

Tesis de Posgrado

Desarrollo y caracterización de anticuerpos contra un factor de transcripción viral unido a su ADN específico

Cerutti, María Laura

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Cerutti, María Laura. (2003). Desarrollo y caracterización de anticuerpos contra un factor de transcripción viral unido a su ADN específico. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3589_Cerutti.pdf

Cita tipo Chicago:

Cerutti, María Laura. "Desarrollo y caracterización de anticuerpos contra un factor de transcripción viral unido a su ADN específico". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3589_Cerutti.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

*Desarrollo y caracterización de anticuerpos
contra un factor de transcripción viral
unido a su ADN específico*

Autora: Lic. María Laura Cerutti
Director: Dr. Fernando A. Goldbaum
Instituto de Investigaciones Bioquímicas - Facultad de
Ciencias Exactas y Naturales

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires

- 2003 -

Nº 3589

*A mis padres,
que siempre me apoyan en mis emprendimientos*

*A Osmi,
mi compañero en este camino de la vida*

Agradecimientos

A Fernando: por haber sido el mejor director que pude haber tenido. Por inculcarme su profesionalismo y criterio día a día, sin cansarse de contestar mis dudas ni discutir ideas en estos casi cinco años de trabajo juntos.

A Gonzalo: por haber contribuido también enormemente a mi formación, abriéndome la posibilidad de incursionar en campos nuevos, enzeñándome a conocer sus límites y a explotar sus ventajas. Por saber que puedo contar siempre con su ayuda.

A Diegui: por haberme abierto la posibilidad de entrar a trabajar en su laboratorio (que no cualquier amigo, por más que sea amigo, lo hace) y presentarme a Fernando, recomendándomelo como un muy buen candidato a jefe (sin equivocarse).

A Diegui, Leo, Juan, Laura y Ale: por las innumerables y extensas discusiones y planteos (reales y filosóficos) que mantuvimos cada vez que me encontraba con resultados que iban en contra de mi lógica. Por darme una mano siempre que la necesitaba. Y por último, pero no por eso menos importante...por hacer causa común cada vez que E2 me agregaba, ya sea en una simple (o no tanto!) purificación o en el medio de LOS experimentos.

A todos mi compañeros del laboratorio: Laura, Marie, Vane, Ana, Naty, Pato, Guille, Dieguito, Juan Pablo, Sebastián y Melina, por su ayuda cotidiana en el trabajo del laboratorio. Por poder discutir problemas técnicos o mecánicos con la extensión que sea necesaria, sintiendo un sincero interés para que pueda resolverlos.

A Laura, Vane, Marie y Naty: por las charlas de almuerzo y cafés en las que compartimos nuestras alegrías y preocupaciones, sintiendome reflejada en las suyas y comprendida en las mías.

A otros compañeros becarios del Instituto: por toda la ayuda que me hayan brindado, a pesar de no ser sus propios compañeros de trabajo.

A toda la gente del Instituto: porque de alguna manera todos me han ayudado a llevar adelante este trabajo de tesis.

Resumen

El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad autoinmune de etiología desconocida. El rasgo principal de esta enfermedad es la presencia de anticuerpos dirigidos contra componentes nucleares, como histonas y ADN doble cadena. En los últimos años, se ha demostrado que varios complejos proteína: ADN pueden inducir una respuesta autoinmune contra ADN en ratones normales, no-predispuestos a desarrollar autoinmunidad. En este trabajo de tesis se describe el desarrollo de un modelo de inmunización con un complejo proteína: ADN molecularmente definido y la caracterización de la respuesta inmune generada contra él en animales normales. En particular, se utilizó el complejo formado por el dominio C-terminal del factor de transcripción E2 del papilomavirus humano y un oligonucleótido doble cadena de 18 pb comprendiendo uno de sus sitios de reconocimiento específico dentro del genoma viral. El análisis de la respuesta inmune humoral de ratones inmunizados con la proteína E2 libre o unida a ADN indica que ésta es una proteína altamente inmunogénica. La inmunización con E2 libre emulsionada en un adyuvante de composición aceite-en-agua resulta en una respuesta policlonal dirigida hacia el reconocimiento de epitopes discontinuos, sugiriendo que la naturaleza acuosa del adyuvante es el responsable de mantener a la proteína en su conformación nativa. El estudio de la respuesta policlonal contra ADN desarrollada en los ratones inmunizados con este complejo proteína: ADN señala que el oligonucleótido específico puede adquirir potencial inmunogénico sólo cuando el complejo es incubado a altas concentraciones por un largo período de tiempo. En estos casos, los ratones inmunizados desarrollaron altos títulos de IgG anti-oligonucleótido durante una respuesta T-dependiente clásica. Además, la inmunización con la proteína E2, ya sea libre o unida a su secuencia de reconocimiento, resultó en una respuesta autoinmune contra ADN nativo doble cadena. Estos resultados son congruentes con la hipótesis de que proteínas virales con capacidad de unir ADN tendrían el potencial necesario para iniciar el desarrollo de la enfermedad autoinmune lupus eritematoso sistémico.

A partir de uno de los animales inmunizados con el complejo E2: ADN han sido obtenidos y caracterizados seis anticuerpos monoclonales dirigidos contra la proteína viral y dos anticuerpos contra el oligonucleótido específico. En coincidencia con el patrón de reactividades observado en la respuesta policlonal, la mayoría de los hibridomas

anti-E2 reconocen epitopes discontinuos en la proteína. Los estudios de mapeo epitópico-funcional realizados sobre estos anticuerpos monoclonales revelan que se han obtenido dos grandes poblaciones de anticuerpos: una formada por anticuerpos capaces de formar un complejo ternario estable con E2 y el oligonucleótido, y otra población formada por anticuerpos que reconocen un epítopo, parcial o totalmente, superpuesto con la superficie de unión a ADN en el factor de transcripción, interfiriendo en su interacción con ADN.

Estudios detallados de la interacciones anti-ADN: ADN muestran que los dos anticuerpos monoclonales anti-ADN generados reaccionan contra el oligonucleótido utilizado como inmunógeno con afinidades comparables a las del factor de transcripción E2. Por el contrario, estos anticuerpos unen con muy baja afinidad moléculas de ADN no-relacionadas doble cadena del mismo largo. Más aún, ambos anticuerpos unen al oligonucleótido libre y acomplexado a E2 con afinidades muy similares, formando un complejo ternario estable. La estructura de las regiones variables y el patrón de mutaciones de la secuencia de estos anticuerpos indica que éstas son muy similares a las encontradas en anticuerpos anti-ADN generados en modelos murinos de lupus. En conjunto, todos estos resultados sugieren fuertemente que estos anticuerpos monoclonales anti-ADN son el producto de una respuesta inmune dirigida por el antígeno, en el cual el complejo E2: ADN actuó como una nueva entidad inmunogénica.

Algunos de los resultados presentados en esta Tesis han sido incluídos en las siguientes publicaciones:

-“Specific antibody-DNA interaction: a novel strategy for tight DNA recognition”. Di Pietro, S.M., Centeno, J.M., Cerutti, M.L., Lodeiro, F., Ferreira, D.U., Alonso, L.G., Schwartz, F.P., Goldbaum, F.A., and G. de Prat Gay. *Biochemistry*, *in press*. (DOI: [10.1021/bi026866u](https://doi.org/10.1021/bi026866u)) (2003).

-“Antibody response to a viral transcription regulator”. Cerutti M.L., Centeno, J.M., de Prat Gay G., and Goldbaum, F.A. *FEBS lett.* 534 (1-3): 202-206 (2003).

-“Generation of sequence specific, high affinity anti-DNA antibodies”. Cerutti, M.L., Centeno, J.M., Goldbaum, F.A., and de Prat Gay, G. *J. Biol. Chem.* 276 (16): 12769-12773 (2001).

Palabras claves: inmunización, adyuvante, complejo proteína: ADN, autoinmunidad, anticuerpos anti-ADN, factor de transcripción, papilomavirus.

Summary

Systemic lupus erythematosus is an autoimmune disorder with unknown etiology. The major hallmark of this disease is the presence of antibodies against nuclear components, including double-stranded DNA and histones. In the last years, several protein: DNA complexes have been shown to induce anti-DNA antibodies in normal, nonautoimmune-predisposed mice. This PhD thesis describes the development of an immunization model using a molecularly defined protein: DNA complex and the characterization of the immune response generated against it in non-autoimmune mice. In particular, a complex formed by the C-terminal domain of the human papillomavirus E2 transcription factor and a cognate 18 bp double stranded oligonucleotide corresponding to one of its recognition sites in the viral genome has been used. Analysis of the humoral immune response of mice challenged with free or bound E2 indicates that this is a very immunogenic protein. Immunization with free E2 emulsified in an oil-in-water adjuvant elicits a strong humoral response shifted to the recognition of discontinuous epitopes, suggesting that the aqueous nature of this adjuvant emulsion is responsible for keeping the protein in its native conformation. Analysis of the induced polyclonal anti-DNA response indicates that the specific oligonucleotide can acquire immunogenic potential only when the complex is incubated under high concentrations for a long-term period. In this case, the immunized mice develop high IgG anti-oligonucleotide sera titers during a typical T-dependent immune response. Besides, immunization with free or DNA complexed E2 protein also results in an autoimmune response to native double stranded DNA, supporting the hypothesis that viral DNA-binding proteins may have the potential to initiate the development of the autoimmune disease Systemic lupus erythematosus.

From one of the E2: DNA complex immunized mice there has been obtained and characterized six monoclonal antibodies against the viral protein and two against the specific oligonucleotide. According with the pattern of reactivity observed in the polyclonal response, most anti-E2 hybridomas recognize discontinuous epitopes on the protein. Epitope mapping and functional analysis of these monoclonal antibodies reveals that two separate antibodies populations can be obtained: one formed by antibodies able to form a stable ternary complex with protein and the oligonucleotide, and other in which the antibodies recognize an epitope totally or partially overlapped with the DNA-binding surface of the transcription factor, interfering with its interaction with DNA.

Detailed studies of the anti-DNA: DNA interactions showed that the two generated anti-DNA monoclonal antibodies react against the double stranded oligonucleotide used as immunogen with affinities comparable to that of the transcription factor. In contrast, they bind with low affinities with unrelated double stranded DNAs of the same length. Furthermore, they bind with almost the same affinity towards the free or E2 bound oligonucleotide, forming a stable ternary structure. The variable region structures and mutation pattern of the anti-DNA antibodies sequences indicate that they are similar to the anti-dsDNA antibodies described on murine models of systemic lupus erythematosus. Taken together these results strongly suggest that these anti-DNA monoclonal antibodies are the product of an antigen-driven immune response, in which the E2: DNA complex acted as an new immunogenic entity.

Some of the results presented in this PhD Thesis has been included in the following publications:

-“Specific antibody-DNA interaction: a novel strategy for tight DNA recognition”. Di Pietro, S.M., Centeno, J.M., Cerutti, M.L., Lodeiro, F., Ferreiro, D.U., Alonso, L.G., Schwartz, F.P., Goldbaum, F.A., and de Prat Gay, G. *Biochemistry*, *in press*. (DOI: [10.1021/bi026866u](https://doi.org/10.1021/bi026866u)) (2003).

-“Antibody response to a viral transcription regulator”. Cerutti M.L., Centeno, J.M., de Prat Gay, G. and Goldbaum, F.A. *FEBS lett.* 534 (1-3): 202-206 (2003).

-“Generation of sequence specific, high affinity anti-DNA antibodies”. Cerutti, M.L., Centeno, J.M., Goldbaum, F.A., and de Prat Gay, G. *J. Biol. Chem.* 276 (16): 12769-12773 (2001).

Key words: immunization, adjuvant, protein: DNA complex, autoimmunity, anti-DNA antibodies, transcription factor, papillomavirus.

Abreviaturas

aa: aminoácido
BSA: seroalbúmina bovina
DMSO: dimetilsulfóxido
DO: Densidad óptica
DTT: ditioneitol
EDTA: ácido etilendiamino tetra acético
FA: adyuvante de Freund
FITC: isotiocianato de fluoresceína
HRPO: peroxidasa de rabanito
IP: intraperitoneal
IPTG: Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
2-Me: 2-Mercaptoetanol
MPL: Sistema adyuvante MPL[®] + TDM
PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida
PEG: polietilenglicol
SDS: dodecilsulfato de sodio
T amb: temperatura ambiente
TBS: tris buffer salino
TFA: trifluoroacético
Tris: tris (hidroximetil) amino metano
AcMo: anticuerpo monoclonal
EBNA: dominio C-terminal de unión a ADN del antígeno nuclear del Epstein Barr.
E2C: extremo C-terminal de la proteína E2 del papillomavirus humano cepa 16.
E2C/FA: proteína E2C emulsionada en el adyuvante FA
E2C/MPL: proteína E2C emulsionada en el adyuvante MPL
site 35: oligonucleótido 18 pares de bases correspondiente a uno de los cuatro sitios de unión a DNA de la proteína E2 dentro del genoma del virus HPV-16.
Bio-site 35: oligonucleótido site 35 modificado con una molécula de biotina en el extremo 5' de la cadena A
FITC-site 35: oligonucleótido site 35 modificado con una molécula de fluoresceína en el extremo 5' de la cadena B.
RhoA-site 35: oligonucleótido site 35 modificado con una molécula de rodamina en el extremo 5' de la cadena A
CX: complejo E2C HPV-16: site 35
NI-CX: complejo E2C: site 35 no incubado
CT-CX: complejo E2C: site 35 incubado corto tiempo
LT-CX: complejo E2C: site 35 incubado largo tiempo
K_D: constante de disociación en el equilibrio
k_{as}: constante cinética de asociación
k_{dis}: constante cinética de disociación
IgG: inmunoglobulina de isotipo G
Fab: fragmento univalente de una inmunoglobulina
Fc: fragmento constante de una inmunoglobulina
CDR: región de determinación de complementaridad
FR: región conservada dentro del dominio variable
V_H: región variable de la cadena pesada de un anticuerpo
V_L: región variable de la cadena liviana de un anticuerpo

Índice

<i>Introducción</i>	3
<i>Anticuerpos anti-ADN y lupus eritematoso sistémico</i>	
<i>Lupus eritematoso sistémico</i>	3
<i>Agente etiológico de los anticuerpos anti-ADN</i>	5
<i>Sistemas transportador-hapteno como modelos de lupus</i>	6
<i>Desarrollo de anticuerpos anti-ADN doble cadena de alta afinidad</i>	8
<i>El factor de transcripción E2</i>	
<i>Los papilomavirus</i>	11
<i>E2 y la respuesta inmune hacia el HPV</i>	13
<i>Estructura de las proteínas E2</i>	14
<i>El complejo E2C: site 35</i>	17
<i>Agentes adyuvantes</i>	
<i>Características generales</i>	18
<i>Clases de adyuvantes y respuesta inmune</i>	19
<i>Objetivos</i>	21
<i>Materiales y métodos</i>	22
<i>Expresión y purificación de E2C</i>	22
<i>Desnaturalización térmica de E2C</i>	23
<i>Péptidos de E2C</i>	23
<i>Preparación de oligonucleótidos</i>	23
<i>Marcación del oligonucleótido site 35 con ATPγ^{32}P</i>	24
<i>Complejos E2C: site 35</i>	24
<i>Protocolos de inmunización</i>	25
<i>Obtención de anticuerpos monoclonales</i>	25
<i>Purificación de los anticuerpos y Fabs</i>	27
<i>Secuenciación de los anticuerpos</i>	28
<i>Marcación de ED5 IgG con peroxidasa</i>	28
<i>Marcación de ED5 Fab con FITC</i>	29
<i>Biotinilación del Fab ED15</i>	30
<i>Ensayos de ELISA</i>	30
<i>Ensayos de espectroscopía</i>	33
<i>Ensayos de movilidad electroforética</i>	35
<i>Análisis por biosensor</i>	36
<i>Ensayos de unión por filtración en gel</i>	38
<i>Respuesta inmune humoral</i>	
<i>Resultados y discusión parte I</i>	40
<i>Efecto del adyuvante en la conformación del antígeno</i>	40
<i>Respuesta policlonal contra el complejo E2C: site 35</i>	43
<i>Especificidad de la respuesta policlonal anti-ADN</i>	46
<i>E2C y la respuesta contra ADNdc</i>	48
<i>Desarrollo de anticuerpos monoclonales</i>	50
<i>Conclusiones I</i>	52
<i>Caracterización de los AcMos anti-E2C</i>	
<i>Resultados y discusión parte II</i>	54
<i>Reconocimiento de epitopos discontinuos</i>	54

<i>Mapeo epitópico-funcional de los AcMos anti-E2C</i>	57
<i>Estequeometría de las interacciones E2C: anti-E2C</i>	60
<i>Determinación de las constantes de disociación de los AcMos anti-E2C</i>	66
<i>Efecto de la sal en la interacción E2C: anti-E2C</i>	72
<i>Posibles aplicaciones de los AcMos anti-E2C</i>	75
<i>Conclusiones II</i>	77

Caracterización de los AcMos anti-ADN

<i>Resultados y discusión III</i>	79
<i>Formación de un complejo estable anti-ADN: site 35</i>	79
<i>Estequeometría de las interacciones anti-ADN: site 35</i>	82
<i>Determinación de las constantes de disociación anti-ADN: site 35</i>	84
<i>Especificidad de los AcMos anti-ADN</i>	87
<i>Efecto de la sal en la interacción anti-ADN: site 35</i>	90
<i>Etiología de los AcMos anti-site 35</i>	94
<i>Formación del complejo ternario E2C: site 35: anti-ADN</i>	96
<i>Características inmunogénicas del complejo E2C: site 35</i>	98
<i>Conclusiones III</i>	101

<i>Discusión general</i>	104
--------------------------------	-----

<i>Bibliografía</i>	108
---------------------------	-----

<i>Apéndice</i>	115
-----------------------	-----

<i>Notas</i>	122
--------------------	-----

Introducción

Anticuerpos anti-ADN y lupus eritematoso sistémico

Lupus eritematoso sistémico

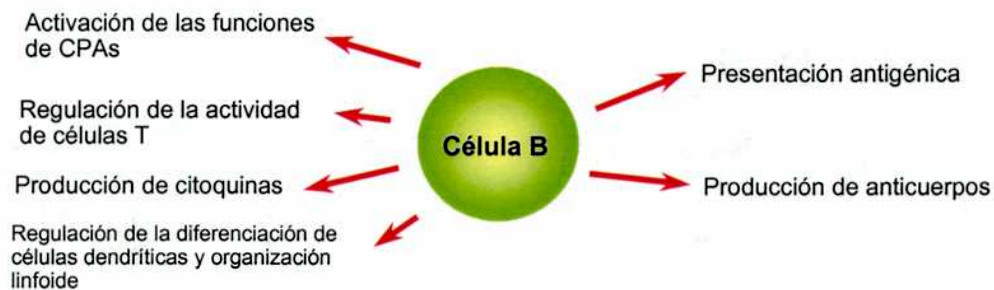
Los anticuerpos anti-ADN doble cadena de mamífero (ADNdc) son considerados el rasgo distintivo de la enfermedad auto-inmune lupus eritematoso sistémico (LES), contribuyendo a la patogénesis de nefritis lúpica como resultado de la deposición de complejos inmunes formados por anticuerpos anti-ADN y ADN en los tejidos (1). Si bien el origen de esta enfermedad es desconocido, una gran variedad de factores han sido propuestos como posibles agentes etiológicos. Estos factores abarcan desde factores ambientales como virus, drogas y bacterias hasta características genéticas hereditarias relacionadas con una mayor susceptibilidad a la desregulación del sistema inmune (figura 1B, (2)). Más aún, todavía no se ha establecido si LES es una única enfermedad o representa una continua superposición de manifestaciones de distintos órganos, con etiologías individuales no-relacionadas. El daño puede afectar a casi cualquier órgano del cuerpo, causando artritis, fatiga, enfermedades cardíacas, osteoporosis, fallas renales, coagulación sanguínea, entre otras. Las diversas expresiones clínicas y los distintos grados de intensidad que pueden alcanzar dichas expresiones entre los pacientes suelen ocasionar graves problemas en el diagnóstico y la investigación clínica de esta enfermedad (2).

La enfermedad LES está asociada con una gran variedad de anomalías inmunoregulatorias. Si bien se ha hipotetizado que anomalías en la respuesta de las células T, tales como la producción anormal de citoquinas o un control deficiente de células T regulatorias, podrían jugar un papel esencial en la evolución de la autoinmunidad y la patología tisular (3), cada vez más evidencias sugieren que la tendencia intrínseca de las células B de responder excesivamente a la estimulación inmune (hiperactividad) podría ser un rasgo básico de lupus (4). Uno de los fundamentos de esta última hipótesis es la relación central entre LES y la producción de autoanticuerpos con patrones característicos, algunos de los cuales están claramente involucrados en el daño tisular. Estos incluyen anticuerpos anti-ADN en glomerulonefritis, anticuerpos anti-cardiolipina en trombosis y anticuerpos anti-Ro en el bloqueo cardíaco congénico. Aunque en el lupus humano existen muchas evidencias de que al menos algunas de las patologías tisulares son mediadas por autoanticuerpos, la

actividad o función anormal de las células B puede también contribuir al desarrollo de la enfermedad. Algunos ejemplos de hiperactividad en células B encontradas en LES son: anomalías en la activación de las células B; anomalías en caminos de señalización y migración; expresión constitutivamente aumentada de moléculas co-estimulatorias; producción aumentada de varias citoquinas estimuladoras de las funciones de las células B, tales como las interleuquinas 6 y 10; aumentos marcados de la actividad mutacional; y anomalías en la selección positiva y negativa de las células B que pueden contribuir, directa o indirectamente, al desarrollo de esta enfermedad autoinmune (4).

A

Funciones de las células B en la respuesta inmune



B

Lupus eritematoso sistémico

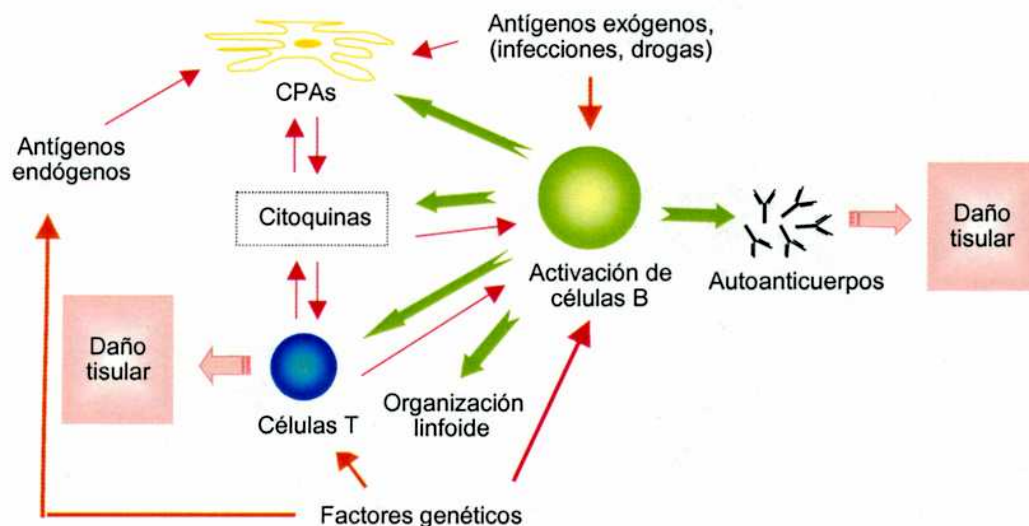


Figura 1: Regulación de las células B y su contribución al desarrollo de LES. A, Respuesta inmune normal. Las células B actúan como precursoras de células productoras de anticuerpos, funcionan como CPAs y regulan positivamente las funciones de otras células involucradas en la respuesta inmune. B, Respuesta inmune en LES. Los factores genéticos contribuyen a incrementar la reactividad de las células B, resultando en la producción directa de autoanticuerpos y daño tisular. Estos factores también pueden intensificar la capacidad de las células B de aumentar la función de varias otras células involucradas en la

respuesta. Además, una variedad de factores genéticos pueden alterar en forma directa las funciones de las células T y CPAs, aumentando la producción de citoquinas o la disponibilidad de antígenos endógenos que pueden contribuir a que las células B hiper-reactivas causen autoinmunidad y daños tisulares (modificado de ref. (3)).

Una evaluación reciente del papel de las células B en el sistema inmune ha indicado que estas células son mucho más que las precursoras de las células productoras de anticuerpos (figura 1A). Las células B cumplen más funciones esenciales en la regulación de las respuestas inmunes de las que habían sido apreciadas anteriormente. Por ejemplo, la linfotoxina α/β expresada por las células B, es esencial para la diferenciación de las células dendríticas en los órganos linfoides secundarios y en el desarrollo de la arquitectura linfoide (5). Similarmente, las células B activadas expresan moléculas co-estimuladoras que pueden ser esenciales para la evolución de las células T efectoras (6). Las citoquinas producidas por las células B activadas también pueden influenciar la función de las células dendríticas presentadoras de antígeno, a la vez de actuar ellas mismas como células presentadoras de antígeno. En conjunto, todos estos resultados indican que las células B desempeñan un rol esencial en la organogénesis linfoide y en la iniciación y regulación de las respuestas de las células T y B. Así, la actividad excesiva o desregulada de las células B puede aumentar la actividad inmune, incrementando las probabilidades de desarrollar autoinmunidad (figura 1B) (3).

