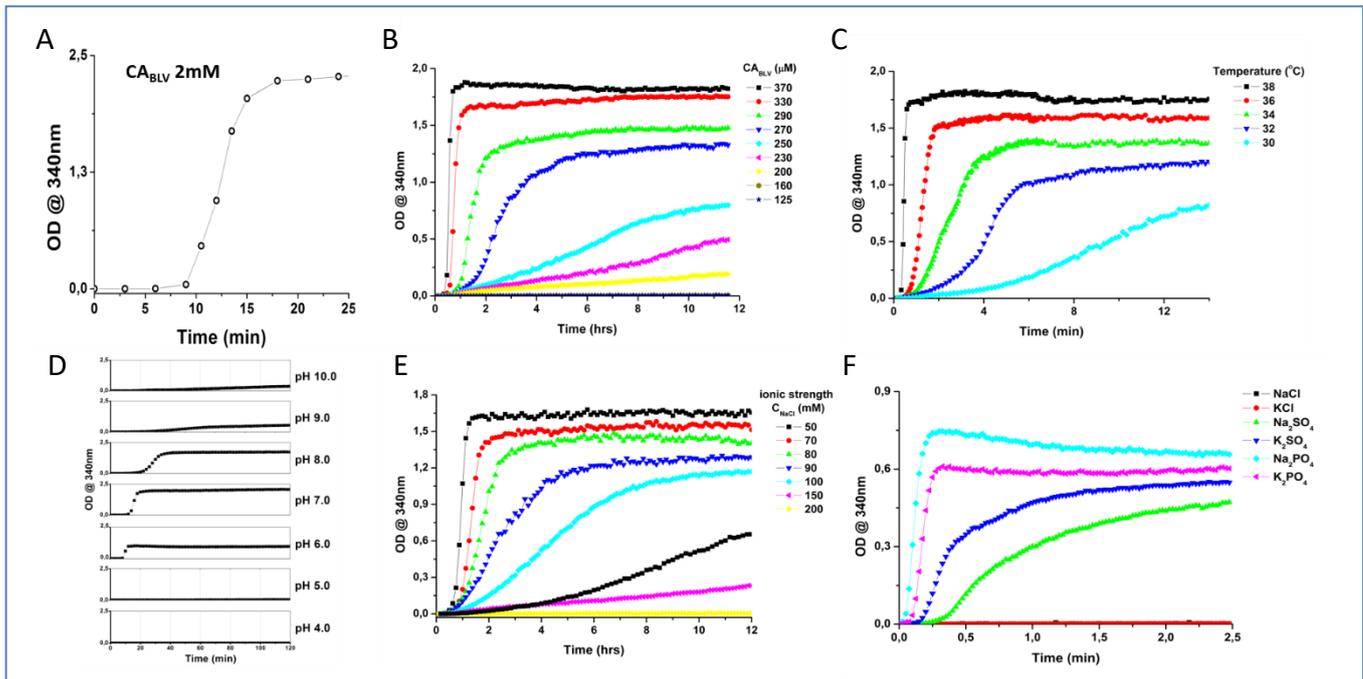


Figura 6: Estudio del autoensamblado de CA_{BLV} en solución. A) El progreso de la reacción de autoensamblado de CA_{BLV} en solución puede ser seguido midiendo la A₃₄₀ en placas de 96 pocillos mantenidas en condiciones controladas. Algunas de las condiciones fisicoquímicas que modulan el ensamblado son la concentración proteica (B), temperatura (C), pH (D), fuerza iónica (E) y naturaleza de los iones divalentes presentes en la solución (F). Tomado de [89].

Los primeros datos estructurales de los dominios de CA en HIV obtenidos a alta resolución (así como de otras proteínas de HIV) fueron obtenidas en la segunda mitad de la década de los 90 [73, 75, 90]. La complementación de datos obtenidos por microscopía electrónica a baja resolución a partir de mallas de hexámeros de CA_{HIV-1} y datos estructurales de sus dominios obtenidos a alta resolución por NMR o difracción de rayos X, permitió comenzar a dilucidar la orientación de las subunidades de CA en la *lattice* (el NTD orientado hacia la cara externa de la cápside y el CTD hacia el interior) y los contactos que la estabilizan [91]. La identificación de estos contactos permitió introducir cisteínas en posiciones clave que permitieran estabilizar los capsómeros (pentámeros y hexámeros de CA) y resolver sus estructuras a nivel atómico [92-94]. Estos resultados fueron validados en 2015 con la dilucidación de la estructura tridimensional a baja resolución de la *lattice* de CA_{HIV} nativa [54]. Las interacciones entre NTD (intra-hexámero) estabilizan los capsómeros formando anillos de seis protómeros (o cinco en el caso de los pentámeros); a su vez la *lattice* se forma gracias a los contactos entre capsómeros adyacentes mediante contactos CTD-CTD y NTD-CTD (inter-capsómero). Existen también contactos NTD-CTD intra-CA que enrigidecen los CTD más móviles, estabilizando la estructura.

La elucidación de las estructuras atómicas de las *lattice* de CA nativa tanto en HIV como BLV demostraron que existe gran homología en los contactos entre los dominios de CA que estabilizan las cápsides maduras de retrovirus pertenecientes a géneros diferentes y además evidenciaron una gran plasticidad a nivel de los contactos que estabilizan la cápside [53, 54]. Esta plasticidad conformacional resulta fundamental para explicar diversos aspectos como: la capacidad de generar regiones con diferente curvatura, la capacidad de formar hexámeros y pentámeros para generar una estructura cerrada, la posibilidad de autoensamblar en diversas condiciones fisicoquímicas, la capacidad de adaptarse frente a diversos interactores (por ejemplo factores de restricción celulares o componentes

del poro nuclear como se verá más adelante) y la aptitud para mantener los contactos entre protómeros en forma independiente de la conformación de éstos (por ejemplo durante la maduración).

En el interior de la cápside se encuentra el genoma viral condensado con NC, una proteína básica con función análoga a las histonas celulares, capaz de unirse al ARN viral dando lugar a un complejo ribonucleoproteico compacto.

Otras proteínas virales como PR, RT e IN, forman parte de la partícula retroviral y poseen indiscutida importancia en el ciclo replicativo, pero no las analizaremos en detalle en esta tesis. Tanto RT como PR son los blancos por excelencia en terapia antirretroviral. En relación con la PR (a menudo llamada también retro pepsina) diremos simplemente que es una proteína de 10-15 KDa perteneciente al grupo de las proteasas aspárticas. Es capaz de reconocer secuencias aminoacídicas específicas y en forma regulada presentando un sitio activo conformado por homodímeros de PR. Volveremos a hablar de esta enzima cuando analicemos la fase de maduración, no obstante numerosas y completas revisiones pueden ser consultadas [95-99]. Por su parte la RT en el caso de HIV es un heterodímero conformado por dos subunidades relacionadas: una grande (p66) conteniendo dominios polimerasa y RNasa H y otro pequeño (p51) similar (pero no idéntico) al dominio polimerasa de p66. Se cree que la subunidad p66 es la que posee actividad catalítica mientras que p51 cumple un rol más estructural [100]. La integrasa viral IN asegura la transmisión de la información viral mediante expansión clonal y en tal sentido es responsable de una de las mayores ventajas de los retrovirus: transmitir la información en forma silenciosa. El mecanismo de esta enzima, su participación en los complejos de importación nuclear y la estructura del complejo pre integración son también sujeto de numerosas revisiones [101-105].

Por último vale destacar que buena parte de los componentes de la partícula retroviral está representada por moléculas del hospedador, muchas de estas reclutadas en forma específica y cumpliendo funciones importantes en el ciclo replicativo (revisado en detalle para HIV por diversos autores [106-108]). Podemos destacar: ácidos nucleicos como algunos ARNm, ARNr y ARNt; en particular el ARNt complementario a la secuencia pbs del genoma retroviral, cuyo rol es fundamental en el inicio de la retrotranscripción actuando como cebador de la RT [55]. Diversas proteínas celulares forman también parte del virión y en muchos casos su aporte a la funcionalidad de este permanece elusiva, por lo que son considerados “simples pasajeros”. Otros ejemplos son las numerosas proteínas de membrana incorporadas en la superficie del virus (ICAM-1, HLA-II, Galectina-1, CD80, CD86, etc.) las cuales cumplen roles funcionales como favorecer los contactos del virión y la célula hospedera, estimular diversas cascadas de señales y respuestas celulares (como inflamación, apoptosis y modulación de la respuesta inmune) e incluso prevenir la lisis del virus por parte de las proteínas del complemento (CD46, CD55, CD59). Otras proteínas son también incorporadas en el virión por interacción con proteínas del virus, por ejemplo con diferentes dominios de Gag como la Lysil-ARNt transferasa o chaperonas de la familia “*heat shock*”; también son incorporadas otras chaperonas como ciclofilina A, actina o proteínas de unión a actina relacionadas con la regulación del citoesqueleto, ubiquitina y proteínas monoubiquitiniladas (usualmente dirigidas a la vía endocítica), proteínas de la familia ESCRT (cuyas funciones han sido relacionadas el brotamiento del virión), proteínas del complejo principal de histocompatibilidad, MHC I y II (a menudo asociadas a presentación de superantígenos y activación de linfocitos), proteínas de unión a ácidos nucleicos como por ejemplo APOBEC3G (involucrada en la inmunidad innata antiviral), quinasas como ERK2 o Proteína quinasa A (PKA) entre otras.

5.2.3. CICLO REPLICATIVO

El ciclo replicativo de los retrovirus puede dividirse en dos fases tal como se describe en la **Figura 7**. La fase temprana se puede definir desde el evento de fusión de la envoltura con la membrana de la célula hospedadora, hasta la integración del ADN proviral en el genoma del hospedero. La segunda fase viene a continuación de un período de

latencia de longitud variable, y se considera entre la producción y ensamblado de los diversos componentes virales hasta la generación de una nueva partícula madura e infecciosa.

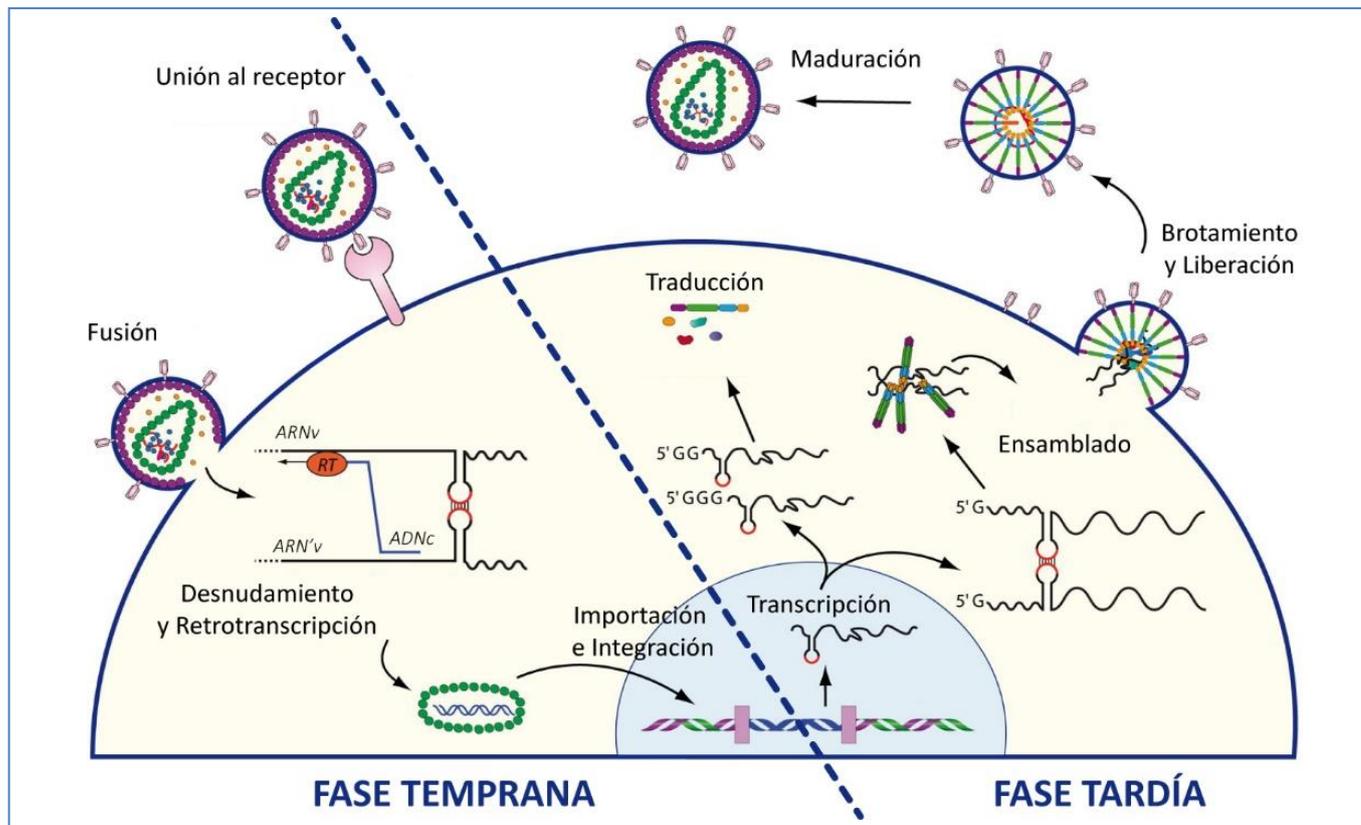


Figura 7: Ciclo Viral de Retrovirus. Se representan en forma esquemática las fases temprana y tardía del ciclo replicativo con todas las etapas descritas en más detalle en esta sección. Adaptado de [109].

5.2.3.1. FASE TEMPRANA DEL CICLO REPLICATIVO

5.2.3.1.1. UNIÓN AL RECEPTOR CELULAR Y FUSIÓN VIRAL

El primer paso del ciclo replicativo consiste en el reconocimiento de proteínas transmembrana sobre la superficie de la célula hospedera que actúan como receptor putativo. A menudo esta etapa es precedida por un episodio de establecimiento de contactos no específicos entre el virión y la célula a través de proteoglicanos tipo heparán sulfato.

En BLV el receptor permanece aún elusivo [110]; de acuerdo a estudios realizados con librerías de fagos hace más de 25 años el receptor de BLV corresponde a una proteína transmembrana de tipo 1 (con un único pasaje a través de la bicapa lipídica)[111]. Estudios realizados por homología de secuencia en ratón, propusieron la subunidad δ del complejo de proteínas adaptadoras AP3D1 [112]. En 2018 se publicaron resultados *in silico* y *in vitro* señalando la interacción entre el extremo N-terminal de la proteína gp51 de BLV y la proteína AP3D1 bovina [113], no obstante esta corresponde a una proteína citosólica sin regiones transmembrana, por lo que la validez de este modelo se mantiene en tela de juicio.

En el caso de HIV el receptor es la proteína CD4 (una glicoproteína expresada en la superficie de linfocitos T, macrófagos y células NK) y consta de un correceptor representado por uno de los receptores de quimioquinas CXCR4 o CCR5[114]. En HTLV-1 el transportador de glucosa GLUT1 y la proteína neurofilina 1 (NRP-1) forman un complejo que ha sido identificado como el receptor viral de superficie [115, 116] e incluso el papel de los proteoglicanos heparán sulfato ha sido priorizado al nivel de estas proteínas [117].

Una vez que se da el reconocimiento específico entre el virión y la célula hospedera, ocurren los re-arreglos conformacionales responsables de acercar y fusionar las membranas lipídicas [118], para que el núcleo ribonucleoproteico o “core” del retrovirus sea internalizado en el citoplasma de la célula. En el caso de BLV no se conoce plenamente el proceso de fusión sin embargo se sostiene que el modelo que mejor se adecúa es el del virus de la leucemia murina (MuLV por “*murine leukemia virus*”)[119]. Según este, SU interacciona con el receptor desencadenando un arreglo conformacional de TM (mantenida hasta ese momento en un estado metaestable fusogénicamente inactivo con el péptido de fusión hidrofóbico ocluido). Este cambio conformacional libera el péptido de fusión que se ancla en la membrana celular, acercando y fusionando ambas bicapas lipídicas.

5.2.3.1.2. RETROTRANSCRIPCIÓN

X Una vez que el “core” es internalizado, diversos factores celulares estimulan la retrotranscripción del ARNv [120, 121], que es acompañada por otros procesos paralelos: el desensamblado parcial de la cápside y la interacción con elementos del citoesqueleto y los poros nucleares [122].

La retrotranscripción es uno de los elementos distintivos de los retrovirus, donde la RT es capaz de sintetizar una cadena de ADN de polaridad negativa (complementaria a la cadena de ARNv de polaridad positiva) a partir de un ARNt que forma parte de la partícula, degradar los segmentos de ARN que se encuentran formando híbridos (actividad ARNasa H) y sintetizar una segunda cadena de ADN de polaridad positiva. Así pues, el producto de la retrotranscripción es un ADN doble hebra conteniendo toda la información genética del virus, flanqueada por dos segmentos LTR (esenciales durante la etapa de integración en el genoma del hospedero). En esta tesis no pretendemos profundizar en los mecanismos de la retrotranscripción (revisado exhaustivamente por [100, 123]).

En HIV, la retrotranscripción ocurre en forma coordinada con la desestabilización del “core”, sin embargo no se sabe si en deltaretrovirus existe correlación entre estos procesos [124].

La presencia de ADN doble cadena en el citoplasma celular es censado por la sintetasa de GMP cíclico y AMP cíclico cGAS (por “*cyclic guanosine monophosphate-adenosine monophosphate synthase*”) y es uno de los principales disparadores de la respuesta innata antiviral, activando vías de señalización y secreción de IFN tipo I y otras citoquinas proinflamatorias. Sin embargo se ha demostrado que HIV retrotranscribe su genoma en un ambiente protegido por la cápside, logrando evadir esta respuesta innata [125, 126] y este complejo es a menudo referido en la literatura como complejo de retrotranscripción (RTC por “*reverse transcription complex*”).

Para que la RT pueda llevar a cabo esta tarea es necesario que la cápside permita la entrada de nucleótidos. Esto se logra gracias a la presencia de poros con tamaño selectivo en el centro de cada hexámero de CA conformados por los residuos Arg₁₈ y una suerte de diafragma móvil constituido por los β-hairpin [127]. Estos poros constituyen un canal positivamente cargado capaz de unir los dNTPs con cinéticas cercanas a la difusión, y se pueden encontrar en estado abierto o cerrado dependiendo de las conformaciones diferentes del β-hairpin como resultado de movimiento pivote de los residuos Pro₁ e His₁₂ respecto al Asp₅₁ (Figura 8.A)

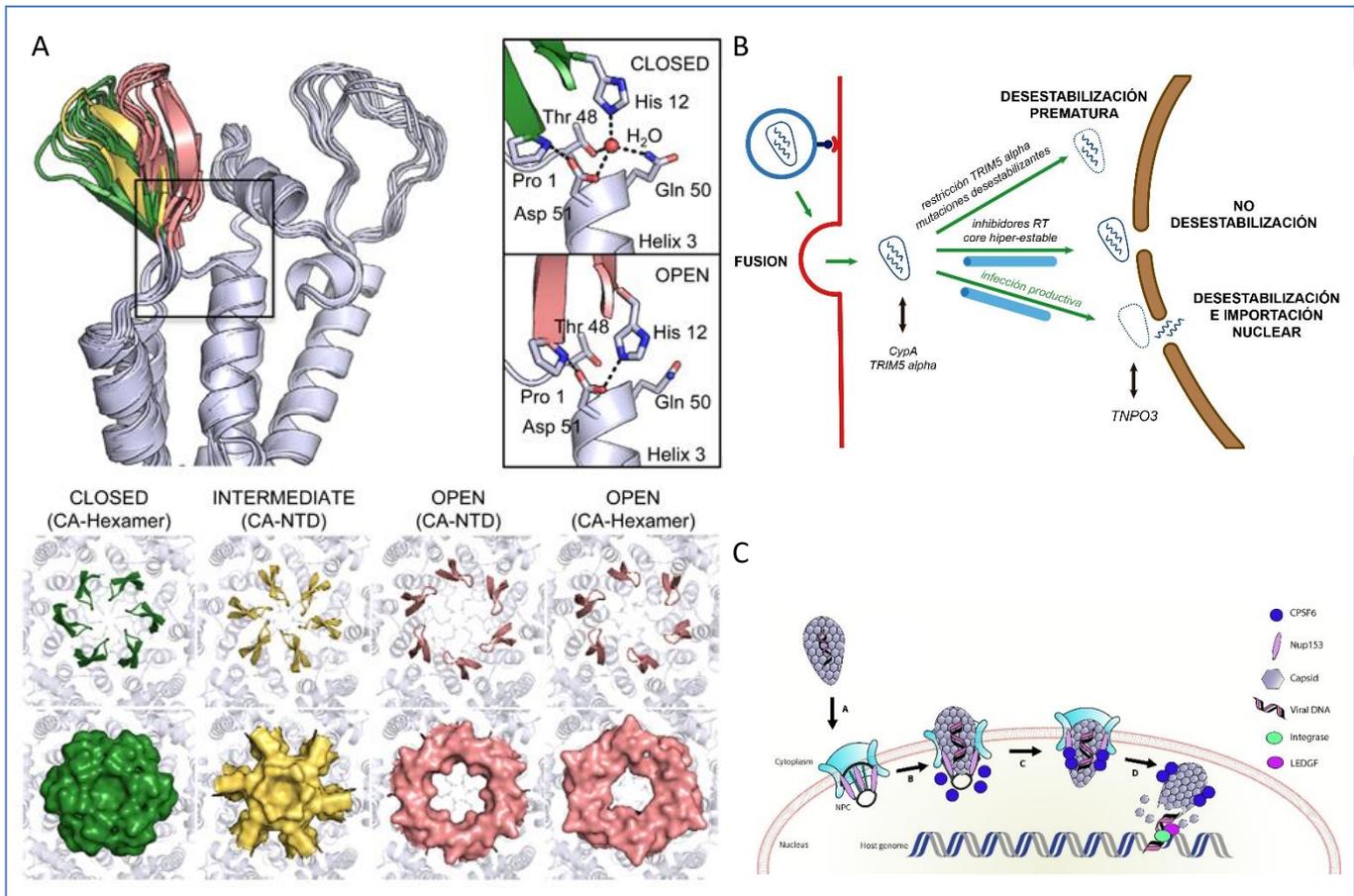


Figura 8: Relación de CA_{HIV} con los procesos de retrotranscripción e importación nuclear. **A)** En la parte superior se presentan las diferentes conformaciones del β -hairpin de CA_{HIV} como resultado del movimiento pívot de los residuos Pro₁ y His₁₂ respecto al Asp₅₁ (*inset*). Este movimiento del β -hairpin permite que el poro generado en el centro de los hexámeros de CA se encuentre en estado abierto o cerrado permitiendo o no la entrada de dNTPs a la cápside para que se produzca la retrotranscripción. Adaptado de [127] **B)** La desestabilización prematura de la cápside retroviral o su hiper-estabilización afectando el desensamblado y en consecuencia el destino de la infección viral. Adaptado de [128]. **C)** La cápside de HIV no se desensambla completamente colabora con el proceso de importación nuclear del ADN retrotranscrito. Para ello debe interactuar con proteínas del poro nuclear acompañar las cadenas de ácidos nucleicos al interior del núcleo. Tomado de [129].

5.2.3.1.3. DESENSAMBLADO O “DESNUDAMIENTO” DE LA CAPSIDE

El “core” es desestabilizado en un proceso conocido como “desnudamiento”, el cual viene siendo activamente estudiado en diferentes retrovirus y aún no es cabalmente comprendido en ninguno de ellos. Incluso existen diferencias notorias en diferentes tipos celulares complejizando aún más el escenario tal como lo describen las numerosas revisiones existentes ([128, 130-132]), la mayoría enfocadas en HIV.

Al momento, la idea más aceptada para HIV plantea que el RTC madura dando lugar al complejo de pre-integración (PIC por “pre integrative complex”) en el cual solo existe ADN doble hebra competente para ser integrado en el genoma hospedero, ligado a una cápside al menos parcialmente ensamblada que logra acoplarse con los poros nucleares para permitir la importación al núcleo [133].

Es un proceso perfectamente coordinado, en el que participan numerosas proteínas virales y del citoplasma del hospedero (algunas como CypA, ERK2 o EF1A incluso forman parte de la partícula. Desde su entrada en el citoplasma hasta el acoplamiento con el poro nuclear, la cápside interactúa con diversos cofactores celulares que regulan el proceso de desensamblado: Ciclofilina A (CypA), la subunidad 6 del factor de corte y poliadenilación de ARN (CPSF6) y diversas nucleoporinas o proteínas de transporte nuclear como TNPO3, NUP153, NUP358 y LEDGF/p75. En particular NUP153 y CPSF6 interactúan con diversos dominios de cápside (interfaz NTD:CTD) que se

mantienen espacialmente juntos cuando esta está ensamblada [134]. El transporte hacia los poros nucleares depende también de la interacción del core con proteínas del citoesqueleto a través de diversas proteínas adaptadoras.

Buena parte de lo que conocemos hasta el momento de la maduración del RTC para dar lugar al PIC y del desensamblado de la cápside, ha sido dilucidado mediante estudios mutagénicos que permiten desestabilizar o hiper-estabilizar la cápside, afectando el poder infectivo de los viriones [135]. Ejemplos de la importancia de este proceso en el ciclo viral son los factores de restricción retroviral que, mediante la interacción con CA, bloquean la infección ya sea desestabilizando la cápside en forma prematura (TRIM5 α por “*Tripartite motif-containing protein 5*”) o bien estabilizándola en forma excesiva (MxB por “*myxovirus resistance protein B*”) (Figura 8.B).

5.2.3.1.4. IMPORTACIÓN NUCLEAR E INTEGRACIÓN

El transporte del ADN doble hebra retrotranscrito al núcleo y su integración en el genoma hospedero constituyen la última etapa de la fase temprana del ciclo. La cápside ha demostrado jugar un rol fundamental en el proceso de transporte al núcleo para su integración [136-138], demostrando que todos los procesos están interconectados.

Algunos retrovirus simples importan el ADN durante la división celular siendo exclusivamente dependientes de esta fase del ciclo celular, no obstante los retrovirus más complejos como lentivirus y spumavirus pueden hacerlo en células que no están en división, utilizando un mecanismo activo para importar el ADN al núcleo [139, 140]. El mecanismo de transporte del ADN retrotranscrito al núcleo celular en deltaretrovirus no está muy descrito en la literatura.

Como se dijo previamente el complejo de preintegración PIC, está formado por el ADN doble hebra y múltiples proteínas virales y celulares en algunos retrovirus como HIV. La interacción de CA con diversas nucleoporinas y factores del poro nuclear como Nup153 y Nup358 está implicada en la importación nuclear mientras que la interacción con otras como CPSF6 o TNPO3 afectan la integración en el genoma [141-143]. Recientemente se constató que la interacción de CPSF6 con los arreglos hexagonales de cápside de HIV está implicada también en el transporte nuclear en macrófagos infectados y que CA_{HIV} es capaz de atravesar el poro nuclear y localizarse en el núcleo [129, 144] (Figura 8.C).

La integración es llevada a cabo por la integrasa viral IN actuando en conjunto con otras proteínas del PIC para insertar el ADN retrotranscrito en el genoma del hospedero, dando origen al *provirus*. Este proceso tiene como consecuencia la pérdida de 2 nucleótidos en cada extremo LTR y la duplicación de unos pocos nucleótidos (de la secuencia de ADN hospedero en el sitio de inserción) a ambos lados del ADN proviral integrado [55].

La interacción de los retrovirus con el genoma hospedero ha suscitado particular interés por su aplicabilidad como vectores para terapia génica [145]. Los sitios de integración de retrovirus son diferentes entre sí, e incluso algunos generan patologías diferentes en función del sitio de inserción. Algunos como HIV integran su genoma preferentemente en regiones con genes activos [146] donde la topografía de la cromatina en las inmediaciones del poro nuclear parece jugar un rol fundamental en la definición de los sitios de integración [147] lo cual refuerza la idea de que los mecanismos de importación nuclear e integración están íntimamente ligados. En el virus de la leucemia murina (MuLV) tiende a insertarse preferente en las regiones ubicadas río arriba del extremo 5' de genes transcritos, mientras que en el virus de la leucosis/sarcoma aviar (ASLV) la preferencia por regiones de genes activos es muy débil mientras y no presenta preferencia por las regiones ubicadas en 5' de los genes activos [55].

En el caso de HTLV-1 la integración en regiones transcripcionalmente silenciadas ocurre con mayor frecuencia en pacientes asintomáticos [148] mientras que la integración en regiones transcripcionalmente activas da como resultado mayores niveles de expresión proviral lo cual ha sido asociado con una progresión hacia la enfermedad

inflamatoria del sistema inmune causada por el virus: paraparesia espástica tropical o mielopatía asociada al virus HTLV-I (TSP/HAM)[149]. Recientemente se ha encontrado que HTLV-1 (al igual que HIV) es capaz de alterar la estructura de la cromatina y afectar la expresión de genes del hospedero contiguos y alejados del sitio de inserción [150].

Como se detalló previamente, durante bastante tiempo se pensó que en BLV la integración ocurría en forma aleatoria, motivo por el cual no existía relación alguna entre el proceso de integración y los mecanismos oncogénicos [19]; sin embargo recientemente se han encontrado sitios de integración con mayor frecuencia o “hotspots” que implican la alteración de genes relacionados con cáncer o “cáncer drivers” [10].

5.2.3.2. FASE TARDÍA DEL CICLO REPLICATIVO

5.2.3.2.1. TRANSCRIPCIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES VIRALES

La transcripción del provirus a ARN es llevada a cabo por la ARN polimerasa II celular, mediante el reconocimiento de promotores ubicados en la región U3 de ambos LTR. Los ARNm pueden actuar como genoma de las nuevas partículas, sin embargo, inicialmente son sometidos a procesos de corte y empalme (“*splicing*”) más o menos complejos dependiendo del retrovirus y exportados al citoplasma. En deltaretrovirus, los ARN doblemente procesados de Tax son los primeros en exportarse al citoplasma y traducirse seguidos por Rex, para dar lugar a múltiples etapas de regulación que aseguran la traducción de las proteínas estructurales y enzimas del virus en forma coordinada y en el momento apropiado [55].

Una estrategia ampliamente extendida en retrovirus es la expresión de poliproteínas como forma de optimizar la compartimentalización de los componentes virales respetando la estequiometría. Por ejemplo Gag representa el 50% de la masa del virión, no obstante la misma es expresada como Gag y Gag-Pro-Pol (a una relación aproximada de 20:1) [56] utilizando estrategias diferentes de acuerdo al género.

En todos los retrovirus Gag-Pro-Pol es traducida a partir de ARN sin procesar, sin embargo, las estrategias pueden ser diferentes. En el caso de los deltaretrovirus, los tres genes se encuentran en ORFs diferentes de modo que la poliproteína Gag-Pro-Pol es producida únicamente cuando ocurren dos corrimientos en el ORF: uno (-1) antes de comenzar la traducción de Pro y otro (-1) justo antes de Pol [55], mientras que en lentivirus y alfaretrovirus, *pro* y *pol* están en un ORF diferente de *gag*, y solo se necesita un corrimiento (-1) en el marco de lectura para producir la poliproteína [151]. Otros como gammaretrovirus o epsilonretrovirus poseen los genes en un único marco de lectura con un codón stop entre *gag* y *pro*, que es pasado por alto para dar la poliproteína Gag-Pro-Pol [152]. Estos cambios en los ORF ocurren con determinada frecuencia gracias a estructuras secundarias que adopta el ARN en ciertas regiones.

Otras proteínas como por ejemplo Env son producidas a partir de un ARN con un único evento de *splicing*, donde trimeriza y establece los puentes disulfuro correspondientes para ser dirigida a la vía del Golgi donde las proteasas tipo furina clivan las dos subunidades SU y TM [55].

5.2.3.2.2. ENSAMBLADO DE LA PARTICULA VIRAL

La partícula infectiva es generada luego del proceso de maduración (descrito en el próximo apartado), sin embargo, el ensamblado y brotamiento del virión ocurre dando lugar a una partícula inmadura (no infecciosa) a través de un proceso que depende en gran medida de Gag y las interacciones que establezca con los demás componentes estructurales del virión. Casi todo lo que sabemos actualmente sobre ensamblado de retrovirus es relacionado a HIV, y en particular sobre BLV existe muy poca información al respecto.

Gag es una proteína de unos 55KDa que posee como estructura básica los dominios de MA, CA y NC con algunas diferencias características de cada género (Figura 9) y cuya presencia es suficiente para generar partículas similares a virus (VLPs por “virus like particles”) [153] gracias a su rol en el ensamblado y el brotamiento de virión. Cuando la partícula se ensambla, Gag se dispone con orientación radial, tapizando buena parte del interior de la partícula con el dominio MA en contacto con la bicapa lipídica [154] y el dominio NC interactuando con el ARN viral. Trabajos de criomicroscopía electrónica (“Cryo-EM”) en HIV-1 han demostrado que este tapizado presenta un número variable de moléculas de Gag (3.000-11.000) en función del tamaño variable de las partículas (119-127nm de diámetro) y se disponen en arreglos hexagonales y continuos (aunque incompletos en algunas regiones) presentando una curvatura natural sin necesidad de incluir arreglos pentaméricos [155, 156].

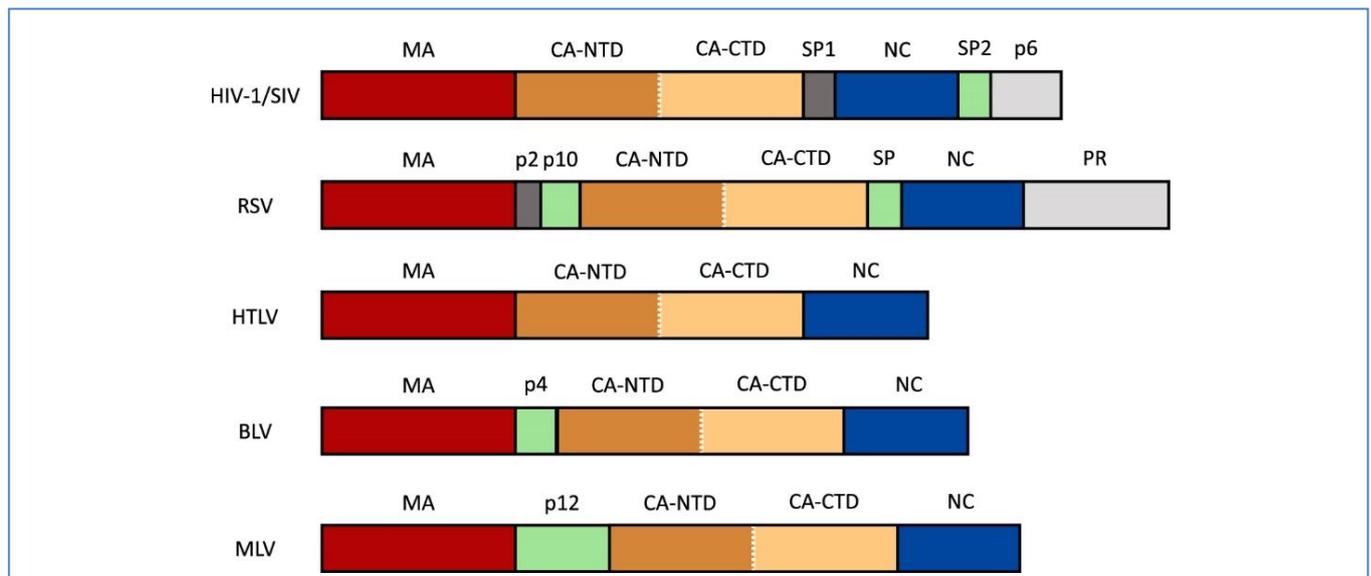


Figura 9: Organización de los dominios de algunas proteínas Gag retrovirales. Representación de los dominios de Gag presentes en todos los retrovirus, matriz (MA), cápside (CA con sus dominios NTD y CTD), nucleocápside (NC). También se incluyen varios péptidos separadores (SP) y otras secuencias peptídicas (p6 en HIV, p2 y p10 en RSV, p4 en BLV y p12 en MLV). La Gag de RSV presenta además la proteasa PR en su extremo c-terminal. Adaptado de [157].

Gag se ancla a la membrana plasmática, por medio del dominio MA a través de a) interacciones electrostáticas de los residuos básicos Arg y Lys con las cabezas polares de la cara interna de la bicapa lipídica, b) a través del grupo miristoílo que se inserta en la cara interna de la bicapa y c) mediante la cadena hidrofóbica en el carbono 1' del fosfolípido PI(4,5)P2 que se inserta en un bolsillo hidrofóbico de MA, manteniendo la cadena acilada del carbono 2' insertada en la bicapa [158].

En HIV se ha visto que antes de autoensamblar en forma radial tapizando la membrana, el dominio MA también es capaz de asociarse temporalmente al ARN viral como forma de regulación del ensamblado [159] adoptando una forma compacta [160] que deberá pasar a su estado extendido para poder autoensamblar [161]. A esto se suma el hecho de que el grupo miristoílo se encuentra inicialmente ocluido en un bolsillo hidrofóbico de MA y es liberado en respuesta a la auto asociación trimérica de MA y a fosfolípidos específicos de membrana, para dar lugar a arreglos de lípidos característicos (“lipid rafts”) [162].

El dominio funcional CA de Gag representa el motor principal de la auto asociación de dicha poliproteína durante el ensamblado, siendo los contactos que dan lugar a los trímeros de MA [163] y contactos entre NC [164], fuerzas complementarias. El arreglo hexagonal de Gag en la partícula inmadura ha sido evidenciado mediante reconstrucciones a partir de imágenes obtenidas por Cryo-EM, las cuales a pesar de la baja resolución sugieren que esta simetría hexagonal está dada fundamentalmente a nivel de los dominios NTD y CTD de CA, a lo que se suma en HIV el fragmento SP1 [165]. Recientemente se demostró la importancia del fragmento SP1 (un péptido separador

ubicado entre CA y NC en HIV, pero ausente en BLV y otros retrovirus) en la autoasociación de Gag [166, 167]; también en HIV se destaca un fragmento rico en prolinas entre las hélices 6 y 7 del dominio CA [168].

El dominio CA de Gag presenta una disposición hexagonal durante el ensamblado, manteniendo contactos entre sí muy diferentes de los que estabilizan los arreglos hexagonales de la cápside en el virus maduro. El mecanismo que lleva a la formación de los arreglos hexagonales de Gag y los cambios conformacionales durante la maduración han comenzado apenas a esclarecerse para HIV. El rol de moléculas formadas por anillos fosforilados de inositol sobre el ensamblado de Gag ha sido estudiado dada su similitud con el fosfolípido PI(4,5)P₂ ampliamente encontrado en la envoltura retroviral, encontrándose que Gag es capaz de interactuar con inositol 6 fosfato (IP6) a través de sus dos extremos: MA y NC [169]. Recientemente se identificó el IP6, como una pequeña molécula (naturalmente presente a nivel celular) capaz de promover los diferentes re-arreglos de Gag durante el ensamblado y la maduración, estabilizando los estados conformacionales [170, 171]. Según estos autores el anillo inositol de este compuesto establece contactos con dos residuos de lisina pertenecientes al dominio CTD de CA y a la región N-terminal de SP1 (capaz de formar un haz de 6 α -hélices que da origen a su denominación 6HB por “six helix bundle”) tal como se describe en la Figura 10.D. Durante la maduración, SP1 es clivado por PR, generando un drástico cambio conformacional a nivel de CA, de modo que IP6 establece nuevos contactos.

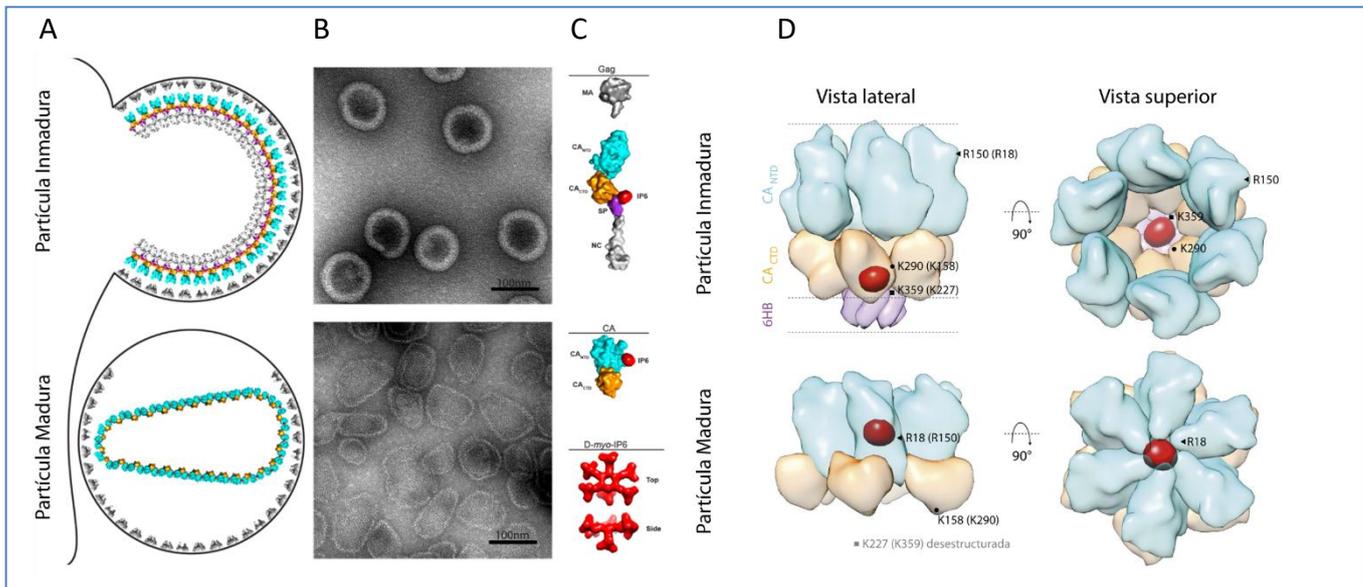


Figura 10: Aspectos estructurales de Gag y su interacción con IP6 durante el ensamblado y la maduración de partículas de HIV. **A)** Esquema de una partícula de HIV inmadura brotando de la membrana plasmática, con Gag estableciendo contactos a nivel de CTD y SP1 (*arriba*) y una partícula madura con la cápside en forma cónica estableciendo contactos a nivel de NTD (*abajo*). No se muestran otros componentes de la partícula como Env o el ARN viral. **B)** Imágenes de microscopía electrónica obtenidas por tinción negativa de partículas de HIV inmaduras (*arriba*) y maduras gracias a la inducción del ensamblado de CA con IP6 (*abajo*). **C)** Representación de Gag inmadura (*arriba*) y CA madura (*abajo*) unidas a IP6 (*rojo*). La interacción de IP6 con la Gag inmadura ocurre a través de la interfaz entre el CTD y SP1, mientras que en la CA madura lo hace a través del NTD. Se incluye también la estructura de D-myo-IP6 (la isoforma más abundante de IP6). **D)** Vista superior y lateral de la representación de superficies de hexámeros de CA unidos a IP6 en una partícula inmadura (*arriba*) y madura (*abajo*). En la partícula inmadura se incluye el primer tramo de SP1 (*violeta*), el cual forma un haz de seis hélices (6HB por “six helix bundle”). Nótese el cambio de posición de IP6 con la maduración: en la partícula inmadura IP6 se une a la interfaz CTD/SP1 mediante los residuos Lys290 y Lys359 de Gag (), mientras que luego de la maduración IP6 establece contactos con la Arg150 de Gag, ubicada en el dominio NTD. Es destacable también el cambio de posición de estos residuos antes y después de la maduración reflejando el dramático cambio conformacional sufrido por CA en esta etapa. Dependiendo de cada etapa de maduración, se presentan en cada caso la numeración de los residuos correspondientes a su posición en la secuencia de dicha proteína, y entre paréntesis se representa la numeración de los mismos en el otro estado de maduración. Adaptado de [170, 171].

En BLV se ha observado que Gag es capaz de unirse a IP6 a través del dominio MA [172], sin embargo en HTLV-1 el ensamblado y brotamiento del virión no parecen dependientes de la interacción de Gag con el fosfolípido PI(4,5)P₂ [173]. Por otro lado la oligomerización de Gag en HTLV-1 no resulta crucial para dirigir su transporte hacia la

membrana (como sí ocurre en HIV [174], o en RSV [175]) y los contactos NTD-NTD parecen tener mayor relevancia en el ensamblado de la partícula (en comparación con HIV donde los dominios CTD y SP1 resultan cruciales) [176]. Recientemente se publicaron datos obtenidos por dispersión de rayos X a bajo ángulo (SAXS por “*small angle X ray scattering*”) y modelado molecular, sugiriendo que la Gag de BLV en solución adopta una conformación elongada similar a MLV y RSV, y se diferencia del comportamiento de la Gag de HIV que adopta una conformación compacta [177]. Estas diferencias sugieren que los mecanismos que dirigen el ensamblado de la partícula viral de lentivirus y deltaretrovirus difieren bastante en algunos aspectos, requiriéndose profundizar en las diferencias para entenderlos mejor [174].

Por su parte el dominio nucleocápside (NC) de Gag es una proteína básica de bajo peso molecular, conteniendo dos dominios de unión a zinc y tiene diversas funciones en el ciclo viral como dimerización de las dos cadenas de ARN viral, empaquetamiento del material genético, replicación, retrotranscripción, integración y ensamblado; muchas de ellas asociadas a su capacidad de unión a ácidos nucleicos (revisadas por [178] y [179] entre otros). La capacidad de NC de unir el ARN genómico viral dimerico de HIV [180, 181] asegura que durante el ensamblado de Gag se formen partículas virales conteniendo la información génica para infectar nuevas células. La secuencia Ψ del ARN viral adopta cierta estructura secundaria que es reconocida específicamente por el dominio NC de Gag. Esto se lleva a cabo gracias a la presencia de un loop conocido como DIS (por “*dimer initiation site*”) en la región Ψ , que es capaz de formar apareamientos de bases inter-cadenas. En la mayoría de los retrovirus esta dimerización es promovida *in vitro* por NC, siendo BLV una excepción dado que la dimerización es promovida por MA [109].

Los dominios NC de Gag son capaces de unir tanto cadenas de ADN como ARN, algo que se ha demostrado en HIV[182] pero también en deltaretrovirus como HTLV-1[183] y BLV[184]. A pesar del parentesco entre HTLV-1 y BLV, se presentan diferencias claras entre estos deltaretrovirus a nivel de NC. En HIV se ha visto una clara predilección por secuencias poli(T/U)G, característica que comparte con SIV y BLV pero que curiosamente no se ve en HTLV-1[157, 184]. Incluso la afinidad de unión entre NC y ácidos nucleicos es mayor en HIV-1 y BLV con respecto a HTLV-1, a la vez que la cinética de desnaturalización de bucles complementarios en HTLV-1 (proceso fundamental durante la retrotranscripción) difiere sensiblemente de las de HIV y BLV[185].

Otro componente fundamental en la partícula son las glicoproteínas de superficie. Dado que las mismas son transportadas a la superficie celular por una vía diferente de los demás componentes estructurales del virión (vía aparato de Golgi), debe haber un nexo que asegure su correcta incorporación en el sitio de ensamblaje. La síntesis, tráfico e incorporación de Env en la partícula de HIV son revisados en detalle por [186], sin embargo los mecanismos permanecen parcialmente comprendidos. Se cree que la interacción del dominio MA de Gag con los extremos C-terminales citoplasmáticos de TM son los mediadores de esta conexión [186-189].

5.2.3.2.3. BROTAMIENTO Y LIBERACIÓN DEL VIRIÓN

El brotamiento y liberación de la partícula retroviral da como resultado una entidad independiente de la célula huésped, aunque inicialmente no infectiva (inmadura). Al igual que el ensamblado, estos procesos dependen fuertemente de Gag y sus interacciones con componentes estructurales del virus y también de la célula. La curvatura de la membrana inducida por el ensamblado de Gag determina el sitio de brotamiento de la nueva partícula. El mecanismo de reclutamiento de Gag al sitio de brotamiento de la partícula varía notablemente entre diferentes retrovirus. HIV-1 parece reclutar las moléculas de Gag directamente desde el citoplasma para formar ensamblados a nivel del sitio de brotamiento, mientras que en HTLV-1 las moléculas de Gag se asocian primero a la cara interna de la membrana plasmática y son desde ahí reclutadas lateralmente hacia el sitio de brotamiento[190].

El brotamiento de los retrovirus ocurre por un proceso de fisión empleando la maquinaria celular utilizada durante la división celular, específicamente en la etapa de citocinesis [191]: la vía ESCRT (por “*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*”).

La vía ESCRT está compuesta por diversos complejos de proteínas identificados como ESCRT-0, ESCRT-I, ESCRT-II, ESCRT-III y el complejo Vps4, los cuales actúan en forma coordinada en procesos que implican deformación de membranas y separación de las mismas como: formación de cuerpos multi-vesiculares y carga de proteínas ubiquitiniladas para su transporte hacia lisosomas, abscisión durante la división celular y obviamente brotamiento de algunos virus envueltos [192]

Respecto al proceso de brotamiento de retrovirus, casi todo lo que se sabe es relacionado a HIV, donde Gag reúne los componentes virales y auto ensambla deformando la membrana. Para que el virión se libere de la célula hospedadora, la partícula debe ser separada de la misma y en este proceso Gag también es protagonista, actuando como un adaptador de membrana para reclutar algunos de los componentes de la vía ESCRT [193, 194] que llevarán a cabo un proceso de deformación topológica de la célula, equivalente al de abscisión durante la citocinesis [195]. El ensamblado de Gag da inicio al proceso de brotamiento, el cual es finalizado por la maquinaria ESCRT antes de que Gag se cierre formando una esfera completa [196].

Desde hace tiempo se conoce que las proteínas Gag retrovirales (y también proteínas de matriz de otros virus envueltos como rhabdovirus y filovirus) poseen secuencias implicadas en la etapa final del brotamiento, conocidas como “dominios tardíos” o “dominios L” (por “*late domains*”)[197]. En HIV el dominio p6 ubicado en el extremo c-terminal de Gag (Figura 9) interactúa con TSG101 (uno de los componentes del complejo ESCRT-I) y ALIX (una subunidad accesoria del complejo ESCRT-III) a través de dos dominios L diferentes (con secuencias PTAP e YPYL); ALIX interactúa también con NC mientras que el dominio CTD de CA hace lo propio con NEDD4L, un miembro de la familia de proteínas NEDD4 E3 ubiquitina ligasas implicadas en el brotamiento de otros retrovirus [56]. En deltaretrovirus los dominios L se ubican en MA cerca del inicio de CA; por ejemplo en HTLV-1 hay dos dominios L dispuestos en tándem cerca del extremo C-terminal de MA (con secuencias PPPY y PTAP respectivamente) los cuales interactúan con NEDD4 y TSG101 [198, 199], mientras que BLV tiene solo un dominio L (con secuencia PPPY) ubicado también al final de MA (en el péptido p4) [200].

Estas proteínas reclutadas por Gag actúan como mediadoras para que el virus usurpe la maquinaria de fisión celular incorporando proteínas de los complejos ESCRT-III y Vps4: aparentemente las proteínas de ESCRT-III polimerizan en forma de espiral cónico generando una estructura que deforma la región que mantiene unidas la célula y la partícula (cuello), mientras que el complejo VPS4 con actividad ATPasa es responsable de desensamblar la estructura cónica, desestabilizando el cuello y liberando la partícula mientras ESCRT-III es devuelta al citoplasma [56, 201] tal como se muestra en la Figura 11.

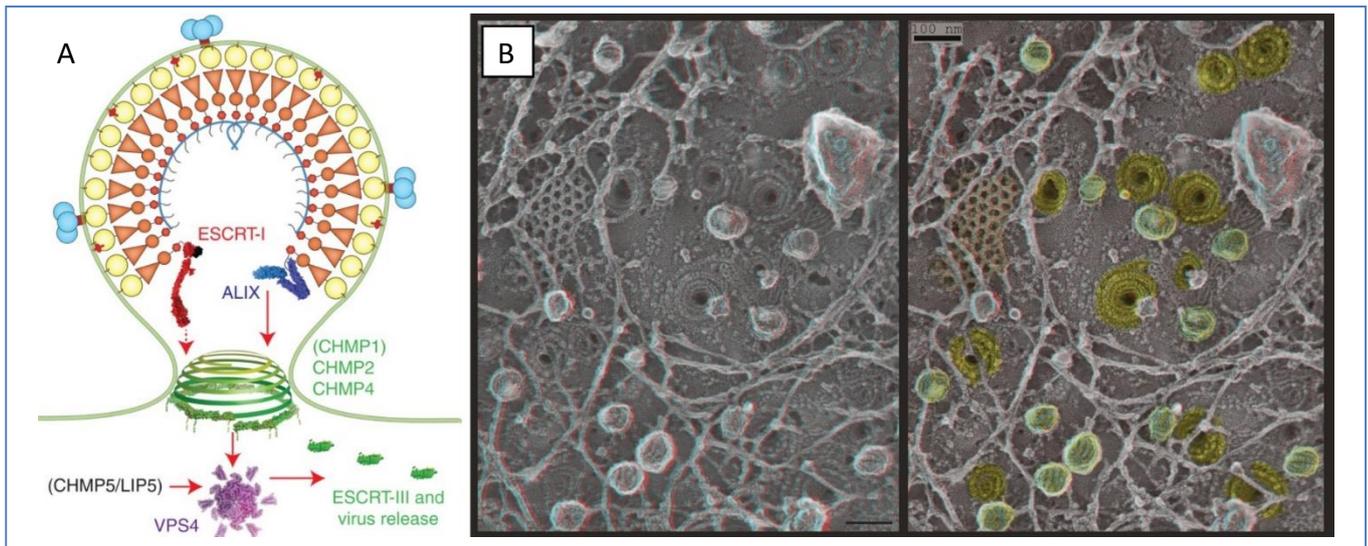


Figura 11: Reclutamiento de la maquinaria ESCRT por parte de Gag para la liberación de la partícula retroviral. A) Esquema representando una partícula de HIV brotando de una célula. Los dominios MA, CA y NC de Gag se presentan como figuras geométricas en amarillo, anaranjado y rojo respectivamente, y el ARN viral diploide en celeste. La membrana se representa en verde y los trímeros de Env se representan con las subunidades TM y SU en rojo y celeste, respectivamente. Las proteínas celulares se representan como estructuras basadas en datos obtenidos por difracción de rayos X: la subunidad TSG101 del complejo ESCRT-I unida al dominio p6 de Gag, se representa como una estructura en rojo unida a ubiquitina en negro (PDB: 1S1Q, 2P22), mientras que el dominio V de ALIX se presenta en azul (PDB: 2OEV). Estas interacciones resultan en el reclutamiento de proteínas del complejo ESCRT-III (representadas en verde, PDB: 2GD5) las cuales polimerizan en una estructura de espiral cónico que promueve el cierre del cuello que mantiene la partícula unida a la célula. VPS4 se representa en violeta (PDB: 1XWI) y es la responsable de desensamblar el espiral cónico y permitir la liberación de la partícula. Tomado de [56] **B)** Estereomágen pseudocoloreada obtenida por microscopía electrónica ("deep-etch electron microscopy") mostrando la estructura en espiral cónico formada por ESCRT-III en la cara citoplasmática de la membrana plasmática de células HeLa depletadas de VPS4. En anaranjado se ve un arreglo de clatrina, en verde caveolas lipídicas y en amarillo los ensamblajes espiralados de ESCRT-III. La imagen puede visualizarse en tres dimensiones utilizando lentes 3D en ambos paneles (ojo izquierdo = rojo). Tomado de [201].

5.2.3.2.4. MADURACIÓN DE LA PARTÍCULA VIRAL

Durante la maduración, la proteasa viral PR corta las moléculas precursoras Gag-Pro-Pol y Gag liberando sus dominios MA, CA y NC [55, 202] (Figura 12.A). La maduración trae aparejada la adquisición de capacidad infectiva y una serie de re-arreglos estructurales a nivel de proteínas y ácidos nucleicos que son visibles por microscopía electrónica tal como se ve en la Figura 12.B.

La proteasa PR es expresada a partir del ARNm de Gag como un precursor minoritario Gag-Pro-Pol, que es reclutado hacia el sitio de ensamblaje de la partícula a través de los mismos mecanismos utilizados por Gag. La subunidad PR del precursor Gag-Pro-Pol posee actividad autocatalítica y es capaz de escindir su extremo N-terminal (unido al dominio NC) mediante una reacción intramolecular, a través de la formación de un dímero transitorio [203, 204] que dará lugar a la proteína dimérica con capacidad de clivar el resto de los sustratos (incluido su extremo C-terminal). La enzima PR en el contexto Gag-Pro-Pol es capaz de autoescindir con baja actividad, mostrando hasta ese momento una restringida actividad frente a los demás sitios de corte [205]. La escisión del extremo N-terminal de PR es el paso limitante para activar la enzima y continuar con el proceso de maduración [206, 207] representando un excelente blanco terapéutico [208].

Este proceso ocurre únicamente en la partícula luego de su liberación por lo que la activación autocatalítica de PR está inhibida durante el ensamblaje. Los disparadores de esta activación proteolítica son desconocidos aunque se sospecha que la multimerización de Gag y Gag-Pro-Pol puedan jugar un rol fundamental, teniendo en cuenta que la enzima activa es homodimérica; otro desencadenante posible es la acidificación del medio dentro de la partícula retroviral [55].

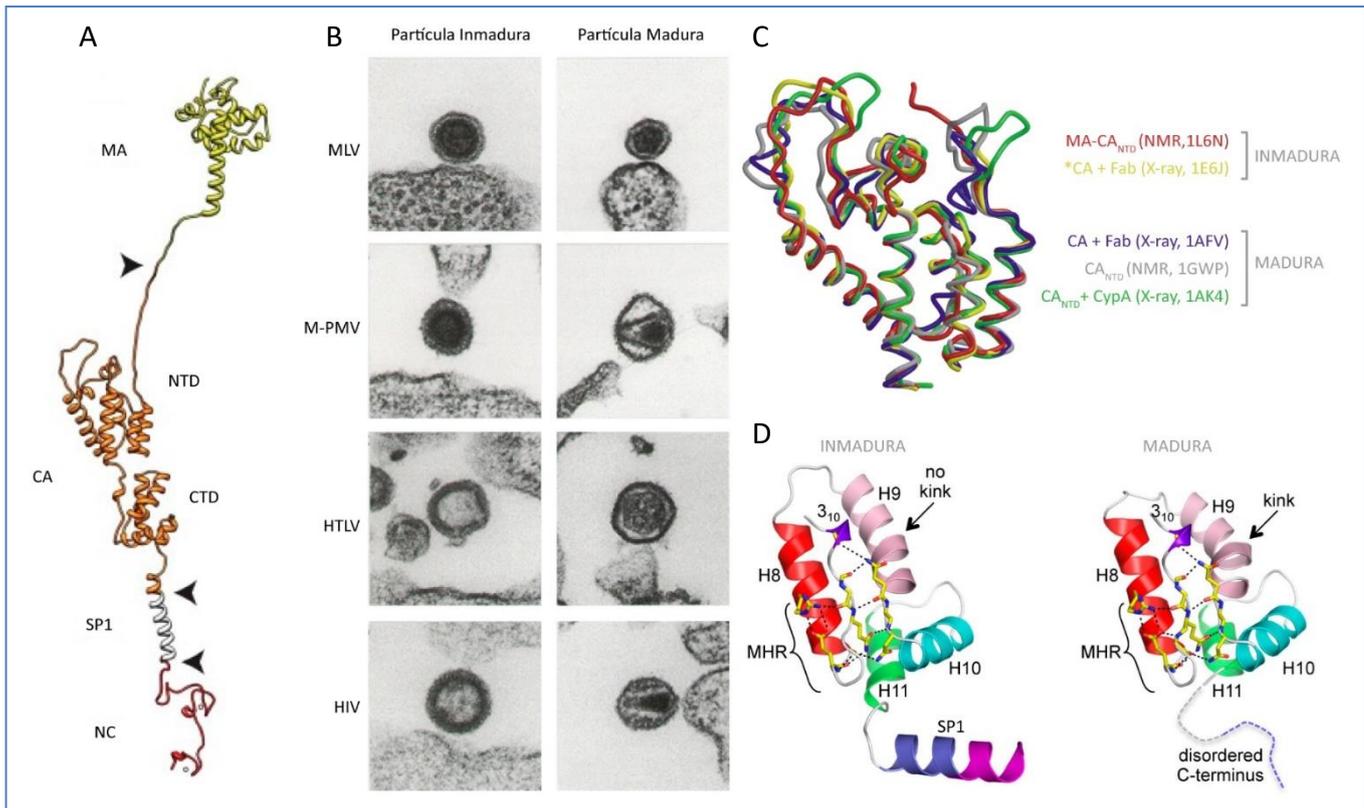


Figura 12: Maduración de retrovirus. **A)** Modelo estructural de la Gag de HIV creado a partir de las estructuras MA-NTD (2GOL), CTD (1BAJ), NC (1MFS) y un modelo helicoidal de SP1. Con flechas negras se presentan los sitios de corte de PR [56]. **B)** Imágenes obtenidas por microscopía electrónica a partir de diversos retrovirus mostrando los cambios sufridos durante la maduración. **C)** Superposición de estructuras del NTD de HIV-1 mostrando que la formación del β -hairpin producto de la maduración no afecta el resto de su estructura terciaria. Cada estructura se presenta en un color diferente y entre paréntesis se describe la técnica utilizada para su obtención y el correspondiente número de acceso en PDB [74]. **D)** Comparación de las estructuras de CTD de HIV-1 antes y después de la maduración con. Con excepción de un codo en la hélice 9 y la pérdida de estructura helicoidal del péptido SP1, el resto de la estructura terciaria se mantiene inalterada [178, 209].

La secuencia de los sitios de corte de PR son variables a nivel de Gag y entre diferentes retrovirus y el orden en que se da el procesamiento de Gag resulta fundamental para asegurar una correcta maduración. En HIV-1, la PR activa inicia el procesamiento de Gag con el clivaje de la interfaz CA-NC seguido por la interfaz MA-CA [96, 210] mientras que en HTLV-1 algunos resultados sugieren que la interfaz MA-CA parece cortarse antes que CA-NC [211]. En BLV, no existe información detallada y en tal sentido nuestro grupo viene realizando trabajos para esclarecer los aspectos enzimáticos de la PR de BLV.

La remoción de MA en el extremo N-terminal de CA da lugar a una prolina que forma un β -hairpin, el cual es conservado y resulta importante en el ensamblado hexamérico de la cápside madura de diversos retrovirus [212]. Sin embargo, la formación de esta estructura en el NTD de HIV-1 no es responsable de la maduración sino una consecuencia de la misma, siendo precedida por el clivaje de la interfaz CA-SP1, el cual ha sido identificado como el desencadenante de la maduración [212, 213]. Estos resultados fueron recientemente confirmados por técnicas de alta resolución como tomografía electrónica [214]. El dominio SP1 de HIV-1 posee una región con estructura helicoidal formando un haz (6HB) que estabiliza la Gag inmadura y cuando CA-SP1 es escindida por PR, CA es liberada adoptando una conformación tridimensional diferente (Figura 10.D). Tal como se muestra en la Figura 12.C y D, los dominios NTD y CTD de CA de HIV-1 no varían sustancialmente su estructura secundaria y terciaria durante la maduración (algo recurrente en retrovirus y que nuestro grupo también constató en el NTD de BLV [53]). Sin embargo, la posición relativa de los dominios NTD y CTD en el espacio, sufre movimientos rotacionales y traslacionales extremadamente drásticos, manteniendo la cohesión de la red hexamérica, pero cambiando su topología, lo cual se logra gracias al establecimiento de contactos continuos y cambiantes entre moléculas de CA

vecinas. El rol de IP6 (que mantiene contactos con residuos de SP1 y CTD en la Gag inmadura) es importante también durante la maduración, pasando a establecer contactos con el dominio NTD de la cápside madura, específicamente con el residuo Arg₁₈ [170, 171] que se encuentra en el centro de los hexámeros y que tiene implicancias en la entrada de nucleótidos a la cápside en el RTC.

Otros retrovirus como M-PMV (Mason-Pfizer Monkey Virus) [215, 216] o RSV (Rous Sarcoma Virus) [217, 218] poseen regiones en el extremo N-terminal de CA (denominadas p12 y p10 respectivamente) que podrían dirigir el ensamblado de la *lattice* de Gag inmadura. Particularmente RSV posee un péptido SP en el extremo C-terminal de CA (Figura 9) que forma un haz de α -hélices (6HB) en el ensamble de Gag inmadura similar al observado en HIV y un péptido p10 en el extremo N-terminal de CA que adopta una estructura particular impidiendo la accesibilidad al sitio de corte de la PR y representando un mecanismo de regulación de la maduración [219]. En este sentido BLV no presenta péptidos espaciadores entre CA y NC, sin embargo el dominio MA (p15) es cortado en forma diferencial por PR dando lugar a una versión más corta identificada como p10 y un pequeño fragmento p4 correspondiente al extremo más cercano a CA (Figura 9)[220]. El rol de esta proteólisis diferencial de la interfaz MA-CA en BLV ha sido muy poco estudiado y sus posibles efectos en la formación de la *lattice* inmadura y la regulación de la maduración no deberían ser descartados.

A manera de resumen luego de revisar el ciclo replicativo, podemos concluir que CA es una proteína central en la biología de los retrovirus, y casi omnipresente ya sea formando parte de la cápside o dirigiendo el ensamblado de Gag. Esta característica ha llevado a que la misma sea tenida en cuenta en el desarrollo de métodos diagnósticos y/o terapéuticos contra retrovirus.

5.2.4. CA EN DIAGNÓSTICO Y COMO BLANCO TERAPÉUTICO

Las estrategias de diagnóstico de retrovirus se basan fundamentalmente en la detección de anticuerpos específicos contra alguno de los componentes virales. Sin embargo, estos dependen del montaje de una respuesta humoral exitosa dando lugar a algunas limitaciones que demandan la aplicación de variantes alternativas como la detección en forma rápida de ácido nucleicos. La detección de la proteína de la cápside de HIV se logra 5-7 días después que el ARN viral, no obstante, requiere personal menos especializado y equipamiento no tan sofisticado, permitiendo su implementación en centros con “nivel primario de atención de salud”. Por tal motivo los “inmunoensayos de cuarta generación” dirigidos a la detección de anticuerpos y antígenos virales en forma conjunta, son actualmente recomendados para reducir la ventana de tiempo en que la infección no es detectada y están siendo implementados en los algoritmos de detección de HIV en países desarrollados [221]. La detección de CA_{HIV} puede ser una estrategia diagnóstica alternativa en el caso de a) neonatos hijos de madres infectadas, b) individuos cursando infección aguda por HIV, c) individuos pertenecientes a grupos de alto riesgo, d) individuos tratados durante la infección aguda propensos a sufrir seroconversión, e) participantes en programas experimentales de vacunación, entre otros [222].

La lucha anti retroviral, en particular contra HIV-1, se ha basado fundamentalmente en el ataque de enzimas clave del ciclo viral como la transcriptasa reversa (RT) y la proteasa (PR). Sin embargo, su alta variabilidad genera resistencia y fallas en los tratamientos, siendo necesaria la identificación de nuevos blancos terapéuticos para ser atacados en combinación con los ya existentes. La alta conservación de secuencia de CA y su sensibilidad frente a la aparición de mutaciones convierte a las cápsides retrovirales en excelentes blancos de terapias mantenidas en el tiempo [223, 224]. Si bien ninguno de los compuestos dirigidos contra CA y propuestos como candidatos terapéuticos ha mostrado suficiente potencial para justificar su desarrollo clínico, estos han evidenciado una diversidad de mecanismos a través de los cuales ejercen su poder antiviral sugiriendo que su uso en forma sinérgica a través de compuestos bifuncionales podría potenciar su aplicabilidad[225].

Varios derivados del ácido betulínico (un compuesto natural de origen vegetal) fueron identificados inicialmente como inhibidores de la maduración de la partícula viral inhibiendo el procesamiento de Gag [226, 227]. **Bevirimat**

(primer compuesto de este tipo sometido a pruebas clínicas) es capaz de unirse a Gag a través de la región entre el extremo C-terminal de CA y el fragmento SP1 inhibiendo el corte por la proteasa viral y por consiguiente la maduración de la partícula [228, 229].

El mecanismo de acción antirretroviral de esta familia de compuestos representa una excepción, ya que la mayoría de las moléculas capaces de unirse a CA_{HIV} e interferir con la maduración y/o el ensamblado de la cápside de HIV, lo hacen a través de los dominios NTD y CTD (Figura 13).

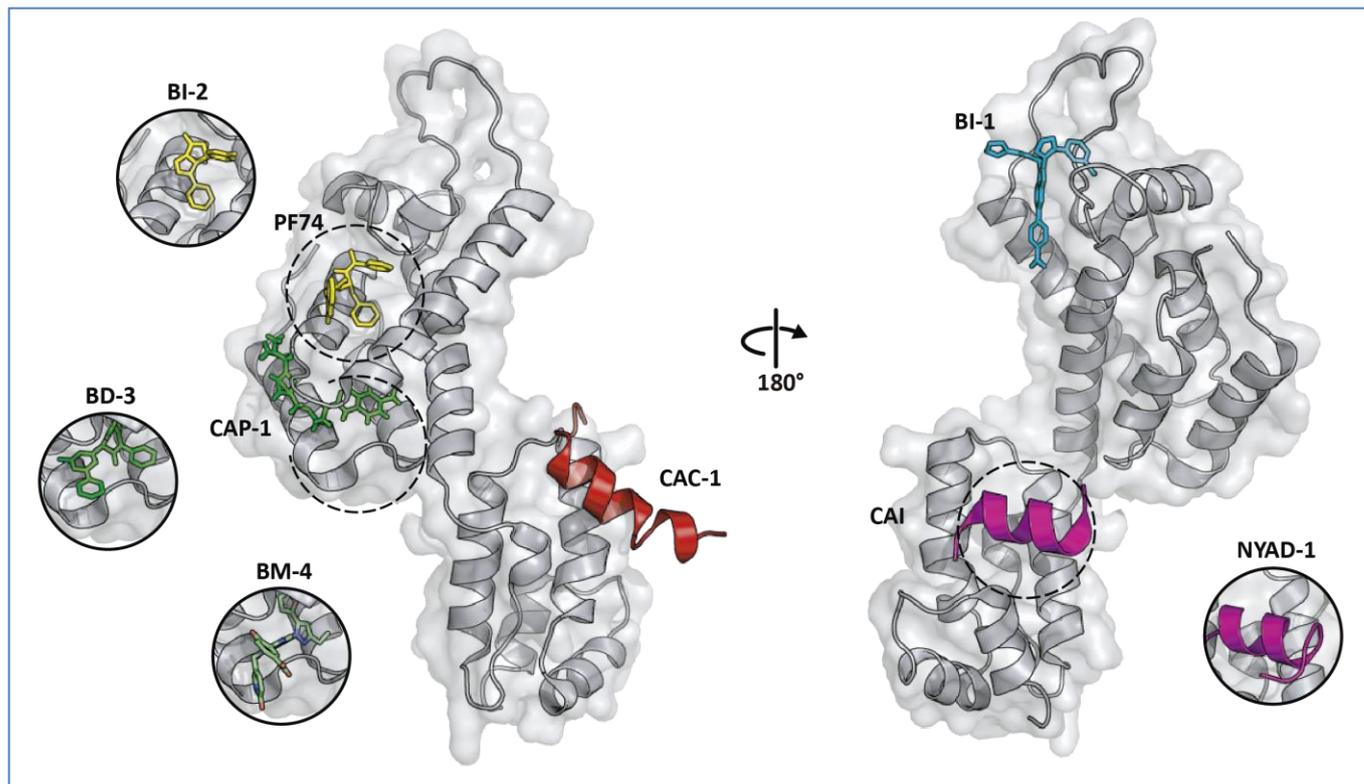


Figura 13: Sitios de unión a CA_{HIV} de compuestos y péptidos con acción antiviral. Diferentes estructuras de CA_{HIV} o sus dominios formando complejos con compuestos antirretrovirales fueron alineadas y se representan con código de colores de acuerdo con el sitio de unión de cada uno. En el caso de compuestos que se unen al mismo sitio con diferentes orientaciones (CAP-1) solo se presenta una de ellas para simplificar. Por su parte el péptido CAC-1 es un homólogo de la hélice 9 de CA, presentándose la estructura de dicha hélice obtenida a partir del dímero de dominios CTD. La figura fue confeccionada utilizando Pymol y los PDB ID fueron los siguientes: PF74 y CA_{HIV} (4XFZ), BI-2 (4U0F), CAP-1 (4NX4), BD-3 (4E91), BM-4 (4E92), BI-1 (4J93), CAC-1 (1A80), CAI (3DS0) y NYAD-1 (2L6E).

En 2003 se describieron **CAP-1** y **CAP-2**, dos compuestos relacionados, capaces de unirse al NTD reduciendo la velocidad de ensamblado y disminuyendo la infectividad de HIV en forma dosis dependiente [230]. Los compuestos **BD3** (benzodiazepinas) y **BM4** (benzoimidazoles) pertenecen a otra familia de compuestos y se unen a un sitio similar inhibiendo el ensamblado a través de la desestabilización de los contactos NTD-CTD de subunidades adyacentes, ya sea deformando el dominio NTD o protruyendo del sitio de unión y afectando los contactos [231]. El compuesto **BI-1** descrito en 2013, presenta capacidad de unir al NTD a través de un sitio cercano a la base del loop de unión a ciclofilina sin hacer contacto directo con las interfaces NTD-NTD o NTD-CTD de subunidades adyacentes. Este compuesto es capaz de inhibir el ensamblado *in vitro* y desestabilizar las cápsides *in vivo* [225, 232]. Sin embargo dicho compuesto posee actividad muy débil frente a proteínas con niveles de polimorfismo normales lo cual llevó a la rápida cancelación de pruebas clínicas [233].

Los compuestos **PF74** [234, 235] y **BI-2** [236], también se unen al NTD, pero a través del bolsillo hidrofóbico formado por las hélices 3, 4, 5 y 7, compitiendo con las moléculas celulares Nup153 [237] y CPSF6 [134] implicadas en la importación nuclear del genoma y la maquinaria de integración. Más recientemente se identificó por análisis *in*

silico, el compuesto **H22** capaz de unirse al mismo sitio, pero interactuando exclusivamente con re-arreglos hexaméricos. Curiosamente el efecto antiviral de estas moléculas está asociado a la estabilización de la cápside viral en las etapas tardías de la infección y no en la inhibición del autoensamblado [235, 236, 238].

Otro compuesto, el **I-XW-053** desarrollado por barrido virtual basado en datos estructurales [239] y el **Compuesto 34** obtenido por optimización del primero [240] son capaces de unirse al NTD e inhibir el ciclo replicativo, aunque no se conoce exactamente el mecanismo de acción antirretroviral.

El CTD de CA_{HIV} también representa un blanco de acción para diversos compuestos, en particular teniendo en cuenta su rol como motor del autoensamblado de Gag en la partícula inmadura. El primer compuesto dirigido contra el CTD de HIV capaz de inhibir el autoensamblado de CA *in vitro* fue el péptido **CAC-1**, diseñado como mimético de la hélice 9 de CA_{HIV} (principal superficie de dimerización de CTD) [241]. Otros péptidos derivados de su secuencia como **CAC1-C** y **CAC-1M** presentaron mayor afinidad y niveles de inhibición más altos [242].

Otro péptido conocido con el nombre de **CAI**, se une a un bolsillo hidrofóbico del CTD entre las hélices 8, 9 y 11 logrando inhibir el ensamblado *in vitro* de CA y bloquear el ensamblado de Gag en la partícula inmadura y de CA en la partícula madura [243-245]. Dicho péptido sirvió de modelo para generar péptidos estabilizados por “grapas de hidrocarburo” (*hydrocarbon-stapled peptides*) con capacidad de penetrar células (CPP por “*cell penetrating peptides*”) y con afinidades mayores dando lugar al péptido grapa **NYAD-1** [246], **NYAD-201**[247] y otros como **NYAD-36**, **NYAD-66**, **NYAD-67** que además de unirse a CA e inhibir el ensamblado, poseen la curiosa capacidad de unirse a la glicoproteína de superficie y afectar también la entrada del virus [248].

Hasta aquí la mayoría de los compuestos con actividad antirretroviral mediante unión al CTD son péptidos con longitudes variables entre 12 y 23 residuos, no obstante existen ejemplos más recientes de pequeñas moléculas como **GDC**, un compuesto obtenido por fluorescencia en ensayos de complementación celular con capacidad de unirse a una región entre los dominios NTD y CTD de subunidades adyacentes, inhibiendo el autoensamblado *in vitro* y en experimentos con células[249]. Otro ejemplo de pequeñas moléculas dirigidas contra el CTD de HIV son los **Compuestos 6** y **Compuesto 50** seleccionados por docking computacional y dirigidos contra la misma cavidad hidrofóbica que el péptido CAI y sus derivados, mostrando capacidad de inhibir el autoensamblado de CA *in vitro* pero incapaces de inhibir la formación de partículas inmaduras con Gag [250].

Por su parte el compuesto **Ebselen** (compuesto con actividad anti-inflamatoria, antioxidante y crio protectora) fue identificado dentro de una librería de 1280 compuestos farmacológicamente activos, como un inhibidor de HIV mediante un mecanismo de estabilización de la cápside (probablemente impidiendo el “desnudamiento “en fases tempranas del ciclo en forma similar a PF74) uniéndose al CTD a través de residuos de cisteína en la región de dimerización de dicho dominio [251].

Los anticuerpos murinos contra CA_{HIV} fueron utilizados a inicio de los 90s, demostrando inhibir la infección *in vitro* mediante mecanismos no del todo conocidos en ese momento, que implicaban inhibición del ensamblado de la cápside, citotoxicidad celular mediada por anticuerpos (ADCC por “*antibody-dependent cellular cytotoxicity*”) y enlentecimiento en la diseminación del virus [252, 253].

Más recientemente, el uso de anticuerpos monoclonales con capacidad de inhibir el autoensamblado de CA_{HIV} *in vitro* demostró ser efectivo para bloquear el ciclo replicativo de HIV gracias a la conjugación de los mismos con péptidos de internalización celular [254]. Frente a esta evidencia, el desarrollo de fragmentos de anticuerpo con capacidad de penetrar células ha sido visualizado como una estrategia promisoría en la inhibición de retrovirus mediante interferencia con los procesos celulares necesarios para llevar a cabo el ciclo replicativo [255].

En tal sentido los dominios variables de anticuerpos de cadena pesada (VHH o nanoanticuerpos) pueden ser una excelente herramienta para interferir con los procesos del ciclo retroviral, particularmente debido a su pequeño

tamaño, fácil producción en forma recombinante y posibilidad de ser modificados a nivel de secuencia aminoacídica. La siguiente sección pretende revisar las características más notorias los VHH, así como sus posibles aplicaciones y mecanismos de producción en forma recombinante.

Tabla 1. Moléculas con actividad antiretroviral por unión a CA_{HIV}. Modificado de [233]. HTS: cribado de alto rendimiento por “high-throughput screening”; TR-FRET: transferencia de energía por resonancia de fluorescencia resuelta en el tiempo por “time-resolved fluorescence resonance energy transfer”; N.D.: no determinado; PBMC: células mononucleares de sangre periférica por “peripheral blood mononuclear cells”. Se considera fase temprana de infección a los eventos comprendidos desde la entrada del virus hasta la integración, mientras que la fase tardía implica la formación de nuevas partículas con el ensamblado de la cápside y su maduración. *Valores de K_D determinados por ITC con compuestos de la misma familia que presentan mayor solubilidad.

Compuesto	Cribado	EC ₅₀	CC ₅₀	K _D	Sitio de unión	Etapas del Ciclo	Ref.
CAP-1	Computacional	EC95 ≈ 100 μM	> 100 μM	≈ 800 μM	NTD	Tardía	[230]
BD-3	Fluorescencia in vitro	70 ± 30 nM	> 28 μM	610 nM *	NTD	Tardía	[231, 256]
BM-4	Fluorescencia in vitro	62 ± 23 nM	> 20 μM	87-210 nM *	NTD	Tardía	[231, 256]
I-XW-053	Virtual	9.03 – 100 μM	> 100 μM(PBMS)	66.3 ± 4.8 μM	NTD	Temprana	[239]
Compuesto 34	Optimización de I-XW-053	14.2 ± 1.7 μM(PBMS)	> 100 μM(PBMS)	11.8 ± 4.7 μM	NTD	N.D.	[240]
PF74	HTS	80 – 640 nM	> 10 μM(PBMS)	Monómero 2.7 μM	NTD/CTD	Temp./Tardía	[134, 234, 235]
BI-1	Infección de ronda única	7.5 ± 2.1 μM	> 91 μM	20 μM	NTD	Temprana	[236]
BI-2	Optimización de BI-1	1.4 ± 0.66 μM	> 76 μM	Monómero 1.2 μM	NTD	Temprana	[236]
H22	In silico	18.1 ± 2.4 μM	> 526 μM	hexamer: 38.2 μM	NTD/CTD	Temp./Tardía	[238]
C1	HTS	6.1 μM	N.D.	43 μM	NTD	Tardía	[232]
CAI	Phage display	N.D.	N.D.	15 ± 7.2 μM	CTD	Tardía	[243, 244]
NYAD-1	Derivado de CAI	4.29 – 21.6 μM(PBMS)	N.D.	≈ 1 μM	CTD	Temp./Tardía	[246]
NYAD-36	Derivado de CAI	1.5 ± 0.7 μM	> 189 μM	10.12 ± 1.4 μM	CTD	Temp./Tardía	[248]
NYAD-66	Derivado de CAI	3.94 ± 0.32 μM	> 115 μM	3.60 ± 0.16 μM	CTD	Temp./Tardía	[248]
NYAD-67	Derivado de CAI	3.88 ± 0.3 μM	> 107 μM	2.64 ± 0.22 μM	CTD	T Temp./Tardía	[248]
CAC1	Mimético de H9 de CA	N.D.	N.D.	50 ± 25 μM	CTD	Tardía	[241]
CAC1-C	Derivado de CAC1	≈ 25% inhibición	N.D.	19 ± 8 μM	CTD	Tardía	[242]
CAC1-M	Derivado de CAC1	≈ 25% inhibición	N.D.	8 ± 1 μM	CTD	Tardía	[242]
NYAD-201	Derivado de CAC1	1.58 – 9.88 μM	N.D.	N.D.	CTD	Tardía	[247]
GDC	Complementación	3.12 ± 0.37 μM	> 200 μM	N.D.	NTD/CTD	Tardía	[249]
Compuesto 6	Virtual	1.6 – 6.17 μM	> 62 μM(PBMS)	N.D.	CTD	Tardía	[250]
Compuesto 50	Virtual	1.12 – 10.95 μM	> 64 μM(PBMS)	N.D.	CTD	Tardía	[250]
Ebselen	HTS TR-FRET	3.2 ± 0.9 μM(PBMS)	> 30 μM(PBMS)	N.D.	CTD	Tardía	[251]

5.3. ANTICUERPOS Y NANOANTICUERPOS.

Antes de hablar de los anticuerpos de cadena pesada y meternos de lleno en el análisis de los nanoanticuerpos, dedicaremos una primera sección al estudio de los anticuerpos clásicos.

5.3.1. ANTICUERPOS CLÁSICOS

5.3.1.1. RESPUESTA HUMORAL Y ANTICUERPOS

Luego de una infección, los mamíferos presentan dos sistemas interconectados para contraatacar el ingreso y diseminación de microorganismos potencialmente patógenos: la respuesta innata y la adaptativa. La respuesta innata se dispara mediante el reconocimiento de patrones conservados en patógenos a través de receptores de amplia especificidad (PRRs por *Pattern Recognition Receptors*) codificados a nivel de línea germinal [257]. Por su parte la respuesta adaptativa presenta un grado de especificidad muy superior por los antígenos y es disparada por estos. Ambos sistemas están basados en componentes celulares y moleculares.

Los componentes celulares de la respuesta innata están representados por células fagocíticas (neutrófilos, monocitos y macrófagos), células liberadoras de mediadores inflamatorios (basófilos, mastocitos y eosinófilos) y células “*natural killers*” (NK), mientras que los componentes moleculares de la respuesta innata están representados por el Sistema del Complemento, las proteínas de Fase Aguda, citoquinas y quimioquinas.

En cuanto a los componentes celulares de la respuesta adaptativa podemos nombrar a los diferentes tipos de linfocitos T y linfocitos B [258]. Los linfocitos B expresan en su superficie receptores BCR específicos, que al unirse a un antígeno son activados, proliferan y se diferencian mediante una compleja reorganización celular, dando lugar a células productoras de anticuerpos o a células de memoria que ofrecen una línea de defensa frente a posteriores infecciones [259].

Los anticuerpos constituyen los componentes moleculares por excelencia de la respuesta adaptativa (respuesta humoral adaptativa) pero también interactúan con la respuesta innata y la respuesta celular adaptativa llevando a cabo diversas funciones como *a) neutralización* de patógenos (aglutinación, inhibición de unión a receptores, inhibición de fusión y entrada), *b) activación de la cascada del complemento* (destrucción del patógeno, fagocitosis mediada por complemento), *c) interacción de Fc vía receptores Fc* (citotoxicidad celular mediada por anticuerpos o ADCC, opsonización y fagocitosis) y *d) modulación de la respuesta inmune* (generación, secreción o represión de sustancias pro- y antiinflamatorias) [260].

5.3.1.2. ESTRUCTURA DE LOS ANTICUEPOS

Cuando pensamos en anticuerpos o inmunoglobulinas, es imposible evitar pensar en su versión clásica basada en la estructura propuesta por Porter en 1963, consistente en un tetrámero ($\approx 150\text{-}180\text{KDa}$) conformado por dos cadenas pesadas idénticas (H) y dos cadenas livianas idénticas (L), donde cada heterodímero de cadenas pesada y liviana se encuentran unidos covalentemente por puentes disulfuro [261] (Figura 14). Tanto la cadena pesada (50-75 KDa) como la liviana ($\approx 25\text{ KDa}$) poseen regiones de secuencia variable en sus extremos N-terminales y secuencias constantes en los extremos C-terminales [262], donde las cadenas livianas están conformadas por un dominio variable V_L y un dominio constante C_L , y las cadenas pesadas están formadas por un dominio variable V_H y hasta 4 dominios constantes C_H . Las cadenas pesadas poseen una región “bisagra” entre el dominio constante más cercano al dominio variable, otorgándole flexibilidad a la cadena pesada y la característica forma de “Y”. Esta región bisagra (sensible a la acción proteolítica de la *papaína*) permite separar los heterodímeros de cadena pesada y liviana en

dos tipos de fragmentos: dos fragmentos de unión al antígeno (Fab) y un fragmento cristalizante (Fc) asociado a otras funciones como la interacción con el sistema de complemento y ADCC [263-266], (Figura 14).

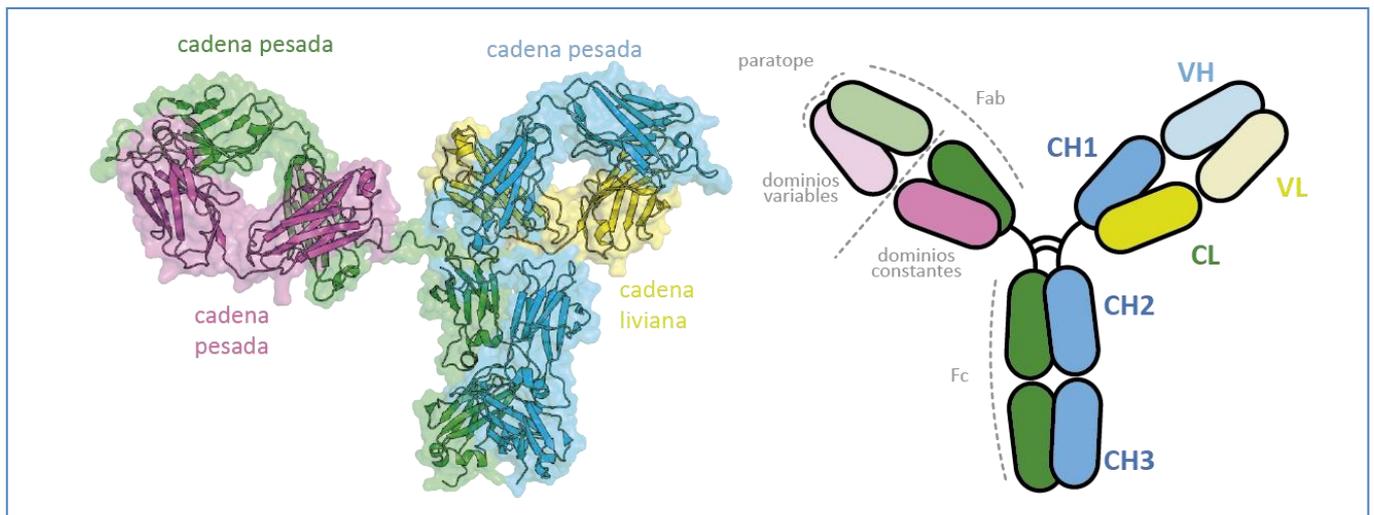


Figura 14. Estructura de un anticuerpo clásico: Los anticuerpos clásicos (en este caso una IgG de ratón) poseen dos cadenas largas y dos cadenas cortas idénticas entre sí, a pesar de que acá se presentan con colores diferentes. Las cadenas livianas poseen un dominio variable (VL) y un dominio constante (CL), mientras que las cadenas pesadas poseen un dominio variable pesado (VH) y tres constantes (CH1, CH2 y CH3). El corte de las regiones bisagra da lugar a un fragmento Fc (conformado por dominios CH2 y CH3) y dos dominios Fab conformados por las cadenas livianas y los dominios VH y CH1 de las cadenas pesadas, cuyo sitio de unión al antígeno se llama paratope.

Las inmunoglobulinas presentan diversidad a nivel de sus regiones Fc, pudiendo ser clasificadas en diferentes clases o isotipos: IgM, IgD, IgG, IgE e IgA (Figura 15.A), de acuerdo a la clase de dominio C_H que las componen, denotados con las letras griegas minúscula μ , δ , γ , ϵ , α , respectivamente. El linfocito B que sale de la médula ósea co-expresa IgM e IgD en su superficie, pero con los mismos dominios VL y VH. Esta co-expresión se explica por splicing alternativo entre las 2 regiones constantes μ y δ [267]. Una vez activado por el antígeno, los linfocitos B adquieren la capacidad de secretar IgM frecuentemente en estado pentamérico [268]. La expresión de otros isotipos ocurre mediante un proceso de recombinación somática conocido como Recombinación de Cambio de Clase (CSR por *class switch recombination*) donde el gen C_μ codificante del fragmento C_H es sustituido por C_γ , C_ϵ o C_α para dar lugar a los demás isotipos [269]. La función de las **IgM** está fuertemente ligada a la eliminación de patógenos por opsonización y fijación del complemento (favorecida por su estado multimérico). La **IgD** se encuentra en baja cantidad en forma soluble en suero y su función es poco conocida tanto para la forma secretada como para la unida a membrana. La **IgG** es la inmunoglobulina más abundante y en humanos presenta 4 subclases diferentes (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4,). La **IgE** a pesar de encontrarse en baja cantidad en su forma soluble en suero tiene una altísima afinidad para unirse a receptores Fc- ϵ presentes en células efectoras, cumple una función relevante en la defensa antiparasitaria y está asociada a reacciones de hipersensibilidad y alérgicas. Por su parte, en humanos la **IgA** posee dos subclases (IgA1 e IgA2) [258] y segunda a la IgG en términos de abundancia en suero; los niveles más altos de IgA se presentan a nivel de mucosas y secreciones como saliva y leche materna [270].

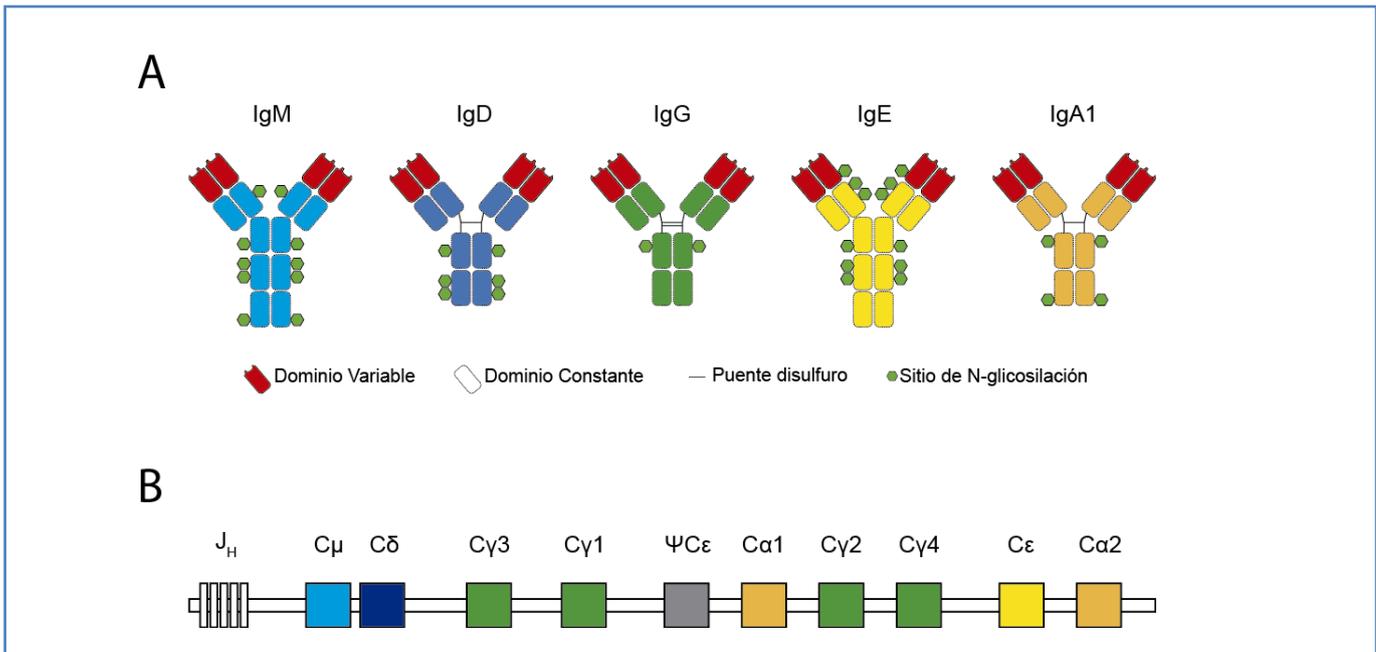


Figura 15: Isotipos de Inmunoglobulinas. **A)** Representación de las formas monoméricas de los principales isotipos de inmunoglobulinas humanas con los dominios variables representados en rojo, los constantes en colores de acuerdo a cada isotipo, los sitios de N-glicosilación como hexágonos verdes y los puentes disulfuro como líneas horizontales de color negro. **B)** Organización de los genes de la región constante de la cadena pesada de humanos. Con la letra Ψ se representa un pseudogen que ha sido inactivado. (Modificado de [271]).

5.3.1.3. GENERACIÓN DE DIVERSIDAD DE PARATOPES

Podemos pensar en los anticuerpos como moléculas con 2 regiones bien diferenciadas: una región efectora ubicada en la región C-terminal, cuya diversidad está asociada a distintas funciones celulares (discutido en la sección anterior) y una región de interacción con el antígeno (paratope) en la región N-terminal cuya diversidad es crucial para virtualmente poder reconocer cualquier ligando.

El sitio de reconocimiento de los anticuerpos está formado por tres regiones hipervariables en la cadena variable pesada (V_H) y tres regiones hipervariables en la cadena variable liviana (V_L), conocidas como “*regiones determinantes de complementariedad*” (CDRs) numeradas de 1 a 3, a su vez separadas y flanqueadas por regiones más conservadas conocidas como regiones “*framework*” (FR) numeradas de 1 a 4 [272] (Figura 16.A). Si bien las diferencias de secuencia aminoacídica en los CDR aportan la mayor variabilidad para la generación de sitios de reconocimiento de antígenos [273], las regiones FR influyen la interacción, fundamentalmente favoreciendo el mantenimiento del correcto plegamiento y la estabilidad de los anticuerpos [274, 275].

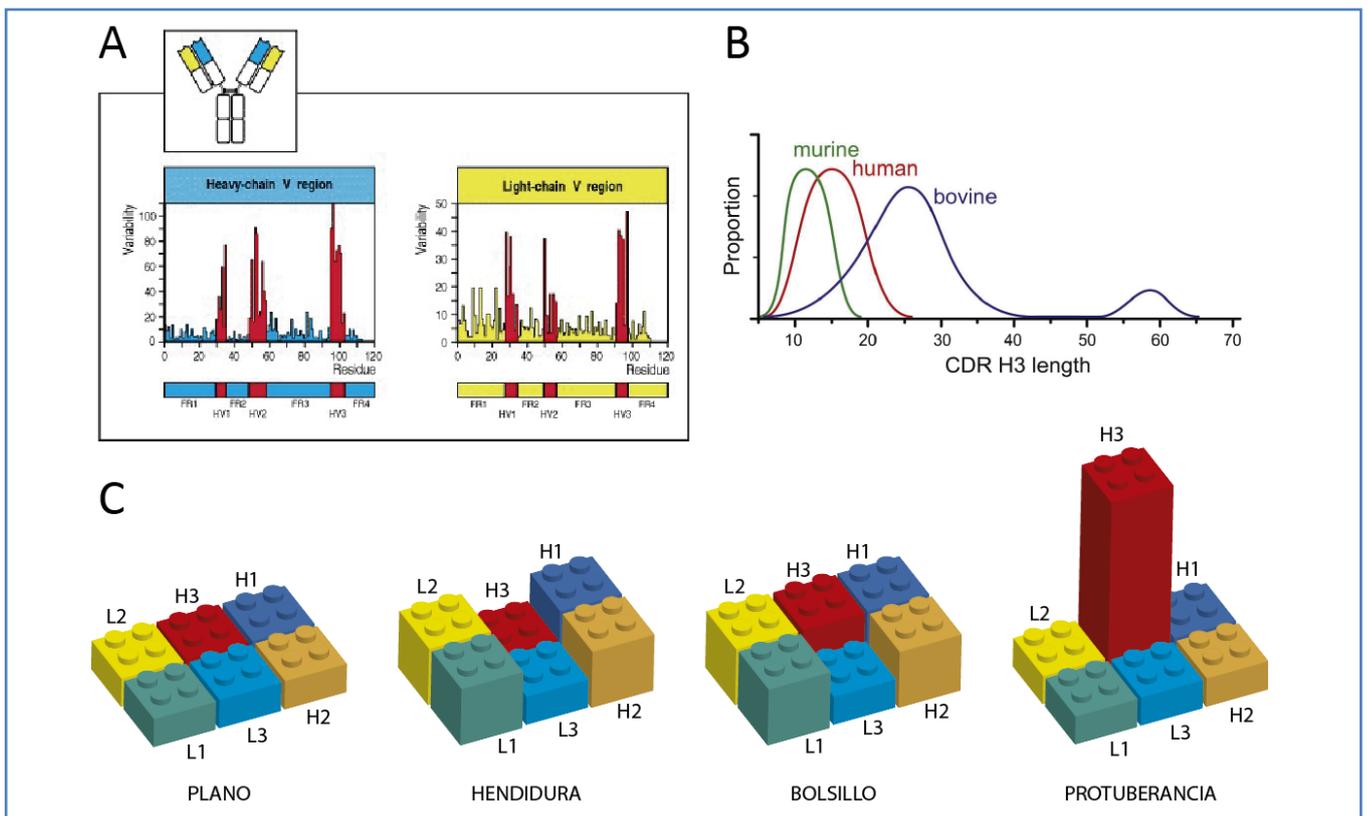


Figura 16: Variabilidad de los CDRs de Inmunoglobulinas. **A)** Gráficos de variabilidad obtenidos a partir de alineamientos de varias docenas de secuencias de cadenas livianas y pesadas de inmunoglobulinas humanas [271]. **B)** Comparación entre especies de la longitud del CDR3 de la cadena pesada [276]. **C)** Representación esquemática del efecto de la longitud de los CDRs sobre la topografía del paratope del anticuerpo (Adaptado de Collis *et al.* [277, 278])

De acuerdo con la base de datos KABAT DATABASE iniciada en 1970, los CDRs de la cadena liviana de anticuerpos humanos se encuentran en las posiciones 24-34 (10), 50-56(6) y 89-97 (8) mientras que en la cadena pesada se encuentran en las posiciones 31-35 (4), 50-65 (15) y 95-102 (7) [262]. Si bien la posición de los CDRs en la estructura de los anticuerpos es conservada, la longitud relativa de los mismos varía entre especies y en función del antígeno reconocido (Figura 16.B y C), permitiendo definir topografías características como superficies planas (asociadas al reconocimiento de proteínas), hendiduras (asociadas al reconocimiento de péptidos), bolsillos (asociadas al reconocimiento de haptenos) [277, 279] o extensas protuberancias[276] (asociadas en vacas a una rápida generación de anticuerpos antivirales neutralizantes de amplio espectro [280]). El CDR3 de la cadena pesada es el más extenso y variable en diferentes especies [281].

Se estima que los linfocitos B son capaces de producir anticuerpos con 10^{15} regiones variables diferentes a partir de la recombinación de aproximadamente 400 genes agrupados en 3 *clusters*: *IGH* (por la cadena pesada), *IGK* (por la cadena liviana κ) e *IGL* (por la cadena liviana λ). Los clusters *IGH*, *IGK* e *IGL* se ubican en cromosomas diferentes (14, 2 y 22 en humanos y 12, 6 y 16 en ratones) [258, 282]. El *cluster IGH* posee 4 tipos de genes V, D, J y C (*variable, diversity, joining* y *constant*) mientras que los clusters *IGK* e *IGL* poseen genes V, J y C, careciendo de segmentos D [283].

El primer nivel de variabilidad en los linfocitos inmaduros se da mediante la generación de segmentos variables de cadena pesada gracias a la recombinación aleatoria de 1 de 25 segmentos D_H con 1 de 6 segmentos J_H por acción de las recombinasas RAG1 y RAG2 (*recombination-activating genes*) y posteriormente con 1 de 50 segmentos V_H dando lugar a 7.500 combinaciones posibles [258]. En el linfocito B inmaduro, el receptor es conformado por una cadena pesada generada a través de esta vía y una “cadena liviana sustituta” (poco variable). Cuando el linfocito B madura, la *cadena liviana sustituta* es suplantada por una cadena liviana variable κ o λ , generada en forma similar por recombinación de segmentos V_L y J_L para dar lugar a 316 combinaciones posibles [284] y dado que el paratope

se conforma por ambas cadenas, las combinaciones posibles ascienden a más de 2.3 millones. Sin embargo este número de posibilidades se incrementa muchísimo gracias a inexactitudes durante el empalme y la incorporación/eliminación de nucleótidos en las uniones de genes, mediada por la enzima Deoxiribonucleotidil Transferasa Terminal, *TdT* (Figura 17) [258].

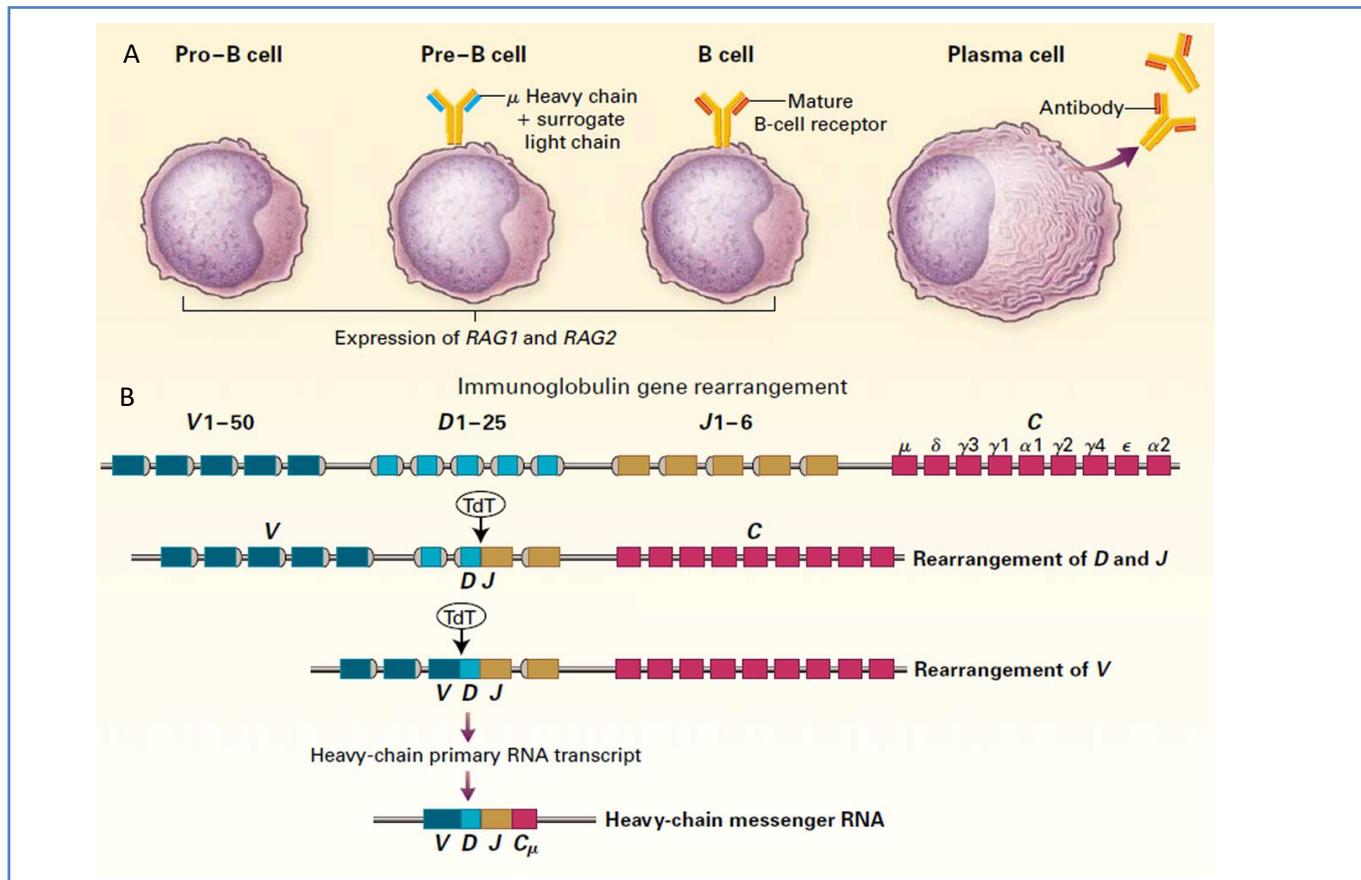


Figura 17: Generación de diversidad de paratopes A) Maduración de un linfocito B hasta generar una célula secretora de anticuerpos (plasmocito). En el linfocito inmaduro, el receptor anclado a la membrana celular posee una cadena pesada variable (subtipo IgM) y una cadena liviana sustituta que es suplantada por una cadena liviana variable para dar lugar al receptor maduro IgM. Posteriormente, con el reconocimiento del antígeno la célula es activada y sufre un cambio de clase donde la región constante de la cadena pesada es modificada para dar lugar a anticuerpos secretables. B) Generación de variabilidad en la cadena pesada de un receptor de célula B. La recombinación de segmentos génicos V, D y J (ubicados en cromosomas diferentes) permite generar la región variable de la cadena pesada. Dicha variabilidad es incrementada por la presencia de inexactitudes en el empalme de secuencias y por la adición y sustracción al azar, de nucleótidos por acción de la enzima Deoxiribonucleotidil Transferasa Terminal (*TdT*). Extraído de Delves y Roitt, 2000 [258].

Cuando el linfocito maduro se une con un antígeno a través de una célula presentadora en los centros germinales, una serie de señales de activación promueven la proliferación de este y el cambio de clase para producir anticuerpos en forma soluble o para generar células de memoria. En esta etapa también ocurre el proceso de Hipermutación Somática (SHM por "somatic hypermutation"), donde la enzima AID (por *Activation Induced Cytidine Deaminase*) introduce mutaciones en las regiones variables de ambas cadenas (V_L y V_H) con una altísima frecuencia, incrementando notoriamente la diversidad del repertorio de anticuerpos. Dicha actividad mutagénica representa una oportunidad para mejorar la afinidad de los anticuerpos, pero también un riesgo dado que puede promover procesos de carcinogénesis. Por tal motivo su actividad está altamente regulada y dirigida a las regiones hipervariables de los anticuerpos [285]. Ambos procesos (CSR y SHM) son responsables de la segunda instancia de generación de diversidad y son regulados por la enzima AID [286].

5.3.1.4. APLICACIONES DE ANTICUERPOS

Más allá de su rol fundamental en la inmunidad adquirida, los anticuerpos reconocen moléculas en forma específica, y su potencial uso en aplicaciones analíticas y terapéuticas fue reconocido tempranamente hace más de 100 años por Paul Ehrlich. Este investigador alemán (Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1908) propuso el concepto de “anticuerpos como balas mágicas capaces de reconocer su objetivo sin afectar el organismo” [287].

Durante más de la mitad del siglo XX, las aplicaciones de anticuerpos se limitaban al uso de sueros policlonales o purificaciones de anticuerpos con reactividad variada, hasta que en 1975 Köhler y Milstein fusionaron una línea celular de mieloma con células de bazo de ratones inmunizados con eritrocitos de oveja, para producir hibridomas inmortalizados capaces de producir grandes cantidades de anticuerpos monoclonales (mAbs) con especificidades únicas [288]. Esta metodología cambiaría definitivamente el destino de las aplicaciones de anticuerpos, primero en investigación básica y diagnóstico, y posteriormente en el campo terapéutico [289, 290]. El uso terapéutico de mAbs en humanos se vio inicialmente retrasado, debido a su origen murino [291]. Primero se sustituyó a la región constante murina por una de origen humano para dar lugar a los *anticuerpos quiméricos* [292] y posteriormente la incorporación de CDRs de anticuerpos monoclonales murinos en anticuerpos humanos dio lugar a *anticuerpos humanizados* [293], reduciendo notoriamente su inmunogenicidad [294]. Con el avance de la ingeniería genética, la inmunogenicidad de los mAbs en humanos ha sido reducida sensiblemente [295, 296], engrosando paulatinamente la lista de mAbs aprobados para fines terapéuticos en humanos, al punto que en 2017 el número de mAbs terapéuticos aprobados por la FDA asciende a 68, con un total de 10 aprobados en el último año [297].

5.3.1.5. FRAGMENTOS DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES

A pesar de sus indiscutibles ventajas, los anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados con fines terapéuticos presentan ciertas limitaciones relacionadas con *costos de producción*, *extensa vida media* en suero, *dificultad para penetrar en tumores sólidos* (debido fundamentalmente a su tamaño, forma y presencia de región Fc) y *limitaciones en el modo de acción de anticuerpos mediante unión a receptores celulares de Fc* (mutaciones en los receptores Fc de pacientes, variaciones en el patrón de glicosilación dependiendo de la línea celular utilizada, competencia con otras IgGs del paciente por los receptores FcγRIIIa e interacción con receptores Fc inhibitorios como FcγRIIb expresados en células B, macrófagos, células dendríticas y neutrófilos) [298]. Por otro lado, existen diversas aplicaciones de anticuerpos donde la región efectora Fc no es necesaria e incluso indeseada, promoviendo la expansión del uso de fragmentos de anticuerpos con capacidad de reconocer antígenos. Por ejemplo en imagenología la presencia de la región Fc extiende la vida media en suero causando reducción de contraste o bien favorece la generación de efectos citotóxicos no deseados provocados por la activación de células que expresan receptores Fc [299]. Estas limitaciones han pavimentado el camino hacia una nueva generación de agentes terapéuticos, diagnósticos y de investigación, basados en fragmentos de anticuerpos.

Los primeros fragmentos de anticuerpos con actividad de reconocimiento antigénico fueron los Fabs obtenidos por proteólisis (papaína y pepsina) y la expansión de la técnica del ADN recombinante en la década del 80 propició la expresión de diversos fragmentos de anticuerpos recombinantes (Figura 18.A). Fragmentos Fab y Fv (dímeros no covalentes de dominios V_H y V_L) han sido expresados con cierto éxito en bacterias en 1988 [300, 301], y más recientemente en levaduras y hongos [302]. En 1989 se reportó la expresión en *E. coli* de fragmentos V_H con capacidad de unión a lisozima, los cuales a pesar de ser pequeños y presentar afinidades similares al mAb original, mostraban tendencia a formar agregados debido a la exposición de residuos hidrofóbicos que normalmente estarían cubiertos por la cadena V_K o V_L [303] y además no son aplicables a todos los anticuerpos dado que generalmente ambos dominios variables participan del sitio de reconocimiento antigénico. La inserción de una secuencia peptídica hidrofílica y flexible a modo de “linker” entre los fragmentos variables V_H y V_L permitió la expresión en *E. coli* de dominios variables de anticuerpos de cadena única (scFv por *single chain Fv*) [304], sin

embargo no siempre la afinidad se mantiene inalterada con respecto al anticuerpo original, la secuencia *linker* a menudo es degradada proteolíticamente y se favorece la agregación por exposición al solvente de residuos hidrofóbicos que usualmente estarían ocluidos en un anticuerpo normal (Figura 18.B)[305, 306].

A partir de esta batería de construcciones se ha cimentado el diseño de construcciones multiméricas con el objetivo de aumentar la afinidad funcional (avidéz), potenciar interacciones celulares mediante el diseño de fragmentos multivalentes contra receptores de superficie para potenciar la activación o apoptosis de diversos tipos celulares a través de vías de señalización transmembrana o favorecer la interacción de diversos blancos para reclutar funciones efectoras, células citotóxicas o cápsulas de distribución de genes o marcadores inmunodiagnósticos (Figura 18.B) [299]. En este sentido, el descubrimiento de los anticuerpos de cadena pesada y la posibilidad de expresar los dominios variables en sistemas heterólogos abrió una nueva avenida en lo que refiere a fragmentos de anticuerpos con actividad de reconocimiento antigénico (Figura 18.C).

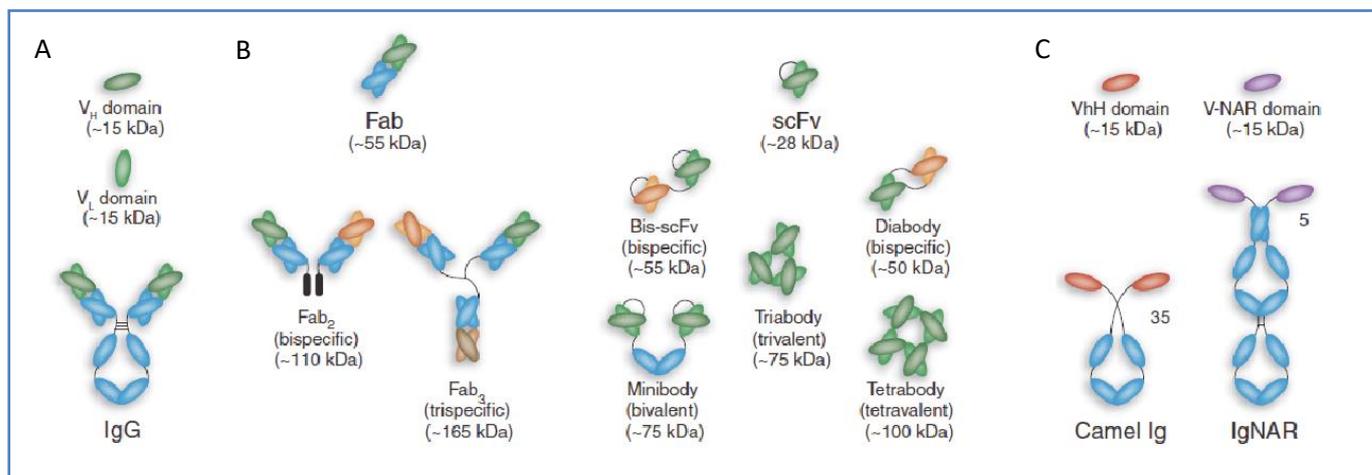


Figura 18: Fragmentos de Anticuerpos Recombinantes. A) Inmunoglobulina G clásica con sus dominios variables VH y VL B) Diferentes fragmentos de anticuerpos con capacidad de reconocimiento antigénico, obtenidos por proteólisis o expresados en forma recombinante. C) Inmunoglobulinas de cadena pesada de camello (izquierda) y tiburón (derecha) acompañadas de los fragmentos VHH y V-NAR expresados en forma recombinante. Entre paréntesis se representa el peso molecular aproximado de cada construcción. (Adaptado de Holliger y Hudson, 2005 [299])

5.3.2. ANTICUERPOS DE CADENA PESADA

El descubrimiento de los anticuerpos de cadena pesada por el grupo de Hamers a inicios de la década del 90 abriría un nuevo frente en el uso de fragmentos de anticuerpos. Este grupo encontró que además de los anticuerpos clásicos, el suero de mamíferos pertenecientes a la familia *Camelidae* (camellos, dromedarios, llamas, alpacas y vicuñas entre otros) presenta una variedad de anticuerpos que carece de cadena liviana [307], a los cuales llamaron Anticuerpos de Cadena Pesada o **hcAbs** (por *heavy chain antibodies*). Poco tiempo después se encontraría que una especie de tiburones posee una variedad de anticuerpos de cadena pesada conocida como IgNAR (inmunoglobulinas NAR por “*new antigen receptor*”) [308] lo que más tarde se haría extensivo a peces cartilaginosos. A pesar de las diferencias estructurales, ambos tipos de anticuerpos poseen como característica común la ausencia de cadenas livianas y por ende un sitio de reconocimiento antigénico constituido únicamente por un dominio variable (Figura 18.C y Figura 19.A).

5.3.2.1. ASPECTOS EVOLUTIVOS

A pesar de las similitudes, los anticuerpos de cadena pesada de camélidos y peces cartilaginosos poseen orígenes diferentes. Los hcAbs de camélidos representan una adaptación reciente surgida a partir de genes del locus IgH de anticuerpos convencionales mientras que los IgNAR de tiburones (pertenecientes a un antiguo linaje en

vertebrados) parecen ser el remanente evolutivo de un antiguo linaje (Figura 19.B) [309, 310] y de hecho proporcionan información respecto a la evolución de las inmunoglobulinas [311].

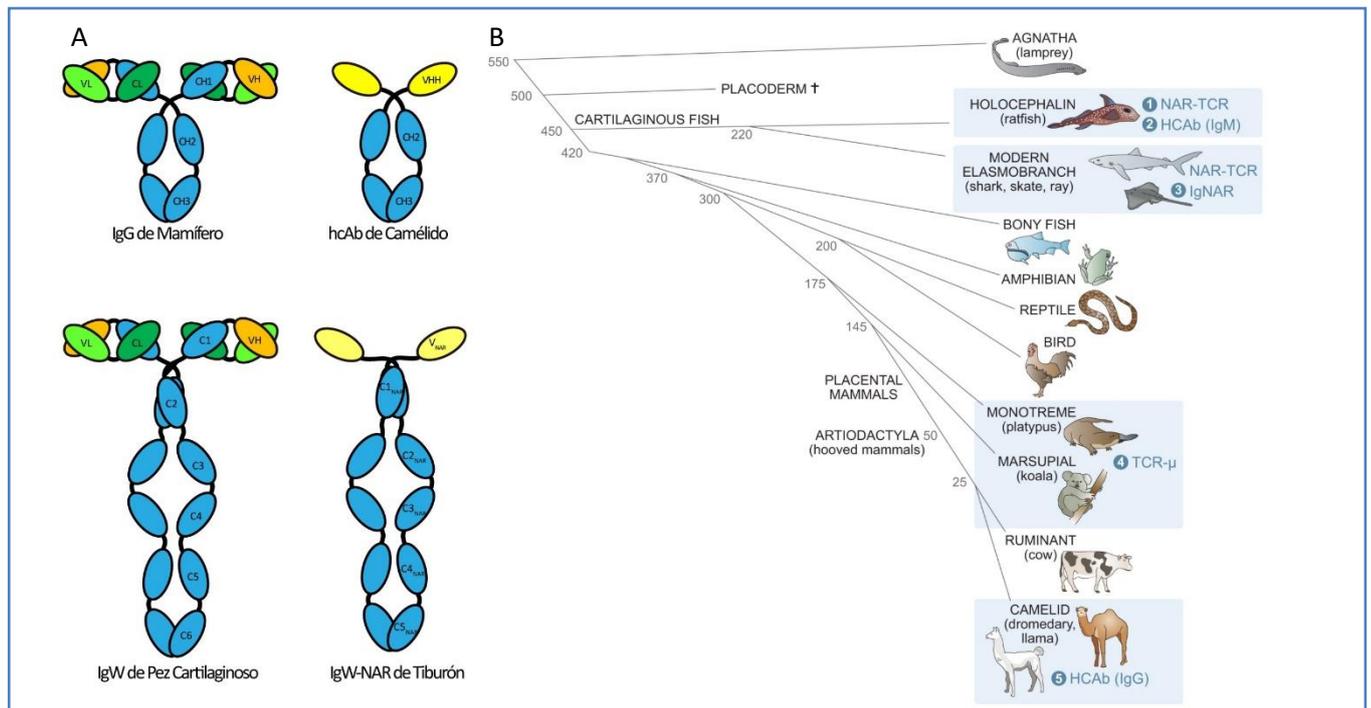


Figura 19: Anticuerpos de Cadena Pesada. A) En la columna izquierda se representan anticuerpos clásicos de 4 cadenas con una IgG de mamífero en la parte superior y una IgW de peces cartilagosos en la parte inferior. Se muestran las cadenas livianas (verde) y en la cadena pesada los dominios variables (naranja) y los dominios constantes C_{1-3} en mamíferos y C_{1-6} en peces cartilagosos (azul). Por su parte en la columna derecha se representa en la parte superior un hcAb de camélido con un dominio variable VHH (amarillo) y los dominios C_{2-3} (azul) y en la parte inferior una IgW-NAR de tiburón con un dominio V_{NAR} (amarillo) y 5 dominios constantes $C_{1-5_{NAR}}$. Nótese la ausencia del primer dominio constante (contiguo al dominio variable) en los anticuerpos de cadena pesada de la derecha. **B)** Árbol filogenético simplificado. Se enfatiza con un rectángulo celeste aquellos taxones que poseen inmunoglobulinas (Ig) o receptores de células T (TCR) con sitios de reconocimiento antigénico de dominio único. Los números a la izquierda de cada nodo representan el tiempo de divergencia transcurrido (en millones de años). Extraído de Flajnik *et al.* [312].

Esto representa un misterioso caso de convergencia evolutiva a distintos niveles: 1) *estructural*: ambos se componen de homodímeros de cadenas pesadas; 2) *secuencia*: aumento en la frecuencia de residuos cargados y polares en la superficie que estaría interactuando con el dominio VL en Ig convencionales; 3) *mecánico*: ausencia de dominio constante C1 (responsable de la interacción con la cadena liviana en Ig clásicas) y mecanismos de generación de alta variabilidad de repertorio (ausencia de la diversidad combinatorial debida al aporte de cadenas V_L y V_H) y 4) *funcional*: los dominios variables VHHs y V-NARs reconocen epítopos similares que se diferencian de los reconocidos por los anticuerpos convencionales [310, 312].

La necesidad de dominios de reconocimiento más pequeños (para acceder a antígenos crípticos alojados en pequeñas cavidades) y más estables (caracterizados por una alta frecuencia de puentes disulfuro no canónicos intra-dominio) para tolerar los ambientes áridos con temperaturas extremas como las que deben soportar los camélidos, podrían explicar al menos en parte la reciente aparición a nivel evolutivo de este tipo de anticuerpos [312].

5.3.2.2. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DE ANTICUERPOS DE CADENA PESADA DE CAMÉLIDOS

En mamíferos, el orden Artiodactyla está formado por tres subórdenes: Ruminantia (vacas, cabras, ovejas, antílopes, etc.), Suiformes (cerdos, hipopótamos, etc.) y Tylopoda. El suborden Tylopoda está constituido por una

única familia: Camelidae conformada por dromedarios (*Camelus dromedarius*) y camellos (*Camelus bactrianus*), llamas (*Lama glama*), guanacos (*Lama guanicoe*), vicuñas (*Vicugna vicugna*) y alpacas (*Vicugna pacos*). El suero de los camélidos posee IgG clásicas o convencionales y anticuerpos de cadena pesada (hcAbs) [313]. El porcentaje de hcAbs respecto a anticuerpos clásicos es variable aunque parece mucho más alto en camellos (50-80%) que en camélidos sudamericanos como llamas y alpacas (10-25%) [313, 314]. En cuanto a la clasificación en subtipos de IgG existen controversias entorno al número exacto, sin embargo se sabe que existe un número similar que en otros artiodáctilos (3 isotipos de IgG en vacas y 6 isotipos de IgG en cerdos) aunque sus funciones no están plenamente diferenciadas como ocurre en humanos y ratones [313].

Los hcAbs son anticuerpos de menor tamaño (90KDa) con respecto a los clásicos (150KDa) dado que carecen de cadenas livianas y dominio constante CH1. Además de las IgG1 clásicas, existen dos fracciones IgG2 e IgG3 donde las IgG2 se caracterizan por la presencia de una región bisagra mucho más larga conformada por repeticiones de Pro-Gln que le otorgan rigidez y que podría redundar en una distancia entre paratopes similar a la observada en IgG1 clásicas, sin comprometer la función de crosslinking antigénico [307]. Los dominios CH2 y CH3 conforman un dominio homólogo a la región Fc de los anticuerpos convencionales y como consecuencia de la ausencia de cadenas livianas, el paratope está conformado únicamente por el dominio variable identificado como V_HH (por “Heavy Chain Variable Domain of hcAbs”) o simplemente VHH (Figura 20.A).

Los dominios variables de hcAbs comparten un 80% de homología de secuencia con los anticuerpos clásicos [315]. Ambos poseen tres dominios hipervariables CDR1, 2 y 3 flanqueados por regiones framework FR1, 2, 3 y 4 y están organizadas en dos hojas beta formadas por 4 y 5 hebras beta (A, B, C, C', C'', D, E, F y G), estabilizadas por tres *loops* (uno de ellos hipervariable) y un puente disulfuro conservado entre las Cys23 y Cys104 (numeración IMGT). Los *loops* hipervariables conectan las hebras B-C, C'-C'' y F-G (Figura 20.B) [313].

En los anticuerpos convencionales, la interfaz VH-VL posee un área aproximada de 1700-1900 Å² con torsiones de las hebras beta que exponen residuos hidrofóbicos hacia el interior de la misma [316]. En los VHH, existen sustituciones de ciertos residuos hidrofóbicos en la región conservada FR2, por residuos de menor tamaño e hidrofobicidad, coincidiendo con lo que correspondería a la interfaz con el dominio VL de anticuerpos clásicos: V42F, G49E, L50R y W52G (Figura 20.B y C) [313, 317-320]. Estas sustituciones favorecen la solubilidad de los dominios VHH en comparación con los VH en ausencia de dominio VL de cadena liviana. De hecho se ha visto que la “camelización” de dominios VH de anticuerpos clásicos de humanos mediante la introducción de tres de estas sustituciones, reduce significativamente la tendencia a formar agregados [321].

El paratope de los hcAbs está formado por tres CDRs (en lugar de seis) generando superficies de unión de menor tamaño. En dromedarios se han detectado CDR 3 de mayor longitud, generando una superficie de unión de mayor tamaño que podría ayudar a superar esta limitación [322]. Estos CDR largos son por naturaleza flexibles y en consecuencia la unión al antígeno es energéticamente desfavorable. En este sentido la presencia de cisteínas en los CDRs permite establecer puentes disulfuro *inter-loops*, otorgándoles rigidez, estabilizando los VHH y favoreciendo la energética de unión con el antígeno mediante reducción de la pérdida de entropía asociada a la unión al antígeno [323]. En llamas la presencia de estos puentes disulfuro *inter-loop* es menos frecuente (usualmente entre los CDR2 y 3) coincidiendo con la existencia de CDR3 de menor longitud en comparación con otros camélidos [313, 317, 320], mientras que en dromedarios los puentes disulfuro *inter-loops* ocurren entre CDR1 y CDR3 (y en menor frecuencia entre FR2 y CDR3) [313, 324] como se muestra en la Figura 20.B. Estas cisteínas no canónicas en el CDR1 suelen ubicarse en las posiciones 31, 33 y 34 (numeración IMGT), en el FR2 se ubican en la posición 50 y en el CDR2 en la posición 55 permitiendo agrupar los hcAbs en diferentes subfamilias; por su parte la ubicación de las cisteínas no canónicas en el CDR3 suele ser mucho más flexible [325]. Estos puentes disulfuro no canónicos tienen como objetivo estabilizar aún más los VHH y otorgar restricciones conformacionales a los CDRs para generar nuevos paratopes expandiendo el repertorio [323, 326]. El CDR3 además de jugar un rol fundamental

en el reconocimiento antigénico, a menudo se ubica sobre la superficie equivalente a la interfaz con la cadena VL de Ig clásicas, cubriendo parches hidrofóbicos que de otra manera quedarían expuestos al solvente comprometiendo la solubilidad de los VHH [327].

5.3.2.3. ORGANIZACIÓN DE GENES DE ANTICUERPOS DE CADENA PESADA EN CAMÉLIDOS Y GENERACIÓN DE DIVERSIDAD

La cadena pesada de los anticuerpos clásicos de camélidos se genera a partir de re-arreglos génicos entre los segmentos V, D y J con los genes constantes IGHM, IGHD, IGHG, IGHE e IGHA ubicados en el mismo locus para dar anticuerpos con diferentes afinidades y diferentes isotipos. En camélidos los segmentos génicos que dan lugar a hcAbs y anticuerpos convencionales se encuentran mezclados en el mismo locus H (en alpacas dicho locus se encuentra en el cromosoma 4, no obstante la localización de dicho locus no se conoce para otros miembros de dicha familia) dando lugar a diferentes tipos de anticuerpos [328, 329].

En camélidos, los genes de Ig clásicas y hcAbs poseen organizaciones idénticas con intrones, exones, regiones S para cambio de clase y sitios de poliadenilación alternativos para producir Ig secretadas y unidas a membrana. De hecho, ambos poseen secuencias para regiones constantes CH1, sin embargo, en hcAbs este dominio es eliminado por splicing gracias a la presencia de mutaciones en el extremo 5' del intrón entre CH1 y la región bisagra (*hinge*). La ontogénesis de los hcAbs y en particular los mecanismos que llevan al cambio de clase de hcAbs para pasar de IgM a IgG2 o IgG3 permanecen elusivos hasta el momento. [313, 330] (Figura 20.C).

El locus H de camélidos está conformado por una **región V**, donde se encuentran mezclados los *clusters* de genes IGHV e IGHVH codificantes de las regiones variables de anticuerpos clásicos y hcAbs, respectivamente; una región con **segmentos D y J** común a ambos tipos de anticuerpos; y una **región C** incluyendo genes codificantes de las regiones constantes de ambos tipos de anticuerpos mezclados [331].

La cantidad de genes IGHV e IGHVH es variable entre especies de camélidos (71 y 17 en alpacas [328], 50 y 42 en dromedarios respectivamente [332]) y por tal motivo en la Figura 20.C se señalan con un subíndice n. Los genes IGHVH tienen como características distintivas las sustituciones V42F, G49E, L50R y W52G en la región FR2 y a la presencia de puentes disulfuros inter-loops (sección 5.3.2.2), aunque existen también elementos a nivel de secuencia que podrían favorecer eventos de hipermutación somática y recombinación génica para dar lugar a un repertorio más extendido [326, 331].

Los dominios VH y VHH se originan por re-arreglos de genes exclusivos de cada uno (IGHV e IGHVH) con *clusters* de genes D y J comunes a ambos [325]. La unión V-D-J en anticuerpos convencionales y hcAbs da origen al CDR3 y la razón para que haya diferencias tan marcadas en el largo de este *loop* entre ambos tipos de anticuerpos (teniendo en cuenta que los segmentos D y J que los originan son los mismos) no está clara, aunque probablemente se deba a una selección a nivel de receptor en la célula pre-B, dando lugar a un dominio correctamente plegado o una selección funcional donde aquellos linfocitos B expresando VHHs con un CDR más corto tienen un paratope de menor tamaño reduciéndose así la probabilidad de reconocer un antígeno y ser seleccionados para proliferar [313].

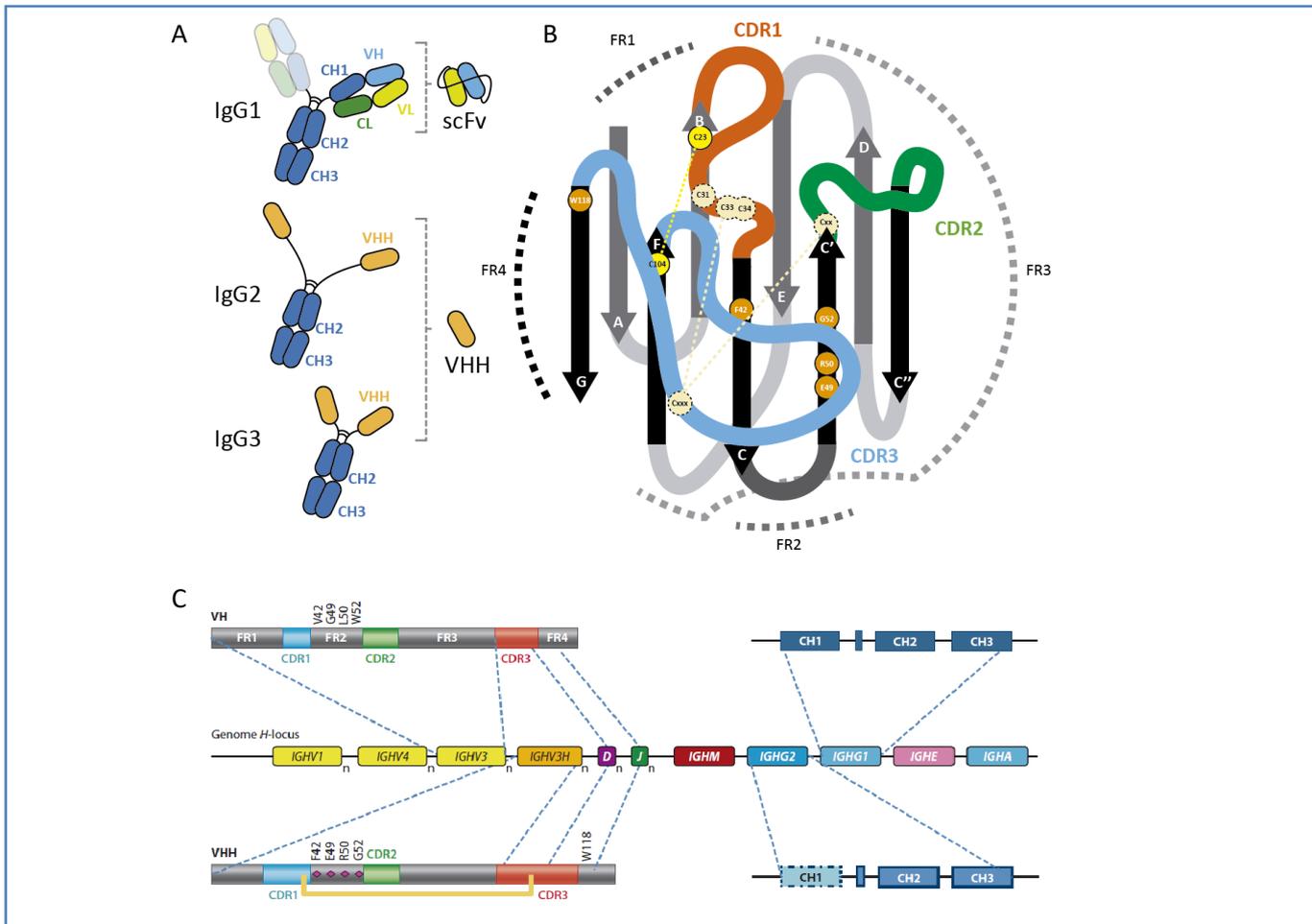


Figura 20: Anticuerpos de cadena pesada. A) IgG de camélidos. Se representa un anticuerpo clásico (IgG1) y dos variantes de hcAb con regiones bisagra de diferente longitud (IgG2 e IgG3). Se incluyen las formas mínimas de los dominios de reconocimiento antigénico (scFv y VHH) expresables en forma recombinante y se detallan los dominios de cada cadena. **B)** Estructura de un dominio VHH. Las hebras beta se denominan con letras mayúscula de color blanco y se representan como flechas de color negro y gris oscuro, dependiendo a qué hoja beta pertenezcan. Los *loops* se representan en gris claro a excepción de los CDR1, 2 y 3 representados en rojo, verde y celeste, respectivamente, y las regiones constantes “framework” se señalan con líneas discontinuas. Las cisteínas canónicas C23 y C104 se representan con círculos continuos de color amarillo intenso y el puente disulfuro canónico se representa como una línea discontinua del mismo color. Con círculos discontinuos de color amarillo pálido, se representan cisteínas no canónicas usualmente encontradas en camellos y dromedarios formando puentes disulfuro (línea discontinua del mismo color) entre el CDR1 (usualmente C31, C33 o C34) y el CDR3 (la ubicación de esta cisteína es mucho más variable y se representa como Cxxx). Por su parte en llamas, este puente disulfuro no canónico se forma entre la Cxxx del CDR3 y una cisteína ubicada al comienzo del CDR2 (señalada como Cxx). Con círculos de color naranja se representan aquellos residuos característicos de los VHH encontrados en camélidos que suelen sustituir residuos hidrofóbicos en el FR2 de los VH de anticuerpos clásicos. Los residuos F42 y G52 son usualmente cubiertos por el extenso CDR3 [313, 324]. **C)** Locus H del genoma de camélidos y sus productos. En la parte central se representa el locus H con los clusters de genes IGHV1, IGHV4 e IGHV3 de los anticuerpos clásicos (amarillo) e IGHV3H de hcAbs (naranja), seguido de los clusters de segmentos génicos D y J (violeta y verde oscuro, respectivamente) y los genes constantes IGHM (e IGHD, no mostrado), varios subtipos de IGHG, IGHE e IGHA. Durante la linfopoyesis de la célula B, los genes IGHV3 sufren re-arreglos (líneas discontinuas) con un elemento D y un elemento J para dar lugar a un dominio VH (parte superior) donde la variabilidad del CDR3 proviene de las uniones VDJ. Inicialmente estos rearreglos génicos son expresados junto a un gen IGHM y luego del cambio de clase junto a un IGHG1 para dar lugar a una cadena pesada (con dominios CH1, bisagra, CH2 y CH3 representados en azul oscuro) que formará parte de una IgG1 convencional (parte superior). En otras células B, los segmentos IGHV3H sufren re-arreglos con elementos D y J de igual manera, para dar lugar a dominios VHH (parte inferior) y eventualmente son co-expresados con los genes IGHG2 (o IGHG3, no mostrado) para dar lugar a hcAbs con regiones constante CH2 y CH3 (azul claro) ya que el dominio CH1 es eliminado por *splicing* del ARNm. Las regiones FR se representan en color gris y los CDR 1, 2 y 3 en azul verde y rojo para ambas proteínas. Los aminoácidos característicos de los dominios VH (clásicos) y VHH (hcAbs) se señalan con rombos violetas y se identifican con código de 1 letra acompañados de la posición (Extraído de [313]).

5.3.2.4. SIMPLEZA ESTRUCTURAL VS RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO.

Dado el éxito evolutivo de los anticuerpos clásicos (presentes en vertebrados a través de toda la escala zoológica), resulta curioso la tardía aparición de los anticuerpos de cadena pesada en camélidos y su establecimiento como mecanismo alternativo de defensa, teniendo en cuenta la ausencia de cadena liviana y la concomitante simpleza de los paratopes generados. La generación de sitios de unión más pequeños sin afectar la capacidad de reconocimiento antigénico representa un compromiso y en esta sección comentaremos algunos aspectos estructurales en relación con esto.

Sin dudas el éxito de una respuesta de anticuerpos radica en la generación de diversidad. Como se discutió previamente los principales mecanismos para lograrlo son: *a)* diversidad recombinatoria de segmentos génicos V_H-D-J_H y V_L-J_L; *b)* diversidad a nivel de las uniones de dichos segmentos por introducción de imprecisiones y adición/delección aleatoria de nucleótidos durante la recombinación; *c)* diversidad combinatoria por el apareamiento de dominios V_H y V_L para generar el paratope y *d)* diversidad a nivel de la arquitectura del paratope incrementada por variaciones en el ángulo entre los dominios V_H y V_L [333]. Queda claro que la ausencia de cadena liviana en los hcAbs afecta dichos mecanismos reduciendo *a priori* el repertorio de anticuerpos. Sin embargo, ciertas características estructurales de los VHH le otorgan a los hcAbs ventajas sobre los anticuerpos clásicos.

En primer lugar, hay que destacar que los hcAbs no constituyen una pérdida de variabilidad sino todo lo contrario ya que en camélidos coexisten ambos tipos de anticuerpos y por ende representan un mecanismo extra de generación de diversidad. De hecho, se ha demostrado en llamas que el tipo de antígeno determina en cierta medida el tipo de respuesta de anticuerpos (clásicos o hcAbs) [334].