Agente etiológico de los anticuerpos anti-ADN

Si bien los anticuerpos anti-ADN doble cadena son reconocidos como el rasgo más sobresaliente del lupus, su consideración como marcadores críticos en el diagnóstico de esta enfermedad podría ser una sobre-estimación de su impacto biológico dentro de la enfermedad. Con el desarrollo de métodos nuevos de alta sensibilidad para la detección de anticuerpos contra ADN doble cadena, pueden detectarse anticuerpos anti-ADN biológicamente insignificantes, exponiendo que el impacto del hallazgo de estos anticuerpos en el diagnóstico debería ser re-evaluado (7). En este sentido, el estudio de anticuerpos anti-ADNdc ha contribuido enormemente al conocimiento general de la regulación del sistema inmune, especialmente con respecto a la especificidad molecular de estos anticuerpos y la estructura de sus regiones variables, determinantes de dichas especificidades. El análisis genético de los anticuerpos anti-ADN generados en forma

espontánea en ratones genéticamente predispuestos a desarrollar lupus (la cepa (NZBxNZW)F₁ es una de ellas (8)) indica que estos anticuerpos son el producto de una respuesta clonal de células B dirigida por un antígeno específico, aunque la naturaleza y forma de el/los inmunógeno/s inductor/es de la respuesta auto-inmune anti-ADN aún no han sido elucidados. La utilización recurrente de determinadas familias de genes variables y la extensiva mutación somática ocurrida en los genes de los anticuerpos anti-ADN desarrollados en ratones autoinmunes (NZBxNZW)F₁ a medida que la respuesta madura, ha implicado al ADNdc como el estímulo inductor de la producción de estos anticuerpos (9-12). Sin embargo, estos hallazgos plantearon como interrogante si el ADNdc estaba actuando como un antígeno en sí mismo, o si sólo lo hacía como hapteno. Dada la falta de pruebas apoyando la primer opción (13), la idea de considerar al ADNdc como un hapteno y a un polipéptido no-propio unido a él como una proteína transportadora, necesaria para la inducción de una potencial respuesta T helper (T_H), ha ido en aumento (14-18).

Sistemas transportador-hapteno como modelos de lupus

En el pasado, se han realizado sin éxito varios intentos de obtener una respuesta anti-ADNdc a través de inmunizaciones con ADNdc unido en forma covalente o no-covalente a varias proteínas transportadoras, tales como histonas, poli-L-lisina, γ -globulina bovina y seroalbúmina bovina metilada (19). Estos resultados sugirieron que en ratones autoinmunes el estímulo inmunogénico de la respuesta anti-ADN doble cadena podían ser complejos de ADN (hapteno) con proteínas capaces de unir ADN (transportador). De este modo, bajo determinadas condiciones, estos complejos proteína: ADN deberían tener la propiedad de ser inmunogénicos incluso en ratones normales. En los últimos años, varios modelos de inmunización transportador-hapteno con complejos proteína: ADN han demostrado que es posible inducir y mantener una respuesta auto-inmune anti-ADN en ratones normales (14, 15, 17, 20, 21). Notablemente, los anticuerpos anti-ADN inducidos por estos complejos presentaron rasgos muy similares a los de los anticuerpos anti-ADN desarrollados en modelos de autoinmunidad, ya sea en su especificidad fina por ADN doble cadena de mamífero como en las estructuras genéticas de las regiones variables de sus cadenas pesadas y livianas (10, 11, 22, 23).

En general, podría decirse que existen dos modelos de inmunización

transportador-hapteno que han logrado desarrollar una respuesta anti-ADN de estas características, contribuyendo a la dilucidación de los mecanismos desencadenantes de esta respuesta autoinmune en animales sin predisposición genética. Uno de estos modelos es el desarrollado por Marion (14, 20), en el cual se utilizó como proteína transportadora un péptido derivado de la proteína de extensión del carboxilo de la ubiquitina de *Trypanosoma cruzi* (péptido Fus1), el cual tiene la capacidad de unir ADN y es altamente inmunogénico. La inmunización de ratones normales con este complejo péptido: ADNdc resultó en la producción de anticuerpos con reactividad contra ADN simple y doble cadena, observándose incluso niveles bajos a moderados de proteinuria y depósitos glomerulares de IgG (rasgos típicos de LES) en algunos animales (14).

Por su parte, el grupo de Rekvig ha desarrollado un modelo en el cual postula la etiología viral de la autoinmunidad ligada a LES (7). En los trabajos de este grupo se demuestra que, en animales normales, la expresión in vivo de una sola proteína viral que une ADN, el antígeno mayor T del poliovirus, es suficiente para iniciar la producción de anticuerpos contra ADNdc, histonas y factores de transcripción eucarióticos como TBP y CREB (17, 18). Además, en sus trabajos se establece que los poliovirus (remanentes en estado latente en individuos sanos) son reactivados en pacientes con LES. En estos pacientes se encontraron altos títulos de anticuerpos no sólo contra antígeno T y ADN simple y doble cadena, sino también contra las proteínas TBP y CREB (factores de transcripción que suelen encontrarse físicamente unidos a nucleosomas) (18). En un trabajo de este grupo publicado recientemente se demuestra que la inmunización de ratones normales con un plásmido de expresión codificando una proteína de fusión entre el dominio de unión a ADN del receptor de glucocorticoide autólogo y una proteína heteróloga que no une ADN, proteína verde fluorescente o GFP, resulta en la producción de anticuerpos anti-ADN doble cadena (16). Basándose en estos resultados y en la capacidad del antígeno T de unirse tanto al ADN viral como a los nucleosomas celulares, los autores sugieren que el T-ag es capaz de actuar como proteína transportadora del ADN contenido en los complejos nucleosomales (hapteno), imprimiéndole así al ADN carácter inmunogénico (7, 16-18, 21). En base a todas estas evidencias, en este modelo se establece que la reactivación espontánea del poliovirus, con el requisito de la expresión del antígeno T, podría proveer las bases moleculares de al menos un camino de iniciación de autoinmunidad a ADN y otros antígenos asociados a nucleosomas.

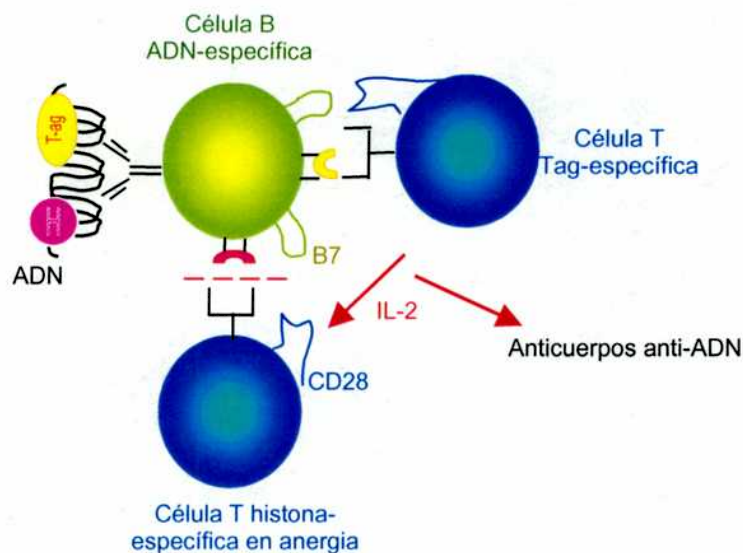


Figura 2: bases celulares y moleculares de la producción de anticuerpos anti-ADNdc inducida por el antígeno T. En el contexto de una infección productiva con el poliomavirus, la proteína viral T-ag unida físicamente a histonas a través de la formación de un complejo con nucleosomas, podría iniciar procesos que resultan en la producción de anticuerpos anti-ADN. Las células B ADN-específicas podrían unir el complejo nucleosoma: T-ag y, subsecuentemente, presentar péptidos derivados de T-ag a células T_H , debido a que expresan suficientes moléculas co-estimuladoras de señal. Subsecuentemente, células T autoinmunes histona-específicas presentes en el microambiente podrían inicialmente comenzar a dividirse en respuesta a las interleuquinas liberadas por las células T_H Tag-específicas. Luego, estas células T podrían comenzar a proliferar en una manera antígeno-específica si péptidos derivados de histonas son presentados por células B ADN o nucleosoma-específicas u otras APCs en presencia de suficientes moléculas co-estimuladoras. IL-2. Interleuquina 2. Reproducida de referencia (7).

El hallazgo de que complejos proteína: ADN o proteínas heterólogas con capacidad de unir ADN in vivo puedan inducir la producción de anticuerpos anti-ADN de características similares a los desarrollados en los modelos de autoinmunidad expuso que el mecanismo responsable de la inducción de esta respuesta autoinmune anti-ADN debía ser el reconocimiento del complejo proteína: ADN por parte de células B y T específicas. Así, se ha postulado que células T específicas para ciertas partes de la proteína del complejo inmunógeno debían producirse durante la respuesta inmune, provocando la activación de células B ADN-específicas. Posteriormente, estas células B activadas sufrirán expansión clonal y se diferenciarán en células productoras de anticuerpos anti-ADN (ver figura 2) (7, 14).

Desarrollo de anticuerpos anti-ADN doble cadena de alta afinidad

Si bien el agente etiológico y los mecanismos involucrados en el desarrollo de

anticuerpos anti-ADN doble cadena aún se desconocen, una gran cantidad de observaciones experimentales y descriptivas señalan que los anticuerpos anti-ADN simple cadena y doble cadena se originan por procesos celulares y moleculares comúnmente observados en respuestas inmunes T-dependientes clásicas (7). Esta conclusión está basada en el análisis de las estructuras genéticas de las regiones variables de los anticuerpos anti-ADN derivados tanto de ratones autoinmunes (10, 11, 22, 23) como de ratones normales en modelos transportador: hapteno (14, 17, 20, 21). Estos estudios demostraron que existe una marcada selección de residuos cargados positivamente en la región variable de la cadena pesada (V_H) de los anticuerpos anti-ADNdc, especialmente en la región determinante de la complementaridad (CDR) 3. De este modo, anticuerpos anti-ADN de baja avidez adquirirían la capacidad de unir ADNdc con alta afinidad a través de la acumulación de mutaciones somáticas que incrementan la cantidad de aminoácidos básicos, principalmente argininas (10, 24, 25).

Se ha postulado que la producción de anticuerpos anti-ADNdc de alta afinidad puede ser el resultado de dos caminos diferentes: 1, la expansión clonal de células B con una capacidad inherente de unir ADNdc; 2, la maduración somática de células B productoras de anticuerpos anti-ADNsc que adquieren la capacidad de unir ADNdc (figura 3) (7). En el primer caso, durante la maduración en la médula ósea serían seleccionadas células B vírgenes portadoras de receptores antigénicos codificados por genes V conteniendo codones para argininas. Estos codones inherentes pueden ser generados por eventos estocásticos conectados a re-arreglos somáticos de los genes VDJ durante la maduración de las células B (10, 11, 21). Así, células B con estructuras de regiones V con capacidad intrínseca de unir ADNdc formarían parte del repertorio de células B vírgenes en reposo. Normalmente, estas células B serían eliminadas, pero como se indica en la figura, algunas pueden escapar a la selección negativa o editar sus receptores, volviéndose susceptibles a la anergia (26). Finalmente, al ser estimuladas con ADN inmunogénico, algunas de estas células pueden sufrir expansión clonal y pasar a producir anticuerpos anti-ADNdc. El segundo camino quizás sea el camino más común. Generalmente, las células B específicas por ADNsc poseen una frecuencia menor de argininas distribuidas al azar en los CDR3 de sus genes V_H que los anticuerpos anti-ADNdc. Al ser estimuladas recurrentemente por ADN inmunogénico, estas células pueden adquirir la capacidad de unir ADNdc como consecuencia de un proceso de maduración de la afinidad desarrollado progresivamente a lo largo de la respuesta inmune (11, 14, 20, 21, 23).

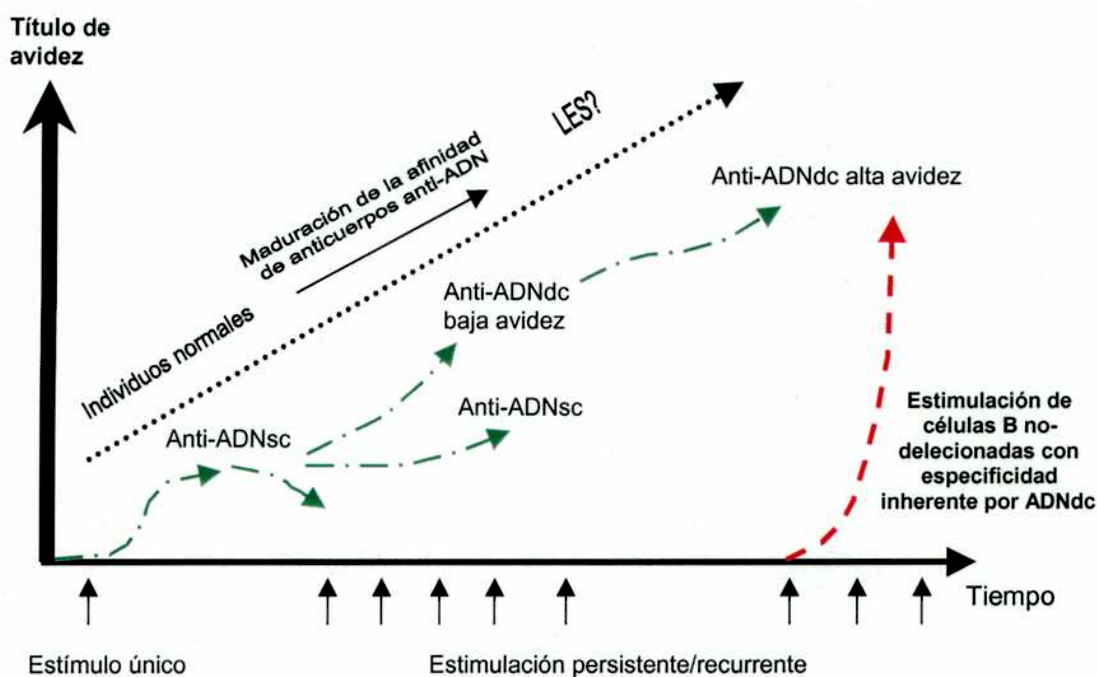


Figura 3: Modelo de caminos de activación de células B ADN-específicas resultante en la producción de anticuerpos anti-ADN doble cadena de alta afinidad. En un camino, células B con especificidad inherente por ADNdc que escaparon del proceso de selección negativa en la médula ósea pueden, ante el estímulo de complejos péptido: ADN inmunogénicos, expandirse y sufrir maduración de la afinidad, pasando a producir anticuerpos anti-ADNdc de alta afinidad. Alternativamente, ante estimulaciones recurrentes de complejos péptido: ADN en forma inmunogénica, células B con especificidad por ADN simple cadena pueden adquirir especificidad por ADNdc como consecuencia de la ocurrencia de mutaciones somáticas en las regiones variables de los anticuerpos desarrollada a lo largo de una respuesta inmune progresiva (reproducido de referencia (7)).

Debido a que la mayoría de los humanos pueden producir anticuerpos contra ADNsc, la maduración de la respuesta inmune para incluir la especificidad contra ADNdc podría, en teoría, ocurrir en cualquier individuo, siempre que la respuesta inmune sea inducida por ADN inmunogénico (independientemente de que el individuo tenga predisposición a desarrollar LES). Esta presunción está claramente demostrada en los trabajos de Marion y Rekvig, en los que la inmunización con complejos proteína: ADN en ratones normales resulta en la producción de anticuerpos anti-ADN de mamífero simple cadena y doble cadena (14, 17, 18, 20). Así, el potencial de las células B ADN-específicas de expandirse clonalmente y adquirir la capacidad de unir ADNdc es una propiedad inherente del sistema inmune de cualquier individuo normal. Estas evidencias junto con la demostración de que existe reactividad T contra nucleosomas en individuos normales (27), señalan que la autoinmunidad contra ADNdc per sé no está confinada a individuos con LES o predispuestos genéticamente a desarrollar esta enfermedad. Si bien

los modelos murinos de lupus y los modelos de inmunización transportador-hapteno han aportado información muy importante acerca de los mecanismos involucrados en la formación de anticuerpos anti-ADN doble cadena, un conocimiento más profundo sobre la especificidad fina y características de unión determinantes del carácter patofisiológico de estos anticuerpos aún es necesario.

El factor de transcripción E2

Los papilomavirus

Los papilomavirus son pequeños virus a ADN que infectan una gran variedad de huéspedes, incluyendo muchas especies de mamíferos. Más de cien cepas distintas son conocidas por infectar humanos, presentando todas ellas tropismo por epitelios en diferentes partes del cuerpo. Por ejemplo, el HPV-1 es el agente causal de las verrugas plantares. HPV-2, -4 y -7 inducen lesiones hiperproliferativas en el epitelio cutáneo de las manos (28). Se estima que la tercera parte de todos los tipos de HPV infectan específicamente el tracto ano-genital, siendo un subtipo de estos asociado al 90% de varios cánceres, mayoritariamente carcinoma cervical. Dentro de este último grupo se incluyen las cepas HPV-16, -18, -31 y -33, generalmente denominadas de alto riesgo. Contrariamente, las cepas -6 y -11 son consideradas cepas de bajo riesgo, dado que también infectan epitelios genitales pero no están asociadas al desarrollo de malignidades ano-genitales (29).

A pesar de los diferentes tipos de enfermedades hiperproliferativas que los HPVs producen, la organización genómica de todos los tipos de HPV es muy similar. El genoma viral es un ADN circular doble cadena de 7,9 kilo bases de longitud que contiene al menos 10 marcos de lectura abiertos, clasificados en tempranos o tardíos según su localización dentro del genoma. Los genes tempranos codifican para las proteínas virales regulatorias (E1, E2, E5, E6 y E7) y son expresados en las células infectadas en forma no productiva y en células transformadas. Las proteínas tardías (E4, L1 y L2) son expresadas solamente en células infectadas productivamente. La expresión de los genes virales tempranos está modulado por una región de 800 pares de bases (pb) llamada región de control a distancia, la cual es específica del tejido epitelial y es regulada por

señales fisiológicas. Esta región además comprende el origen de replicación y una serie de sitios de unión de la proteína E2 (29).

Los productos del gen E2 juegan roles fundamentales en la regulación de la transcripción génica y replicación virales. Las proteínas E2 mejor estudiadas son las del sistema bovino (BPV-1), en el cual se han encontrado tres especies diferentes de esta proteína. En esta cepa, la proteína entera puede actuar como activador o represor de la transcripción, dependiendo de la localización de sus sitios de unión dentro de la región promotora o activadora. Las otras dos proteínas, más cortas, contienen sólo el dominio de unión a ADN y actúan únicamente como represores de la transcripción (30, 31). En el papilomavirus humano, en cambio, las proteínas E2 parecen actuar sólo como represoras de la transcripción, exponiendo que las funciones biológicas de esta proteína varían entre las distintas cepas (29). Además de su rol como reguladora de la transcripción, E2 tiene funciones críticas en la replicación del ADN y el mantenimiento del genoma viral. Las proteínas E2 y E1 son fundamentales para el proceso de replicación. Si bien E1 es la única proteína viral directamente involucrada en este proceso, la unión de E1 al origen de replicación es estabilizada mediante su interacción con E2 y la unión de E2 a sus sitios de reconocimiento adyacentes al origen (29). E5, E6 y E7 son oncoproteínas que alteran el ciclo celular, ya sea anulando el efecto de reguladores negativos del ciclo (tales como p53 y Rb) o aumentando la actividad de receptores de factores de crecimiento. La función descontrolada de estas proteínas en muchos casos lleva a la desregulación del ciclo celular, causando incluso la transformación de las células (29, 32-34). La pérdida de la expresión de E2 ha sido implicada en el desarrollo de carcinomas inducidos por HPV. En la mayoría de las células de carcinoma humanas, tales como las células HeLa, el ADN del virus se encuentra integrado en el genoma de la célula, causando la expresión constitutiva de las oncoproteínas E6 y E7 (35). La importancia de la interrupción del gen de E2 en la desregulación de la expresión de las proteínas E6 y E7, y en la consiguiente contribución a la progresión carcinogénica, ha sido investigada por medio de la re-introducción del gen de E2 en células de carcinoma HPV-positivas. La expresión de la proteína E2 en estas células produjo la inhibición de la expresión de las oncoproteínas y la inhibición de la proliferación celular, estableciendo así el rol fundamental de E2 en el control de estos eventos (36, 37). La capacidad de E2 de realizar eficientemente estas actividades parece depender, casi exclusivamente, de su dominio de transactivación N-terminal, el cual sería necesario durante el proceso de transcripción activa, produciendo el desplazamiento de factores celulares del promotor E6/E7 y permitiendo la interacción de E2 con sus

secuencias de ADN blanco (38).

E2 y la respuesta inmune hacia el HPV

El cáncer cervical continua siendo la principal causa de muerte en mujeres de países en desarrollo. Si bien la detección temprana de la infección con HPV ha reducido la mortandad asociada a estos cánceres en el mundo occidental, lamentablemente hasta el presente no se cuenta con ningún tratamiento específico para este virus (29). Las investigaciones sobre inmunidad anti-HPV en humanos se ha centrado históricamente en las respuestas hacia las oncoproteínas E6 y E7 del HPV-16 y -18, debido, principalmente, a que la expresión de estas proteínas esta íntimamente asociada con la displasia causada por la infección de este virus. Sin embargo, es notable que las respuestas inmunes contra estas proteínas no están correlacionadas con las regresiones espontáneas (39, 40) o el estadio de las lesiones (41). Estos resultados sugieren que las respuestas inmunes contra las oncoproteínas E6 y E7 no son capaces de eliminar las células infectadas con HPV. Esto se explica en que la desaparición total del virus y la regresión espontánea de las verrugas ocurre frecuentemente en las lesiones de menor grado, mientras que las lesiones más avanzadas raramente lo hacen. Dado que E6 y E7 alcanzan su máximo nivel de expresión en las lesiones de mayor grado, no es extraño que la respuesta inmune contra estas proteínas sea insuficiente para revertir la lesión causada por la ya avanzada infección.

El estudio de la respuesta inmune humoral contra la proteína E2 de la cepa de alto riesgo HPV-16 en pacientes con distintos grados de neoplasia demostró que los niveles de IgA anti-E2 son elevados en pacientes con neoplasias de grado I (CIN I) o menores, y casi indetectables en pacientes con CIN III y carcinomas (42). Posteriormente, el seguimiento del patrón de expresión de E2 en preparados histológicos de muestras humanas indicó que el nivel de expresión máximo de E2 ocurría en las lesiones de menor grado (coilocitos y CIN I), disminuyendo progresivamente con la severidad de la lesión (CIN II y III). Curiosamente, en los carcinomas invasivos se observó una cierta restauración del nivel de expresión de E2, aunque su distribución difusa sugiere la ocurrencia de algún artefacto (43). Todas estas evidencias coinciden en que la respuesta contra E2 puede ser asociada con el estadio y progresión de las neoplasias cervicales, convirtiendo a E2 en un marcador muy significativo para el diagnóstico en pacientes de riesgo.

Hasta el presente se cuenta con muy poca información respecto a la naturaleza de la respuesta T contra la proteína E2 en individuos infectados con HPV. El hecho de haber encontrado anticuerpos de tipo IgA en pacientes con CIN (42) es indicativo de que una respuesta T E2-específica ha tenido lugar en estos pacientes en algún momento. En un primer estudio realizado con pacientes con CIN demostró que la respuesta T_H contra el dominio C-terminal de la proteína coincidía frecuentemente con el momento de eliminación del virus, sugiriendo que esta respuesta podría contribuir con la eliminación del mismo (44). En una serie de trabajos recientes, el potencial de la respuesta T E2-específica como agente terapéutico ha sido acreditado (45, 46). En uno de ellos se ha demostrado que la inoculación de ratones “nude” portadores de un carcinoma humano con un plásmido conteniendo el gen de E2 logró reducir el crecimiento tumoral eficientemente, a la vez de prologar entre 3 y 4 veces la expectativa de vida de los animales (46). Además, la utilización de este mismo sistema de vacunación en conejos portadores de un carcinoma de papilomavirus transplantable produjo una importante regresión tumoral en el 80% de los casos, lográndose incluso la desaparición completa del tumor (45). La capacidad de E2 de inducir una respuesta T tan robusta podría deberse a la eficiente presentación de péptidos de E2 por parte de las células dendríticas. En este sentido, se ha observado que células dendríticas presentadoras de péptidos derivados del dominio C-terminal de E2 pueden inducir la liberación de interferón γ por parte de las células T, además de inducir la actividad de lisis de los linfocitos T CD8⁺ (47). En conjunto, todas estas evidencias señalan que la proteína E2 es una molécula clave para el desarrollo de estrategias terapéuticas dirigidas al control y/o reversión de fenotipos malignos asociados al HPV.