A nivel de estructura, existen elementos que potencian la generación de diversidad. En los anticuerpos clásicos, algunos residuos de los CDRs participan de la interacción con la cadena liviana imponiendo restricciones a nivel de secuencia. En los hcAbs, la ausencia de cadena liviana elimina dicha restricción expandiendo el repertorio. La mayor longitud de los CDRs 1 y 3 en VHHs (además de compensar la ausencia de cadena liviana) representa otra alternativa para expandir el repertorio [333]. En humanos los CDR1 y 2 adoptan un número limitado de conformaciones mientras que en camélidos existe una mayor flexibilidad estructural a este nivel [335]. Además de las topografías clásicas: plana y hendidura, los VHH poseen *loops* (en particular el CDR3 de mayor longitud) que protruyen de la estructura, alcanzando epítomos ocultos que resultan inaccesibles a un paratope conformado por cadenas liviana y pesada [333, 336, 337]. Por último, la presencia de cisteínas no canónicas a lo largo de los CDRs y de la región FR2 permite estabilizar ciertas conformaciones de los CDRs generando así paratopes diferentes [323].

5.3.3. VHH RECOMBINANTES O NANOANTICUERPOS

Los dominios VHH pueden ser expresados en forma recombinante como entidades monoméricas solubles cuya capacidad de unión al antígeno se mantiene incambiada respecto al anticuerpo original. Los VHH recombinantes se conocen también como “nanoanticuerpos” o en inglés “*nanobodies*”. A pesar de que Nanobody® y Nanobodies® son marcas registradas por la compañía belga Ablynx (una compañía incubada en la *Vrije Universiteit Brussel* de Bélgica, donde fueron descubiertos los anticuerpos de cadena pesada en 1993 [307]), es común encontrar dicha denominación en bibliografía.

Los VHH presentan características biofísicas y bioquímicas que los hacen interesantes como entidades para reconocimiento de antígenos. Además poseen gran versatilidad para ser utilizados en diversas aplicaciones biotecnológicas en el campo de la investigación, el diagnóstico y la terapéutica [335, 338-340].

Son proteínas muy estables mostrando reversibilidad frente a diversos agentes químicos caotrópicos [341], presentando una termostabilidad superior a la de los anticuerpos con valores de T_M entre 60 - 80 °C e incluso

mostrando una capacidad de reconocimiento antigénico inalterada luego de periodos de incubación a 90°C [341, 342]. Los valores de T_M son similares a los obtenidos para fragmentos scFv, sin embargo los VHH presentan la capacidad de re-naturalizarse correctamente luego de bajar la temperatura [343, 344]. Al mismo tiempo toleran pH extremos [345] así como la acción proteolítica de diversas enzimas, motivo por el cual se los considera *a priori*, excelentes candidatos terapéuticos para ser administrados por vía oral [346]. Además son extremadamente solubles alcanzándose concentraciones superiores a 3mM sin signos de agregación [335]. En virtud de su pequeño tamaño son capaces de penetrar tejidos con mayor velocidad, haciéndolos apropiados para el tratamiento de tumores sólidos, a la vez que son capaces de reconocer antígenos inaccesibles para los anticuerpos clásicos (de mayor tamaño) [322, 337].

Por último, cabe destacar que se expresan en sistemas heterólogos con rendimientos muy altos, permitiendo bajar muchísimo los costos de producción. Además, su secuencia puede ser modificada para mejorar ciertos aspectos (estabilidad, afinidad, avidez, etc.) y para agregar dominios extra que permitan generar un efecto deseado. Sin dudas, aquí radica una de las fortalezas más importantes de los nanoanticuerpos desde el punto de vista biotecnológico. La Tabla 2 correlaciona las propiedades de los VHH con algunas aplicaciones haciendo énfasis en las ventajas y desventajas asociadas [347].

5.3.4. APLICACIONES DE NANOANTICUERPOS

Casi 30 años tuvieron que transcurrir desde el descubrimiento de los anticuerpos de cadena pesada, para la aprobación del primer nanoanticuerpo con fines terapéuticos. Este desarrollo resultó sorprendente lento en comparación con los mAbs (el primer mAb aprobado por la FDA con fines terapéuticos salió al mercado poco más de una década después del descubrimiento de la tecnología de hibridomas en 1975).

El diseño de multímeros monovalentes o multivalentes aumenta la avidez o permite unir antígenos diferentes, a la vez que aumenta su tamaño [335] evitando que sean fácilmente eliminados a nivel renal [335, 348]. Recientemente se aprobó **Caplacizumab**, siendo el primer y único fármaco basado en nanoanticuerpos aprobado en Estados Unidos y Europa. Este VHH posee formato bivalente monoespecífico contra vWF (factor de Von Willebrand) y es indicado contra la Púrpura Trombocitopénica Trombótica (TPP).

El carácter modular de los nanoanticuerpos permite abrir un extenso abanico de aplicaciones con fines terapéuticos. Muchas de las estrategias antitumorales basadas en nanoanticuerpos se han enfocado en su efecto antagónico contra proteínas sobre expresadas diferencialmente en células tumorales como factores de crecimiento y/o sus receptores [349-357], aunque también existen ejemplos con efecto agonista, reconociendo por ejemplo un receptor Fc de células NK, disparando una respuesta INF- γ y dirigida contra un blanco específico [358, 359].

La fusión de nanoanticuerpos con diversos motivos efectores ha demostrado ser de gran utilidad en terapia antitumoral, incluyendo enzimas [360], toxinas [361-363] y radioisótopos o incluso sistemas de distribución de carga como liposomas, micelas o nanopartículas cargadas con agentes citotóxicos [364-367].

Las aplicaciones terapéuticas de nanoanticuerpos para combatir enfermedades infecciosas incluyen virus, bacterias, hongos, parásitos e incluso toxinas producidas por agentes infecciosos. En el caso de terapias antivirales, diferentes etapas del ciclo viral son blanco de nanoanticuerpos, por ejemplo contra proteínas de superficie [368, 369], contra nucleoproteínas virales inhibiendo la translocación viral [328] o contra proteasas virales [370]. En el caso de HIV, nanoanticuerpos contra la proteína Rev de HIV bloquean el tráfico nuclear del ARNm viral [371, 372].

Tabla 2: Correlación entre las propiedades biofísicas de los Nbs y sus aplicaciones. Adaptado de [347] donde se encuentran referencias bibliográficas de cada caso.

PROPIEDAD	VENTAJA	DESVENTAJA	AREA DE APLICACIÓN
Dominio único	Aumento del tamaño funcional de las librerías como consecuencia de la falta de apareamiento erróneo de dominios		Producción oligoclonal de célula única
	Posibilidad de diseños multivalentes unidos por "linker" flexibles		Fácil producción de formatos bivalentes y trivalentes
	Producción en sistemas microbianos en condiciones de fermentación simples ofreciendo tiempos cortos de desarrollo	Fiabilidad de la producción	Producción a gran escala con una buena relación costo/beneficio
	Fácil manipulación genética para fusionar motivos, para aumentar la solubilidad o para reducir la agregación (inmunogenicidad reducida)	Incapacidad para inducir funciones efectoras en forma directa.	Selectividad tumor específica Imagenología in vivo selectiva
Pequeño tamaño		Unión a haptenos y péptidos requiere pasos múltiples	Selectividad tumor específica
	Rápida eliminación del torrente sanguíneo y penetración de tejidos	Tratamiento de enfermedades inflamatorias puede requerir tiempos de retención más largos	Imagenología in vivo selectiva
		Presenta problemas en aplicaciones parenterales	Neutralización de toxinas
Hidrofiliidad aumentada	Altos rendimientos de expresión		Fácil producción
	Alta solubilidad		Producción de "intrabodies"
	Estabilidad proteolítica		Inmunoterapia administrada por vía oral
Alta estabilidad de secuencia	Permite gran variedad de tratamientos, condiciones de almacenamiento y formulaciones		Modificación racional de secuencia
	Bajo potencial inmunogénico que permite tratamientos repetidos o con altas dosis	No demostrado	Modificación racional de secuencia
		Aplicaciones parenterales pueden requerir medidas de seguridad más exigentes	Fabricación optimizada de drogas
CDR3 largo	Re-plegamiento eficiente luego de desnaturalización química o térmica otorga una alta estabilidad termodinámica	No se excluye la posibilidad de formación de complejos no deseados <i>in situ</i> .	Modificación racional de secuencia Fabricación optimizada de drogas Inmunoterapia administrada por vía oral
	Reconocimiento de sitios antigénicos de difícil acceso e inhibición de enzimas.		Diagnóstico rápido de infecciones in vivo o in vitro Investigación de mecanismos bioquímicos
Variabilidad en el extremo N-terminal del CDR1	Transmigración de la barrera hematoencefálica	Imposibilidad de unirse a antígenos a través del extremo C-terminal.	Tratamiento de trastornos neurológicos

Otras aplicaciones terapéuticas de nanoanticuerpos tienen como objetivo el tratamiento de enfermedades de tipo inflamatorias como autoinmunes, la enfermedad inflamatoria intestinal, aterosclerosis y el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (donde TNF y su receptor representan uno de los blancos más interesantes) o enfermedades neurodegenerativas como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson y Huntington y la distrofia muscular oculofaríngea.

En el campo de la investigación, el diagnóstico médico y análisis ambiental, la lista de aplicaciones de nanoanticuerpos es casi infinita y existen numerosas revisiones en la literatura [338-340, 373, 374]. Sin lugar a duda la inmunodetección a través de la generación de mAbs con alta especificidad ha revolucionado el campo de la investigación científica, por lo que hacer una revisión del uso de nanoanticuerpos aplicados al campo de la investigación resulta redundante. En la Discusión General de este trabajo dedicaremos algunos párrafos a comentar las posibles aplicaciones de los VHHs seleccionados en este trabajo en el estudio del BLV.

La generación de nanoanticuerpos contra pequeñas moléculas es factible [375] expandiendo su uso a otros campos como la industria alimentaria [376]; monitoreo ambiental [377, 378]; bioseguridad contra agentes asociados al bioterrorismo [379, 380] y componentes de explosivos como TNT [381], entre otros.

5.3.5. PHAGE DISPLAY

La obtención de anticuerpos (de cualquier tipo) supone la utilización de la maquinaria de generación de diversidad por parte del individuo inmunizado, con el objetivo de generar una librería lo suficientemente variable para obtener clones capaces de reconocer el antígeno. La selección *in vivo*, de clones capaces de reconocer el antígeno ocurre gracias a un sistema de presentación donde aquellos linfocitos productores de anticuerpos específicos son seleccionados para proliferar y eventualmente perpetuarse como plasmocitos. Cuando dicha selección se hace *in vitro* para generar una librería de anticuerpos artificial con capacidad de reconocer un determinado antígeno, es necesario recurrir a técnicas de “display” o muestreo, capaces de mantener espacialmente unidos el anticuerpo y la secuencia que lo codifica, para su posterior amplificación. Existen diversas técnicas de display que utilizan organismos vivos para amplificar el material génico seleccionado como virus [382], bacterias [383], levaduras [384] o células eucariotas [385] e incluso sistemas completamente *in vitro* como *ribosome display* [386].

La técnica de muestreo en fagos o “*phage display*” fue presentada en 1985 por George Smith [382] como una técnica para expresar proteínas recombinantes en la superficie de fagos manteniendo su capacidad infectiva. El desarrollo de esta técnica a lo largo de su carrera, hizo a Smith merecedor del Premio Nobel en Química 2018 junto a Sir Gregory Winter y Frances Arnold [387]. En 1991 se describió su uso para seleccionar fragmentos Fab [388] y actualmente es una de las técnicas más utilizadas para seleccionar fragmentos de anticuerpos (Fab, scFv, Nb, etc.) [389].

La técnica de phage display ha sido extensivamente revisada ([390-392]) por lo que en este caso la describiremos en forma muy resumida, enfocándonos específicamente en la metodología utilizada en esta tesis (selección de VHH expresados en fagos M13). La generación de una librería de fagos consiste básicamente en clonar una librería de fragmentos de ADN codificante de las proteínas de interés en un plásmido junto a un fragmento de una proteína de superficie del fago (fagémido). Estos fagémidos son utilizados para transformar bacterias competentes que a su vez son infectadas con un fago “*helper*” (conteniendo la información génica para expresar el resto de las proteínas del fago) de modo tal que se produzcan fagos con las diferentes variantes de las proteínas de interés en su superficie. El antígeno (en el caso de selección de fragmentos de anticuerpo, la proteína utilizada durante la inmunización o un fragmento de esta) es inmovilizado en un soporte sólido e incubado con los fagos producidos para que se dé la interacción específica. Luego de un paso de lavado, los fagos específicos son eluidos y utilizados para infectar nuevamente bacterias competentes de modo de producir fagos específicos. Este proceso llamado “*panning*” se repite las veces que sea necesario con el objetivo de obtener fagos específicos (Figura 21.A).

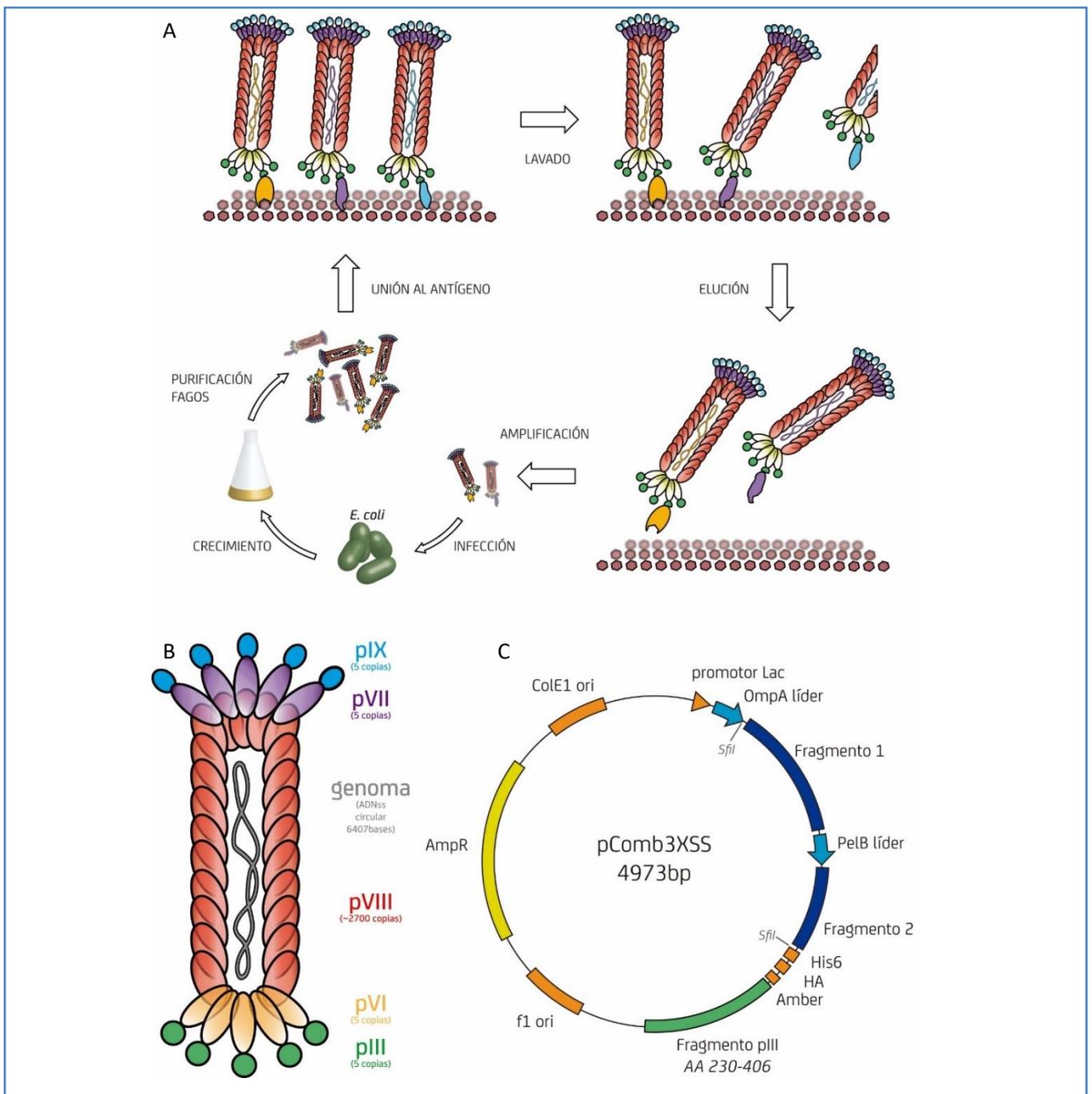


Figura 21: Phage Display. **A)** Esquema del proceso de selección y amplificado (panning) de una librería de fagos M13 expresando proteínas de interés fusionadas al dominio c-terminal de pIII. Una vez que la librería de genes de interés se clona entre los sitios *SfiI* del fagémido pComb3X y las bacterias ER2738 son co-infectadas con dicho fago y un fago "helper" (por ejemplo VCSM13), se seleccionan por unión al antígeno inmovilizado en un soporte sólido. Los fagos no específicos son removidos luego de un paso de lavado y los de interés son eluidos y amplificados mediante una etapa de re-infección y crecimiento bacteriano. Este proceso es iterado de 3 a 5 veces para finalmente obtener una librería de fagos específicos cuyo ADN puede ser sometido a diversos procesos como secuenciación, clonado, evolución in vitro, modificación, expresión recombinante, etc. **B)** Detalle del fago M13 con sus proteínas estructurales y su genoma de ADN circular simple hebra [393]. **C)** Esquema del vector fagémido pComb3XSS presentando un cassette de clonación entre los sitios *SfiI* con dos fragmentos 1 y 2 de relleno (*stuffer sequences*, SS) pensados para expresar en forma separada los dominios VH y VL de fragmentos Fab) precedidos por secuencias OmpA y PelB respectivamente, para dirigir el transporte de dichos fragmentos al periplasma bacteriano. El cassette de clonación posee otros sitios de corte no especificados y se encuentra bajo el control del promotor Lac. Al final posee dos tags de purificación de histidinas y hemaglutinina consecutivos (His6 y HA), un codón stop AMBER (UAG) suprimido en ciertas cepas de *E. coli* (como ER2738) y el extremo c-terminal de la proteína pIII del fago M13 (aminoácidos 230 a 406). El fagémido posee además un gen de resistencia a Ampicilina (AmpR) y dos orígenes de replicación bacteriano (ColE1 ori) y del fago (f1 ori). Adaptado de [394].

5.3.5.1. BACTERIÓFAGO M13

El bacteriófago más utilizado para este fin es el fago M13 [395], perteneciente a la familia de fagos filamentosos cuyo diámetro (en el caso del fago *wild type*) es de 6.5nm y su largo de 930nm. Posee un genoma de ADN circular simple hebra de 6407 bases, cubierto por una estructura capsular alargada conformada por de la proteína pVIII (~2700 copias). Dicha estructura filamentosa posee en uno de los extremos cinco copias de las proteínas pVII y pIX y en el otro, cinco copias de las proteínas pIII y pVI (Figura 21.B)[393]. Su genoma codifica 11 proteínas: las cinco proteínas estructurales previamente detalladas y otras seis proteínas implicadas en la replicación y maduración del fago (pII y pX implicadas en la replicación, pV con capacidad de unión al ssADN, y pI, pIV y pXI relacionadas al ensamblaje de la partícula). Durante el proceso infeccioso la proteína estructural pIII (unida al virión a través del extremo C-terminal) se une a la *pilus F* de *E. coli* mediante su extremo N-terminal (a través de 2 dominios N1 y N2). Esto favorece la retracción de este y la posterior interacción entre el dominio N1 y la proteína TolA de la membrana bacteriana. A continuación, se produce la transferencia del ADN viral y el desensamblaje de la cápside. El ssADN es convertido en ADN doble hebra por enzimas bacterianas y se inicia la síntesis de proteínas de M13 en el citoplasma de *E. coli* [393].

Las proteínas a seleccionar se expresan fusionadas a algunas de las proteínas de superficie del fago siendo las más utilizadas pVIII (para pequeños péptidos) y pIII (para proteínas de mayor tamaño como fragmentos de anticuerpos) [389, 393]. Para su expresión se pueden utilizar vectores fagos (secuencia del fago M13 natural) o vectores fagémidos (plásmidos con resistencia a algún antibiótico de selección, orígenes de replicación bacterianos y del fago, secuencia del gen del fago en el que se va a expresar la proteína de fusión y una señal de empaquetamiento). Si bien la proteína pIII es fundamental en el ciclo infeccioso del fago, al existir 5 copias es posible sustituir parte de su secuencia en alguna de estas, por proteínas (como fragmentos de anticuerpos funcionales) sin afectar la capacidad infecciosa del mismo. Uno de los fagémidos más utilizados (este trabajo no es la excepción) es pComb3X.

5.3.5.2. FAGÉMIDO

El fagémido pComb3X (Figura 21.C) fue diseñado originalmente para expresar fragmentos Fab por lo cual contiene entre el promotor Lac y el extremo C-terminal de pIII, un *cassette* de clonado con dos fragmentos de relleno 1 y 2 (*stuffer fragments*) que pueden ser sustituidos por los dominios VH y VL [388]. Dichos fragmentos están precedidos por secuencias OmpA y PelB respectivamente, para dirigir su transporte al periplasma bacteriano donde se ve favorecido el correcto plegamiento y la formación de puentes disulfuro de los fragmentos de anticuerpo. Dicho *cassette* de clonado está flanqueado por sitios de restricción de *SfiI*, de modo de poder sustituir dichos fragmentos por un gen de interés. El fagémido pComb3X posee una versión trunca de la proteína pIII (a la cual le falta el péptido señal y los primeros 211 residuos del extremo N-terminal) donde la proteína de interés es clonada en el mismo marco de lectura.

Dado que el fago para ser infeccioso y poder replicarse requiere algunas copias de la proteína pIII intacta y el resto de las proteínas virales, las bacterias (usualmente XL1-Blue) se coinfectan con un fagémido colaborador o “*helper*” derivado de M13 (por ejemplo VCSM13), con un origen de replicación defectivo, dando lugar a un 10% de fagos con 1 copia de la proteína a expresar y un 90% de fago nativos o vacíos [393, 394].

Cuando las bacterias son coinfectadas con el fagémido conteniendo la secuencia de la proteína a seleccionar y un fago “*helper*”, se producirán fagos infectivos con la proteína de interés fusionada al segmento C-terminal de la proteína pIII. Usualmente 3-5 ciclos de selección o “*panning*” son suficientes para obtener una librería de fagos específicos, utilizando este sistema. Como el fagémido pComb3X posee tags de purificación y un codón Amber stop entre la proteína de interés y el segmento C-terminal de pIII, es posible obtener la proteína en solución mediante

su expresión en una cepa bacteriana que no suprima dicho codón de terminación y así evaluar su éxito en el reconocimiento antigénico [394].

5.4. IDENTIFICACIÓN DEL PROBLEMA

A lo largo de la Introducción, destacamos la importancia del BLV como agente etiológico de la LBE (una enfermedad de bovinos con alta prevalencia en nuestro país siendo responsable de numerosas pérdidas en el sector agropecuario) y también como modelo animal de infecciones por retrovirus oncogénicos (debido a su alto emparentamiento con HTLV).

Además, analizamos el ciclo replicativo de BLV y otros retrovirus, identificando el establecimiento de contactos a nivel de la proteína CA como un elemento central del que dependen diversos procesos virales como retrotranscripción, desensamblado del core, importación del ADNc al núcleo, ensamblado, brotamiento, liberación y maduración.

De hecho, se conocen un conjunto de moléculas celulares (factores de restricción viral) que tienen la capacidad de interferir con el ciclo viral mediante interacciones con la cápside, conformando una primera etapa de respuesta celular antiviral.

Por lo antes dicho, inhibir el autoensamblado de Gag y/o CA, así como hiper-estabilizar el “core viral”, podría representar una estrategia eficaz para bloquear el ciclo viral de retrovirus. Hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no existen inhibidores del ensamblado de Gag/CA para BLV, por lo que decidimos generar “*binders*” de esta proteína como herramientas basadas en fragmentos de anticuerpos de cadena pesada derivados de llama (nanoanticuerpos), con el objetivo de interferir en el proceso de autoensamblado “*in vitro*” de CA_{BLV}.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL

Generación, purificación y caracterización de nanoanticuerpos con capacidad de reconocer en forma específica a la proteína de la cápside del virus de la leucosis bovina (CA_{BLV}), con la finalidad de interferir en el proceso de autoensamblado de la cápside viral.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Expresión y purificación de proteínas recombinantes derivadas de CA_{BLV} para ser utilizadas en la generación, selección y caracterización de nanoanticuerpos específicos.
2. Inmunización de una llama con la proteína recombinante CA_{BLV} purificada y obtención de una librería de fagos expresando nanoanticuerpos específicos.
3. Clasificación y selección de nanoanticuerpos contra CA_{BLV} teniendo en cuenta diferentes criterios (afinidad, dominio antigénico y variabilidad de secuencia) y producción recombinante de los mismos.
4. Caracterización biofísica de los nanoanticuerpos específicos seleccionados y de su interacción con la proteína CA_{BLV}.
5. Obtención de la estructura cristalográfica de los complejos de nanoanticuerpos con la proteína CA_{BLV}.

7. METODOLOGÍA

7.1. GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES PARA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.

7.1.1. GENERACIÓN DE CONSTRUCCIONES DE CABLV Y SUS DOMINIOS.

Todas las secuencias nucleotídicas de origen viral fueron obtenidas a partir de ADNc genómico de una línea celular ovina persistentemente infectada con VLB (FLK-BLV-044, *fetal lamb kidney cells*, DSMZ n°ACC153). Todas las construcciones de CA_{BLV} fueron generadas previamente en nuestro laboratorio [53, 89].

Dos construcciones de CA_{BLV} fueron diseñadas con el propósito de expresar la proteína: en forma nativa CAn sin etiquetas (“tags”) de purificación y con un tag de polihistidinas (*His-tag*) removible con trombina en el extremo N-terminal para dar lugar a H₆CA o *CA (donde * indica la presencia de residuos remanentes luego del corte proteolítico) tal como se presenta en la Figura 22.B-C. Por su parte las construcciones para expresar los dominios NTD_{BLV} y CTD_{BLV} fueron diseñadas con secuencias *His-tag* en las posiciones c-terminal y N-terminal respectivamente, con el propósito de preservar la conformación nativa de los mismos (Figura 22.D-E). El *His-tag* del dominio CTD es removible con trombina pudiendo dar lugar a las proteínas H₆CTD o *CTD.

7.1.1.1. DISEÑO DE PRIMERS Y CLONADO DE LA PROTEÍNA DE CAPSIDE DE VLB (CAVLB) PARA SU EXPRESION EN FORMA NATIVA (CAn) Y CON TAG DE PURIFICACIÓN (H6CA).

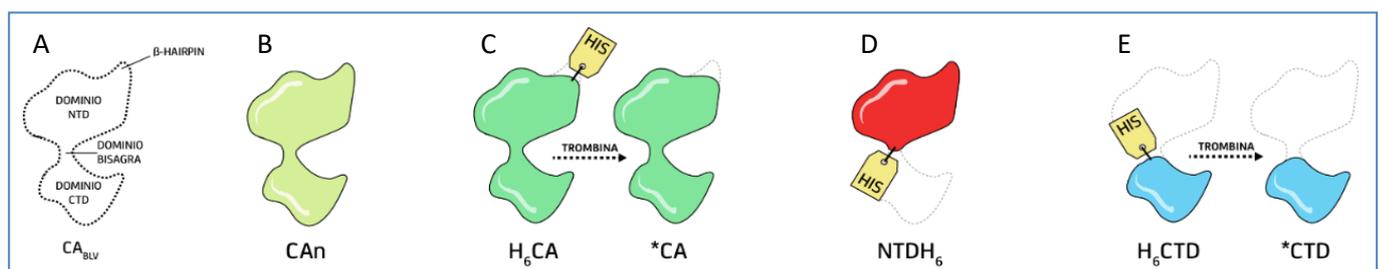


Figura 22. Diseño de construcciones de antígenos de BLV expresados y purificados. **A)** Esquema de CA donde se resaltan algunas características estructurales básicas. **B)** CA purificada en forma nativa (CAn) sin tags de purificación. **C)** CA expresada con un His-tag (H₆CA) en el extremo N-terminal, removible por trombina para dar lugar a *CA. **D)** Dominio N-terminal (NTD) expresado con un His-tag en el extremo c-terminal. **E)** Dominio C-terminal (CTD) expresado con un His-tag en el extremo N-terminal (H₆CTD), removible con trombina para dar lugar a *CTD.

La secuencia de CA_{BLV} de FLK-VLB (GenBank: EF600696.1:956-1600) fue amplificada y clonada por el método libre de enzimas de restricción (“RF-cloning” por “restriction free cloning”) [396] en el plásmido pET22b(+) para su expresión en forma nativa (CAn); y utilizando el método de clonado clásico con enzimas de restricción y ligación [397], entre los sitios *NheI* y *BamHI* del plásmido pET28a(+) para su expresión con un tag removible con trombina

en el extremo N-terminal (H_6CA). Para el clonado de dichas construcciones se diseñaron los siguientes *primers* (las secuencias de los sitios de corte de las enzimas de restricción se representan en subrayado):

- **CA_F** (5'-GTTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGCCAATCATATCTGAAGGGAATCGC-3')
- **CA_R** (5'-GCTTTGTTAGCAGCCGGATCTCAGAGAACTGCAGGCTGTTTCACCTTG-3')
- **p24-NheI_FOR** (5'-TGGCTAGCTTGCCAATCATATCTGAAGGG-3')
- **p24-BamHI_REV** (5'-CCGGATCCTTAGAGAACTGCAGGCTGTTTCAC-3')

Los *primers* fueron diseñados con el objetivo de amplificar la secuencia nativa completa y clonarla en marco con el promotor T7 de los respectivos vectores de expresión (**Figura 23.A y B**).

En el caso de la construcción CAn la metionina inicial es removida espontáneamente de modo que la construcción presenta la prolina inicial responsable de la formación del β -hairpin en el extremo N-terminal [53, 89]. Además, se incluyó un codón STOP inmediatamente después de la secuencia de la cápside en el *primer* CA_R (evitando así la expresión de la secuencia *His-tag* en el extremo C-terminal, presente en el plásmido parental). Por su parte en el caso de H_6CA se utilizó el codón STOP presente en el plásmido.

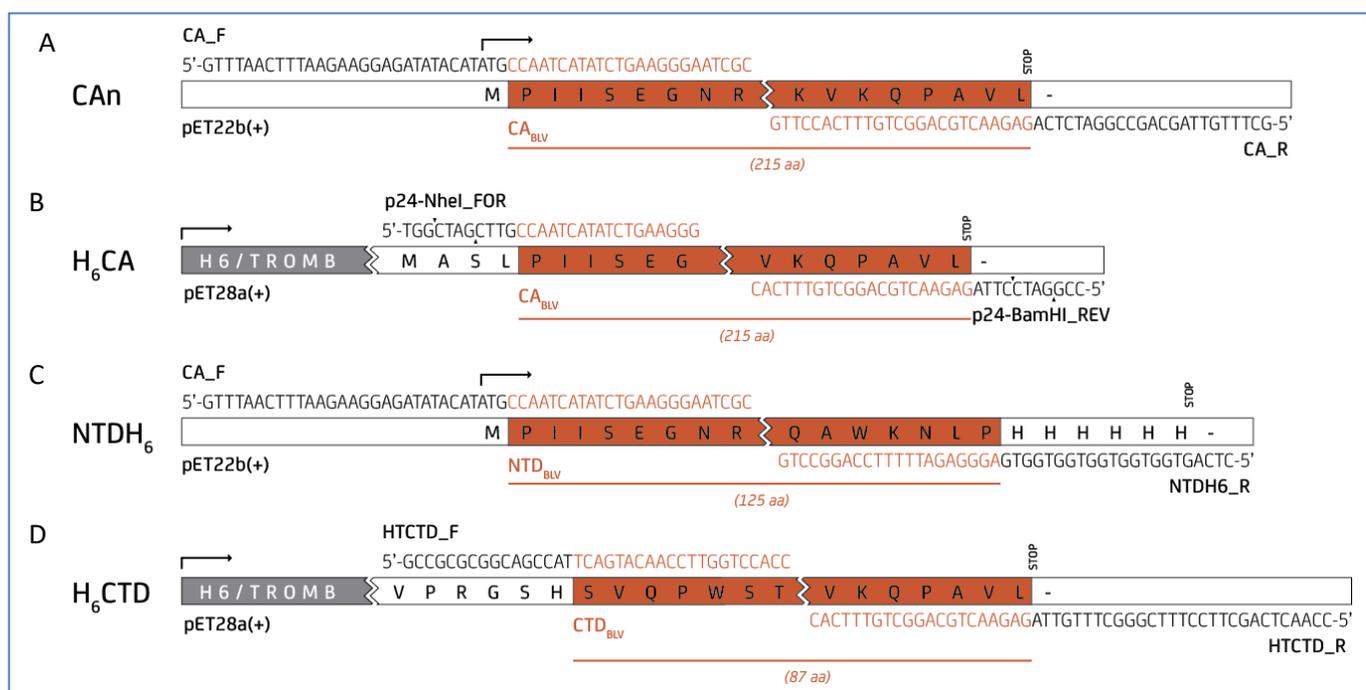


Figura 23: Diseño de primers para el clonado de las distintas construcciones de proteínas virales de VLB: Todas las construcciones fueron clonadas por RF-cloning, con excepción de H_6CA donde la secuencia de CA fue amplificada e insertada en los sitios de restricción de las enzimas *NheI* y *BamHI* (representados con flechas verticales sobre las secuencias nucleotídicas). Las secuencias virales se representan en fondo anaranjado y las del plásmido parental en blanco (con excepción de los tags de histidina y los sitios de corte por trombina, representados en fondo gris). Los sitios de inicio y final de la traducción se representan con flechas rectas y señales de STOP de color negro, respectivamente; la secuencia aminoacídica de origen viral se representa en forma incompleta (solo los extremos), por tal motivo se presenta la cantidad de aminoácidos en texto anaranjado, debajo de cada construcción.

7.1.1.2. DISEÑO DE PRIMERS Y CLONADO DE NTD DE BLV PARA EXPRESION CON TAG DE PURIFICACIÓN (NTDH6).

La secuencia del dominio N-terminal (NTD_{BLV}) de la proteína de cápside de FLK-VLB (GenBank: EF600696.1:956-1330) fue clonada por RF-cloning en el plásmido pET22a(+). Los *primers* fueron diseñados con el objetivo de

presentan una secuencia 5' común, con pequeñas variaciones en la secuencia hacia 3' del sitio de corte de *Sfil*, codificando la metionina inicial y los primeros residuos de la región FR1 de VHHs de llama (extremo N-terminal). Por su parte, la secuencia 3' del "primer" JH presenta complementariedad con la secuencia reversa del segmento génico J (codificante de la región FR4 de los VHH de llama en el extremo C-terminal) (Figura 24.A).

Las secuencias de los *primers* utilizados se describen a continuación, (las secuencias de los sitios de corte por *Sfil* se representan en subrayado, la letra R representa la posición de una purina y en negrita y color rojo se representan aquellos nucleótidos distintivos):

- **VH1** (5'-CATGCCATGACTCGCGGCCAGGCCGATGGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGG-3')
- **VH3** (5'-CATGCCATGACTCGCGGCCAGGCCGATGGCCGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGG-3')
- **VH4** (5'-CATGCCATGACTCGCGGCCAGGCCGATGGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGG-3')
- **JH** (5'-CCACGATTCTGGCCGGCCTGGCCTGAGGAGACRGTGACCTGGGTCC-3')

Estos *primers* permiten amplificar por PCR los genes VHH y clonarlos en el fagémido pComb3x mediante digestión con *Sfil* y ligación, dando lugar a una librería de fagos M13 con capacidad para expresar VHHs funcionales fusionados a la porción C-terminal de la proteína PIII (Figura 21.B-C y Figura 24.B) cuando coinfectan bacterias supresoras del codón Amber STOP, con un fago *helper*.

7.1.2.2. DISEÑO Y CLONADO DE CONSTRUCCIÓN PARA EXPRESION DE NANOANTICUERPOS BIOTINILABLES CON HIS-TAG.

Una vez seleccionados los clones capaces de reconocer CA (por phage display), se extrajo el ADN de los fagos y se digirió con *Sfil* para ser clonados en forma masiva en el vector de expresión pINQ-BtH6 desarrollado por Rossotti *et al.* [399]. Dicho vector es una modificación del pET28a(+) conteniendo bajo la acción del promotor T7 las secuencias de: un péptido líder OmpA para secreción periplásmica de los VHHs (cuyos últimos nucleótidos contienen la secuencia de corte por *Sfil*), un sitio de biotilación *in vivo* (BAP por *biotin acceptor peptide*) y un *His-tag* en el extremo C-terminal, para su purificación (Figura 24.C).

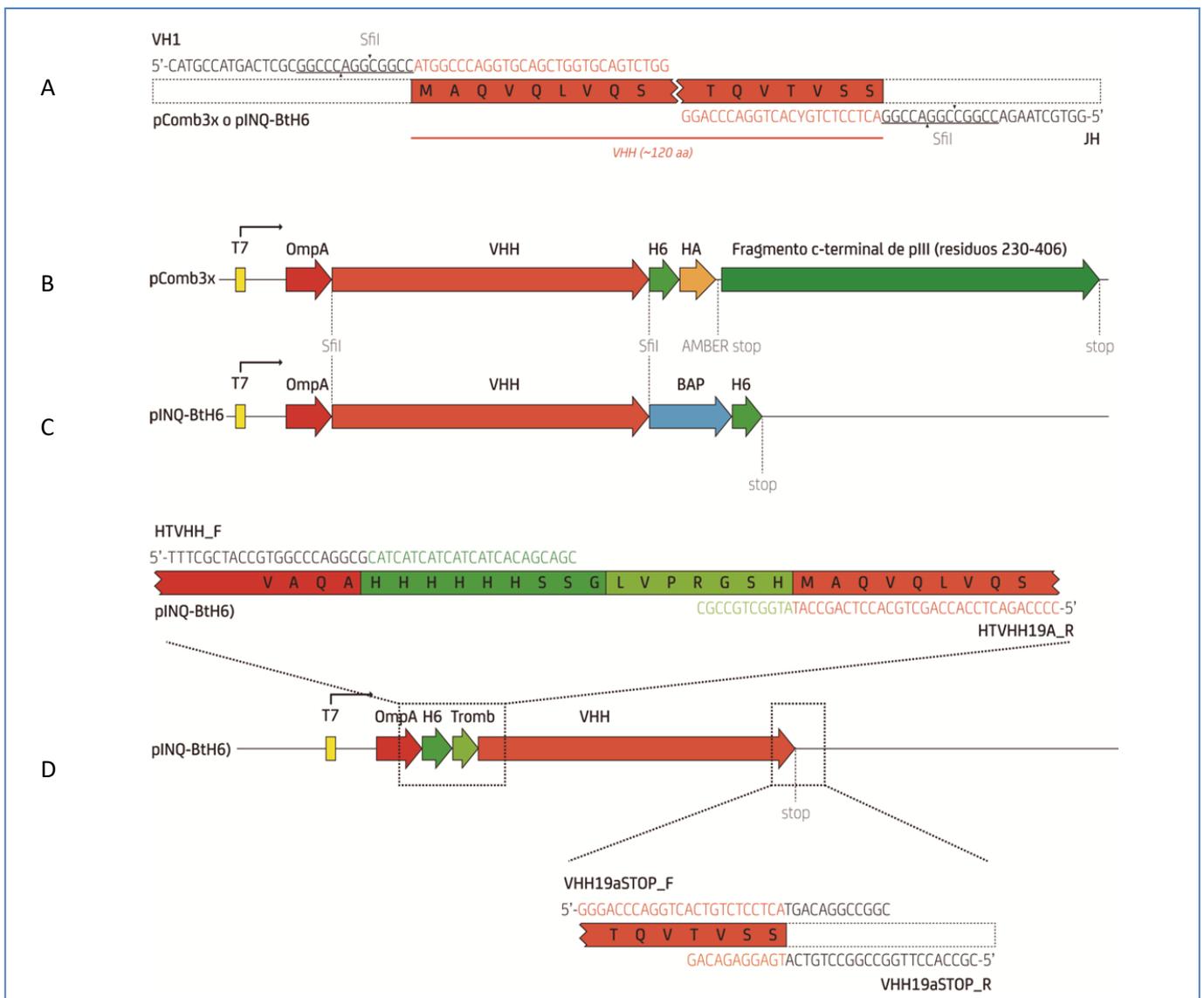


Figura 24: Diseño de primers para la amplificación de genes VHH y su clonado en vectores fagémidos y de expresión. A) Se esquematizan los primers VH1 y JH para amplificar genes VHH con los sitios de corte de *SfiI* (subrayados y representados con flechas verticales sobre las secuencias nucleotídicas) y su disposición sobre un vector (pComb3x o pINQ-BtH6) para el clonado de dichas construcciones (con letras de color anaranjado se representa la secuencia de los primers que codifica secuencias aminoacídicas de VHH las cuales se representan con código de 1 letra sobre fondo de color anaranjado). Para simplificar, solo se incluye la secuencia del primer VH1 y la secuencia aminoacídica codificada por este. **B)** Esquema de la construcción resultante del clonado de una secuencia VHH entre los sitios *SfiI* del fagémido pComb3x. **C)** Esquema de la construcción resultante del clonado de una secuencia VHH entre los sitios *SfiI* del vector de expresión bacteriano pINQ-BtH6 derivado del pET28a(+). **D)** En el centro se presenta el esquema de la construcción diseñada para expresar VHHs sin sitio de biotilación ni His-tag. Para ello se incluyó un His-tag removible con trombina entre OmpA y el VHH y se dispuso un codón stop justo después del mismo. En la parte superior e inferior se presentan las secuencias de primers utilizados para esto, con los mismos códigos de colores utilizados más arriba. Para simplificar solo se incluye la secuencia de los primers para el VHH19a.

7.1.2.3. DISEÑO Y CLONADO DE CONSTRUCCIÓN PARA EXPRESION DE NANOANTICUERPOS SIN SITIO DE BIOTINILCIÓN Y CON HIS-TAG REMOVIBLE.

Dos clones fueron producidos a mayor escala con el objetivo de realizar un análisis biofísico y estructural más exhaustivo. En estos casos se modificó la secuencia de las construcciones originales posicionando el His-tag removible por trombina en el extremo N-terminal de los nanoanticuerpos (entre la secuencia OmpA y el VHH) y eliminando el sitio de biotilación BAP seguido de un His-tag c-terminal mediante la incorporación de un codón

stop inmediatamente después de la secuencia del VHH (Figura 24.D). Esto se llevó a cabo mediante dos etapas consecutivas de clonado por *RF-cloning*.

En primer lugar, se clonó la secuencia *His-tag* seguida del sitio de corte por trombina (amplificada a partir de la construcción H₆CA clonada en pET28a(+)) entre la secuencia OmpA y el VHH. Para ello se diseñó un *primer forward* común a ambas construcciones (HTVHH_F) y un *primer reverse* complementario a la secuencia N-terminal de cada nanoanticuerpo (HTVHH8c_R para el VHH8c y HTVHH19a_R para el VHH19a,) tal como se presenta a continuación con las diferencias resaltadas en rojo:

- HTVHH_F (5'-TTTCGCTACCGTGGCCCAGGCGCATCATCATCACAGCAGC-3')
- HTVHH8c_R (5'-CCCCAGACTCCACCAGCTGCACCTCAGCCATATGGCTGCCGC-3')
- HTVHH19a_R (5'-CCCAGACTGCACCAGCTGCACCTGGCCATATGGCTGCCGC-3')

En segundo lugar, se introdujo un codón STOP justo después del final de cada VHH utilizando los siguientes juegos de *primers* para los VHH8c y VHH19a (el codón STOP se muestra subrayado):

- VHH8cSTOP_F (5'-GGGACCCAGGTCACCGTCTCCTCATGACAGGCCGGC-3')
- VHH19aSTOP_F (5'-GGGACCCAGGTCACGTCTCCTCATGACAGGCCGGC-3')
- VHH8cSTOP_R (5'-CGCCACCTTGCCGGCCTGTCATGAGGAGACGG-3')
- VHH19aSTOP_R (5'-CGCCACCTTGCCGGCCTGTCATGAGGAGACAG-3')

7.2. EXPRESION DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Esta sección describe las metodologías llevadas a cabo para expresar en forma recombinante las distintas construcciones generadas en la sección anterior, ya sean proteínas de BLV o nanoanticuerpos.

7.2.1. EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES DE BLV

Todas las proteínas de BLV, independientemente de la estrategia de purificación utilizada, fueron expresadas siguiendo un protocolo de expresión genérico tal como se describe a continuación.

7.2.1.1. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA CON VECTORES DE EXPRESIÓN.

Todas las proteínas de BLV fueron expresadas en el citosol de la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Promega). Para tal fin, bacterias quimiocompetentes fueron transformadas por choque térmico (según recomendaciones del proveedor) y se incubaron por 16 horas a 37°C en placas de LB agar suplementado con antibióticos de selección (kanamicina 50 µg/mL para H₆CA y H₆CTD y ampicilina 100 µg/mL para CAN y NTDH₆).

7.2.1.2. EXPRESIÓN A MEDIANA ESCALA (1 litro).

La expresión se llevó a cabo en medio 2YT (Tryptona 1.6%; Extracto de Levaduras 1%; NaCl 0.5%) adicionado con antibiótico de selección. Para ello el medio fue inoculado con una dilución 1:200 de un pre-cultivo sobrecrecido, preparado a partir de la transformación correspondiente (sección 7.2.1.1) e incubado a 37°C con 220 r.p.m. de agitación. Una vez que se alcanzó una densidad óptica (D.O) de 0.7, se indujo la expresión con 1mM Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) y se incubó a 30°C durante 5 horas.

7.2.2. EXPRESIÓN DE NANOANTICUERPOS

7.2.2.1. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA EN VECTORES DE EXPRESIÓN

Los nanoanticuerpos fueron expresados en el periplasma de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen) transformada con el plásmido pCY216 portando el gen BirA (biotina ligasa) [400]. Para tal fin, las bacterias electrocompetentes se transformaron por electroporación (de acuerdo con las recomendaciones del proveedor) y se crecieron 16 horas a 37°C en medio selectivo (LB agar + kanamicina 50 µg/mL + cloranfenicol 35 µg/mL). Este protocolo se aplicó tanto a las construcciones de VHHs clonados en el vector pINQ-BtH6 tal como se describe en el apartado 7.1.2.2 como con las construcciones diseñadas para producir VHHs sin sitio de biotilación ni *His-tag*.

7.2.2.2. EXPRESIÓN A BAJA ESCALA

La expresión a baja escala se llevó a cabo en bacterias *E. coli* ER2738 transformadas con el plásmido pComb3x conteniendo la biblioteca de VHHs específicos contra CA_{BLV}, obtenidas tal como se describe más adelante en el apartado 7.4.3.5. Para ello se prepararon placas de cultivo de 96 pocillos de fondo cónico (Greiner) con mini cultivos de 1mL de **medio líquido SB** (Tryptona 3%, Extracto de Levadura 2%, MOPS 1%) adicionado con ampicilina 100 µg/mL. Cada cultivo fue inoculado con una colonia única proveniente de las placas de LB agar + ampicilina utilizadas para cuantificar la librería luego de cada ronda de panning. El cultivo fue incubado a 37°C con agitación, hasta alcanzar un valor D.O.=1.0, y posteriormente inducido con IPTG 1mM durante 16 horas a 37°C con agitación.

7.2.2.3. EXPRESIÓN DE VHHs BIOTINILADOS A PEQUEÑA Y MEDIANA ESCALA.

Cuando fue necesario expresar los 96 VHHs ya sea en forma biotilada o sin biotilar, se utilizó un formato de expresión en placas *multi well* similar al del apartado anterior, pero adaptando el siguiente protocolo descrito a continuación. En el caso de no necesitar biotilar los nanoanticuerpos, simplemente se eliminó la inducción con arabinosa y la complementación con D-biotina.

La expresión de nanoanticuerpos biotilados *in vivo* a mediana escala tuvo lugar a partir de bacterias *E. coli* BL21 (DE3) conteniendo el vector pCY216 [400] y el vector pINQ-BtH6 [399] con la secuencia de un VHH anti CA_{BLV}.

Un precultivo de 10mL de medio autoclavado LB (Tryptona 1.0%; Extracto de Levaduras 0.5%; NaCl 0.5%) suplementado con antibióticos de selección (kanamicina 50 µg/mL y cloranfenicol 35 µg/mL) se inoculó con una única colonia obtenida luego de la transformación (7.2.2.1) y se creció a 37°C con 220 r.p.m. de agitación durante 16 horas. Luego de este período, 1L de 2YT adicionado con 0.04% L-(+) arabinosa y 100 µM d-biotina, fue inoculado con 5 mL (1:200) del precultivo crecido. El cultivo fue incubado a 37°C con 220 r.p.m. de agitación durante 2-3 horas hasta alcanzar una DO₆₀₀=0.7. Luego de este período, se indujo con 0.1 mM IPTG durante 16 horas a 30°C con 220 r.p.m. de agitación.

7.2.2.4. EXPRESIÓN A GRAN ESCALA (1L)

Un litro de **Medio Mínimo M9** autoclavado (0.678 % Na₂HPO₄; 0.30 % KH₂PO₄; 0.10 % NH₄Cl; 0.05 % NaCl) adicionado con kanamicina 50 µg/mL y 20mL de **Complemento 50x** fresco y esterilizado por filtración (50 mM MgCl₂; 5 mM CaCl₂; 0.25 mg/mL tiamina-HCl; 10 % glucosa; 20 % hidrolizado de caseína), fue inoculado con una dilución 1:40 de un precultivo sobrecrecido de bacterias transformadas de acuerdo a (7.2.2.1). El cultivo fue incubado a 25°C con 180 r.p.m. de agitación durante 30 horas. Luego de este período, se complementó con 100mL de **Medio de Inducción 10x** autoclavado (12%w/v triptona, 24%w/v extracto de levaduras, 4%v/v glicerol), se indujo con 0.1mM IPTG y se incubó 60 horas a 25°C con 130 r.p.m. de agitación.

7.3. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

7.3.1. PURIFICACIÓN DE CA NATIVA

Ante la ausencia de un tag de purificación, la proteína CA nativa (CAN) es purificada por una serie de pasos cromatográficos consecutivos descritos a continuación (de acuerdo a [88, 89]).

7.3.1.1. EXTRACCIÓN CITOSÓLICA

Luego de la expresión en *E. coli* (sección 7.2.1.2), el cultivo bacteriano se centrifugó a 6.000g por 15 minutos a 4°C y el pellet obtenido se resuspendió en **Buffer DEAE** frío (50mM Tris-HCl, pH 6.0) a una relación de 4mL de buffer por gramo de pellet. La suspensión se incubó a 25°C durante 30 minutos, en presencia de inhibidor de proteasas (Complete EDTA Free, ROCHE) según recomendaciones del fabricante y 30 U de Desoxiribonucleasa (D4527, Sigma) por gramo de pellet bacteriano. El extracto bacteriano fue sonificado en hielo durante 5 minutos (ciclos de 5 s encendido y 40 s de pausa a 30% de amplitud con un sonicador digital BRANSON) y centrifugado a 16.000g durante 45 minutos a 4°C. El sobrenadante fue finalmente clarificado mediante filtración a través de 0.45µm.

7.3.1.2. INTERCAMBIO ANIÓNICO (IEX-DEAE)

El sobrenadante clarificado (sección 7.3.1.1) fue sometido a un intercambio aniónico usando matriz DEAE Sepharose Fast Flow (GE Healthcare Life Science) equilibrada en **buffer DEAE** (descrito en sección 7.3.1.1). Este paso tiene la finalidad de unir a la matriz gran parte de los contaminantes del extracto. La fracción no unida a la columna (*flow-through*) conteniendo CAN fue colectada y reservada para los pasos de purificación subsiguientes.

7.3.1.3. CAMBIO DE BUFFER Y CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR (SEC)

La fracción no unida a la IEX-DEAE, (sección 7.3.1.2) fue filtrada por 0.22µm e inyectada rápidamente en una columna HiLoad Superdex 75 PG 16-60 equilibrada en **buffer de almacenamiento de CA** (20mM HEPES pH 7.4; 50mM NaCl), utilizando un equipo FPLC ÄKTA Purifier (GE Healthcare Life Science).

7.3.1.4. ANÁLISIS, CONCENTRACIÓN Y CUANTIFICACIÓN

La pureza de las fracciones obtenidas fue analizada por SDS-PAGE 12% en buffer Tris-glicina y las proteínas purificadas fueron concentradas por ultrafiltración a 4°C utilizando tubos AMICON (Millipore) con MWCO=10. La cuantificación de proteínas se realizó por espectrofotometría en el rango UV-visible utilizando un espectrofotómetro Cary 50 Bio (Varian). Los valores de absorptividad correspondientes fueron obtenidos según su secuencia aminoacídica, a partir del sitio <http://web.expasy.org/protparam/> (Tabla 3).

Tabla 3. Número de aminoácidos y valores teóricos de peso molecular (PM), absorptividad molar (ϵ_{MOLAR}) y específica ($\epsilon_{\text{ESPECÍFICA}}$) para las proteínas de origen viral producidas en forma recombinantes: Los valores teóricos fueron obtenidos a partir de las secuencias aminoacídicas utilizando el sitio <http://web.expasy.org/protparam/>. En el caso de CAn se toma en cuenta la remoción del primer residuo de metionina (determinado previamente por MALDI-MS).

PROTEÍNA	Nº AMINOÁCIDOS	PM (g/mol)	ϵ_{MOLAR} ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	$\epsilon_{\text{ESPECÍFICA}}$ ($\text{mL mg}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
CAn	215	23583	39085	1.657
H ₆ CA	239	26149	39085	1.495
*CA	222	24267	39085	1.611
NTDH ₆	132	14809	24980	1.687
H ₆ CTD	107	11555	13980	1.210
*CTD	90	9673	14105	1.458

7.3.2. PURIFICACIÓN DE CABLV Y SUS DOMINIOS POR CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD.

La estrategia de purificación fue la misma para H₆CA, NTDH₆ y H₆CTD, con excepción de pequeñas diferencias relacionadas a la remoción del tag de purificación.

7.3.2.1. EXTRACCIÓN CITOSÓLICA

El cultivo bacteriano (sección 7.2.1.2) fue centrifugado a 6.000g y 4°C por 15 minutos y el pellet obtenido se resuspendió en **Buffer A de IMAC** frío (20 mM fosfato de sodio, pH 7.4; 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol) a una relación de 4mL de buffer por gramo de pellet y se reservó a -80°C hasta el momento de la extracción. Para la extracción, se descongeló la suspensión bacteriana y se adicionó inhibidor de proteasas (Complete EDTA Free, ROCHE) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, 30 U de Desoxiribonucleasa (D4527, Sigma) por gramo de pellet bacteriano y se incubó a 25°C durante 30 minutos. El extracto bacteriano fue sonificado en hielo durante 5 minutos (ciclos de 5 s encendido y 40 s de pausa a 30% de amplitud con un sonicador digital BRANSON). El extracto bacteriano fue centrifugado a 16.000g y 4°C durante 45 minutos, y el sobrenadante finalmente clarificado mediante filtrado a través de 0.45 μm .

7.3.2.2. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD POR IONES METALICOS INMOVILIZADOS (IMAC)

El sobrenadante clarificado (sección 7.3.2.17.3.1.1) fue inyectado en una columna His Trap HP de 1mL (GE Healthcare Life Science) equilibrada con **Buffer A de IMAC**. Una vez cargada la muestra, la columna se lavó con el mismo buffer a un flujo de 1mL/min, utilizando un equipo FPLC ÄKTA Purifier (GE Healthcare Life Science), hasta obtener una línea de base estable en la absorbancia a 280nm. A partir de este punto se eluyó la proteína con gradiente de imidazol (sección 7.3.2.2.1) o se procedió a remover el tag de purificación mediante “procesamiento proteolítico en columna” (sección 7.3.2.2.2).

7.3.2.2.1. ELUCIÓN CON GRADIENTE DE IMIDAZOL

En el caso de las proteínas con *His-tag* (H₆CA, NTDH₆ y H₆CTD), luego de la cromatografía de afinidad (sección 7.3.2.2) se eluyeron las proteínas con **Buffer B de IMAC** (20mM fosfato de sodio, pH 7.4; 500mM NaCl, 500mM Imidazol) aplicando un gradiente de concentración de Imidazol desde 20mM hasta 500mM en 15 minutos. Las proteínas eluidas fueron reservadas a 4°C hasta el siguiente paso cromatográfico. Esta metodología fue también utilizada para la purificación de nanoanticuerpos por cromatografía de afinidad según el apartado 7.3.3.2

7.3.2.2.2. REMOCIÓN DEL HIS-TAG EN COLUMNA

Para la remoción del tag de purificación (*CA y *CTD), 600 U de Trombina (T4648, SIGMA) fueron diluidas en PBS hasta un volumen de 1mL y dicho volumen inyectado en la columna de IMAC con la proteína de interés unida por afinidad (sección 7.3.2.2). La columna fue incubada 16-20 horas a 4°C, y la muestra clivada proteolíticamente se eluyó con **Buffer A de IMAC**. El eluato fue sometido a un segundo paso de IMAC para unir aquellas moléculas no clivadas y fragmentos de *His-tag* clivados, reservando la fracción no unida para el siguiente paso de purificación. Esta metodología fue también utilizada para la purificación de nanoanticuerpos por cromatografía de afinidad según el apartado 7.3.3.2.

7.3.2.3. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR (SEC)

Independientemente del protocolo de elución seguido durante la cromatografía de afinidad (elución con gradiente de imidazol según el apartado 7.3.2.2.1 o remoción del *His-tag* en columna según 7.3.2.2.2), la fracción purificada fue filtrada por 0.22 µm e inyectada en una columna Hi Load Superdex 75 PG 16-60 utilizando un equipo FPLC ÄKTA Purifier (GE Healthcare Life Science).

7.3.2.4. ANÁLISIS, CONCENTRACIÓN Y CUANTIFICACIÓN

La pureza de las fracciones obtenidas fue analizada por SDS-PAGE 12% y 15% en buffer Tris-glicina (para H₆CA y los dominios de cápside, respectivamente). Las proteínas purificadas fueron concentradas por ultrafiltración utilizando tubos AMICON (Millipore) con MWCO de 10 y 3 (para H₆CA y los dominios de cápside, respectivamente). Por su parte la cuantificación de proteínas se realizó por espectrofotometría en el rango UV-visible, utilizando un espectrofotómetro Cary 50 Bio (Varian) y el correspondiente valor de absortividad teórico (Tabla 3).

7.3.3. PURIFICACIÓN DE NANOANTICUERPOS

Los nanoanticuerpos expresados a baja escala (apartado 7.2.2.2) no fueron purificados a partir de espacio periplásmico; en su lugar se utilizó el sobrenadante del cultivo obtenido mediante centrifugación a 6.000g y filtrado por 0.45 µm. En los casos que fue necesario obtener una mayor cantidad de proteína, los VHH se extrajeron mediante lisis de las bacterias usando reactivo B-PER (GE Healthcare) y purificando por cromatografía de unión a metales en formato *high throughput* (como se describe al final de la sección 7.3.3.2). Por su parte los nanoanticuerpos expresados a mediana y gran escala (apartados 7.2.2.3 y 7.2.2.4) fueron sometidas a la misma metodología de purificación basada en [\[401\]](#) tal como se describe a continuación.

7.3.3.1. EXTRACCIÓN PERIPLÁSMICA

El cultivo bacteriano (sección 7.2.2.3) fue centrifugado a 6.000g por 15 minutos a 4°C y el pellet obtenido fue resuspendido en **Buffer de Lavado** frío (10 mM Tris-HCl, pH=8.0; 150 mM NaCl) y centrifugado a 13.000 g durante 10 minutos a 4°C. El pellet obtenido se resuspendió en 120 mL de **Buffer Sacarosa** a 25°C (10 mM Tris-HCl, pH=8.0; 25 % w/v sacarosa; 1 mM EDTA) y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, la suspensión fue centrifugada a 13.000 g durante 45 minutos a 4°C y el pellet sometido a un choque osmótico. Para ello se resuspendió el pellet en 120mL de **Buffer de Shock** frío (10mM Tris-HCl, pH=8.0; 0.5mM MgCl₂) y se incubó 10 minutos en hielo para finalmente ser centrifugado a 13.000g durante 25 minutos a 4°C, obteniéndose un sobrenadante conteniendo la fracción periplásmica de *E. coli* que se reservó a 4°C hasta el siguiente paso de purificación.

7.3.3.2. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD POR IONES METÁLICOS INMOVILIZADOS (IMAC)

Previo a la cromatografía de afinidad, la fracción periplásmica (sección 7.3.3.1) fue sometida a diálisis extensiva durante 72h con renovación diaria del buffer, utilizando una membrana con MWCO=3.5 (Snake Skin, Thermo) en **Buffer A de IMAC**. Posteriormente, la fracción periplásmica fue filtrada por 0.22µm e inyectada en una columna His Trap HP de 1mL (GE Healthcare Life Science) equilibrada con **Buffer A de IMAC**. Una vez cargada la muestra, la columna se lavó con el mismo buffer a un flujo de 1mL/min, utilizando un equipo FPLC ÄKTA Purifier (GE Healthcare Life Science) hasta obtener una absorbancia a 280nm estable. A partir de este punto la muestra fue tratada siguiendo la misma metodología aplicada a H₆CA y los dominios de CA: elución con gradiente de imidazol (sección 7.3.2.2.1) o “procesamiento proteolítico del *His-tag* en columna” (sección 7.3.2.2.2).

Excepcionalmente se realizó una purificación por IMAC en formato *high-throughput* utilizando una placa de 96 pocillos His MultiTrap HP (GE Healthcare) según recomendaciones del fabricante.

7.3.3.3. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR (SEC)

Independientemente del protocolo de elución seguido, la fracción purificada por cromatografía de afinidad fue filtrada por 0.22µm e inyectada en una columna HiLoad Superdex 75 PG 16-60 utilizando un equipo FPLC ÄKTA Purifier (GE Healthcare Life Science).

7.3.3.4. ANÁLISIS, CONCENTRACIÓN Y CUANTIFICACIÓN

La pureza de las fracciones obtenidas fue analizada por SDS-PAGE 15% en buffer Tris-glicina. Las proteínas purificadas fueron concentradas por ultrafiltración utilizando tubos AMICON, MWCO=3 (Millipore). La cuantificación de proteínas se realiza por espectrofotometría en el rango UV-visible utilizando un espectrofotómetro Cary 50 Bio (Varian) y el correspondiente valor de absorptividad teórico (Tabla 4).

Tabla 4. Número de aminoácidos, valores teóricos de peso molecular (PM), absorptividad molar (ϵ_{MOLAR}) y específica ($\epsilon_{\text{ESPECÍFICA}}$) para los nanoanticuerpos producidas: Los valores teóricos fueron obtenidos a partir de las secuencias aminoacídicas utilizando el sitio <http://web.expasy.org/protparam/>.

PROTEÍNA	N° AMINOÁCIDOS	PM (g/mol)	ϵ_{MOLAR} (M ⁻¹ cm ⁻¹)	$\epsilon_{\text{ESPECÍFICA}}$ (mL mg ⁻¹ cm ⁻¹)
VHH8c(BAPH6)	152	16275	20065	1.233
*VHH8c	125	13125	14565	1.110
H6VHH19(BAPH6)	149	16015	20065	1.253
*VHH19a	122	12865	14565	1.132

7.4. GENERACIÓN DE NANOANTICUERPOS

7.4.1. INMUNIZACIÓN DE LLAMA CON CABLV

Una llama de 2 años y medio de edad (perteneciente al Parque Lecocq de la Intendencia de Montevideo) se inmunizó siguiendo un programa de 32 semanas de duración, con cantidades variables de proteína *CA (expresada y purificada según las secciones 7.2.1 y 0, con remoción proteolítica del *His-tag*). La inmunización se llevó a cabo con la proteína diluida en Adyuvante Incompleto de Freund. La inyección inicial con 380 µg de *CA fue seguida de 2 boosters con 2 mg (a las 6 y 9 semanas) y 4 boosters subsiguientes con 0.5 mg (a las 14, 19, 26 y 28 semanas), para finalizar con un sangrado a las 32 semanas (Tabla 5). La inmunización de la llama se llevó a cabo en paralelo con otros antígenos con el objetivo de obtener librerías de VHH contra diferentes proteínas.

Junto con el primer booster se extrajo sangre a un animal sin inmunizar como control, para analizar el título de anticuerpos. Para el sangrado final se extrajeron 100mL de sangre heparinizada por venopunción.

Tabla 5. Programa de inmunización de llamas con *CA. Una llama de 2.5 años de edad es inmunizada durante 32 semanas con 7 inyecciones de *CA + adyuvante incompleto de Freund, finalizando con el sangrado de estas.

TIEMPO ENTRE INMUNIZACIONES (SEMANAS)	CANTIDAD DE *CA (μg)
-	380
6	2000
3	2000
5	500
5	500
7	500
2	500
4	Sangrado para biblioteca (100mL)

7.4.2. EVALUACIÓN DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS

La evaluación del título de anticuerpos contra los respectivos inmunógenos (CA entre otros) se realizó por ELISA indirecto. Para ello se sensibilizaron microplacas de poliestireno (MaxiSorp, NUNC) durante 16 horas a 4°C, con 100 μL de antígeno diluido a una concentración de 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ en PBS y se bloquearon durante 1h a temperatura ambiente con PBS adicionado con 3 % BSA. Diferentes diluciones de suero de llama preparadas en buffer de bloqueo fueron incubadas en los pocillos sensibilizados durante 1h a temperatura ambiente y lavadas 5 veces con PBS adicionado con 0.05 % Tween20. A continuación, los pocillos se incubaron con suero murino anti-IgG de llama (producido *in house*) diluido 1:000 durante 1h y se llevó a cabo una segunda etapa de lavado. Finalmente, los pocillos se incubaron con anticuerpo anti-ratón conjugado a HRP (Pierce, Rockford, IL, U.S.A.) durante 1h y se lavaron por tercera vez. El revelado se llevó a cabo incubando los pocillos durante 20 minutos con 100 μL de sustrato de peroxidasa (0.1 mg/mL TMB [3,3',5,5'-tetrametilbenzidina], 0.004% H_2O_2 en 0.1 M buffer acetato, pH 5.5) y deteniendo la reacción enzimática mediante adición de 50 μL de 2N H_2SO_4 . La absorbancia fue medida a 450 nm y el título de anticuerpos calculado como la dilución necesaria para obtener una absorbancia correspondiente a la mitad de la obtenida con el suero de la llama control diluido 1:100. Todas las medidas fueron realizadas por duplicado.

7.4.3. GENERACIÓN DE LA LIBRERÍA DE NANOANTICUERPOS ANTI CABLV

7.4.3.1. PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS Y EXTRACCIÓN DE ARN

La purificación de linfocitos a partir de sangre periférica se llevó a cabo en gradiente de densidad. Para ello la sangre se diluyó a la mitad con PBS y se llevó a cabo una centrifugación en gradiente de Histopaque®-1077 (Sigma) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Finalmente, los linfocitos aislados se lavaron con suero fetal bovino y se resuspendieron en 4mL de PBS. Se extrajo el ARN agregando tres volúmenes de reactivo TRIzol (Invitrogen) y procediendo de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La cantidad de linfocitos obtenidos se determinó mediante conteo en cámara de Neubauer y la concentración y pureza del ARN purificado se determinó utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Fremont, CA).

7.4.3.2. OBTENCIÓN DE ADNc Y AMPLIFICACIÓN DE GENES VHH

Una vez purificado el ARN de linfocitos, se procedió a la obtención de ADN complementario (ADNc) mediante RT-PCR con el *primer* JH (sección 7.1.2.1), utilizando el sistema SuperScript III (Thermo Fisher, Scientific) según

recomendaciones del fabricante. Para ello se realizaron 9 reacciones de 20 μL con 2.25 μg de ARN cada una (20.25 μg de ARN total) dando lugar a 180 μL de ADNc. Solo la mitad del ADNc obtenido fue utilizada como molde para amplificar los genes VHH por PCR. Para ello se utilizaron los *primers* VH1, VH3, VH4 y JH (sección 7.1.2.1), mediante 15 reacciones PCR de 50 μL para cada *primer* (28 ciclos de 1min a 94°C, 1min a 60°C y 2 min a 72°C). Los amplicones obtenidos fueron digeridos con la enzima de restricción *SfiI* (New England Biolabs) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y purificados a partir de gel de agarosa (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) para dar lugar a una batería de genes VHH flanqueados por sitios de corte por *SfiI*.

7.4.3.3. CLONADO DE GENES VHH EN EL FAGÉMIDO pComb3x Y TRANSFORMACIÓN DE *E. coli* ER2738.

Los productos de digestión purificados a partir de gel de agarosa fueron clonados en el fagémido pComb3x (cortesía del Profesor Barbas, The Scripps Research Institute, La Jolla, USA). Para ello se digirieron 100 μg de fagémido con *SfiI* y se purificó dos veces a partir de gel de agarosa (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) para evitar religaciones con las secuencias de relleno o “*stuffer sequences*” (Figura 21.B). El fagémido y los amplicones digeridos se ligaron con Ligasa T4 (Thermo Fisher Scientific) utilizando una relación molar inserto:vector de 3:1. Las ligaciones fueron purificadas a partir de gel de agarosa (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) y resuspendidas en agua estéril. Finalmente se transformaron bacterias electrocompetentes *E. coli* ER2738 (Lucigen Corporation, Middleton, WI, USA) con 3 μL de ligación purificada por 25 μL de suspensión bacteriana. La presencia de fragmentos VHH fue confirmada por PCR de colonias utilizando los *primers* VHHmix y JH.

7.4.3.4. PRODUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA DE FAGOS PREINMUNE

Las bacterias ER2738 transformadas con el fagémido, fueron crecidas en medio LB adicionado con 0.25 % K_2HPO_4 , 0.1 % MgSO_4 , 0.1 % glucosa y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de ampicilina (antibiótico de selección para el fagémido pComb3x). Una vez que el cultivo alcanzó una D.O. = 1.0, fue infectado con el fago *helper* M13KO7 (Pharmacia Biotech) a una multiplicidad de infección de 10:1, y fue crecido durante 16 horas a 30°C en presencia de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ adicionales de kanamicina (antibiótico de selección para fago *helper*), para producir los fagos recombinantes expresando los VHH fusionados a la proteína de superficie pIII truncada.

Los fagos contenidos en el sobrenadante de cultivo fueron precipitados adicionando 0.2 volúmenes de 20 % (w/v) Polietilenglicol 8000 (PEG 8000) y 2.5 M NaCl (concentraciones finales de 4% PEG 8000 y 0.5M NaCl) e incubando en baño de hielo durante 1 hora para luego de ser centrifugados a 4°C durante 15 minutos a 15.000g. El pellet se resuspendió en PBS adicionado con 3% BSA estéril, dando lugar a una biblioteca de fagos preinmune la cual fue posteriormente amplificada y seleccionada por phage display.

Para la titulación de la biblioteca, tubos con 100 μL de un cultivo de *E. coli* ER2738 crecido en medio líquido SB (Tryptona 3%, Extracto de Levadura 2%, MOPS 1%) sin antibiótico, a una D.O.=1.0, fueron adicionados con 10 μL de diluciones seriadas de la biblioteca preinmune ($f=10^{-8}$, $f=10^{-9}$, $f=10^{-10}$, $f=10^{-11}$, $f=10^{-12}$ en PBS estéril) y sembradas en placas de LB agar adicionado con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Luego de crecer 16 horas a 37°C, se hizo un recuento de colonias en una de las placas y el tamaño de esta se calculó como:

$$\text{Tamaño de la biblioteca (cfu/mL)} = n^\circ \text{ de colonias} \cdot f \cdot 100$$

7.4.3.5. PRODUCCIÓN DE LA BIBLIOTECA DE FAGOS ESPECÍFICA CONTRA CABLV (PHAGE DISPLAY)

Para la obtención de una biblioteca específica contra CA_{BLV} , se realizaron varias rondas de panning consistentes en inmovilizar el antígeno en placas Nunc, MaxiSorp mediante incubación de diluciones variables de *CA en PBS

durante 16 horas a 4°C. A continuación, se bloqueó con BSA 3% en PBS a 37°C durante 1 hora y se incubó con 100 µL de la biblioteca de fagos preimmune durante 1h a 4°C con agitación. A continuación, se aplicaron lavados diferenciales y se eluyeron los fagos mediante adición de 100 µL por pocillo de **buffer de elución de fagos** (100 mM glicina, pH 2.2; 150 mM NaCl) e incubación por 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se neutralizaron los eluatos adicionando 0.05 volúmenes de Tris 2M hasta una concentración final de 0.1M y se cuantificó el tamaño de la sub-biblioteca enriquecida de la misma manera que con la biblioteca preimmune (7.4.3.4). Los fagos obtenidos al final de cada ronda fueron amplificados re-infectando bacterias *ER2738* (tal como se describe a continuación) o se utilizaron como insumo para clonar la biblioteca específica en un vector de expresión.

Para amplificar la biblioteca después de cada ronda de *panning*, se realizó el mismo procedimiento de precipitación utilizado con la biblioteca preimmune, dando lugar al OUT que fue utilizado para re-infectar las bacterias nuevamente e iniciar la siguiente ronda. Para ello, un cultivo de 2mL de *E. coli ER2738* crecido en medio SB a una D.O.=1.0 se infectó 100 µL del OUT correspondiente, manteniéndolo 30 minutos a 37°C sin agitación. Las células infectadas se diluyeron 5 veces en medio SB con ampicilina (100 µg/mL) y se crecieron durante 2 horas a 37°C con agitación. A continuación, el cultivo se infectó con 50 µL del fago *helper M13KO7* incubando 1 hora con agitación, para finalmente agregar kanamicina (50 µg/mL) y dejar creciendo durante 16 horas a 37°C. La cuantificación se realizó de la misma manera, mediante sembrado de diluciones seriadas en placas de LB agar + ampicilina 100 µg/mL y conteo de colonias formadas.

Las **rondas de *panning* 1 y 2** se llevaron a cabo en forma secuencial utilizando 6 y 3 pocillos respectivamente, en los que se inmovilizó 1µg de *CA y se aplicaron 8 lavados de 5 minutos con PBS adicionado con 0.005% Tween20. A partir del producto de la ronda 2, se llevaron a cabo en forma paralela las rondas 3 y 4. Para la **ronda 3** se utilizó 1 pocillo sensibilizado con 1 µg de *CA pero aplicando lavados extensivos (con 0.005% Tween20 y agitación continua) durante 3 días, mientras que la **ronda 4** se llevó a cabo con el mismo régimen de lavado (agitación continua durante 3 días con 0.005% Tween20) pero inmovilizando 0.05 µg de *CA en 3 pocillos.

7.4.3.6. CLONADO DE SECUENCIAS DE VHH EN PLASMIDO DE EXPRESIÓN

Una vez que se constató la especificidad de la biblioteca de fagos por CA_{BLV} y sus dominios (utilizando la técnica de ELISA), se procedió a clonar *en masse* los nanoanticuerpos seleccionados en el vector de expresión bacteriano pINQ-BtH6 diseñado por Rossotti *et al.* [399]. Para ello se infectaron células *ER2738* electrocompetentes crecidas a una DO=1.0 en medio SB, con 1/200 volúmenes de los eluatos de las rondas de *panning* elegidas y se crecieron en cultivos de 10mL durante 16 horas a 37°C, para luego purificar los fagémidos mediante minipreps (QIAamp DNA Mini Kit). A continuación, 20 µg de ADN de cada purificación fueron digeridos con *SfiI* (New England Biolabs) y purificados a partir de gel de agarosa (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen). Los genes VHH flanqueados por sitios de corte con *SfiI* fueron clonados en 1µg el vector pINQ-BtH6 igualmente digerido con *SfiI* utilizando la enzima T4 Ligasa (Thermo Fisher Scientific), con una relación molar inserto:vector de 3:1 según recomendaciones del proveedor. A continuación, se purificaron las ligaciones a partir de gel de agarosa (QIAquick Gel Extraction Kit, Qiagen) y se resuspendieron en agua estéril para finalmente transformar bacterias *E. coli BL21 (DE3)* electrocompetentes, previamente transformadas con el vector pCY216 para expresar la biotín ligasa *BirA* (bajo acción de un promotor inducible por arabinosa) [400]. Los doble transformantes se seleccionaron mediante crecimiento en placas de LB agar adicionadas con 50 µg/mL kanamicina y 35 µg/mL cloranfenicol.

7.4.3.7. ANALISIS DE SECUENCIA DE NANOANTICUERPOS

Para aquellos VHH clonados en el vector pINQ-BtH6 que fueron seleccionados y secuenciados, se alineó la secuencia aminoacídica con el objetivo de identificar los dominios característicos. Para ello se utilizó la herramienta de alineamiento e identificación de dominios variables de inmunoglobulinas y receptores de células T del sitio web del

IMGT (<http://www.imgt.org/3Dstructure-DB/cgi/DomainGapAlign.cgi>) [402, 403] donde las secuencias en formato FASTA son cargadas a fin de identificar los dominios FR y CDRs, así como también los posibles genes de llama que dan origen a los respectivos clones.

Este servidor utiliza el sistema de numeración IMGT para posicionar ciertos residuos clave en ubicaciones específicas [404, 405] y a partir de estos identificar las regiones FR y CDR (Figura 25.A). Este sistema asume una longitud de los CDR1, 2 y 3 de 12, 10 y 13 residuos, permitiendo comparar dominios con CDRs de diferente longitud o de diferentes especies mediante la introducción de “gaps” o inserciones en posiciones establecidas (Figura 25.B). Además, utiliza una base de datos de genes de la línea germinal de diferentes especies para buscar similitudes e identificar los posibles genes que dan origen a dichos fragmentos.

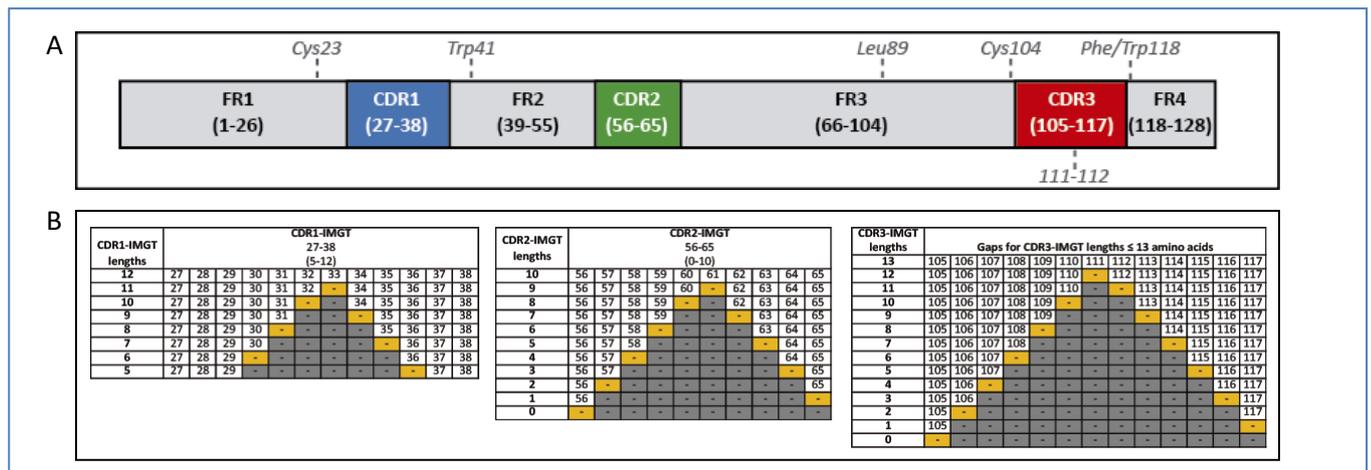


Figura 25: Sistema de numeración IMGT. A) Ciertos residuos clave son identificados y posicionados correctamente (C₂₃, W₄₁, L₈₉, C₁₀₄, F/W₁₁₈) para definir los CDR en función de estos. **B)** Este posicionamiento asume longitudes máximas para los CDR de 12, 10 y 13 residuos e introduce gaps de acuerdo con un criterio preestablecido para numerar los CDR de menor longitud. En el caso de los CDR3 de mayor longitud dicha secuencia se extiende adicionando residuos entre las posiciones 111 y 112 identificados como 111 o 112 acompañados de un punto y un número (se comienza por adicionar una posición 112 y luego una posición 111. Por ejemplo para un CDR3 de 14 residuos la secuencia será ...110, 111, 112.1, 112, 113... y para un CDR de 16 residuos la secuencia será ...110, 111, 111.1, 112.2, 112.1, 112, 113...). [404, 405].

7.5. MÉTODOS ANALÍTICOS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS PRODUCIDAS EN FORMA RECOMBINANTE.

La presente sección describe las metodologías analíticas llevadas a cabo en esta tesis, con el objetivo de determinar parámetros que permitan evaluar el comportamiento en solución de las proteínas producidas en forma recombinante y/o establecer controles de calidad que aseguren el éxito de los experimentos realizados a partir de estas.

7.5.1. ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE).

Las muestras proteicas fueron analizadas por electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida SDS-PAGE 12% o 15%, en un sistema de buffer tris-glicina o tris-tricina (dependiendo de la resolución requerida). Para ello se utilizó un protocolo estándar basado en el método discontinuo de Laemmli [406]. Las muestras fueron desnaturalizadas en presencia de SDS y DTT, y el gel analizado por tinción con Coomassie [407] o sometido a Western Blot. Los marcadores de peso molecular utilizados fueron dos, dependiendo de la resolución del gel: Page Ruler™ Prestained Protein Ladder (Thermo) o SigmaMarker™, Low Range (Sigma).

7.5.2. ANÁLISIS DE PUREZA POR DENSITOMETRÍA

La pureza de las proteínas purificadas fue determinada por densitometría utilizando el software de libre acceso Scion Image (Scion Corporation). Para ello se tomó una fotografía digital del gel teñido con Coomassie en formato .TIFF y se analizó según las recomendaciones del desarrollador del software (https://es.wikiversity.org/wiki/Programa_gr%C3%A1fico_Scion_Image).

7.5.3. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR (SEC)

El tamaño molecular de las muestras obtenidas en solución fue analizado mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC) en buffer PBS usando una columna analítica Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare Life Science) acoplada a un equipo FPLC ÄKTA Purifier (GE Healthcare Life Science) o una columna ZORBAX GF 250 (Agilent Technologies) acoplada a un sistema HPLC Agilent serie 1200 (Agilent Technologies). En aquellos casos que se realizó purificación por SEC utilizando columnas preparativas (secciones 7.3.1.3 y 7.3.2.3), dicha información fue utilizada para evaluar la pureza y volumen de exclusión de las muestras obtenidas.

7.5.4. ESPECTROMETRÍA DE MASAS POR DESORCIÓN/IONIZACIÓN LÁSER ASISTIDA POR MATRIZ Y DETECCIÓN POR TIEMPO DE VUELO (MALDI-TOF)

El análisis por espectrometría de masas se llevó a cabo en la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Instituto Pasteur de Montevideo, utilizando un espectrómetro de Masas 4800 Plus MALDI TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems Inc., Framingham, MA) equipado con un láser Nd:YAG (355-nm)

La digestión de péptidos a partir de bandas de SDS-PAGE se realizó mediante tratamiento con tripsina (Promega) durante 16 horas a 37°C, los cuales fueron extraídos de gel usando 60% acetonitrilo en 0.2% TFA, concentrados por secado en vacío y desalados con micro columnas C18 de fase reversa (OMIX Pippete tips, Varian). Los péptidos resultantes de la digestión trípica de las proteínas de interés se concentraron y desalaron mediante fase reversa utilizando microcolumnas C18 (ZipTip, Millipore), eluyéndose con una solución saturada de matriz (ácido α -ciano-4-hidroxixinamínico en 60% acetonitrilo conteniendo 0.1% TFA) directamente sobre la placa Opti-TOF™384 Well Insert (123x81mm).

Los espectros se adquirieron en el modo reflector positivo en un rango de m/z entre 800 a 4000. La placa se calibró utilizando una mezcla comercial de péptidos estándar (Mass Standards Kit for Calibration of AB Sciex TOF/TOF). Se eligieron las señales de m/z más intensas del espectro para su posterior fragmentación (MS/MS). La identificación y confirmación de las secuencias de proteínas se realizó mediante búsqueda en una base de datos local (donde se depositaron las secuencias de interés) utilizando como motor de búsqueda MASCOT v2.3.02 (licencia del Instituto Pasteur de Montevideo; <http://www.matrixscience.com>). Los parámetros utilizados fueron los siguientes: tolerancia masa isotópica de 0,05 Da, tolerancia de masa de fragmentación 0.2 Da, modificación de cisteínas como productos de la alquilación por iodoacetamida, oxidación de metioninas, deamidación de residuos asparagina y glutamina, etc.).

7.5.5. ANÁLISIS DE ESTADO DE OLIGOMERIZACIÓN POR DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS)

El análisis por Dispersión Dinámica de Luz en batch (DLS por “dynamic light scattering”) se llevó a cabo usando un Zetasizer Nano S (Malvern). Las muestras proteicas (a concentraciones superiores a 0.8mg/mL) fueron analizadas

en cubetas descartables de plástico UVette (Eppendorf). Las medidas se realizaron a 25°C, con períodos de incubación previos de 5 minutos, utilizando valores de viscosidad = 0,8906 cP y RI = 1.330; los valores de atenuación, posición del haz de luz y cantidad de medidas realizadas por corrida se ajustaron en forma automática. Los resultados fueron analizados utilizando el software Zetasizer versión 7.12 (Malvern) y presentados como distribución de tamaños de partícula (radio hidrodinámico, R_H) expresada en términos de porcentajes de intensidad de luz dispersada o de volumen de muestra dispersante.

7.5.6. ANÁLISIS DE TERMOESTABILIDAD POR MICROCALORIMETRÍA DE BARRIDO DIFERENCIAL DE TEMPERATURA (DSC)

El análisis por microcalorimetría de barrido diferencial de temperatura (DSC por “*differential scanning calorimetry*”) se llevó a cabo usando un equipo Micro Cal VP-DSC (Malvern). La línea de base se definió utilizando el buffer de la muestra obtenido en el último paso de purificación, y las muestras proteicas fueron utilizadas a concentraciones superiores a 0.8mg/mL durante 2 o 3 ciclos para evaluar la reversibilidad frente a la desnaturalización térmica en un rango de temperatura entre 25-90 °C. El análisis de los datos se realizó utilizando el software Origin versión 7 (Micro Cal).

7.6. ESTUDIO DE INTERACCIÓN ENTRE NANOANTICUERPOS Y ANTÍGENOS ESPECÍFICOS

7.6.1. ANALISIS POR ELISA

La técnica de ELISA fue utilizada a lo largo de esta tesis con diferentes objetivos: para evaluar la eficiencia de selección de VHHs por phage display y para clasificar los VHHs en función del dominio de CA que son capaces de reconocer o por su afinidad. A continuación, presentamos las diferentes metodologías aplicadas.

7.6.1.1. ELISA PARA EVALUAR LA EFICIENCIA DE LA SELECCIÓN POR PHAGE DISPLAY

Se usaron placas de poliestireno de 96 pocillos NUNC MaxiSorp (Thermo Fisher Scientific, 44240421) que fueron incubadas durante 2 horas a 37°C con 0.1 µg de antígeno por pocillo en buffer fosfato salino (PBS). A continuación, se bloqueó durante 1 hora a 37°C con BSA 1% en PBS y se realizaron tres ciclos de lavados con 0.05% Tween20 en PBS. Los pocillos sensibilizados y bloqueados se incubaron con 100 µL de una dilución a la mitad (con BSA 1 %) de sobrenadante de cultivo de ER2738 transformadas con el fagémido conteniendo VHHs seleccionados por *phage display* (sin infectar con fago *helper*). Luego de 8 lavados con 0.05% Tween20 en PBS, se incubaron durante 1h a 25°C con anticuerpo anti-HA conjugado a HRP (Roche, Boulder, CO) diluido 1:3000 en buffer de bloqueo y se realizaron 5 lavados con 0.05% Tween20 en PBS. El revelado se llevó a cabo con 100µL de TMB (0.02 mg/mL) y H₂O₂ (0.003%) diluidos en 110 mM Buffer Acetato, pH 5.0. Luego de 15 minutos de reacción colorimétrica, la misma se detuvo adicionando 50 µL de H₂SO₄ 2N a cada pocillo, y se midió la absorbancia a 2 longitudes de onda diferentes en un lector de placas Fluostar Optima Reader (BMG, Ortenberg, GE). Los valores obtenidos se expresan como la resta de ambas absorbancias ($A_{450}-A_{620}$).

7.6.1.2. ELISA PARA MAPEO ANTIGÉNICO DE VHHs

Placas de poliestireno de 96 pocillos NUNC MaxiSorp (Thermo Fisher Scientific, 44240421) fueron incubadas durante 2 horas a 37°C con 0.1 µg de antígeno viral diluido en PBS (obtenidos de acuerdo a la sección 0). A continuación se bloqueó durante 1 hora a 37°C con BSA 1% en PBS y se realizó un lavado de 3 ciclos con 0.05% Tween20 en PBS

para luego incubar con sobrenadantes de un cultivo bacteriano (inducidos para expresar VHHs biotinilados de acuerdo a la sección 7.2.2.2), diluido a la mitad con BSA 1% durante 1 hora a 25°C. Luego de realizar un lavado igual al paso anterior. A continuación, se incubó a 25°C durante 1h con estreptavidina conjugada a HRP (Pierce, Rockford, IL) diluida 1:5000 en solución de bloqueo y luego de otro ciclo de lavado idéntico, se reveló con 100µL de TMB (0.02 mg/mL) y H₂O₂ (0.003%) diluidos en 110 mM Buffer Acetato, pH 5.0. Luego de 15 minutos de reacción colorimétrica, la misma se detiene agregando 50 µL de H₂SO₄ 11% a cada pocillo y se midió la absorbancia a 2 longitudes de onda diferentes en un lector de placas Fluostar Optima Reader (BMG, Ortenberg, GE). Los valores obtenidos se expresan como la resta de ambas absorbancias ($A_{450}-A_{620}$).

7.6.1.3. ELISA PARA ESTIMACIÓN DE LA AFINIDAD DE LOS VHHs

Esta metodología se llevó a cabo mediante introducción de modificaciones al método presentado por [408] con el objetivo de categorizar los VHH de acuerdo a la afinidad relativa. Para ello, placas de poliestireno de 96 pocillos (NUNC, MaxiSorp) fueron incubadas durante 16 horas a 4°C con 0.2 µg de avidina por pocillo en PBS. A continuación, se bloqueó durante 1 hora a 37°C con BSA 1% en PBS y se realizó un ciclo de 3 lavados con 0.05% Tween20 en PBS. Los pocillos sensibilizados con avidina y bloqueados se incubaron con sobrenadante de cultivo bacteriano (inducidos para expresar VHHs biotinilados de acuerdo a la sección 7.2.2.2), diluido a la mitad con BSA 1% durante 1 hora a 25°C, y se realizó un ciclo de 3 lavados igual que en el paso anterior. A continuación se incubó a 25°C durante 1h con CA-HRP (*CA conjugada a HRP siguiendo la estrategia de [409]) diluida 1:100 en solución de bloqueo y luego de otro ciclo de 3 lavados se reveló con 100µL de TMB (0.02 mg/mL) y H₂O₂ (0.003%) diluidos en 110 mM Buffer Acetato, pH 5.0. Luego de 15 minutos de reacción colorimétrica, la misma se detuvo agregando 50 µL de H₂SO₄ 2N a cada pocillo y se midió la absorbancia a 2 longitudes de onda diferentes en un lector de placas Fluostar Optima Reader (BMG, Ortenberg, GE). Los valores obtenidos se expresan como la resta de ambas absorbancias ($A_{450}-A_{620}$).

7.6.2. ANALISIS POR WESTERN BLOT

La interacción entre los nanoanticuerpos y las proteínas de BLV fueron analizados por Western Blot utilizando métodos estándar [410]. Para ello las proteínas de BLV fueron sometidas a SDS-PAGE (sección 7.5.1) sembrando 0.5 µg de muestra pura por pocillo y posteriormente electro-transferidas a una membrana de polifluoruro de vinilideno (PVDF) a 300 mA durante 1.5 horas a 4°C, utilizando una unidad de transferencia TE 22 Mini Tank (GE, Healthcare, Life Sciences). A continuación, la membrana fue lavada con agua y bloqueada con PBS + 3% BSA durante 16h a 4°C. Las proteínas de BLV fueron inmuno-detectadas mediante incubación durante 1 hora con los respectivos nanoanticuerpos biotinilados (producidos a mediana escala), diluidos a una concentración final de 8 µg/mL en PBS + 3% BSA + 0.5% Tween20. Luego de un ciclo de 3 lavados con agitación de 5 minutos en PBS + 1% Tween20, se procedió a incubar la membrana durante 1 hora con Estreptavidina conjugada a HRP (DAKO) diluida 1:8000 en PBS + 3% BSA + 0.5% Tween20 y se repitió el mismo ciclo de lavados del paso anterior. El revelado se llevó a cabo utilizando sustrato quimio-luminiscente Super Signal™ West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo) según recomendaciones del fabricante mediante exposición a una placa auto-radiográfica Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare Life Science).

Esta técnica también fue utilizada para confirmar la remoción del sitio de biotinilación (BAP) en algunas construcciones de nanoanticuerpos. En este caso se corren las muestras de nanoanticuerpos por SDS-PAGE y se procede de la misma manera, con la salvedad que los pasos de incubación con nanoanticuerpos y el siguiente ciclo de lavados son eliminados.

7.6.3. ANALISIS DE INHIBICIÓN DEL AUTENSAMBLADO DE LA CÁPSIDE IN VITRO

Para evaluar la capacidad inhibitoria de los nanoanticuerpos sobre el autoensamblado de CA_{BLV} , se midió la velocidad de ensamblado en presencia de diferentes concentraciones de nanoanticuerpos, como la pendiente de la fracción lineal del ensamblado. Para ello se utilizaron placas de poliestireno de media adsorción (655001, Greiner Bio-one) dispensando 100 μ L de CA_{BLV} 1 mM por pocillo (en PBS) y adicionando concentraciones diferentes de nanoanticuerpos. Las placas fueron mantenidas a 4°C hasta el momento de inicio de la reacción de auto-ensamblado, la cual se desencadenó mediante incubación a 38°C. Las medidas de velocidad se realizaron por turbidimetría incubando las placas a 38°C y midiendo la absorbancia a 340nm (A_{340}). Las medidas se realizaron durante 3-4 horas con un espectrofotómetro de placas termostatzado Multiskan FC (Thermo Scientific).

7.6.4. ANÁLISIS DE INTERACCIÓN POR RESONANCIA PLASMÓNICA DE SUPERFICIE (SPR)

La Resonancia Plasmónica de Superficie es un fenómeno óptico que ocurre cuando un haz de luz incide sobre una superficie delgada de algunos metales (ej. oro, plata, platino) en condiciones de Reflexión Total Interna, es decir con un ángulo de incidencia superior al ángulo crítico, θ_c . La resonancia Plasmónica de Superficie se evidencia por una caída en la intensidad de la luz reflejada y dicho ángulo θ_r es afectado (entre otras cosas) por el índice de refracción (IR) de la porción de medio ubicada inmediatamente por debajo de la lámina de metal [411].

Los biosensores poseen un sistema microfluídico ubicado debajo de la lámina metálica, que a su vez está acoplada a un sistema óptico donde un haz de luz de intensidad fija incide sobre la misma con diferentes ángulos y una vez reflejado, es detectado por un sensor (fotomultiplicador).

Los cambios en el ángulo de resonancia θ_R (como consecuencia de los cambios en el índice de refracción) son censados de forma continua, permitiendo obtener información en tiempo real acerca de los cambios en la composición del medio como consecuencia de interacciones moleculares. El registro en el tiempo, de las unidades de resonancia (unidades arbitrarias que describen los cambios en el ángulo de resonancia como consecuencia de los cambios en la solución) se conoce como Sensorgrama y permite detectar en tiempo real la inmovilización de moléculas a la superficie (ligando) así como la asociación y disociación de las moléculas inyectadas (analito). Este tipo de información permite obtener datos cualitativos (confirmación e identificación de interactores, mapeo antigénico, etc.) y cuantitativos (concentración, K_d , k_{on} , k_{off}) relacionados con las interacciones moleculares [412].

La interacción entre CA_{BLV} y los nanoanticuerpos se analizó por Resonancia Plasmónica de Superficie (SPR) utilizando un equipo Biacore 3000 (GE Healthcare Life Sciences). Los experimentos se realizaron a 25°C en PBS adicionado con surfactante P20 0.005% (GE Healthcare Life Sciences), utilizando chips CM5 (GE Healthcare Life Sciences). Para esto se inmovilizaron las proteínas de BLV purificadas, según las recomendaciones del fabricante, en buffer acetato de sodio 10 mM, a diferente pH en función de la muestra inmovilizada (CA_{BLV} y *CTD a pH 4.0 y NTDH6 a pH 5.5). Una vez inmovilizadas las proteínas virales en diferentes superficies del mismo chip, se inyectaron los diferentes nanoanticuerpos purificados a flujo constante de 50 o 100 μ L/min durante 5 minutos con 20 minutos de disociación. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el software BiaEvaluation (GE Healthcare Life Sciences).

7.6.5. ANALISIS POR MICROCALORIMETRÍA DE TITULACIÓN ISOTÉRMICA (ITC)

La Microcalorimetría de Titulación Isotérmica es una técnica para cuantificar interacciones moleculares ampliamente utilizada en biología [413]. Los microcalorímetros constan de 2 celdas idénticas ubicadas en una camisa adiabática termostatzada, donde una actúa como referencia mientras que la otra contiene la muestra (uno de los interactores) y está adaptada para alojar en su interior una jeringa giratoria, manipulada en forma automática para dispensar pequeños volúmenes de ligando (el otro interactor) en forma muy precisa. Ambas celdas se encuentran a la misma temperatura y poseen resistencias independientes que permiten mantener $\Delta T=0$ en respuesta a los cambios ocurridos en su interior, mediante la aplicación de potencias diferenciales sobre las mismas.

Dado que con cada inyección de ligando sobre la celda ocurre un intercambio de calor con el medio (liberación de calor si la reacción es exotérmica y absorción si la reacción es endotérmica), para mantener la temperatura de ambas celdas igual y constante, el equipo deberá detectar estos cambios de temperatura y aplicar potencias diferenciales sobre las resistencias de ambas celdas (mayor potencia sobre la resistencia de la muestra si la reacción es endotérmica y menor potencia si la reacción es exotérmica). La cantidad calor liberado o absorbido es proporcional a la cantidad de complejo formado, y el registro de los cambios de potencia diferencial a través del tiempo permite definir una línea de base e integrar cada inyección para obtener el calor liberado o absorbido por mol de ligando en cada inyección. Dado que las concentraciones totales de cada interactor son conocidas a lo largo de toda la titulación, es posible graficar el calor por mol de ligando en función de la relación molar de ambos interactores y mediante el ajuste matemático a un modelo determinado, extrapolar los parámetros termodinámicos de la reacción. La técnica de ITC permite obtener simultáneamente ΔG (y por ende K_d), ΔH y ΔS en un único experimento y realizando experimentos a diferentes temperaturas es posible determinar cambios en la capacidad calórica (ΔC_p) [414].

El análisis por microcalorimetría de titulación isotérmica se llevó a cabo con un equipo Micro Cal VP-ITC (Malvern), inyectando concentraciones conocidas de los nanoanticuerpos sobre las proteínas virales diluidas en el mismo buffer, a concentraciones también conocidas. Las titulaciones se realizaron a 25°C, en PBS con inyecciones de 10 μ L separadas por tiempos de 10 minutos. Las muestras fueron cuidadosamente filtradas y desgasificadas previo a la titulación, según las recomendaciones del fabricante. El análisis de los datos se realizó utilizando programas de dominio público NITPIC [415, 416] para la definición de la línea de base e integración de las inyecciones, SEDPHAT [417, 418] para ajustar los datos a un modelo de interacción molecular y GUSI [419] para obtener figuras de calidad en forma directa.

7.7. ANALISIS ESTRUCTURAL DE NANOANTICUERPOS

Los nanoanticuerpos purificados y concentrados fueron sometidos a ensayos de cristalogenésis (tanto en forma aislada como en complejo con los respectivos dominios de CA_{BLV}). En los casos de análisis de complejos se utilizaron relaciones equimolares de ambos componentes y en todos los casos las muestras fueron previamente incubadas en hielo por 30 minutos y centrifugadas a 16.000g por 10 minutos.

Se realizaron diversos ensayos de búsqueda de condiciones de cristalización en forma robótica, con el objetivo de identificar las más promisorias para luego proceder a su optimización y análisis por difracción de rayos X en la Unidad de Cristalografía de Proteínas, IP Montevideo).

7.7.1. BÚSQUEDA Y OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DE CRISTALIZACIÓN (ROBÓTICA)

La búsqueda inicial de condiciones de cristalización de proteínas se efectuó mediante el método de difusión de vapor en gota sentada. Se evaluaron 384 condiciones comerciales diferentes: pHClear Suite, PEGs Suite, y AmSO4 Suite (QIAGEN) y CrystalScreen de HAMPTON Research) utilizando un robot de cristalización Honeybee 963[®] (Digilab) en placas de 96 pocillos (Greiner) conteniendo 90 μL de solución comercial por pocillo y gotas preparadas con 0.3 μL de proteína y 0.3 μL del reservorio. Las placas fueron selladas, incubadas a $(19 \pm 1) ^\circ\text{C}$ durante varios días y evaluadas periódicamente con el objetivo de identificar condiciones con material cristalino para proceder a su optimización.

Para realizar dicha optimización, en algunos casos (VHH8c y complejo VHH8c/CTD) fue necesario agregar aditivos en forma robótica. Esto se llevó a cabo usando el kit de aditivos Additive Screen HT (HAMPTON Research) según recomendaciones del fabricante.

7.7.2. OPTIMIZACIÓN DE CONDICIONES DE CRISTALIZACIÓN (MANUAL)

La optimización de condiciones de cristalización identificadas a partir de la búsqueda inicial se llevó a cabo en forma manual por el método de difusión de vapor en gota colgante, usando placas tipo Linbro de 24 pocillos (HAMPTON Research) con 1mL de solución de reservorio. Las placas fueron selladas, incubadas a $(19 \pm 1) ^\circ\text{C}$ durante varios días y evaluadas periódicamente.

Las condiciones para evaluar fueron preparadas manualmente variando la concentración de proteína (2.9-3.9 mM), la relación volumétrica de proteína-reservorio (diferentes combinaciones de 1 a 3 μL de proteína y/o reservorio) y las concentraciones de precipitante, buffer, aditivos y pH. En la sección 8.6.3 de Resultados se describen en detalle las condiciones que arrojaron resultados promisorios durante la etapa de optimización.

En los casos que se obtuvieron cristales de proteína, se procedió a su crio-preservación por medio de incubación durante 60 segundos en la condición de cristalización suplementada con 25 % (v/v) de glicerol. Los cristales tratados con esta solución fueron congelados rápidamente y almacenados en N_2 líquido hasta la colección de datos por difracción de rayos X.

7.7.3. DIFRACCIÓN DE RAYOS X Y DETERMINACIÓN DE ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE PROTEÍNAS.

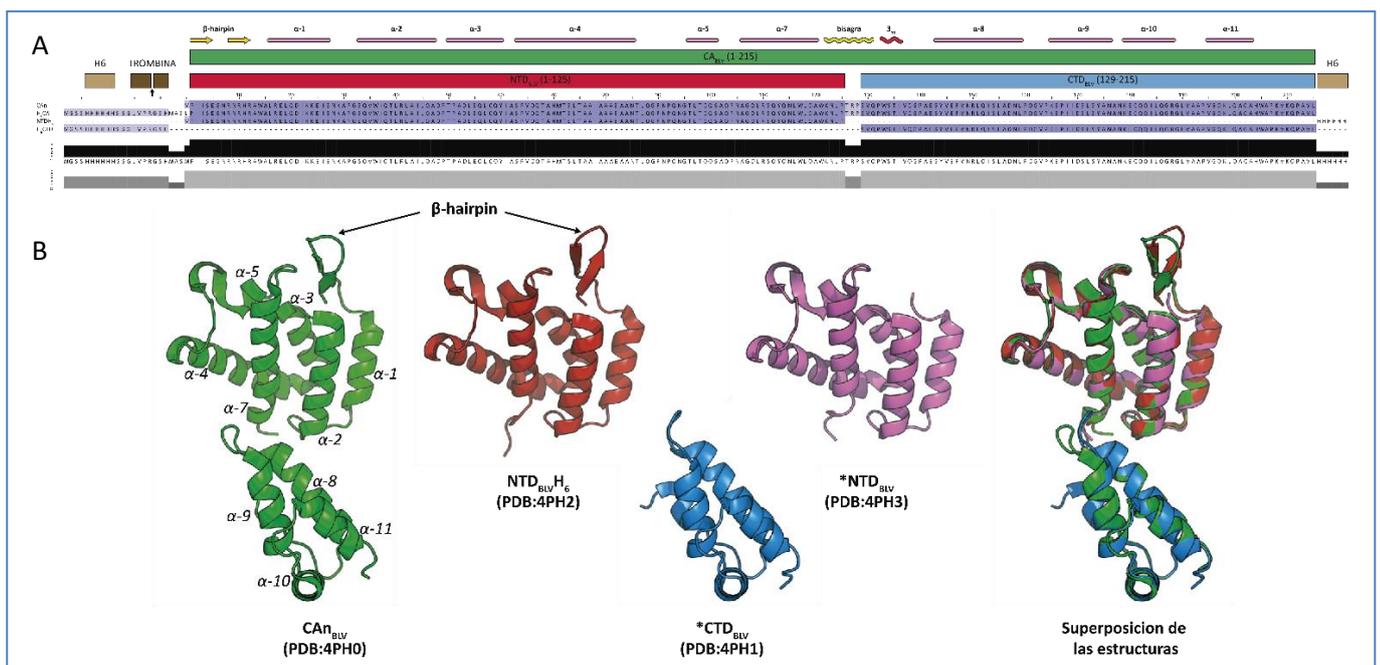
Los datos de difracción fueron en colectados en el French National Synchrotron Facility (Soleil, línea Próxima 2A). Los datos se obtuvieron a partir de cristales únicos a 100K. Los datos completos fueron procesados en forma automática con el software Autoproc [420], que emplea XDS [421] para la indexado e integrado, mientras que el escalado fue realizado con Aimless [422]. La estructura del VHH8c fue resuelta mediante reemplazo molecular utilizando Molrep [423] y como sonda de búsqueda se utilizó un dominio VHH obtenido de PDB ID: 4XT1. Mediante ciclos iterativos de construcción manual de modelo con Coot [424] y refinamiento con phenix.refine dentro del paquete Phenix [425], el modelo pudo ser refinado (la información detallada se muestra en la **Tabla 10**).

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES

8.1.1. CLONADO Y SECUENCIACIÓN

Todas las construcciones de antígenos virales fueron clonadas en los respectivos vectores de expresión y sus secuencias fueron confirmadas por secuenciación automática utilizando *primers* universales (*T7 forward* y *T7 terminator reverse*). La mayoría de las construcciones para expresar proteínas de CA_{BLV} fueron diseñadas y clonadas en nuestro laboratorio en el marco del trabajo de tesis doctoral de Gonzalo Obal [89]. En aquellos casos donde las construcciones debieron ser clonadas nuevamente, se procedió de igual manera cotejando las secuencias obtenidas con las secuencias teóricas y solo fueron tenidas en cuenta aquellas secuencias con 100% de homología en ambos sentidos. Las secuencias aminoacídicas con sus características más importantes se presentan en la [Figura 26.A](#).



Cabe destacar que la construcción nativa presenta una metionina en la posición inicial que es removida en forma co-traduccional por la maquinaria bacteriana dando lugar a una proteína idéntica a la CA_{BLV} madura, con capacidad de formar el β -hairpin característico en el extremo N-terminal mediante la formación de un puente salino entre los residuos P₁ y D₅₃. Por su parte H₆CA (y *CA) no posee estructura β -hairpin y pueden ser considerada similar a la CA_{BLV} inmadura. En el caso de los dominios NTDH₆ y *CTD (obtenido luego de clivar el *His-tag*), conservan también la secuencia de los extremos N-terminal y C-terminal respectivamente. En el caso del NTDH₆, la metionina es

Cabe destacar que la construcción nativa presenta una metionina en la posición inicial que es removida en forma co-traduccional por la maquinaria bacteriana dando lugar a una proteína idéntica a la CA_{BLV} madura, con capacidad de formar el β -hairpin característico en el extremo N-terminal mediante la formación de un puente salino entre los residuos P₁ y D₅₃. Por su parte H₆CA (y *CA) no posee estructura β -hairpin y pueden ser considerada similar a la CA_{BLV} inmadura. En el caso de los dominios NTDH₆ y *CTD (obtenido luego de clivar el *His-tag*), conservan también la secuencia de los extremos N-terminal y C-terminal respectivamente. En el caso del NTDH₆, la metionina es

removida de igual manera que en CAn, permitiendo la formación de la estructura β -hairpin. A pesar de las diferencias introducidas fundamentalmente por remoción de dominios enteros o modificaciones en el extremo N-terminal y en la región bisagra, todas las construcciones dan lugar a proteínas estructuralmente similares (**Figura 26.B**).

8.1.2. PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

La obtención de las diferentes versiones de los antígenos de BLV fue crucial a lo largo de las diferentes etapas de esta tesis (desde la inmunización de llamas hasta la obtención de cristales de complejos con nanoanticuerpos). La cantidad de proteína requerida en cada experimento depende de la naturaleza de estos; los análisis por ELISA o Western Blot requieren baja cantidad de muestra en comparación con los ensayos de optimización de condiciones de cristalización, experimentos de ITC o de ensamblado de CA_{BLV}. Por tal motivo, la escala de producción se adecuó a las necesidades de cada experimento e independientemente de la cantidad requerida, en todos los casos se tuvieron en cuenta elevados criterios de pureza con el objetivo de obtener resultados reproducibles. Los resultados presentados en esta sección corresponden a ejemplos representativos de la expresión y purificación de las diferentes construcciones de antígenos de BLV, llevadas a cabo a lo largo de las diferentes etapas de esta tesis.

La expresión bacteriana fue evaluada comparando los cultivos antes de la inducción y luego de 4 horas de inducción por SDS-PAGE seguida de tinción por Coomassie (sección 7.5.1). Para ello se normalizó la cantidad de biomasa, diluyendo las muestras en función de los valores de densidad óptica D.O. a 600nm para las proteínas H₆CA, NTDH₆ y H₆CTD tal como se muestra en la **Figura 27.A** (carriles NI, IND y S), mientras que los resultados para CAn fueron presentados en la tesis doctoral de Gonzalo Obal [89]. En todos los casos se obtuvieron niveles de expresión considerables en forma soluble.

Por su parte el análisis de los diferentes pasos de purificación fue realizado sembrando una alta concentración de muestra, con el objetivo de determinar la pureza de estas por densitometría (sección 7.5.2) y detectar contaminantes presentes incluso con baja concentración.

En el caso de las proteínas con *His-tag*, la purificación por cromatografía de afinidad fue suficiente para alcanzar los niveles de pureza requeridos y en tal sentido el segundo paso de purificación por SEC representó un control extra de pureza (ver **Figura 27.A**, carriles AF y SEC).

La **Figura 27.B** presenta el perfil de elución de NTDH₆ a partir de una columna de IMAC mediante aplicación de gradiente de imidazol, mientras que en la **Figura 27.C** se muestra el perfil de elución de *CTD con PBS, luego de ser clivado en la columna de IMAC (resultado constatado sistemáticamente tanto para *CTD como *CA). La aplicación de un gradiente de imidazol a continuación no evidencia la elución de material proteico demostrando que el total de la proteína fue clivado con trombina; además las proteínas clivadas en columna fueron sometidas a un segundo paso de IMAC, siendo colectadas en la fracción no unida como resultado de la remoción del *His-tag* (no mostrado). La trombina utilizada (conformada por dos cadenas de 5 y 35 kDa unidas por un puente disulfuro) fue eficientemente removida mediante aplicación de una columna de benzamidina conectada en serie con la IMAC, tal como lo demuestran los resultados de SDS-PAGE (**Figura 27.A**) y SEC (**Figura 27.D**). El perfil de elución por SEC presentado en la **Figura 27.D** corresponde a técnicas preparativas, de modo que en la mayoría de los casos se observa una saturación de la señal de A₂₈₀ como resultado de la alta concentración de proteína. En el caso de la proteína CAn (sin *tag* de purificación), el último paso de purificación fue una SEC, donde la misma eluyó aproximadamente a los 68mL en una columna Superdex 75, 16-60 (**Figura 27.E**).

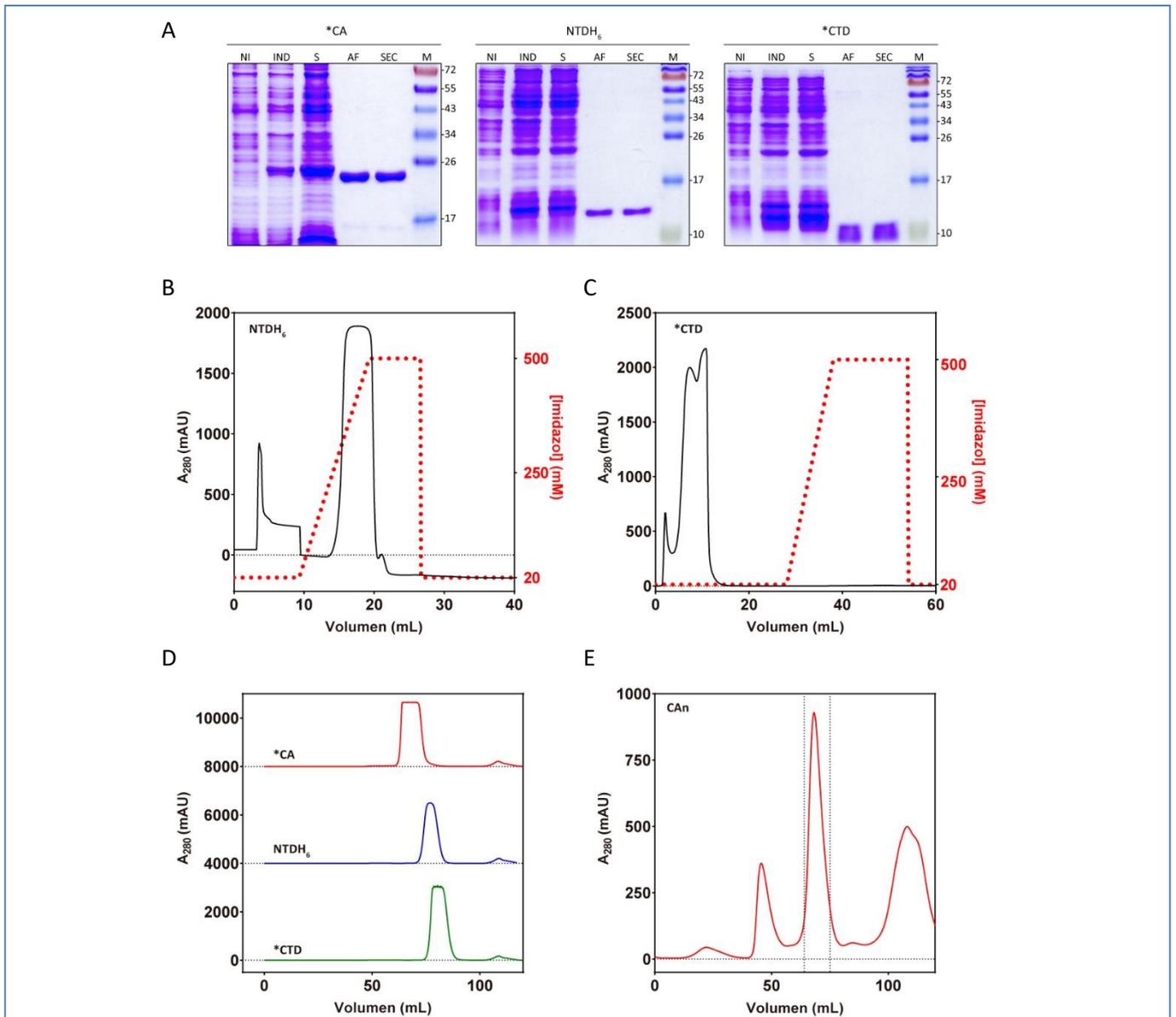


Figura 27. Expresión y purificación de proteínas de BLV: **A)** Análisis por SDS-PAGE y tinción con Coomassie de las fracciones correspondientes a la purificación de *CA, NTDH₆ y *CTD (NI, fracción total no inducida; IND fracción total inducida; S, fracción soluble inducida; AF, eluato de la cromatografía de afinidad; SEC, eluato de la gelfiltración; M, marcador de peso molecular). **B)** Elución con Imidazol de NTDH₆ a partir de una IMAC. **C)** Elución con PBS de *CTD clivado en columna de IMAC y aplicación posterior de un gradiente de imidazol. **D)** Purificación por SEC de las proteínas *CA, NTDH₆ y *CTD, utilizando una columna Superdex 75 16-60. **E)** Purificación por SEC de CAn (la fracción entre 64-75mL corresponde a la proteína pura).

La pureza, homogeneidad y el correcto tamaño de las proteínas purificadas fue evidenciado mediante técnicas analíticas como SDS-PAGE (Figura 27.A) o SEC analítica (no mostrado). Los valores de pureza determinados por densitometría luego del último paso de purificación mostraron en todos los casos valores entre 94 – 97 %. En aquellos casos que la pureza se ubicó por debajo de 90% o se detectó una banda de tamaño no esperado por SDS-PAGE, se realizó un segundo paso de purificación por SEC.

Todas las construcciones de proteínas de BLV recombinante utilizadas en esta tesis, mostraron altos rendimientos de producción luego de purificar y concentrar las muestras, evidenciando además una gran estabilidad en solución. Los rendimientos fueron variables entre diferentes “batches” y con las diferentes construcciones utilizadas. A modo meramente descriptivo, podemos decir que los rendimientos de producción de proteínas de BLV obtenidos a largo de esta tesis fueron superiores a 60 mg L⁻¹ de cultivo, con niveles de pureza promedio en el entorno del 95%.

8.2. GENERACIÓN DE LA LIBRERÍA DE NANOANTICUERPOS

8.2.1. INMUNIZACIÓN DE LLAMAS CON CABLV Y ANÁLISIS DEL TÍTULO DE ANTICUERPOS.

La proteína CA_{HIV} es considerada un inmunógeno débil [426, 427], sin embargo la respuesta de anticuerpos obtenida en llamas con CA_{BLV} fue aceptable incluso después de la segunda inmunización, con títulos de anticuerpos relativamente similares en todas las inmunizaciones y cerca de 80 veces superiores a los obtenidos con el control preinmune.

Las inmunizaciones #2 y #3 con CA_{BLV} arrojaron resultados muy similares cuando comparamos los títulos de anticuerpos. En la **Figura 28** se muestra el resultado de comparar la respuesta de anticuerpos después de las inmunizaciones 2 y 3 frente a una llama control sin inmunizar. El título promedio obtenido fue de 1:8900, lo cual representa un valor 82 veces superior al de la llama control de 1:108. Estos resultados fueron similares a los obtenidos con uno de los antígenos no relacionados utilizados en el mismo programa de inmunización (hPD1 con título promedio de 1:9800, 92 veces superior al de la llama control) sugiriendo que las inmunizaciones generaron una respuesta de anticuerpos aceptable y con títulos de anticuerpos dentro de lo esperado. El otro antígeno administrado en paralelo presentó valores sensiblemente superiores (TL1A con título promedio de 1:25.300, representando un valor 146 veces superior al de la llama control).

Se evaluó mediante ELISA el título de anticuerpos con inmunizaciones posteriores mostrando valores bastante similares, no obstante se utilizaron diferentes condiciones de inmovilización de antígeno y otros sueros anti-llama, arrojando valores de absorbancia diferentes (no mostrado). La quinta y sexta inmunización no pudieron ser evaluadas por ELISA debido a dificultades operativas relacionadas al manejo de los animales en el Zoológico Municipal.

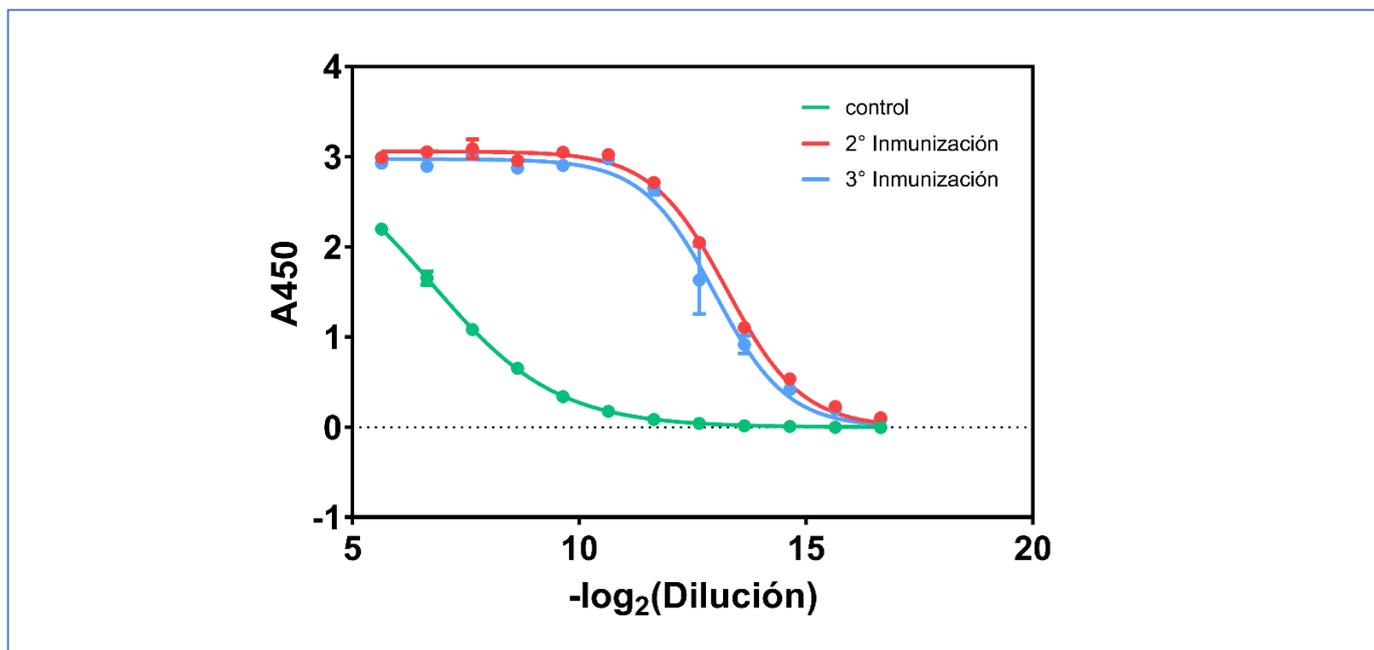


Figura 28: Título de anticuerpos de llama contra CA_{BLV}. Comparación de la respuesta de anticuerpos luego de las inmunizaciones 2 y 3. Los puntos representan el promedio de los duplicados y las barras de error la desviación estándar. Las curvas representan el ajuste por regresión no lineal de los datos a un modelo dosis-respuesta sigmoide de pendientes variables a partir del cual se determinó el título de anticuerpos.

8.2.2. PURIFICACIÓN DE LINFOCITOS Y EXTRACCIÓN DE ARN

A la luz de los resultados obtenidos luego de las inmunizaciones se decidió seguir adelante con la obtención de nanoanticuerpos. Previo a la purificación de linfocitos se optimizaron diversos parámetros como la dilución de las muestras de sangre y la aceleración y desaceleración del rotor durante la centrifugación en gradiente de Ficoll.

Para la obtención de linfocitos de llama a partir de 100mL de sangre heparinizada, se utilizaron tubos Falcon de 15mL con 5mL de sangre y 5mL de PBS obteniéndose una buena separación de fases: suero y eritrocitos separados por una fracción leucocítica (*buffy coat*) que pudo ser aislada correctamente (Figura 29.A). El número de células obtenidas fue de 1.57×10^8 células totales en 4mL de PBS. Luego de la extracción de ARN se obtuvieron 30 μg totales diluidos en 154 μL de agua a una concentración de 195 $\mu\text{g}/\text{mL}$, con un índice de pureza aceptable (relación $A_{260}/A_{280}=1.94$). La integridad del ARN purificado fue analizada por electroforesis en gel desnaturalizante de agarosa sembrando 4 μg de ARN (Figura 29.B), donde se observa la presencia de bandas discretas correspondientes a las subunidades ribosomales, lo cual confirma el éxito de la purificación. Dado que el marcador de peso molecular utilizado en este caso es para ADN, no fue posible extraer conclusiones acerca del tamaño de las subunidades ribosomales obtenidas no obstante este resultado permitió continuar con la estrategia de obtención de VHHs.

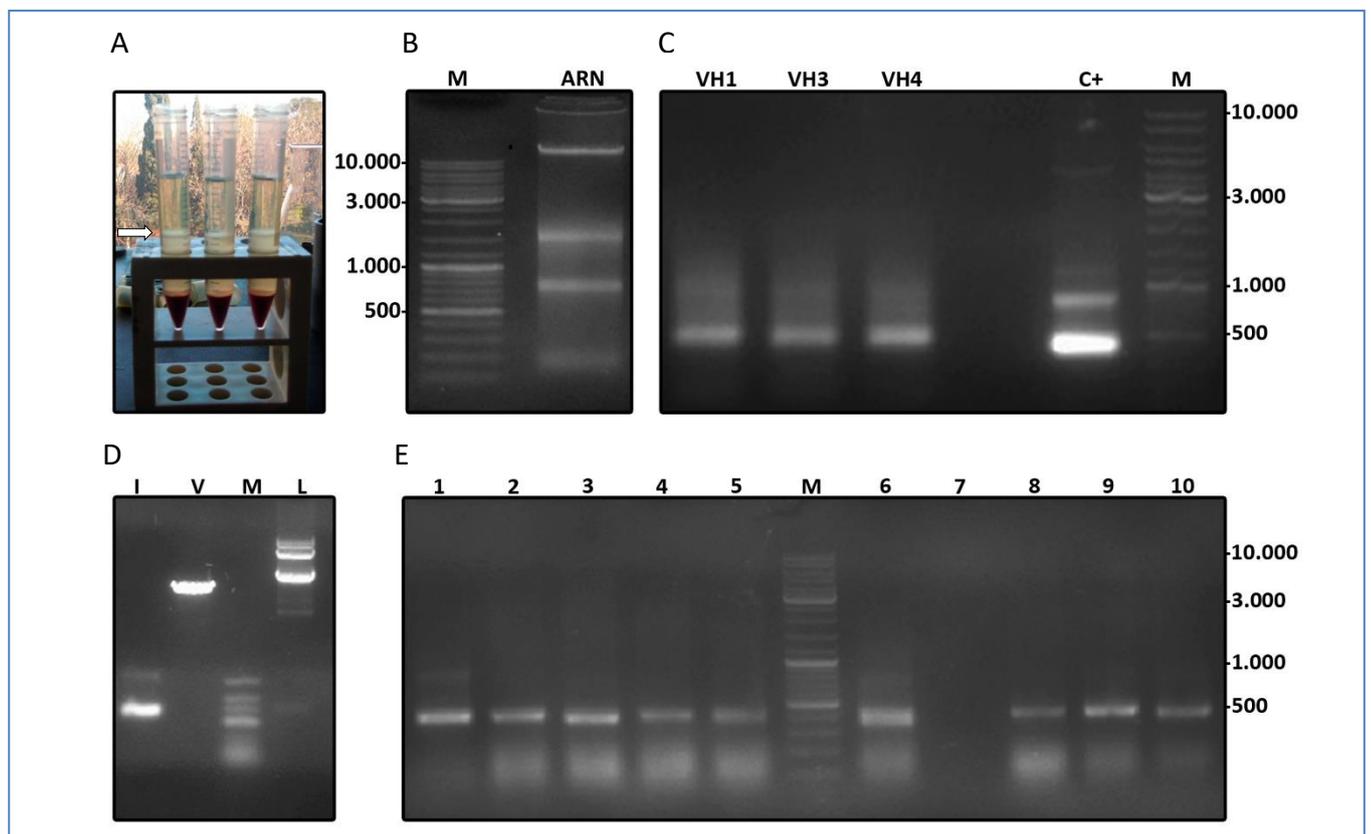


Figura 29: Generación de una librería de fagos y clonado en el fagémido pComb3x para su selección. **A)** Purificación de linfocitos mediante centrifugación de sangre en gradiente de Ficoll. La capa de linfocitos (*“buffy coat”*) se señala con una flecha de color blanco. **B)** Electroforesis en gel desnaturalizante de agarosa con 4 μg de ARN purificado a partir de linfocitos de llama. **C)** Electroforesis en gel de agarosa de las PCR para amplificar los genes VHH a partir del ADNc, utilizando el *primer* JH en combinación con diferentes *forward primers* (VH1, VH3 y VH4). En la PCR se incluyó como control positivo una secuencia de un VHH no relacionado (específico contra Triclocarbán, TCC). **D)** Electroforesis en gel de agarosa de la reacción de ligación de los genes VHH y el vector fagémido pComb3x (I, inserto; V, vector digerido; M, marcador de peso molecular; L, producto de ligación). Tanto la fracción de los insertos como el vector fueron digeridos con SfiI, purificados a partir de gel de agarosa y ligados con T4 ligasa. **E)** Electroforesis en gel de agarosa de 10 PCR de colonia utilizando los *primers* VH1, VH3, VH4 y JH.

8.2.3. GENERACIÓN DE LA LIBRERÍA DE FAGOS PRESENTADORES DE NANOANTICUERPOS

El ADNc de genes VH y VHH fue obtenido a partir de 2/3 del ARN linfocitario (20µg), y los genes VHH fueron amplificados a partir de la mitad del ADNc obtenido, utilizando los *primers* VH1, VH3 y VH4 (15 PCR de 50µL con cada *primer*). El tamaño de los amplicones obtenidos fue corroborado por electroforesis en gel de agarosa mediante comparación con el ADN codificante de un VHH no relacionado anti Triclocarbán (TCC) previamente caracterizado [375] dando fragmentos de alrededor de ≈400pb (Figura 29.C). La cantidad de ADN amplificado con cada *primer* fue de ≈20 µg (60 µg totales) los cuales fueron posteriormente digeridos con *Sfil* y purificados a partir de gel de agarosa. En paralelo también se digirieron con *Sfil*, 100 µg del fagémido pComb3x, el cual se purificó dos veces consecutivas a partir de gel de agarosa para evitar religaciones con los fragmentos de relleno (*stuffer sequences*) ya que las mismas se encuentran flanqueadas por sitios *Sfil*. Estos dos pasos consecutivos de purificación fueron responsables de una caída en el rendimiento (apenas se recuperó un 10% del material) no obstante fue suficiente para realizar los clonados en el fagémido.

La integridad de los insertos y el vector digeridos con *Sfil*, así como del producto de ligación se evaluó por electroforesis en gel de agarosa mostrando resultados concordantes con una ligación exitosa (bandas de diferente tamaño características de vectores cerrados con diferentes niveles de enrollamiento) con un tamaño mayor al del vector abierto (Figura 29.D). El total de fagémidos recombinantes fue utilizado para transformar mediante electroporación, la cepa bacteriana *E. coli ER2738*. Dicha cepa se utiliza en phage display debido a que es capaz de suprimir el codón stop UAG (amber) produciendo los VHHs ligados a la proteína pIII del fago M13 cuando es coinfectada por un fago *helper* (Figura 21.C). El tamaño de la biblioteca resultó ser del orden de 10^8 transformantes, por lo que se obtuvo una buena representación de la diversidad original considerando que se partió de un número similar de leucocitos. Un total de 35 colonias escogidas al azar fueron amplificadas directamente por PCR de colonia con los *primers* VHmix y JH dando lugar a fragmentos con el tamaño esperado en más del 97% de los casos (34 de 35). Esto permitió confirmar que la biblioteca presentaba los correspondientes genes VHH en un alto porcentaje (Figura 29.D). Una vez generados los fagos se alcanzaron títulos de $1,1 \times 10^{12}$ cfu/mL de aquellos que portan el pagémido (recuento en placas de ampicilina) y títulos de $6,50 \times 10^{10}$ cfu/mL (recuento en placas de kanamicina) correspondiente a fagos que empacaron el genoma del fago *helper*. Esto fue similar a lo obtenido por Rossotti *et al.* 2015 [399] lo cual se encuentra en total concordancia con los resultados usualmente obtenidos en librerías de fagos. La biblioteca obtenida fue debidamente identificada como **Librería Preimmune** y almacenada a -80°C.

8.2.4. SELECCIÓN DE FAGOS REACTIVOS POR PHAGE DISPLAY

Para la selección de fagos por *phage display* se realizaron cuatro rondas de *panning* con diferente cantidad de antígeno inmovilizado y diferentes procedimientos de lavado (tal como se describe en la sección 7.4.3.5). Al final de cada ronda se obtuvo una sub-biblioteca de fagos enriquecida que fue posteriormente amplificada mediante coinfección con el fago *helper* dando lugar a una librería amplificada que fue utilizada en la siguiente ronda. Las librerías fueron cuantificadas y los resultados se resumen en la Tabla 6. La disminución observada en el tamaño de la librería después de la ronda 2 se explica por la aplicación de condiciones de lavado más selectivas.

Tabla 6. Tamaño de la librería de fagos al final de cada ronda de panning. La cuantificación de la librería amplificada solo se llevó a cabo después de la primera ronda.

RONDA DE PANNING	*TAMAÑO LIBRERÍA SIN AMPLIFICAR	*TAMAÑO LIBRERÍA AMPLIFICADA
1	2.6x10 ⁷ cfu/mL	3.1x10 ¹² cfu /mL
2	3.3x10 ⁹ cfu /mL	-
3	3.8x10 ⁷ cfu /mL	-
4	1.3x10 ⁷ cfu /mL	-

* El volumen total fue de 600 µL

8.2.5. EVALUACIÓN DE LA ESPECIFICIDAD DE LA BIBLIOTECA SELECCIONADA

Dado que la llama utilizada para la generación de nuestra librería de fagos fue sometida simultáneamente a inmunizaciones con diversas proteínas, se expresaron en baja escala (sección 7.2.2.2) 10 clones provenientes de la segunda ronda de panning con cada una de las proteínas utilizadas durante la inmunización. En este caso las bacterias ER2738 transformadas con pComb3x fueron cultivadas e inducidas en ausencia de fago helper, y en estas condiciones los VHHs expresados con los péptidos HA y *His-tag* pueden detectarse en el sobrenadante debido principalmente a que la supresión del codón *amber* no es total. La detección de los mismos se llevó a cabo realizando un ELISA (de acuerdo a 7.6.1.1) con 10 clones seleccionados al azar provenientes de la segunda ronda de panning con cada uno de los diferentes inmunógenos y un VHH T11 anti Triclocarbán (TCC) previamente purificado ([375]). Se incluyeron además dos controles basados en BSA y el hapteno Triclocarbán (TCC).

Los resultados presentados en la **Figura 30** muestran que 9 de los 10 clones seleccionados contra CA_{BLV} después de la segunda ronda de panning, fueron capaces de reconocer la proteína inmovilizada y no presentan reactividad cruzada con los demás inmunógenos ni con BSA o el hapteno Triclocarbán. Solo por completitud se muestra que las rondas de panning realizadas en paralelo con los demás inmunógenos también fueron efectivas, demostrando además que esta metodología permite evaluar la reactividad de los clones directamente del sobrenadante de cultivo haciendo uso del tag HA presente en el fagémido pComb3x, sin necesidad de purificar los VHHs. También se utilizó una estrategia análoga frente a los dominios NTD y CTD de cápside, confirmando que la librería de fagos presentaba clones específicos contra ambos dominios (no mostrado). La misma fue debidamente identificada como **Librería anti CA_{BLV}** y almacenada a -80°C.

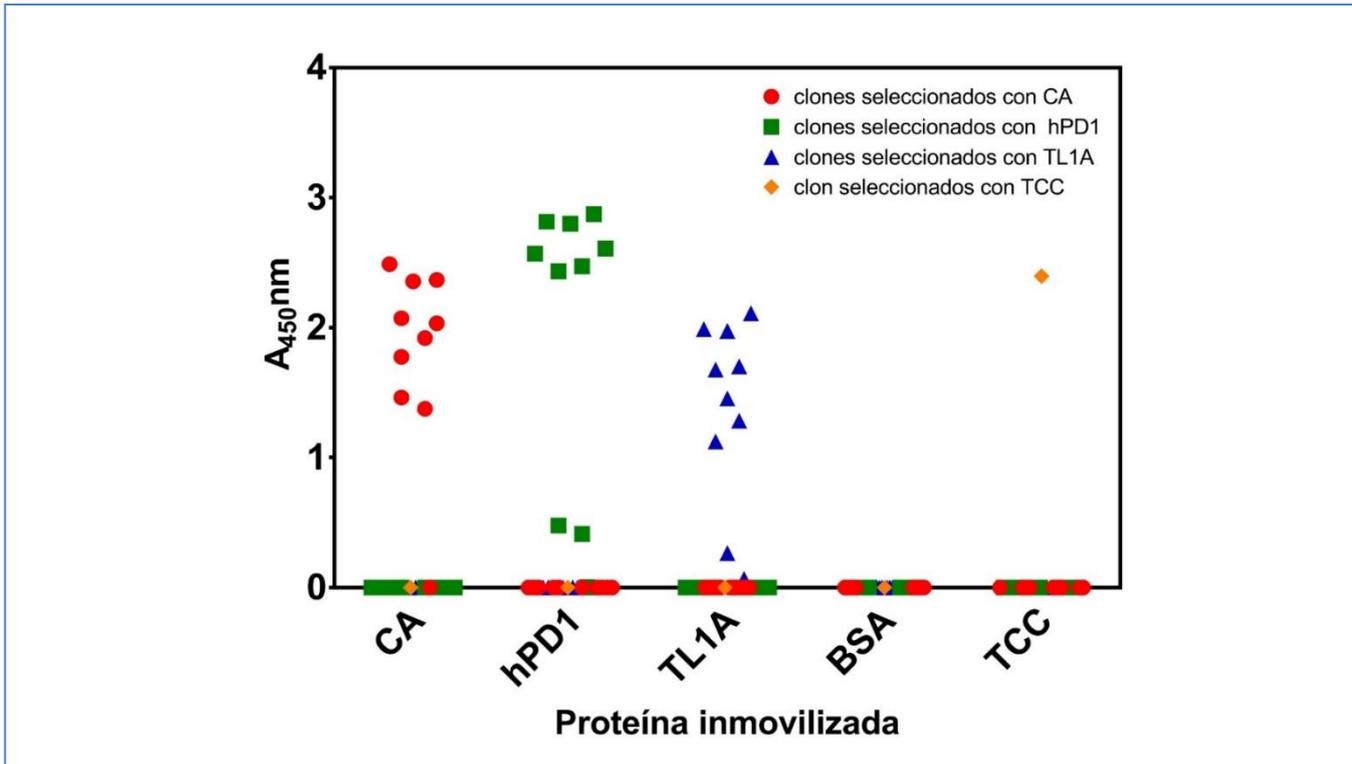


Figura 30: Análisis de especificidad de clones seleccionados a partir de la segunda ronda de panning. Diez clones seleccionados aleatoriamente a partir de la segunda ronda de panning con CA_{BLV} (rojo), fueron evaluados por ELISA en forma cruzada contra los tres antígenos utilizados para inmunizar la llama. También se incluyó el análisis cruzado de 10 clones seleccionados de igual forma contra los otros inmunógenos (hPD1 y TL1A en verde y azul respectivamente). Se evaluó la reactividad contra BSA como control negativo y el clon T11 no relacionado (contra Triclocarbán) como control positivo.

8.2.6. CLONADO “EN MASSE” EN pINQ-BtH6 Y EXPRESION DE VHHs BIOTINILADOS

Una vez que se corroboró la especificidad de la librería de fagos frente a CA_{BLV} y sus dominios, se procedió a clonar la librería en el vector pINQ-BtH6, con el objetivo de producir VHHs contra CA_{BLV} en forma aislada (no unidos a fagos) y biotinilables *in vivo* en las antípodas del paratope. Esto representa una gran ventaja desde el punto de vista de su uso en diagnóstico o para la inmovilización de VHHs de forma orientada [428-430], sin embargo en nuestro trabajo explotaremos esta característica durante la selección de clones aplicando diversos criterios.

Para el clonado se seleccionaron los eluatos de las rondas de panning 2 y 3 (ya que el eluato de la ronda 4 se hizo como alternativa al tres y presentó una variabilidad muy similar a este), y se clonaron los genes VHH en el vector pINQ-BtH6 para finalmente transformar la cepa BL21 (DE3) previamente transformada con el plásmido pCY216 portando el gen BirA codificante de la biotina ligasa [400] y producir los VHHs en forma biotinilada. Este clonado se llevó a cabo ponderando la eficiencia de transformación para minimizar la pérdida de diversidad, la cual fue considerada el precio a pagar por tener una biblioteca de nanoanticuerpos específicos contra CA_{BLV}, con capacidad de ser producidos en un área convencional de producción de proteínas recombinantes libre de fagos y con una molécula de biotina ligada al residuo Lys del péptido BAP.

Las bibliotecas enriquecidas de nanoanticuerpos anti CA_{BLV} provenientes de las rondas 2 y 3 y clonadas en el vector pINQ-BtH6 fueron almacenadas a 4°C e identificadas como **pINQ-BtH6 anti CABLV 2 y 3**.

Luego de transformar bacterias BL21 (DE3) conteniendo el plásmido pCY216 se seleccionaron de manera aleatoria 95 clones VHH (los clones 1-64 pertenecientes a la segunda ronda de panning por ser la más variable y del 65-95

pertenecientes a la tercera), los cuales se expresaron en forma biotinilada en mini-cultivos de 1mL. Esto representó una disminución muy grande del repertorio de nanoanticuerpos, pero nos permitió aplicar criterios de selección de clones (tal como se describe en la próxima sección), para ser producidos a mayor escala y caracterizar su interacción con la proteína CA_{BLV}.