Estructura de las proteínas E2

La proteína E2, como muchas otras proteínas reguladoras que unen ADN, tiene una estructura modular. Está compuesta por un dominio C-terminal de unión a ADN y un dominio N-terminal de transactivación conectados por una región altamente flexible. La estructura cristalina a alta resolución del dominio de activación de E2 de la cepa HPV-16 (48) ha demostrado que este dominio de 200 aminoácidos (aa) forma un dímero en el cual los residuos necesarios para la transactivación, altamente conservados, están localizados

en la interface de dimerización. Sobre la base de este hallazgo se ha postulado que la oligomerización mediada por el dominio de activación podría mediar la interacción de E2 con otros factores de transcripción virales o celulares, además de contribuir a la relocalización de factores de transcripción unidos a sitios distantes entre sí dentro del genoma viral. Si bien se cuenta con muy poca información estructural sobre la región que une a los dominios N- y C-terminal (40-200 aa), se sabe que a pesar de poseer una secuencia muy poco conservada entre las distintas cepas, es una región crítica para la estabilidad y el desarrollo normal de las funciones biológicas de esta proteína (49).

La estructura del dominio de unión a ADN de E2 (E2C) de varias cepas ha sido resuelta. Entre ellas se encuentran las estructuras cristalinas de las cepas de HPV de alto riesgo HPV-16, -18 y -31 (50-52), además de la causante de verrugas bovinas: BPV-1 (53). Estructuras de RMN de algunas de estas proteínas también se han reportado (BPV-1 y HPV-31, (54, 55)). El dominio C-terminal de E2 es el prototipo de una nueva clase de estructura de proteínas que unen ADN. Esta proteína forma un barril- β dimérico, en el cual cada subunidad contribuye con cuatro hebras β anti-paralelas, formando la mitad del barril (figura 4). La topología de cada subunidad es β_1 - α_1 - β_2 - β_3 - α_2 - β_4 . La hélice α_1 es la hélice de reconocimiento a ADN, comprendiendo todos los residuos involucrados en la interacción directa con la secuencia de ADN. Con la dimerización, las hebras β_2 y β_4 en las puntas de cada subunidad, participan en una red continua de puentes de hidrógeno, la cual resulta en el barril β de 8 hebras. La interface de dimerización es extensa, formada por los mencionados puentes de hidrógeno y una gran cantidad de contactos hidrofóbicos en el centro del barril β (49).

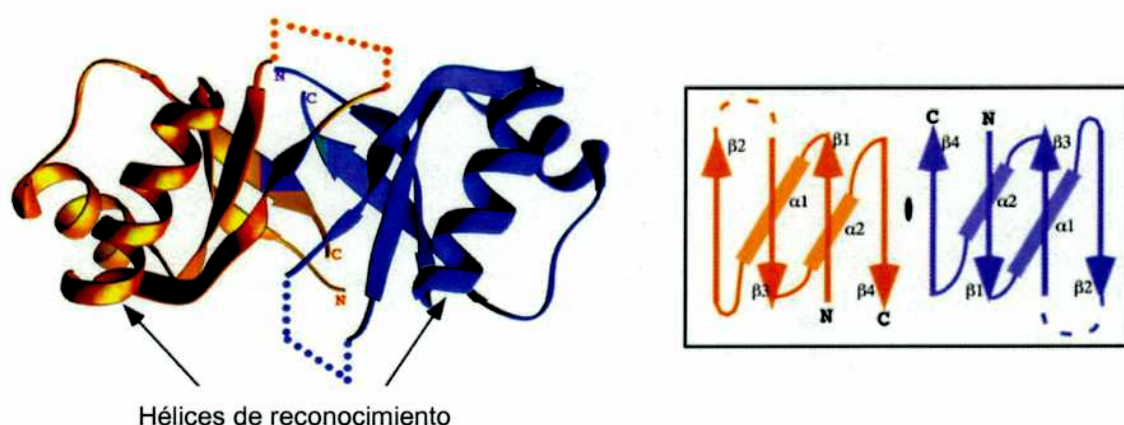


Figura 4: Diagrama de cintas del dominio de unión a ADN de la proteína E2 del HPV-18. Las dos subunidades (color dorado y lavanda) se asocian formando un barril de 8 hebras anti-paralelas. Las

regiones desordenadas están representadas por líneas punteadas. La topología de la proteína está esquematizada a la derecha. El barril β se formaría al curvar la figura hacia el observador, tal que las dos hebras de los bordes puedan formar puentes de hidrógeno entre ellas (reproducido de referencia (52)).

Las proteínas E2 de todas las cepas de papilomavirus unen la secuencia palindrómica consenso ACCgNNNNcGGT, normalmente denominada sitio de unión de E2 (los nucleótidos representados en letras minúscula indican que estas son bases preferidas pero no requeridas para el reconocimiento específico de E2). La región N_4 central tiene un largo de 4 bases absolutamente conservado, aunque la composición de su secuencia varía entre las distintas cepas (49). Dentro del genoma del virus se encuentran varios sitios de unión de E2. En las cepas de HPV de alto riesgo hay cuatro sitios ubicados en forma conservada, localizados inmediatamente río arriba del promotor que regula la expresión de los oncogenes E6 y E7 y de los genes de las proteínas E1 y E2. Las consecuencias biológicas de la interacción de E2 con sus sitios de reconocimiento varían dentro del contexto de su localización, incluyendo la represión de la transcripción, activación/desrepresión de la transcripción y replicación de ADN. Como resultado, el orden de ocupación de los distintos sitios parece representar un papel crítico en ciclo de vida del papilomavirus (49).

En todas las estructuras de complejos E2: ADN las hélices de reconocimiento se encuentran insertadas dentro de surcos mayores sucesivos del ADN, en contacto directo con los sitios consenso. En estas estructuras se observa, además, que el ADN se dobla hacia el surco menor (región central N_4). En ninguna de las estructuras E2: ADN reportadas (51-53) hay contactos visibles entre la proteína y los cuatro nucleótidos que comprenden el surco menor del ADN enfrentando la proteína (región N_4), explicando así la ausencia de definición de una secuencia consenso para esta región. Se ha postulado que las deformaciones que sufre el ADN al interaccionar con E2 serían necesarias para que las hélices de reconocimiento de la proteína realicen contactos simétricos con su sitio consenso (52, 53, 56). Varios mecanismos de torcimiento de ADN involucrando fuerzas electrostáticas han sido propuestos. En uno de ellos se postula que la neutralización asimétrica de cargas es suficiente para inducir el torcimiento del ADN. De este modo, cuando las cargas negativas de una cara del ADN son neutralizadas por el ligando, una fuerza neta torciendo al ADN hacia la superficie neutralizante sería ejercida (57). En otro mecanismo, las fuerzas electrostáticas ejercidas por la proteína (la cual tiene un potencial electrostático de superficie altamente positivo (58)), iniciarían el torcimiento activo del

ADN hacia la superficie positiva (59, 60). En todo caso, cualquiera sea el modelo que mejor explique esta interacción, aún una combinación de ambos, está claro que las fuerzas electrostáticas juegan un papel fundamental en la interacción específica de E2 con sus sitios de reconocimiento.

El complejo E2C: site 35

Si bien hasta el presente no se cuenta con la estructura cristalina de la proteína E2 de HPV-16 unida a ADN, varias evidencias experimentales señalan que, tanto el ADN como la proteína, sufren profundos cambios conformacionales al interaccionar (61, 62). En estos trabajos se utilizó como modelo de interacción E2: ADN al dominio C-terminal de E2 (E2C) y a un oligonucleótido de 18 pb correspondiente a uno de los cuatro sitios de reconocimiento de E2 dentro del genoma viral: el oligonucleótido site 35. Curvas de desnaturalización de E2C por agentes químicos han demostrado que el ADN tiene un gran efecto estabilizador sobre la proteína, volviéndola mucho menos sensible a los efectos del agente desnaturalizante. Interesantemente, esta estabilización está acompañada por los mencionados cambios conformacionales ocurridos en ambas macromoléculas (62). En la proteína, estos cambios conformacionales podrían representar cambios en varios motivos estructurales, involucrando tanto a las hélices α y hojas β , como a contribuciones de giros y aminoácidos aromáticos. Más aún, los autores de este trabajo concluyen que la unión de E2C al ADN causa un re-arreglo general de la estructura de la proteína, sin afectar la interface de dimerización, estando este re-arreglo concedido por la plasticidad característica de la proteína E2 (62). Además de la alta estabilidad del complejo E2C: site 35, su extremadamente lenta reacción de disociación (tiempo medio aproximado de 2 horas, (63)) sugiere que la formación de este complejo es una reacción casi irreversible. Juntas, estas dos características del complejo E2C: site 35, su alta estabilidad y prolongada vida media, podrían tener fuertes implicancias sobre las funciones biológicas de la proteína E2, reguladora clave de la transcripción y replicación del virus.

Como se describió anteriormente, la utilización de complejos proteína: ADN como modelos de inmunización transportador-hapteno han ayudado a comprender los mecanismos involucrados en la inducción de una respuesta autoinmune anti-ADN y su

relación con el desarrollo de la enfermedad LES. Sin embargo, aún quedan muchas incógnitas por resolver en este campo, principalmente relacionadas con las características o propiedades inmunogénicas del complejo proteína: ADN desencadenante de este fenómeno. Considerando este último punto como el paso crucial en el entendimiento de las bases moleculares subyacentes en el desarrollo de una respuesta anti-ADN, la utilización de un complejo proteína: ADN molecularmente definido como un nuevo modelo de inmunización transportador-hapteno sería crítico para el estudio de estos eventos. En este sentido, el hecho de contar con amplios conocimientos bioquímicos y estructurales sobre el complejo E2C: site 35 convierte a este complejo proteína: ADN en un candidato ideal para desarrollar estos estudios.

Agentes adyuvantes

Características generales

Los adyuvantes inmunológicos fueron originariamente descriptos como “sustancias que, utilizadas en combinación con un antígeno específico, son capaces de originar una inmunidad mayor que la del antígeno solo” (64). Los adyuvantes pueden ser utilizados para mejorar la respuesta inmune hacia un determinado antígeno de diferentes formas: incrementando la velocidad y duración de la respuesta inmune; modulando la avidez, especificidad e isotipo de los anticuerpos; estimulando la inmunidad mediada por células; promoviendo la inducción de la inmunidad de mucosas; etc. Todos estos efectos que los adyuvantes pueden ejercer en una respuesta inmune muchas veces implican la activación de varias cascadas complejas de efectores inmunes, de los cuales sólo algunos son relevantes para la inducción de una respuesta antígeno-específica (65). En general, los adyuvantes pueden mediar sus efectos por alguno de los siguientes mecanismos: incremento de la infiltración celular, inflamación y tráfico hacia el sitio de inyección; promoción del estado de activación de las células presentadoras de antígenos por medio del aumento las señales co-estimulatorias o de la expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH); aumento de la presentación antigénica o inducción de la liberación de citoquinas por efectos indirectos. En todo caso, el escaso conocimiento de los mecanismos de la acción de los adyuvantes con el que se cuenta hoy

en día ha impedido el diseño racional de nuevos compuestos adyuvantes (65).

Hasta el presente, los únicos adyuvantes ampliamente utilizados en vacunas humanas son el hidróxido de aluminio y el fosfato de aluminio. Si bien estos adyuvantes son muy efectivos para aumentar la respuesta de células T de tipo 2 (favoreciendo la respuesta humoral) son incapaces de inducir inmunidad mediada por células, incluyendo las respuestas de células T citotóxicas (66). Un adyuvante que es tradicionalmente conocido por su capacidad de inducir una respuesta inmune efectiva total es el adyuvante de Freund (67). Sin embargo, dado que su composición consiste en una emulsión de agua en aceite (conteniendo micobacterias), este adyuvante suele producir granulomas en el sitio de inyección, volviéndolo inaceptable para su utilización en vacunas (68). Una opción interesante es la utilización de un adyuvante derivado del lipopolisacárido de *Salmonella minnesota*, el monofosforil lípido A. Este adyuvante posee una composición de aceite en agua y puede utilizarse en combinación con Trealosa de Dicorimicolato y Escualeno (MPL® + TDM Adjuvant System, MPL). La naturaleza acuosa de este adyuvante facilita el pasaje de sus partículas desde el sitio de inyección hacia la linfa y nódulos linfáticos, reduciendo así la posibilidad de establecer una acumulación aceitosa en dicho sitio. No obstante, la ventaja más importante que presenta el adyuvante MPL es que el antígeno se adiciona a una emulsión pre-formada. Esta característica permite la reconstitución de antígenos inestables justo antes de la inmunización, a la vez de evitar la desnaturalización de la proteína durante la emulsión con el adyuvante (68) (ver más abajo).

Clases de adyuvantes y respuesta inmune

Hace 30 años se publicó el primer trabajo remarcando la importancia de conocer los efectos que los adyuvantes de composición agua en aceite, como el adyuvante de Freund (comúnmente utilizados en ese entonces), tienen sobre la estructura del antígeno (69). En ese trabajo se demuestra que la inmunización de ratones con lisozima emulsionada en el adyuvante de Freund resulta en una fuerte respuesta policlonal contra la proteína nativa y desnaturalizada. Por el contrario, en el suero de los animales inmunizados con lisozima en ausencia de adyuvante sólo se desarrolló una respuesta policlonal contra la forma nativa de la proteína (69). Posteriormente, el análisis comparativo de las características de la respuesta humoral inducida por distintos

adyuvantes ha demostrado que estos tienen un papel crítico sobre características particulares de la respuesta policlonal, tales como la concentración, título, avidéz e isotipo de los anticuerpos inducidos (70). Más aún, los adyuvantes pueden modificar substancialmente el patrón de reactividad de estos anticuerpos, modificando su capacidad de reconocer epitopes nativos. Así, mientras la inmunización de ratones con seroalbúmina humana o interleuquina-1 α (IL-1 α) emulsionadas en el adyuvante de Freund estimuló la producción de una gran proporción de anticuerpos dirigidos contra determinantes internos de la proteína, la reconstitución de estas mismas proteínas en emulsiones pre-formadas (tales como el MPL) resultó en la aparición de anticuerpos que reconocen, mayoritariamente, epitopes localizados en la superficie de la proteína. En estos último casos, la mayoría de los anticuerpos producidos poseían capacidad neutralizante (70). Todos estos resultados demuestran que los epitopes conformacionales del antígeno pueden perderse durante el proceso de emulsión, causando graves problemas a la hora de obtener anticuerpos que reconozcan epitopes biológicamente relevantes o inmunidad protectora. De todas estas evidencias surge como conclusión que la selección del adyuvante, por medio de una apropiada evaluación de la respuesta policlonal inducida, puede optimizar la producción de anticuerpos policlonales y monoclonales con las cualidades deseadas.

Objetivos

Objetivos

El objetivo de este trabajo es desarrollar un modelo de inmunización transportador-hapteno con un complejo proteína: ADN molecularmente definido: el complejo E2C: site 35. La alta estabilidad y prolongada vida media del complejo E2C: site 35, junto con la gran inmunogenicidad de la proteína E2C convierten a este complejo proteína: ADN en un modelo ideal para el estudio de los mecanismos involucrados en el desarrollo de una respuesta autoimmune anti-ADN en individuos no-predispuestos a generar autoinmunidad.

Los pasos seguidos para cumplir este objetivo fueron:

- Evaluar la influencia de la naturaleza del adyuvante en el patrón de reactividad de los anticuerpos inducidos durante la respuesta immune humoral.
- Estudiar el potencial inmunogénico del complejo E2C: site 35 preparado en distintas condiciones experimentales, evaluándose la respuesta policlonal anti-E2C, anti-complejo y anti-ADN inducidas en los animales inmunizados.
- Generar y caracterizar anticuerpos monoclonales contra la proteína E2C.
- Generar y caracterizar anticuerpos monoclonales contra el oligonucleótido site 35.

Materiales

y

Métodos

Materiales y métodos

Expresión y purificación de E2C

El dominio C-terminal de la proteína E2 del HPV-16, de 80 aminoácidos, fue sobre-expresado en forma recombinante en células *E. coli* BL21DE3 y purificado como una proteína dimérica y soluble (61). Brevemente, las células fueron crecidas en medio LB (triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L, NaCl 5 g/L y NaOH 1 mM) con 100 µg/ml de ampicilina hasta una densidad óptica (DO) a 600 nm = 0.5. Allí las células fueron inducidas con Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG) 0,2 mM e incubadas toda la noche a 37° C. Posteriormente, las células fueron centrifugadas 30 minutos a 3500 rpm y el pellet fue resuspendido en el 5% del volumen inicial en buffer de lisis (Tris-HCl 0,1 M pH 6,8, NaCl 0,6 M, 2-Mercaptoetanol (2-Me) 10 mM y EDTA 1 mM), sonicado a 0° C y centrifugado 15 minutos a 12.000 rpm. Estos pasos se repitieron dos veces para lograr una extracción total. El sobrenadante fue concentrado por una precipitación al 60% con (NH₄)₂SO₄ durante toda la noche a 4° C. Luego de la centrifugación, el precipitado fue resuspendido y dializado contra 100 volúmenes de Tris 50 mM pH 6,8, NaCl 0,6 M y 2-Me 5 mM. La muestra luego fue sembrada en una columna de afinidad de HyperD Heparina (BioSeptra) previamente equilibrada con buffer Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,6 M, 2-Me 2 mM a un flujo de 2 ml/min. Luego de lavar la columna con 5 volúmenes de buffer, la proteína retenida en la columna eluyó dentro de un gradiente lineal de NaCl, 0,6-2 M. Las fracciones que poseían una pureza mayor al 90% fueron unificadas y dializadas contra NaAc 25 mM pH 5,6, 2-Me 5 mM. Luego la muestra fue concentrada con un Centriprep-3 (Amicon) y se le agregó NaCl 0,4 M previo al pasaje por una columna de filtración molecular Superdex 75 (Pharmacia Biotech), en NaAc 25 mM pH 5,6, NaCl 0,4 M, 2-Me 5 mM. El pico mayoritario fue colectado y concentrado (PM=18 kDa). La pureza de la proteína fue mayor al 98%, evaluada por su corrida electroforética en un gel desnaturalizante. Como último paso se le agregó Ditioneitol (DTT) 10 mM a la muestra y se la volvió a dializar contra NaAc 25 mM pH 5,6, NaCl 0,4 M, DTT 1 mM, se alicuotó y congeló en nitrógeno líquido para almacenarla en condiciones de mayor estabilidad a -70° C. La concentración de la proteína se determinó por DO a 280 nm, utilizando un coeficiente de extinción de $4.194 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. El rendimiento total de las purificaciones fue de 15 mg/L de cultivo, aproximadamente.

Desnaturalización térmica de E2C

La desnaturalización de la proteína E2C se llevó a cabo incubando una solución 1 μ M de la proteína en buffer NaAc 50 mM pH 5,6 durante 1 hora a 85° C. Al finalizar la incubación, la muestra se centrifugó 15 min a 13.000 rpm y se tomaron espectros de fluorescencia intrínseca de triptófano de la proteína desnaturalizada por calor (85° C) y de la proteína sin tratar (85° C). La longitud de onda de excitación se fijó en 280 nm y el espectro de emisión se registró entre los 300 y 400 nm, utilizándose un espectrofluorómetro de luminiscencia Aminco Bowman serie 2. En todos los casos, la línea de base del buffer fue sustraída y la temperatura se mantuvo constante a $25 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$. La desnaturalización de la proteína fue evaluada como la disminución de la fluorescencia intrínseca de triptófano y el desplazamiento en el centro de masa hacia el rojo ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 10$ nm), según fue descrito previamente (71).

Péptidos de E2C

La proteína E2C fue digerida con la endonucleasa Lys-C durante 24 h a 20° C, y el producto de digestión fue posteriormente purificado por HPLC en una columna de fase reversa C-18 (Vaydac). Se aislaron 4 cuatro péptidos de longitudes variables cubriendo todo el largo de la proteína, se liofilizaron y re-disolvieron en buffer TBS. El mismo protocolo de purificación se empleó con los péptidos sintéticos (Biosynthesis Incorporated) correspondientes a los aminoácidos 337-348 (péptido SEW: NH₂-SEWQRDQFLSHD-OH) y 349-358 (péptido KIP: NH₂-KIPKTITVST-OH) en la secuencia de E2C. Los mismos se cuantificaron por DO a 280 nm utilizando el coeficiente de extinción del triptófano de $5600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Preparación de oligonucleótidos

El oligonucleótido site 35 de 18 pb corresponde a la secuencia de uno de los cuatro sitios de unión a ADN de la proteína E2 dentro del genoma del virus HPV-16. La secuencia de la cadena A del oligonucleótido sintético site 35 (IDT) es: 5'-GTAACCGAAATCGGTTG-3' (el sitio consenso de E2 está subrayado). La concentración del oligonucleótido simple cadena fue calculada considerando que un ADN simple cadena de $\text{DO}_{260\text{nm}}=1,0$ corresponde a 33 $\mu\text{g/ml}$. El apareamiento de hebras para obtener el oligonucleótido doble cadena se realizó mezclando cantidades iguales de los oligos (hebras A y B) en buffer Bis Tris-HCl 10 mM pH 7,0, NaCl 0,2 M, incubando 5

minutos a 95° C y enfriando lentamente hasta 25° C en 16 horas. El mismo procedimiento fue utilizado para preparar otros oligonucleótidos doble cadena. El ADN site 35 fluoresceinado (FITC-site 35) contiene una molécula de isotiocianato de fluoresceína (FITC) en el extremo 5' de la cadena B unida a través de una cadena de 6 carbonos. El ADN site 35 biotinilado (Bio-site 35) contiene una molécula de biotina unida al extremo 5' de la cadena A. El ADN site 35 rodaminado (Rho-site 35) contiene una molécula de rodamina unida al extremo 5' de la cadena A. Otros oligonucleótidos utilizados son: site 7450 (18 pb), correspondiente a otro sitio de unión de E2 dentro del genoma del HPV-16; ARC, secuencia específica del operador para el represor de Arc (21 pb); CRE, elemento de respuesta al AMPc (18 pb); EBNA, sitio de unión del antígeno nuclear del virus Epstein-Barr (18 pb); V_H ratón, secuencia al azar del gen que codifica la parte variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina (18 pb); HPV-16 2300, secuencia al azar del genoma del HPV-16 (18 pb).

Marcación del oligonucleótido site 35 con ATP $\gamma^{32}\text{P}$

La reacción de marcación del oligonucleótido doble cadena de 18 pb con fósforo radiactivo se realizó por intercambio del fosfato γ terminal del ATP radiactivo al extremo 5'-OH del ADN utilizando la enzima T4 polinucleótido quinasa. La mezcla de reacción fue: 4 picomoles de site 35 con la enzima (20 U, aproximadamente) y 1 μl de ATP $\gamma^{32}\text{P}$ (act. específica > 3000 Ci/mmol) en el buffer de la enzima. La reacción se llevó a cabo a 37° C durante toda la noche, en un volumen final de 20 μl . Luego, la mezcla de reacción se sembró en una columnita de filtración molecular Sephadex G-25 en buffer Tris 50 mM pH 7,5, NaCl 0,2 M y se recolectaron fracciones de 150 μl . En este caso, el oligonucleótido eluye primero de la columna, separándose del ATP $\gamma^{32}\text{P}$ libre. Finalmente se midió la reactividad de cada fracción en un contador de centelleo (Liquid Scintillation Counter Wallac).

Complejos E2C: site 35

Mezclas estequiométricas equimolares de E2C:site 35 fueron concentradas en un buffer de alta fuerza iónica (NaAc 25 mM pH 5,6, NaCl 0,6 M, DTT 10 mM). Los complejos proteína: ADN utilizados en los planes de inmunización fueron preparados de la siguiente manera:

- Complejo no incubado (NI-CX): preparación fresca del complejo E2C: site 35.

- Complejo incubado corto tiempo (CT-CX): complejo en una concentración de 6 mg/ml incubado durante 7 días en condiciones de cristalización previamente establecidas para este complejo proteína: ADN. Esto es, por equilibrio contra PEG (polietilenglicol) 8000 10%, NaCl 0,6 M, cacodilato de sodio 0,1 M pH 6,5, CaCl₂ 10 mM y DTT 10 mM, utilizando la técnica de difusión en gota colgante.
- Complejo incubado largo tiempo: (LT-CX): complejo en una concentración de 16 mg/ml incubado durante 30 días en condiciones de cristalización similares a las del complejo CT-CX.

Protocolos de inmunización

Se realizaron dos protocolos de inmunización con la proteína E2C. En uno de ellos se utilizó como adyuvante una emulsión no viscosa de aceite en agua (2% de escualeno), MPL[®] + TDM Adjuvant System (MPL, Sigma). La proteína fue diluida en TBS (Tris-HCl 25 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M) y emulsionada en el adyuvante (plan E2C/MPL). En el otro protocolo, se utilizó el adyuvante de Freund (plan E2C/FA), una emulsión de agua en aceite (85% de aceite de parafina). En ambos casos, cada ratón recibió 16 µg de proteína por vía intraperitoneal (IP). Las segundas y terceras inmunizaciones fueron administradas en forma IP cada 20 días con dosis similares. En el caso del plan E2C/FA, la segunda y tercera inmunización se realizaron con adyuvante de Freund incompleto. Las inmunizaciones que utilizaron al complejo E2C: site 35 como antígeno fueron realizadas en un modo similar. Todos los ratones recibieron 25 µg de las diferentes mezclas del complejo proteína: ADN (NI-CX, CT-CX, LT-CX, descritas anteriormente), emulsionadas en MPL. En todos los casos, el desafío final con el antígeno consistió de una inyección IP de 20 µg de E2C o de una preparación fresca del complejo proteína: ADN, según el caso, disuelto en TBS cuatro días antes de la fusión de células somáticas. En todos los planes de inmunización realizados se utilizaron ratones BALB/c de 6 semanas de edad, distribuidos en lotes de 5 animales por grupo.