8.3. SELECCIÓN DE CLONES DE INTERÉS

Estrictamente hablando, el primer “criterio” de selección aplicado fue el azar ya que pasamos desde una librería de VHHs con un tamaño de varios ordenes de magnitud (10^7 si no hubiéramos perdido diversidad durante el clonado *en masse*) a un reducido grupo de 95 clones aislados (provenientes de las rondas 2 y 3) y seleccionados en forma totalmente aleatoria.

Esto representó una caída enorme en el tamaño de la librería analizada, sin embargo fue necesario pasar a un número asequible de clones para comenzar a entender cuáles son las características de los nanoanticuerpos producidos. En paralelo, la posibilidad de que las librerías **Preimmune**, **Anti CA_{BLV}** y **pINQ-BtH6 anti CABLV 2 y 3** puedan contar con clones diferentes que sean funcionales a nuestras necesidades debe ser tenida en cuenta a la hora de edificar perspectivas a partir de este trabajo.

8.3.1. CRITERIO DE SELECCIÓN 1: EXPRESIÓN A BAJA ESCALA

En primer lugar, se evaluó la expresión y purificación a baja escala de los 96 clones seleccionados (incluyendo el VHH control no específico), con el propósito de descartar aquellos clones que no se expresan en forma correcta. Los VHH correspondientes fueron expresados y purificados por cromatografía de unión a metales en formato *high throughput*.

La **Figura 31** presenta una composición de imágenes creada a partir de 7 corridas independientes de SDS-PAGE con geles al 15%, llevadas a cabo con el fin de analizar los resultados de la purificación por cromatografía de afinidad a baja escala de los 95 clones VHH seleccionados. Todos los clones fueron expresados y purificados, aunque con rendimientos variables, donde algunos como los clones 59, 67 y 93 presentan rendimientos muy bajos por SDS-PAGE, mientras que otros mostraron una cantidad de proteína sensiblemente superior. En todos los casos los clones purificados presentan un peso molecular aproximado entre 14-15KDa. En algunos casos se detectó más de una banda, lo cual podría estar asociado a productos de degradación, anomalías en la migración electroforética o presencia de más de un VHH con pesos moleculares diferentes (aun cuando los mismos provienen de colonias aisladas).

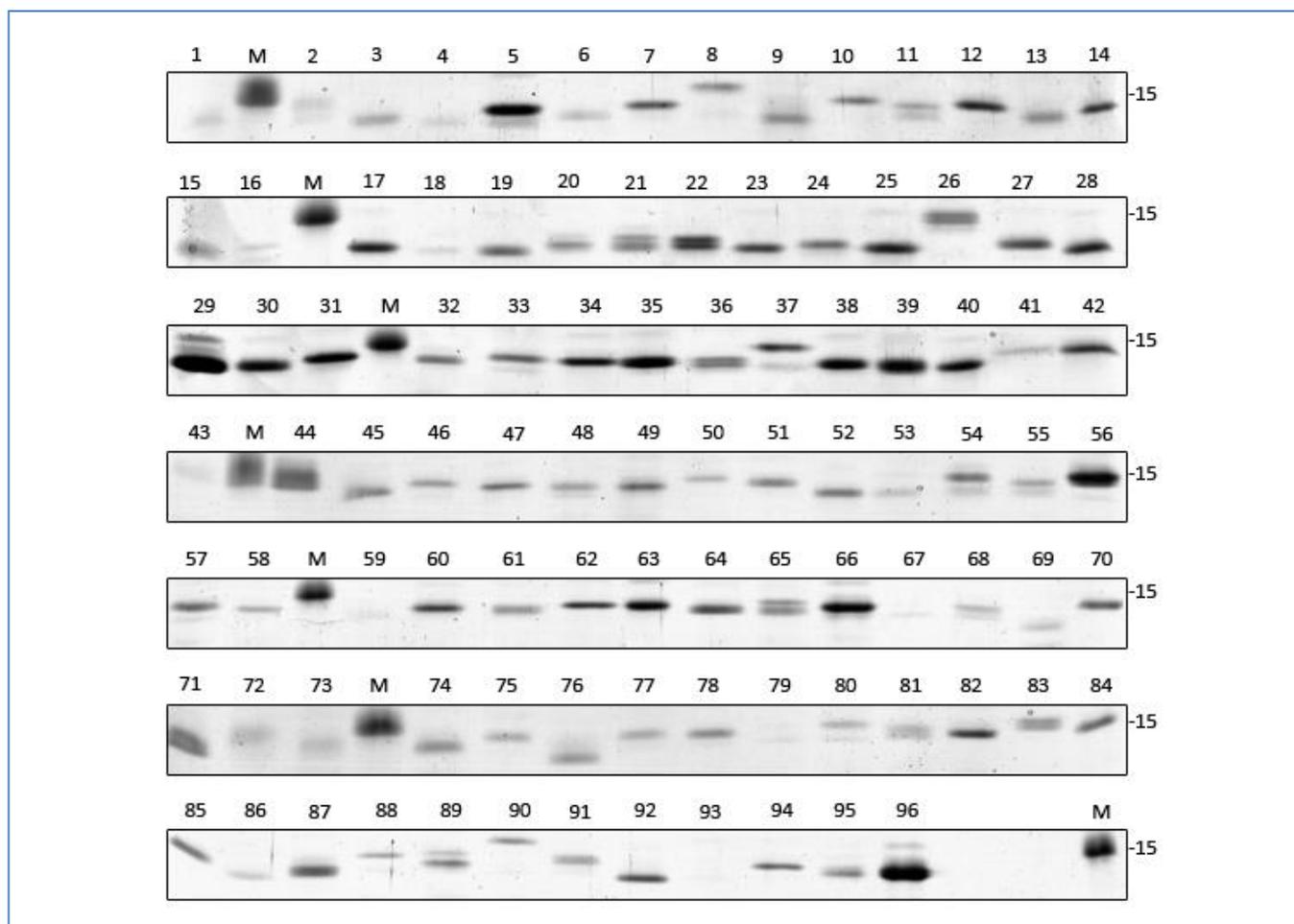


Figura 31: SDS PAGE teñido con Coomassie para evaluar la purificación de 95 clones de VHH por cromatografía de afinidad a baja escala. Los niveles de expresión de los diferentes clones son heterogéneos, con pesos moleculares variables en el entorno de 14-15 kDa. El clon 96 corresponde a un VHH no relacionado como control.

8.3.2. CRITERIO DE SELECCIÓN 2: MAPEO ANTIGÉNICO

Se realizó una prueba ELISA inmovilizando *CA, NTDH6 y *CTD en diferentes pocillos, con el objetivo de clasificar los VHH biotinilados dentro de cuatro categorías posibles: aquellos clones que exclusivamente reconocen CA_{BLV} a través del CTD (**CTD**), aquellos que lo hacen exclusivamente a través del dominio NTD (**NTD**), aquellos clones que reconocen ambos dominios de CA_{BLV} (**MIXTO**) y aquellos clones que no reconocen ninguno de los dos dominios de CA_{BLV} por ELISA (**NEGATIVOS**). El criterio fue arbitrario considerando reactivos a aquellos clones con una absorbancia superior a 1.0 (obtenida luego de restar la señal obtenida con el clon 96 no relacionado). Los resultados correspondientes al ELISA contra ambos dominios de CA_{BLV} se presentan en la Figura 32, agrupados de acuerdo con la categoría asignada. Todos los clones con capacidad de unirse a alguno de los dominios arrojaron resultados positivos contra *CA (no mostrado). Por su parte los clones negativos (44 y 93) tampoco reconocieron *CA, sugiriendo que la ausencia de señal no se debe al reconocimiento de residuos ausentes en las construcciones de los dominios (región bisagra), sino más bien a falta de reactividad, ausencia de biotinilación in vivo, problemas de estabilidad de los VHH o bajo nivel de expresión (como se demuestra en el apartado 8.3.1 para el clon 93).

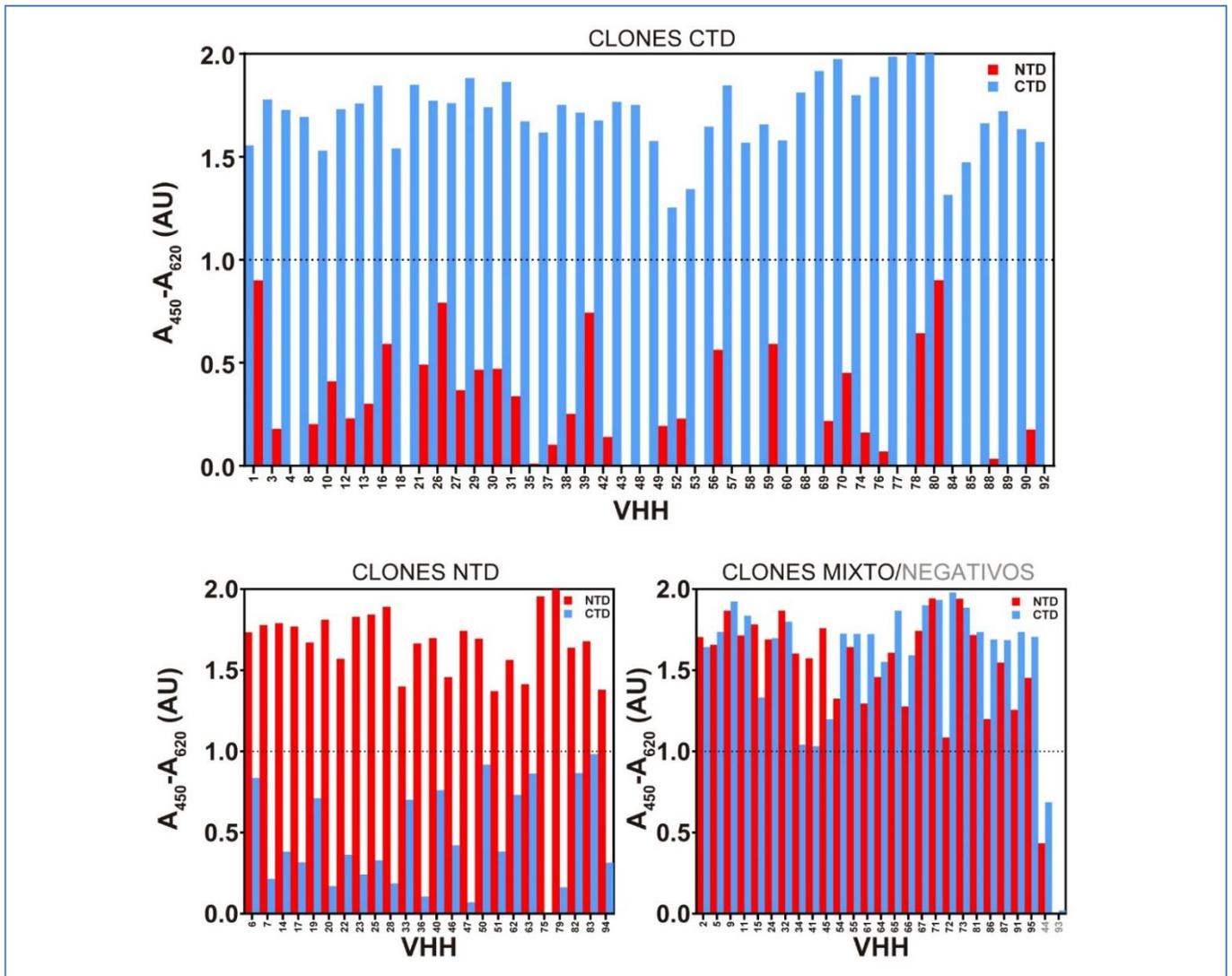


Figura 32: Mapeo antigénico de VHHs por ELISA. Se presentan los resultados del ELISA realizado para definir la reactividad de los 95 clones seleccionados al azar contra los dominios de CA_{BLV} . Los resultados obtenidos luego de restar la absorbancia obtenida con un clon no reactivo (VHH96) se presentan agrupados en función de las categorías definidas en forma arbitraria: clones específicos contra el CTD (*panel superior*), clones específicos contra el NTD (*panel inferior izquierdo*) y clones con capacidad de reconocer ambos dominios o ninguno de ellos (*panel inferior derecho*). Los clones negativos se señalan en color gris.

Estos resultados demuestran además que el protocolo de biotilación *in vivo* fue efectivo, al menos con todos los clones considerados positivos contra alguno de los dominios. La Tabla 7 resume el resultado de esta caracterización por ELISA mostrando que un 46% reconoce exclusivamente el CTD, un 25% reconocen exclusivamente el NTD y un 26% reconoce CA_{BLV} a través de ambos dominios. Si bien la muestra no es significativa debido a su pequeño tamaño, los resultados podrían permitir sugerir que el dominio CTD podría ser más inmunogénico que el NTD, teniendo en cuenta que un número mucho mayor de clones reconocen este dominio a pesar de presentar un menor tamaño. De hecho, casi la totalidad de los VHH (incluso aquellos que fueron categorizados como específicos contra NTD por presentar una interacción mucho más marcada con este dominio) presentan algún tipo de interacción basal con el dominio CTD por ELISA. Otra explicación posible para esta supremacía de nanoanticuerpos reactivos contra este dominio podría ser que durante las rondas de *panning* (donde los fagos se incubaron durante tres días con el antígeno inmovilizado sobre placas de poliestireno y en presencia de detergente), el dominio NTD sea más propenso a sufrir algún tipo de desestabilización conformacional afectando su estructura terciaria y en consecuencia se hayan seleccionado un mayor número de clones reactivos contra el CTD.

Tabla 7. Clasificación de clones por ELISA de acuerdo con el dominio de CA_{BLV} reconocido y su afinidad relativa definida de acuerdo a la sección 8.3.3.

AFINIDAD RELATIVA	CTD (44 clones)	NTD (24 clones)	MIXTO (25 clones)	NEGATIVOS (2 clones)
Alta	8	19	2	
	12	63	9	
	13	75	32	
	16		55	
	39		87	
	42		95	
	56			
	78			
Media	3	7	5	
	10	17	15	
	21	20	34	
	26	23	41	
	27	36	54	
	30	50	61	
	31	83	64	
	35		65	
	37		72	
	38			
	43			
	48			
	69			
	70			
76				
88				
90				
Baja	1	6	11	
	4	14	24	
	18	22	45	
	29	25	66	
	49	28	67	
	52	33	71	
	53	40	73	
	57	46	81	
	58	47	86	
	59	51	91	
	60	62		
	68	79		
	74	82		
	77	94		
	80			
84				
85				
89				
92				
Negativos				44
				93

8.3.3. CRITERIO DE SELECCIÓN 3: AFINIDAD RELATIVA

Dado que los 95 clones presentan niveles de expresión muy dispares, resulta inviable correlacionar el valor de absorbancia del ELISA anterior, con la afinidad de estos por los respectivos dominios. Para tener una idea de la afinidad relativa de los clones aislados, se puso a punto un ELISA consistente en inmovilizar cantidades iguales de avidina en todos los pocillos de la placa, saturar cada pocillo con un exceso de VHH biotinilado y adicionar *CA conjugada a HRP (*CA-HRP) para evaluar la cantidad de CA_{BLV} unida a cada VHH. La cantidad de avidina utilizada para sensibilizar las placas y las diluciones de eluatos de VHH fueron optimizadas para independizarnos de los niveles de expresión, de modo que la señal obtenida sea proporcional a la afinidad/avidez de los clones.

Se realizaron dos experimentos independientes mostrando resultados similares y se obtuvieron valores promedio de absorbancia a 450nm desde 1.46 hasta 0.04, permitiendo categorizar los clones en 3 rangos de afinidad relativa, definidos de forma arbitraria: Alta ($A_{450} \geq 0.8$), Media ($0.8 > A_{450} > 0.2$) y Baja ($A_{450} \leq 0.2$) tal como se detalla en la Tabla 7. Los límites de absorbancia para definir cada categoría fueron escogidos en forma arbitraria y la cantidad de VHHs distribuidos en cada categoría no constituye un dato significativo

Más allá de que 2/3 de los 95 clones aislados pertenecen a la ronda 2 de panning (solo 1/3 pertenecen a la ronda 3 debido a la notoria disminución del tamaño de la biblioteca), resulta sorprendente que los clones de las categorías con afinidades alta y media hayan sido mayoritariamente seleccionados con la ronda 2 de panning. Teniendo presente que el tamaño de la muestra es muy bajo en comparación con el de la biblioteca y por ende es incorrecto extraer conclusiones definitivas, tomamos la cantidad de VHH en cada categoría e hicimos correcciones para independizarnos del mayor número de clones provenientes de las diferentes rondas de panning. Así, encontramos que las categorías con afinidad alta y media presentan alrededor de un 60% de clones provenientes de la ronda 2 de panning. Por su parte el 60% de los clones pertenecientes a la categoría con afinidad baja tiene su origen en la tercera ronda de panning.

En caso de existir un sesgo de este tipo, una explicación posible sería que durante las rondas de panning 3 y 4 llevadas en condiciones más agresivas, la proteína CA_{BLV} inmovilizada haya sufrido algún tipo de desnaturalización (similar a la propuesta con el NTD para explicar el mayor número de clones reactivos contra el CTD) y en consecuencia se hayan seleccionado clones de menor afinidad por la proteína nativa en las rondas finales. Otra hipótesis basada en la fuerte presencia de clones de baja afinidad en la categoría mixta proveniente de la ronda de panning 3, es que las rondas 3 y 4 hayan favorecido la selección de clones de menor afinidad, pero con capacidad para interactuar con ambos dominios de CA_{BLV}.

Ante estos resultados inesperados teniendo en cuenta que las sucesivas rondas de panning deberían seleccionar clones con mayor afinidad, algunos clones clasificados por su afinidad dentro de las categorías Alta y Baja fueron testeados en forma cualitativa por SPR para confirmar los resultados obtenidos por ELISA (Figura 33). Para esto, diluciones idénticas de la purificación de VHHs a baja escala fueron inyectadas durante dos minutos sobre un chip CM5 con *CA_{BLV} inmovilizada. Los clones de alta afinidad (2, 16, 32 y 42) mostraron una señal de asociación característica en contraposición con los clones de baja afinidad (14 y 40), validando los resultados obtenidos por ELISA y permitiéndonos incorporar el criterio de selección de clones en función de su afinidad relativa. Las concentraciones no fueron ajustadas en este experimento. De todos modos, se incluyeron clones positivos que mostraron niveles bajos de expresión (VHH2 y VHH16) junto con clones positivos que mostraron niveles de expresión superiores (VHH32 y VHH42), no observándose diferencias notorias en el perfil de las curvas de asociación y disociación.

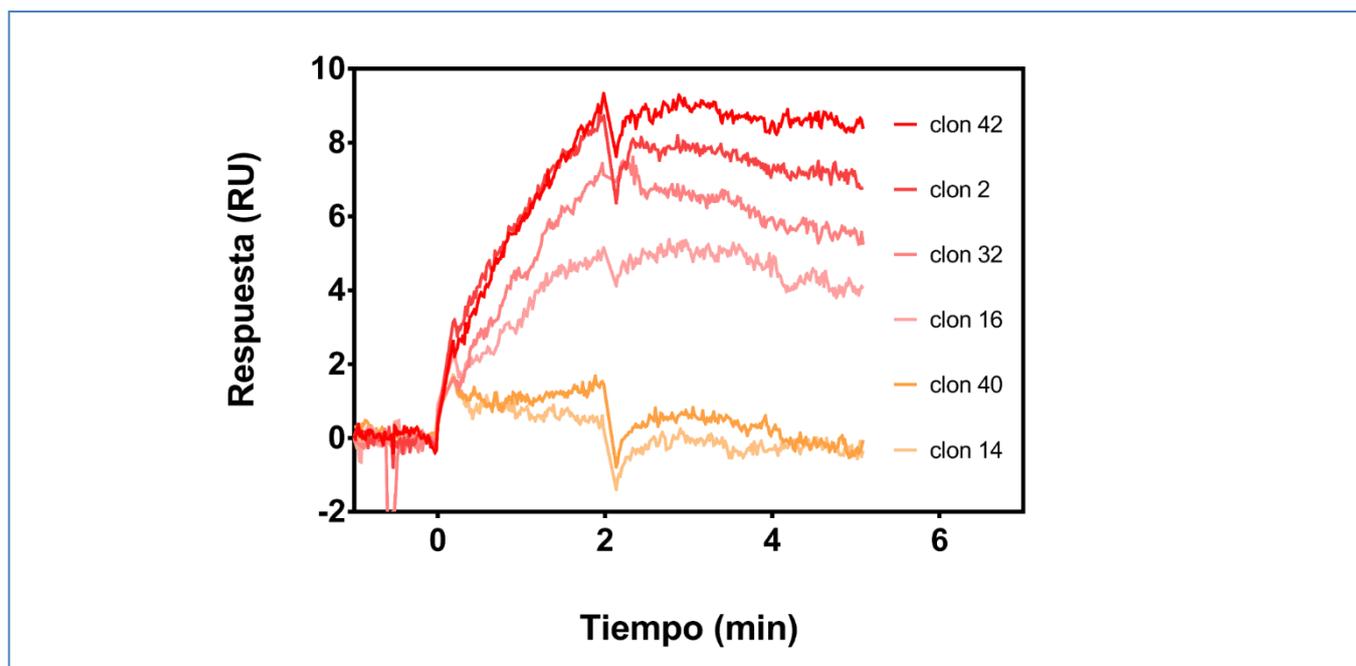


Figura 33: Análisis cualitativo por SPR de clones de VHH de alta y baja afinidad de acuerdo con la clasificación por ELISA. Seis VHHs purificados a baja escala y clasificados por ELISA como de alta afinidad (tonalidades de rojo) y de baja afinidad (tonalidades de anaranjado) fueron analizados por SPR mediante inyecciones de dos minutos sobre CA_{BLV} inmovilizada en la superficie de un chip. La respuesta se obtiene por sustracción de la señal de una superficie control sin CA_{BLV}.

8.3.4. CRITERIO DE SELECCIÓN 4: VARIABILIDAD DE SECUENCIA

Una vez que los 95 clones fueron categorizados en función de la afinidad y de la región antigénica, se seleccionaron algunos de ellos para purificar plásmidos y secuenciar los genes VHH, con el objetivo de analizar la variabilidad de secuencia y descartar clones redundantes. Además, se priorizaron aquellos clones que no presentan heterogeneidad de tamaños por electroforesis (Figura 31). Los clones seleccionados se crecieron sobre placas de LB agar suplementado con antibióticos, sembrando diluciones que permitieron obtener colonias aisladas (< 30 por placa). A partir de tres colonias diferentes por cada VHH (designadas con la letra *a*, *b* o *c*) se purificó el ADN plasmídico con el propósito de asegurar que el material secuenciado corresponda a una única copia. Además, se repitió el experimento de mapeo antigénico por ELISA y se seleccionaron aquellos clones que presentaron baja reactividad cruzada entre dominios para purificar el ADN y secuenciar. En este caso se encontró un número menor de clones con reactividad cruzada entre dominios sugiriendo que esto podría ser consecuencia de la presencia de más de un VHH en la selección inicial.

Si bien la eficiencia de producción de plásmidos a partir de la cepa BL21 (DE3) es baja en comparación con cepas de *E. coli* modificadas para este fin, y el plásmido pET28a del cual deriva el plásmido pINQ-BtH6 se produce en un bajo número de copias, fue posible purificar y secuenciar de manera correcta algunos de los clones escogidos. El secuenciado se llevó a cabo utilizando los *primers* universales **T7 forward** y **T7 Terminal reverso**, y solo se consideraron aquellos clones para los que se obtuvo la secuencia completa del gen VHH en ambos sentidos.

Se obtuvieron secuencias completas para seis VHHs específicos contra ambos dominios incluidos en las categorías de afinidad relativa alta y media. En el caso de los clones con capacidad de reconocer ambos dominios, solo se obtuvieron secuencias de dos clones categorizados con afinidades media y baja (Tabla 8).

De los 8 clones para los que se obtuvo la secuencia completa en ambos sentidos, dos fueron originalmente amplificados con el *primer* VH1 (19a y 51a), tres con el *primer* VH3 (8c, 42c y 41b) y tres con el *primer* VH4 (17b, 23b y 31b), denotando una distribución acorde al diseño experimental. El alineamiento de las secuencias

aminoacídicas fue realizado utilizando CLUSTAL/OMEGA y su presentación en forma gráfica posteriormente modificada de acuerdo con el sistema de numeración global IMGT. Esto permitió evidenciar la presencia de ciertos elementos característicos de la estructura primaria de los VHHs (Figura 34) y así comparar las secuencias de los clones seleccionados.

Tabla 8. Clones para los que se obtuvo la secuencia completa de genes VHH.

CLONES SECUENCIADOS	MAPEO ANTIGÉNICO/AFINIDAD		
	CTD	NTD	MIXTO
VHH8c	Alta		
VHH42c	Alta		
VHH31b	Media		
VHH19a		Alta	
VHH17b		Media	
VHH23b		Media	
VHH41a			Media
VHH51a		Baja	

En primer lugar, vale destacar la presencia de las secuencias intactas del péptido líder OmpA, el péptido de biotilación (BAP) y el *tag* de purificación (H6) en la totalidad de los clones. Ciertos residuos conservados en los que se basa el sistema de numeración global IMGT como C₂₃, L₈₉ y C₁₀₄ están presentes en las 8 secuencias aisladas, mientras que W₁₁₈ solo está ausente en el clon 19b y W₄₁ está presente en la mayoría (con excepción de 8c, 31b y 42c).

En cuanto a las regiones framework, FR4 es la más conservada, lo cual no resulta sorprendente dado que buena parte de esta es codificada por el único *reverse primer* JH utilizado durante la amplificación de genes VHH para la preparación de la biblioteca. En el mismo sentido, la región FR1 posee cierta variabilidad al inicio de su secuencia heredada de los tres *forward primer* VH1, VH3 y VH4 utilizados. Las regiones FR2 y FR3 poseen cierto grado de variabilidad propio de la secuencia de los VHH seleccionados y se destaca la presencia de sustituciones características de las regiones variables de anticuerpos de cadena pesada en la región FR3 de algunos clones: residuos F₄₂ o Y₄₂ y R₅₀ en todos los clones excepto el 19b, E₄₉ en los clones 41a y 42c y residuos G₅₂ y L₅₂ en los clones 19b y 51a.

Se realizó también un alineamiento de secuencias según el IMGT [402, 403] permitiendo analizar los posibles orígenes de cada clon. La región N-terminal de los dominios variables de llama pueden ser originados a partir de ocho genes diferentes que integran el subgrupo IGHV3 (conformado por IGHV3S1-IGHV3S8 donde S7 y S8 corresponden a pseudogenes) y que dan origen a FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3 y parte inicial del CDR3). Por su parte el extremo final del CDR3 y FR4 es codificado por uno de seis genes diferentes del subgrupo IGHJ (IGHJ1 a IGHJ6 donde IGHJ1 es un pseudogen).

De acuerdo al alineamiento IMGT, el gen IGHV3S3 se presenta como el candidato más probable de codificar la región N-terminal de la mayoría de los clones, con porcentajes de identidad de 71.1% (VHH31b), 71.9% (VHH17b), 73% (VHH23b), 73.2% (VHH42c) y 76.3% (VHH8c), mientras que otros clones mostraron mayor identidad con los genes IGHV3S1 (68.8% en el VHH51a), IGHV3S2 (76.5% en el VHH41a) e IGHV3S6 (79.4% en el del VHH19a).

Por su parte el extremo C-terminal parece originado exclusivamente por el gen IGHJ4 con porcentajes de identidad entre 83.3-100%, sin embargo esto es el resultado del uso de un único *primer* JH reverso que presenta homología de secuencia con este gen. No podemos descartar que durante la amplificación de los genes VHH, este *primer* haya sido capaz de amplificar secuencias derivadas de otros genes del grupo IGHJ teniendo en cuenta que comparte un alto grado de similitud con los demás genes de este grupo; en tal caso el residuo Gln₁₂₃ habría sido impuesto por el *primer* JH durante la amplificación y en su lugar habría un residuo Leucina.

Los CDR1 y CDR2 poseen longitudes normales (entre 7-8 residuos) mientras que los CDR3 poseen de 10-14 residuos, siendo los clones 8c, 42c y 31b los que poseen los CDR3 más largos. Los CDR3 de todos los clones secuenciados son más cortos que la media de los hcAbs (estimada en 15 residuos [431]) y no poseen cisteínas no canónicas. La presencia de estas es una característica mucho menos frecuente en VHHs de llama respecto a otros camélidos donde es habitual la presencia de CDR3 largos estabilizados por puentes disulfuro *inter-loops* [313, 317, 320].

Cuando se analizó la identidad de secuencia de los VHH considerando la secuencia total o únicamente los CDRs, se obtuvieron resultados similares, lo cual es esperable teniendo en cuenta que estas regiones son las principales determinantes de variabilidad.

Encontramos mayor homología entre aquellos clones que reconocen exclusivamente un dominio respecto del resto, tal como se muestra en las representaciones filogenéticas de la **Figura 34.B**. Por ejemplo, los clones que reconocen exclusivamente el CTD se agrupan juntos, denotando mayor homología entre los clones VHH42c y VHH31b respecto del VHH8c. Por su parte entre los clones que reconocen exclusivamente el dominio NTD, vemos que el VHH17b y VHH23b se diferencian únicamente por dos residuos en la región FR3, por lo que son considerados redundantes. El VHH19a se agrupa junto a estos, pero presentando una identidad de secuencia más baja (podría tratarse de un VH en lugar de un VHH, teniendo en cuenta que algunas de las sustituciones en la FR2 típicas de VHH no se encuentran en esta construcción) y el 51a se presenta más apartado de estos. En cuanto al clon que reconoce ambos dominios, se ubica separado del resto, aunque más relacionado con el grupo que reconoce el CTD. Incluso con algunos clones se evidencia una aparente correlación entre las afinidades relativas estimadas por ELISA y la identidad de secuencia, no obstante, la forma en que fueron obtenidos los datos de afinidad relativa y el bajo número de secuencias analizadas, no permiten confirmar de manera inequívoca esta relación.

La relación entre el árbol filogenético creado y los datos de afinidad relativa y de mapeo antigénico, podría representar un primer paso hacia la identificación de nanoanticuerpos anti CA_{BLV} funcionalmente interesantes, mediante aplicación de técnicas de secuenciado masivo como método alternativo [432].

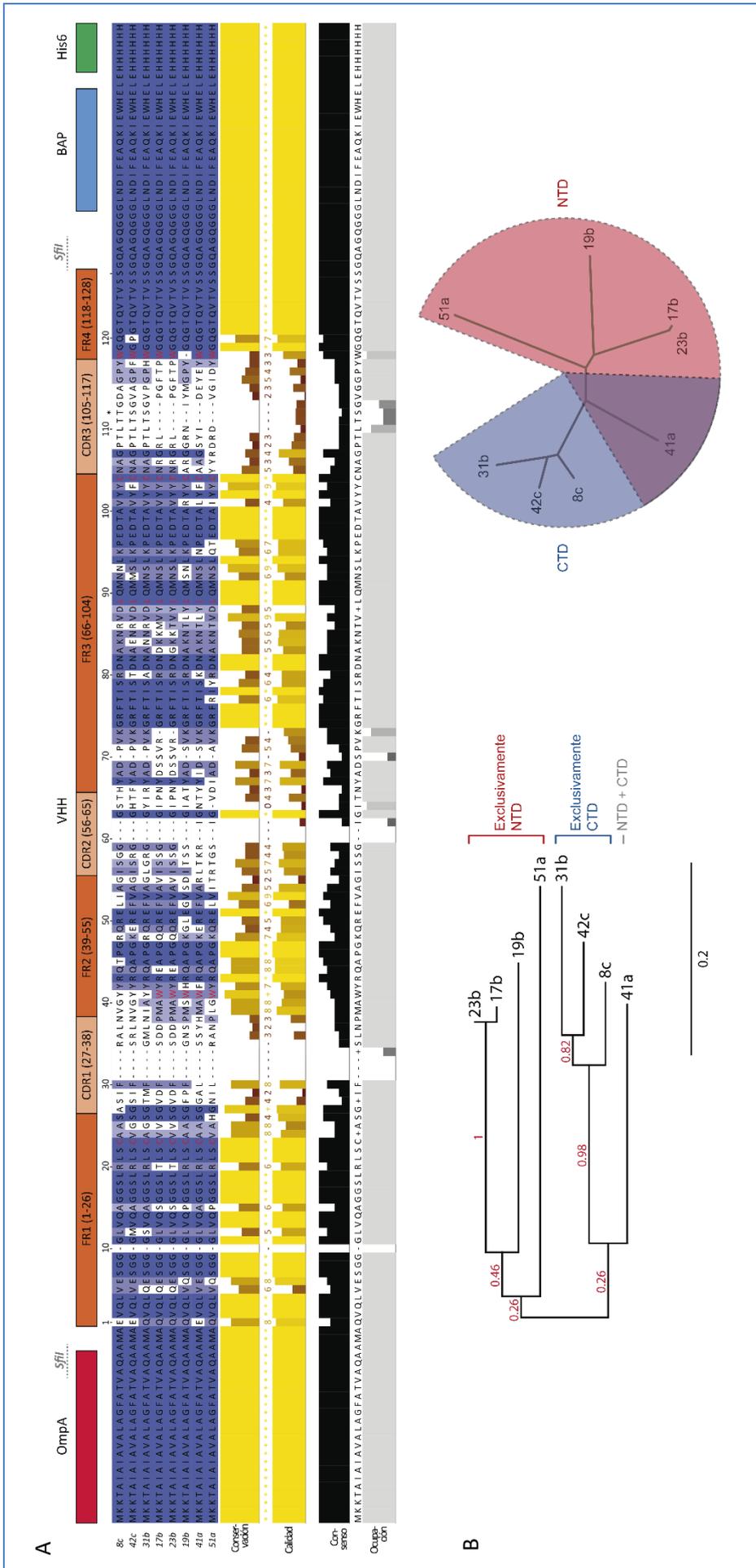


Figura 34: Análisis de secuencias aminoacídicas de los clones aislados. A) Alineamiento modificado de acuerdo al sistema de numeración IMGT con los residuos utilizados como referencia (C23, W41, L89, C104 y W118) representados en rojo. En la parte superior se detalla con bloques de colores los dominios de las construcciones más relevantes (secuencia líder OmpA, péptido de biotilación BAP, His tag, y las regiones *framework* y CDRs de los VHH) **B)** Representación redundante en forma de cladograma y árbol filogenético con disposición radial, realizado a partir de las secuencias completas de VHHs. Se destaca la separación en clusters de los nanoanticuerpos que reconocen dominios diferentes. Para la representación de los árboles se utilizó el sitio web <https://www.phylogeny.fr/> [433].

8.4. CARACTERIZACIÓN INICIAL DE VHHs 8c Y 19a

En función de los criterios expuestos en la sección anterior, se seleccionaron los clones 8c y 19a para caracterizar su interacción con CA_{BLV}. Esta decisión se tomó teniendo en cuenta que: ambos se expresan bien y se purifican dando una banda única por SDS PAGE, poseen secuencias bien diferenciadas manteniendo todas las características propias de nanoanticuerpos y reconocen dominios diferentes de CA_{BLV} en forma específica, sin presentar reactividad cruzada y con afinidades relativas aparentemente más altas que el resto. El hecho de enfocarnos en estos clones no impide que en un futuro sea posible seleccionar clones diferentes a partir de la biblioteca anti CA_{BLV}.

En tal sentido cabe aclarar que, a partir de las colonias únicas obtenidas, se volvieron a expresar los VHH biotinilados a baja escala y se repitió el ELISA contra los dominios NTDH6 y *CTD, constatándose la ausencia de reactividad cruzada entre dominios.

En esta sección buscamos optimizar la expresión y purificación de ambos clones con el objetivo de llevar a cabo una caracterización inicial de los mismos. Para ello, se transformaron bacterias BL21 (DE3) con las *miniprep* de los VHH8c y VHH19a clonados en el vector pINQ-BtH6, y se llevó a cabo la expresión, biotinilación *in vivo* a mediana escala y purificación de estos. El objetivo de esta sección fue poner a punto la purificación de los nanoanticuerpos y sus antígenos de BLV en forma soluble, pura y en condiciones similares para evaluar la interacción, reduciendo posibles artefactos por causa de diferencias en la composición de los buffer. Como se discutirá a continuación, los intentos por producir los nanoanticuerpos en el mismo buffer utilizado previamente para purificar CA_{BLV} fueron infructuosos y por tal motivo fue necesario poner a punto su purificación en PBS.

8.4.1. OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE VHH8c A MEDIANA ESCALA

Si bien la expresión de ambos VHH a partir del fagémido había sido confirmada previamente durante la selección de clones e incluso los mismos fueron biotinilados *in vivo* y extraídos con éxito mediante lisis y purificación a baja escala, fue necesario optimizar la expresión y purificación de VHHs a partir de periplasma de *E. coli* para proceder a su caracterización. La expresión de nanoanticuerpos en periplasma de *E. coli* (menos reductor que el citoplasma), asegura la correcta formación de puentes disulfuro, esenciales para garantizar su correcto plegamiento, estabilidad y funcionalidad. Si bien existen reportes de expresión exitosa de nanoanticuerpos en el citoplasma de ciertas cepas bacterianas modificadas como *E. coli* SHuffle T7 Express (capaz de expresar la enzima disulfuro isomerasa DsbC en el citoplasma en forma constitutiva) [434], en este trabajo optamos por dirigir la expresión al espacio periplásmico de las bacterias y purificarlos a partir del mismo mediante shock osmótico, aun sabiendo que los rendimientos suelen ser inferiores a los obtenidos con proteínas expresadas y purificadas a partir de la fracción citoplasmática.

En esta primera instancia se llevó a cabo una expresión a mediana escala del VHH8c biotinilado (250mL de cultivo). Las fracciones de los extractos resuspendidos en buffer de sacarosa y de shock osmótico fueron sometidas a purificación por IMAC no detectándose proteínas en la primera y un pico de A₂₈₀ eluido con imidazol en la segunda. Cuando dichas fracciones fueron analizadas por SEC analítica inyectando 20 µL de cada fracción en una columna Zorbax GF-250 equilibrada en PBS a 2mL/min como forma de evaluar los resultados en forma rápida (Figura 35.A), solo se obtuvo un pico con un volumen de exclusión esperado (11.6 mL) en la fracción de shock osmótico purificada por IMAC. Dicho resultado fue posteriormente confirmado por SDS-PAGE teñido con Coomassie (Figura 35.B) y la identidad del VHH8c confirmada por espectrometría de masas (MS), demostrando la presencia del VHH8c en el espacio periplásmico y la aplicabilidad de este protocolo de purificación a mediana escala para obtener nanoanticuerpos puros.

También se analizaron por SDS-PAGE las fracciones de cultivo bacteriano a diferentes etapas de inducción (pre-inducción y luego de 4 horas de inducción) no detectándose diferencias notorias en las proteínas con tamaño cercano a 15KDa, lo cual sugiere de antemano que los niveles de expresión no son suficientemente altos para ser detectados por esta técnica.

Teniendo en cuenta estos resultados se expresó el VHH8c a partir de 1 litro de cultivo, y se purificó por IMAC seguida de SEC preparativa en buffer 20mM HEPES pH 7.4, 50mM NaCl obteniéndose una proteína que eluye de la IMAC gradiente de imidazol y de la SEC con un pico simétrico en un volumen de exclusión acorde al tamaño de los VHHs (**Figura 35.C-D**).

La purificación inicial de nanoanticuerpos en buffer 20mM HEPES pH 7.5, 50mM NaCl (utilizado previamente en nuestro laboratorio para purificar y caracterizar CA_{BLV} [88, 89]) se llevó a cabo pensando en los estudios posteriores de interacción en solución.

A bajas concentraciones, se vio que la solución de VHH8c en buffer 20mM HEPES pH 7.4, 50mM NaCl a 4°C es perfectamente soluble y su estado de oligomerización aparentemente monomérico, no obstante, la solución mostró claros signos de turbidez cuando fue concentrado 30 veces por ultrafiltración. Diferentes tratamientos como aumento de la concentración de NaCl, diálisis en diferentes buffers/pH o incubación a diferentes temperaturas no lograron revertir este estado, evidenciando un proceso de agregación irreversible en estas condiciones. La muestra agregada fue sometida a centrifugación a 16.000 g durante 20 minutos seguido de filtración por 0.22µm y el material soluble remanente fue cuantificado y analizado por DLS. El material recuperado representó un porcentaje muy bajo de la cantidad obtenida por SEC inicialmente (<10%) y los resultados de DLS mostraron una distribución de tamaños polidispersa, caracterizada por 2 poblaciones con diámetros de aproximadamente 2.4 nm y 8.1 nm (**Figura 35.E**). Si bien la población con diámetro de 2.4nm podría corresponder al VHH monomérico, la misma es extremadamente polidispersa y representa un porcentaje muy bajo de la muestra total. Los eventos de agregación irreversible dependientes de la concentración son una característica propia de nanoanticuerpos fundamentalmente con características como los nuestros: carentes de puentes disulfuro no canónicos que estabilicen los loops y con ausencia de CDR3 largos que protegen la cara del dominio equivalente a la interfaz VH-VL de anticuerpos clásicos [435].

Por tal motivo se hicieron nuevas producciones de VHH a mediana escala siguiendo la misma estrategia, pero sustituyendo el buffer de la SEC preparativa por PBS, el cual fue elegido teniendo en cuenta la experiencia previa del grupo de investigación de la Cátedra de Inmunología del Instituto de Higiene (Facultad de Química, Universidad de la República) y considerando que su uso está ampliamente distribuido de acuerdo con la literatura. Además los iones fosfato son promotores del autoensamblado de CA_{BLV} en forma dependiente de la temperatura [88, 89], tal como se muestra en la **Figura 6.F** lo que nos permitió más adelante evaluar la capacidad de inhibir el ensamblado de CA_{BLV} sin necesidad de sustituir el buffer.

En estas condiciones fue posible concentrar la muestra 32 veces por ultrafiltración (a concentraciones por encima de 5mg/mL) y demostrar por SEC analítica en PBS, que no se evidencian cambios en el volumen de exclusión (**Figura 35.F**). Por otra parte no se detectó aumento de la turbidez y por DLS se observó que la muestra es monodispersa y con una distribución de tamaños acorde a su peso molecular (no mostrado para evitar redundancias ya que los mismos se presentan en la **Figura 40.A** con la muestra producida a mayor escala).

A la luz de estos resultados se llevaron a cabo nuevas producciones de los VHH8c y VHH19a aplicando esta estrategia y se obtuvieron ambos VHH en forma soluble a concentraciones superiores a 15mg/mL (>1mM) con rendimientos entre 3-5 mg L⁻¹.

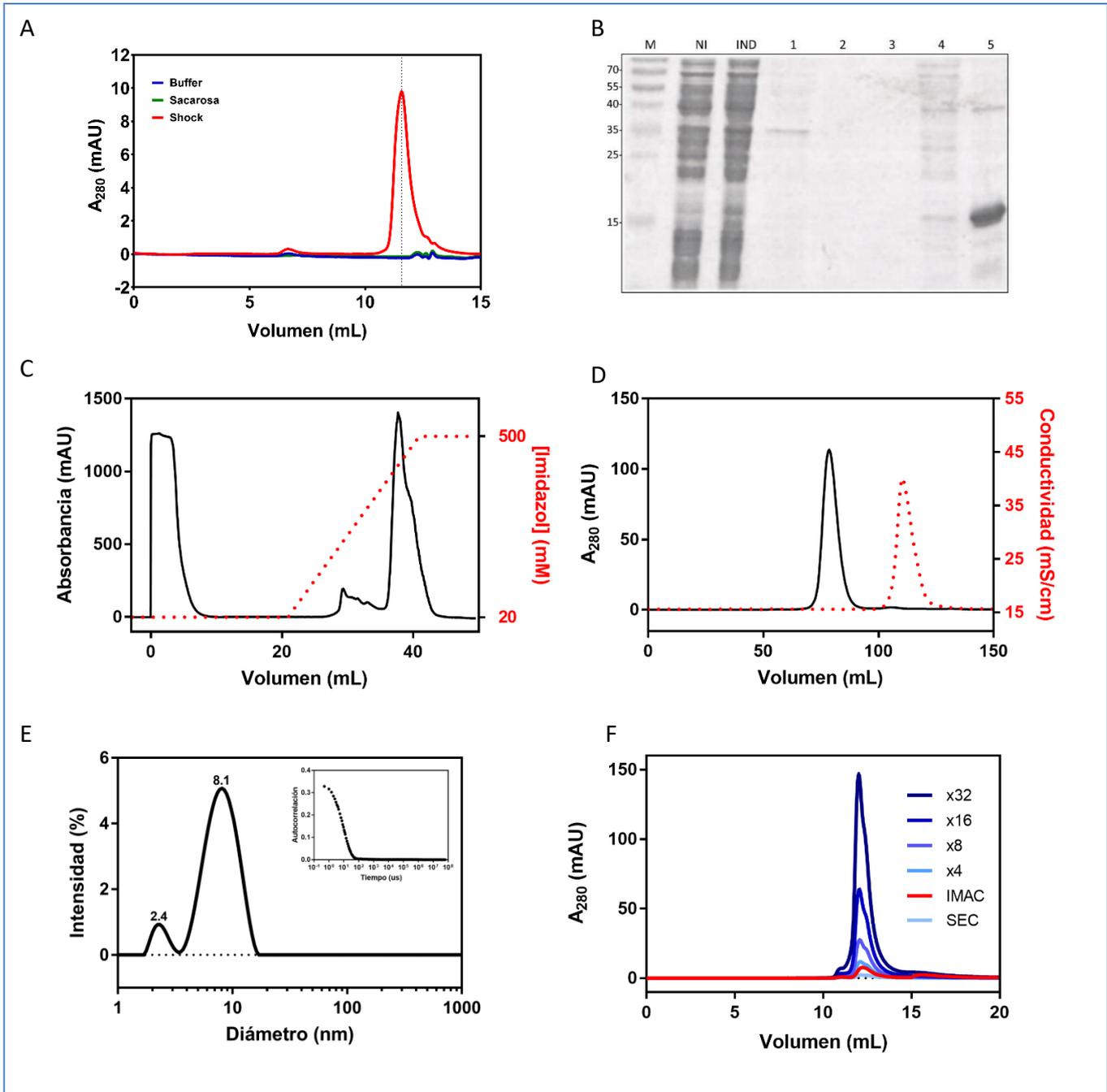


Figura 35: Purificación de VHHs expresados a mediana escala. **A)** SEC analítica utilizando una columna Zorbax GF-250 a flujo 1mL/min donde se compara el perfil de exclusión molecular del buffer de elución de IMAC y las fracciones de sacarosa y shock osmótico purificadas por IMAC. En esta última se detecta un pico correspondiente al VHH8c. **B)** SDS-PAGE con las fracciones obtenidas durante la expresión y purificación del VHH8c. Las fracciones no inducidas e inducidas solubles se cargan en los primeros carriles evidenciando expresión débil en forma soluble. Los carriles 1 y 4 contienen los sobrenadantes de sacarosa y shock osmótico previo a la purificación por IMAC. Por su parte los carriles 2 y 3 presentan dos fracciones colectadas a partir de la IMAC realizada con el sobrenadante de sacarosa mientras que en el carril 5 se analizó la fracción obtenida de la purificación por IMAC a partir del sobrenadante de shock osmótico, denotando la presencia de una proteína de peso molecular acorde con un nanoanticuerpo. **C)** Purificación por IMAC del VHH8c expresado a mediana escala, mediante un gradiente de imidazol desde 20mM hasta 500mM en 20 mL. **D)** SEC preparativa en 20mM HEPES pH 7.4, 50mM NaCl utilizando una columna Superdex 75 16-60. El VHH8c purificado por IMAC es inyectado y obtenido como un pico simétrico a un volumen de exclusión de 78mL. **E)** Análisis por DLS de la fracción soluble del VHH8c purificado por SEC y concentrado 15 veces por ultrafiltración evidenciando agregación irreversible. Se observan dos poblaciones de diámetro 2.4 y 8.1nm (la función de autocorrelación obtenida se presenta en el *inset*). **F)** SEC analítica utilizando una columna Zorbax GF-250 a flujo 1mL/min. El perfil de exclusión molecular del sobrenadante de shock purificado por IMAC tal como se muestra en el panel C es inyectado directamente en la columna (rojo) y se compara con el resultante de purificar por dicho eluato por SEC en buffer PBS y concentrarlo por ultrafiltración (tonos de azul). El perfil de exclusión molecular no cambia cuando la concentración de proteína es incrementada hasta 32 veces por ultrafiltración.

8.4.2. ANALISIS CUALITATIVO DE INTERACCIÓN

Con el propósito de confirmar los resultados del mapeo epitópico obtenidos previamente por ELISA (con las proteínas producidas a baja escala), se evaluó la capacidad de reconocimiento de CA_{BLV} y sus dominios por Western blot una vez que los nanoanticuerpos fueron expresados a mediana escala en periplasma de *E. coli* y purificados en PBS. Como se muestra en la [Figura 36.A](#), ambos VHH purificados en PBS reconocen CA_{BLV} por Western blot. Por su parte los clones VHH8c y VHH19a se unen a los dominios CTD y NTD respectivamente y no existe reacción cruzada con el otro dominio. Estos resultados demuestran que ambos clones mantienen sus propiedades de interacción con CA_{BLV} cuando son producidos a mayor escala reconociendo en forma específica epítomos lineales de ambos dominios.

Del mismo modo se analizó por SPR la capacidad de reconocimiento de epítomos conformacionales de CA_{BLV} expresada en forma nativa (CAn) y de ambos dominios. Para ello se inmovilizaron las proteínas de BLV en superficies diferentes de un chip CM5 de BIACORE (GE Healthcare) y se inyectaron los VHH8c y VHH19a purificados a mediana escala en PBS ([Figura 36.B](#)). Los resultados de SPR demuestran que la proteína de la cápside de BLV en su forma nativa (CAn) es igualmente reconocida por ambos VHHs y concuerdan con los datos obtenidos por Western blot, sugiriendo que ambos clones son capaces de reconocer los respectivos dominios de CA_{BLV} en solución, de forma específica y diferencial. La señal químio luminiscente obtenida por Western blot parece más intensa en el caso del VHH19a y los sensorgramas obtenidos por SPR muestran una disociación del VHH19a algo más lenta que el VHH8c. Estos resultados podrían sugerir una mayor afinidad del VHH19a por CA_{BLV} o al menos una interacción caracterizada por una constante cinética de disociación (k_{off}) más lenta; sin embargo, estos estudios tuvieron como único cometido realizar un primer acercamiento cualitativo, para caracterizar la interacción de los VHHs y CA_{BLV} expresados en periplasma de *E. coli* y purificados a mayor escala.

Por último, se analizó la formación de complejos con el VHH8c y la proteína CAn por SEC analítica intentando definir una estrategia para purificar complejos estables que permitan llevar a cabo estudios estructurales. Para ello se comparó el perfil de elución de CAn inyectada en forma aislada, con el perfil de elución de mezclas CAn:VHH8c con relaciones molares 1:1 y 1:2, luego de ser incubadas durante 30 minutos. Tal como se muestra en la [Figura 36.C](#), cuando se co-inyectan ambas proteínas se observa una caída en la cantidad de CAn libre, directamente proporcional a la cantidad de VHH presente y se evidencia un hombro de mayor tamaño que podría corresponder a complejos CA-VHH8c. Dichos complejos representan un porcentaje minoritario de la mezcla y el área bajo la curva no cambia cuando se aumenta la concentración de VHH, sugiriendo que poseen una corta vida media en las condiciones evaluadas.

Se intentó sin éxito utilizar la técnica de SPR para cuantificar la interacción de los VHHs 8c y 19a con los dominios de CA (no mostrado). Para ello se inmovilizaron ambos dominios de CA_{BLV} en diferentes superficies y se inyectaron los VHH purificados a diferentes concentraciones. Tal como esperábamos, se detectó interacción específica con una señal proporcional a la concentración de VHH inyectada; sin embargo los datos obtenidos no pudieron ser ajustados a un modelo cinético de Langmuir [436] el cual describe una interacción 1:1 donde una molécula de VHH (analito) interactúa con una única molécula de dominio de CA_{BLV} inmovilizado (ligando), dando lugar a la formación uniones equivalentes entre sí e independientes para todos los sitios generando complejos con una cinética de pseudo-primer orden. Teniendo en cuenta que las proteínas de las cápsides retrovirales forman ensamblajes supramoleculares, existe la posibilidad de que los VHHs sean capaces de unir más de un epítomo dentro de los propios dominios de CA_{BLV} (por ejemplo, reconociendo la interfaz de dos dominios NTD o CTD que se dispongan cercanos en la lattice hexagonal de la cápside). Si bien esta hipótesis explicaría un modelo de interacción no 1:1, parece poco probable que se hayan seleccionado clones con capacidad de reconocer dominios adyacentes,

teniendo en cuenta el método de selección por panning, donde CA_{BLV} fue inmovilizada en placas de ELISA a bajas concentraciones. Ante este hecho, parece más probable que la incompatibilidad del ajuste de los datos obtenidos por SPR con un modelo de interacción 1:1, sea la consecuencia de artefactos experimentales (bastante habituales en esta técnica) como heterogeneidad de alguno de los componentes (diferentes estados conformacionales o variabilidad del sitio de unión de la molécula inmovilizada teniendo en cuenta que la orientación de las mismas es aleatoria y no dirigida), efecto de avidéz causado por re-asociaciones un VHH con más de una molécula de CA_{BLV} (“*analyte re-binding*”), presencia de contaminantes, interacción a través de cambios conformacionales, limitación por transporte de masa a raíz de la difusión diferencial del analito en la red de carboximetil dextrano en la superficie del chip, e interacción no específica con la superficie del mismo. En particular esta última suele ser una causa de no ajuste al modelo de Langmuir bastante común en SPR y difícil de atacar ya que sus orígenes son inherentes a cada molécula y las soluciones muy diversas.

Si bien ambos dominios se purificaron en forma soluble a altas concentraciones y fueron obtenidos con un grado de pureza aceptable para llevar a cabo su caracterización primaria, los rendimientos finales alcanzados hacen que se requiera grandes volúmenes de cultivo a la hora de llevar a cabo una caracterización biofísica más exhaustiva, así como estudios estructurales o de interacción molecular con CA_{BLV} .

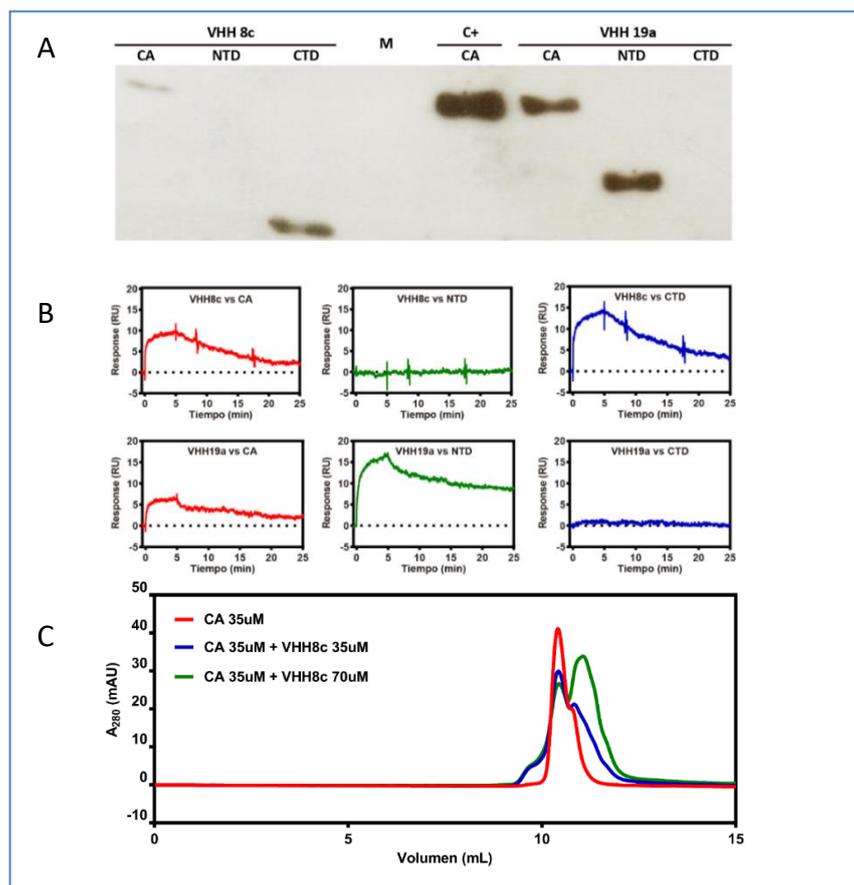


Figura 36: Análisis cualitativo de interacción entre VHHs y CA_{BLV} . **A)** Mapeo epitópico lineal mediante Western blot para analizar la interacción entre los VHH8c y VHH19a con CA y sus respectivos dominios. Los VHH fueron expresados mediante biotilación *in vivo* y revelados con Estreptavidina-HRP, mientras que el control positivo (C+) consistente en un anticuerpo monoclonal contra CA_{BLV} fue revelado con un anticuerpo contra Inmunoglobulinas murinas conjugado a HRP. **B)** Mapeo epitópico conformacional llevado a cabo mediante SPR. Los antígenos CA, NTDH₆ y *CTD fueron inmovilizados en diferentes superficies de un chip y los VHH8c y VHH19a inyectados durante 5 minutos con un período de disociación de 20 minutos. **C)** SEC analítica para analizar en forma cualitativa la formación de complejos VHH8c/CA. El perfil de elución de CA inyectada a una concentración de 35 µM se compara con el de coinyecciones de mezclas de CA y VHH8c a relaciones molares 1:1 y 1:2. La presunta formación de complejos se evidencia por la presencia de hombros de tamaño superior al de CA cuando esta se coinyecta con VHHs.

8.5. CARACTERIZACIÓN BIOFÍSICA DE LOS VHHs 8c Y 19a.

El abordaje experimental llevado a cabo en la sección anterior permitió poner a punto la expresión de los VHHs en periplasma de *E. coli* y su purificación en PBS alcanzando rendimientos aceptables. Sin embargo, estos no fueron suficientes para llevar a cabo otras técnicas que requieren cantidades mayores de proteína como ensayos de cristalización o de inhibición del autoensamblado de CA_{BLV} *in vitro*. Por otra parte, la imposibilidad de cuantificar la interacción por SPR nos puso en un escenario en que la cuantificación de la interacción entre los VHH y los dominios

de CA_{BLV} debió llevarse a cabo utilizando otras técnicas biofísicas como microcalorimetría de titulación isotérmica (ITC). Los requerimientos de muestra de esta técnica son elevados si consideramos que la afinidad es baja (tal como lo sugieren los resultados de formación de complejos estables por SEC). Por tal motivo fue necesario poner a punto un protocolo de expresión y purificación de nanoanticuerpos a mayor escala.

8.5.1. PRODUCCIÓN DE VHHs A GRAN ESCALA.

Si bien el término “*gran escala*” puede resultar rimbombante e incluso inapropiado, el mismo debe ser concebido en una escala de laboratorio y proviene de la denominación utilizada por Baral y Arbabi-Ghahroudi [401] cuyo protocolo de expresión y purificación de VHHs en sistemas bacterianos fue adoptado por nosotros para obtener cantidades razonables de nanoanticuerpos, tal como se describe en las secciones 7.2.2.4 y 7.3.3.

Ambos clones fueron expresados en medio mínimo M9 y las diferentes fracciones de la extracción periplásmica analizadas por SDS-PAGE, detectándose la presencia de VHHs en las fracciones correspondientes a los sobrenadantes de cultivo inducidos y de “*shock*” osmótico (Figura 37), tal como lo confirmaron resultados de identificación por MS. En ambos casos los respectivos VHHs se obtuvieron en la fracción correspondiente al sobrenadante de shock osmótico, en presencia de proteínas bacterianas de diferentes tamaños. Dichas fracciones fueron sometidas a purificación por IMAC seguida de SEC preparativa en PBS.

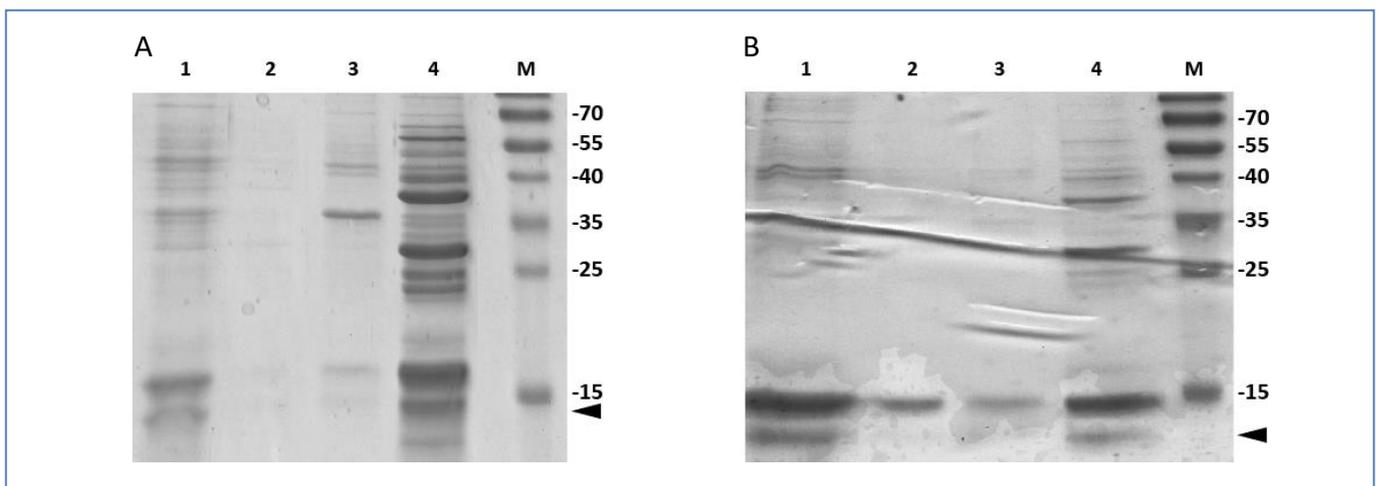


Figura 37: Expresión a gran escala y extracción periplásmica de VHHs. Análisis por SDS-PAGE de las fracciones de la extracción periplásmica de los VHH8c (A) y VHH19a (B). Las fracciones corresponden a los sobrenadantes de cultivo inducidos (*carril 1*), sobrenadantes de lavado (*carril 2*), sobrenadantes de sacarosa (*carril 3*) y sobrenadantes de shock osmótico (*carril 4*). La banda de 14 kDa correspondiente a los nanoanticuerpos (marcada con una flecha junto al marcador de peso molecular, M) se evidencia en los sobrenadantes de cultivo y de shock osmótico.

En primer lugar, los VHH8c y VHH19a se purificaron con péptido de biotilación (BAP) y *His-tag*, mediante IMAC y aplicación de un gradiente de imidazol de 15mL (Figura 38.A-B). A su vez el eluato de cada IMAC se purificó por SEC preparativa en PBS, obteniéndose picos de A₂₈₀ simétricos y con volúmenes de exclusión de 78.0 mL y 81.1 mL, correspondientes a los respectivos VHH8c(BAPH₆) y VHH19a(BAPH₆), tal como se muestra en la Figura 38.C.

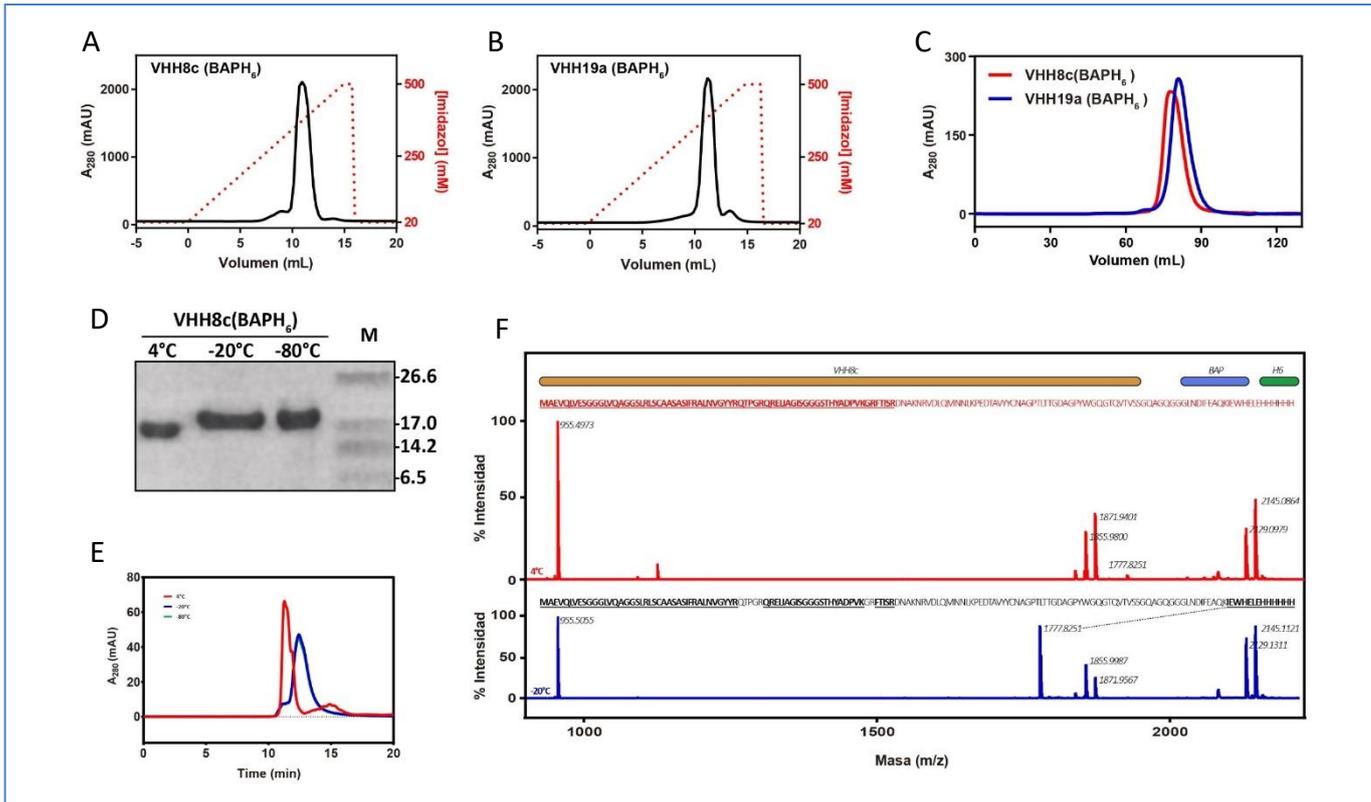


Figura 38. Purificación a gran escala de los VHH8c y BHH19a conteniendo sitio de biotilación y His-tag. **A)** Elución con gradiente de imidazol a partir de IMAC del VHH8c y **B)** VHH19a, conteniendo en ambos casos las secuencias BAP y H6 en el extremo c-terminal. **C)** Purificación de las proteínas eluidas en A y B por SEC preparativa (Superdex 75 16-60). Las proteínas VHH8c(BAPH₆) y VHH19a(BAPH₆) eluyen a volúmenes de exclusión de 78.0mL y 81.1mL. Tres lotes idénticos de VHH8c(BAPH₆) fueron almacenados en PBS durante 3.5 meses a diferentes temperaturas (4, -20 y -80 °C) y analizados por SDS-PAGE **(D)** y SEC analítica **(E)**, mostrando una degradación de la muestra a 4°C. **F)** Análisis por MALDI TOF de las bandas obtenidas por SDS-PAGE a partir de las muestras almacenadas 4°C (rojo) y -20°C (azul), evidenciando la remoción proteolítica del extremo C-terminal en la muestra mantenida a 4°C. El extremo N-terminal se mantiene intacto en ambos casos. Se presenta la secuencia del VHH con los péptidos identificados por MALDI TOF en negrita y subrayado para cada caso.

El VHH8c(BAPH₆) purificado en PBS se llevó a una concentración final de 5 mg/mL y se fraccionó en tres alícuotas idénticas que fueron almacenadas a tres temperaturas diferentes (4, -20 y -80 °C) durante 3 meses para evaluar su estabilidad a mediano plazo. Luego de este período se analizó el tamaño molecular de las tres muestras por SDS-PAGE en buffer tris-tricina (**Figura 38.D**) y por SEC analítica (**Figura 38.E**). Con ambas técnicas se evidenció una disminución de tamaño en el caso de la muestra mantenida a 4°C demostrando que la muestra era degradada cuando se mantenía a 4°C. Un análisis comparativo por MALDI TOF a partir de las bandas obtenidas por SDS-PAGE con las muestras mantenidas a 4°C y -20°C permitió identificar diversos péptidos correspondientes al extremo N-terminal del nanoanticuerpo demostrando que en ambos casos dicho extremo se mantiene inalterado. Por su parte el péptido correspondiente al extremo C-terminal (*His-tag*) solo se detecta en la muestra mantenida a -20°C (**Figura 38.F**), sugiriendo que este extremo es degradado a 4°C. Si bien la mayoría de los experimentos analíticos se realizaron con las muestras frescas, técnicas como la cristalogénesis de proteínas realizadas a temperatura ambiente durante un período extenso de tiempo, son particularmente sensibles a la heterogeneidad de las muestras.

En esta etapa del trabajo, la biotilación *in vivo* (útil durante la etapa de selección de VHHs) no se llevó a cabo y fue innecesaria para los experimentos subsiguientes. Teniendo en cuenta los resultados de estabilidad a diferentes temperaturas y atendiendo a la necesidad de eliminar partes móviles y poco estructuradas (para la etapa de cristalización), se procedió a eliminar el sitio de biotilación y el *His-tag*, teniendo en cuenta que este fragmento (de unos 30 residuos) representa alrededor del 20% de la secuencia aminoacídica de los VHHs.

En este sentido, se llevaron a cabo construcciones alternativas de ambos VHHs (sin BAP y con un *His-tag* removible por trombina en el extremo N-terminal, tal como se describe en la sección 7.1.2.3). Las nuevas construcciones fueron confirmadas por secuenciación nucleotídica, expresadas a gran escala y purificadas por IMAC aplicando ciertas variaciones en la estrategia de elución y finalmente por SEC preparativa en PBS.

En este caso, los H₆VHHs unidos a la IMAC no fueron eluidos con imidazol; en su lugar fueron digeridos con trombina en la propia columna y eluidos con 1mL de **buffer de unión a IMAC** (tal como se hizo con *CA y *CTD) después de un periodo de 24 horas. Para evaluar si la remoción del *His-tag* fue efectiva, dicho eluato fue inyectado en una segunda columna de IMAC (conectada en serie a una columna de Benzamidina) con el objetivo de remover el remanente de proteína sin proteolizar y la trombina. En la **Figura 39.A y B** se muestra la inyección de los *VHHs (digeridos en columna con trombina) en una segunda IMAC/Benzamidina. El pico inicial de A₂₈₀ detectado en ambos cromatogramas casi inmediatamente después de su inyección, corresponde al material no unido conteniendo los *VHHs clivados, mientras que la aplicación de un posterior gradiente de imidazol no evidenció presencia de proteínas, demostrando que la estrategia de remoción del *His-tag* fue exitosa en ambos casos. Por su parte la aplicación de un gradiente de imidazol en la primera IMAC (no mostrado) evidenció muy poco material eluido, manifestando además que el corte en columna fue sumamente eficiente. La fracción no unida en esta segunda IMAC fue colectada (para ambos VHHs) y posteriormente purificada por SEC, tal como se presenta en la **Figura 39.C**. En este caso se muestra el perfil de exclusión molecular a partir de una columna Superdex 75 16-60 para ambos *VHH mostrando máximos de A₂₈₀ a los 85.2 mL en el caso de *VHH8c y 89.5 mL para el *VHH19a. Los volúmenes de exclusión obtenidos en este caso son menores que los obtenidos para los nanoanticuerpos purificados con sitio de biotilación y *His-tag* (78.0 mL y 81.1 mL), en concordancia con una reducción del tamaño molecular.

La **Figura 39.D** presenta un análisis por SDS-PAGE teñido con Coomassie y sometido a western blot revelado con estreptavidina-HRP, con el VHH8c(BAPH₆) biotilado "*in vivo*" y el *VHH8c purificado de acuerdo a la **Figura 39.C**. El análisis muestra claramente las diferencias de tamaño como producto de la remoción proteolítica del fragmento BAPH₆ y la detección diferencial con estreptavidina del VHH biotilado. Además, este experimento permitió demostrar que con la construcción carente de BAP y *His-tag* es posible obtener una banda única mientras que en el caso de la construcción biotilada *in vivo*, se obtienen al menos dos bandas de diferente tamaño y ambas son biotiladas, sugiriendo que el péptido BAP conserva la Lys biotilada.

La optimización de la producción de nanoanticuerpos a gran escala fue un elemento central de esta tesis, ya que de ella depende el éxito de la caracterización de los clones y su interacción con CA_{BLV}. La estrategia de expresión y purificación de nanoanticuerpos a gran escala permitió obtener los clones *VHH8c y *VHH19a, con un alto grado de pureza (>98% por densitometría) y homogeneidad tal como lo muestran los resultados de SDS-PAGE (**Figura 39.E**) y con rendimientos entre 15-30 mg L⁻¹ en una escala de laboratorio. Este aumento de 3-6 veces en el rendimiento de producción, permitió producir cantidades suficientes para llevar a cabo experimentos de caracterización biofísica y estructural, así como los estudios de interacción con CA_{BLV} *in vitro*.

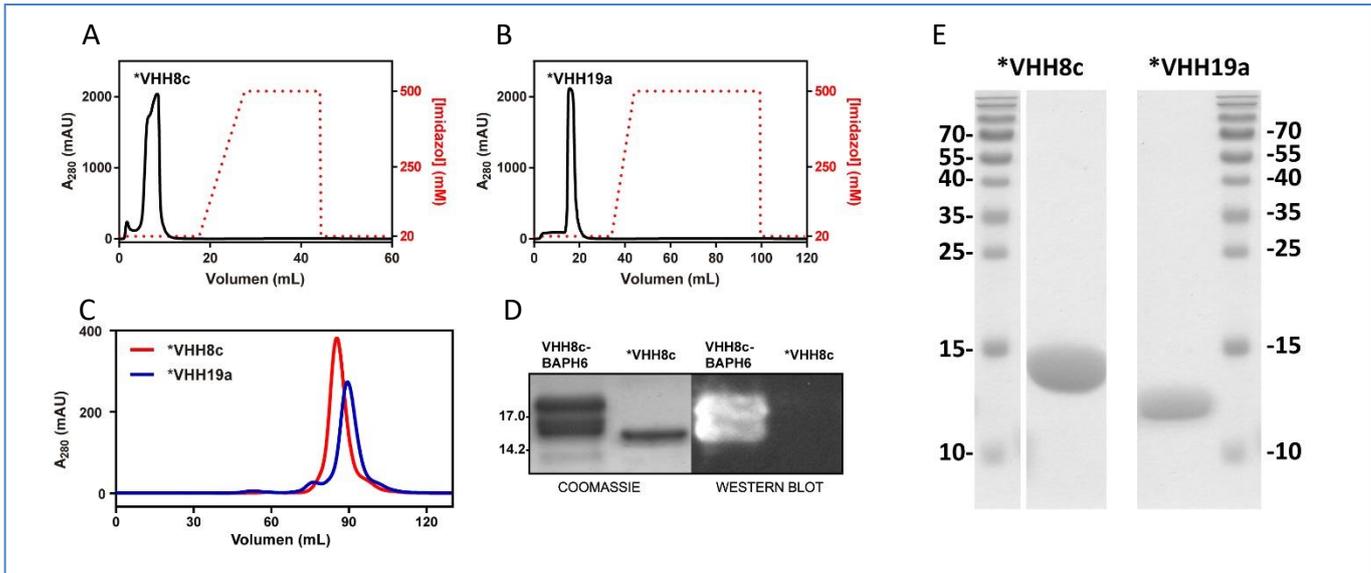


Figura 39: Purificación de VHHs sin BAP ni His-tag a gran escala: Los sobrenadantes de shock osmótico de los VHH8c y VHH19a fueron purificados por IMAC y cortados en columna. Después de remover proteolíticamente el *His-tag*, y las muestras obtenidas fueron inyectadas en una segunda IMAC tal como se muestra en **A)** para el *VHH8c y **B)** para el *VHH19a. En ambos casos se presentan los resultados de la segunda IMAC donde los VHHs eluidos a partir de la primera IMAC, no interactúan con la columna y son colectados en la fracción no unida (pico de A_{280} inicial), mientras que durante la elución con gradiente de imidazol no se recupera material proteico indicando que la proteólisis fue efectiva. **C)** Purificación por SEC de los clones *VHH8c y *VHH19a clivados en columna y purificados a gran escala a partir de A y B, respectivamente. En ambos casos se utilizó una columna Superdex 75 16-60 y las proteínas eluyen con volúmenes de exclusión 85.2 mL y 89.5 mL. **D)** Análisis por SDS-PAGE teñido con Coomassie y western blot revelado con estreptavidina-HRP del VHH8c(BAPH₆) biotinilado *in vivo* y *VHH8c purificado por SEC de acuerdo a C. Solo se detecta interacción con estreptavidina en el caso del VHH biotinilado *in vivo*. **E)** Análisis por SDS-PAGE teñido con Coomassie de los *VHH8c y *VHH19a purificados a gran escala a partir de 1 L de cultivo bacteriano. En ambos casos se detecta buena cantidad de proteína con una correcta relación de tamaños y una pureza superior al 98%.

8.5.2. ESTUDIOS BIOFÍSICOS EN SOLUCIÓN.

Antes de estudiar la interacción de los VHHs purificados con el/los antígeno/s, se procedió a caracterizar su comportamiento en solución. Si bien durante la optimización de las condiciones de purificación se llevaron a cabo con éxito algunas pruebas de solubilidad en PBS, una vez que los clones *VHH8c y *VHH19a fueron purificados, concentrados y cuantificados, se realizó un análisis por dispersión dinámica de luz (DLS) obteniéndose para ambos clones, medidas de tamaño de partícula en solución a concentraciones de 80 y 40mg/mL, respectivamente. En el caso del *VHH8c se determinó la distribución de tamaños por intensidad mostrando una única población cuyo diámetro hidrodinámico fue de 5.62 ± 0.69 nm (**Figura 40.A**). Por su parte el clon *VHH19a presentó una distribución de tamaños por intensidad bimodal con una población mayoritaria de diámetro hidrodinámico de 6.06 ± 1.02 nm y una segunda población con diámetro hidrodinámico mayor a $1\mu\text{m}$ (**Figura 40.B**). Cabe aclarar que la técnica de DLS es extremadamente sensible a partículas de gran tamaño y que en ambos casos podemos considerar que el $\approx 100\%$ de la solución está representado por la población mayoritaria. En ambos casos la población mayoritaria (con diámetro hidrodinámico entre 5.5 - 6.0 nm) presentó una distribución monodispersa.

El otro estudio biofísico en solución llevado a cabo con los clones purificados fue el análisis de termostabilidad por DSC. Dado que el autoensamblado de CA_{BLV} en solución se realiza a 38°C , fue necesario confirmar que las proteínas purificadas se encuentran correctamente plegadas a esa temperatura. Para ello se realizó el análisis en un rango de temperatura entre 25 y 90°C con el objetivo de determinar la temperatura de transición o “melting” (T_M) de cada nanoanticuerpo. El clon *VHH8c posee una $T_M=68.8^\circ\text{C}$ (**Figura 40.C**) mientras que el VHH19a es menos termoestable con una $T_M=56.8^\circ\text{C}$ (**Figura 40.D**). En ambos casos se comprobó la reversibilidad de la desnaturalización térmica

mediante repetición de ciclos de desnaturalización y re-plegamiento observándose valores de T_M similares. Los datos fueron ajustados a un modelo de desnaturalización de dos estados (nativo y desnaturalizado) obteniéndose una mala descripción del sistema, lo cual nos lleva a pensar que el proceso ocurre a través de uno o más intermediarios.

Si bien los experimentos de DSC no permitieron obtener información termodinámica de la desnaturalización térmica de los VHH analizados, los mismos permitieron determinar su T_M y demostrar que la desnaturalización ocurre de manera reversible. Esta reversibilidad es probablemente favorecida por el puente disulfuro canónico que otorga estabilidad a los nanoanticuerpos uniendo sus dos hojas β . Los valores de T_M obtenidos se encuentran dentro del rango esperable teniendo en cuenta la bibliografía, donde se reportan valores de T_M alrededor de 60°C para VHH carentes de puentes disulfuro no canónicos que favorezcan su termostabilidad [435, 437-439]. Además, en ninguno de los casos se observan signos de desnaturalización térmica a 38°C (temperatura a la cual se obtuvieron los resultados de inhibición del ensamblado de CA_{BLV} , descritos en el apartado 8.6.2).

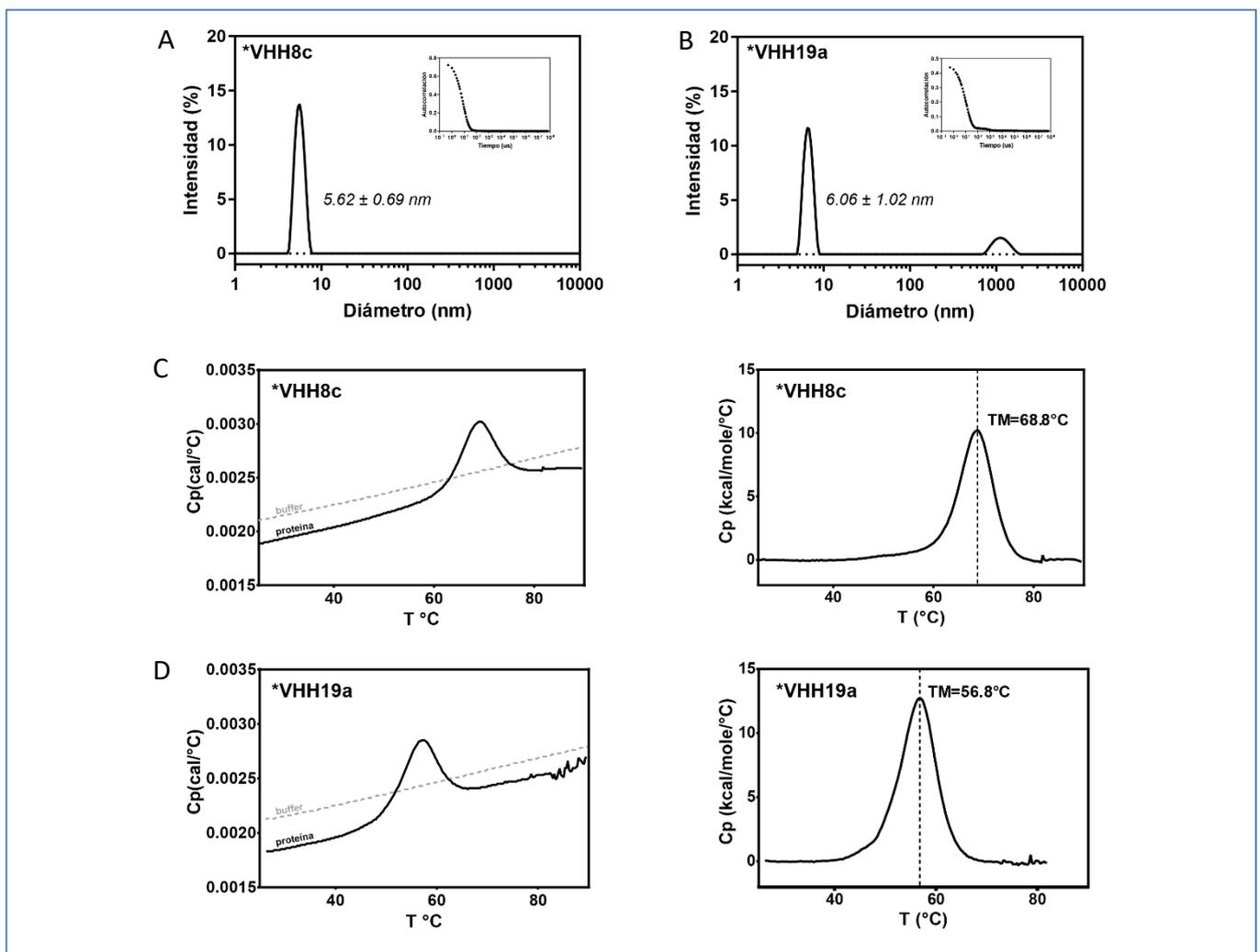


Figura 40: Análisis biofísico de VHHs en solución. A-B) Análisis de tamaño de partícula por DLS para los clones *VHH8c y *VHH19a respectivamente. Las gráficas muestran la distribución del diámetro de las proteínas por intensidad, obtenida a partir de la deconvolución de las respectivas funciones de autocorrelación (presentadas como *insets* en cada gráfico). El valor de diámetro hidrodinámico de la población mayoritaria se presenta en cada gráfico con su valor de desviación estándar. **C-D)** Estudios de termostabilidad por DSC de los clones *VHH8c y *VHH19a respectivamente. A la izquierda se presentan los termogramas sin procesar de buffer (línea punteada gris) y de las proteínas respectivas (línea continua de color negro), mientras que a la derecha se presentan los termogramas de desnaturalización de las respectivas proteínas, luego de sustraer la línea de base (termograma de buffer), normalizar por la concentración de proteína y definir como línea de base las pendientes antes y después de la transición. En ambos casos se presenta el valor de T_M de la desnaturalización térmica.

8.6. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE LOS VHHs CON CABLV.

En esta última sección de Resultados intentamos abordar la interacción de los respectivos nanoanticuerpos con CA_{BLV} (o sus dominios) mediante el análisis termodinámico de la interacción, el efecto de estos sobre el autoensamblado de CA_{BLV} y el análisis estructural de los respectivos complejos. En tal sentido la optimización de la metodología de purificación de los VHHs y de las proteínas de BLV (descrito en las secciones anteriores) fue fundamental para llevar a cabo esta etapa donde se requieren altas cantidades de proteína a alta concentración y con altos índices de pureza y homogeneidad.

8.6.1. ANÁLISIS TERMODINÁMICO DE LA INTERACCIÓN

Frente a los intentos fallidos de cuantificación de la unión de los nanoanticuerpos y CA_{BLV} , utilizando la técnica de resonancia plasmónica de superficie (SPR), decidimos utilizar la técnica de calorimetría de titulación isotérmica (ITC) con el propósito de obtener información termodinámica de la interacción.

Los resultados del análisis preliminar de la interacción de los VHHs con CA_{BLV} o sus dominios, sugieren que la afinidad de los clones seleccionados no es demasiado alta y por ende se requieren cantidades relativamente altas de ambos interactores para obtener información utilizando esta técnica. En este sentido los rendimientos obtenidos mediante la expresión a gran escala y la capacidad de obtenerlos en forma soluble a concentraciones relativamente altas permitieron poner a punto las condiciones experimentales para llevar a cabo estos experimentos.

Inicialmente se intentó evaluar la interacción del *VHH8c con *CAn, sin embargo, luego de cada inyección se obtuvo un cambio en la línea de base dificultando la integración de las inyecciones. En condiciones controladas, este tipo de señal puede ser utilizado para extraer información cinética en sistemas enzimáticos [440], sin embargo en nuestro caso donde la concentración de proteína utilizada es alta, probablemente existan subunidades de CAn formando autoensambles que por efecto de dilución generan este tipo de señal, cuya interpretación resulta compleja.

En el caso de CA_{BLV} , la ocurrencia de contactos moleculares a causa del autoensamblado de la misma podría ser responsable de este artefacto. Por tal motivo, este abordaje no fue adecuado para diseñar experimentos de ITC que aportaran información termodinámica de la unión de los nanoanticuerpos, ni extraer datos a partir de los mismos. Como alternativa, teniendo en cuenta que los dominios CTD y NTD de BLV mantienen su estructura tridimensional en solución, se realizaron diversos experimentos con VHHs y los respectivos dominios de CA_{BLV} .

En primer lugar, se tituló *CTD con el *VHH8c. Para ello se realizaron diversos experimentos con el fin de optimizar las concentraciones de proteína y finalmente se realizaron dos titulaciones independientes utilizando diferentes concentraciones (*CTD 1,034 mM y 1,938 mM vs *VHH8c 122 μ M y 169 μ M, respectivamente). Los datos obtenidos fueron integrados utilizando el software de integración automática NITPIC (tal como se describe en la sección metodológica) y se realizó un análisis global mediante ajuste a un modelo de hetero-asociación $A+B \leftrightarrow AB$ utilizando el software SEDPHAT (Figura 41). La constante de disociación obtenida fue $K_d = 8,889 \mu$ M ($\Delta G = -6,891$ kcal/mol) y el perfil termodinámico evidenció una interacción gobernada por el componente entrópico ($T\Delta S = 25,380$ kcal/mol), con un componente entálpico desfavorable ($\Delta H = 18,489$ kcal/mol). En cuanto al ajuste al modelo podemos decir que es bueno, obteniéndose valores de K_d y ΔH con intervalos de confianza de 68.3 % (1 desviación estándar para una distribución de error Gaussiana) entre 7.461-10.52 μ M y 16.859 - 20.389 kcal/mol, respectivamente.

La interacción *VHH8c/*CTD con estequiometría 1:1 y caracterizada por un valor de K_d cercano a 10 μ M, representa una afinidad relativamente baja, teniendo en cuenta las afinidades máximas de 690pM reportadas para nanoanticuerpos contra el CTD de CA_{HIV} [441]. Sin embargo, cuando comparamos la afinidad del *VHH8c y las de

diversos interactores de CA_{HIV} capaces de inhibir el ciclo replicativo mediante interacción con el dominio CTD (Tabla 1), encontramos que se encuentran aproximadamente en el mismo rango (micromolar bajo).

Desde el punto de vista termodinámico, la interacción es endotérmica y gobernada estrictamente por el componente entrópico (en contraposición con la mayoría de los datos termodinámicos publicados con interactores de CA_{VIIH} [134, 231, 236, 239, 241, 242, 248], donde las reacciones son exotérmicas y gobernadas por el componente entálpico). Cuando evaluamos la bibliografía dirigida al análisis termodinámico de interacciones entre nanoanticuerpos y proteínas, también encontramos que el escenario habitual se compone de interacciones exotérmicas gobernadas por el componente entálpico. En tal sentido, el VHH8c representa un caso bastante inusual desde este punto de vista, precedido únicamente (hasta donde alcanza nuestro conocimiento) por el ejemplo de Nano-32, uno de seis nanoanticuerpos caracterizados, con capacidad de unir a un epítipo particular del dominio P de la cápside de Norovirus, el cual presenta una afinidad de 60 nM con una reacción gobernada exclusivamente por el componente entrópico [442]. Puede parecer contradictorio que la formación de complejos ordenados entre proteínas se vea favorecida por un aumento de la entropía, no obstante, esto puede explicarse por la presencia de regiones hidrofóbicas expuestas al solvente y rodeadas de capas de moléculas de agua dispuestas en orden, evitando así el contacto con la misma. Cuando la interacción entre proteínas ocurre a través de interacciones hidrofóbicas ocluyendo dichas superficies, las moléculas de solvente se liberan aumentando la entropía del sistema (entropía de solvatación). Otra explicación puede encontrarse en la estabilización de complejos proteicos gracias a la flexibilización de diversos grupos internos (entropía conformacional) que se mantienen rígidos cuando las moléculas no interactúan [443]. Los experimentos de ITC se realizaron a 25°C, no obstante sería interesante repetir los experimentos a diferentes temperaturas y al graficar ΔH en función de la temperatura para determinar el cambio en la capacidad calórica del sistema (ΔC_p) el cual se asocia con el calor ΔS de solvatación [444].

Teniendo en cuenta estos resultados, es altamente probable que la interacción del *VHH8c con CA_{BLV} ocurra a través de contactos entre residuos hidrofóbicos de los CDRs y algún parche hidrofóbico del dominio CTD de la proteína viral. El hecho de que se hayan seleccionado VHHs con interacciones hidrofóbicas resulta curioso e incluso sorprendente teniendo en cuenta que las condiciones de panning implicaron el uso de detergente.

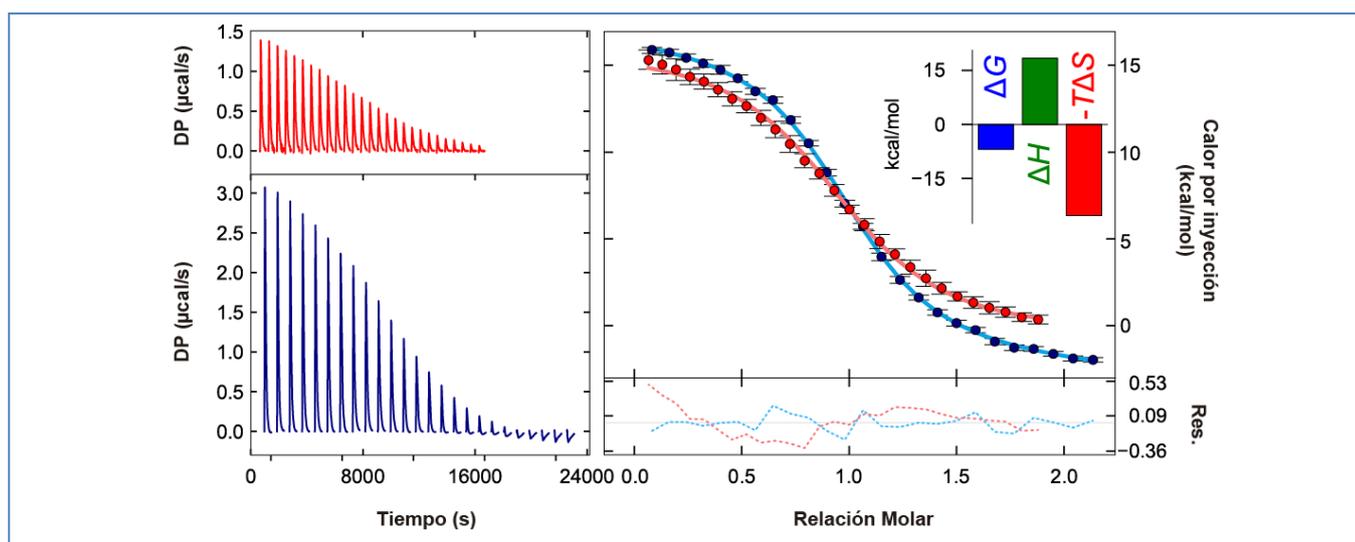


Figura 41: Análisis termodinámico de la interacción del VHH8c y el dominio *CTD. A la izquierda se presentan los termogramas luego de sustraer la línea de base (utilizando NITPIC) para dos titulaciones de *CTD (1034 μM) sobre *VHH8c (122 μM) en rojo y *CTD (1938 μM) sobre *VHH8c (169 μM) en azul. A la derecha (manteniendo el mismo código de colores) se presenta el resultado de la integración de las respectivas inyecciones y el análisis global de los datos (utilizando SEDPHAT) mediante ajuste a un modelo de heteroasociación $A + B \leftrightarrow AB$, con los respectivos valores residuales en la parte inferior y la firma termodinámica como *inset*. Los parámetros termodinámicos obtenidos se presentan en la Tabla 9.

Por su parte se llevaron a cabo diversos intentos por evaluar la interacción del *VHH19a con el NTDH₆ utilizando esta técnica. En primer lugar, se llevó a cabo un experimento titulando el dominio NTDH₆ (102 μM) con el *VHH19a (1.69 mM) tal como se muestra en **Figura 42.A**. Estas concentraciones se eligieron asumiendo una afinidad similar a la del VHH8c, y en caso de que esa hipótesis fuera correcta se estaría utilizando un valor $c=10$; sin embargo este experimento no permitió evidenciar interacción entre ambas moléculas. En función de este resultado, se decidió aumentar las concentraciones, invirtiendo además el orden de los componentes de la titulación (en función de la disponibilidad de proteína). En este caso se tituló el *VHH19a (247 μM) con el dominio NTDH₆ (2,18 mM) tal como se muestra en la **Figura 42.B**. Luego de integrar las inyecciones y ajustar los resultados a un modelo de heteroasociación $A + B \leftrightarrow AB$, se obtuvo una constante de disociación $K_d = 35,26 \mu\text{M}$ ($\Delta G = -6,075 \text{ kcal/mol}$) y el perfil termodinámico evidenció una interacción gobernada por el componente entrópico ($-T\Delta S = 8,010 \text{ kcal/mol}$) con un componente entálpico desfavorable ($\Delta H = 1,935 \text{ kcal/mol}$) al igual que con el *VHH8c. Cabe aclarar que el error en la obtención de estos parámetros es alto, dado que el valor c utilizado es relativamente bajo (aproximadamente 7 asumiendo que el valor de $K_d = 35 \mu\text{M}$ es correcto), dando como resultado una isoterma poco pronunciada. Por otro lado, la relación molar alcanzada no es suficiente para determinar con precisión el calor absorbido por efecto de dilución del *VHH19a y/o el NTDH₆ (el cual resulta bastante más elevado que para el *VHH8c). Con el objetivo de mejorar estos resultados, se repitió el experimento aumentando 3 veces las concentraciones tal como se presenta en la **Figura 42.C**. En este caso se tituló el *VHH19a (762 μM) con el NTDH₆ (6,14 mM) y para nuestra sorpresa no se detectó una señal sigmoideal clara que permita caracterizar la interacción. Los resultados de ITC obtenidos con este nanoanticuerpo no son concluyentes y se requiere explorar otras posibilidades para cuantificar la interacción.

A su vez se analizó por DLS el tamaño del NTDH₆ en solución a muy altas concentraciones entre 6-21 mM (**Figura 42.D**) observándose un aumento del diámetro hidrodinámico desde 7.01 (± 0.88) nm hasta 12.79 (± 1.52) nm proporcional a la concentración. Si bien estos resultados no son concluyentes, el aumento de diámetro hidrodinámico del NTDH₆ en función de la concentración sugiere que puede existir algún tipo de autoasociación que compita con los nanoanticuerpos. Un escenario posible, teniendo en cuenta la capacidad de CA_{BLV} para formar hexámeros mediante contactos entre los NTD, es que el NTDH₆ forme estructuras multiméricas de tamaño discreto cuando aumenta su concentración. Estas interacciones entre monómeros de NTDH₆ podrían afectar la interacción con los nanoanticuerpos, ya sea compitiendo por sus sitios de unión o generando intercambios de calor por efecto de dilución que interfieren con el calor de la reacción. De todos modos, determinar de forma concluyente si este tipo de interacciones entre NTD tiene lugar en solución representa una excelente oportunidad para identificar intermediarios y entender el mecanismo de ensamblado de la lattice hexagonal de BLV. Si bien no se avanzó en este aspecto, podría ser útil invertir el esquema del experimento titulando el NTDH₆ con el VHH19a a altas concentraciones o diseñar experimentos de competición por SPR [445] aprovechando las construcciones de VHH biotiniladas y sin biotinilar. En este caso se debería inmovilizar el VHH19a biotinilado y realizar sucesivas inyecciones de *CA (o el NTDH₆) a idénticas concentraciones en presencia de cantidades crecientes de *VHH19a (no biotinilado). Este tipo de experimentos podría ser útil para estudiar por SPR la interacción de CA con los nanoanticuerpos, atacando algunos de los potenciales problemas que impiden la obtención de un buen ajuste al modelo cinético de Langmuir 1:1 (discutidos previamente) y utilizando cantidades y concentraciones de proteína más accesibles donde la oligomerización de NTD no tenga lugar.

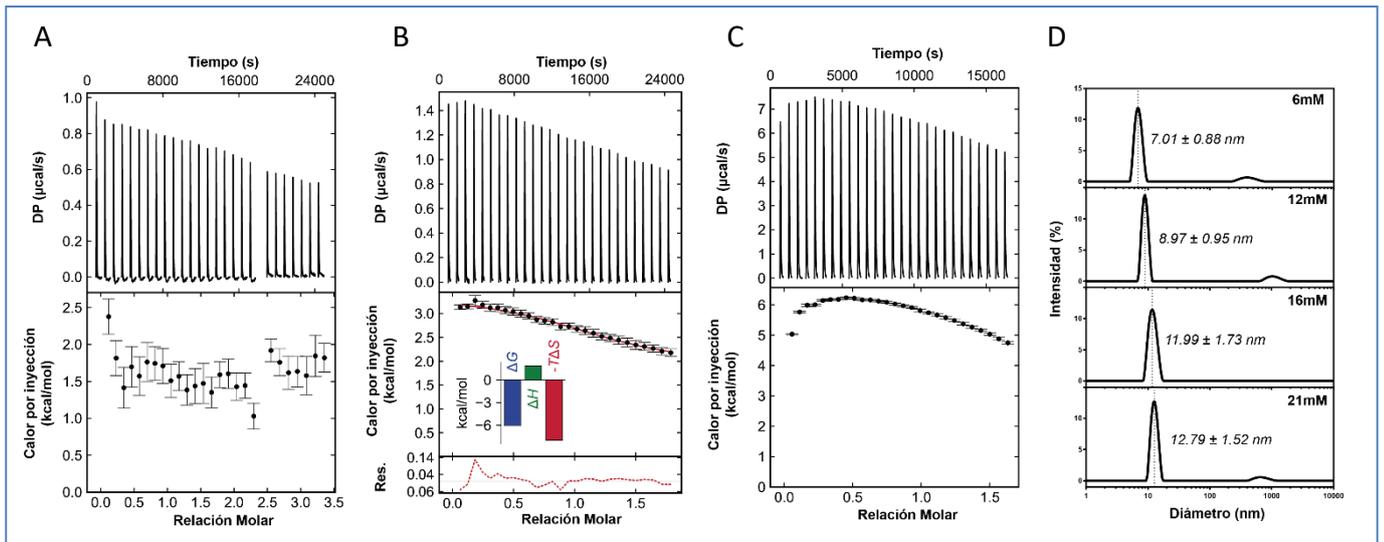


Figura 42: Análisis por ITC de la interacción del *VHH19a con el dominio NTDH6 y análisis de tamaño de NTDH6 en solución por DLS. A) Termograma (panel superior) de la titulación de NTDH₆ (102 μM) con *VHH19a (1,69 mM) y resultado de la integración de las inyecciones (panel inferior). La inyección 20 fue eliminada debido a la presencia de una inflexión en la línea de base que impide su correcta determinación y afecta sensiblemente la integración. **B)** Termograma (panel superior) de la titulación del *VHH19a (247 μM) con el dominio NTDH₆ (2,18 mM); integración de las inyecciones y ajuste a un modelo de heteroasociación $A + B \leftrightarrow AB$ (panel central), con los respectivos valores residuales (panel inferior) y la firma termodinámica como *inset*. Los datos termodinámicos obtenidos (resumidos en la Tabla 9) deben ser considerados con precaución de acuerdo a lo discutido en el texto. **C)** Termograma (panel superior) de la titulación de *VHH19a (762 μM) con el dominio NTDH₆ (6,14 mM) y resultado de la integración de las inyecciones (panel inferior). En este caso no se detecta interacción. **D)** Análisis de la distribución de tamaño de NTDH₆ a altas concentraciones por DLS. Se observa un incremento en el diámetro hidrodinámico promedio (presentado en cada gráfico junto con su desviación estándar) proporcional a la concentración.

Vale la pena recordar además, que la afinidad reportada para el VHH8c, se encuentran cerca del límite de detección de la técnica, donde se requieren altas concentraciones de proteína (sobre todo del titulante) y donde el efecto de agregación de cualquiera de los componentes puede llegar a afectar los resultados.

Tabla 9. Parámetros termodinámicos obtenidos por ITC para la interacción de los nanoanticuerpos *VHH8c y *VHH19a con los dominios *CTD y NTDH6 de CA_{BLV} respectivamente. Los valores obtenidos para el par *VHH8c/*CTD fueron obtenidos de acuerdo con el análisis global presentado en la Figura 41. Por su parte los valores obtenidos para el par *VHH19a/NTDH₆ fueron obtenidos según la Figura 42.B, no obstante, deben ser tomados solo como referencia, debido a la presencia de errores asociados al diseño experimental tal como se describe en el texto.

	*VHH8c / *CTD	*VHH19a / NTDH6
K _D (μM)	8,9	35,2
ΔG (kcal/mol)	-6,9	-6,1
ΔH (kcal/mol)	18,5	1,935
ΔS (cal/Mol K)	85,1	8,0
TΔS (kcal/mol)	25,3	26,9

8.6.2. INHIBICIÓN DEL AUTOENSAMBLADO DE CABLV μ

Una vez llevados a cabo todos los experimentos para cuantificar la interacción de los nanoanticuerpos con CA_{BLV}, y teniendo en cuenta que muchos de los compuestos capaces de inhibir el ciclo replicativo de HIV mediante su interacción con CA poseen afinidades en el orden micromolar bajo, nos enfocamos en evaluar el efecto de nuestros nanoanticuerpos sobre el autoensamblado *in vitro* de CA_{BLV}.

Inicialmente se incubó CA_N 1mM a 38°C y se midió el avance de la polimerización de CA_{BLV} en el tiempo por turbidimetría. Estas condiciones se escogieron teniendo en cuenta la alta concentración local de CA_{BLV} en la partícula viral (estimada en 1mM para HIV aunque con gran variabilidad [155, 243]) y la temperatura normal de los bovinos. Los resultados mostraron un aumento rápido de la turbidez luego de una fase *lag* de aproximadamente

15 minutos, alcanzando un valor constante de A_{340} antes de la media hora, demostrando que cuando CA_{BLV} a una concentración 1mM es mantenida en PBS a 4°C se comporta de forma soluble y monomérica, mientras que el aumento de la temperatura a 38°C es capaz de disparar el auto-ensamblado. Estos resultados se encuentran en perfecto acuerdo con los obtenidos previamente por nuestro grupo, identificando la presencia de iones fosfato, el “crowding” molecular y la temperatura, como algunas de las condiciones que favorecen el autoensamblado de CA_{BLV} *in vitro* [88, 89].

Cuando CA_{BLV} se sometió a las mismas condiciones en presencia de los nanoanticuerpos *VHH8c y *VHH19a a relaciones molares subestequiométricas crecientes (50 a 200 μ M), se observó un aumento en la duración de dicha fase *lag*, la velocidad relativa de autoensamblado (medida como la pendiente de la fase recta de la curva que sucede a la fase *lag*) fue cada vez menor y el nivel de autoensamblado (medido como la turbidez constante alcanzada al final del proceso) fue cada vez más baja (Figura 43). En todos los casos, las curvas mostraron un correcto ajuste con la ecuación empírica de Hill:

$$DO = DO_f \cdot \left[\frac{(t/t_{50})^n}{1 + ((t/t_{50})^n)} \right]$$

donde DO es la A_{340} medida a través del tiempo t . DO_f es la A_{340} extrapolada a tiempo infinito, t_{50} es el tiempo necesario para alcanzar una DO igual a la mitad de DO_f , y n es el parámetro de cooperatividad.

En el caso del *VHH8c a una concentración de 200 μ M (relación molar subestequiométrica de 5:1), no se observó autoensamblado de la cápside incluso después de 5 horas de incubación a 38°C (la Figura 43 solo refleja un período de 2 horas) evidenciando una inhibición total, mientras que frente a concentraciones cada vez más bajas de este nanoanticuerpo se constató la capacidad de polimerizar con velocidades cada vez mayores alcanzando DO finales cada vez más altas (Figura 43.A). A modo de referencia, el nivel de autoensamblado de CA_{BLV} en presencia del *VHH8c (a una relación molar subestequiométrica 20 veces inferior) sufrió una reducción al 81% mientras que la velocidad relativa de polimerización se vio disminuida al 51%.

Por su parte el *VHH19a (Figura 43.B) mostró un comportamiento similar donde la presencia del nanoanticuerpo a relaciones molares subestequiométricas cada vez mayores, provocó una disminución del nivel y de la velocidad relativa del autoensamblado de CA_{BLV} , observándose inhibición absoluta (después de 5 horas de incubación a 38°C) a concentraciones de 200 μ M e incluso 133 μ M (relaciones molar subestequiométrica de 5:1 y 7.5:1). A modo de referencia, el nivel de autoensamblado de CA_{BLV} en presencia del *VHH19a (a una relación molar subestequiométrica 20 veces inferior) sufrió una reducción al 65% mientras que la velocidad relativa de polimerización se vio disminuida a un 32.2%.

Estos resultados muestran que ambos nanoanticuerpos son capaces de inhibir el autoensamblado de CA_{BLV} *in vitro* y sugieren que el poder inhibitorio del VHH19a podría ser incluso superior al del VHH8c.

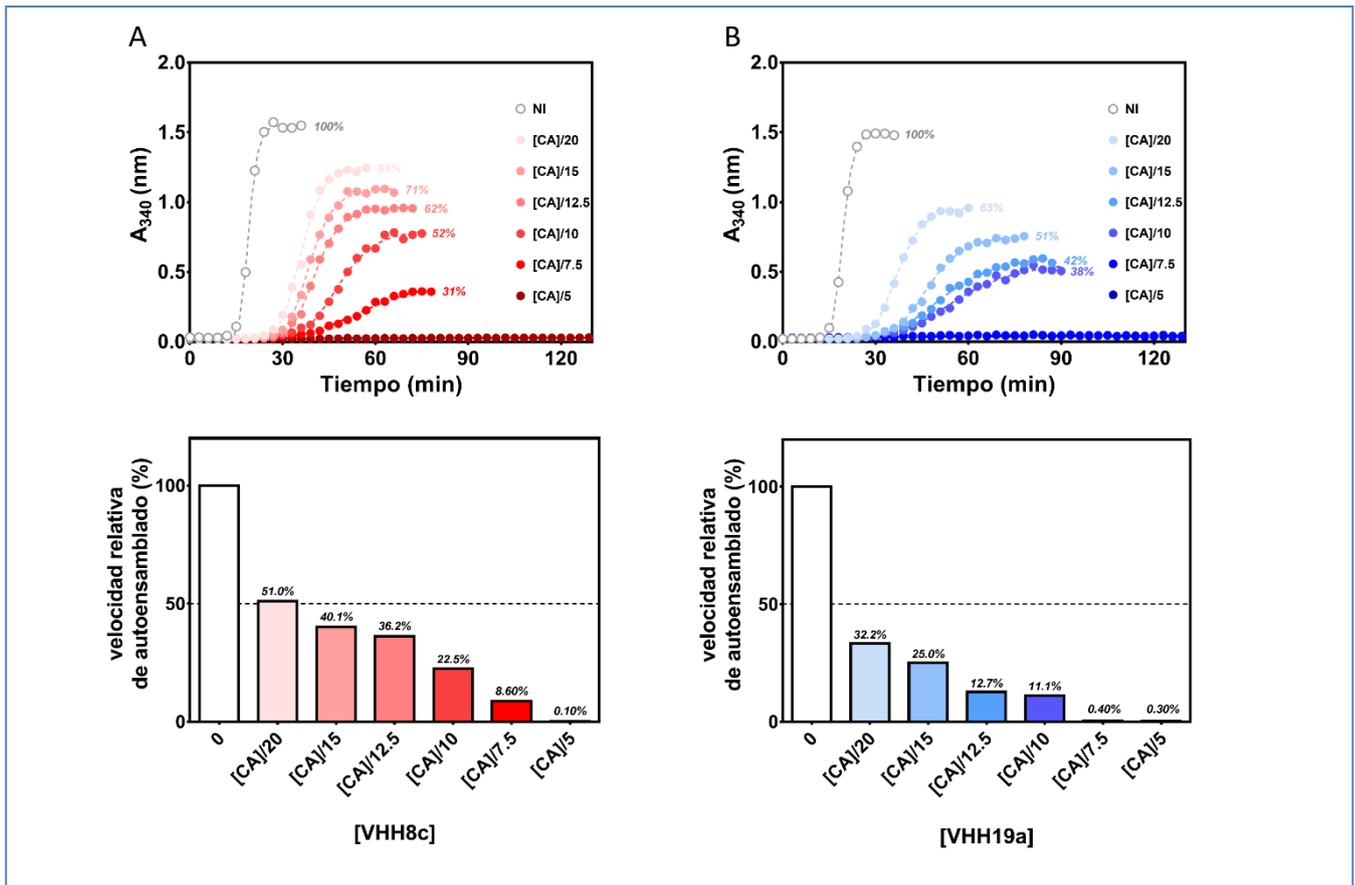


Figura 43: Inhibición *in vitro* del autoensamblado de CA_{BLV}: A-B) Autoensamblado de CA_n 1mM en presencia de concentraciones subestequiométricas crecientes de *VHH8c y *VHH19a respectivamente (panel superior) y efecto de la concentración de dichos nanoanticuerpos sobre la velocidad relativa del autoensamblado de CA_n (panel inferior). Las curvas de autoensamblado fueron ajustadas a la ecuación de Hill (líneas discontinuas) observándose una disminución del nivel de polimerización proporcional a la concentración de nanoanticuerpo (expresada como porcentaje junto a cada curva). Por su parte las velocidades relativas fueron calculadas como el cociente de las pendientes de la parte recta (justo después de la fase *lag*) de las curvas de autoensamblado (paneles superiores) en ausencia y presencia de nanoanticuerpo y expresadas como porcentaje.

8.6.3. ANÁLISIS ESTRUCTURAL

8.6.3.1. CRISTALOGÉNESIS

El abordaje para dilucidar detalles estructurales de la interacción de los nanoanticuerpos seleccionados y CA_{BLV}, se llevó a cabo intentando cristalizar los respectivos complejos VHHs/dominios de CA_{BLV} para luego resolver su estructura por difracción de rayos X. En todos los casos se utilizaron las versiones de proteínas de BLV y nanoanticuerpos sin regiones móviles o poco estructuradas. Así, se utilizaron el *CTD (sin *His-tag*) y los VHHs luego de remover el sitio de biotilación y el *His-tag*. Para obtener cristales de complejos, se analizaron 384 condiciones de cristalización diferentes en forma robótica, utilizando relaciones equimolares de VHH/dominio de CA_{BLV}. De esta manera se lograron identificar algunas condiciones en función de la aparición de pequeños cristales, que fueron optimizadas mediante introducción de modificaciones en forma gradual y sistemática, con el objetivo de obtener cristales únicos y de calidad.

Para el complejo *VHH19a/NTDH6 se utilizaron concentraciones equimolares de 2.9 mM y se obtuvieron en forma robótica pequeños cristales con forma de aguja en la condición 10% (w/v) Polietilenglicol 6000, 0,1 M HEPES pH 7,0. A partir de esta condición se hizo una optimización en forma manual, utilizando una concentración equimolar de complejo *VHH19a/NTDH6 de 2.9 mM, variando las condiciones de cristalización en forma gradual y sistemática en el rango 6-16 % (w/v) Polietilenglicol 6000, 0.1 M HEPES pH=6,5-8,0 con relaciones equivolumétricas de

reservorio y proteína. Los resultados más promisorios se obtuvieron con 6 % (w/v) Polietilenglicol 6000, 0.1 M Hepes pH=7.5, dando lugar a cristales de forma alargada tipo agujas que fueron criopreservados y enviados al sincrotrón de Soleil para ensayos de difracción de rayos X. Los resultados de búsqueda y optimización de las condiciones de cristalización para estos complejos se presentan en la [Figura 44.A](#).

Por su parte en el caso del complejo equimolar *VHH8c/*CTD a 2,87 mM se encontraron pequeños cristales en 4 condiciones obtenidas a partir de placas robóticas: a) 0,1 M Bicina pH 9.0, 1,6 M AmSO₄; b) 0,1 M Tris pH 8,0, 1,6 M AmSO₄; c) 0,1 M Hepes pH 7.5, 1,5 M Li₂SO₄ y d) 0,1 M Tris pH8.5, 30 % (w/v) Polietilenglicol 400. Las mismas se optimizaron evaluando diferentes concentraciones de proteínas (complejo equimolar 1.5-3.14 mM), diferentes relaciones de reservorio:proteína y variando en forma gradual y sistemática las condiciones de cristalización. Así, se evaluó la formación de cristales en el siguiente rango de condiciones: a) 1.2-2.2 M Sulfato de Amonio, 0.1 M Tris pH=7.0-9.0; b) 1.2-2.2 M Sulfato de Amonio, 0.1 M Bicina pH=9.0; c) 24-39 % (w/v) Polietilenglicol 400, 0.1 M Tris pH 8.5 y d) 0.6-2.1 M LiSO₄, 0.1M Hepes pH 7.5. La condición 1.1 M LiSO₄, 0.1M Hepes pH 7.5 presentó pequeños cristales y por tal motivo se intentó hacer "seeding" (pequeños cristales obtenidos en una condición sembrados en condiciones similares) y se evaluó la adición de aditivos como glicerol en forma manual o usando un kit comercial en forma robótica, tal como se describe en la sección 7.7.1. En ningún caso fue posible obtener cristales aptos para difracción de rayos X ([Figura 44.B](#)).

Ante la imposibilidad de cristalizar el complejo VHH8c/*CTD, intentamos obtener cristales del *VHH8c en forma aislada. Luego de una búsqueda de 384 condiciones en forma robótica utilizando una concentración de *VHH8c 3,8 mM, se obtuvieron cristales en las siguientes condiciones: a) 0,1M buffer citrato pH 5.0, 2,4 M AmSO₄; b) 0,2 M acetato de zinc, 20 % (w/v) Polietilenglicol 3350; c) 0.2 M citrato de litio, 20 % (w/v) Polietilenglicol 3350 y d) 2,0 M AmSO₄, 5% (v/v) 2-propanol. En función de estos resultados se evaluó la formación de cristales en forma manual en el siguiente rango de condiciones: a) 0,1 M buffer citrato pH 5, 2-3 M AmSO₄; b) 0,2 M acetato de zinc, 16-26 % (w/v) Polietilenglicol 3350; c) 0.2 M citrato de litio, 16-26 % (w/v) Polietilenglicol 33 y d) 1.6-2.6 M AmSO₄, 5% (v/v) 2-propanol, siendo esta condición la más promisoría. En tal sentido se continuó con la optimización variando la concentración de 2-propanol en el rango 1-9 %, agregando aditivos como 1-11% glicerol en forma manual o usando un kit comercial en forma robótica, realizando "seedings" y cambiando las relaciones volumétricas de proteína:reservorio. Los cristales de mejor calidad fueron obtenidos con *VHH8c 3.8mM en 2.4M AmSO₄, 7% 2-propanol, 4% Pentaeritritol etoxilato (3/4 EO/OH). Los resultados de búsqueda y optimización de las condiciones de cristalización del *VHH8c en forma aislada se presentan en la [Figura 44.C](#).

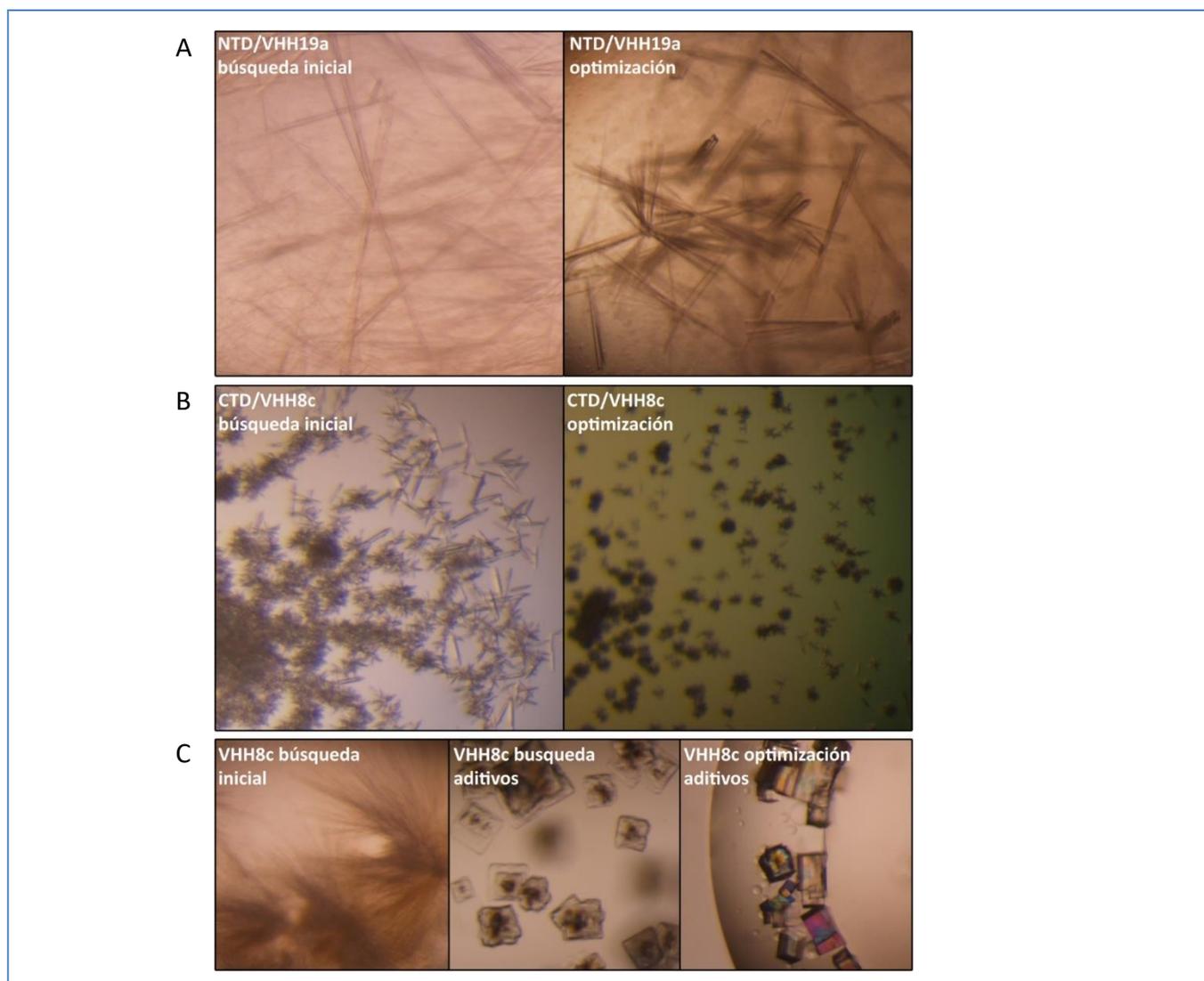


Figura 44: Búsqueda de condiciones de cristalización de los VHH seleccionados en complejo con los dominios de CA_{BLV}. **A)** Ejemplo de alguno de los cristales obtenidos con complejos equimolares *NTD/*VHH19a. Los cristales optimizados con hábito de crecimiento tipo aguja (*derecha*) difractaron a baja resolución, sin embargo, no se ha podido dilucidar aún la estructura del complejo. **B)** Ejemplos de cristales obtenidos con complejos equimolares *CTD/*VHH8c. Se intentó sin éxito optimizar cristales mediante búsqueda de condiciones similares a las identificadas durante la búsqueda inicial. Ante este escenario negativo se procedió a buscar cristales del nanoanticuerpo en forma aislada. **C)** Ejemplos de cristales obtenidos con *VHH8c en forma aislada. La búsqueda de aditivos a partir la condición inicial permitió optimizar las condiciones para obtener cristales con hábito de crecimiento cúbico (*derecha*). Estos cristales difractaron a alta resolución permitiendo dilucidar la estructura tridimensional del VHH8c. Las condiciones que dieron lugar a los cristales presentados en esta figura se describen en el texto.

8.6.3.2. DIFRACCIÓN Y ANÁLISIS ESTRUCTURAL

En el caso del VHH19a, los cristales difractaron a baja resolución (4.2 Å) y el procesamiento de los datos de difracción indicó que el mismo pertenece a una forma cristalina tetragonal. A pesar de innumerables intentos por resolver la estructura por reemplazo molecular utilizando como sonda de búsqueda distintos VHHs obtenidos de la PDB, esto no fue posible. Las posibles causas de esta dificultad pueden ser: a) baja resolución de los datos; b) anisotropía en la difracción y c) presencia de simetría no cristalográfica traslacional.

Por su parte el cristal obtenido con el VHH8c difractó a una resolución de 2.1 Å y el procesamiento de los datos reveló una forma cristalina orto-rómbica con un grupo de espacio C222₁.

Tabla 10: Estadísticas de colección de datos y refinamiento para la obtención de estructuras atómicas. En el caso del VHH19a no contamos con estadística de refinamiento dado que no se resolvió la estructura. En paréntesis se presentan los datos estadísticos de la capa de mayor resolución.

	VHH19a	VHH 8c	
Estadística de los datos	Longitud de onda (Å)	0.9801	0.9801
	Grupo de espacio	P 4 2 2	C 2 2 2 ₁
	Celda unidad (a, b, c) (Å)	100.076 100.076 174.678	120.56 120.72 69.941
	Rango de resolución de los datos (Å)	43.417 - 4.203 (4.276 – 4.203)	54.09 - 2.109 (2.184 - 2.109)
	Reflexiones únicas medidas	6885 (331)	29555 (2948)
	R _{merge}	0.352 (1.705)	0.1364 (0.6807)
	R _{meas}	0.375 (1.818)	0.1516 (0.7564)
	R _{pim}	0.126 (0.616)	0.06448 (0.3223)
	Promedio I/σ(I)	5.9 (1.6)	8.71 (2.26)
	CC1/2	0.993 (0.772)	0.995 (0.752)
	Complejidad (%)	99.1 (99.1)	99.15 (99.86)
	Multiplicidad	8.6 (8.4)	5.1 (5.3)
	Estadística del refinamiento	Rango de resolución	
Reflexiones usadas			29555 (2948)
Reflexiones usadas por R _{free}			1556 (139)
R _{work}			0.2085 (0.2406)
R _{free}			0.2465 (0.2915)
RMS (enlaces)			0.003
RMS(ángulos)			0.67
Gráfico de Ramachandran permitido/no permitido (%)			99.58/0.42
PDB ID			6OC8

La unidad asimétrica del cristal presentó cuatro moléculas completas del VHH8c con una alta homología estructural presentando las mayores diferencias a nivel del loop que conecta las hojas beta C y C' de FR2 (**Figura 45.A**). En cuanto a la estructura terciaria se observan los tres CDRs, con el CDR1 presentando estructura secundaria helicoidal, el CDR3 dispuesto sobre las cadenas beta C y C' (superficie que en los anticuerpos clásicos forma parte de la interfaz VH/VL), el puente disulfuro canónico entre las Cys₂₃ y Cys₁₀₄ manteniendo estabilizadas las hojas beta B y G de las regiones FR1 y FR3 respectivamente (**Figura 45.B**) y un paratope planar (habitualmente asociado a anticuerpos generados contra superficies de proteínas) (**Figura 45.C**). La distribución de cargas en la superficie de la molécula muestra una distribución relativamente uniforme, y mayoritariamente neutralizadas entre sí, en concordancia con la alta solubilidad constatada (**Figura 45.D**).

Los factores B de las estructuras obtenidas fueron bajos, demostrando que la misma no posee regiones móviles, y en tal sentido el CDR3 conformado por un gran loop de 14 residuos de largo está estabilizado por contactos hidrofóbicos con residuos de la región FR2 (**Figura 45.E**). La molécula no presenta regiones fuertemente cargadas como lo demuestra la **Figura 45.D**, con presencia de residuos hidrofóbicos expuestos fundamentalmente en el CDR1 y en menor medida el CDR3 (**Figura 45.E**) apoyando la hipótesis de una interacción con el CTD a través de contactos hidrofóbicos. Esta observación coincide con la presencia de dos superficies planas a nivel del CTD, con residuos hidrofóbicos expuestos hacia la superficie (**Figura 45.F**). Dichas superficies corresponden a la interfase de contacto entre CTDs inter-hexaméricos con carácter hidrofóbico (característica conservada entre retrovirus ([53, 446]) y a la superficie de contacto intra-hexamérico con el NTD del protómero adyacente, por lo que la interacción con estas superficies tiene implicancias directas con la formación de la *lattice*.

El CDR1 se presenta como el principal componente de la superficie hidrofóbica del paratope y posee estructura helicoidal, haciendo de este un muy buen modelo para la generación de péptidos con actividad inhibitoria del ensamblado de la cápside de BLV, de manera similar que con los péptidos inhibidores de la autoasociación de CA_{HIV}: CAC-1 [241] o CAI [243-245] y sus derivados. Estos poseen residuos hidrofóbicos expuestos hacia la superficie de contacto con CA_{HIV} interactuando con las superficies homólogas a las propuestas en el párrafo anterior, y podría ser

un buen modelo de inicio para la aplicación de técnicas de docking *in silico* para entender la interacción, diseñar nuevos interactores o mutantes capaces de formar complejos estabilizados por puentes disulfuro.

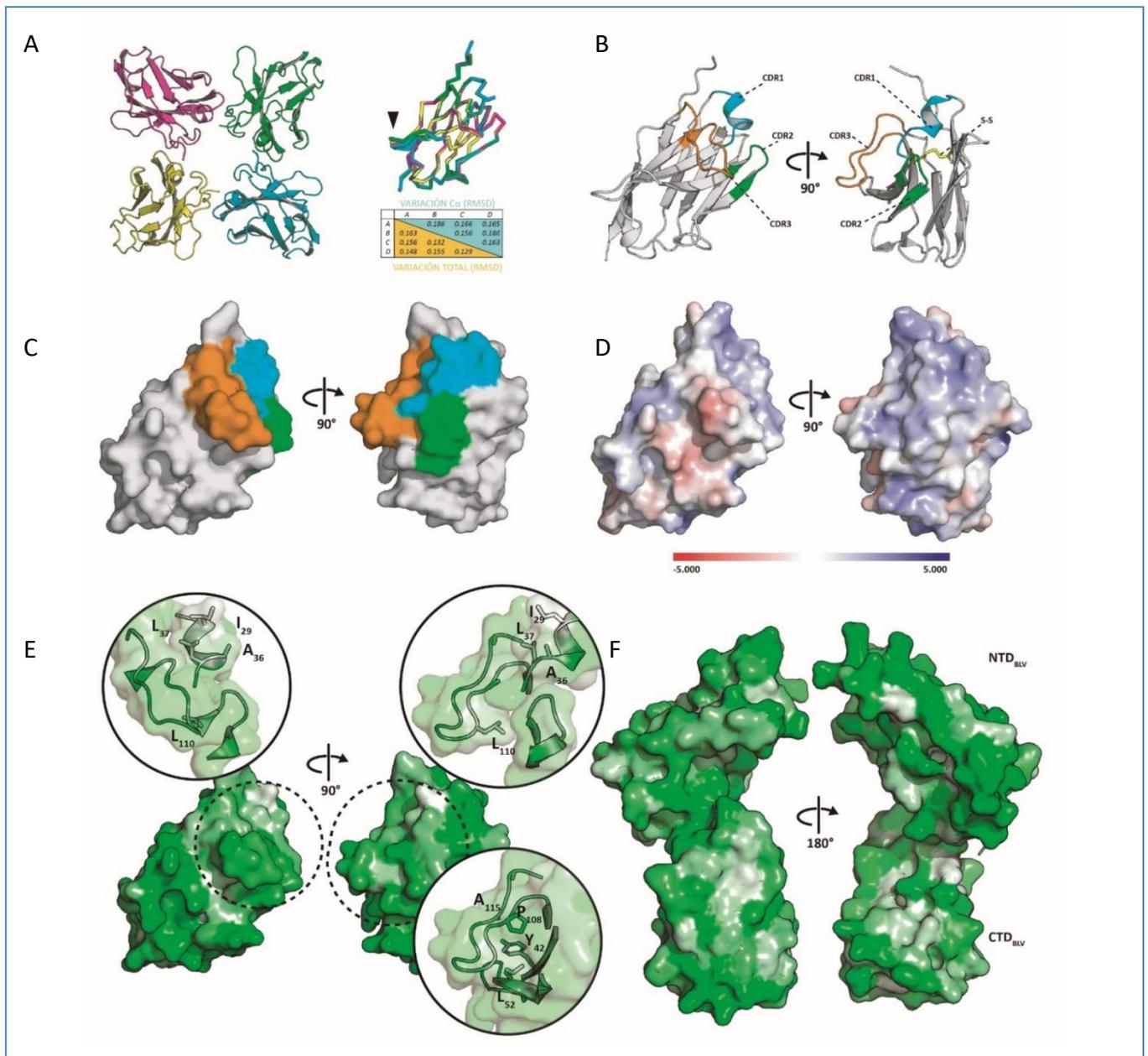


Figura 45: Análisis estructural del VHH8c. **A)** Representación en "cartoon" de las 4 moléculas del VHH8c completas que integran la unidad asimétrica de los cristales obtenidos (*izquierda*) y superposición de las cadenas principales de las mismas denotando una alta homología estructural (*derecha*). La cabeza de flecha negra indica el loop con mayor diferencia entre moléculas. El cuadro indica las desviaciones relativas en (RMSD) de los carbonos alfa (C α) de la cadena principal en celeste y del total de las moléculas en amarillo. **B)** Representación de la molécula C de VHH8c vista desde ángulos diferentes denotando su estructura secundaria con los CDRs y el puente disulfuro canónico señalado. **C)** Representación de la superficie del VHH8c con las mismas orientaciones y código de colores de B, denotando la topología planar del paratope. **D)** Mapa superficial de distribución de cargas del VHH8c. **E)** Representación de la superficie del VHH8c coloreada por hidrofobicidad. Los insets superiores indican los residuos hidrofóbicos de los CDR1 y CDR3 expuestos hacia la superficie del paratope. El inset inferior derecho indica los residuos hidrofóbicos del CDR3 y FR2 que se mantienen mutuamente excluidos del solvente. **F)** Representación de la superficie de CABLV coloreada por hidrofobicidad donde se observan dos superficies relativamente planas a ambos lados del CTD con presencia de residuos hidrofóbicos. Los PDB ID del VHH8c y CABLV corresponden a 6OC8 y 4PH0. Los mapas de densidad de cargas se crearon con la herramienta APBS 2.1 de Pymol, donde rojo es positivo y azul es negativo[447], mientras que los mapas de hidrofobicidad de superficie se realizaron usando el comando de Pymol Color h2, donde verde es polar y lanco es apolar <https://web.expasy.org/protscale/pscale/Hphob.Eisenberg.html> [448]. La numeración de residuos obedece al sistema de numeración IMGT y no a la posición en la secuencia nucleotídica del VHH.

9. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

La obtención de las diferentes versiones de los antígenos virales fue crucial a lo largo de esta tesis (desde la inmunización de llamas, hasta la caracterización de la interacción de nanoanticuerpos con su blanco y los intentos por obtener cristales de complejos para difracción de rayos X). Por tal motivo en cada una de las purificaciones realizadas, se ponderó el grado de pureza, homogeneidad y solubilidad de las proteínas, sobre la cantidad de material obtenido (incluso cuando esta es limitante). Buena parte de este trabajo se enfocó en la interacción entre los VHH seleccionados y CA_{BLV} en condiciones controladas, de modo que contar con todos los componentes en las mismas condiciones fue determinante. Los nanoanticuerpos seleccionados demostraron ser mucho más estables en PBS que en las condiciones de almacenamiento iniciales de CA_{BLV} , motivo por el cual se utilizó este buffer como condición final para todas las proteínas producidas. Si bien los iones fosfato divalentes son promotores del ensamblado de CA_{BLV} , el mismo es inhibido cuando la proteína se mantiene a 4°C, permitiéndonos obtener CA_{BLV} y sus dominios en forma monomérica soluble.

A modo de conclusión podemos decir que se optimizó la producción en PBS, de todas las proteínas de BLV utilizadas en los experimentos de caracterización biofísica y estructural, lográndose niveles de solubilidad, pureza y homogeneidad acordes con los requerimientos de técnicas analíticas aplicadas, mostrando rendimientos superiores a los 60 mg⁻¹ L⁻¹ de cultivo bacteriano.

Durante la maduración de Gag, las estructuras tridimensionales de los dominios NTD y CTD de CA_{BLV} se mantienen prácticamente inalteradas, siendo la formación del β -hairpin en el extremo N-terminal del NTD una de las diferencias estructurales más importantes entre ambos estados. Esto representa una característica común a nivel de retrovirus tal como se ve en la [Figura 12](#) [74, 178, 209] y fue demostrado para el NTD de CA_{BLV} por nuestro grupo [53], mediante la elucidación de la estructura atómica del NTDH₆ con β -hairpin simulando el estado maduro de CA_{BLV} (PDB:4PH2) y del dominio *NTD sin β -hairpin simulando el estado inmaduro (PDB: 4PH3), tal como se muestra en la [Figura 26.B](#).

Teniendo en cuenta este aspecto, la inmunización de la llama se realizó con la construcción * CA_{BLV} (carente de β -hairpin) con el objetivo de no dirigir la respuesta inmune contra esta estructura, generando anticuerpos con capacidad de reconocer CA_{BLV} independientemente del estado de maduración de Gag. Por otra parte, la presencia de residuos extra (provenientes del sitio de corte por trombina) en el extremo N-terminal de *CA ([Figura 26.A](#)) representa un fragmento inexistente en CA_{BLV} que podría generar anticuerpos específicos, sin embargo la selección posterior de VHHs con capacidad de reconocer la proteína nativa nos permitió asegurar que el reconocimiento antigénico de los clones seleccionados, no está supeditado a estos pocos residuos.

Los datos estructurales obtenidos con HIV han demostrado que independientemente del estado de maduración de Gag, el CTD de CA mantiene su estructura tridimensional incambiada participando de hexámeros, ya sea estabilizados por el manojito de 6 hélices (6HB) de la región N-terminal del péptido SP1 (en la Gag inmadura) o mediante contactos hexaméricos entre NTDs (en la CA madura). Además, durante la maduración ambos dominios rotan sobre sí mismos de manera que los residuos orientados hacia el interior del hexágono quedan hacia afuera [170, 171], lo cual requiere que la región bisagra de CA sufra re-arreglos conformacionales. Atendiendo a los resultados de mapeo antigénico obtenidos con CA_{BLV} en este trabajo, donde todos los nanoanticuerpos con capacidad de unirse a CA reconocen al menos uno de los dominios de CA_{BLV} , podemos decir que la interacción con el antígeno tampoco depende de la región central del linker flexible (ausente en las construcciones de NTD y CTD).

Esto demuestra que cualquiera de los nanoanticuerpos seleccionados y caracterizados en este trabajo son capaces de reconocer CA_{BLV} en su estado maduro a través de uno de sus dominios NTD o CTD, y también cuando se encuentra formando parte del precursor Gag en la partícula inmadura.

En definitiva, podemos concluir que la inmunización con la proteína CA_{BLV} carente de 6-hairpin dio lugar a una respuesta humoral mantenida en el tiempo, con títulos de anticuerpos en el orden de 1:9000, permitiéndonos generar una librería preinmune de VHHs ligados a fagos (con un tamaño de 10¹² cfu/mL).

Por su parte, los nanoanticuerpos específicos contra CA_{BLV} reconocen en su mayoría al menos uno de los dominios NTD y CTD, siendo a priori candidatos para interactuar con el precursor Gag en las etapas iniciales del ensamblado del virus y con la proteína CA_{BLV} madura en la partícula viral.

En este trabajo, seleccionamos los VHHs mediante unión a CA_{BLV} aplicando lavados con detergente a baja concentración. La estabilidad estructural de la proteína blanco resulta crucial en la etapa de inmunización afectando el perfil de la respuesta inmune (algo muy tenido en cuenta durante el desarrollo de vacunas [449]), pero también durante la selección de los VHH específicos. Tal como se discute en la sección Resultados y Discusión, la estabilidad del antígeno durante las rondas de panning representa un cuello de botella importante a la hora de definir el perfil de reactividad de los VHH seleccionados. Por ejemplo, la selección de clones específicos contra regiones menos sensibles desde el punto de vista estructural se verá favorecida. En tal sentido, aquellas partes de la proteína blanco que presenten mayor inestabilidad estructural en las condiciones de panning, darán lugar a una población reducida de nanoanticuerpos dado que su reactividad con la proteína nativa se verá relegada. La aplicación de técnicas para estudiar la estabilidad conformacional del antígeno en las condiciones de panning [450] podría ser de gran utilidad a la hora de seleccionar clones con determinadas características.

Los VHH obtenidos a partir de librerías específicas contra CA_{BLV} se clonaron en un vector de expresión (pINQ-BtH6) con un péptido señal en el extremo N-terminal para direccionar su expresión al espacio periplásmico (menos reductor que el citosol), asegurando así la formación del puente disulfuro canónico que estabiliza su estructura terciaria (y por ende su funcionalidad). Además, dicho vector nos permitió purificar a baja escala 95 clones expresados en el espacio periplásmico y biotinilados *in vivo*, para aplicar diferentes criterios de selección. La gran pérdida de diversidad que esto representó nos permitió comenzar a analizar la librería anti CA_{BLV} y entender las características de algunos clones. En la medida que seamos capaces de traducir dicho análisis (afinidad, mapeo antigénico, identificación de residuos clave, similitudes a nivel de secuencia, etc.) a propiedades funcionales, podremos volver sobre la librería para direccionar nuestra búsqueda a nanoanticuerpos con determinadas características.

Esto nos permite concluir que la librería completa de VHHs anti CA_{BLV} fue clonada en un vector de expresión para producir nanoanticuerpos biotinilados in vivo (en ausencia de fagos) y aplicar diferentes criterios de selección escogiendo dos VHH: el VHH8c capaces de reconocer en forma específica el dominio CTD y el VHH19a con especificidad por el NTD.

La producción de estos VHHs a mayor escala nos permitió evaluar las características de la interacción con sus respectivos antígenos demostrando que no existe reacción cruzada, que son capaces de reconocer epítopos lineales expuestos a la superficie de CA_{BLV} y que la afinidad de la interacción es relativamente débil en comparación con las alcanzadas con nanoanticuerpos en general. Estos resultados y la necesidad de caracterizar los VHH y su interacción con CA_{BLV} mediante técnicas biofísicas y estructurales, nos obligó a poner a punto un protocolo de producción de VHHs con rendimientos, solubilidad, estabilidad y niveles de pureza y homogeneidad suficientemente altos para cubrir los requerimientos de dichas técnicas (en muchos casos dependientes de la afinidad por el antígeno). Incluso se eliminaron las partes móviles y/o poco estructuradas con el propósito de aumentar su estabilidad y homogeneidad estructural.