Obtención de anticuerpos monoclonales (AcMos)

Para la obtención de hibridomas productores de anticuerpos monoclonales, se extrajeron células de bazo de los ratones inmunizados que presentaban mayor título contra su antígeno específico. La extracción se realizó en forma aséptica, por incisión en la región dorsal de animales previamente sacrificados por dislocación cervical. La

suspensión de esplenocitos se realizó en medio RPMI-1640 (Gibco) desmenuzando el bazo con tijera y posterior homogeneizado con “potter”. La suspensión así obtenida se filtró por un tamiz de 60-80 mallas/pulgada, para eliminar agregados y restos de tejido conectivo. Las células se lavaron con RPMI por centrifugación a 400 g durante 10 min y se resuspendieron a una concentración adecuada para su hibridización. El recuento celular se realizó contando células en la cámara de Neubauer, por dilución de una alícuota de la suspensión en solución de Turk (ácido acético 3% en agua).

Para la fusión se eligieron las células de mieloma no secretorio de cadenas de inmunoglobulinas NSO (72), isogénico con los ratones inmunizados. Las células provenientes de un cultivo en fase de crecimiento logarítmico se lavaron por centrifugación a T amb durante 5 min a 400g. La viabilidad celular se determinó por tinción con Azul de Trypan, llevando las células a la concentración deseada en medio RPMI. La fusión celular se realizó por medio del método de hibridización de células somáticas descrito por Galfré y Milstein (72). En pocas palabras, se mezclaron 10^8 células de bazo con $1-5 \times 10^7$ células de mieloma en un tubo cónico de 50 ml y se centrifugaron a T amb durante 10 min a 400g. Luego se descartó el sobrenadante y al sedimento celular se le agregó 1 ml de Polietilenglicol 3350 (PEG 3350) al 50% en RPMI precalentado a 37 °C. El PEG se añadió en el lapso de 1 min con agitación suave y constante. Luego, a esta mezcla se le agregaron 9 ml de RPMI en un período de 3 min con agitación suave y se centrifugó a 400g durante 2 min. Finalmente, las células se resuspendieron en medio selectivo HAT (hipoxantina aminopterina timidina, Gibco) y se distribuyeron en 4 placas de 24 pocillos, a razón de 1 ml de suspensión celular por pocillo. Como control se dejaron 2 pocillos con células de NSO en este mismo medio. Las células se cultivaron en una estufa con atmósfera controlada al 5% de CO₂ hasta alcanzar una densidad suficiente para evaluar la presencia de anticuerpos en el sobrenadante de cultivo. Los cultivos de hibridoma productores de inmunoglobulinas (IgGs) anti-ADN y anti-E2C específicas fueron detectados por medio de ensayos de actividad por ELISA. Los cultivos positivos fueron clonados por dilución límite para asegurar la monoclonalidad de la línea e isotipados por ELISA utilizando antisueros isotipo-específico comerciales. Los hibridomas productores de anticuerpos monoclonales de interés fueron expandidos en cultivo y congelados en suero fetal bovino 10% DMSO en N₂ líquido para criopreservar a largo término las líneas celulares.

Purificación de los anticuerpos y Fabs

Para la producción de IgGs se inyectaron ratones BALB/c con 0,5 ml de pristane (Sigma) IP 15 días previos a la inoculación con las líneas de hibridoma ($0,5-1,5 \times 10^6$ células por ratón). A partir de las dos semanas de inoculadas las células, comenzó la recolección del líquido ascítico. Luego de cada extracción, la ascitis se centrifugó a 12.000 rpm durante 25 min descartándose los agrupados lipídicos y el precipitado, y se congeló a -70°C hasta finalizar la recolección. El líquido ascítico total recolectado fue precipitado al 50% con una solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ durante 2 horas 4°C . Luego se centrifugó y el precipitado fue resuspendido en buffer TBS y dializado contra 100 volúmenes de Na_3PO_4 40 mM pH 8,0. La fracción soluble de la diálisis fue sembrada en una columna de intercambio aniónico DEAE-Sephacel (Sigma), previamente equilibrada en el mismo buffer. En estas condiciones, las moléculas de IgG no son retenidas en la columna, siendo eluidas al aplicar el flujo continuo del mismo buffer. Como último paso de purificación de las IgG, la fracción eluida de la DEAE se concentró con un Centriprep-10 y se sembró en una columna de filtración molecular Superdex 200 (Pharmacia). El pico mayoritario, con una pureza $>98\%$ correspondió al de la IgG (PM=150 kDa). Para la obtención de fragmentos univalentes Fab, se digirió la IgG con la proteasa Papaína (Sigma). En cada caso, se pusieron a punto las condiciones de la digestión, variando levemente según el anticuerpo a digerir. En general, se utilizó una relación de masas de Papaína/IgG de 1/200 en presencia de EDTA 7 mM y 2-Me 7 mM incubando a 37°C durante 2 horas, con inversiones cada 20 min. El patrón de la digestión se analizó por una corrida electroforética en un gel desnaturalizante 12.5%. Luego, el producto de la digestión se dializó contra un buffer Na_3PO_4 17 mM pH 8,0 y se sembró nuevamente en una columna DEAE-Sephacel, previamente equilibrada en el mismo buffer. En este caso, el fragmento Fab es eluido de la columna mientras que el fragmento constante Fc queda retenido en la misma. Como último paso de purificación, la muestra se concentró y pasó por una columna de filtración molecular Superdex 75, resultando en un pico homogéneo. La concentración de IgG y Fab purificados se determinó por absorbancia a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción $1.5 \text{ ml/mg cm}^{-1}$ en ambos casos. El rendimiento promedio de las purificaciones fue de 4 mg de IgG y 1 mg de Fab por ml de líquido ascítico original.

Secuenciación de los anticuerpos

Con el fin de secuenciar los segmentos variables de los anticuerpos estudiados, se realizó una extracción y purificación de ARN mensajero (ARNm) a partir de 5×10^7 células de hibridoma utilizando el kit Fast-track (Invitrogen). Posteriormente, se sintetizó el ADN copia (ADNc) a partir de una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) reversa (RT-PCR) utilizando un primer de oligo(dT). Luego, el ADNc fue utilizado como molde para ser amplificado con primers degenerados diseñados para aparearse con secuencias de la región variable de la cadena liviana (V_L) y pesada (V_H) de inmunoglobulinas murinas (73). El producto de PCR fue posteriormente clonado en el vector pGEM[®]-T utilizando el kit TA cloning (Invitrogen) e introducido en células *E. coli* DH5 α por el método de transformación por CaCl_2 . Varios clones de cada cadena fueron secuenciados para asegurar la ausencia de artefactos surgidos de la reacción de amplificación por PCR. Los residuos de aminoácidos (aa) se clasificaron de acuerdo a la numeración de Kabat (74).

Marcación de ED5 IgG con peroxidasa

Con el fin de realizar analizar la presencia de actividad tipo ED5 en sobrenadantes de cultivo de hibridoma y revelar la presencia de E2C en ensayos de interacción por ELISA, se procedió a la conjugación de la IgG de este anticuerpo con peroxidasa siguiendo el protocolo de Tijssen et al (75). Primeramente, se hizo una rápida purificación de la enzima HRPO comercial (tipo VI; Sigma) para eliminar proteínas contaminantes o inactivas y aumentar la actividad específica de la enzima. La cantidad necesaria de HRPO (6 mg) fue disuelta en buffer Na_3PO_4 2,5 mM pH 7,6 y aplicada en una columna de intercambio iónico DEAE-Sephacel equilibrada en el mismo buffer (en estas condiciones la enzima eluye directamente de la columna). Luego, la fracción eluida de la columna fue concentrada a 10 mg/ml en buffer Na_3PO_4 10 mM pH 7,2, NaCl 0,15 M para su posterior oxidación con mNaIO_4 . Según el protocolo de Tijssen, la concentración óptima de NaIO_4 debe ser entre 4-8 mM para obtener una eficiencia de conjugación cercana al 95%. Se incubó entonces la enzima con una solución 8 mM de mNaIO_4 durante 20 min en oscuridad (al progresar la reacción se observa que el color de la muestra vira del color marrón al verde). Inmediatamente luego de la incubación, la muestra se sembró en una columnita de filtración molecular Sephadex G-25 en el mismo buffer que el utilizado para la DEAE. En este caso, la enzima oxidada eluye primero de

la columna y se concentra nuevamente a 10 mg/ml. La IgG de ED5 a ser conjugada (3 mg) se concentró a 10 mg/ml en buffer Na_2CO_3 0,2 M pH 9,6 y se incubó durante 2 h con la enzima HRPO, previamente dializada en buffer Na_2CO_3 , en una relación 1:1 v/v (relación molar IgG: HRPO, 1:3,75). Este paso se hizo en presencia de resina Sephadex G-25 seca (relación 1/6 p/p) para aumentar la velocidad de reacción y disminuir la concentración de periodato presente. Luego de las 2 horas de incubación, se centrifugó la muestra y se estabilizó la base de Schiff intermediaria con el agregado de 3/20 volúmenes de NaBH_4 5 mg/ml en NaOH 0,1 mM dejando equilibrar durante 1,5 horas. Como paso adicional de purificación, la muestra se dializó contra buffer Tris-HCl 20 mM pH 8,5 y se sembró en una columna de intercambio aniónico Mono Q HR 5/5 (Pharmacia) previamente equilibrada en el mismo buffer. La HRPO libre en exceso eluyó en el V_0 de la columna y el complejo anticuerpo:HRPO eluyó dentro de un gradiente lineal de NaCl 0-1 M. Este pico fue posteriormente concentrado, diluido al 50% con glicerol, alicuotado y guardado a 4° C. El título del HRPO-ED5 a utilizar fue posteriormente determinado por ELISA indirecto utilizando E2C como antígeno (ver más abajo).

Marcación de ED5 Fab con FITC

Con el fin de determinar la estequiometría de unión y la constante de disociación de la interacción ED5: E2C, se procedió al marcado de fragmentos Fab del anticuerpo con FITC siguiendo un protocolo ya establecido (76). Brevemente, se preparó una solución de anticuerpo 2 mg/ml (1,4 mg de proteína) en buffer Na_2CO_3 0,1 M pH 9 y se la incubó con una solución 1 mg/ml de FITC (en dimetil sulfóxido, DMSO). Se agregaron 50 μl de fluoróforo por ml de anticuerpo muy lentamente y se dejó reaccionar durante 1 h a 4° C en oscuridad. La reacción se detuvo por el agregado de NH_4Cl (50 mM_f) y posterior equilibrado durante 2 h a T amb. La separación del anticuerpo de la FITC libre se realizó por medio de una filtración en Sephadex G-25. Como paso adicional de purificación, la muestra recolectada de la columna se sembró en una columna de intercambio catiónico mono S (flujo 1 ml/min, buffer Mes 50 mM pH 5,5) de la cual eluyó dentro del gradiente de NaCl aplicado (0-1 M). Finalmente, se midió la DO de la muestra a 280 y 495 nm (longitud de onda en la cual la FITC tiene absorción máxima) y se calculó la concentración del ED5-FITC aplicando la siguiente fórmula:

$$\text{Abs proteína}^* = \text{Abs 280 nm} - \text{Abs 495 nm} \times \text{FC}$$

Siendo el factor de corrección $FC = \text{Abs } 280 \text{ nm FITC libre} / \text{Abs } 495 \text{ nm FITC libre} = 0,2$

Biotinilación del Fab ED15

Con el fin de determinar la estequiometría de la interacción ED15: E2C por medio de un ensayo de captura en ELISA, se marcaron 100 µg de fragmentos Fab del anticuerpo anti-E2C ED15 con el reactivo de biotinilación de aminas primarias Biotina disulfuro N-Hidroxisuccinimida ester (Sigma), utilizándose una relación molar reactivo: Fab 5:1. La reacción se desarrolló en 60 min a T amb. Posteriormente, se realizó una microdiálisis de 18 h a 4° C para eliminar el exceso de agente reactivo libre y se diluyó el anticuerpo biotinilado en 50% de glicerol. El título de ED15 biotinilado a utilizar fue posteriormente determinado por ELISA de captura utilizando como antígeno y la IgG del ED23 para evaluar reactividad anti-E2C (ver más abajo).

Ensayos de ELISA

Diseño general: todos los ensayos de ELISA fueron realizados en placas de poliestireno de 96 pocillos (Maxisorp, Nunc) sensibilizadas con los diferentes antígenos en TBS, salvo especificaciones particulares, y bloqueados con seroalbúmina bovina (BSA) 1% en TBS (BSA/TBS). Los sueros o líquidos ascíticos de los ratones fueron diluidos en BSA/TBS y su reactividad fue revelada por incubación con anticuerpos policlonales anti-Fc (Accurate), o anti-IgM (ICN) de ratón conjugados a peroxidasa diluidos en BSA/TBS. La reactividad tipo ED5 en los sobrenadantes de cultivo de los hibridoma fue evaluada usando la IgG del anticuerpo ED5 conjugada a peroxidasa (peroxidasa de rabanita tipo VI, Sigma). En cualquier caso, el color de la reacción se midió a 492 nm en un lector de ELISA (Σ 960 Metertech Inc., Taiwan). Salvo indicaciones particulares, todas las incubaciones fueron de 60 min a T amb y las determinaciones se realizaron por duplicado.

Para la sensibilización de la placa de ELISA se utilizaron los siguientes antígenos: E2C, 0,5 µg/pocillo; E2C desnaturalizada térmicamente, 0,5 µg/pocillo en NaAc 50 mM pH 5,6; péptidos de E2C, 1 µg/pocillo; mezclas estequiométricas del complejo E2C: site 35, 0,5 µg/pocillo; oligonucleótido doble cadena site 35, 1 µg/pocillo; ADN timo de ternera, 1 µg/pocillo; Fabs, 1 µg/pocillo; Estreptavidina, 1 µg/pocillo. En el caso de los ELISAs sensibilizados con ADN solo, las placas se incubaron toda la noche a 37° C (produciéndose la evaporación de la solución) para lograr una mejor adsorción del ADN.

Reactividad tipo ED5 en sobrenadantes de hibridoma: en el ensayo de actividad tipo ED5 en sobrenadantes de hibridoma se sensibilizó la placa con la proteína E2C. Luego del bloqueo, se incubaron juntos el sobrenadante de cultivo y el anticuerpo ED5-HRPO en una dilución previamente establecida por ELISA indirecto. Se consideró como positivo aquellos sobrenadantes que lograron inhibir la unión del conjugado al antígeno sensibilizado en la placa, produciendo una disminución de la DO a 492 nm mayor al 90% con respecto a la absorbancia de los sobrenadante de células de mieloma NSO.

ELISAs de captura: las placas se sensibilizaron con el Fab del AcMo ED5 (1 µg/pocillo) o (1 µg/pocillo) en TBS durante 60 min. Luego del bloqueo, a la placa sensibilizada con Estreptavidina se les agregó una solución de Fab ED15 biotinilado durante 20 min (dilución 1/800 en BSA determinada previamente, ver más arriba). Posteriormente al agregado de E2C (5 ng/pocillo en BSA/Tween 20 durante 60 min), la placa se incubó con 1 µg de cada una de las IgGs de los AcMos anti-E2C durante 60 min más. En los pocillos inmovilizados con el Fab ED5, la adición de E2C se hizo en presencia de 0,3 M NaCl para reducir su pegado inespecífico a la placa. En ambos casos la reactividad IgG se reveló utilizando un anticuerpo policlonal anti-Fc de IgG conjugado a peroxidasa (ver más abajo). La reactividad IgG medida en los pocillos sensibilizados con el Fab de un anticuerpo no-relacionado fue utilizada como blanco.

Formación del complejo ternario anti-ADN: site 35: E2C: se incubaron mezclas estequiométricas 1:1 del complejo E2C: Bio-site 35 (20 nM) con los anticuerpos ED10 y ED84 IgG en concentraciones crecientes (0-100 nM sitios de unión), durante 30 min a T amb. El volumen de incubación fue de 300 µl en buffer BSA/TBS/Tween/DTT. Luego se colocaron 50 µl/pocillo de la mezcla en una placa previamente sensibilizada con (1 µg/pocillo) y se dejó incubando durante 15 min. Posteriormente, se utilizaron como segundo anticuerpo el conjugado anti-Fc de ratón y el anticuerpo ED5-HRPO, incubándose en paralelo. De esta manera se evaluó en simultáneo la presencia de anticuerpo anti-ADN y de la proteína E2C unidos al oligonucleótido Bio-site 35 retenido en la placa de ELISA. Luego del revelado, a cada pocillo se le sustrajo la absorbancia correspondiente al pocillo sin oligonucleótido o sin E2C, según corresponda. Unión 100% ED5-HRPO, corresponde al pocillo sin el agregado de IgG anti-ADN. Unión 100% anti-Fc corresponde al pocillo sin agregado de E2C en la máxima concentración de

IgG anti-ADN utilizado.

Determinación de la constante de disociación: se realizaron ensayos de ELISA cuantitativo para la determinación de la constante de disociación en el equilibrio (K_D) de la interacción anti-ADN: site 35 y de los complejos ternarios anti-ADN: site 35: E2C, acorde a las premisas establecidas previamente por Friguet et al (77) (ver apéndice). Las placas de ELISA fueron sensibilizadas con (1 μ g/pocillo en TBS) durante una hora. Luego del bloqueo, se agregaron 5 ng/pocillo de Bio-site 35 ADN por 15 min (concentración finalmente utilizada en el ensayo). Simultáneamente se incubaron 300 μ l de las IgGs de ED10 y ED84 (0,8 nM de IgG) con concentraciones crecientes del ADN site 35 sin biotinilar durante 120 min. Posteriormente, 50 μ l de cada mezcla fue incubada en la placa durante 60 min. Todas las diluciones se realizaron en BSA 1%, DTT 1 mM, Tween 20 0,05% en TBS a T amb. El mismo protocolo se siguió para la determinación de la K_D de la interacción de los anticuerpos anti-ADN contra el complejo E2C: site 35, excepto que como antígeno libre se utilizó el complejo proteína: ADN 1:1 previamente incubado 10 min.

Utilizando esta técnica también se intentó determinar la K_D de la interacción anti-E2C: E2C. Para ello, se realizaron distintos eventos de sensibilización con E2C como antígeno a inmovilizar, pero en ningún caso se logró cumplir con el segundo requisito del método (deben quedar retenidas en la fase sólida menos del 10% de las moléculas de anticuerpo totales, ver apéndice), probablemente debido a la gran tendencia a agregar que presenta esta proteína. Dado este fenómeno, se intentó disminuir el desplazamiento de las moléculas de anticuerpos hacia la fase sólida modificando la cantidad de E2C presente en esa fase. Para ello, se diseñó un ELISA en el que E2C sea capturada a través del fragmento Fab del AcMo ED5 previamente inmovilizado en la placa. Aunque también en este caso se realizaron varios intentos, tampoco pudo ponerse a punto el ensayo.

Efecto de la sal en la interacción anti-ADN: site 35: con el fin de analizar el efecto de la sal en la interacción anti-DNA: site 35, se incubaron distintas mezclas de los complejos E2C: Bio-site 35 (10: 50 nM), ED10: Bio-site 35 (50: 250 nM) y ED84: Bio-site 35 (20: 100 nM), en presencia de concentraciones crecientes de NaCl (0.15-1 M) durante 10 min a T amb. Las relaciones molares de los distintos complejos proteína: ADN, así como las concentraciones de cada reactante, fueron puestos a punto previamente. El volumen de

incubación fue de 200 μ l en buffer base BSA/TBS/Tween/DTT. Se colocaron 50 μ l/pocillo de cada mezcla en una placa de 96 pocillos previamente sensibilizada con Estreptavidina (1 μ g/pocillo) y se dejó incubando durante 15 min. En el caso de los pocillos incubados con E2C:Bio-site 35, la placa además se incubó durante 60 min con el anticuerpo ED5 (50 ng/pocillo). Finalmente, para detectar la presencia de IgG anti-ADN o ED5, la placa se incubó con el conjugado anti-Fc de ratón. Luego del revelado, a cada pocillo se le sustrajo la absorbancia correspondiente al pocillo sin oligonucleótido.

Ensayos de espectrometría

Espectros de emisión: todos los espectros de fluorescencia intrínseca de triptófano se registraron en un espectrofluorómetro Aminco Bowman Serie 2. La longitud de onda de excitación fue fijada en 280 nm para los espectros de E2C y a 295 nm en el caso de los anticuerpos anti-ADN. En ambos casos, la emisión de fluorescencia se registró entre los 310 y 410 nm y cada espectro fue corregido por el espectro del buffer solo. Todas las incubaciones se realizaron a $25 \pm 0.1^\circ \text{C}$ en un volumen de 250 μ l.

Para los espectros de E2C se utilizó una solución 1 μ M de la proteína en buffer NaAc 50 mM pH 5,6. La desnaturalización de E2C se llevó a cabo por incubación de la proteína a 85°C durante 1 h y posterior centrifugación a 13000 rpm durante 15 min. La desnaturalización de la proteína se evaluó por la disminución de la fluorescencia intrínseca y el desplazamiento del centro de masa hacia el rojo ($\Delta\lambda_{\text{max}} = 10 \text{ nm}$) (71).

En el caso de los espectros de los complejos Fab: site 35, las soluciones de anticuerpos (2 μ M) y del oligonucleótido site 35 (2,4 μ M) se preincubaron 15 min a T amb antes de realizar la medición.

Determinación de la constante de disociación:

Interacción ED5: E2C y ED5: CX: las titulaciones del Fab ED5 conjugado a fluoresceína (FITC-ED5) con concentraciones crecientes de la proteína E2C libre y del complejo E2C:site 35 se llevaron a cabo fijando la longitud de onda de excitación en 490 nm y registrando la emisión a los 520 nm, permitiendo 5 min de equilibrado entre mediciones. Una vez determinada la estequiometría de unión Fab ED5: E2C, en las titulaciones realizadas para determinar la K_D ED5: E2C y ED5: CX, la concentración de E2C fue corregida de acuerdo al número sitios de combinación con el anticuerpo (2 sitios). El complejo proteína: ADN se preparó en una relación molar 1:1,1 y se trabajó en

un rango de concentraciones 10 veces por encima del valor de la K_D del complejo (0,2 nM) (61). La dilución máxima al final del ensayo fue del 20%, y la fluorescencia fue corregida acordemente. Las mediciones se realizaron en buffer Bis Tris-HCl 50 mM pH 6,0, 0,2 M NaCl, 1 mM DTT a $25 \pm 0.1^\circ \text{C}$ en un volumen de 700 μl . La dilución máxima al final del ensayo fue del 20%, y la fluorescencia fue corregida acordemente.

Para la determinación de la constante de disociación en el equilibrio los datos fueron ajustados a un modelo simple de unión con una estequiometría de 1:1, descrito por la siguiente ecuación:

$$[\text{Fab:L}] = 0,5 \Delta F ([L] + [\text{Fab}] + K_D) - \left(([L] + [\text{Fab}] + K_D)^2 - (4[L][\text{Fab}]) \right)^{0,5} \text{ Siendo:}$$

- L, la proteína E2C libre o el complejo E2C: site 35

- ΔF , diferencia en la señal de fluorescencia del Fab fluoresceínado libre y unido

- $[\text{Fab}]$ y $[L]$, concentraciones de Fab y L totales

- K_D , constante de disociación para la interacción Fab: E2C

Interacción anti-ADN: ADN: las titulaciones de fluorescencia intrínseca de triptófano de los Fab anti-ADN con distintos oligonucleótidos se llevaron a cabo fijando la longitud de onda de excitación en 295 nm y registrando la emisión a los 338 nm para ED10 y 339 nm para ED84. Todas las titulaciones se realizaron agregando pequeñas cantidades de una solución concentrada del ligando (ADN) a una cantidad fija de Fab, permitiendo 5 min de equilibrado en cada punto. Las cantidades de Fab empleadas variaron dentro de un rango de concentraciones (5-100 nM), dependiendo del oligonucleótido utilizado. La dilución máxima al final del ensayo fue del 20%, y la fluorescencia fue corregida acordemente. Las mediciones se realizaron en buffer TBS a $25 \pm 0.1^\circ \text{C}$ en un volumen de 700 μl . Sólo en los casos de titulaciones empleando concentraciones de proteína menores a 15 nM, el volumen se aumentó a 2,7 ml para lograr mayor sensibilidad.

Para la determinación de la constante de disociación al equilibrio, los datos fueron ajustados a un modelo simple de unión con una estequiometría de 1:1, descrito por la siguiente ecuación:

$$[\text{Fab: ADN}] = 0,5 \Delta F \left(([\text{ADN}] + [\text{Fab}] + K_D) - \left(([\text{ADN}] + [\text{Fab}] + K_D)^2 - (4[\text{ADN}][\text{Fab}]) \right)^{0,5} \right) \text{ Siendo:}$$

- ΔF , diferencia en la señal de fluorescencia intrínseca de triptófano del Fab libre y unido

- $[\text{Fab}]$ y $[\text{ADN}]$, concentraciones de Fab y ADN totales.

K_D , constante de disociación para la interacción Fab: ADN.

En las titulaciones realizadas para evaluar el efecto de la sal en la interacción anti-ADN: site 35, la concentración salina del buffer TBS (0,15 M NaCl) se incrementó hasta llegar a la concentración deseada (ej, 1 M NaCl).

Ensayos de movilidad electroforética

Interacción de los AcMos anti-ADN con FITC-site 35: se prepararon distintas mezclas de una solución 3 μM del oligonucleótido FITC-site 35 de 18 pb con las siguientes proteínas: E2C (3 μM), complejo E2C: Fab ED5 (3 y 6 μM , respectivamente), y con los fragmentos Fab de los anticuerpos anti-ADN ED10 y ED84 (6 μM cada uno). Las muestras se incubaron en buffer Bis-Tris-HCl 25 mM pH 7,0, NaCl 0,2 M, DTT 1 mM y glicerol 8% durante 30 min a T amb en un volumen final 20 μl . Al finalizar la incubación, las muestras se centrifugaron 10 min a 14.000 rpm y se sembraron 15 μl en un gel nativo de poliacrilamida 6%. El gel se separó utilizando el buffer Tris-HCl 25 mM pH 8,3, Glicina 190 mM a un voltaje de 5 V cm^{-1} ; el patrón de migración de bandas del DNA fluoresceinado se visualizó por transiluminación UV en un documentador de geles (UVP transiluminator system, GDS8000).

Formación de los complejos anti-ADN: site 35 revelado por Bromuro de Etidio: se prepararon distintas mezclas de una solución del ADN site 35 de 18 pb (3 μM) con fragmentos Fab de los anticuerpos anti-ADN (la máxima concentración empleada fue 4 veces mayor a la de ADN), incubando durante 30 min a T amb. Las muestras fueron preparadas en las mismas condiciones que en el punto anterior y sembradas en un gel nativo de poliacrilamida 6%. El gel se separó utilizando el buffer MOPS/Imidazol 100 mM pH 6,5 a un voltaje de 5 V cm^{-1} y se reveló por tinción con Bromuro de Etidio y posterior visualización de las bandas de ADN por transiluminación UV.

Inhibición de la formación del complejo E2C: site 35: se prepararon distintas mezclas de E2C (2,5 μM) con los diferentes anticuerpos anti-E2C (la concentración máxima de IgG empleada fue de 4 μM), y se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente. Con el fin de corregir la relación molar de proteína E2C y anticuerpo utilizada en el ensayo, el PM de la IgG fue considerado como 75 kDa (esto es, se dividió el PM de la IgG por el número total de sitios de combinación). Luego, se agregó el oligonucleótido FITC-site 35 (2,5 μM) y se dejó equilibrar durante 30 min más. Las condiciones en las

que se prepararon las muestras fueron iguales a las descritas anteriormente. Las condiciones de corrida electroforética y visualización de bandas fueron las mismas que en el caso de los complejos anti-ADN: FITC-site 35.

Análisis por biosensor

La utilización del biosensor nos permitió estudiar en tiempo real distintos procesos: el efecto de los AcMos anti-E2C sobre la formación del complejo E2C: site 35, la determinación de las constantes cinéticas y de equilibrio de complejos E2C: anti-E2C y el efecto de la sal en estas interacciones.

Principio operativos del IAsys: se utilizó el biosensor óptico de resonancia de espejos, IAsys plus Affinity Sensor (ThermoLabsystems). En la figura 5 se muestra la configuración y principios operativos del biosensor.

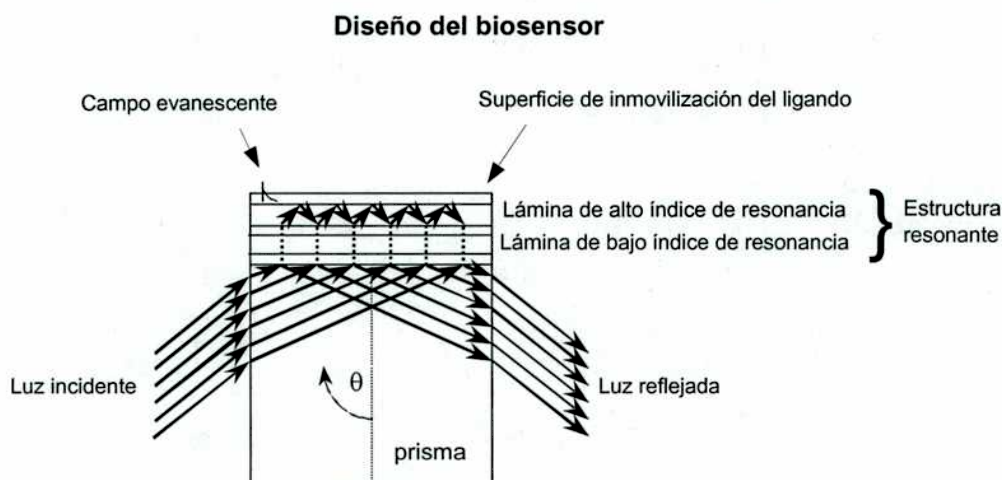


Figura 5: Diseño del biosensor óptico de resonancia de espejos IAsys plus.

En este sistema, la luz del láser incide sobre un prisma con distintos ángulos θ (se muestra un solo ángulo para mayor claridad), siendo todo ellos reflejados totalmente desde la lámina de bajo índice de acoplamiento. A un único ángulo (ángulo resonante), la luz incidente puede atravesar la capa de acoplamiento y propagarse a través de la lámina resonante, produciendo un campo evanescente. La intensidad del campo evanescente decae exponencialmente desde la superficie de inmovilización, siendo reducida a un tercio de su intensidad dentro de 100 nanómetros. Esto asegura que se registren sólo aquellas interacciones que ocurren dentro del campo que contiene al ligando

inmovilizado. Cualquier partícula de la muestra que entre al campo evanescente alterará el perfil del índice de refracción cercano a la superficie, cambiando el ángulo de resonancia. Esto llevará finalmente a un cambio en la señal del biosensor, expresada en arc.seg.

Efecto de los AcMos anti-E2C en la formación del complejo E2C: site 35: el efecto de los anticuerpos anti-E2C sobre la interacción en tiempo real de E2C con el oligonucleótido doble cadena site 35 fue evaluado en el biosensor. La inmovilización de estreptavidina (100 µg/ml en NaAc 10 mM pH 5,6) en la cubeta de matriz de carboximetildextrano fue llevada a cabo utilizando un protocolo de activación con (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida/N-hidrosuccinimida (EDC/NHS) ya establecido (Protocolo 1.1, manual de usuario Affinity Sensors). Luego de la conjugación, los grupos ésteres NHS sin reaccionar fueron inactivados con etanolamina 1 M. Luego de remover los restos de proteína no conjugados a la matriz con HCl 10 mM, se obtuvo una respuesta de 60 arc seg de proteína inmovilizada. Posteriormente, se agregaron 2,2 µl de Bio-site 35 en 50 µl de buffer (concentración final 5 µg/ml; Bis-Tris-HCl 25 mM pH 7,0, NaCl 0,2 M, DTT 1 mM) y se incubó durante aproximadamente 20 min, tiempo en el cual se alcanzó el equilibrio de unión. Luego del lavado, el cambio en la posición de resonancia observado fue de 10 arc seg. Dado que la interacción biotina-estreptavidina es considerada casi irreversible (constante de afinidad aproximada de $1 \times 10^{11} \text{ M}^{-1}$), puede asumirse que la fracción de oligonucleótido retenida luego del lavado y de la regeneración de la cubeta no cambiará a lo largo de las distintas corridas. Luego de establecer la concentración óptima de E2C a utilizar en el ensayo de inhibición (0,1 µM concentración final), se registró la respuesta de proteína luego de ser preincubada durante dos horas a T amb con concentraciones crecientes de los distintos AcMos. La unión de E2C al ADN biotinilado se midió durante 5 minutos, considerándose como respuesta la diferencia en unidades de resonancia arc seg entre t_0 y $t_{5\text{min}}$. En todos los casos, las muestras se prepararon diez veces más concentradas que la concentración final requerida y se realizó una dilución 1/10 en la cubeta para disminuir errores de inyección. El buffer utilizado en el ensayo fue Bis-Tris-HCl 10 mM pH 7,0, NaCl 0,2 M, DTT 1 mM y BSA 1%. Al principio de cada experimento, la curva de unión correspondiente a E2C sin preincubar con anticuerpo fue considerada como un control interno de la respuesta máxima. Como control positivo de inhibición se utilizó el oligonucleótido site 35 sin modificación.

Determinación de las constantes de disociación: las constantes de asociación (k_{as}) y disociación cinéticas (k_{dis}) y al equilibrio (K_D) de los distintos complejos antígeno: anticuerpo fueron determinadas por biosensor (ver apéndice). En todos los casos, se inmovilizaron los fragmentos Fab de los anticuerpos en una cubeta con matriz de carboximetildextrano según se describió en el punto anterior. Como resultado de la inmovilización se obtuvo una respuesta de 1000 arc para ED5, 300 arc seg para ED23 y de 78 arc seg para ED15. En todos los casos, para realizar los ensayos de unión, las muestras de ligando se prepararon diez veces más concentradas que la concentración final requerida. En las determinaciones de las constantes contra el complejo E2C: site 35, este se preparó en una relación molar 1:1,1 favoreciendo que toda la proteína se encuentre unida al oligonucleótido (el rango de concentración de complejo utilizado en estas determinaciones se encuentra por lo menos 10 veces por encima del valor de su constante de disociación: 0,2 nM). El buffer utilizado fue Bis-Tris-HCl 10 mM pH 7,0, NaCl 0,2 M, DTT 1 mM. Los datos fueron analizados usando el software FASTplot. La concentración de E2C como ligando fue corregida por la cantidad de sitios de unión de E2C a cada anticuerpo, según corresponda (2 sitios para ED5 y ED23 y un sitio para ED15). Los valores de K_D se calcularon a partir de la siguiente relación: $K_D = k_{dis}/k_{as}$. En el caso de la interacción ED23: KIP, la constante de disociación se determinó sólo al equilibrio debido a la baja señal que resultaba de la interacción del péptido con el Fab inmovilizado. Luego, la k_{dis} se calculó como el producto entre la K_D y k_{as} .

Efecto de la sal en la interacción E2C: anti-E2C: se analizó por biosensor el efecto de la sal en la formación del complejo E2C: Fab. Para ello, se prepararon distintas muestras de E2C (0,1 μ M) en concentraciones crecientes de NaCl (0,15-0,8 M) y se siguió la respuesta producida por el agregado de E2C sobre los Fab inmovilizados durante 4 min. Se consideró como % respuesta la diferencia en unidades de resonancia arc seg entre t_0 y t_{4min} .

Ensayos de unión por filtración en gel

La estequiometría de unión del complejo ED23: E2C fue determinada por ensayos

de filtración en gel. Muestras de 20 μ l con distintas cantidades de Fab ED23 (rango de 4-160 μ M) y una cantidad fija de E2C (40 μ M) fueron pre-incubadas a T amb 30 min antes de ser inyectadas en una columna Superdex 200 previamente equilibrada en buffer. El perfil de elución se siguió a 280 nm y la estimación del área de los picos se realizó con el programa JASCO-Borwin 1.5. Las muestras se corrieron a un flujo de 0,5 ml/min en buffer Tris-HCl 25 mM pH 7,4, 0,3 M NaCl y 1 mM DTT. La relación molar del complejo ED23: E2C se calculó a partir de la concentración de Fab libre remanente en las corridas de las muestras del complejo en exceso de Fab (4 y 8 mg/ml). La concentración del Fab libre en estas muestras se obtuvo por extrapolación del valor del área del segundo pico de la corrida (V_e correspondiente al Fab libre, 15,5 ml) en la curva de calibración: área del pico vs concentración de Fab. Luego, la diferencia entre Fab total y libre da el valor del Fab unido en el complejo.

Respuesta
Inmune
Humoral

Respuesta inmune humoral

Efecto del adyuvante en la conformación del antígeno

Como se describió anteriormente, la presencia de anticuerpos contra ADN de mamífero de tipo B es un marcador de diagnóstico para lupus, aunque su relación con el origen y desarrollo de esta enfermedad aún no ha sido esclarecida. Si bien los modelos murinos de autoinmunidad y de inmunización transportador-hapteno han ayudado a identificar rasgos característicos de los anticuerpos anti-ADN y su relación con la aparición de LES, el desconocimiento de las bases moleculares determinantes de la inmunogenicidad adquirida por el ADN nativo en estos casos, imposibilita analizar en detalle los mecanismos desencadenantes de este tipo de auto-inmunidad.

Tomando como base los modelos de inmunización con el péptido Fus1: ADN (14, 20), se estudió la respuesta inmune contra el complejo proteína: ADN E2C: site 35. Dada la notable inmunogenicidad de la proteína E2C (78) y la alta estabilidad y prolongada vida media del complejo E2C: site 35 (62), era interesante estudiar si alguna de estas características del sistema, o la resultante de ellas, eran suficientes para que el oligonucleótido adquiriera carácter inmunogénico. El hecho de contar con un complejo proteína: ADN molecularmente definido permite relacionar las características moleculares del agente inmunógeno con la naturaleza de la respuesta inmune anti-ADN inducida, brindando información valiosa sobre el/los posibles factores desencadenantes de este tipo de respuestas.

A pesar de que las interacciones macromoleculares son críticas a la hora de estabilizar o cambiar la conformación de los integrantes de un complejo, hasta el presente se cuenta con poca información sobre el comportamiento de complejos macromoleculares como inmunógenos. Se sabe que los cambios conformacionales sufridos durante la formación del complejo son detectados por el sistema inmune, el cual desarrolla anticuerpos específicos contra los epitopes conformacionales así expuestos. Un ejemplo de este fenómeno lo constituye la interacción entre la proteína de la envoltura del virus de inmunodeficiencia humana (HIV) gp120 y el dominio extracelular del CD4, evento esencial en la entrada del virus a los linfocitos T. La unión de estas dos macromoléculas provoca un cambio conformacional muy marcado en la proteína gp120, el cual induce la

proliferación de células B secretoras de anticuerpos específicos contra los nuevos epitopes expuestos (79). Dado que la presencia de estos anticuerpos está claramente relacionada con su actividad neutralizante (80), la preservación del complejo gp120: CD4 es un punto fundamental para el desarrollo de una vacuna efectiva contra el HIV. En particular, se ha encontrado que la inmunización de ratones con este complejo emulsionado en un adyuvante de composición aceite en agua (Syntex) induce la aparición de anticuerpos dirigidos contra epitopes conformación-dependientes (81).

Como se describió en la introducción, la elección del adyuvante es un paso crucial para lograr un protocolo de inmunización exitoso (69, 70). Dado que el mantenimiento sostenido del ADN en estado inmunogénico *in vivo* es un evento crítico para lograr anticuerpos anti-ADN de alta afinidad (7), la utilización de un adyuvante que preserve la integridad del complejo E2C: site 35 durante la inmunización parece ser un punto fundamental para lograr el desarrollo de una respuesta anti-ADN específica. Con el fin de determinar qué tipo de adyuvante era el más apropiado para realizar los planes de inmunización con este complejo proteína: ADN, se evaluó el efecto de dos adyuvantes de naturaleza diferente sobre la conformación de la proteína E2C libre. Para este estudio se inmunizaron ratones BALB/c con la proteína E2C emulsionada en el adyuvante de Freund (E2C/FA, emulsión de agua en aceite) y el adyuvante MPL (E2C/MPL, emulsión no viscosa de aceite en agua). Luego, se comparó el título y patrón de reactividades de la respuesta policlonal de los ratones inmunizados contra la proteína en estado nativo o desnaturalizado por la técnica de ELISA. Se ha descrito previamente que E2C es desnaturalizada en forma total e irreversible al ser tratada a alta temperatura y pH ácido (71). En este caso, la desnaturalización térmica de la proteína se ve reflejada en el cambio de sus propiedades fluorescentes (figura 6, panel A). Como se muestra en la figura, en el espectro de la proteína calentada a 85 °C se observa una marcada disminución de la fluorescencia intrínseca y un corrimiento del centro de masa de aproximadamente 10 nm hacia el rojo con respecto al espectro de la proteína incubada a 25 °C, indicando que la proteína ha sido desnaturalizada irreversiblemente. Así, este sencillo tratamiento de E2C permite evaluar rápidamente la reactividad contra epitopes continuos o lineales presente en los sueros de los ratones inmunizados.

La respuesta policlonal de los ratones inmunizados con FA o MPL contra la proteína E2C se muestra en la figura 6. En general, ambos planes de inmunización indujeron títulos altos de IgG contra la proteína nativa, indicando que esta proteína es

altamente inmunogénica. Estos resultados coinciden con datos de bibliografía que reconocen a E2 como la proteína más inmunogénica dentro de las proteínas del HPV-16 (78). Más aún, se ha demostrado que también la inmunización con péptidos derivados del dominio C-terminal de E2 puede inducir altos títulos de anticuerpos IgG (82).

El patrón de reactividades de los sueros contra la proteína en su conformación nativa o desnaturalizada señala que el empleo de la emulsión acuosa MPL dirige la respuesta inmune, casi exclusivamente, hacia la producción de anticuerpos que reconocen la proteína en su estado nativo (título IgG 1/120,000 contra E2C nativa y 1/400 contra E2C desnaturalizada, ver figura 6B). Por el contrario, los ratones inmunizados con el adyuvante de Freund desarrollaron títulos altos tanto contra la proteína nativa como desnaturalizada (1/400,000 y 1/10,000, respectivamente), indicando que este adyuvante produce una desnaturalización, al menos parcial, de la proteína.

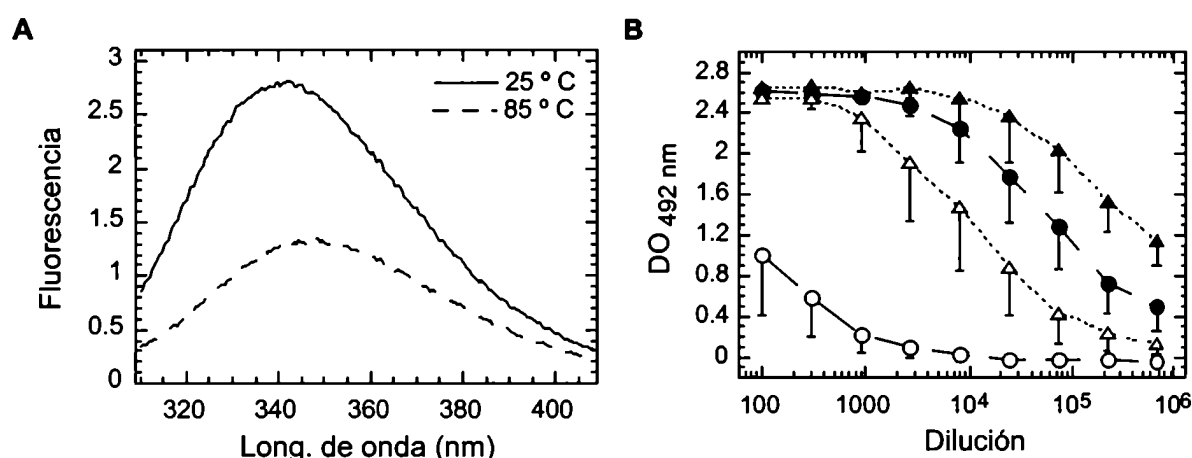


Figura 6. Evaluación del efecto del adyuvante sobre la conformación del antígeno. A, Espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de E2C en estado nativo (25 °C) y desnaturalizado (85 °C). El calentamiento de E2C en pH ácido produce una disminución de la fluorescencia de triptófanos y desplazamiento del centro de masa hacia el rojo ($\Delta \lambda_{\text{máx}}=10$ nm). B, Efecto del adyuvante en la respuesta policlonal hacia epitopes conformacionales o discontinuos de E2C. Se midió la reactividad IgG anti-E2C en el suero de ratones inmunizados con E2C en MPL (círculos) o en FA (triángulos) contra la proteína en estado nativo (símbolos negros) o desnaturalizada (símbolos blancos). Los sueros se titularon por ELISA en diluciones seriadas al medio. Los datos representan el promedio de determinaciones por duplicado del suero de cinco ratones por grupo.

En concordancia con los datos de bibliografía antes discutidos, estos resultados también evidencian que los adyuvantes de naturaleza acuosa, como el MPL, preservan mejor la conformación nativa de la proteína, siendo por esta razón el más adecuado para la

realización de los protocolos de inmunización con el complejo macromolecular E2C: site 35.

Respuesta policlonal contra el complejo E2C: site 35

Una vez establecido el adyuvante óptimo a emplear en los protocolos de inmunización con el complejo E2C: site 35 (adyuvante MPL), se procedió a la inmunización de ratones normales no-autoinmunes BALB/c con distintas preparaciones del complejo. Se ha descrito que, en condiciones de baja sal, el exceso de E2C lleva al complejo E2C: site 35 hacia un proceso de agregación reversible, aún en concentraciones nanomolares de proteína (61). Estos resultados coinciden con evidencias de otros sistemas que sugieren que la agregación o formación de complejos macromoleculares de mayor orden podrían ser parte de un proceso fisiológico localizado en los orígenes de replicación y transcripción (83, 84). Si bien hasta el presente no hay reportes en bibliografía que demuestren que existe una relación directa entre agregación e inmunogenicidad, hay evidencias que indican que el ordenamiento espacial y grado de agregación de una proteína juegan un rol fundamental en la inmunogenicidad de la misma (85-87).

Los animales se inmunizaron con mezclas estequiométricas del complejo preparadas de distintas forma: el complejo NI-CX, incubado sólo 10 min antes de la emulsión con MPL, y los complejos CT-CX y LT-CX, preincubados durante 7 y 30 días en condiciones de sobresaturación antes de la emulsión, respectivamente (ver materiales y métodos para mayores detalles). En la tabla I se muestra la reactividad IgG anti-complejo, anti-E2C y anti-site 35 de los ratones inmunizados con las tres mezclas del complejo E2C: site 35. En general, se observa que la respuesta IgG contra el complejo proteína: ADN o contra la proteína sola es prácticamente la misma en los tres grupos de animales, mientras que la respuesta contra el oligonucleótido se incrementa notablemente a medida que el tiempo de incubación del complejo es más prolongado (figura 7, ver más abajo).

Tabla I. Respuesta policlonal de los animales inmunizados con complejos E2C: site 35

Antígeno ^a	Título		
	anti-Cx ^b	anti-E2C	anti-site 35
NI-CX	1/20,000	1/30,000	0
CT-CX	1/20,000	1/200,000	1/250
LT-CX	1/20,000	1/20,000	> 1/800

La reactividad IgG del suero de los diferentes grupos de animales inmunizados con los complejos proteína: ADN luego de la tercera inmunización fue evaluada por ELISA. Cada ratón recibió 3 inmunizaciones con una mezcla estequiométrica 1:1 de 25 µg del complejo E2C: site 35 preparado en distintas condiciones y emulsionado en MPL (ver materiales y métodos). Las dosis fueron administradas con intervalos de 20 días. Los títulos de anticuerpos IgG se calcularon como la inversa de la dilución que corresponde al 50% de la DOMax. ^a Complejos E2C: site 35 usados como antígenos: NI-CX: complejo E2C: site 35 no incubado. CT-CX: complejo E2C: site 35 incubado durante 7 días. LT-CX: complejo E2C: site 35 incubado durante 30 días. ^b Los valores de los títulos están expresados como la inversa de la dilución. CX, complejo E2C: site 35.

El análisis de la respuesta policlonal generada contra la proteína E2C en los ratones inmunizados con el complejo E2C: site 35 indica que el patrón de reconocimiento y el título de los anticuerpos IgG anti-E2C es muy similar al inducido por la proteína libre emulsionada en el mismo adyuvante (título aproximado en ambos grupos: 1/200,000 y 1/400 contra la conformación nativa o desnaturalizada de E2C, respectivamente). Estos resultados corroboran que la composición del adyuvante es un factor determinante para preservar al antígeno en su conformación nativa. Por otro lado, estos datos indican que la presencia del ADN no modifica la inmunogenicidad intrínseca de la proteína, confirmando la gran capacidad inmunogénica de la misma (ver más arriba). Este último hecho es crítico para que el oligonucleótido adquiriera inmunogenicidad, y eventualmente, logre desencadenar una respuesta T_H específica que estimule la activación y expansión de células B anti-ADN (ver figura 2).

A diferencia de lo ocurrido en la respuesta policlonal contra E2C libre, la respuesta contra el oligonucleótido fue muy dispar entre los diferentes grupos de animales inmunizados (tabla I, figura 7). Como se muestra en la figura 7, mientras la respuesta IgM se mantiene constante en los tres grupos, la respuesta IgG anti-site 35 aumenta progresivamente de acuerdo al período de incubación que tuvo el complejo antes de la inmunización. Así, mientras la combinación fresca del complejo (grupo NI-CX) sólo fue

capaz de inducir anticuerpos IgM específicos contra el oligonucleótido, la inmunización con los complejos CT-CX y LT-CX indujo el desarrollo de títulos IgG anti-site 35 muy elevados, siendo esta respuesta mucho más fuerte en el grupo inmunizado con el complejo preincubado durante más tiempo (título aproximado 1/250 y 1/800 para el complejo incubado 7 días y 30 días, respectivamente. Tabla I).