En tal sentido, pusimos a punto un protocolo de expresión y purificación de VHH a partir de periplasma de E. coli, con rendimientos de 15-30 mg L⁻¹ de cultivo, alcanzando niveles de pureza por encima de 98% y una excelente solubilidad y homogeneidad con VHH a concentraciones finales entre 3-5 mM.

A pesar de los esfuerzos realizados y las consideraciones tenidas en cuenta para la selección de clones de alta afinidad, el VHH8c se une al dominio CTD con un valor de K_d cercano a 10 μM , lo cual representa una afinidad relativamente baja en comparación con los reportes de afinidad de nanoanticuerpos. En cuanto al perfil termodinámico de la interacción, la misma está gobernada por el componente entrópico, una característica poco común en nanoanticuerpos que se explica por una interacción probablemente a través de residuos hidrofóbicos. Por su parte la afinidad del VHH19a por el NTD no pudo ser cuantificada en forma precisa por ITC o SPR, no obstante, los resultados cualitativos llevados a cabo por SPR muestran un perfil no muy distinto del observado con el VHH8c presentando una disociación apenas más lenta que con el VHH8c. Igualmente dicha disociación ocurre de modo relativamente rápido, acorde con una constante cinética de disociación (k_{off}) alta y por ende una afinidad baja. Por su parte los resultados obtenidos por western blot muestran también una señal mayor con el VHH19a apoyando la idea de una afinidad superior, no obstante, ninguno de estos resultados es concluyentes.

A modo de conclusión podemos decir que el VHH8c interactúa con el dominio CTD probablemente a través de interacciones hidrofóbicas con una afinidad de 10 μM , mientras que la interacción del VHH19a con el NTD (probablemente algo mayor) no pudo ser caracterizada con precisión, requiriendo nuevas aproximaciones experimentales.

La baja afinidad de los VHHs seleccionados, no solo dificultó su caracterización (requiriendo cantidades mayores de proteína y concentraciones elevadas) así como la formación de complejos estables capaces de ser cristalizados, sino que además representa una reducción el abanico de potenciales aplicaciones en diagnóstico, investigación básica o terapéutica.

El diagnóstico de BLV se lleva a cabo mediante técnicas serológicas (ELISA y AGID) y en tal sentido nuestro grupo recientemente ha desarrollado una prueba ELISA para detectar anticuerpos contra CA y Env en muestras de sangre y leche de origen bovino [28]. En el caso de HIV el diagnóstico también se realiza por técnicas serológicas, sin embargo la aplicación de técnicas alternativas basadas en la detección de CA_{HIV} tiene cabida en ciertas condiciones [221, 222]. Diferentes test con ultra-sensibilidad han sido propuestos teniendo en cuenta que la abundancia de esta proteína en sangre es baja [222]; algunos de ellos basados en nanoanticuerpos de llama [451, 452]. En BLV (como en HTLV) parece muy poco viable desarrollar este tipo de estrategias teniendo en cuenta fundamentalmente que la detección de proteínas y partículas virales en el hospedero es muy baja como consecuencia de los mecanismos de propagación basados en la integración del ADN proviral en linfocitos B con prolongados periodos de latencia [2, 3].

En investigación básica, la obtención de VHHs capaces de unir CA_{BLV} a través de ambos dominios en forma diferencial representa una gran oportunidad, que se vería potenciada por la obtención de clones de mayor afinidad ya sea mediante selección de nuevos clones, realización de nuevas rondas de panning o introducción de mutaciones en forma aleatoria utilizando la técnica de PCR propensa a error (epPCR por “error prone pcr”) [453].

Con el objetivo de movernos en esta dirección, la librería preinmune fue sometida a un nuevo evento de selección por panning en presencia de CA_{BLV} soluble como competidor, con el objetivo de seleccionar clones con mayor afinidad (de acuerdo a [375]). Esta selección fue realizada con la colaboración de Martín Rossotti, obteniéndose tres clones capaces de reconocer los dominios NTD y CTD en forma diferencial y con afinidades aparentemente mayores, cuyas secuencias aminoacídicas presentan bastante homología con los clones secuenciados en este trabajo. La caracterización de estos VHHs, su interacción con CA_{BLV} y la comparación con los clones VHH8c y VHH19a no forman parte de este trabajo, integrando las perspectivas a futuro.

La obtención de clones de mayor afinidad podría ser de gran ayuda por ejemplo en la comprensión del proceso de desensamblado e importación del ARN de BLV al núcleo de la célula infectada. Como ocurre con HIV, es altamente probable que cuando la cápside de BLV es internalizada en la célula hospedera se den interacciones con diversos componentes celulares (factores de restricción, cofactores del desensamblado, nucleoporinas, etc.) cuya identidad permanece ignorada y viene siendo estudiada en nuestro laboratorio mediante acercamientos proteómicos. La inmovilización orientada de VHHs biotinilados in vivo con alta afinidad por dominios de CA_{BLV}, podría ser de utilidad en la captura de ensamblados de esta proteína unidos a interactores citoplasmáticos, para su posterior identificación. Incluso disponer de VHHs contra ambos dominios podría dar lugar a elegantes estrategias de elución por competición, sin necesidad de aplicar condiciones severas.

La obtención de datos estructurales a partir de complejos entre CA_{BLV} y posibles interactores identificados, podría verse igualmente favorecida por el uso de VHHs de alta afinidad dado que su uso como chaperonas en cristalogénesis para difracción de rayos X ha sido bien documentado [454-456] e incluso extendido a otras técnicas estructurales como NMR [457] y criomicroscopía electrónica [458].

Dado el carácter modular de los VHH, su uso podría extenderse incluso a la identificación de interactores de CA_{BLV} a nivel celular mediante técnicas de co-localización de fluoróforos [459-461] y microscopía de fluorescencia [462-466] o bien para definir la localización espacio-temporal de CA_{BLV} a nivel celular [466-468]. La microscopía de fluorescencia super-resolutiva ha tenido un gran impacto en el estudio de HIV [469] y el marcado directo nanoanticuerpos evitando la disminución de la resolución generada con otro tipo de sondas de mayor tamaño [470] podría ser de utilidad para el estudio de BLV.

Dado que, durante buena parte del período infectivo BLV permanece latente y la mayoría de las células infectadas no producen viriones, la detección de CA_{BLV} en poblaciones celulares específicas puede ser de gran utilidad a la hora de entender los estímulos y mecanismos que disparan la producción de partículas infectivas. Una estrategia utilizada en HIV se basa en el uso de nanoanticuerpos para detectar y eventualmente manipular poblaciones de células productoras de CA_{HIV} [471]. La misma consiste en introducir mutaciones desestabilizantes en las regiones FR de los VHHs específicos fusionados a proteínas fluorescentes, de modo que la unión al antígeno estabilice dichos clones rescatándolos de la vía proteasómica y permitiendo seleccionar las células por citometría de flujo.

Como se vio en la introducción, el ensamblado de la cápside de HIV inicia durante la maduración con la liberación del dominio CTD de Gag, el cual se encuentra formando hexámeros estabilizados por unión a IP6 y por el péptido SP1 helicoidal que forma un manojo de seis α -hélices (6HB) [170, 171]. No obstante, en BLV no se conoce exactamente el mecanismo de maduración y ensamblado de la cápside, y posee algunas diferencias que pueden sugerir la existencia de mecanismos diferentes. Algunas evidencias apuntan a que IP6 es capaz de unirse al dominio MA de la Gag de BLV [172], y en HTLV-1, los contactos NTD-NTD parecen tener mayor relación con ensamblado de Gag que en HIV [176]. En BLV el dominio MA de Gag sufre proteólisis diferencial en su extremo C-terminal dando lugar a un pequeño péptido p4 [220] y es el único retrovirus donde la dimerización del ARN viral depende del dominio MA. Por tales motivos disponer de VHHs bien caracterizados con capacidad de unirse a ambos dominios en forma específica, resulta de interés para entender los mecanismos de ensamblado y maduración de Gag de BLV.

En esta tesis nos propusimos generar interactores de CA_{BLV} que pudieran **alterar el hábito de autoensamblado** de la cápside con el propósito de bloquear el ciclo replicativo en una o varias de las diversas etapas en que este proceso tiene implicancias. Ante la ausencia de inhibidores específicos del ensamblado de la cápside de BLV, los experimentos de inhibición se llevaron a cabo en forma exploratoria y no con fines estrictamente comparativos frente a otros inhibidores del ensamblado de la cápside de retrovirus.

Los resultados muestran una disminución de la velocidad de polimerización y la cantidad de proteína autoensamblada a medida que se aumenta la concentración de VHHs, alcanzando una inhibición absoluta con

relaciones molares de CA:VHH8c y CA:VHH19a de 5 y 7.5, respectivamente. A modo de referencia, Rincón *et al.* [472] determinaron la velocidad relativa de autoensamblado *in vitro* de CA_{HIV} en presencia del péptido inhibidor CAI (capaz de unirse al CTD con una afinidad similar al VHH8c [244]) usando una relación molar CA:CAI subestequiométrica de 5. Los autores detectaron una reducción de aproximadamente el 70% (utilizando concentraciones bajas de CA_{HIV}) mientras que en presencia de agentes de “crowding” dicho efecto fue incluso menor. Nuestros resultados se presentan extremadamente alentadores en este sentido, aunque bien podríamos pensar que el gran tamaño de los nanoanticuerpos (en relación con el dodecapéptido CAI) podría favorecer dicho efecto por inhibición estérica del autoensamblado. En ese sentido dichos autores compararon el efecto del CTD soluble como inhibidor (con peso molecular similar a los VHH y con capacidad de unirse a CA_{HIV} en forma reversible), encontrando que se comporta como un peor inhibidor respecto a CAI con una reducción de la velocidad de autoensamblado de CA_{HIV} de aproximadamente el 40% y un efecto incluso menor en condiciones de “crowding”. Estos resultados evidencian el gran potencial de nuestros VHHs como inhibidores del autoensamblado de CA_{BLV}, posicionándolos como herramientas valiosas para el estudio del autoensamblado de CA_{BLV} en la partícula madura y como potenciales inhibidores terapéuticos del ciclo replicativo del virus.

Como dijimos, las características de unión con los dominios NTD y CTD en forma independiente (y en el caso del NTD en forma independiente de la presencia del β -hairpin), posiciona a los VHH8c y VHH19s como posibles interactores con dichos dominios a nivel de Gag en la partícula inmadura. En tal sentido la inhibición del autoensamblado de Gag puede ser (en caso de demostrarse) una herramienta igualmente valiosa en el estudio de los procesos de ensamblado, brotamiento y maduración de viriones de deltaretrovirus, pero también como posible agente antiretroviral inhibiendo uno de los procesos clave del ciclo replicativo.

La interacción entre moléculas de CA es a nivel de la Gag inmadura el principal motor de la oligomerización de este precursor durante el ensamblado de la partícula retroviral inmadura, por lo que su inhibición representa una estrategia interesante para bloquear la producción de viriones, como lo representan los numerosos intentos por inhibir el autoensamblado de CA_{HIV} utilizando pequeñas moléculas (Figura 13). En el caso de los VHH producidos en este trabajo, su tamaño y solubilidad representan un problema a la hora de atravesar la membrana celular de la partícula infectada. En este sentido vale la pena destacar el uso de secuencias peptídicas con capacidad de penetrar células (CPP por *cell penetrating peptides*) para dirigir proteínas [473, 474] y anticuerpos [475] al interior de la célula. El uso de CPPs representa una estrategia muy versátil para atacar blancos intracelulares para los que no existen pequeñas moléculas [476, 477] a tal punto que con el nombre de “TransMabs” este tipo de anticuerpos modificados ha sido considerado la nueva generación de anticuerpos terapéuticos [478]. En tal sentido, se ha reportado el uso de este tipo de modificaciones en VHHs para generar “*trans-nanoanticuerpos*” con capacidad de penetrar células [370, 479]. Además, numerosos ejemplos de inhibidores presentados en la Tabla 1 consisten en péptidos estabilizados por grapas de hidrocarbano” (hydrocarbon-stapled peptides) con capacidad de penetrar células, haciendo de los paratopes de los VHH8c y VHH19a, excelentes candidatos para inhibir el ensamblado de BLV mediante la introducción de este tipo de péptidos en la célula infectada. El desarrollo de líneas reporteras de infección por BLV viene siendo llevado a cabo en nuestro laboratorio, siendo un aliado fundamental a la hora de evaluar el efecto antiviral de los nanoanticuerpos modificados o de los péptidos derivados de estos, con el objetivo de identificar posibles “*hits*” que lleven a la identificación de “*compuestos líderes*” basados en estos VHHs [480].

Cuando comparamos ambos clones entre sí, encontramos que el VHH19a presenta una actividad inhibitoria incluso mayor a la del VHH8c. Estas observaciones deben ser evaluadas y confirmadas en forma inequívoca, mediante la realización de experimentos de autoensamblado por duplicado en diversas condiciones, para lo cual sería extremadamente útil optimizar el diseño experimental con el objetivo de reducir los requerimientos de proteína (condiciones que potencien el ensamblado, placas de 384 pocillos, aumento de la sensibilidad, etc.). Además, la determinación de la K_d del VHH19a en forma precisa podría ayudar a entender la relación entre la afinidad de los VHHs y la capacidad de inhibición del autoensamblado de la cápside.

El autoensamblado de cápsides virales es un proceso autorregulado donde la baja afinidad entre subunidades asegura la formación de intermediarios viables en baja proporción permitiendo la formación de agentes nucleantes, sin comprometer la disponibilidad de subunidades libres para formar las estructuras supramoleculares resultantes. En tal sentido, un aumento de la afinidad entre subunidades desplazaría el equilibrio hacia la formación de intermediarios en lo que se conoce como “trampa cinética”, reduciendo así la concentración de subunidades libres y favoreciendo la creación de estructuras supramoleculares incompletas, amorfas o no funcionales [481]. Los altos niveles de inhibición logrados con nuestros VHHs, nos lleva a preguntarnos si es posible aumentar el efecto inhibitorio mediante un aumento de la afinidad o si esto nos colocaría en un escenario donde los inhibidores queden secuestrados en una suerte de “trampa cinética” dando lugar a niveles de inhibición más bajos. En tal sentido el análisis de inhibición de VHHs capaces de reconocer los mismos epítomos con mayor afinidad puede ayudar a responder esta pregunta.

La identificación de los contactos moleculares entre ambos VHHs y CA_{BLV} , representa una estrategia interesante para mejorar la afinidad conservando el epítomo y así evaluar el efecto de la afinidad sobre el autoensamblado, pero también para comprender el mecanismo de inhibición. Esto permitiría entender mejor las bases biofísicas del proceso de autoensamblado de las cápsides virales y podría ser de gran utilidad durante el proceso de selección de nuevos y mejores inhibidores.

Los mecanismos de inhibición del ensamblado de cápside en HIV son múltiples. Por ejemplo mediante interacción directa con las superficies de contacto en la lattice hexagonal a nivel de NTD (CAP-1 y CAP-2 con afinidades de 800 μ M y 50 μ M, respectivamente [230]) o CTD (CAC-1 con afinidades de 50 μ M [241]); deformación de dominios alterando estas interfaces (BM4 [231]); interacción con bolsillos hidrofóbicos emulando interactores celulares como Nup153 o CPSF6 (PF74 [234, 235] y BI-2 [236]) estabilizando la estructura y compitiendo con los procesos asociados. La interacción de factores de restricción celular como TRIM5 α con CA_{HIV} ha demostrado inducir una rigidificación global la cápside que se transmite alostéricamente afectando los contactos intermoleculares de toda la estructura sin ser necesaria la interacción específica con las interfaces individuales [482].

Podemos concluir que los VHH8c y VHH19a a concentraciones subestequiométricas 20 veces por debajo de la concentración de CA_{BLV} , son capaces de reducir la velocidad de autoensamblado entre 30-50%, mientras que los niveles de ensamblado se reducen a un 60-80%. Cuando las concentraciones de los VHH8c y VHH19a se aumentan alcanzando concentraciones subestequiométricas 5-8 veces inferiores a la de CA_{BLV} , la inhibición es completa. Los experimentos de inhibición fueron realizados con concentraciones de CA_{BLV} de 1 mM, representando un ambiente con crowding molecular similar al que podríamos encontrar en la partícula viral.

Lamentablemente la obtención de datos estructurales a partir de complejos de VHH y CA_{BLV} no fue posible a pesar de los esfuerzos realizados para obtener proteínas solubles homogéneas y sin partes móviles o poco estructuradas. La baja afinidad del VHH8c podría explicar al menos parcialmente, la imposibilidad de obtener cristales de complejos con este clon. Por su parte en el caso del VHH19a no contamos con datos cuantitativos de afinidad y la obtención de cristales a partir de mezclas equimolares de NTD y VHH, nos alientan a continuar por esta vía intentando dilucidar la estructura tridimensional de complejos e identificar los contactos moleculares de los estabilizan.

Nuestro grupo encontró que la plasticidad conformacional de los contactos intermoleculares de CA_{BLV} en la lattice hexagonal tienen relevancia en el ensamblado de la misma [53], y si bien necesitamos entender mejor los mecanismos de inhibición de los nanoanticuerpos seleccionados, los mismos podrían generar efectos que se transmiten alostéricamente al resto de la estructura bloqueando el ensamblado.

La obtención de la estructura tridimensional del VHH8c por difracción de rayos X, permitió evidenciar una proteína polar y un paratope con topología planar, presentando algunos residuos hidrofóbicos expuestos fundamentalmente

en el CDR1. Esto, junto con los resultados de caracterización termodinámica por ITC y la conservación de estos residuos hidrofóbicos a nivel de secuencia en el CDR1 permite hipotetizar que la interacción con este dominio se da a través de las caras planas del CTD donde se presentan parches hidrofóbicos con implicancias en el ensamblado de la red de hexámeros. Dado que una de las caras se ubica hacia la parte externa del hexágono interactuando con su homóloga en el hexámero adyacente y la otra contacta directamente con el NTD del protómero adyacente en el mismo hexámero, identificar cuál de estas es el blanco del VHH8c tiene profundas implicancias en el mecanismo de inhibición.

La estructura helicoidal del CDR1, la exposición de residuos hidrofóbicos en el paratope, la presunta interacción con superficies relativamente plana a través de contactos hidrofóbicos, la afinidad en el entorno de 10 μ M y la capacidad de inhibir el autoensamblado de CA son características compartidas con el péptido inhibidor de HIV: CAI [243, 244]. El péptido CAC-1 (mimético de la hélice 9 de HIV) también guarda diversas similitudes con este loop helicoidal. Ante la ausencia de datos estructurales de complejo VHH8c/CTD, los contactos establecidos entre CAI o CAC-1 y el CTD_{HIV}, se presentan como un buen punto de partida para la realización de predicciones de la orientación de ambas moléculas por modelado molecular (“*molecular docking*”). En este mismo sentido, el loop helicoidal del CDR1 podría ser *per se* un inhibidor del ensamblado de CA_{BLV}.

A modo de conclusión, la obtención de la estructura tridimensional del VHH8c a alta resolución en conjunción con los datos termodinámicos obtenidos por ITC y el mapeo epitópico realizado, permitieron identificar dos posibles sitios de contacto a nivel del CTD.

La naturaleza de los contactos moleculares entre los VHH y CA_{BLV} tienen estrecha relación con los mecanismos de formación de la lattice y los mecanismos de inhibición de la formación de esta. La obtención de VHHs diferentes con capacidad de inhibir el ensamblado de la lattice hexagonal por mecanismos diferentes se presenta además con una herramienta útil para esclarecer los mecanismos del autoensamblado, identificar intermediarios del proceso y diseñar inhibidores específicos dirigidos a bloquear la formación de estos o los arreglos supramoleculares a partir de estos.

A modo de conclusión general, este trabajo describe la generación y caracterización de dos nanoanticuerpos con capacidad de reconocer en forma específica y diferencial los dominios NTD y CTD de CA_{BLV} con afinidades relativamente bajas e inhibir el autoensamblado in vitro de la misma en condiciones de “crowding” molecular semejantes a las encontradas en el interior de la partícula viral.

Los resultados obtenidos apoyan además la idea de que dichas interacciones podrían darse también a nivel del precursor Gag, y tener implicancias similares en el ensamblado del virión. Estas moléculas representan el primer ejemplo conocido (hasta donde alcanza nuestro conocimiento) de moléculas generadas para inhibir el autoensamblado de la cápside del BLV.

La estructura tridimensional de uno de estos nanoanticuerpos fue resuelta a 2.1 Å y depositada en la PDB (6OC8) permitiendo junto con el resto de los resultados obtenidos en esta tesis y el conocimiento previo acerca de los contactos moleculares que estabilizan la lattice hexamérica de la cápside de BLV, formular una hipótesis respecto a los posibles sitios de interacción y los posibles mecanismos de inhibición del autoensamblado de CA_{BLV}.

10. PERSPECTIVAS

Los nanoanticuerpos generados en este trabajo y los datos obtenidos a partir del análisis de estos en solución y de la interacción con la proteína CA_{BLV}, representan una herramienta útil para diseñar posibles aplicaciones en el campo de la investigación básica del BLV y para definir estrategias de inhibición del autoensamblado de las cápsides de retrovirus. Por otro lado, diversas preguntas e hipótesis relacionadas al mecanismo de autoensamblado y su inhibición fueron delineadas en este trabajo. En conjunto, estos elementos generados a partir del presente trabajo dejan la puerta abierta a una serie de trabajos cuya realización deberá ser llevada a cabo en un futuro más o menos cercano.

Algunos trabajos que se presentan en el horizonte cercano tienen que ver con aquellos objetivos que no pudieron ser alcanzados en esta tesis. Por ejemplo, la afinidad de la interacción del VHH19a con el dominio NTD, no pudo ser medida con precisión en este trabajo, y en este sentido nos proponemos llevar a cabo abordajes experimentales utilizando estrategias diferentes y/o técnicas ortogonales. Para ello nos planteamos realizar experimentos de SPR capturando el VHH19a biotinilado en un chip con estreptavidina, intentando minimizar la heterogeneidad en la inmovilización. La implementación de variantes experimentales como ensayos de SPR por competición inyectando CA_{BLV} o NTD en presencia de cantidades crecientes de VHH19a sin biotinar (cuya construcción también fue generada en esta tesis) podría ser de utilidad para medir la afinidad en condiciones de equilibrio. Otras técnicas para medir constantes cinéticas de afinidad como interferometría de biocapa (BI por “*biolayer interferometry*”) o afinidad en equilibrio por ultracentrifugación analítica (AUC por “*analytical ultracentrifugation*”), termoforesis a microescala (MST por “*microscale thermophoresis*”), entre otras podrían ser de utilidad. La generación de mutantes diseñados a partir de las estructuras de CA_{BLV} formando arreglos hexaméricos y la purificación de hexámeros estabilizados por puentes disulfuro permitiría evaluar la interacción con el VHH19a y comenzar a entender el mecanismo de inhibición del autoensamblado y llevar a cabo estudios estructurales. Incluso si dicho nanoanticuerpo es capaz de interactuar con los hexámeros, se podrían llevar a cabo experimentos por ITC.

Dado que las afinidades de los nanoanticuerpos obtenidos son relativamente bajas, resulta interesante analizar la estabilidad conformacional de CA_{BLV} o sus dominios en diferentes condiciones usadas durante las rondas de panning por phage display. En tal sentido, técnicas como por dicroísmo circular (CD) para detectar cambios en la estructura secundaria o técnicas como microcalorimetría diferencial de barrido de temperatura (DSC) o nano fluorimetría diferencial de barrido de temperatura (nanoDSF por “*differential scanning nano fluorimetry*”) para análisis de termostabilidad de moléculas en diferentes condiciones pueden ser de muchísima utilidad. En caso de que la estabilidad conformacional se vea comprometida en las condiciones de panning utilizadas en este trabajo, sería ventajoso hacer un nuevo panning por phage display a partir de la librería preinmune generada en esta tesis, utilizando competidores como por ejemplo CA_{BLV} en solución o los propios VHH8c y VHH19a purificados, dando ventaja a aquellos clones de mayor afinidad.

Además, se continuará con la caracterización de los nanoanticuerpos obtenidos por phage display con CA_{BLV} como competidor (realizado en paralelo por Martin Rossotti), los cuales evidenciaron resultados preliminares que sugieren una afinidad mayor por CA_{BLV}.

Los datos estructurales del VHH8c obtenidos en este trabajo representan un primer paso hacia la identificación de los contactos moleculares que gobiernan la interacción. La implementación de técnicas computacionales como modelado por “docking” de las superficies de contacto, simulaciones por dinámica molecular y modelado molecular

utilizando datos de secuencia aminoacídica e identificación de residuos conservados, podrían ser de utilidad en la identificación de residuos clave para realizar experimentos de mutagénesis (donde la información estructural de péptidos formando complejos con CA_{HIV} puede ser un buen punto de inicio). Otras alternativas como evolución dirigida, mediante introducción de variabilidad en regiones clave seguido de análisis funcional, o experimentos de cross-linking e identificación de residuos clave por espectrometría de masas también deberán ser puestas al servicio de la modificación de manera racional para aumentar la afinidad.

La introducción de mutaciones en las regiones de CA_{BLV} que según nuestra hipótesis son importantes en la interacción con los VHH, también representa una estrategia útil para identificar es sitio antigénico y en el caso de generación de clones con diferentes afinidades, para identificar aquellos que se unen a través del mismo epítipo.

La obtención de nanoanticuerpos con capacidad de reconocer el mismo epítipo con afinidades diferentes puede resultar una estrategia muy efectiva para entender la relación entre afinidad e inhibición del ensamblado, permitiendo reunir información para dirigir las características de los futuros inhibidores.

Otro elemento que resulta crucial para analizar la potencialidad de estos nanoanticuerpos es entender si el efecto de inhibición del autoensamblado de CA_{BLV} *in vitro* se traduce en un efecto similar en un contexto celular o de la partícula. Para ello puede ser muy útil expresar los VHH generados aquí, en células productoras de VLPs (desarrolladas recientemente en nuestro laboratorio) donde no existe la enzima PR y por tanto la maduración no tiene lugar, evaluando su efecto a nivel de Gag. Esto permitiría identificar la capacidad inhibitoria de los VHH a dos niveles: en la célula impidiendo la formación de la partícula inmadura y en la propia partícula evitando la maduración de la partícula a través de la formación de la cápside viral. También puede ser útil llevar a cabo la expresión de los VHH en células productoras de partículas, o insertar CPPs a los VHHs para internalizarlos en células productoras de partículas y midiendo después la formación de éstas.

La producción de VHHs en líneas reporteras de infección por BLV, por ejemplo, permitiría determinar si los VHH producidos en este trabajo son además capaces de desensamblar la cápside cuando es internalizada conduciendo la infección a un callejón sin salida.

Del mismo modo que con los VHHs, la identificación de inhibidores a partir de librerías de compuestos de bajo peso molecular es otra alternativa interesante. Para ello, diseñar un método para cuantificar la capacidad inhibitoria del autoensamblado utilizando cantidades más bajas de proteína es crucial, por ejemplo, utilizando placas de 384 pocillos, identificando y seleccionando condiciones experimentales que potencien el proceso de autoensamblado, o utilizando técnicas alternativas de detección como fluorescencia intrínseca o nano fluorimetría de barrido de temperatura (nanoDSF).

En el caso de obtener clones de mayor afinidad, evaluar diferentes alternativas en investigación básica (ver la discusión general) podría ayudar a responder otras cuestiones relacionadas con la biología del BLV. En particular el uso de VHH de alta afinidad capaces de unirse a CA_{BLV} podrían ser modificados mediante introducción de mutaciones desestabilizantes en las regiones FR. Dichos VHH se producirían acoplados a fluoróforos de modo que la interacción con el antígeno devuelva la estabilidad rescatándolos de la vía proteasómica y emitiendo una señal de fluorescencia que permita clasificar y separar las células. Este diseño experimental permitiría identificar aquellas células infectadas por BLV que abandonan el estado de infección latente, así como estudiar los estímulos externos que generan este cambio.

11. ANEXO

11.1. ALINEAMIENTO DE NANOANTICUERPOS (CLUSTAL OMEGA)

17b	QVQLQESGGGLVQSGGSLTSLSCVVSQVDFSDDPMAWYREAPGQREFVAVISS-GGIPNY	59
23b	QVQLQESGGGLVQSGGSLTSLSCVVSQVDFSDDPMAWYREAPGQREFVAVISS-GGIPNY	59
31b	QVQLQESGGGSVQAGGSLRLSCAGSGTMFGMLNIAYYRQAPGRQREFVAGLGR-GGYIRY	59
42c	EVQLVESGGGMVQAGGSLRLSCVGSISIFSLNVGYRQAPGKEREVAGISR-GGHTFY	59
8c	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASASIFRALNVGYRQTPGRQRELIAGISG-GGSTHY	59
51a	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCVAHGNIILRANPLGWYRQAPGKQRELVIITRTGSIGV-DI	59
19b	QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFPGNSPMSWHRQAPGKLEGVSDITS-SGIATY	59
41a	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGGALSSYHMAWFRQAPGKEREVAVARLTKRIGNTYY :*** :**** * * **** * . : : : . * : * : * :	60
17b	DSSVRGRFTISRDNDDKMMVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNRGRLPG----FTPWGQGTQVTVS	115
23b	DSSVRGRFTISRDNDDKMMVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNRGRLPG----FTPWGQGTQVTVS	115
31b	ADPVKGRFTISADNANNRVDLQMNLSLKPEDTAVYYCNRGRLPG----FTPWGQGTQVTVS	119
42c	ADPVKGRFTISTDANRVDLQMNLSLKPEDTAVYYCNRGRLPG----FTPWGQGTQVTVS	119
8c	ADPVKGRFTISRDNDDKMMVYLQMNLSLKPEDTAVYYCNRGRLPG----FTPWGQGTQVTVS	119
51a	ADAVKGRFRIYRDNKNTVLDLQMNLSLQTEDETAIYYCYRDRD---VGIDYWGQGTQVTVS	116
19b	ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLKPEDTARYYCARGGRN---IYMGPYGQGTQVTVS	116
41a	IDSVKGRFTISKDNKNTLYLQMNLSLNPEDTALYFCAAGSYI---DEYEWGQGTQVTVS . * : * * * * * * * : : : * * . * : * * * * * * : * * * * * * *	117
17b	S	116
23b	S	116
31b	S	120
42c	S	120
8c	S	120
51a	S	117
19b	S	117
41a	S	118
	*	

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Burny A, Bex F, Chantrenng H, Cleuter Y, Dekegel D, Ghysdael J, Kettmann R, Leclercq M, Leunen J, Mammerickx M *et al*: **Bovine leukemia virus involvement in enzootic bovine leukosis**. In: *Advances in Cancer Research*. Edited by Klein G, Weinhouse S, vol. 28: Academic Press; 1978: 251-311.
2. Gillet N, Florins A, Boxus M, Burteau C, Nigro A, Vandermeers F, Balon H, Bouzar A-B, Defoiche J, Burny A *et al*: **Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human**. *Retrovirology* 2007, **4**(1):18.
3. Aida Y, Murakami H, Takagashi M, Takeshima S-n: **Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus**. *Frontiers in Microbiology* 2013, **4**(328).
4. **ICTV Master Species List 2018a v1** [<https://talk.ictvonline.org/files/master-species-lists/>]
5. MacLachlan NJ, Dubovi EJ: **Chapter 14 - Retroviridae**. In: *Fenner's Veterinary Virology (Fifth Edition)*. Edited by MacLachlan NJ, Dubovi EJ. Boston: Academic Press; 2017: 269-297.
6. Gonçalves DU, Proietti FA, Ribas JGR, Araújo MG, Pinheiro SR, Guedes AC, Carneiro-Proietti ABF: **Epidemiology, treatment, and prevention of human T-cell leukemia virus type 1-associated diseases**. *Clinical microbiology reviews* 2010, **23**(3):577-589.
7. Tsujimoto H, Noda Y, Ishikawa K, Nakamura H, Fukasawa M, Sakakibara I, Sasagawa A, Honjo S, Hayami M: **Development of adult T-cell leukemia-like disease in African green monkey associated with clonal integration of simian T-cell leukemia virus type I**. *Cancer Res* 1987, **47**(1):269-274.
8. Barez PY, de Brogniez A, Carpentier A, Gazon H, Gillet N, Gutierrez G, Hamaidia M, Jacques JR, Perike S, Neelature Sriramareddy S *et al*: **Recent Advances in BLV Research**. *Viruses* 2015, **7**(11):6080-6088.
9. Djilali S, Parodi A-L: **The BLV-induced leukemia-lymphosarcoma complex in sheep**. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1989, **22**(3):233-244.
10. Rosewick N, Durkin K, Artesi M, Marçais A, Hahaut V, Griebel P, Arsic N, Avettand-Fenoel V, Burny A, Charlier C *et al*: **Cis-perturbation of cancer drivers by the HTLV-1/BLV proviruses is an early determinant of leukemogenesis**. *Nature Communications* 2017, **8**:15264.
11. Mekata H, Sekiguchi S, Konnai S, Kirino Y, Honkawa K, Nonaka N, Horii Y, Norimine J: **Evaluation of the natural perinatal transmission of bovine leukaemia virus**. *The Veterinary record* 2015, **176**(10):254.
12. Meas S, Usui T, Ohashi K, Sugimoto C, Onuma M: **Vertical transmission of bovine leukemia virus and bovine immunodeficiency virus in dairy cattle herds**. *Veterinary microbiology* 2002, **84**(3):275-282.
13. European Food Safety Authority Panel on Animal Health and Welfare: **Scientific opinion on Enzootic bovine leukosis**. *EFSA Journal* 2015, **13**(7):63.
14. Ruiz V, Porta NG, Lomónaco M, Trono K, Alvarez I: **Bovine Leukemia Virus Infection in Neonatal Calves. Risk Factors and Control Measures**. *Frontiers in Veterinary Science* 2018, **5**(267).
15. Erskine RJ, Bartlett PC, Byrem TM, Render CL, Febvay C, Houseman JT: **Herd-level determinants of bovine leukaemia virus prevalence in dairy farms**. *Journal of Dairy Research* 2012, **79**(4):445-450.
16. Rodríguez SM, Florins A, Gillet N, De Brogniez A, Sánchez-Alcaraz MT, Boxus M, Boulanger F, Gutiérrez G, Trono K, Alvarez I *et al*: **Preventive and Therapeutic Strategies for Bovine Leukemia Virus: Lessons for HTLV**. *Viruses* 2011, **3**(7):1210.
17. Fulton BE, Portella M, Radke K: **Dissemination of Bovine Leukemia Virus-Infected Cells from a Newly Infected Sheep Lymph Node**. *Journal of virology* 2006, **80**(16):7873-7884.
18. Domenech A, Goyache J, Llamas L, Jesus Paya M, Suarez G, Gomez-Lucia E: **In vitro infection of cells of the monocytic/macrophage lineage with bovine leukaemia virus**. *The Journal of general virology* 2000, **81**(Pt 1):109-118.
19. Murakami H, Yamada T, Suzuki M, Nakahara Y, Suzuki K, Sentsui H: **Bovine leukemia virus integration site selection in cattle that develop leukemia**. *Virus research* 2011, **156**(1-2):107-112.

20. Seiki M, Hattori S, Hirayama Y, Yoshida M: **Human adult T-cell leukemia virus: complete nucleotide sequence of the provirus genome integrated in leukemia cell DNA.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1983, **80**(12):3618-3622.
21. Deschamps J, Kettmann R, Burny A: **Experiments with cloned complete tumor-derived bovine leukemia virus information prove that the virus is totally exogenous to its target animal species.** *Journal of virology* 1981, **40**(2):605-609.
22. Zhao T, Matsuoka M: **HBZ and its roles in HTLV-1 oncogenesis.** *Frontiers in microbiology* 2012, **3**:247-247.
23. Durkin K, Rosewick N, Artesi M, Hahaut V, Griebel P, Arsic N, Burny A, Georges M, Van den Broeke A: **Characterization of novel Bovine Leukemia Virus (BLV) antisense transcripts by deep sequencing reveals constitutive expression in tumors and transcriptional interaction with viral microRNAs.** *Retrovirology* 2016, **13**(1):33.
24. Polat M, Takeshima S-N, Aida Y: **Epidemiology and genetic diversity of bovine leukemia virus.** *Virology journal* 2017, **14**(1):209-209.
25. Furtado A, Rosadilla D, Franco G, Piaggio J, Puentes R: **Leucosis Bovina Enzoótica en cuencas lecheras de productores familiares del Uruguay.** *Veterinaria (Montevideo)* 2013, **Veterinaria (Montevideo)**(49):8.
26. Rama G, Moratorio G, Greif G, Obal G, Bianchi S, Tomé L, Carrion F, Meikle A, Pritsch O: **Development of a real time PCR assay using SYBR Green chemistry for bovine leukemia virus detection.** *Retrovirology* 2011, **8**(S1):1-1.
27. Rama G, Meikle A, Puentes R, Moratorio G, Nicolini P, Pessina P, Furtado A, Pritsch O: **Estudio comparativo de tres técnicas diagnósticas para la Leucosis Enzoótica Bovina y análisis del efecto de enfermedades concurrentes sobre la fórmula leucocitaria.** *Veterinaria, (Montevideo)* 2010, **46**(177-178-179-180):15-22.
28. Addiego A: **Desarrollo de un nuevo método diagnóstico para Leucosis Bovina Enzoótica y su validación como herramienta para el control de la enfermedad.** *Tesis de Maestría.* Programa para la Investigación Biomédica (PROINBIO): Universidad de la República, Uruguay; 2018.
29. LaDronka RM, Ainsworth S, Wilkins MJ, Norby B, Byrem TM, Bartlett PC: **Prevalence of Bovine Leukemia Virus Antibodies in US Dairy Cattle.** *Veterinary Medicine International* 2018, **2018**(ID 5831278):8.
30. Bartlett PC, Norby B, Byrem TM, Parmelee A, Ledergerber JT, Erskine RJ: **Bovine leukemia virus and cow longevity in Michigan dairy herds.** *Journal of Dairy Science* 2013, **96**(3):1591-1597.
31. Frie MC, Coussens PM: **Bovine leukemia virus: A major silent threat to proper immune responses in cattle.** *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2015, **163**(3):103-114.
32. Brenner J, Van-Haam M, Savir D, Trainin Z: **The implication of BLV infection in the productivity, reproductive capacity and survival rate of a dairy cow.** *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1989, **22**(3):299-305.
33. Emanuelson U, Scherling K, Pettersson H: **Relationships between herd bovine leukemia virus infection status and reproduction, disease incidence, and productivity in Swedish dairy herds.** *Preventive Veterinary Medicine* 1992, **12**(1):121-131.
34. Sargeant JM, Kelton DF, Martin SW, Mann ED: **Associations between farm management practices, productivity, and bovine leukemia virus infection in Ontario dairy herds.** *Preventive Veterinary Medicine* 1997, **31**(3):211-221.
35. Perzova RN, Loughran TP, Dube S, Ferrer J, Esteban E, Poiesz BJ: **Lack of BLV and PTLV DNA sequences in the majority of patients with large granular lymphocyte leukaemia.** *British journal of haematology* 2000, **109**(1):64-70.
36. Burmeister T, Schwartz S, Hummel M, Hoelzer D, Thiel E: **No genetic evidence for involvement of Deltaretroviruses in adult patients with precursor and mature T-cell neoplasms.** *Retrovirology* 2007, **4**:11.
37. Sellers TA, Vierkant RA, Djeu J, Celis E, Wang AH, Kumar N, Cerhan JR: **Unpasteurized milk consumption and subsequent risk of cancer.** *Cancer causes & control : CCC* 2008, **19**(8):805-811.
38. Olaya-GalÁN NN, Corredor-Figueroa AP, GuzmÁN-GarzÓN TC, RÍOs-Heandez KS, Salas-CÁRdenas SP, Patarroyo MA, Gutierrez MF: **Bovine leukaemia virus DNA in fresh milk and raw beef for human consumption.** *Epidemiology and Infection* 2017, **145**(15):3125-3130.
39. Buehring GC, Philpott SM, Choi KY: **Humans Have Antibodies Reactive with Bovine Leukemia Virus.** *AIDS research and human retroviruses* 2003, **19**(12):1105-1113.
40. Schwingel D, Andreolla AP, Erpen LMS, Frandoloso R, Kreutz LC: **Bovine leukemia virus DNA associated with breast cancer in women from South Brazil.** *Scientific Reports* 2019, **9**(1):2949.

41. Buehring GC, Shen H, Schwartz DA, Lawson JS: **Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development.** *PLOS ONE* 2017, **12**(6):e0179367.
42. Buehring G, Shen H, Jensen HM, Jin DL, Hudes M, Block G: **Exposure to Bovine Leukemia Virus Is Associated with Breast Cancer: A Case-Control Study.** *PLOS ONE* 2015, **10**(9):e0134304.
43. Buehring G, Shen H, Jensen HM, Choi YK, Sun D, Nuovo G: **Bovine Leukemia Virus DNA in Human Breast Tissue.** *Emerging Infectious Diseases* 2014, **20**(5):772-782.
44. Giovanna M, Ulloa J, Uribe A, Gutierrez M: **Bovine leukemia virus gene segment detected in human breast tissue.** *Open journal of medical microbiology* 2013, **3**(1):84.
45. Gillet NA, Willems L: **Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA.** *Retrovirology* 2016, **13**(1):75.
46. Zhang R, Jiang J, Sun W, Zhang J, Huang K, Gu X, Yang Y, Xu X, Shi Y, Wang C: **Lack of association between bovine leukemia virus and breast cancer in Chinese patients.** *Breast Cancer Research* 2016, **18**(1):101.
47. Gannon OM, Antonsson A, Bennett IC, Saunders NA: **Viral infections and breast cancer – A current perspective.** *Cancer Letters* 2018, **420**:182-189.
48. Lawson JS, Salmons B, Glenn WK: **Oncogenic Viruses and Breast Cancer: Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV), Bovine Leukemia Virus (BLV), Human Papilloma Virus (HPV), and Epstein–Barr Virus (EBV).** *Frontiers in Oncology* 2018, **8**.
49. Cuesta L, Lendez P, Farias M, Dolcini G, Ceriani M: **Can Bovine Leukemia Virus Be Related to Human Breast Cancer? A Review of the Evidence.** *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2018, **23**(3):101-107.
50. Tagaya Y, Gallo RC: **The Exceptional Oncogenicity of HTLV-1.** *Frontiers in Microbiology* 2017, **8**(1425).
51. Martin F, Tagaya Y, Gallo R: **Time to eradicate HTLV-1: an open letter to WHO.** *The Lancet* 2018, **391**(10133):1893-1894.
52. Willems L, Burny A, Collete D, Dangoisse O, Dequiedt F, Gatot JS, Kerkhofs P, Lefebvre L, Merezak C, Peremans T *et al*: **Genetic determinants of bovine leukemia virus pathogenesis.** *AIDS research and human retroviruses* 2000, **16**(16):1787-1795.
53. Obal G, Trajtenberg F, Carrión F, Tomé L, Larrioux N, Zhang X, Pritsch O, Buschiazzi A: **Conformational plasticity of a native retroviral capsid revealed by x-ray crystallography.** *Science* 2015, **349**(6243):95-98.
54. Gres AT, Kirby KA, KewalRamani VN, Tanner JJ, Pornillos O, Sarafianos SG: **X-ray crystal structures of native HIV-1 capsid protein reveal conformational variability.** *Science* 2015, **349**(6243):99-103.
55. Fields BN, Knipe DM, Howley PM: **Fields Virology**, vol. 1 and 2, 6 edn. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2013.
56. Sundquist WI, Kräusslich H-G: **HIV-1 assembly, budding, and maturation.** *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2012, **2**(7):a006924-a006924.
57. Florins A, Gillet N, Boxus M, Kerkhofs P, Kettmann R, Willems L: **Even attenuated bovine leukemia virus proviruses can be pathogenic in sheep.** *Journal of virology* 2007, **81**(18):10195-10200.
58. Yoshikawa H, Xie B, Oyamada T, Hiraga A, Yoshikawa T: **Detection of Bovine Leukemia Viruses (BLV) in Mammary Tissues of BLV Antibody-Positive Cows Affected by Subclinical Mastitis.** *Journal of Veterinary Medical Science* 1997, **59**(4):301-302.
59. Zhu P, Chertova E, Bess J, Lifson JD, Arthur LO, Liu J, Taylor KA, Roux KH: **Electron tomography analysis of envelope glycoprotein trimers on HIV and simian immunodeficiency virus virions.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003, **100**(26):15812-15817.
60. Schiller J, Chackerian B: **Why HIV Virions Have Low Numbers of Envelope Spikes: Implications for Vaccine Development.** *PLOS Pathogens* 2014, **10**(8):e1004254.
61. Zarkik S, Decroly E, Wattiez R, Seidah NG, Burny A, Ruyschaert JM: **Comparative processing of bovine leukemia virus envelope glycoprotein gp72 by subtilisin/kexin-like mammalian convertases.** *FEBS Lett* 1997, **406**(1-2):205-210.
62. Hoshino H: **Cellular Factors Involved in HTLV-1 Entry and Pathogenicity.** *Frontiers in microbiology* 2012, **3**:222-222.
63. Johnston ER, Radke K: **The SU and TM Envelope Protein Subunits of Bovine Leukemia Virus Are Linked by Disulfide Bonds, both in Cells and in Virions.** *Journal of virology* 2000, **74**(6):2930-2935.
64. Wallin M, Ekstrom M, Garoff H: **Isomerization of the intersubunit disulphide-bond in Env controls retrovirus fusion.** *EMBO J* 2004, **23**(1):54-65.

65. Wu S-R, Sjöberg M, Wallin M, Lindqvist B, Ekström M, Hebert H, Koeck PJB, Garoff H: **Turning of the receptor-binding domains opens up the murine leukaemia virus Env for membrane fusion.** *The EMBO journal* 2008, **27**(20):2799-2808.
66. Chen B, Vogan EM, Gong H, Skehel JJ, Wiley DC, Harrison SC: **Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core.** *Nature* 2005, **433**:834.
67. Pejchal R, Doores KJ, Walker LM, Khayat R, Huang PS, Wang SK, Stanfield RL, Julien JP, Ramos A, Crispin M *et al*: **A potent and broad neutralizing antibody recognizes and penetrates the HIV glycan shield.** *Science* 2011, **334**(6059):1097-1103.
68. Vlach J, Saad JS: **Trio engagement via plasma membrane phospholipids and the myristoyl moiety governs HIV-1 matrix binding to bilayers.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013, **110**(9):3525-3530.
69. Briggs JA, Krausslich HG: **The molecular architecture of HIV.** *J Mol Biol* 2011, **410**(4):491-500.
70. Li S, Hill CP, Sundquist WI, Finch JT: **Image reconstructions of helical assemblies of the HIV-1 CA protein.** *Nature* 2000, **407**:409.
71. Ganser-Pornillos BK, von Schwedler UK, Stray KM, Aiken C, Sundquist WI: **Assembly Properties of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 CA Protein.** *Journal of virology* 2004, **78**(5):2545-2552.
72. Worthylake DK, Wang H, Yoo S, Sundquist WI, Hill CP: **Structures of the HIV-1 capsid protein dimerization domain at 2.6 Å resolution.** *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 1999, **55**(Pt 1):85-92.
73. Turner BG, Summers MF: **Structural biology of HIV.** *J Mol Biol* 1999, **285**(1):1-32.
74. Tang C, Ndassa Y, Summers MF: **Structure of the N-terminal 283-residue fragment of the immature HIV-1 Gag polyprotein.** *Nature Structural Biology* 2002, **9**:537.
75. Gitti RK, Lee BM, Walker J, Summers MF, Yoo S, Sundquist WI: **Structure of the Amino-Terminal Core Domain of the HIV-1 Capsid Protein.** *Science* 1996, **273**(5272):231-235.
76. Ganser-Pornillos BK, Yeager M, Pornillos O: **Assembly and Architecture of HIV.** In: *Viral Molecular Machines*. Edited by Rossmann MG, Rao VB. Boston, MA: Springer US; 2012: 441-465.
77. Zhang W, Cao S, Martin JL, Mueller JD, Mansky LM: **Morphology and ultrastructure of retrovirus particles.** *AIMS biophysics* 2015, **2**(3):343-369.
78. Cao S, Maldonado JO, Grigsby IF, Mansky LM, Zhang W: **Analysis of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Particles by Using Cryo-Electron Tomography.** *Journal of virology* 2015, **89**(4):2430-2435.
79. Calafat J, Ressang AA: **Morphogenesis of bovine leukemia virus.** *Virology* 1977, **80**(1):42-53.
80. Campbell S, Rein A: **In vitro assembly properties of human immunodeficiency virus type 1 Gag protein lacking the p6 domain.** *Journal of virology* 1999, **73**(3):2270-2279.
81. Kelly BN, Howard BR, Wang H, Robinson H, Sundquist WI, Hill CP: **Implications for Viral Capsid Assembly from Crystal Structures of HIV-1 Gag1-278 and CAN133-278.** *Biochemistry* 2006, **45**(38):11257-11266.
82. Ehrlich LS, Agresta BE, Carter CA: **Assembly of recombinant human immunodeficiency virus type 1 capsid protein in vitro.** *Journal of virology* 1992, **66**(8):4874-4883.
83. Gross I, Hohenberg H, Krausslich HG: **In vitro assembly properties of purified bacterially expressed capsid proteins of human immunodeficiency virus.** *European journal of biochemistry* 1997, **249**(2):592-600.
84. Khorasanizadeh S, Campos-Olivas R, Summers MF: **Solution structure of the capsid protein from the human T-cell leukemia virus type-I.** *J Mol Biol* 1999, **291**(2):491-505.
85. Kuznetsova IM, Turoverov KK, Uversky VN: **What macromolecular crowding can do to a protein.** *International journal of molecular sciences* 2014, **15**(12):23090-23140.
86. Barklis E, Alfadhli A, McQuaw C, Yalamuri S, Still A, Barklis RL, Kukull B, López CS: **Characterization of the in vitro HIV-1 capsid assembly pathway.** *Journal of molecular biology* 2009, **387**(2):376-389.
87. Purdy JG, Flanagan JM, Ropson IJ, Craven RC: **Retroviral capsid assembly: a role for the CA dimer in initiation.** *Journal of molecular biology* 2009, **389**(2):438-451.
88. Obal G, Lepault J, Carrión F, Tomé L, Moratorio G, Rama G, Bianchi S, Pritsch O: **In vitro characterisation of Bovine Leukemia Virus capsid protein self-assembly.** *Retrovirology* 2011, **8**(S1):1-1.
89. Obal G: **Bases biofísicas y estructurales del ensamblado de la cápside retroviral: Virus de la Leucemia Bovina.** *Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas*. Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA): Universidad de la República, Uruguay; 2014.

90. Gamble TR, Yoo S, Vajdos FF, von Schwedler UK, Worthylake DK, Wang H, McCutcheon JP, Sundquist WI, Hill CP: **Structure of the Carboxyl-Terminal Dimerization Domain of the HIV-1 Capsid Protein.** *Science* 1997, **278**(5339):849-853.
91. Ganser-Pornillos BK, Cheng A, Yeager M: **Structure of full-length HIV-1 CA: a model for the mature capsid lattice.** *Cell* 2007, **131**(1):70-79.
92. Pornillos O, Ganser-Pornillos BK, Banumathi S, Hua Y, Yeager M: **Disulfide bond stabilization of the hexameric capsomer of human immunodeficiency virus.** *Journal of molecular biology* 2010, **401**(5):985-995.
93. Pornillos O, Ganser-Pornillos BK, Kelly BN, Hua Y, Whitby FG, Stout CD, Sundquist WI, Hill CP, Yeager M: **X-ray structures of the hexameric building block of the HIV capsid.** *Cell* 2009, **137**(7):1282-1292.
94. Pornillos O, Ganser-Pornillos BK, Yeager M: **Atomic-level modelling of the HIV capsid.** *Nature* 2011, **469**:424.
95. Wlodawer A, Gustchina A: **Structural and biochemical studies of retroviral proteases.** *Biochim Biophys Acta* 2000, **1477**(1-2):16-34.
96. Konvalinka J, Kräusslich H-G, Müller B: **Retroviral proteases and their roles in virion maturation.** *Virology* 2015, **479-480**:403-417.
97. Mattei S, Schur FKM, Briggs JAG: **Retrovirus maturation—an extraordinary structural transformation.** *Current Opinion in Virology* 2016, **18**:27-35.
98. Meher BR, Patel S: **Chapter Eight - Structural and Dynamical Aspects of HIV-1 Protease and Its Role in Drug Resistance.** In: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Edited by Karabencheva-Christova T, vol. 92: Academic Press; 2013: 299-324.
99. Shuker SB, Mariani VL, Herger BE, Dennison KJ: **Understanding HTLV-I Protease.** *Chemistry & Biology* 2003, **10**(5):373-380.
100. Hu W-S, Hughes SH: **HIV-1 reverse transcription.** *Cold Spring Harbor perspectives in medicine* 2012, **2**(10):a006882.
101. Lesbats P, Engelman AN, Cherepanov P: **Retroviral DNA Integration.** *Chemical Reviews* 2016, **116**(20):12730-12757.
102. Anderson EM, Maldarelli F: **The role of integration and clonal expansion in HIV infection: live long and prosper.** *Retrovirology* 2018, **15**(1):71.
103. Maldarelli F: **The role of HIV integration in viral persistence: no more whistling past the proviral graveyard.** *The Journal of Clinical Investigation* 2016, **126**(2):438-447.
104. Maldarelli F: **HIV-infected cells are frequently clonally expanded after prolonged antiretroviral therapy: implications for HIV persistence.** *Journal of virus eradication* 2015, **1**(4):237-244.
105. Ballandras-Colas A, Maskell DP, Serrao E, Locke J, Swuec P, Jónsson SR, Kotecha A, Cook NJ, Pye VE, Taylor IA *et al*: **A supramolecular assembly mediates lentiviral DNA integration.** *Science (New York, NY)* 2017, **355**(6320):93-95.
106. Giroud C, Chazal N, Briant L: **Cellular kinases incorporated into HIV-1 particles: passive or active passengers?** *Retrovirology* 2011, **8**(1):71.
107. Ott DE: **Cellular proteins detected in HIV-1.** *Reviews in Medical Virology* 2008, **18**(3):159-175.
108. Tremblay MJ, Fortin JF, Cantin R: **The acquisition of host-encoded proteins by nascent HIV-1.** *Immunol Today* 1998, **19**(8):346-351.
109. Dubois N, Marquet R, Paillart J-C, Bernacchi S: **Retroviral RNA Dimerization: From Structure to Functions.** *Frontiers in Microbiology* 2018, **9**(527).
110. Lavanya M, Kinet S, Montel-Hagen A, Mongellaz C, Battini J-L, Sitbon M, Taylor N: **Cell Surface Expression of the Bovine Leukemia Virus-Binding Receptor on B and T Lymphocytes Is Induced by Receptor Engagement.** *The Journal of Immunology* 2008, **181**(2):891-898.
111. Ban J, Portetelle D, Altaner C, Horion B, Milan D, Krchnak V, Burny A, Kettmann R: **Isolation and characterization of a 2.3-kilobase-pair cDNA fragment encoding the binding domain of the bovine leukemia virus cell receptor.** *Journal of virology* 1993, **67**(2):1050-1057.
112. Suzuki T, Ikeda H: **The mouse homolog of the bovine leukemia virus receptor is closely related to the delta subunit of adaptor-related protein complex AP-3, not associated with the cell surface.** *Journal of virology* 1998, **72**(1):593-599.

113. Corredor AP, González J, Baquero LA, Curtidor H, Olaya-Galán NN, Patarroyo MA, Gutiérrez MF: **In silico and in vitro analysis of boAP3d1 protein interaction with bovine leukaemia virus gp51.** *PLOS ONE* 2018, **13**(6):e0199397.
114. Berger EA, Murphy PM, Farber JM: **Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease.** *Annu Rev Immunol* 1999, **17**:657-700.
115. Manel N, Battini JL, Taylor N, Sitbon M: **HTLV-1 tropism and envelope receptor.** *Oncogene* 2005, **24**(39):6016-6025.
116. Ghez D, Lepelletier Y, Lambert S, Fourneau J-M, Blot V, Janvier S, Arnulf B, van Endert PM, Heveker N, Pique C *et al*: **Neuropilin-1 Is Involved in Human T-Cell Lymphotropic Virus Type 1 Entry.** *Journal of virology* 2006, **80**(14):6844-6854.
117. Ghez D, Lepelletier Y, Jones KS, Pique C, Hermine O: **Current concepts regarding the HTLV-1 receptor complex.** *Retrovirology* 2010, **7**(1):99.
118. Kubo Y, Hayashi H, Matsuyama T, Sato H, Yamamoto N: **Retrovirus Entry by Endocytosis and Cathepsin Proteases.** *Advances in Virology* 2012, **2012**:14.
119. De Brogniez A, Mast J, Willems L: **Determinants of the Bovine Leukemia Virus Envelope Glycoproteins Involved in Infectivity, Replication and Pathogenesis.** *Viruses* 2016, **8**(4):88.
120. Warrilow D, Warren K, Harrich D: **Strand transfer and elongation of HIV-1 reverse transcription is facilitated by cell factors in vitro.** *PLoS One* 2010, **5**(10):e13229.
121. Warren K, Warrilow D, Meredith L, Harrich D: **Reverse Transcriptase and Cellular Factors: Regulators of HIV-1 Reverse Transcription.** *Viruses* 2009, **1**(3):873-894.
122. Warrilow D, Tachedjian G, Harrich D: **Maturation of the HIV reverse transcription complex: putting the jigsaw together.** *Rev Med Virol* 2009, **19**(6):324-337.
123. Cimarelli A, Darlix JL: **HIV-1 reverse transcription.** *Methods Mol Biol* 2014, **1087**:55-70.
124. Martin JL, Maldonado JO, Mueller JD, Zhang W, Mansky LM: **Molecular Studies of HTLV-1 Replication: An Update.** *Viruses* 2016, **8**(2):31.
125. Cingöz O, Goff SP: **HIV-1 Is a Poor Inducer of Innate Immune Responses.** *mBio* 2019, **10**(1):e02834-02818.
126. Rasaiyaah J, Tan CP, Fletcher AJ, Price AJ, Blondeau C, Hilditch L, Jacques DA, Selwood DL, James LC, Noursadeghi M *et al*: **HIV-1 evades innate immune recognition through specific cofactor recruitment.** *Nature* 2013, **503**:402.
127. Jacques DA, McEwan WA, Hilditch L, Price AJ, Towers GJ, James LC: **HIV-1 uses dynamic capsid pores to import nucleotides and fuel encapsidated DNA synthesis.** *Nature* 2016, **536**:349.
128. Arhel N: **Revisiting HIV-1 uncoating.** *Retrovirology* 2010, **7**(1):96.
129. Zuliani-Alvarez L, Towers GJ: **Identifying a nuclear passport for HIV.** *eLife* 2019, **8**:e45580.
130. Suzuki Y, Craigie R: **The road to chromatin — nuclear entry of retroviruses.** *Nature Reviews Microbiology* 2007, **5**:187.
131. Ambrose Z, Aiken C: **HIV-1 uncoating: connection to nuclear entry and regulation by host proteins.** *Virology* 2014, **454-455**:371-379.
132. Rawle DJ, Harrich D: **Toward the “unravelling” of HIV: Host cell factors involved in HIV-1 core uncoating.** *PLOS Pathogens* 2018, **14**(10):e1007270.
133. Arhel NJ, Souquere-Besse S, Munier S, Souque P, Guadagnini S, Rutherford S, Prévost MC, Allen TD, Charneau P: **HIV-1 DNA Flap formation promotes uncoating of the pre-integration complex at the nuclear pore.** *The EMBO Journal* 2007, **26**(12):3025-3037.
134. Price AJ, Jacques DA, McEwan WA, Fletcher AJ, Essig S, Chin JW, Halambage UD, Aiken C, James LC: **Host Cofactors and Pharmacologic Ligands Share an Essential Interface in HIV-1 Capsid That Is Lost upon Disassembly.** *PLOS Pathogens* 2014, **10**(10):e1004459.
135. Forshey BM, von Schwedler U, Sundquist WI, Aiken C: **Formation of a human immunodeficiency virus type 1 core of optimal stability is crucial for viral replication.** *Journal of virology* 2002, **76**(11):5667-5677.
136. Schaller T, Ocwieja KE, Rasaiyaah J, Price AJ, Brady TL, Roth SL, Hué S, Fletcher AJ, Lee K, KewalRamani VN *et al*: **HIV-1 Capsid-Cyclophilin Interactions Determine Nuclear Import Pathway, Integration Targeting and Replication Efficiency.** *PLOS Pathogens* 2011, **7**(12):e1002439.
137. Mattheakis LC, Bhatt RR, Dower WJ: **An in vitro polysome display system for identifying ligands from very large peptide libraries.** *Proceedings of the ...* 1994, **91**(19):9022-9026.

138. Krishnan L, Matreyek KA, Oztop I, Lee K, Tipper CH, Li X, Dar MJ, Kewalramani VN, Engelman A: **The requirement for cellular transportin 3 (TNPO3 or TRN-SR2) during infection maps to human immunodeficiency virus type 1 capsid and not integrase.** *Journal of virology* 2010, **84**(1):397-406.
139. Fassati A: **HIV infection of non-dividing cells: a divisive problem.** *Retrovirology* 2006, **3**:74-74.
140. Yamashita M, Emerman M: **Retroviral infection of non-dividing cells: Old and new perspectives.** *Virology* 2006, **344**(1):88-93.
141. Di Nunzio F: **New insights in the role of nucleoporins: A bridge leading to concerted steps from HIV-1 nuclear entry until integration.** *Virus research* 2013, **178**(2):187-196.
142. Buffone C, Martinez-Lopez A, Fricke T, Opp S, Severgnini M, Cifola I, Petiti L, Frabetti S, Skorupka K, Zadrozny KK *et al*: **Nup153 Unlocks the Nuclear Pore Complex for HIV-1 Nuclear Translocation in Nondividing Cells.** *Journal of virology* 2018, **92**(19):e00648-00618.
143. Valle-Casuso JC, Di Nunzio F, Yang Y, Reszka N, Lienlaf M, Arhel N, Perez P, Brass AL, Diaz-Griffero F: **TNPO3 is required for HIV-1 replication after nuclear import but prior to integration and binds the HIV-1 core.** *Journal of virology* 2012, **86**(10):5931-5936.
144. Bejarano DA, Peng K, Laketa V, Borner K, Jost KL, Lucic B, Glass B, Lusic M, Muller B, Krausslich HG: **HIV-1 nuclear import in macrophages is regulated by CPSF6-capsid interactions at the Nuclear Pore Complex.** *elife* 2019, **8**:e41800.
145. Poletti V, Mavilio F: **Interactions between Retroviruses and the Host Cell Genome.** *Molecular therapy Methods & clinical development* 2018, **8**:31-41.
146. Sherman MP, Greene WC: **Slipping through the door: HIV entry into the nucleus.** *Microbes and infection* 2002, **4**(1):67-73.
147. Lelek M, Casartelli N, Pellin D, Rizzi E, Souque P, Severgnini M, Di Serio C, Fricke T, Diaz-Griffero F, Zimmer C *et al*: **Chromatin organization at the nuclear pore favours HIV replication.** *Nature Communications* 2015, **6**:6483.
148. Gillet NA, Malani N, Melamed A, Gormley N, Carter R, Bentley D, Berry C, Bushman FD, Taylor GP, Bangham CRM: **The host genomic environment of the provirus determines the abundance of HTLV-1-infected T-cell clones.** *Blood* 2011, **117**(11):3113-3122.
149. Meekings KN, Leipzig J, Bushman FD, Taylor GP, Bangham CRM: **HTLV-1 Integration into Transcriptionally Active Genomic Regions Is Associated with Proviral Expression and with HAM/TSP.** *PLOS Pathogens* 2008, **4**(3):e1000027.
150. Melamed A, Yaguchi H, Miura M, Witkover A, Fitzgerald TW, Birney E, Bangham CR: **The human leukemia virus HTLV-1 alters the structure and transcription of host chromatin in cis.** *elife* 2018, **7**:e36245.
151. Jacks T, Power MD, Masiarz FR, Luciw PA, Barr PJ, Varmus HE: **Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 gag-pol expression.** *Nature* 1988, **331**(6153):280-283.
152. Wills NM, Gesteland RF, Atkins JF: **Evidence that a downstream pseudoknot is required for translational read-through of the Moloney murine leukemia virus gag stop codon.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991, **88**(16):6991-6995.
153. Gheysen D, Jacobs E, de Foresta F, Thiriart C, Francotte M, Thines D, De Wilde M: **Assembly and release of HIV-1 precursor Pr55gag virus-like particles from recombinant baculovirus-infected insect cells.** *Cell* 1989, **59**(1):103-112.
154. Fuller SD, Wilk T, Gowen BE, Krausslich HG, Vogt VM: **Cryo-electron microscopy reveals ordered domains in the immature HIV-1 particle.** *Current biology : CB* 1997, **7**(10):729-738.
155. Briggs JAG, Simon MN, Gross I, Kräusslich H-G, Fuller SD, Vogt VM, Johnson MC: **The stoichiometry of Gag protein in HIV-1.** *Nature Structural & Molecular Biology* 2004, **11**:672.
156. Briggs JAG, Riches JD, Glass B, Bartonova V, Zanetti G, Kräusslich H-G: **Structure and assembly of immature HIV.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2009, **106**(27):11090-11095.
157. Olson ED, Musier-Forsyth K: **Retroviral Gag protein-RNA interactions: Implications for specific genomic RNA packaging and virion assembly.** *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2019, **86**:129-139.
158. Saad JS, Miller J, Tai J, Kim A, Ghanam RH, Summers MF: **Structural basis for targeting HIV-1 Gag proteins to the plasma membrane for virus assembly.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006, **103**(30):11364-11369.
159. Hamard-Peron E, Muriaux D: **Retroviral matrix and lipids, the intimate interaction.** *Retrovirology* 2011, **8**(1):15.

160. Datta SA, Curtis JE, Ratcliff W, Clark PK, Crist RM, Lebowitz J, Krueger S, Rein A: **Conformation of the HIV-1 Gag protein in solution.** *J Mol Biol* 2007, **365**(3):812-824.
161. Munro JB, Nath A, Färber M, Datta SAK, Rein A, Rhoades E, Mothes W: **A Conformational Transition Observed in Single HIV-1 Gag Molecules during *In Vitro* Assembly of Virus-Like Particles.** *Journal of virology* 2014, **88**(6):3577-3585.
162. Yandrapalli N, Lubart Q, Tanwar HS, Picart C, Mak J, Muriaux D, Favard C: **Self assembly of HIV-1 Gag protein on lipid membranes generates PI(4,5)P₂/Cholesterol nanoclusters.** *Scientific Reports* 2016, **6**:39332.
163. Alfadhli A, Barklis RL, Barklis E: **HIV-1 matrix organizes as a hexamer of trimers on membranes containing phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate.** *Virology* 2009, **387**(2):466-472.
164. Zhang Y, Qian H, Love Z, Barklis E: **Analysis of the Assembly Function of the Human Immunodeficiency Virus Type 1 Gag Protein Nucleocapsid Domain.** *Journal of virology* 1998, **72**(3):1782-1789.
165. Wright ER, Schooler JB, Ding HJ, Kieffer C, Fillmore C, Sundquist WI, Jensen GJ: **Electron cryotomography of immature HIV-1 virions reveals the structure of the CA and SP1 Gag shells.** *The EMBO Journal* 2007, **26**(8):2218-2226.
166. Datta SAK, Clark PK, Fan L, Ma B, Harvin DP, Sowder RC, Nussinov R, Wang Y-X, Rein A: **Dimerization of the SP1 Region of HIV-1 Gag Induces a Helical Conformation and Association into Helical Bundles: Implications for Particle Assembly.** *Journal of virology* 2016, **90**(4):1773-1787.
167. Schur FKM, Obr M, Hagen WJH, Wan W, Jakobi AJ, Kirkpatrick JM, Sachse C, Kräusslich H-G, Briggs JAG: **An atomic model of HIV-1 capsid-SP1 reveals structures regulating assembly and maturation.** *Science* 2016, **353**(6298):506-508.
168. Novikova M, Adams LJ, Fontana J, Gres AT, Balasubramaniam M, Winkler DC, Kudchodkar SB, Soheilian F, Sarafianos SG, Steven AC *et al*: **Identification of a Structural Element in HIV-1 Gag Required for Virus Particle Assembly and Maturation.** *mBio* 2018, **9**(5):e01567-01518.
169. Datta SAK, Zhao Z, Clark PK, Tarasov S, Alexandratos JN, Campbell SJ, Kvaratskhelia M, Lebowitz J, Rein A: **Interactions between HIV-1 Gag molecules in solution: an inositol phosphate-mediated switch.** *Journal of molecular biology* 2007, **365**(3):799-811.
170. Dick RA, Mallery DL, Vogt VM, James LC: **IP6 Regulation of HIV Capsid Assembly, Stability, and Uncoating.** *Viruses* 2018, **10**(11).
171. Dick RA, Zadrozny KK, Xu C, Schur FKM, Lyddon TD, Ricana CL, Wagner JM, Perilla JR, Ganser-Pornillos BK, Johnson MC *et al*: **Author Correction: Inositol phosphates are assembly co-factors for HIV-1.** *Nature* 2018, **563**(7731):E22-E22.
172. Qualley DF, Lackey CM, Paterson JP: **Inositol phosphates compete with nucleic acids for binding to bovine leukemia virus matrix protein: Implications for deltaretroviral assembly.** *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 2013, **81**(8):1377-1385.
173. Inlora J, Chukkapalli V, Derse D, Ono A: **Gag Localization and Virus-Like Particle Release Mediated by the Matrix Domain of Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Gag Are Less Dependent on Phosphatidylinositol-(4,5)-Bisphosphate than Those Mediated by the Matrix Domain of HIV-1 Gag.** *Journal of virology* 2011, **85**(8):3802-3810.
174. Martin JL, Mendonça LM, Marusinec R, Zuczek J, Angert I, Blower RJ, Mueller JD, Perilla JR, Zhang W, Mansky LM: **Critical Role of the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Capsid N-Terminal Domain for Gag-Gag Interactions and Virus Particle Assembly.** *Journal of virology* 2018, **92**(14):e00333-00318.
175. Dick RA, Kamynina E, Vogt VM: **Effect of Multimerization on Membrane Association of Rous Sarcoma Virus and HIV-1 Matrix Domain Proteins.** *Journal of virology* 2013, **87**(24):13598-13608.
176. Rayne F, Bouamr F, Lalanne J, Mamoun RZ: **The NH₂-Terminal Domain of the Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Capsid Protein Is Involved in Particle Formation.** *Journal of virology* 2001, **75**(11):5277-5287.
177. Qualley DF, Cooper SE, Ross JL, Olson ED, Cantara WA, Musier-Forsyth K: **Solution Conformation of Bovine Leukemia Virus Gag Suggests an Elongated Structure.** *J Mol Biol* 2019.
178. Levin JG, Guo J, Rouzina I, Musier-Forsyth K: **Nucleic Acid Chaperone Activity of HIV-1 Nucleocapsid Protein: Critical Role in Reverse Transcription and Molecular Mechanism.** In: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*. vol. 80: Academic Press; 2005: 217-286.
179. Darlix J-L, Godet J, Ivanyi-Nagy R, Fossé P, Mauffret O, Mély Y: **Flexible Nature and Specific Functions of the HIV-1 Nucleocapsid Protein.** *Journal of Molecular Biology* 2011, **410**(4):565-581.