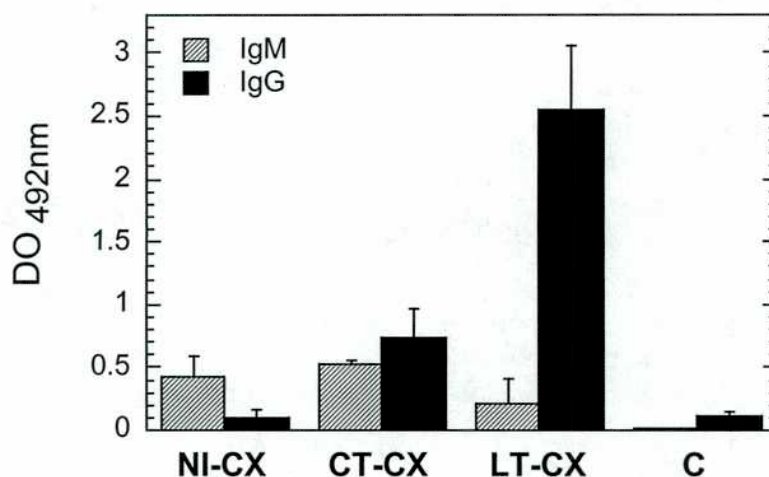


Figura 7. Respuesta policlonal anti-site 35 de ratones inmunizados con tres preparaciones diferentes del complejo E2C: site 35. La reactividad policlonal contra el oligonucleótido site 35 de los sueros de los tres grupos de ratones inmunizados con el complejo E2C: site 35 luego de la tercera inmunización se evaluó por ELISA. C: suero de animal no inmunizado. Los sueros se ensayaron a una dilución 1/100 para la reactividad IgM e IgG.

Con el fin de profundizar el estudio de la respuesta policlonal anti-site35 inducida por el complejo LT-CX, se analizó la evolución temporal de la respuesta IgM e IgG contra el oligonucleótido luego de las sucesivas inmunizaciones. Como se muestra en la figura 8, mientras que luego de la segunda inmunización un solo ratón había desarrollado una respuesta IgM e IgG específica contra el oligonucleótido (panel A, ratón 1), al cabo de la tercera inmunización los cinco ratones del grupo desarrollaron una alta respuesta IgG anti-site 35 específica (panel B). En este último caso, no sólo se observa una fuerte reactividad IgG contra este oligonucleótido en todos los animales del grupo, sino que, además, la respuesta IgM ha vuelto a sus valores normales (comparar la reactividad IgM del ratón 1 luego de la segunda y tercera inmunización). En este sentido, el hecho que el incremento en reactividad IgG ocurra concomitantemente con la disminución de la respuesta IgM contra el mismo antígeno, sugiere que el desarrollo progresivo de esta respuesta anti-

oligonucleótido es el resultado de una típica respuesta humoral T-dependiente (88).

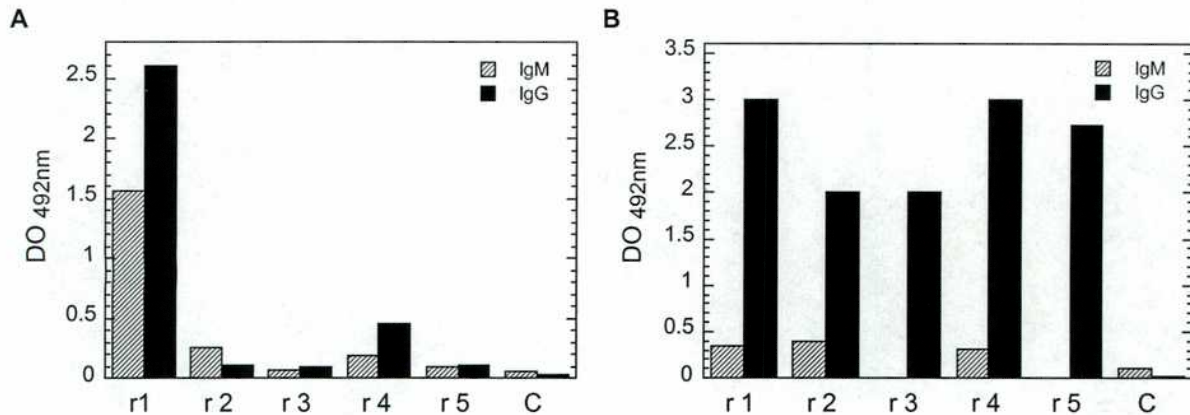


Figura 8. Evolución de la respuesta policlonal anti-site 35 de los ratones inmunizados con el complejo LT-CX. La reactividad IgM e IgG contra el oligonucleótido site 35 de los sueros de los cinco ratones del grupo LT-CX luego de la segunda (A) y tercera inmunización (B) se evaluó por ELISA. r: ratón inmunizado. C: animal no inmunizado. Los sueros se ensayaron a una dilución 1/100.

En conjunto, todos estos resultados señalan que las propiedades inmunogénicas del complejo E2C: site 35 han sido modificadas durante el período de incubación, adquiriendo la capacidad de generar una respuesta humoral anti-ADN sostenida en el tiempo.

Especificidad de la respuesta policlonal anti-ADN

En los modelos de inmunización transportador-hapteno con complejos proteína: ADN (14, 15, 20), o con el antígeno T (sistema T-ag: nucleosoma) (7, 17, 18, 21), la reactividad anti-ADN es evaluada contra moléculas de ADN doble cadena de mamífero de distintos largos y secuencias al azar (comúnmente ADN de timo de ternera). En general, en estos modelos los ratones inmunizados desarrollan títulos de anticuerpos anti-ADNdc menores o iguales a 1/200, siendo muy inferiores a los desarrollados en los modelos de autoinmunidad (título aproximado 1/3.000) (14). Al evaluar la reactividad de los sueros de los animales inmunizados con los complejos E2C: site 35 se encuentra que este complejo proteína: ADN también es capaz de inducir una respuesta auto-inmune contra ADN. En este caso, los títulos anti-ADNdc desarrollados en los ratones inmunizados son levemente mayores (títulos > 1/300) que los inducidos por otros complejos proteína: ADN, pudiendo

atribuirse este fenómeno a dos características de la proteína E2C: su gran inmunogenicidad y su capacidad de unión a ADN (ver más abajo).

Con el fin de analizar si la respuesta anti-site 35 desarrollada en los ratones LT-CX fue el resultado de una respuesta dirigida por el antígeno, se analizó la evolución de la respuesta contra el oligonucleótido site 35 y fragmentos de ADN doble cadena de secuencia al azar. Como puede verse en la figura 9, existe una clara correlación entre el número de inmunizaciones administradas y el aumento de la reactividad de los sueros contra el ADN inmunógeno, el oligonucleótido site 35. En la figura se observa que la reactividad IgG anti-site 35 se incrementa 4 veces entre la segunda y tercera inmunización, coincidiendo con el aumento de 8 veces en el título de anticuerpos contra este mismo antígeno luego de cada inmunización (títulos $<1/100$ y $>1/800$ luego de la segunda y tercera inmunización, respectivamente). Por el contrario, la reactividad contra el ADN de secuencia al azar permanece invariable en el tiempo.

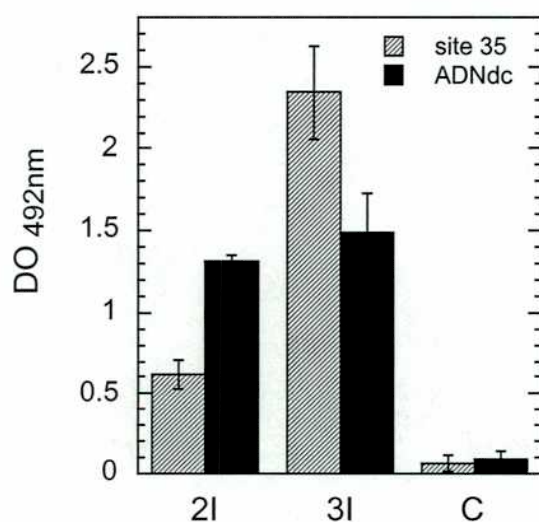


Figura 9: Evolución de la respuesta específica anti-site 35. La reactividad IgG de los sueros de los ratones del grupo LT-CX luego de la segunda (2I) y tercera (3I) inmunización contra el oligonucleótido site 35 y ADN doble (ADNdc) se evaluó por ELISA. C: animal no inmunizado. Los sueros se ensayaron a una dilución 1/100.

En conjunto, el análisis de la respuesta policlonal desarrollada en los ratones inmunizados con los complejos E2C: site 35 sugiere que el complejo LT-CX fue capaz de originar una colaboración específica de células B-T, generando una respuesta inmune dirigida por el antígeno. El desarrollo de una respuesta anti-ADN específica tan fuerte, podría ser el resultado tanto de un aumento en la concentración de anticuerpos anti-ADN circulantes, como de un proceso de maduración de la afinidad de estos anticuerpos. El hecho de encontrar un patrón de reactividades diferencial entre el antígeno site 35 y un

ADN de secuencia al azar parece indicar que la respuesta anti-ADN generada sería el resultado de un proceso de maduración de la afinidad de los anticuerpos anti-ADN inducidos. Con el fin de discernir entre estas dos hipótesis se generaron y caracterizaron anticuerpos monoclonales a partir de uno de los ratones del grupo LT-CX. (ver más abajo).

E2C y la respuesta contra ADNdc

Como se describió anteriormente, desde hace décadas el origen y evolución de los anticuerpos anti-ADN doble cadena es tema de debate continuo. En los últimos años, el grupo de Rekvig ha demostrado que existe una estrecha correlación entre la presencia de proteínas virales o heterólogas con capacidad de unión a ADN y la posterior aparición de auto-anticuerpos anti-ADN simple y doble cadena (16-18). En estos casos, la evolución de la respuesta anti-ADN parece estar directamente relacionada con la presencia sostenida de estas proteínas in vivo, manteniendo de este modo un nivel mínimo de linfocitos T activados que estimulen continuamente la proliferación de las células B ADN-específicas presentes en el nódulo linfático (7). En coincidencia el modelo propuesto por este grupo, se ha descrito que la inmunización con el péptido Fus1 libre también resulta en la aparición de anticuerpos anti-ADN simple y doble cadena, aunque los títulos de los anticuerpos inducidos en este caso suelen menores y mucho más variables que los desarrollados contra el péptido unido a ADN (14). Siguiendo este razonamiento, dado que E2C es una proteína viral (heteróloga) altamente inmunogénica y con capacidad de unir ADN, se estudió la capacidad de E2C sola de inducir una respuesta autoinmune anti-ADN. Con este fin, se ensayó la reactividad IgG anti-ADNdc de los sueros de los animales inmunizados con E2C libre (E2C/MPL) por ELISA. Como se muestra en la figura 10, a semejanza de lo ocurrido con el péptido Fus1, la inmunización con la proteína E2C libre también resulta en una respuesta policlonal contra ADN simple y doble cadena. Notablemente, también en este caso el nivel de la respuesta contra ADNdc no se mantiene en el tiempo, observándose fluctuaciones importantes entre las distintas inmunizaciones de un mismo ratón (ver figura). Asimismo, el nivel de la respuesta anti-ADNdc es altamente variable entre los diferentes animales del mismo grupo (datos no mostrados). De todas formas, el carácter transitorio de las respuestas anti-ADNdc es un fenómeno ampliamente descrito en la bibliografía, explicándose por la pérdida y posterior recuperación de los

mecanismos de tolerancia hacia el ADN (14, 89-91).

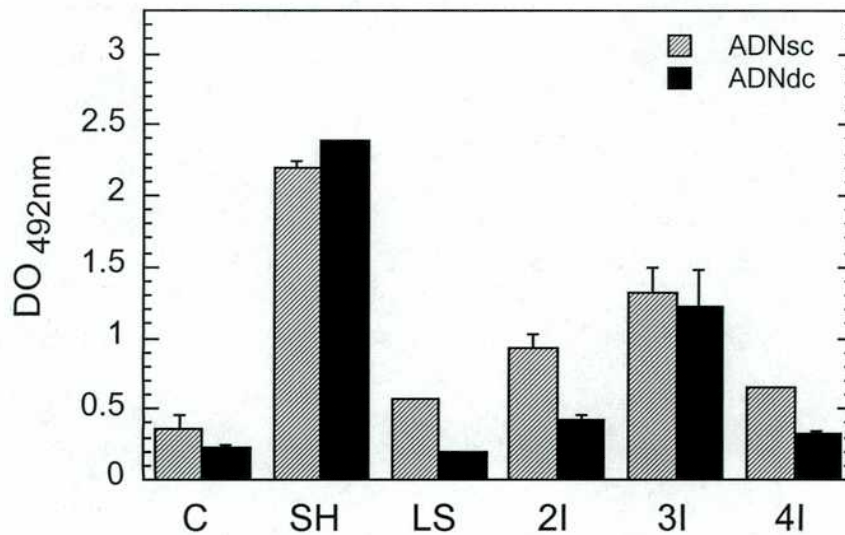


Figura 10: Evolución de la respuesta anti-ADN de los ratones inmunizados con E2C. La reactividad IgG contra ADN simple cadena (ADNsc) y doble cadena (ADNdc) del suero de un ratón inmunizado con E2C/MPL luego de sucesivas inmunizaciones se evaluó por ELISA. La respuesta de un solo animal es mostrada como ejemplo. C: animal no inmunizado. SH: suero de animal inmunizado con el complejo E2C: site 35 LT-CX. LS: suero de animal inmunizado con Lumazina sintetasa de *Brucella abortus*. 2I, 3I y 4I: sueros de la segunda, tercera y cuarta inmunización, respectivamente. Los sueros se ensayaron a una dilución 1/100.

En general, la observación que la inmunización de animales normales con la proteína E2C (tanto libre como unida a su secuencia de reconocimiento específico) resulte en el desarrollo de una respuesta autoinmune contra ADNdc coincide con el modelo de Rekvig (ver introducción), en el cual se postula la existencia de una estrecha relación entre la infección con agentes virales y el desarrollo de autoinmunidad hacia ADN. Igualmente, es necesario destacar que el desarrollo de la respuesta específica contra el oligonucleótido site 35 no puede atribuirse totalmente a esta propiedad de la proteína E2C. En este sentido, el rol que jugaron las condiciones en las que se preparó y mantuvo el complejo antes de iniciar los protocolos de inmunización fue determinante para que el oligonucleótido adquiriera potencial inmunogénico. Esta observación sugiere fuertemente que durante el período de incubación las propiedades físico-químicas del complejo E2C: site 35 se modificaron profundamente, resultando en la ganancia de carácter inmunogénico por parte del oligonucleótido (este tema se retomará en la parte final del capítulo de caracterización de los AcMos anti-ADN).

Desarrollo de anticuerpos monoclonales

Según se discutió más arriba, la respuesta policlonal anti-site 35 generada en los ratones inmunizados con el complejo LT-CX parecería ser el resultado de una respuesta dirigida por el antígeno. Con el fin de analizar esta hipótesis en mayor detalle, se obtuvieron y caracterizaron anticuerpos monoclonales anti-ADN a partir de uno de los ratones inmunizados con este complejo. Se realizó entonces un experimento de fusión con los esplenocitos de uno de los ratones del grupo LT-CX y células de mieloma NSO a los cuatro días de una inmunización final con el complejo E2C: site 35 en buffer TBS. Luego se analizó por la técnica de ELISA si los hibridomas producían anticuerpos con reactividades anti-complejo, anti-E2C y anti-site 35 similares a las encontradas previamente en los sueros de los ratones inmunizados. Notablemente, el total de los sobrenadantes de hibridomas de la fusión (92 en total) resultaron ser IgG anti-complejo y anti-E2C positivos, con DO saturantes en la mayoría de los casos. Asimismo, 15 de los 92 hibridomas resultaron poseer, además, reactividad IgG anti-site 35. El hecho que el 100% de los sobrenadantes de hibridomas presenten alta reactividad contra E2C reafirma la gran capacidad de esta proteína para inducir una fuerte respuesta policlonal.

A partir de algunos de los cultivos positivos se han clonado y estudiado seis AcMos IgG anti-E2C, denominados ED5, ED12, ED13, ED15, ED19 y ED23 y dos AcMos IgG anti-site 35 (ED10 y ED84). En la tabla II se resume una caracterización preliminar de los AcMos obtenidos. Como se muestra en la tabla, los seis AcMos anti-E2C generados mostraron una alta reactividad tanto contra la proteína libre como unida al oligonucleótido, sin demostrar reacción cruzada contra el ADN solo. Por otro lado, los dos AcMos anti-ADN reaccionaron fuertemente contra el oligonucleótido libre y unido a la proteína. Cabe aclarar que la diferencia en reactividad entre estas dos últimas condiciones es debida a que el oligonucleótido acomplexado a la proteína se adsorbe mejor a la placa de ELISA. Todos los AcMos generados resultaron ser de isotipo IgG₁, *k*. La caracterización detallada de estos anticuerpos se desarrollará en los capítulos siguientes.

Tabla II. Caracterización de los anticuerpos monoclonales

Clon	Reactividad en ELISA del sobrenadante de cultivo			
	Anti-CX	Anti-E2C	Anti-site 35	Especificidad
ED5	> 3,0	> 3,0	0,09	E2C
ED12	> 3,0	> 3,0	0,03	E2C
ED13	> 3,0	> 3,0	0,07	E2C
ED15	> 3,0	> 3,0	0,03	E2C
ED19	> 3,0	2,10	0,02	E2C
ED23	> 3,0	2,54	0,04	E2C
ED10	> 3,0	0,14	1,80	site 35
ED84	> 3,0	0,15	1,60	site 35
NSO	0,04	0,10	0,04	-----

Clasificación de la reactividad de los AcMos generados a partir de un ratón del grupo LT-CX. La reactividad IgG de los sobrenadantes de cultivo de los clones aislados contra los distintos antígenos: E2C: site 35, E2C y site 35 se ensayó por ELISA. (ver materiales y métodos). NSO: sobrenadante de la línea de plasmacitoma murino.

Conclusiones I

- El análisis de la respuesta policlonal inducida por los adyuvantes de Freund (emulsión viscosa de agua en aceite) y MPL (emulsión acuosa de aceite en agua) demuestran que este último preserva mejor la conformación nativa del antígeno emulsionado, orientando la respuesta hacia la producción de anticuerpos dirigidos contra epitopes discontinuos.
- El estudio de la respuesta policlonal contra la proteína E2C indica que esta es una proteína altamente inmunogénica, conservando esta propiedad aún en presencia de su secuencia de reconocimiento específico site 35.
- El estudio de la respuesta policlonal contra el oligonucleótido site 35 señala que la respuesta IgG site35-específica aumenta en forma progresiva con el período de incubación que tuvo el complejo antes de la inmunización. Esta observación sugiere que las condiciones en las que se preparó y mantuvo el complejo antes de iniciar los protocolos de inmunización fueron determinantes para que el oligonucleótido adquiriera potencial inmunogénico.
- El estudio de la respuesta IgM e IgG anti-site 35 en el grupo de animales inmunizados con el complejo LT-CX sugiere que el desarrollo progresivo de la respuesta IgG site 35-específica es el resultado de una típica respuesta humoral T-dependiente.
- La evolución de la respuesta policlonal IgG contra el oligonucleótido site 35 y contra fragmentos de ADN doble cadena de secuencia al azar señala que la respuesta anti-site 35 desarrollada en los ratones LT-CX es el resultado de una respuesta dirigida por el antígeno.
- El estudio de la reactividad contra ADN doble cadena de secuencia al azar en animales inmunizados con la proteína E2C libre o unida a su secuencia de reconocimiento específico indica que esta proteína es capaz de generar una respuesta autoinmune anti-ADN similar a las reportadas en bibliografía. Esta propiedad de la proteína E2C estaría basada tanto en su gran inmunogenicidad como en su capacidad de unir ADN.
- La caracterización preliminar de un grupo de hibridomas generados a partir de un animal inmunizado con el complejo E2C: site 35 LT-CX indica que se han obtenido clones productores de anticuerpos monoclonales de isotipo IgG₁ específicos contra la

proteína E2C (clones ED5, ED12, ED13, ED15, ED19 y ED23) y contra el oligonucleótido site 35 (clones ED10 y ED84).

AcMos anti-E2C

Caracterización de los AcMos anti-E2C

Reconocimiento de epitopes discontinuos

Cada vez se reúnen más evidencias que señalan la estrecha correlación existente entre la respuesta humoral hacia la proteína E2 y el estadio y progresión de las neoplasias cervicales asociadas al HPV-16 (43, 42, 45). En general, se observa que en lesiones de coilocitos y en neoplasias cervicales intraepiteliales de grado I la expresión de E2 alcanza sus niveles más elevados, disminuyendo a valores casi indetectables en lesiones de mayor grado y carcinomas invasivos. No obstante, a pesar de que el patrón de expresión de esta proteína podría utilizarse como un buen marcador del estadio de la lesión cervical, hasta el momento no se han desarrollado anticuerpos capaces de detectar e identificar lesiones provenientes de infecciones con HPV, ya sean de bajo o alto riesgo. Este antecedente, sumado a la pobre caracterización inmunológica realizada hasta el presente sobre esta proteína clave en la regulación del ciclo de vida y potencial oncogénico del papilomavirus, motivaron la realización de una caracterización más detallada y exhaustiva de los AcMos anti-E2C obtenidos.

Como primera medida, se analizó la capacidad de los anticuerpos monoclonales de reconocer epitopes continuos o discontinuos en la superficie de E2C. En coincidencia con el patrón de reconocimiento de la respuesta policlonal anti-E2C desarrollada en los ratones inmunizados con el complejo E2C: site 35 LT-CX, la mayoría de los hibridomas generados a partir de uno de estos animales también reconocen diferencialmente epitopes discontinuos en la proteína. La figura 11 muestra la reactividad de 15 hibridomas anti-E2C, los 6 AcMos preliminarmente caracterizados y 9 hibridomas seleccionados al azar, contra las formas nativa y desnaturalizada de la proteína E2C. Como puede observarse en la figura, en la mayoría de los casos se produce una marcada disminución de la reactividad luego de la desnaturalización térmica de la proteína. En particular, de los 6 AcMos generados, sólo el AcMo ED23 demostró tener una alta reactividad contra las dos formas de E2C (ver figura 12).

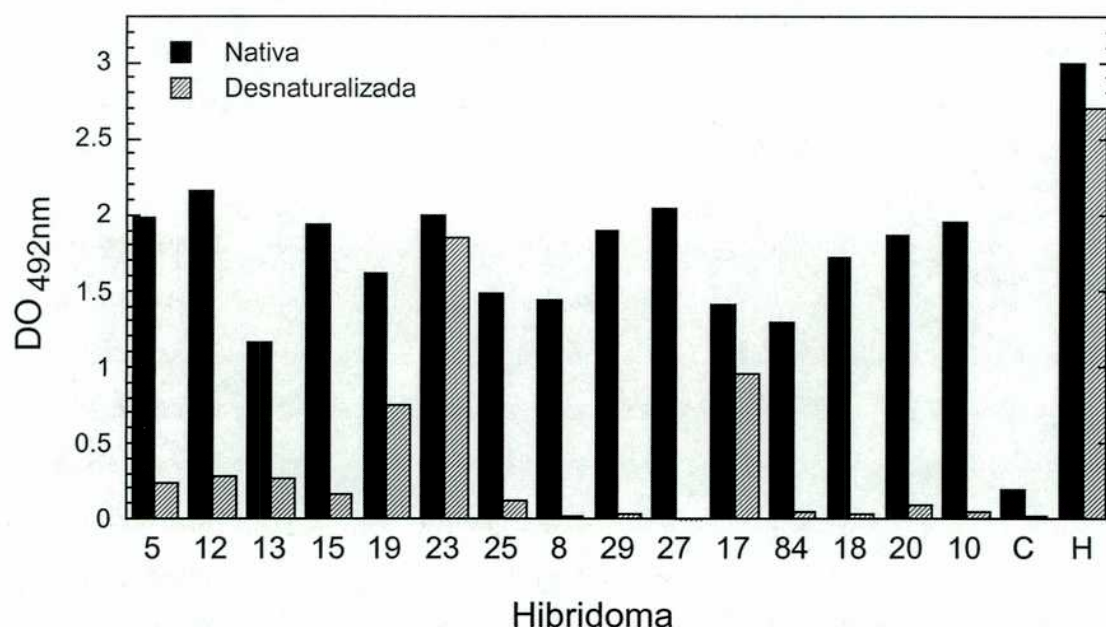


Figura 11. Reactividad en ELISA de los hibridomas anti-E2C contra la proteína nativa o desnaturalizada térmicamente. Se ensayó la reactividad IgG anti-E2C en los sobrenadantes de cultivo de los hibridomas generados a partir de un ratón del grupo LT-CX. C: suero de animal no inmunizado. Los números indican la denominación correspondiente de la serie de hibridomas ED. Los sueros de un ratón hiperinmune (H, grupo E2/MPL) y de un animal no inmunizado (C) fueron ensayados en una dilución 1/100.

Asimismo, se analizó la capacidad de los 6 AcMos de reaccionar contra péptidos derivados de E2C. Primeramente, se ensayó la reactividad de los anticuerpos contra una serie de péptidos obtenidos por digestión enzimática, cubriendo toda la secuencia de la proteína, (figura 12). En este caso, ninguno de los 5 AcMos que no había reaccionado contra la proteína desnaturalizada (ED5, ED12, ED13, ED15 y ED19) mostró reactividad alguna contra los péptidos, confirmando que estos AcMos reconocen epítopes discontinuos en la superficie de E2C. Por el contrario, el AcMo ED23 demostró tener fuerte reactividad contra uno de los péptidos, correspondiente a los aa 328-363 del extremo C-terminal de la proteína, siendo el único de los AcMos anti-E2C dirigido hacia un epítipo continuo. Este resultado promovió el análisis estructural del posible sitio de reconocimiento de este anticuerpo. Para ello, se evaluó la localización de los aa comprendidos en el péptido reconocido por ED23 en la estructura de la proteína altamente homóloga E2C del HPV-18, proteína para la cual se encuentran resueltas tanto la estructura de la proteína libre como unida a ADN (52). De este análisis surgió que los residuos 328-363 comprenden parte de la hélice α_2 , el loop conector y la hebra β_4 (aa 330-365 en la proteína E2C del HPV-18, ver figura 4), implicando que el epítipo

reconocido por este anticuerpo está localizado en la cara opuesta a la superficie de reconocimiento al ADN. Con el fin de definir mejor el epítopo reconocido por ED23 y tomando como base la estructura de cristalina de E2C, se diseñaron péptidos sintéticos que sean plausibles de conformar un epítopo lineal en la superficie de la proteína. Como una primera medida se diseñaron dos péptidos de 12 y 10 aa de longitud, péptidos SEW (aa 337-348) y KIP (aa 349-358). Los aa comprendidos en el péptido SEW forman parte de la hélice $\alpha 2$ y el loop conector con la hebra $\beta 4$ siguiente, mientras que los residuos comprendidos en el péptido KIP involucran la última parte de dicho loop y parte de la hebra $\beta 4$ (ver área roja en la figura 18). El ensayo de la reactividad de ED23 contra estos dos péptidos se muestra en la figura 12.

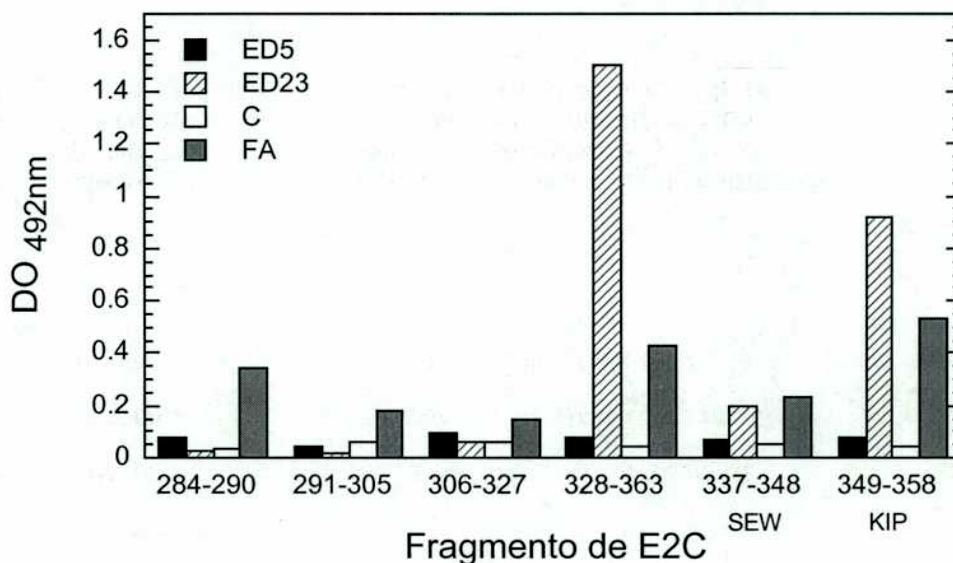


Figura 12. Reactividad en ELISA de los AcMos anti-E2C contra péptidos derivados de la proteína E2C. Líquido ascítico de los AcMos y los sueros control fueron ensayados en una dilución 1/100. C: suero de animal no inmunizado. FA: suero de ratón inmunizado con E2 en FA. Los AcMos ED12, 13, 15 y 19 mostraron el mismo patrón de reactividad que ED5 (datos no mostrados). La asignación de los aminoácidos de los péptidos se realizó de acuerdo a la estructura de E2 deHPV-18 depositada en el PDB (51).

Como puede observarse en la figura, este anticuerpo es capaz de reconocer al péptido KIP como antígeno en ELISA, no así al péptido SEW, indicando que el epítopo reconocido por este anticuerpo involucra total, o parcialmente, los aminoácidos comprendidos en el péptido KIP. Como se observa en la figura 18, los residuos 349-358 forman un área casi continua en la superficie de E2C. Esta observación podría explicar, al menos en parte, la capacidad de ED23 de reaccionar contra E2C aún cuando esta pierda

su conformación nativa. Si bien es claramente necesario realizar un examen más exhaustivo para conocer con exactitud cuáles son los aa involucrados en el epítopo reconocido por este anticuerpo, la información obtenida de estos ensayos es de gran utilidad para el análisis posterior del sitio de reconocimiento de los otros AcMos anti-E2C.

Mapeo epitópico-funcional de los AcMos anti-E2C

El empleo de anticuerpos en la caracterización de proteínas es una herramienta utilizada desde hace ya muchos años. A través del patrón de reactividad de los anticuerpos es posible definir dominios y estructuras flexibles dentro de la proteína, sus determinantes antigénicos, superficies de interacción con otras macromoléculas, funciones biológicas, etc. En particular, la generación de anticuerpos contra proteínas reguladoras de la replicación y transcripción celular o viral se ha convertido en uno de los campos más explotados, utilizándolos como armas eficaces en la inhibición de sus funciones *in vitro* (92-95). Generalmente, dentro de un panel de anticuerpos dirigidos contra una proteína que une ADN (o ARN), se encuentra que algunos de ellos inhiben la interacción de la proteína con su secuencia blanco mientras otros forman un complejo ternario estable anticuerpo: proteína: ADN. En todo caso, la capacidad de los anticuerpos de interferir en las funciones del factor regulador no sólo depende de la localización del epítopo que está reconociendo sino del grado de impedimento estérico y/o pérdida de libertad conformacional que sufra la proteína al formarse el complejo antígeno: anticuerpo (92, 94) (ver más abajo).

Con el fin de estudiar si los AcMos anti-E2C eran capaces de interferir en la unión de E2C a su oligonucleótido blanco, se desarrolló un ensayo de retardo de la movilidad electroforética utilizando como sonda al oligonucleótido de 18 pb site 35 conjugado a una molécula de fluoresceína en su extremo 5' (FITC-site 35). En la figura 13 se muestra que la migración de la banda correspondiente al oligonucleótido libre (calle 1) es retrasada en presencia de E2C (calle 2) debido a la formación del complejo proteína: ADN, E2C: FITC-site 35. La preincubación de los AcMos con la proteína (previo al agregado del oligonucleótido) produjo dos efectos diferentes sobre la migración del ADN sonda. Por un lado, la mitad de los seis AcMos (ED5, ED12 y ED23) causaron un retardo aún mayor

en la migración de la banda fluorescente, siendo este un efecto concentración dependiente (calles 3-5, ED5 como ejemplo). Este resultado indica que estos AcMos pueden formar un complejo ternario estable AcMo: E2C: site 35, sugiriendo que reconocen, en el factor de transcripción, un epítopo no relacionado a la superficie de unión a ADN. Por otro lado, la preincubación con los otros 3 AcMos restantes (ED13, ED15 y ED19) produjo un aumento en la fluorescencia de la banda correspondiente al FITC-site 35 libre, con la concomitante disminución de la fluorescencia de la banda correspondiente al complejo E2C: FITC-site 35 (calles 6-9, ED15 como ejemplo). Estos resultados sugieren que estos 3 AcMos pueden prevenir la unión de E2C al oligonucleótido.

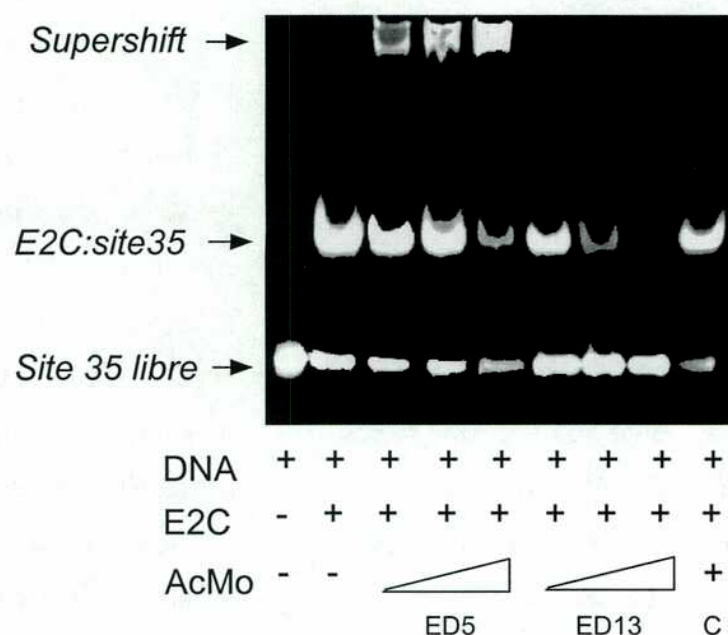


Figura 13. Interacción de los AcMos anti-E2C con el complejo E2C: site 35 por EMSA. Una solución 2,5 μ M de E2C fue incubada con concentraciones crecientes de anticuerpo (1,0, 2,0 y 4,0 μ M de sitios de combinación) durante 2 horas. Luego se agregó la sonda FITC-site 35 (2,5 μ M) y se dejó incubar durante 30 min más. Las bandas se visualizaron por transiluminación UV C: IgG no-relacionada (4 μ M).

Para corroborar estos resultados por medio de otra metodología, se analizó el efecto que causa la formación del complejo E2C: anti-E2C en la posterior interacción de E2C con el oligonucleótido site 35 biotinilado (Bio-site 35) inmovilizado en una cubeta de biosensor (ver materiales y métodos). El agregado de E2C produce un aumento de la señal concentración dependiente, indicando unión específica. Por el contrario, la adición de una proteína no relacionada (EBNA) no produce cambio alguno en la señal (datos no mostrados). Como se observa en la figura 14, la preincubación de E2C con el AcMo ED5 produce una señal aún mayor a la observada luego de la formación del complejo E2C: site 35 en presencia de un anticuerpo no-relacionado, llegando a duplicar la respuesta a

concentraciones de anticuerpo cercanas a $0,1 \mu\text{M}$ (resultados similares fueron obtenidos con el AcMo ED23). Dado que en el biosensor la señal resultante es proporcional al peso molecular de las macromoléculas interactuantes, el incremento de la señal producido por el agregado de los anticuerpos es indicador de la formación del complejo ternario AcMo: E2C: Bio-site 35. Por otro lado, la preincubación de E2C con los AcMos ED13, ED15 y ED19 produce la inhibición de la interacción de E2C con su secuencia de reconocimiento, observándose como una disminución concentración dependiente de la señal (panel B, ED19 es mostrado como ejemplo). Más aún, se encontraron concentraciones inhibitorias (CI_{50}) distintas para cada AcMo, probablemente debido a diferencias en sus constantes de afinidad (ver panel C). La preincubación de la proteína con el oligonucleótido site 35 sin marcar inhibió totalmente la unión de E2C al oligonucleótido inmovilizado en la cubeta, aún a concentraciones nanomolares, avalando el diseño del ensayo (datos no mostrados).

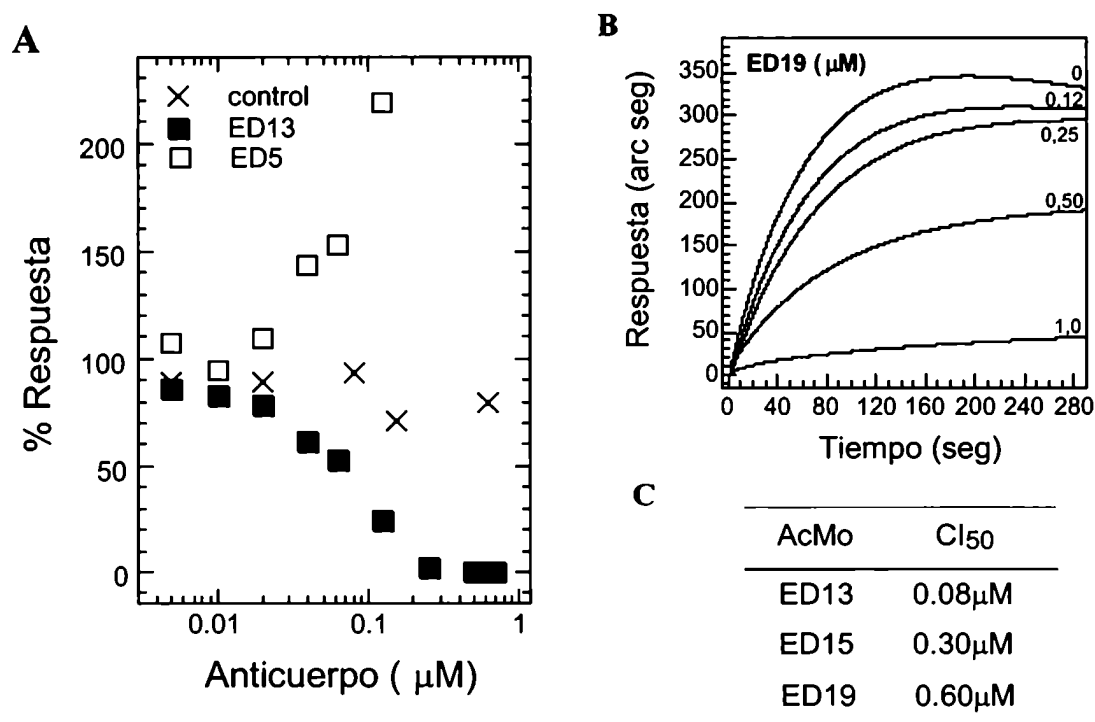


Figura 14. Efecto de la interacción anticuerpo: E2C en la formación del complejo E2C: site 35 en tiempo real. A, Respuesta porcentual de la unión de E2C (100 nM) al oligonucleótido Bio-site 35 sensibilizado en la cubeta del biosensor luego de su incubación con cantidades crecientes de los anticuerpos anti-E2C (rango $0,02\text{--}1 \mu\text{M}$). Las respuestas obtenidas luego de la preincubación con los AcMos ED5 y ED13 son presentadas como ejemplo. 100% respuesta corresponde a la respuesta de E2C en ausencia de anticuerpo. B, Sensogramas correspondientes a la respuesta de E2C luego de la incubación con concentraciones crecientes del AcMo ED19. C, Tabla mostrando la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}) de los diferentes AcMos anti-E2C. CI_{50} : concentración de IgG que produce una disminución del 50% en la respuesta de E2C, con respecto a la respuesta con un anticuerpo control.

Estos resultados indican que los AcMos ED13, ED15 y ED19 son capaces de inhibir eficientemente la unión de E2C a su secuencia blanco site 35, sugiriendo que reconocen un epítipo en, o cercano a, la superficie de unión a ADN dentro del factor de transcripción.

El bloqueo de la interacción factor de transcripción: ADN mediado por anticuerpos podría explicarse de dos formas (92, 94). Primero, la unión del anticuerpo a su sitio de reconocimiento podría impedir estéricamente la interacción del factor de transcripción con su secuencia blanco. Segundo, la formación del complejo antígeno: anticuerpo podría prevenir la ocurrencia de cambios conformacionales necesarios para que el factor de transcripción desarrolle normalmente sus funciones biológicas. En tanto es claro que los anticuerpos que reconocen epítopos ubicados en la superficie de unión a ADN pueden impedir en forma directa o indirecta la interacción entre el factor de transcripción y su secuencia blanco, el papel de los anticuerpos dirigidos contra epítopos ubicados fuera de la zona de interacción con ADN no es tan evidente. Un ejemplo lo constituyen los anticuerpos dirigidos contra la subunidad A del factor de transcripción celular NF-Y (94). Si bien estos anticuerpos pueden formar un complejo ternario con NF-Y y ADN, también poseen la capacidad de inhibir la transcripción mediada por este factor en un ensayo *in vitro*. Los autores han atribuido este fenómeno a que la interacción del anticuerpo con NF-Y podría impedir interacciones proteína-proteína necesarias para la formación del complejo de iniciación, aunque interacciones con otros factores celulares tampoco pueden descartarse.

Estequeometría de las interacciones E2C: anti-E2C

Dado el carácter homodimérico de E2C, otro paso fundamental hacia la caracterización del sitio y modo de reconocimiento de los AcMos era la determinación de la estequeometría de unión de los distintos complejos E2C: anti-E2C. Para ello, se analizó si los AcMos reconocen epítopos repetitivos en la superficie de la proteína mediante un ELISA de captura. En el ensayo se utilizaron los fragmentos Fab de los AcMos ED5 y ED15 como anticuerpo de captura, siendo considerado cada uno de estos AcMos como representante de cada uno de los dos grupos de AcMos caracterizados

previamente: grupo 1: aquellos que pueden formar un complejo ternario E2C: site 35 (AcMos ED5, ED12 y ED23), y grupo 2: anticuerpos que inhiben la unión del factor de transcripción a su secuencia blanco (AcMos ED15, ED13 y ED19). Luego, se midió la reactividad IgG remanente sobre la proteína E2C capturada por el Fab inmobilizado en la placa de ELISA. En la figura 15A se muestra el patrón de reactividades de los 6 AcMos contra la proteína capturada por el Fab ED5.

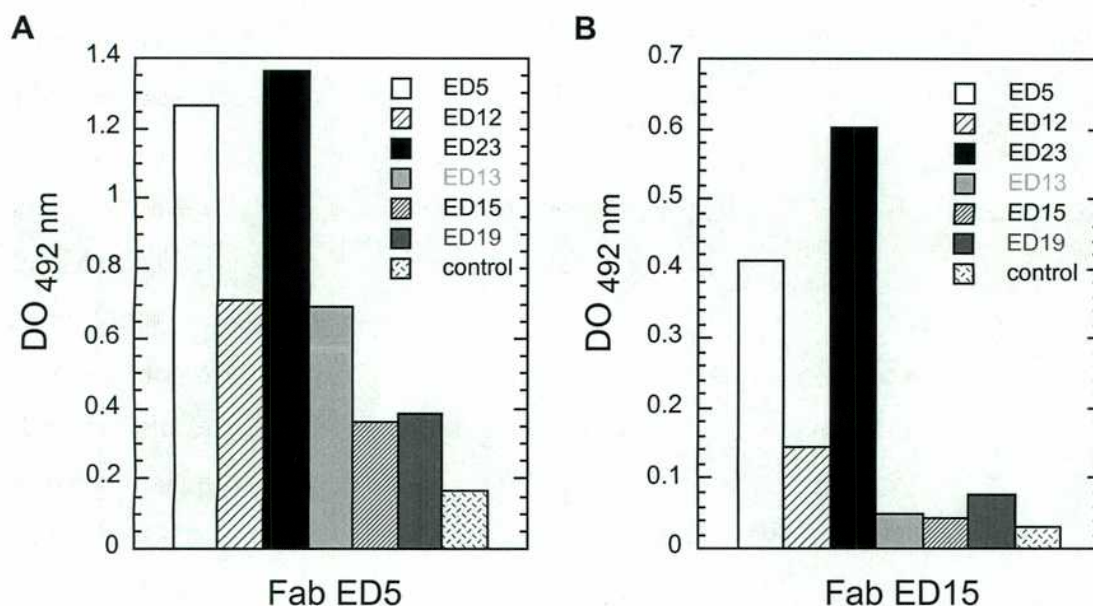


Figura 15. Mapeo epitopico de los AcMos por ELISA de captura. Determinación de la reactividad IgG de los AcMos anti-E2C contra la proteína E2C capturada por los fragmentos Fab de los anticuerpos ED5 y ED15. A, Captura de E2C con el Fab ED5. Las placas se sensibilizaron con los fragmentos Fab del AcMo ED5. La reactividad IgG medida en los pocillos sensibilizados con el Fab de un anticuerpo no-relacionado fue considerada como blanco. B, Captura de E2C con el Fab ED15 biotinilado. Las placas sensibilizadas con estreptavidina se incubaron posteriormente con el Fab ED15 biotinilado. En ambos casos, la presencia de IgG anti-E2C remanente se reveló con un conjugado policlonal anti-Fc IgG. Control, IgG no-relacionada.

Como puede observarse en la figura, en todos los casos en los que se produjo la captura de E2C con el Fab ED5 se obtuvo señal positiva, indicando que la formación del complejo Fab ED5: E2C no impide la posterior interacción de los otros AcMos con la proteína, incluyendo al propio ED5. Este resultado implica dos cosas: 1, que los AcMos del grupo 1 están reconociendo un epítopo repetitivo en E2C (estequiometría AcMo: E2C 2:1) y 2, que los AcMos del grupo 2 no tendrían epítopos solapados con el AcMo ED5 (ver panel A). Por el contrario, la captura de E2C con el Fab ED15 (ver panel B) produjo señal positiva sólo en los casos en los que se incubó con los AcMos del grupo 1 (ED5,

ED12 y ED23), confirmando que los AcMos del grupo 1 y 2 no reconocen epitopes superpuestos entre sí. Por otro lado, la ausencia de señal positiva al incubar los anticuerpos ED15, ED13 y ED19 con el Fab ED15 indica que estos anticuerpos estarían reconociendo un epítopo único y solapado en E2C (estequiometría AcMo: E2C 1:1). Además, resultados obtenidos de experimentos de competencia por ELISA, utilizando E2C como antígeno y los anticuerpos ED5 o ED15 como competidores, también señalan que los AcMos que pertenecen a un mismo grupo reconocen epitopes total o parcialmente solapados entre sí y que los anticuerpos pertenecientes a grupos diferentes no compiten entre sí por la unión a E2C (datos no mostrados). En general, el patrón de reconocimiento de los AcMos es coincidente con los resultados de mapeo epítipo-funcional obtenidos en los ensayos de EMSA y biosensor.

Dado que los anticuerpos pertenecientes al grupo 1 reconocen un epítopo repetitivo en la superficie de E2C, se realizaron ensayos de fluorescencia y de filtración en gel para determinar su estequiometría de unión exacta. En particular, se analizaron las relaciones molares de los complejos Fab: E2C formados con los anticuerpos ED5 y ED23, dado que ambos AcMos reconocen epitopes solapados entre sí pero de características diferentes (ED5 reconoce un epítopo discontinuo y ED23 uno continuo (ver figura 11).

La determinación de la estequiometría de la interacción Fab ED5: E2C se realizó por medio de curvas de titulación de fluorescencia, utilizando como fluoróforo el Fab ED5 conjugado a FITC (FITC-ED5, ver materiales y métodos).

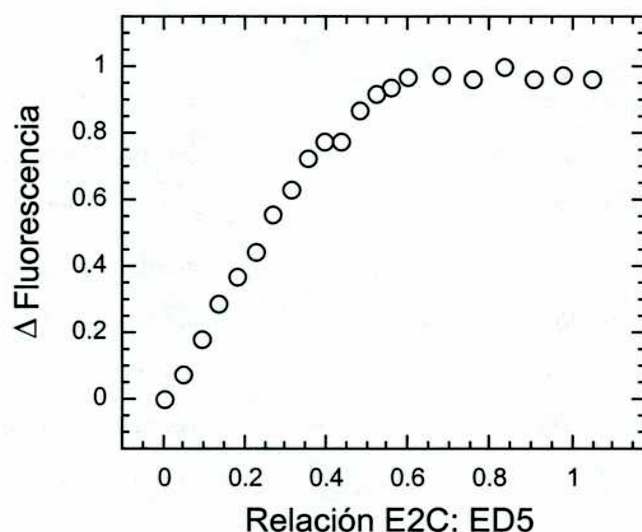


Figura 16. Estequiometría de la interacción ED5: E2C. Titulación del Fab FITC-ED5 (200 nM) con concentraciones crecientes de la proteína E2C. Se monitoreo el cambio en la fluorescencia del Fab FITC-ED5 luego de 5 min de equilibrado.

Como se observa en la figura 16, el cambio en la fluorescencia de FITC-ED5 alcanza la saturación en una relación molar E2C: Fab de 1:2 (100 nM dímero E2C), indicando que bajo condiciones de saturación en el equilibrio se forma un complejo ED5: E2C estable en el cual se unen dos moléculas de Fab por cada dímero de E2C.