180. Bernacchi S, Abd El-Wahab EW, Dubois N, Hijnen M, Smyth RP, Mak J, Marquet R, Paillart J-C: **HIV-1 Pr55(Gag) binds genomic and spliced RNAs with different affinity and stoichiometry.** *RNA biology* 2016, **14**(1):90-103.
181. Abd El-Wahab EW, Smyth RP, Mailler E, Bernacchi S, Vivet-Boudou V, Hijnen M, Jossinet F, Mak J, Paillart J-C, Marquet R: **Specific recognition of the HIV-1 genomic RNA by the Gag precursor.** *Nature Communications* 2014, **5**:4304.
182. Fisher RJ, Rein A, Fivash M, Urbaneja MA, Casas-Finet JR, Medaglia M, Henderson LE: **Sequence-Specific Binding of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nucleocapsid Protein to Short Oligonucleotides.** *Journal of virology* 1998, **72**(3):1902-1909.
183. Morcock DR, Kane BP, Casas-Finet JR: **Fluorescence and nucleic acid binding properties of the human T-cell leukemia virus-type 1 nucleocapsid protein.** *Biochimica et biophysica acta* 2000, **1481**(2):381-394.
184. Morcock DR, Katakam S, Kane BP, Casas-Finet JR: **Fluorescence and nucleic acid binding properties of bovine leukemia virus nucleocapsid protein.** *Biophys Chem* 2002, **97**(2-3):203-212.
185. Qualley DF, Sokolove VL, Ross JL: **Bovine leukemia virus nucleocapsid protein is an efficient nucleic acid chaperone.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2015, **458**(3):687-692.
186. Checkley MA, Luttgge BG, Freed EO: **HIV-1 envelope glycoprotein biosynthesis, trafficking, and incorporation.** *Journal of molecular biology* 2011, **410**(4):582-608.
187. Johnson MC: **Mechanisms for Env glycoprotein acquisition by retroviruses.** *AIDS research and human retroviruses* 2011, **27**(3):239-247.
188. Tedbury PR, Freed EO: **The role of matrix in HIV-1 envelope glycoprotein incorporation.** *Trends in Microbiology* 2014, **22**(7):372-378.
189. Tedbury PR, Novikova M, Ablan SD, Freed EO: **Biochemical evidence of a role for matrix trimerization in HIV-1 envelope glycoprotein incorporation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2016, **113**(2):E182-E190.
190. Eichorst JP, Chen Y, Mueller JD, Mansky LM: **Distinct Pathway of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Gag Punctum Biogenesis Provides New Insights into Enveloped Virus Assembly.** *mBio* 2018, **9**(5):e00758-00718.
191. Carlton JG, Martin-Serrano J: **Parallels between cytokinesis and retroviral budding: a role for the ESCRT machinery.** *Science* 2007, **316**(5833):1908-1912.
192. Henne William M, Buchkovich Nicholas J, Emr Scott D: **The ESCRT Pathway.** *Developmental Cell* 2011, **21**(1):77-91.
193. Bieniasz PD: **The cell biology of HIV-1 virion genesis.** *Cell host & microbe* 2009, **5**(6):550-558.
194. Usami Y, Popov S, Popova E, Inoue M, Weissenhorn W, H GG: **The ESCRT pathway and HIV-1 budding.** *Biochemical Society transactions* 2009, **37**(Pt 1):181-184.
195. Pornillos O, Higginson DS, Stray KM, Fisher RD, Garrus JE, Payne M, He G-P, Wang HE, Morham SG, Sundquist WI: **HIV Gag mimics the Tsg101-recruiting activity of the human Hrs protein.** *The Journal of Cell Biology* 2003, **162**(3):425-434.
196. Carlson LA, Briggs JA, Glass B, Riches JD, Simon MN, Johnson MC, Muller B, Grunewald K, Krausslich HG: **Three-dimensional analysis of budding sites and released virus suggests a revised model for HIV-1 morphogenesis.** *Cell host & microbe* 2008, **4**(6):592-599.
197. Freed EO: **Viral late domains.** *Journal of virology* 2002, **76**(10):4679-4687.
198. Bouamr F, Melillo JA, Wang MQ, Nagashima K, de Los Santos M, Rein A, Goff SP: **PPPYEPTAP Motif Is the Late Domain of Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Gag and Mediates Its Functional Interaction with Cellular Proteins Nedd4 and Tsg101.** *Journal of virology* 2003, **77**(22):11882-11895.
199. Blot V, Perugi F, Gay B, Prévost M-C, Briant L, Tangy F, Abriél H, Staub O, Dokhélar M-C, Pique C: **Nedd4.1-mediated ubiquitination and subsequent recruitment of Tsg101 ensure HTLV-1 Gag trafficking towards the multivesicular body pathway prior to virus budding.** *Journal of Cell Science* 2004, **117**(11):2357-2367.
200. Wang H, Norris KM, Mansky LM: **Analysis of Bovine Leukemia Virus Gag Membrane Targeting and Late Domain Function.** *Journal of virology* 2002, **76**(16):8485-8493.
201. Cashikar AG, Shim S, Roth R, Maldazys MR, Heuser JE, Hanson PI: **Structure of cellular ESCRT-III spirals and their relationship to HIV budding.** *eLife* 2014, **3**:e02184.
202. Swanstrom R, Wills JW: **Synthesis, Assembly, and Processing of Viral Proteins.** In: *Retroviruses*. Edited by Coffin JM, Hughes SH, Varmus HE. Cold Spring Harbor NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.; 1997.

203. Louis JM, Nashed NT, Parris KD, Kimmel AR, Jerina DM: **Kinetics and mechanism of autoprocessing of human immunodeficiency virus type 1 protease from an analog of the Gag-Pol polyprotein.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994, **91**(17):7970-7974.
204. Louis JM, Wondrak EM, Kimmel AR, Wingfield PT, Nashed NT: **Proteolytic processing of HIV-1 protease precursor, kinetics and mechanism.** *J Biol Chem* 1999, **274**(33):23437-23442.
205. Pettit SC, Clemente JC, Jeung JA, Dunn BM, Kaplan AH: **Ordered processing of the human immunodeficiency virus type 1 GagPol precursor is influenced by the context of the embedded viral protease.** *Journal of virology* 2005, **79**(16):10601-10607.
206. Pettit SC, Everitt LE, Choudhury S, Dunn BM, Kaplan AH: **Initial cleavage of the human immunodeficiency virus type 1 GagPol precursor by its activated protease occurs by an intramolecular mechanism.** *Journal of virology* 2004, **78**(16):8477-8485.
207. Tang C, Louis JM, Aniana A, Suh J-Y, Clore GM: **Visualizing transient events in amino-terminal autoprocessing of HIV-1 protease.** *Nature* 2008, **455**:693.
208. Huang L, Li L, Tien C, LaBarbera DV, Chen C: **Targeting HIV-1 Protease Autoprocessing for High-throughput Drug Discovery and Drug Resistance Assessment.** *Scientific reports* 2019, **9**(1):301-301.
209. Wagner JM, Zadrozny KK, Chrustowicz J, Purdy MD, Yeager M, Ganser-Pornillos BK, Pornillos O: **Crystal structure of an HIV assembly and maturation switch.** *eLife* 2016, **5**:e17063.
210. Clavel F, Mammano F: **Role of Gag in HIV Resistance to Protease Inhibitors.** *Viruses* 2010, **2**(7):1411-1426.
211. Hatanaka M, Nam SH: **Identification of HTLV-I gag protease and its sequential processing of the gag gene product.** *Journal of cellular biochemistry* 1989, **40**(1):15-30.
212. Yeager M: **Design of in vitro symmetric complexes and analysis by hybrid methods reveal mechanisms of HIV capsid assembly.** *J Mol Biol* 2011, **410**(4):534-552.
213. Monroe EB, Kang S, Kyere SK, Li R, Prevelige PE, Jr.: **Hydrogen/deuterium exchange analysis of HIV-1 capsid assembly and maturation.** *Structure (London, England : 1993)* 2010, **18**(11):1483-1491.
214. Mattei S, Tan A, Glass B, Müller B, Kräusslich H-G, Briggs JAG: **High-resolution structures of HIV-1 Gag cleavage mutants determine structural switch for virus maturation.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2018, **115**(40):E9401-E9410.
215. Knejzlík Z, Smékalová Z, Ruml T, Sakalian M: **Multimerization of the p12 domain is necessary for Mason-Pfizer monkey virus Gag assembly in vitro.** *Virology* 2007, **365**(2):260-270.
216. Zabransky A, Sakalian M, Pichova I: **Localization of self-interacting domains within betaretrovirus Gag polyproteins.** *Virology* 2005, **332**(2):659-666.
217. Joshi SM, Vogt VM: **Role of the Rous sarcoma virus p10 domain in shape determination of gag virus-like particles assembled in vitro and within Escherichia coli.** *Journal of virology* 2000, **74**(21):10260-10268.
218. Phillips JM, Murray PS, Murray D, Vogt VM: **A molecular switch required for retrovirus assembly participates in the hexagonal immature lattice.** *EMBO J* 2008, **27**(9):1411-1420.
219. Schur FKM, Dick RA, Hagen WJH, Vogt VM, Briggs JAG: **The Structure of Immature Virus-Like Rous Sarcoma Virus Gag Particles Reveals a Structural Role for the p10 Domain in Assembly.** *Journal of virology* 2015, **89**(20):10294-10302.
220. Katoh I, Kyushiki H, Sakamoto Y, Ikawa Y, Yoshinaka Y: **Bovine leukemia virus matrix-associated protein MA(p15): further processing and formation of a specific complex with the dimer of the 5'-terminal genomic RNA fragment.** *Journal of virology* 1991, **65**(12):6845-6855.
221. Rosenberg NE, Pilcher CD, Busch MP, Cohen MS: **How can we better identify early HIV infections?** *Current Opinion in HIV and AIDS* 2015, **10**(1):61-68.
222. Gray ER, Bain R, Varsaneux O, Peeling RW, Stevens MM, McKendry RA: **p24 revisited: a landscape review of antigen detection for early HIV diagnosis.** *AIDS* 2018, **32**(15):2089-2102.
223. Rihn SJ, Wilson SJ, Loman NJ, Alim M, Bakker SE, Bhella D, Gifford RJ, Rixon FJ, Bieniasz PD: **Extreme Genetic Fragility of the HIV-1 Capsid.** *PLOS Pathogens* 2013, **9**(6):e1003461.
224. Neira JL: **The capsid protein of human immunodeficiency virus: molecular recognition and design of antiviral agents.** *The FEBS Journal* 2009, **276**(21):6097-6097.
225. Wang W, Zhou J, Halambage UD, Jurado KA, Jamin AV, Wang Y, Engelman AN, Aiken C: **Inhibition of HIV-1 Maturation via Small-Molecule Targeting of the Amino-Terminal Domain in the Viral Capsid Protein.** *Journal of virology* 2017, **91**(9).

226. Kanamoto T, Kashiwada Y, Kanbara K, Gotoh K, Yoshimori M, Goto T, Sano K, Nakashima H: **Anti-human immunodeficiency virus activity of YK-FH312 (a betulinic acid derivative), a novel compound blocking viral maturation.** *Antimicrob Agents Chemother* 2001, **45**(4):1225-1230.
227. Li F, Goila-Gaur R, Salzwedel K, Kilgore NR, Reddick M, Matallana C, Castillo A, Zoumplis D, Martin DE, Orenstein JM *et al*: **PA-457: A potent HIV inhibitor that disrupts core condensation by targeting a late step in Gag processing.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003, **100**(23):13555-13560.
228. Keller PW, Adamson CS, Heymann JB, Freed EO, Steven AC: **HIV-1 Maturation Inhibitor Bevirimat Stabilizes the Immature Gag Lattice.** *Journal of virology* 2011, **85**(4):1420-1428.
229. Nguyen AT, Feasley CL, Jackson KW, Nitz TJ, Salzwedel K, Air GM, Sakalian M: **The prototype HIV-1 maturation inhibitor, bevirimat, binds to the CA-SP1 cleavage site in immature Gag particles.** *Retrovirology* 2011, **8**(1):101.
230. Tang C, Loeliger E, Kinde I, Kyere S, Mayo K, Barklis E, Sun Y, Huang M, Summers MF: **Antiviral Inhibition of the HIV-1 Capsid Protein.** *Journal of Molecular Biology* 2003, **327**(5):1013-1020.
231. Lemke CT, Titolo S, von Schwedler U, Goudreau N, Mercier J-F, Wardrop E, Faucher A-M, Coulombe R, Banik SSR, Fader L *et al*: **Distinct Effects of Two HIV-1 Capsid Assembly Inhibitor Families That Bind the Same Site within the N-Terminal Domain of the Viral CA Protein.** *Journal of virology* 2012, **86**(12):6643-6655.
232. Goudreau N, Lemke CT, Faucher AM, Grand-Maitre C, Goulet S, Lacoste JE, Rancourt J, Malenfant E, Mercier JF, Titolo S *et al*: **Novel inhibitor binding site discovery on HIV-1 capsid N-terminal domain by NMR and X-ray crystallography.** *ACS chemical biology* 2013, **8**(5):1074-1082.
233. Thenin-Houssier S, Valente ST: **HIV-1 Capsid Inhibitors as Antiretroviral Agents.** *Current HIV research* 2016, **14**(3):270-282.
234. Shi J, Zhou J, Shah VB, Aiken C, Whitby K: **Small-molecule inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infection by virus capsid destabilization.** *Journal of virology* 2011, **85**(1):542-549.
235. Blair WS, Pickford C, Irving SL, Brown DG, Anderson M, Bazin R, Cao J, Ciaramella G, Isaacson J, Jackson L *et al*: **HIV Capsid is a Tractable Target for Small Molecule Therapeutic Intervention.** *PLOS Pathogens* 2010, **6**(12):e1001220.
236. Lamorte L, Titolo S, Lemke CT, Goudreau N, Mercier JF, Wardrop E, Shah VB, von Schwedler UK, Langelier C, Banik SS *et al*: **Discovery of novel small-molecule HIV-1 replication inhibitors that stabilize capsid complexes.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013, **57**(10):4622-4631.
237. Matreyek KA, Yücel SS, Li X, Engelman A: **Nucleoporin NUP153 Phenylalanine-Glycine Motifs Engage a Common Binding Pocket within the HIV-1 Capsid Protein to Mediate Lentiviral Infectivity.** *PLOS Pathogens* 2013, **9**(10):e1003693.
238. Xu JP, Branson JD, Lawrence R, Cocklin S: **Identification of a small molecule HIV-1 inhibitor that targets the capsid hexamer.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2016, **26**(3):824-828.
239. Kortagere S, Madani N, Mankowski MK, Schön A, Zentner I, Swaminathan G, Princiotta A, Anthony K, Oza A, Sierra L-J *et al*: **Inhibiting Early-Stage Events in HIV-1 Replication by Small-Molecule Targeting of the HIV-1 Capsid.** *Journal of virology* 2012, **86**(16):8472-8481.
240. Kortagere S, Xu JP, Mankowski MK, Ptak RG, Cocklin S: **Structure–Activity Relationships of a Novel Capsid Targeted Inhibitor of HIV-1 Replication.** *Journal of Chemical Information and Modeling* 2014, **54**(11):3080-3090.
241. Garzon MT, Lidon-Moya MC, Barrera FN, Prieto A, Gomez J, Mateu MG, Neira JL: **The dimerization domain of the HIV-1 capsid protein binds a capsid protein-derived peptide: a biophysical characterization.** *Protein Sci* 2004, **13**(6):1512-1523.
242. Bocanegra R, Nevot M, Doménech R, López I, Abián O, Rodríguez-Huete A, Cavasotto CN, Velázquez-Campoy A, Gómez J, Martínez MÁ *et al*: **Rationally Designed Interfacial Peptides Are Efficient In Vitro Inhibitors of HIV-1 Capsid Assembly with Antiviral Activity.** *PLOS ONE* 2011, **6**(9):e23877.
243. Ternois F, Sticht J, Duquerroy S, Kräusslich H-G, Rey FA: **The HIV-1 capsid protein C-terminal domain in complex with a virus assembly inhibitor.** *Nature Structural & Molecular Biology* 2005, **12**:678.
244. Sticht J, Humbert M, Findlow S, Bodem J, Müller B, Dietrich U, Werner J, Kräusslich H-G: **A peptide inhibitor of HIV-1 assembly in vitro.** *Nature Structural & Molecular Biology* 2005, **12**:671.
245. Bartonova V, Igonet S, Sticht J, Glass B, Habermann A, Vaney M-C, Sehr P, Lewis J, Rey FA, Kräusslich H-G: **Residues in the HIV-1 Capsid Assembly Inhibitor Binding Site Are Essential for Maintaining the Assembly-**

- competent Quaternary Structure of the Capsid Protein.** *Journal of Biological Chemistry* 2008, **283**(46):32024-32033.
246. Zhang H, Zhao Q, Bhattacharya S, Waheed AA, Tong X, Hong A, Heck S, Curreli F, Goger M, Cowburn D *et al*: **A Cell-penetrating Helical Peptide as a Potential HIV-1 Inhibitor.** *Journal of Molecular Biology* 2008, **378**(3):565-580.
247. Zhang H, Curreli F, Zhang X, Bhattacharya S, Waheed AA, Cooper A, Cowburn D, Freed EO, Debnath AK: **Antiviral activity of alpha-helical stapled peptides designed from the HIV-1 capsid dimerization domain.** *Retrovirology* 2011, **8**:28.
248. Zhang H, Curreli F, Waheed AA, Mercredi PY, Mehta M, Bhargava P, Scacalossi D, Tong X, Lee S, Cooper A *et al*: **Dual-acting stapled peptides target both HIV-1 entry and assembly.** *Retrovirology* 2013, **10**:136.
249. Lampel A, Bram Y, Ezer A, Shaltiel-Kario R, Saad JS, Bacharach E, Gazit E: **Targeting the Early Step of Building Block Organization in Viral Capsid Assembly.** *ACS chemical biology* 2015, **10**(8):1785-1790.
250. Curreli F, Zhang H, Zhang X, Pyatkin I, Victor Z, Altieri A, Debnath AK: **Virtual screening based identification of novel small-molecule inhibitors targeted to the HIV-1 capsid.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2011, **19**(1):77-90.
251. Thenin-Houssier S, de Vera IMS, Pedro-Rosa L, Brady A, Richard A, Konnick B, Opp S, Buffone C, Fuhrmann J, Kota S *et al*: **Ebselen, a Small-Molecule Capsid Inhibitor of HIV-1 Replication.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2016, **60**(4):2195-2208.
252. Franke L, Grunow R, Meissner K, Porstmann T, von Baehr R: **Inhibition of HIV-1 infection in vitro by murine monoclonal anti-p24 antibodies.** *Journal of medical virology* 1992, **37**(2):137-142.
253. Grunow R, Franke L, Hinkula J, Wahren B, Fenyö E-M, Jondal M, von Baehr R: **Monoclonal antibodies to p24-core protein of HIV-1 mediate ADCC and inhibit virus spread in vitro.** *Clinical and Diagnostic Virology* 1995, **3**(3):221-231.
254. Ali SA, Teow S-Y, Omar T, Khoo A, Choon T, Yusoff N: **A Cell Internalizing Antibody Targeting Capsid Protein (p24) Inhibits the Replication of HIV-1 in T Cells Lines and PBMCs: A Proof of Concept Study.** *PLOS ONE* 2016, **11**(1).
255. Nordin M, Teow S-Y: **Review of Current Cell-Penetrating Antibody Developments for HIV-1 Therapy.** *Molecules (Basel, Switzerland)* 2018, **23**(2):335.
256. Lemke CT, Titolo S, Goudreau N, Faucher AM, Mason SW, Bonneau P: **A novel inhibitor-binding site on the HIV-1 capsid N-terminal domain leads to improved crystallization via compound-mediated dimerization.** *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 2013, **69**(Pt 6):1115-1123.
257. Medzhitov R: **Recognition of microorganisms and activation of the immune response.** *Nature* 2007, **449**(7164):819-826.
258. Delves PJ, Roitt IM: **The Immune System.** *New England Journal of Medicine* 2000, **343**(1):37-49.
259. Harwood NE, Batista FD: **Early events in B cell activation.** *Annual review of immunology* 2009, **28**:185-210.
260. Forthall DN: **Functions of antibodies.** *Microbiology spectrum* 2014, **2**(4):1-17.
261. Porter RR: **Chemical structure of -globulin and antibodies.** *British medical bulletin* 1963, **19**(3):197-201.
262. Johnson G, Wu TT: **Kabat database and its applications: 30 years after the first variability plot.** *Nucleic Acids Research* 2000, **28**(1):214-218.
263. Hilschmann N, Craig LC: **Amino acid sequence studies with Bence-Jones proteins.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1965, **53**(6):1403-1409.
264. Cohen S, Milstein C: **Structure of antibody molecules.** *Nature* 1967, **214**(5087):449-452.
265. Feinstein A, Rowe AJ: **Molecular Mechanism of Formation of an Antigen–Antibody Complex.** *Nature* 1965, **205**(4967):147-149.
266. Padlan EA: **Anatomy of the antibody molecule.** *Molecular Immunology* 1994:169-217.
267. Geisberger R, Lamers M, Achatz G: **The riddle of the dual expression of IgM and IgD.** *Immunology* 2006, **118**(4):429-437.
268. Harriman W, Volk H, Defranoux N, Wabl M: **Immunoglobulin class switch recombination.** *Annual Review of Immunology* 1993, **11**:361-384.
269. Li Z, Woo CJ, Iglesias-Ussel MD, Ronai D, Scharff MD: **The generation of antibody diversity through somatic hypermutation and class switch recombination.** *Genes & Development* 2004, **18**(1):1-11.
270. Schroeder HW, Cavacini L: **Structure and function of immunoglobulins.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2010, **125**(2 Supl2):S41-S52.

271. Charles A. Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik. MJ: **Immunobiology**, 5th. edn. New York: Garland Science; 2001.
272. Johnson G, Wu T: **The Kabat database and a bioinformatics example**. *Antibody Engineering: Methods and Protocols* 2004:11-25.
273. Padlan EA, Abergel C, Tipper JP: **Identification of specificity-determining residues in antibodies**. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1995:133-139.
274. Jung S, Spinelli S, Schimmele B, Honegger A, Pugliese L, Cambillau C, Plückthun A: **The Importance of Framework Residues H6, H7 and H10 in Antibody Heavy Chains: Experimental Evidence for a New Structural Subclassification of Antibody VH Domains**. *Journal of Molecular Biology* 2001, **309**(3):701-716.
275. David MPC, Asprer JJT, Ibana JSA, Concepcion GP: **A study of the structural correlates of affinity maturation: antibody affinity as a function of chemical interactions, structural plasticity and stability**. *Molecular Immunology* 2007, **44**(6):1342-1351.
276. Wang F, Ekiert DC, Ahmad I, Yu W, Zhang Y, Bazirgan O, Torkamani A, Raudsepp T, Mwangi W, Criscitiello MF *et al*: **Reshaping antibody diversity**. *Cell* 2013, **153**(6):1379-1393.
277. Collis AVJ, Brouwer AP, Martin ACR: **Analysis of the antigen combining site: correlations between length and sequence composition of the hypervariable loops and the nature of the antigen**. *Journal of molecular biology* 2003, **325**(2):337-354.
278. René B, Mauffret O, Fossé P: **Retroviral nucleocapsid proteins and DNA strand transfers**. *Biochimie Open* 2018, **7**:10-25.
279. Sundberg EJ, Mariuzza RA: **Molecular recognition in antibody-antigen complexes**. *Advances in protein chemistry* 2002, **61**:119-160.
280. Sok D, Le KM, Vadnais M, Saye-Francisco KL, Jardine JG, Torres JL, Berndsen ZT, Kong L, Stanfield R, Ruiz J *et al*: **Rapid elicitation of broadly neutralizing antibodies to HIV by immunization in cows**. *Nature* 2017, **548**(7665):108-111.
281. Wu T, Johnson G, Kabat EA: **Length distribution of CDRH3 in antibodies**. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 1993, **16**(1):1-7.
282. Tonegawa S: **Somatic generation of antibody diversity**. *Nature* 1983, **302**(5909):575-581.
283. Schilling J, Clevinger B, Davie JM, Hood L: **Amino acid sequence of homogeneous antibodies to dextran and DNA rearrangments in heavy chain V-region gene segments**. *Nature* 1980, **238**(5742):35-40.
284. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P: **Molecular Biology of the Cell**. In., 4th edn. New York: Garland Science; 2002.
285. Maul RW, Gearhart PJ: **AID and Somatic Hypermutation**. *Advances in Immunology* 2010, **105**:159-191.
286. Honjo T, Kinoshita K, Muramatsu M: **Molecular mechanism of class switch recombination: linkage with somatic hypermutation**. *Annual Review of Immunology* 2002, **20**:165-196.
287. Strebhardt K, Ullrich A: **Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress**. *Nature Reviews Cancer* 2008, **8**(6):473-480.
288. Kohler G, Milstein C: **Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity**. *Nature* 1975, **256**(5517):495-497.
289. Borrebaeck CA: **Antibodies in diagnostics—from immunoassays to protein chips**. *Immunology today* 2000, **21**(8):379-382.
290. Abell CW, Denney RM: **Application of monoclonal antibodies in basic research, diagnosis, and therapy**. *Journal of natural products* 1985, **48**(2):193-202.
291. Shawler DL, Bartholomew RM, Smith LM, Dillman RO: **Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG**. *The Journal of Immunology* 1985, **135**(2):1530.
292. Neuberger MS, Williams GT, Mitchell EB, Jouhal SS, Flanagan JG, Rabbitts TH: **A hapten-specific chimaeric IgE antibody with human physiological effector function**. *Nature* 1985, **314**(6008):268-270.
293. Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G: **Replacing the complementarity-determining regions in a human antibody with those from a mouse**. *Nature* 1986, **321**(6069):522-525.
294. Hwang WYK, Foote J: **Immunogenicity of engineered antibodies**. *Methods* 2005, **36**(1):3-10.
295. Harding FA, Stickler MM, Razo J, DuBridges R: **The immunogenicity of humanized and fully human antibodies: residual immunogenicity resides in the CDR regions**. *mAbs* 2010, **2**(3):256-265.

296. Mallbris L, Davies J, Glasebrook A, Tang Y, Glaesner W, Nickoloff BJ: **Molecular Insights into Fully Human and Humanized Monoclonal Antibodies: What are the Differences and Should Dermatologists Care?** *The Journal of Clinical and Aesthetic Dermatology* 2016, **9**(7):13-15.
297. Cai H: **Therapeutic Monoclonal Antibodies Approved by FDA in 2016.** *MOJ Immunology* 2017, **5**(1).
298. Chames P, Regenmortel M, Weiss E, Baty D: **Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future.** *British journal of pharmacology* 2009, **157**(2):220-233.
299. Holliger P, Hudson PJ: **Engineered antibody fragments and the rise of single domains.** *Nature Biotechnology* 2005, **23**(9):1126-1136.
300. Skerra A, Plückthun A: **Assembly of a functional immunoglobulin Fv fragment in Escherichia coli.** *Science* 1988, **240**(4855):1038-1041.
301. Better M, Chang CP, Robinson RR, Horwitz AH: **Escherichia coli secretion of an active chimeric antibody fragment.** *Science* 1988, **240**(4855):1041-1043.
302. Frenken LG, Hessing JG, Van den Hondel CA, Verrips CT: **Recent advances in the large-scale production of antibody fragments using lower eukaryotic microorganisms.** *Research in immunology* 1998, **149**(6):589-599.
303. Ward SE, Güssow D, Griffiths AD, Jones PT, Winter G: **Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli.** *Nature* 1989:544-546.
304. Huston JS, Levinson D, Mudgett-Hunter M, Tai MS, Novotný J, Margolies MN, Ridge RJ, Brucoleri RE, Haber E, Crea R: **Protein engineering of antibody binding sites: recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analogue produced in Escherichia coli.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1988, **85**(16):5879-5883.
305. Cattaneo A, Biocca S: **The selection of intracellular antibodies.** *Trends in biotechnology* 1999, **17**(3):115-121.
306. Muyldermans S: **Single domain camel antibodies: current status.** *Journal of biotechnology* 2001, **74**(4):277-302.
307. Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hammers C, Songa EB, Bendahman N, Hammers R: **Naturally occurring antibodies devoid of light chains.** *Nature* 1993, **363**(6428):446-448.
308. Greenberg AS, Avila D, Hughes M, Hughes A, McKinney EC, Flajnik MF: **A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks.** *Nature* 1995, **374**(6518):168-173.
309. Nguyen V, Su C, Muyldermans S, van der Loo W: **Heavy-chain antibodies in Camelidae ; a case of evolutionary innovation.** *Immunogenetics* 2002:39-47.
310. Roux KH, Greenberg AS, Greene L, Strelets L, Avila D, McKinney EC, Flajnik MF: **Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998, **95**(20):11804-11809.
311. Feige MJ, Gräwert MA, Marcinowski M, Hennig J, Behnke J, Ausländer D, Herold EM, Peschek J, Castro CD, Flajnik M *et al*: **The structural analysis of shark IgNAR antibodies reveals evolutionary principles of immunoglobulins.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2014, **111**(22):8155-8160.
312. Flajnik MF, Deschacht N, Muyldermans S: **A case of convergence: why did a simple alternative to canonical antibodies arise in sharks and camels?** *PLoS Biol* 2011, **9**(8):e1001120.
313. Muyldermans S: **Nanobodies: natural single-domain antibodies.** *Annual review of biochemistry* 2013, **82**:775-797.
314. Blanc MR, Anouassi A, Ahmed Abed M, Tsikis G, Canepa S, Labas V, Belghazi M, Bruneau G: **A one-step exclusion-binding procedure for the purification of functional heavy-chain and mammalian-type gamma-globulins from camelid sera.** *Biotechnology and applied biochemistry* 2009, **54**(4):207-212.
315. Harmsen MM, Haard DHJ: **Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments.** *Applied microbiology and biotechnology* 2007.
316. Chothia C, Novotný J, Brucoleri R, Karplus M: **Domain association in immunoglobulin molecules: the packing of variable domains.** *Journal of Molecular Biology* 1985, **186**(3):651-663.
317. Harmsen MM, Ruuls RC, Nijman IJ, Niewold TA, Frenken LG, de Geus B: **Llama heavy-chain V regions consist of at least four distinct subfamilies revealing novel sequence features.** *Molecular immunology* 2000, **37**(10):579-590.

318. Maass DR, Sepulveda J, Pernthaner A, Shoemaker CB: **Alpaca (*Lama pacos*) as a convenient source of recombinant camelid heavy chain antibodies (VHHs).** *Journal of Immunological Methods* 2007, **324**(1-2):13-25.
319. Muyldermans S, Atarhouch T, Saldanha J, Barbosa JA, Hamers R: **Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains.** *Protein engineering* 1994, **7**(9):1129-1135.
320. Vu K, Ghahroudi M, Wyns L, Muyldermans S: **Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies.** *Molecular Immunology* 1997, **34**(16-17):1121-1131.
321. Davies J, Riechmann L: **"Camelising" human antibody fragments: NMR studies on VH domains.** *FEBS letters* 1994, **339**(3):285-290.
322. De Genst E, Silence K, Decanniere K, Conrath K, Loris R, Kinne J, Muyldermans S, Wyns L: **Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006, **103**(12):4586-4591.
323. Govaert J, Pellis M, Deschacht N, Vincke C, Conrath K, Muyldermans S, Saerens D: **Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments.** *The Journal of biological chemistry* 2012, **287**(3):1970-1979.
324. Wesolowski J, Alzogaray V, Reyelt J, Unger M, Juarez K, Urrutia M, Cauerhff A, Danquah W, Rissiek B, Scheuplein F *et al*: **Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity.** *Medical Microbiology and Immunology* 2009:157-174.
325. Conrath KE, Wernery U, Muyldermans S, Nguyen VK: **Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae.** *Developmental & Comparative Immunology* 2003, **27**(2):87-103.
326. Nguyen VK, Hamers R, Wyns L, Muyldermans S: **Camel heavy-chain antibodies: diverse germline VHH and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire.** *The EMBO journal* 2000, **19**(5):921-930.
327. Desmyter A, Decanniere K, Muyldermans S, Wyns L: **Antigen specificity and high affinity binding provided by one single loop of a camel single-domain antibody.** *The Journal of biological chemistry* 2001, **276**(28):26285-26290.
328. Achour I, Cavelier P, Tichit M, Bouchier C, Lafaye P, Rougeon F: **Tetrameric and homodimeric camelid IgGs originate from the same IgH locus.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2008, **181**(3):2001-2009.
329. Nguyen VK, Desmyter A, Muyldermans S: **Functional heavy-chain antibodies in Camelidae.** *Advances in immunology* 2001, **79**:261-296.
330. Nguyen VK, Hamers R, Wyns L, Muyldermans S: **Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire CH 1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies.** *Molecular Immunology* 1999, **36**(8):515-524.
331. Genst E, Saerens D, Muyldermans S, Conrath K: **Antibody repertoire development in camelids.** *Developmental & Comparative Immunology* 2006, **30**(1-2):187-198.
332. Nguyen V, Hamers R, Wyns L, Muyldermans S: **Camel heavy chain antibodies: diverse germline V H H and specific mechanisms enlarge the antigen binding repertoire.** *The EMBO journal* 2000, **19**(5):921-930.
333. Muyldermans S, Cambillau C, Wyns L: **Recognition of antigens by single-domain antibody fragments: the superfluous luxury of paired domains.** *Trends in Biochemical Sciences* 2001, **26**(4):230-235.
334. van der Linden R, de Geus B, Stok W, Bos W, van Wassenaar D, Verrips T, Frenken L: **Induction of immune responses and molecular cloning of the heavy chain antibody repertoire of Lama glama.** *Journal of immunological methods* 2000, **240**(1-2):185-195.
335. Kolkman JA, Law DA: **Nanobodies – from llamas to therapeutic proteins.** *Drug Discovery Today: Technologies* 2010, **7**(2):e139-e146.
336. Lauwereys M, Ghahroudi MA, Desmyter A, Kinne J, Hölzer W, De Genst E, Wyns L, Muyldermans S: **Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies.** *The EMBO journal* 1998, **17**(13):3512-3520.
337. Stijlemans B, Conrath K, Cortez-Retamozo V, Xong H, Wyns L, Senter P, Revets H, Baetselier P, Muyldermans S, Magez S: **Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies African trypanosomes as paradigm.** *Journal of Biological Chemistry* 2004, **279**(2):1256-1261.
338. Huang L, Muyldermans S, Saerens D: **Nanobodies: proficient tools in diagnostics.** *Expert Review of Molecular Diagnostics* 2010, **10**(6):777-785.

339. De Meyer T, Muyldermans S, Depicker A: **Nanobody-based products as research and diagnostic tools.** *Trends in biotechnology* 2014, **32**(5):263-270.
340. Hassanzadeh-Ghassabeh G, Devoogdt N, Pauw P, Vincke C, Muyldermans S: **Nanobodies and their potential applications.** *Nanomedicine* 2013:1013-1026.
341. Dumoulin M, Conrath K, Meirhaeghe A, Meersman F, Heremans K, Frenken LGJ, Muyldermans S, Wyns L, Matagne A: **Single-domain antibody fragments with high conformational stability.** *Protein Sci* 2002, **11**(3):500-515.
342. van der Linden RHJ, Frenken LGJ, de Geus B, Harmsen MM, Ruuls RC, Stok W, de Ron L, Wilson S, Davis P, Verrips CT: **Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies.** *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1999:37-46.
343. Ewert S, Cambillau C, Conrath K, Plückthun A: **Biophysical Properties of Camelid VHH Domains Compared to Those of Human VH3 Domains†.** *Biochemistry* 2002, **41**(11):3628-3636.
344. Pérez MJM, Renisio JG, Prompers JJ, van Platerink CJ, Cambillau C, Darbon H, Frenken LGJ: **Thermal Unfolding of a Llama Antibody Fragment: A Two-State Reversible Process†.** *Biochemistry* 2001, **40**(1):74-83.
345. Revets H, Baetselier P, Muyldermans S: **Nanobodies as novel agents for cancer therapy.** *Expert opinion on biological therapy* 2005:111-124.
346. Harmsen MM, van Solt CB, van Zijderveld-van Bommel AM, Niewold TA, van Zijderveld FG: **Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy.** *Applied microbiology and biotechnology* 2006, **72**(3):544-551.
347. Siontorou CG: **Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy.** *International journal of nanomedicine* 2013, **8**:4215-4227.
348. Tijink BM, Laeremans T, Budde M, Walsum MS-v, Dreier T, de Haard HJ, Leemans CR, van Dongen GAMS: **Improved tumor targeting of anti-epidermal growth factor receptor Nanobodies through albumin binding: taking advantage of modular Nanobody technology.** *Molecular Cancer Therapeutics* 2008, **7**(8):2288-2297.
349. Iqbal N, Iqbal N: **Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) in cancers: overexpression and therapeutic implications.** *Molecular biology international* 2014, **2014**.
350. Vosjan MJWD, Vercammen J, Kolkman JA, Stigter-van Walsum M, Revets H, van Dongen GAMS: **Nanobodies targeting the hepatocyte growth factor: potential new drugs for molecular cancer therapy.** *Molecular Cancer Therapeutics* 2012, **11**(4):1017-1025.
351. Slørdahl T, Denayer T, Moen S, Standal T, Børset M, Ververken C, Rø T: **Anti-c-MET Nanobody® – a new potential drug in multiple myeloma treatment.** *European Journal of Haematology* 2013, **91**(5):399-410.
352. Van Impe K, Bethuyne J, Cool S, Impens F, Ruano-Gallego D, De Wever O, Vanloo B, Van Troys M, Lambein K, Boucherie C *et al*: **A nanobody targeting the F-actin capping protein CapG restrains breast cancer metastasis.** *Breast Cancer Research* 2013, **15**(6):R116.
353. Kaczmarek JZ, Skottrup PD: **Selection and characterization of camelid nanobodies towards urokinase-type plasminogen activator.** *Molecular immunology* 2015, **65**(2):384-390.
354. Behdani M, Zeinali S, Karimipour M, Khanahmad H, Asadzadeh N, Azadmanesh K, Seyed N, Baniahmad S, Anbouhi M: **Expression, purification, and characterization of a diabody against the most important angiogenesis cell receptor: Vascular endothelial growth factor receptor 2.** *Advanced Biomedical Research* 2012, **1**(1):34-34.
355. Ebrahimizadeh W, Mousavi Gargari SLM, Javidan Z, Rajabibazl M: **Production of novel VHH nanobody inhibiting angiogenesis by targeting binding site of VEGF.** *Applied Biochemistry and Biotechnology* 2015, **176**(7):1985-1995.
356. Farajpour Z, Rahbarizadeh F, Kazemi B, Ahmadvand D: **A nanobody directed to a functional epitope on VEGF, as a novel strategy for cancer treatment.** *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2014, **446**(1):132-136.
357. Araste F, Ebrahimizadeh W, Rasooli I, Rajabibazl M, Mousavi Gargari SL: **A novel VHH nanobody against the active site (the CA domain) of tumor-associated, carbonic anhydrase isoform IX and its usefulness for cancer diagnosis.** *Biotechnology Letters* 2014, **36**(1):21-28.

358. Behar G, Sibénil S, Groulet A, Chames P, Pugnière M, Boix C, Sautès-Fridman C, Teillaud J-L, Baty D: **Isolation and characterization of anti-FcγRIII (CD16) llama single-domain antibodies that activate natural killer cells.** *Protein Engineering, Design and Selection* 2007, **21**(1):1-10.
359. Rozan C, Cornillon A, Pétiard C, Chartier M, Behar G, Boix C, Kerfelec B, Robert B, Pèlegri A, Chames P *et al*: **Single-Domain Antibody-Based and Linker-Free Bispecific Antibodies Targeting FcγRIII Induce Potent Antitumor Activity without Recruiting Regulatory T Cells.** *Molecular Cancer Therapeutics* 2013, **12**(8):1481-1491.
360. Cortez-Retamozo V, Backmann N, Senter PD, Wernery U, De Baetselier P, Muyldermans S, Revets H: **Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate.** *Cancer research* 2004, **64**(8):2853-2857.
361. Behdani M, Zeinali S, Karimpour M, Khanahmad H, Schoonoghe S, Aslemar A, Seyed N, Moazami-Godardi R, Baniahmad F, Habibi-Anbouhi M *et al*: **Development of VEGFR2-specific Nanobody Pseudomonas exotoxin A conjugated to provide efficient inhibition of tumor cell growth.** *New biotechnology* 2013, **30**(2):205-209.
362. Fang T, Duarte JN, Ling J, Li Z, Guzman JS, Ploegh HL: **Structurally Defined αMHC-II Nanobody-Drug Conjugates: A Therapeutic and Imaging System for B-Cell Lymphoma.** *Angewandte Chemie International Edition* 2016, **55**(7):2416-2420.
363. van de Water JAJM, Bagci-Onder T, Agarwal AS, Wakimoto H, Roovers RC, Zhu Y, Kasmieh R, Bhere D, Van Bergen en Henegouwen PMP, Shah K: **Therapeutic stem cells expressing variants of EGFR-specific nanobodies have antitumor effects.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2012, **109**(41):16642-16647.
364. Oliveira S, Schiffelers RM, van der Veeken J, van der Meel R, Vongpromek R, van Bergen en Henegouwen PMP, Storm G, Roovers RC: **Downregulation of EGFR by a novel multivalent nanobody-liposome platform.** *Journal of Controlled Release* 2010, **145**(2):165-175.
365. van der Meel R, Oliveira S, Altintas I, Haselberg R, van der Veeken J, Roovers RC, van Bergen en Henegouwen PMP, Storm G, Hennink WE, Schiffelers RM *et al*: **Tumor-targeted Nanobullets: Anti-EGFR nanobody-liposomes loaded with anti-IGF-1R kinase inhibitor for cancer treatment.** *Journal of Controlled Release* 2012, **159**(2):281-289.
366. Talelli M, Oliveira S, Rijcken CJ, Pieters EH, Etrych T, Ulbrich K, van Nostrum RC, Storm G, Hennink WE, Lammers T: **Intrinsically active nanobody-modified polymeric micelles for tumor-targeted combination therapy.** *Biomaterials* 2013, **34**(4):1255-1260.
367. Altintas I, Heukers R, van der Meel R, Lacombe M, Amidi M, van Bergen en Henegouwen PMP, Hennink WE, Schiffelers RM, Kok RJ: **Nanobody-albumin nanoparticles (NANAPs) for the delivery of a multikinase inhibitor 17864 to EGFR overexpressing tumor cells.** *Journal of Controlled Release* 2013, **165**(2):110-118.
368. Ibañez LI, De Filette M, Hultberg A, Verrips T, Temperton N, Weiss RA, Vandeveld W, Schepens B, Vanlandschoot P, Saelens X: **Nanobodies with in vitro neutralizing activity protect mice against H5N1 influenza virus infection.** *The Journal of Infectious Diseases* 2011, **203**(8):1063-1072.
369. Tillib SV, Ivanova TI, Vasilev LA, Rutovskaya MV, Saakyan SA, Gribova IY, Tutykhina IL, Sedova ES, Lysenko AA, Shmarov MM *et al*: **Formatted single-domain antibodies can protect mice against infection with influenza virus (H5N2).** *Antiviral Research* 2013, **97**(3):245-254.
370. Jittavisutthikul S, Thanongsaksrikul J, Thueng-in K, Chulanetra M, Srimanote P, Seesuy W, Malik AA, Chaicumpa W: **Humanized-VHH transbodies that inhibit HCV protease and replication.** *Viruses* 2015, **7**(4):2030-2056.
371. Vercruyse T, Boons E, Venken T, Vanstreels E, Voet A, Steyaert J, De Maeyer M, Daelemans D: **Mapping the binding interface between an HIV-1 inhibiting intrabody and the viral protein Rev.** *PLoS ONE* 2013, **8**(4):e60259.
372. Vercruyse T, Pardon E, Vanstreels E, Steyaert J: **An intrabody based on a llama single-domain antibody targeting the N-terminal α-helical multimerization domain of HIV-1 Rev prevents viral production.** *Journal of Biological Chemistry* 2010, **285**(28):21768-21780.
373. Gonzalez-Sapienza G, Rossotti MA, Tabares-da Rosa S: **Single-Domain Antibodies As Versatile Affinity Reagents for Analytical and Diagnostic Applications.** *Frontiers in Immunology* 2017, **8**(977).
374. Bever CS, Dong J-X, Vasylieva N, Barnych B, Cui Y, Xu Z-L, Hammock BD, Gee SJ: **VHH antibodies: emerging reagents for the analysis of environmental chemicals.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2016, **408**(22):5985-6002.

375. Tabares-da Rosa S, Rossotti M, Carleiza C, Carrión F, Pritsch O, Ahn KC, Last JA, Hammock BD, González-Sapienza G: **Competitive selection from single domain antibody libraries allows isolation of high-affinity antihapten antibodies that are not favored in the llama immune response.** *Analytical chemistry* 2011, **83**(18):7213-7220.
376. Ladenson RC, Crimmins DL, Landt Y, Ladenson JH: **Isolation and characterization of a thermally stable recombinant anti-caffeine heavy-chain antibody fragment.** *Analytical Chemistry* 2006, **78**(13):4501-4508.
377. Bever CRS, Majkova Z, Radhakrishnan R, Suni I, McCoy M, Wang Y, Dechant J, Gee S, Hammock BD: **Development and Utilization of Camelid VHH Antibodies from Alpaca for 2,2',4,4'-Tetrabrominated Diphenyl Ether Detection.** *Analytical Chemistry* 2014, **86**(15):7875-7882.
378. Bever CS, Dong J-XX, Vasylieva N, Barnych B, Cui Y, Xu Z-LL, Hammock BD, Gee SJ: **VHH antibodies: emerging reagents for the analysis of environmental chemicals.** *Analytical and bioanalytical chemistry* 2016, **408**(22):5985-6002.
379. Goldman ER, Anderson GP, Conway J, Sherwood LJ, Fech M, Vo B, Liu JL, Hayhurst A: **Thermostable llama single domain antibodies for detection of botulinum A neurotoxin complex.** *Analytical Chemistry* 2008, **80**(22):8583-8591.
380. Rudolph MJ, Vance DJ, Cheung J, C. F-M, Burshteyn F, Cassidy MS, Gary EN, Herrera C, Shoemaker CB, Mantis NJ: **Crystal structures of ricin toxin's enzymatic subunit (RTA) in complex with neutralizing and non-neutralizing single-chain antibodies.** *Journal of Molecular Biology* 2014, **426**(17):3057-3068.
381. Anderson GP, Goldman ER: **TNT detection using llama antibodies and a two-step competitive fluid array immunoassay.** *Journal of Immunological Methods* 2008, **339**(1):47-54.
382. Smith GP: **Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface.** *Science (New York, NY)* 1985:1315-1317.
383. Becker S, Theile S, Heppeler N, Michalczyk A, Wentzel A, Wilhelm S, Jaeger K-EE, Kolmar H: **A generic system for the Escherichia coli cell-surface display of lipolytic enzymes.** *FEBS letters* 2005, **579**(5):1177-1182.
384. Fields S, Song O-k: **A novel genetic system to detect protein-protein interactions.** *Nature* 1989, **340**(6230):245-246.
385. Ho M, Pastan I: **Mammalian cell display for antibody engineering.** *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2009, **525**:337.
386. Hanes J, Plückthun A: **In vitro selection and evolution of functional proteins by using ribosome display.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**(10):4937-4942.
387. **The Nobel Prize in Chemistry 2018** [<https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2018/summary/>]
388. Barbas CF, Kang AS, Lerner RA, Benkovic SJ: **Assembly of combinatorial antibody libraries on phage surfaces: the gene III site.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1991, **88**(18):7978-7982.
389. Chan CE, Lim AP, MacAry PA, Hanson BJ: **The role of phage display in therapeutic antibody discovery.** *International immunology* 2014, **26**(12):649-657.
390. Rami A, Behdani M, Yardehnavi N, Habibi-Anbouhi M, Kazemi-Lomedasht F: **An overview on application of phage display technique in immunological studies.** *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 2017, **7**(7):599-602.
391. Hammers CM, Stanley JR: **Antibody Phage Display: Technique and Applications.** *Journal of Investigative Dermatology* 2014, **134**(2):1-5.
392. Farajnia S, Babaei H, Majidi J, Veisi K, Ahmadzadeh V, Akbari B: **Evolution of phage display technology: from discovery to application AU - Rahbarnia, Leila.** *Journal of Drug Targeting* 2017, **25**(3):216-224.
393. Kehoe JW, Kay BK: **Filamentous phage display in the new millennium.** *Chemical Reviews* 2005, **105**(11):4056-4072.
394. Levisson M, Spruijt RB, Winkel IN, Kengen SWW, van der Oost J: **Phage display of engineered binding proteins.** *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)* 2014, **1129**:211-229.
395. Georgieva Y, Konthur Z: **Design and screening of M13 phage display cDNA libraries.** *Molecules (Basel, Switzerland)* 2011, **16**(2):1667-1681.
396. van den Ent F, Löwe J: **RF cloning: A restriction-free method for inserting target genes into plasmids.** *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 2006, **67**(1):67-74.
397. Sambrook J, Russell D: **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 3rd edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.

398. Alvarez-Rueda N, Behar G, Ferré V, Pugnère M, Roquet F, Gastinel L, Jacquot C, Aubry J, Baty D, Barbet J *et al*: **Generation of llama single-domain antibodies against methotrexate, a prototypical hapten**. *Molecular Immunology* 2007, **44**(7):1680-1690.
399. Rossotti M, Tabares S, Alfaya L, Leizagoyen C, Moron G, González-Sapienza G: **Streamlined method for parallel identification of single domain antibodies to membrane receptors on whole cells**. *Biochimica et biophysica acta* 2015, **1850**(7):1397-1404.
400. Chapman-Smith A, Turner DL, Cronan JE, Jr., Morris TW, Wallace JC: **Expression, biotinylation and purification of a biotin-domain peptide from the biotin carboxy carrier protein of Escherichia coli acetyl-CoA carboxylase**. *The Biochemical journal* 1994, **302** (Pt 3):881-887.
401. Baral TN, Arbabi-Ghahroudi M: **Expression of single-domain antibodies in bacterial systems**. In: *Single Domain Antibodies*. vol. 911, 1 edn. London: Humana Press; 2012: 257-275.
402. Ehrenmann F, Kaas Q, Lefranc MP: **IMGT/3Dstructure-DB and IMGT/DomainGapAlign: a database and a tool for immunoglobulins or antibodies, T cell receptors, MHC, IgSF and MhSF**. *Nucleic Acids Res* 2010, **38**(Database issue):D301-307.
403. Ehrenmann F, Lefranc M-P: **IMGT/DomainGapAlign: IMGT Standardized Analysis of Amino Acid Sequences of Variable, Constant, and Groove Domains (IG, TR, MH, IgSF, MhSF)**. *Cold Spring Harbor Protocols* 2011, **2011**(6):pdb.prot5636.
404. Lefranc M-P: **IMGT, the international ImMunoGeneTics database** ®. *Nucleic Acids Research* 2003, **31**(1):307-310.
405. Lefranc M-P, Pommié C, Ruiz M, Giudicelli V, Foulquier E, Truong L, Thouvenin-Contet V, Lefranc G: **IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains**. *Developmental & Comparative Immunology* 2003, **27**(1):55-77.
406. Gallagher SR: **One-Dimensional SDS Gel Electrophoresis of Proteins**. In: *Current Protocols in Cell Biology*. vol. 37: John Wiley & Sons, Inc.; 2001: 6.1.1-6.1.38.
407. Dell'Angelica EC, Bonifacino JS: **Staining Proteins in Gels**. In: *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons, Inc.; 2001: 6.6.1–6.6.14.
408. Rossotti MA, Pirez M, Gonzalez-Techera A, Cui Y, Bever CS, Lee KSS, Morisseau C, Leizagoyen C, Gee S, Hammock BD *et al*: **Method for Sorting and Pairwise Selection of Nanobodies for the Development of Highly Sensitive Sandwich Immunoassays**. *Analytical chemistry* 2015, **87**(23):11907-11914.
409. Lassabe G, Rossotti M, González-Techera A, González-Sapienza G: **Shiga-like toxin B subunit of Escherichia coli as scaffold for high-avidity display of anti-immunocomplex peptides**. *Analytical chemistry* 2014, **86**(11):5541-5546.
410. Ni D, Xu P, Gallagher S: **Immunoblotting and Immunodetection**. In: *Current Protocols in Cell Biology*. John Wiley & Sons, Inc.; 2001: 6.2.1-6.2.37.
411. Nikolovska-Coleska Z: **Studying Protein-Protein Interactions Using Surface Plasmon Resonance**. In: *Protein-Protein Interactions: Methods and Applications*. Edited by Meyerkord CL, Fu H. New York, NY: Springer New York; 2015: 109-138.
412. Markey F: **Principles of Surface Plasmon Resonance**. In: *Real-Time Analysis of Biomolecular Interactions: Applications of BIACORE*. Edited by Nagata K, Handa H. Tokyo: Springer Japan; 2000: 13-22.
413. Ghai R, Falconer RJ, Collins BM: **Applications of isothermal titration calorimetry in pure and applied research--survey of the literature from 2010**. *Journal of molecular recognition : JMR* 2012, **25**(1):32-52.
414. Velazquez-Campoy A, Leavitt SA, Freire E: **Characterization of Protein-Protein Interactions by Isothermal Titration Calorimetry**. In: *Protein-Protein Interactions: Methods and Applications*. Edited by Meyerkord CL, Fu H. New York, NY: Springer New York; 2015: 183-204.
415. Keller S, Vargas C, Zhao H, Piszczek G, Brautigam CA, Schuck P: **High-precision isothermal titration calorimetry with automated peak-shape analysis**. *Analytical chemistry* 2012, **84**(11):5066-5073.
416. Scheuermann TH, Brautigam CA: **High-precision, automated integration of multiple isothermal titration calorimetric thermograms: New features of NITPIC**. *Methods* 2015, **76**:87-98.
417. Houtman JC, Brown PH, Bowden B, Yamaguchi H, Appella E, Samelson LE, Schuck P: **Studying multisite binary and ternary protein interactions by global analysis of isothermal titration calorimetry data in SEDPHAT: application to adaptor protein complexes in cell signaling**. *Protein science : a publication of the Protein Society* 2007, **16**(1):30-42.

418. Zhao H, Piszczek G, Schuck P: **SEDPHAT--a platform for global ITC analysis and global multi-method analysis of molecular interactions.** *Methods (San Diego, Calif)* 2015, **76**:137-148.
419. Brautigam CA: **Calculations and Publication-Quality Illustrations for Analytical Ultracentrifugation Data.** *Methods in enzymology* 2015, **562**:109-133.
420. Vonrhein C, Flensburg C, Keller P, Sharff A, Smart O, Paciorek W, Womack T, Bricogne G: **Data processing and analysis with the autoPROC toolbox.** *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 2011, **67**(Pt 4):293-302.
421. Kabsch W: **XDS.** *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 2010, **66**(Pt 2):125-132.
422. Evans PR, Murshudov GN: **How good are my data and what is the resolution?** *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 2013, **69**(Pt 7):1204-1214.
423. Vagin A, Teplyakov A: **MOLREP: an Automated Program for Molecular Replacement.** *Journal of Applied Crystallography* 1997, **30**(6):1022-1025.
424. Emsley P, Cowtan K: **Coot: model-building tools for molecular graphics.** *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 2004, **60**(Pt 12 Pt 1):2126-2132.
425. Adams PD, Afonine PV, Bunkóczi G, Chen VB, Davis IW, Echols N, Headd JJ, Hung L-W, Kapral GJ, Grosse-Kunstleve RW *et al*: **PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution.** *Acta crystallographica Section D, Biological crystallography* 2010, **66**(Pt 2):213-221.
426. Bayon E, Morlieras J, Dereuddre-Bosquet N, Gonon A, Gosse L, Courant T, Le Grand R, Marche PN, Navarro FP: **Overcoming immunogenicity issues of HIV p24 antigen by the use of innovative nanostructured lipid carriers as delivery systems: evidences in mice and non-human primates.** *NPJ vaccines* 2018, **3**:46-46.
427. Salabert N, Todorova B, Martinon F, Boisgard R, Zurawski G, Zurawski S, Dereuddre-Bosquet N, Cosma A, Kortulewski T, Banchereau J *et al*: **Intradermal injection of an anti-Langerin-HIVGag fusion vaccine targets epidermal Langerhans cells in nonhuman primates and can be tracked in vivo.** *European journal of immunology* 2016, **46**(3):689-700.
428. Even-Desrumeaux K, Baty D, Chames P: **Strong and oriented immobilization of single domain antibodies from crude bacterial lysates for high-throughput compatible cost-effective antibody array generation.** *Molecular bioSystems* 2010, **6**(11):2241-2248.
429. Saerens D, Frederix F, Reekmans G, Conrath K, Jans K, Brys L, Huang L, Bosmans E, Maes G, Borghs G *et al*: **Engineering camel single-domain antibodies and immobilization chemistry for human prostate-specific antigen sensing.** *Anal Chem* 2005, **77**(23):7547-7555.
430. Sukhanova A, Even-Desrumeaux K, Kisserli A, Tabary T, Reveil B, Millot JM, Chames P, Baty D, Artemyev M, Oleinikov V *et al*: **Oriented conjugates of single-domain antibodies and quantum dots: toward a new generation of ultrasmall diagnostic nanoprobe.** *Nanomedicine* 2012, **8**(4):516-525.
431. Mitchell LS, Colwell LJ: **Comparative analysis of nanobody sequence and structure data.** *Proteins* 2018, **86**(7):697-706.
432. Turner KB, Naciri J, Liu JL, Anderson GP, Goldman ER, Zabetakis D: **Next-Generation Sequencing of a Single Domain Antibody Repertoire Reveals Quality of Phage Display Selected Candidates.** *PLOS ONE* 2016, **11**(2):e0149393.
433. Dereeper A, Chevenet F, Blanc G, Dufayard J-F, Claverie J-M, Lescot M, Audic S, Buffet S, Guindon S, Guignon V *et al*: **Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist.** *Nucleic Acids Research* 2008, **36**(suppl_2):W465-W469.
434. Zarschler K, Wittecy S, Kapplusch F, Foerster C, Stephan H: **High-yield production of functional soluble single-domain antibodies in the cytoplasm of Escherichia coli.** *Microbial cell factories* 2013, **12**:97-97.
435. Kunz P, Zinner K, Mücke N, Bartoschik T, Muyldermans S, Hoheisel JD: **The structural basis of nanobody unfolding reversibility and thermoresistance.** *Scientific reports* 2018, **8**(1):7934-7934.
436. O'Shannessy DJ, Brigham-Burke M, Soneson KK, Hensley P, Brooks I: **Determination of rate and equilibrium binding constants for macromolecular interactions using surface plasmon resonance: use of nonlinear least squares analysis methods.** *Analytical biochemistry* 1993, **212**(2):457-468.
437. Shriver-Lake LC, Zabetakis D, Goldman ER, Anderson GP: **Evaluation of anti-botulinum neurotoxin single domain antibodies with additional optimization for improved production and stability.** *Toxicon* 2017, **135**:51-58.

438. Liu JL, Goldman ER, Zabetakis D, Walper SA, Turner KB, Shriver-Lake LC, Anderson GP: **Enhanced production of a single domain antibody with an engineered stabilizing extra disulfide bond.** *Microbial Cell Factories* 2015, **14**(1):158.
439. Liu JL, Shriver-Lake LC, Anderson GP, Zabetakis D, Goldman ER: **Selection, characterization, and thermal stabilization of llama single domain antibodies towards Ebola virus glycoprotein.** *Microbial Cell Factories* 2017, **16**(1):223.
440. Todd MJ, Gomez J: **Enzyme Kinetics Determined Using Calorimetry: A General Assay for Enzyme Activity?** *Analytical Biochemistry* 2001, **296**(2):179-187.
441. Gray ER, Brookes JC, Caillat C, Turbé V, Webb BLJ, Granger LA, Miller BS, McCoy LE, El Khattabi M, Verrips CT *et al*: **Unravelling the Molecular Basis of High Affinity Nanobodies against HIV p24: In Vitro Functional, Structural, and in Silico Insights.** *ACS Infectious Diseases* 2017, **3**(7):479-491.
442. Koromyslova AD, Hansman GS: **Nanobodies targeting norovirus capsid reveal functional epitopes and potential mechanisms of neutralization.** *PLOS Pathogens* 2017, **13**(11):e1006636.
443. Tzeng S-R, Kalodimos CG: **Protein activity regulation by conformational entropy.** *Nature* 2012, **488**:236.
444. Hariharan P, Balasubramaniam D, Peterkofsky A, Kaback HR, Guan L: **Thermodynamic mechanism for inhibition of lactose permease by the phosphotransferase protein IIA_{Glc}.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2015, **112**(8):2407-2412.
445. Nieba L, Krebber A, Plückthun A: **Competition BIAcore for Measuring True Affinities: Large Differences from Values Determined from Binding Kinetics.** *Analytical Biochemistry* 1996, **234**(2):155-165.
446. Yu X, Wang Q, Yang J-C, Buch I, Tsai C-J, Ma B, Cheng SZD, Nussinov R, Zheng J: **Mutational Analysis and Allosteric Effects in the HIV-1 Capsid Protein Carboxyl-Terminal Dimerization Domain.** *Biomacromolecules* 2009, **10**(2):390-399.
447. Baker NA, Sept D, Joseph S, Holst MJ, McCammon JA: **Electrostatics of nanosystems: Application to microtubules and the ribosome.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2001, **98**(18):10037-10041.
448. Eisenberg D, Schwarz E, Komaromy M, Wall R: **Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot.** *Journal of Molecular Biology* 1984, **179**(1):125-142.
449. Scheiblhofer S, Laimer J, Machado Y, Weiss R, Thalhammer J: **Influence of protein fold stability on immunogenicity and its implications for vaccine design.** *Expert Review of Vaccines* 2017, **16**(5):479-489.
450. Manta B, Obal G, Ricciardi A, Pritsch O, Denicola A: **Tools to evaluate the conformation of protein products.** *Biotechnology Journal* 2011, **6**(6):731-741.
451. Turbé V, Gray ER, Lawson VE, Nastouli E, Brookes JC, Weiss RA, Pillay D, Emery VC, Verrips CT, Yatsuda H *et al*: **Towards an ultra-rapid smartphone- connected test for infectious diseases.** *Scientific Reports* 2017, **7**(1):11971.
452. Loynachan CN, Thomas MR, Gray ER, Richards DA, Kim J, Miller BS, Brookes JC, Agarwal S, Chudasama V, McKendry RA *et al*: **Platinum Nanocatalyst Amplification: Redefining the Gold Standard for Lateral Flow Immunoassays with Ultrabroad Dynamic Range.** *ACS Nano* 2018, **12**(1):279-288.
453. Unkauf T, Hust M, Frenzel A: **Antibody Affinity and Stability Maturation by Error-Prone PCR.** *Methods Mol Biol* 2018, **1701**:393-407.
454. Rasmussen SGF, Choi H-J, Fung JJ, Pardon E, Casarosa P, Chae PS, DeVree BT, Rosenbaum DM, Thian FS, Kobilka TS *et al*: **Structure of a nanobody-stabilized active state of the β 2 adrenoceptor.** *Nature* 2011, **469**:175.
455. Staus DP, Strachan RT, Manglik A, Pani B, Kahsai AW, Kim TH, Wingler LM, Ahn S, Chatterjee A, Masoudi A *et al*: **Allosteric nanobodies reveal the dynamic range and diverse mechanisms of G-protein-coupled receptor activation.** *Nature* 2016, **535**(7612):448-452.
456. Tereshko V, Uysal S, Koide A, Margalef K, Koide S, Kossiakoff AA: **Toward chaperone-assisted crystallography: protein engineering enhancement of crystal packing and X-ray phasing capabilities of a camelid single-domain antibody (VHH) scaffold.** *Protein science : a publication of the Protein Society* 2008, **17**(7):1175-1187.
457. Isogai S, Deupi X, Opitz C, Heydenreich FM, Tsai C-J, Brueckner F, Schertler GFX, Veprintsev DB, Grzesiek S: **Backbone NMR reveals allosteric signal transduction networks in the β 1-adrenergic receptor.** *Nature* 2016, **530**(7589):237-241.

458. Strauss M, Schotte L, Karunatilaka KS, Filman DJ, Hogle JM: **Cryo-electron Microscopy Structures of Expanded Poliovirus with VHHs Sample the Conformational Repertoire of the Expanded State.** *Journal of virology* 2017, **91**(3):e01443-01416.
459. Herce HD, Deng W, Helma J, Leonhardt H, Cardoso MC: **Visualization and targeted disruption of protein interactions in living cells.** *Nature communications* 2013, **4**:2660.
460. Künzl F, Frühholz S, Fäßler F, Li B, Pimpl P: **Receptor-mediated sorting of soluble vacuolar proteins ends at the trans-Golgi network/early endosome.** *Nature plants* 2016, **2**:16017.
461. Drees C, Raj AN, Kurre R, Busch KB, Haase M, Piehler J: **Engineered Upconversion Nanoparticles for Resolving Protein Interactions inside Living Cells.** *Angewandte Chemie (International ed in English)* 2016, **55**(38):11668-11672.
462. Beghein E, Gettemans J: **Nanobody Technology: A Versatile Toolkit for Microscopic Imaging, Protein-Protein Interaction Analysis, and Protein Function Exploration.** *Frontiers in immunology* 2017, **8**:771.
463. de Bruin R, Lougheed SM, van der Kruk L, Stam AG, Hooijberg E, Roovers RC, van en Henegouwen P, Verheul H, de Gruijl TD, van der Vliet HJ: **Highly specific and potently activating V γ 9V δ 2-T cell specific nanobodies for diagnostic and therapeutic applications.** *Clinical Immunology* 2016, **169**:128-138.
464. Peyrassol X, Laeremans T, Gouwy M, Lahura V, Debulpaepe M, Van Damme J, Steyaert J, Parmentier M, Langer I: **Development by Genetic Immunization of Monovalent Antibodies (Nanobodies) Behaving as Antagonists of the Human ChemR23 Receptor.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 2016, **196**(6):2893-2901.
465. Braun MB, Traenkle B, Koch PA, Emele F, Weiss F, Poetz O, Stehle T, Rothbauer U: **Peptides in headlock – a novel high-affinity and versatile peptide-binding nanobody for proteomics and microscopy.** *Scientific Reports* 2016, **6**:19211.
466. Maier J, Traenkle B, Rothbauer U: **Real-time analysis of epithelial-mesenchymal transition using fluorescent single-domain antibodies.** *Scientific reports* 2015, **5**:13402.
467. Jullien D, Vignard J, Fedor Y, Béry N, Olichon A, Crozatier M, Erard M, Cassard H, Ducommun B, Salles B *et al*: **Chromatibody, a novel non-invasive molecular tool to explore and manipulate chromatin in living cells.** *Journal of cell science* 2016, **129**(13):2673-2683.
468. Traenkle B, Emele F, Anton R, Poetz O, Haeussler RS, Maier J, Kaiser PD, Scholz AM, Nueske S, Buchfellner A *et al*: **Monitoring interactions and dynamics of endogenous beta-catenin with intracellular nanobodies in living cells.** *Molecular & cellular proteomics : MCP* 2015, **14**(3):707-723.
469. Chojnacki J, Eggeling C: **Super-resolution fluorescence microscopy studies of human immunodeficiency virus.** *Retrovirology* 2018, **15**(1):41.
470. Ries J, Kaplan C, Platonova E, Eghlidi H, H. E-: **A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies.** *Nature Methods* 2012, **9**(6):582-594.
471. Tang JCY, Drokhyansky E, Etemad B, Rudolph S, Guo B, Wang S, Ellis EG, Li JZ, Cepko CL: **Detection and manipulation of live antigen-expressing cells using conditionally stable nanobodies.** *eLife* 2016, **5**.
472. Rincón V, Bocanegra R, Rodríguez-Huete A, Rivas G, Mateu MG: **Effects of Macromolecular Crowding on the Inhibition of Virus Assembly and Virus-Cell Receptor Recognition.** *Biophysical Journal* 2011, **100**(3):738-746.
473. Lin YZ, Yao SY, Veach RA, Torgerson TR, Hawiger J: **Inhibition of nuclear translocation of transcription factor NF-kappa B by a synthetic peptide containing a cell membrane-permeable motif and nuclear localization sequence.** *J Biol Chem* 1995, **270**(24):14255-14258.
474. Rojas M, Donahue JP, Tan Z, Lin Y-Z: **Genetic engineering of proteins with cell membrane permeability.** *Nature Biotechnology* 1998, **16**(4):370-375.
475. Zhao Y, Lou D, Burkett J, Kohler H: **Chemical engineering of cell penetrating antibodies.** *Journal of Immunological Methods* 2001, **254**(1-2):137-145.
476. Dinca A, Chien W-M, Chin MT: **Intracellular Delivery of Proteins with Cell-Penetrating Peptides for Therapeutic Uses in Human Disease.** *International Journal of Molecular Sciences* 2016, **17**(2):263.
477. Slastnikova TA, Ulasov AV, Rosenkranz AA, Sobolev AS: **Targeted Intracellular Delivery of Antibodies: The State of the Art.** *Frontiers in Pharmacology* 2018, **9**(1208).
478. Muller S, Zhao Y, Brown TL, Morgan AC, Kohler H: **TransMabs: cell-penetrating antibodies, the next generation.** *Expert opinion on biological therapy* 2005, **5**(2):237-241.

479. van Lith SAM, van den Brand D, Wallbrecher R, van Duijnhoven SMJ, Brock R, Leenders WPJ: **A Conjugate of an Anti-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) VHH and a Cell-Penetrating Peptide Drives Receptor Internalization and Blocks EGFR Activation.** *The European Journal of Chemical Biology* 2017, **18**(24):2390-2394.
480. Saldívar-González F, Prieto-Martínez FD, Medina-Franco JL: **Descubrimiento y desarrollo de fármacos: un enfoque computacional.** *Educación Química* 2017, **i28**(1):51-58.
481. Zlotnick A, Mukhopadhyay S: **Virus assembly, allostery and antivirals.** *Trends in Microbiology* 2011, **19**(1):14-23.
482. Quinn CM, Wang M, Fritz MP, Runge B, Ahn J, Xu C, Perilla JR, Gronenborn AM, Polenova T: **Dynamic regulation of HIV-1 capsid interaction with the restriction factor TRIM5 α identified by magic-angle spinning NMR and molecular dynamics simulations.** *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2018, **115**(45):11519-11524.