Si bien también se llevó a cabo la marcación del fragmento Fab del AcMo ED23 con FITC empleando el mismo protocolo que el utilizado en la marcación del Fab ED5, ED23 marcado no produjo cambios en la emisión de fluorescencia ante la adición de E2C. Este fenómeno podría atribuirse tanto a que los residuos del anticuerpo a los que se conjugaron las moléculas de fluoresceína se encuentran muy alejados de la región de interacción con el antígeno como a que el sitio de combinación del anticuerpo ha sido modificado o destruido durante el proceso de marcación. En cualquier caso, finalmente la determinación de la estequiometría de unión del Fab ED23 con E2C se realizó por medio de ensayos en filtración en gel. Para ello se sembraron en una columna de exclusión molecular Superdex 200 distintas mezclas del complejo Fab ED23: E2C en las que se mantuvo fija la concentración de E2C (0,72 mg/ml) y se aumentó progresivamente la concentración de Fab (rango 0,25–8 mg/ml), dejando que el sistema se equilibre durante 30 min.

En la figura 17 se muestra el perfil de elución de los distintos complejos ED23: E2C. Allí se observa que a medida que se incrementa la concentración de anticuerpo, el pico correspondiente al Fab libre (Volumen de elución, V_e aprox.=15,5 ml) sufre un desplazamiento gradual hacia la izquierda, alcanzando un valor mínimo y estable de V_e = 13,4 ml en las muestras incubadas con exceso de Fab (relación molar Fab: E2C 2:1 y 4:1). A la vez, este corrimiento del volumen de elución del Fab coincide con la desaparición gradual del pico correspondiente a E2C (V_e = 19,5 ml), el cual desaparece totalmente en una relación molar Fab: E2C 1:1. De acuerdo al perfil de elución de las proteínas patrón, un V_e aproximado de 13,4 ml correspondería al V_e de una molécula globular de 120 kDa. Estos resultados sugieren que en exceso de Fab se forma un complejo Fab ED23: E2C 2:1, el cual tendría un PM de 118 kDa. Esta misma relación estequiométrica es la que se obtiene de calcular la concentración de Fab libre y unido luego de cada corrida a partir de la curva de calibración del área del pico versus la concentración de Fab, (panel B, ver materiales y métodos).

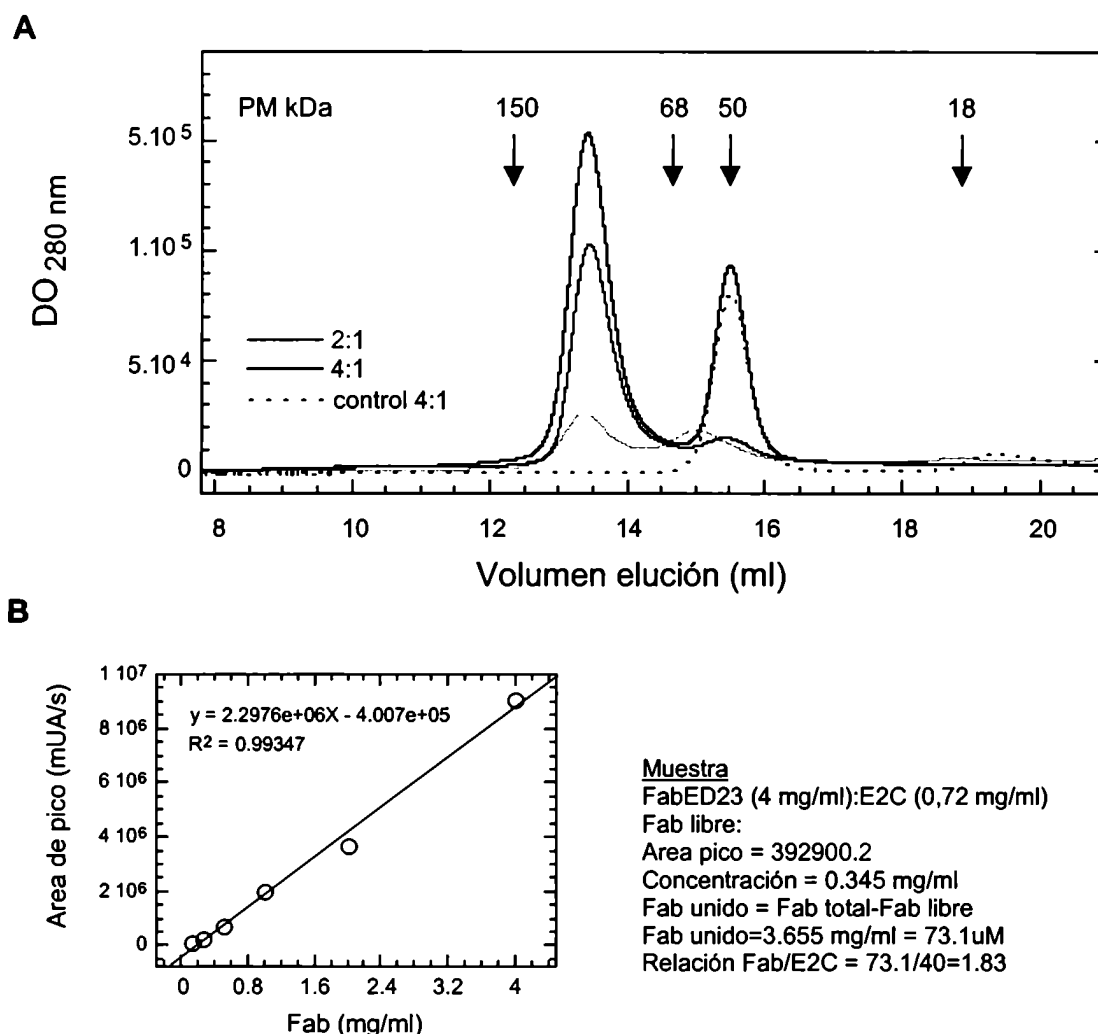


Figura 17. Formación de complejos ED23: E2C por filtración en gel. Determinación de la relación molar Fab ED23: E2C por cromatografía líquida de exclusión de tamaño. **A**, Perfil de elución de distintas mezclas conteniendo una concentración fija de E2C (0,72 mg/ml) y cantidades crecientes de Fab (0,25-8 mg/ml). Luego de 30 min de incubación a T amb las muestras se sembraron en una columna Superdex 200. **B**, Curva de calibración de Fab ED23 (rango 0,125-4 mg/ml). El perfil de elución se siguió a 280 nm. La estimación del área de los picos se realizó con el programa JASCO-Borwin 1.5. Los pesos moleculares de proteínas patrón están indicados con flechas. Como control se utilizó un Fab no relacionado.

Posteriormente se intentó confirmar la estequiometría de unión ED15: E2C por esta metodología, pero lamentablemente no fue posible obtener el pico correspondiente al complejo antígeno: anticuerpo, aún en corridas realizadas en buffers de baja fuerza iónica para evitar la disociación del complejo (ver más abajo).

Tomando en conjunto los datos de los experimentos del mapeo epitópico-funcional y estequiometría se puede concluir que los AcMos anti-E2C del grupo 1 (o de reactividad tipo ED5, AcMos ED5, ED12 y ED23) reconocen un epítopo repetitivo en la

superficie de E2C. Como se demostró anteriormente, ED23 reconoce un epítopo comprendido entre los aa 349-358 de E2, en la cara opuesta a la superficie de interacción con ADN (figura 18. La zona de reconocimiento de ED23 está coloreada en rojo). El hecho que estos tres anticuerpos reconozcan epítopos solapados entre sí implica que al menos una parte del epítope reconocido por los anticuerpos ED5 y ED12 debe estar comprendida en la zona reconocida por ED23. Estas evidencias explican la capacidad de estos 3 AcMos para formar un complejo ternario con E2C y ADN. Por otro lado, los AcMos del grupo 2 (o de reactividad tipo ED15) reconocen un epítope único, el cual se solaparía total o parcialmente con la zona de unión a ADN del factor de transcripción (color amarillo). Como se observa en la figura, los residuos en contacto con ADN delimitan un área continua con dos α -hélices simétricas protuberantes. Si bien hasta el momento no ha podido definirse con mayor precisión el área de reconocimiento de estos AcMos dentro de esta superficie, posiblemente esto pueda lograrse en el futuro mediante ensayos de mapeo con un AcMo recientemente generado en el laboratorio.

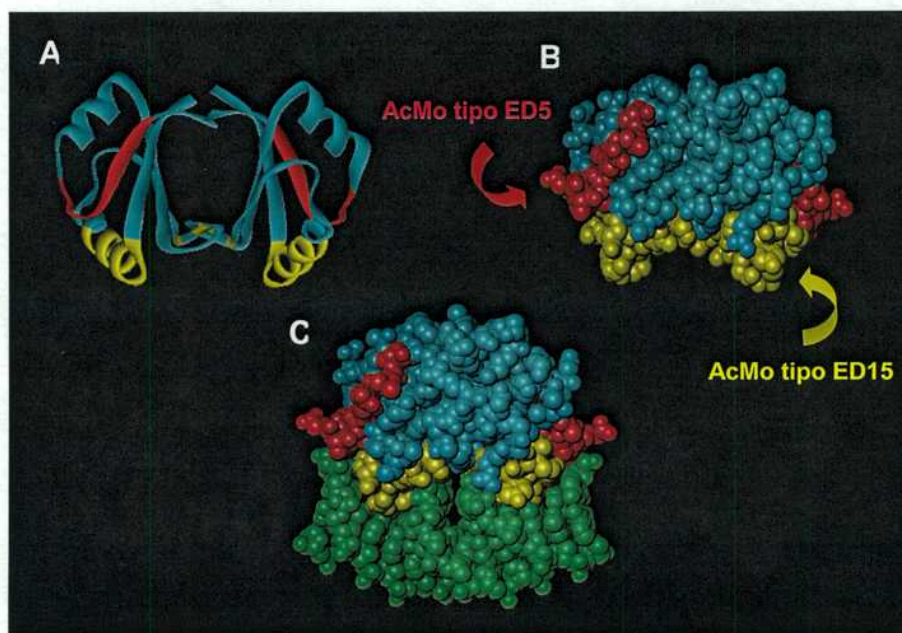


Figura 18. Topografía antigénica de la proteína E2C del HPV-16. Modelos gráficos del dominio C-terminal de la proteína homóloga E2C HPV-18 en estado libre (A y B) o unida a ADN (C) mostrando las dos grandes áreas de reconocimiento de los AcMos anti-E2C. Los diagramas fueron generados usando los programas Turbo Frodo y ViewerProTrial 42 a partir de las coordenadas cristalográficas depositadas en el PDB (52). Las áreas de reconocimiento repetitivo de los anticuerpos del grupo 1 están coloreadas en rojo (residuos 351-360 en la proteína E2 del HPV-18). La superficie de contacto con el ADN está resaltada en amarillo. A, Representación en cintas del dominio de unión a ADN de la proteína E2C del HPV-18. B y C, representación de átomos llenos coloreada como en A.

Determinación de las constantes de disociación de los AcMos anti-E2C

Tomando como base los resultados de la caracterización epitopico-funcional, se continuó el estudio del modo de reconocimiento de algunos de los AcMos en mayor detalle. En particular, se determinaron las constantes de disociación en el equilibrio y las constantes cinéticas de asociación y disociación de tres anticuerpos: ED5, ED23 y ED15. Los AcMos ED5 y ED23 fueron elegidos por reconocer epitopes de distintas características (uno es discontinuo y el otro continuo) dentro de la cara opuesta a la superficie de interacción con ADN, mientras que ED15 se tomó como representante de los anticuerpos que reconocen un epitope en la zona de unión a ADN del factor de transcripción.

Como se mencionó anteriormente, la unión de E2C a su secuencia blanco site 35 induce profundos cambios conformacionales en la proteína, incluyendo un gran efecto de estabilización (62). El hecho de contar con anticuerpos capaces de reconocer tanto la proteína libre como unida a ADN, planteó como interrogante si estos anticuerpos eran capaces de censar los cambios conformacionales sufridos por E2C al acomplejarse con el oligonucleótido site 35, desplegando afinidades diferentes en uno y otro caso. Para responder esta pregunta, se determinaron y compararon las constantes de disociación de los anticuerpos ED5 y ED23 contra la proteína E2C libre y unida a ADN. Primeramente, se determinaron las constantes de disociación en el equilibrio (K_D) del AcMo ED5 por técnicas espectroscópicas haciendo uso del fragmento Fab conjugado a fluoresceína, FITC-ED5. Las constantes se determinaron por medio de curvas de titulación en solución agregando E2C o el complejo E2C: site 35 a una cantidad fija del fluoróforo FITC-ED5 (figura 19). Titulaciones preliminares indicaron que el rango de disociación requería cantidades muy bajas de Fab. Luego de corregir la concentración de E2C por el número de sitios de unión al anticuerpo (2 sitios de unión por Fab de acuerdo a los estudios de estequiometría), se obtuvo un valor de K_D de $10 \pm 0,2$ nM para E2C y de $28 \pm 2,7$ nM para el complejo E2C: site 35. En ambos casos, la distribución al azar de los residuales confirma el modelo de unión utilizado para el ajuste (el modelo matemático está descripto en materiales y métodos).

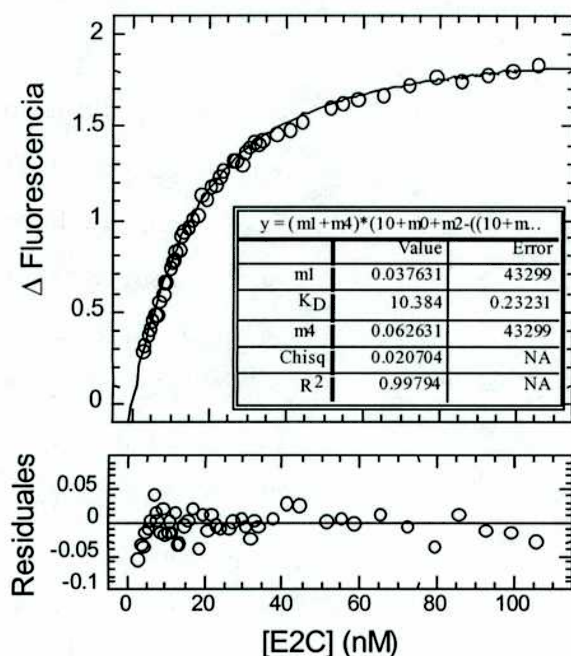


Figura 19. Determinación de la constante de disociación al equilibrio del AcMo ED5 contra E2C libre y unida a ADN. Los experimentos se realizaron añadiendo concentraciones crecientes de la proteína E2C o del complejo E2C: site 35 a una cantidad fija del Fab FITC-ED5 (10 nM, la titulación contra E2C libre es mostrada como ejemplo). En el panel inferior se muestran los residuales.

Si bien el valor de la K_D contra el complejo es 3 veces mayor que el determinado contra la proteína libre, no es posible afirmar que esta sea una diferencia significativa, aún considerando que los errores derivados de la medición son menores o iguales al 10%.

Con el fin de validar estos resultados utilizando otra metodología, se determinaron las constantes de equilibrio del AcMo ED5 contra la proteína libre y unida a ADN en un biosensor óptico IAsys plus. Con este instrumento es posible medir los valores experimentales de las constantes de asociación y disociación cinéticas, obteniéndose mucha más información sobre los eventos de formación y disociación de una interacción determinada que la adquirida con mediciones de unión al equilibrio. Otra ventaja es que pueden compararse los parámetros cinéticos obtenidos de la interacción del agente inmovilizado con distintos ligandos que este reconozca. En nuestro caso, el hecho de poder inmovilizar el fragmento Fab de los anticuerpos, permite la comparación directa de las constantes cinéticas de asociación y disociación obtenidas contra E2C libre o acomplejada al oligonucleótido site 35. A modo de ejemplo, la figura 20 muestra los gráficos de ajuste de datos y determinación de la constante cinética de asociación del Fab ED23 con E2C (ver más abajo). Los valores de las constantes cinéticas y en el equilibrio del AcMo ED5 contra estos dos ligandos se muestran en la tabla III. En general, los datos muestran una buena correlación con los previamente obtenidos en los experimentos de fluorescencia, descartándose así la presencia de artefactos en las mediciones realizadas en

el biosensor (96). Las constantes de disociación en el equilibrio contra la proteína E2C libre determinadas por las técnicas de fluorescencia y biosensor son prácticamente indistinguibles entre sí (K_D s iguales a $10 \pm 0,2$ y $21 \pm 2,0$ nM, respectivamente. Tabla III). En línea con los resultados obtenidos por fluorescencia, la K_D de ED5 por el complejo E2C: site 35 es significativamente diferente al valor determinado contra la proteína libre ($160 \pm 5,3$ y $28 \pm 2,0$ nM, respectivamente), indicando que la afinidad del anticuerpo es 7,6 veces más baja contra la proteína unida a ADN que contra la forma libre de la misma. Al observar las constantes cinéticas de asociación (k_{as}) y disociación (k_{dis}) derivadas de cada interacción, se encuentra que la fase de asociación tiene velocidades muy distintas en un caso y en el otro, siendo 12 veces más rápida en la interacción con la proteína libre (comparar las k_{as} en ambos casos, tabla III). Estos resultados sugieren que el AcMo ED5 es sensible a los cambios conformacionales que sufre E2C al acomplejarse con su secuencia blanco, viéndose así afectada, principalmente, la fase de asociación de la formación del complejo antígeno: anticuerpo.

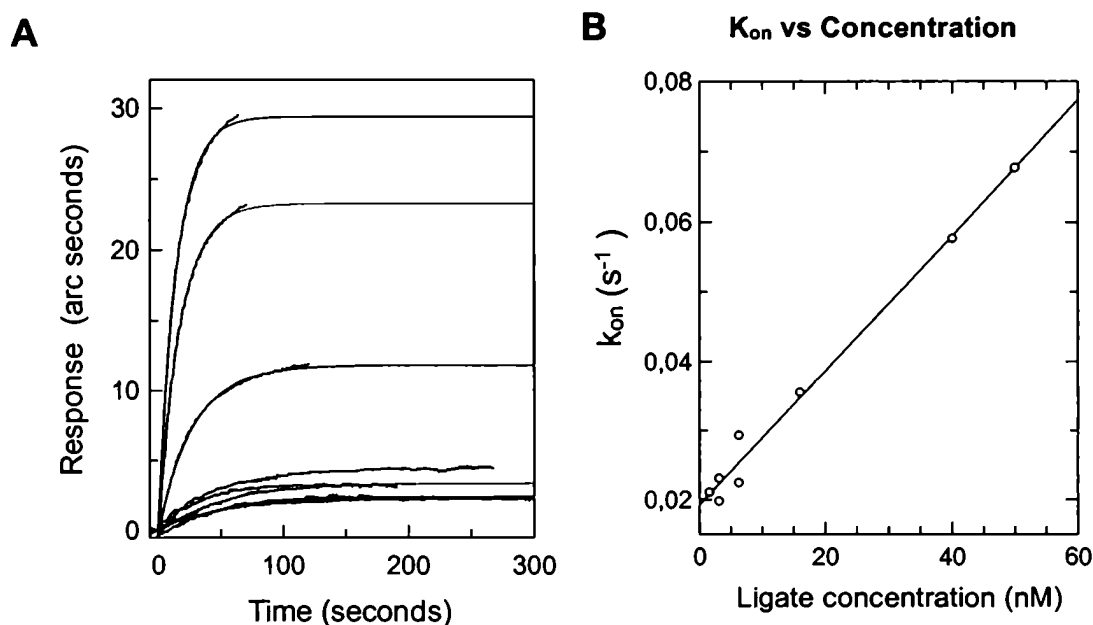


Figura 20. Determinación de constantes cinéticas por biosensor. Análisis de los datos cinéticos obtenidos en el biosensor óptico IAsys plus. La obtención del valor de k_{as} del Fab ED23 inmovilizado con concentraciones crecientes de E2C en solución se muestra como ejemplo. Los datos se analizaron con el software FASTplot. **A**, Ajuste de datos a un modelo de asociación monofásica. **B**, Determinación de la constante cinética de asociación. El valor de k_{as} es la pendiente del gráfico k_{on} vs concentración de ligando (número de sitios de unión de E2C).

Asimismo, se realizó un análisis similar sobre el modo de reconocimiento del

AcMo ED23. A semejanza de lo observado con el AcMo ED5, el AcMo ED23 tiene una K_D diferente por la proteína libre o unida a su secuencia de reconocimiento site 35 (147 y 753 nM, respectivamente), siendo el factor de discriminación D 5 veces menor para la interacción ED23: E2C.

Tabla III: Mediciones de las constantes cinéticas y de disociación en el equilibrio de los AcMos ED5, ED23 y ED15

AcMo	K_D [M $\times 10^{-9}$]	D^e	k_{as}^b [M ⁻¹ s ⁻¹ $\times 10^5$]	A^f	k_{dis}^b [s ⁻¹ $\times 10^{-3}$]	B^g
FITC-ED5:E2C ^a	10 $\pm$ 0,2	1,0	ND		ND	
FITC-ED5:Cx ^a	28 $\pm$ 2,7	2,8	ND		ND	
ED5:E2C	21 $\pm$ 2,0	1,0	4,77 $\pm$ 0,43	1,0	10 $\pm$ 0,02	1,0
ED5:Cx	160 $\pm$ 5,3	7,6	0,39 $\pm$ 0,01	12,2	6,32 $\pm$ 0,03	1,6
ED23:E2C	147 $\pm$ 7,5	1,0	4,84 $\pm$ 0,23	1,0	71 $\pm$ 0,21	1,0
ED23:Cx	753 $\pm$ 59	5,1	0,36 $\pm$ 0,03	13,4	27 $\pm$ 0,07	2,6
ED23:KIP ^c	15.000 $\pm$ 4.130	102	0,011 $\pm$ 0,001	440	17 $\pm$ 5,0	4,2
ED15:E2C	2,14 $\pm$ 0,25	1,0	58 $\pm$ 6,78	1,0	12 $\pm$ 0,01	1,0

^a Las constantes de disociación en el equilibrio se determinaron por fluorescencia. ^b Las constantes cinéticas k_{as} y k_{dis} fueron determinadas en un biosensor óptico de resonancia de espejos. En todos los casos se inmovilizaron los fragmentos Fab de los AcMos y se midió el cambio de la respuesta (arc seg) en el tiempo luego de la adición de los distintos ligandos en solución. ^c Los valores de K_D se obtuvieron del cociente entre k_{dis} y k_{as} . ^e La K_D se determinó por mediciones en el equilibrio y la k_{dis} se calculó como el producto entre la K_D y k_{as} . ^f El factor discriminación D es la tasa $K_D \text{ E2C}/K_D \text{ X}$, siendo X cualquiera de los ligandos estudiados. ^g El factor A es la tasa $k_{as \text{ E2C}}/k_{as \text{ X}}$. ^h El factor B es la tasa $k_{dis \text{ E2C}}/k_{dis \text{ X}}$. ND: no determinado.

Similarmente a lo ocurrido con el anticuerpo ED5, las diferencias en las constantes de afinidad de ED23 frente a E2C libre o unida a ADN podrían atribuirse, casi exclusivamente, a las diferencias en las constantes cinéticas de asociación de este anticuerpo con cada uno de los ligandos. En conjunto, los datos cinéticos y de equilibrio obtenidos con los anticuerpos ED5 y ED23 ponen de manifiesto que los cambios conformacionales sufridos por E2C al interaccionar con su secuencia de reconocimiento específica son los suficientemente profundos como para producir una disminución significativa de las velocidades de las reacciones de asociación de los anticuerpos y

modificar así extensamente su afinidad. En este sentido, es interesante remarcar el hecho que el anticuerpo ED23 sea capaz de percibir estos cambios conformacionales de E2C, aún reconociendo un epítopo continuo, reafirmando que estos también son conformacionales.

Como se describió anteriormente, ED23 es capaz de reconocer tanto la forma nativa como desnaturalizada de E2C. Más aún, se ha demostrado que posee una alta reactividad en ELISA contra un péptido correspondiente a los últimos 10 residuos del extremo C-terminal de la proteína (péptido KIP, figura 12). Hasta el presente no existen en la bibliografía muchos ejemplos sobre el modo en el que anticuerpos originados contra proteínas enteras reconocen péptidos derivados de estas. Un ejemplo interesante lo constituye el anticuerpo monoclonal 8F5, capaz de neutralizar el virus rinovirus humano, agente causante del resfrío común. Este anticuerpo, generado a partir de la inmunización con partículas virales enteras, reconoce una de las proteínas de la cápside del virus: la proteína VP2 (97). Extensivas caracterizaciones de este anticuerpo mostraron su capacidad para, no sólo reconocer la proteína en estado desnaturalizado, sino también interaccionar con péptidos derivados de esta proteína (98). La comparación de la estructura cristalina del anticuerpo 8F5 unido a uno de estos péptidos (de 15 aa de longitud) con la estructura del anticuerpo unido a una proteína altamente homóloga a VP2, la proteína HRV1A (la estructura del complejo 8F5: VP2 no estaba disponible en ese momento), indica que la conformación del péptido en el complejo es muy similar a la del epítopo correspondiente en la proteína entera (99). Según los autores, la capacidad del péptido de adoptar un arreglo tridimensional, al menos parcialmente equivalente a una parte de un epítopo en la proteína entera, explicaría la reactividad cruzada entre el péptido y la partícula viral.

Con el fin de determinar si la interacción de ED23 con el péptido KIP sería diferente a la interacción con la proteína completa, se midieron las constantes cinéticas y de equilibrio del Fab ED23 contra este péptido y se las comparó con los valores obtenidos contra toda la proteína E2C. Como se muestra en la tabla III, la K_D de ED23 por KIP es 100 veces mayor que la K_D determinada contra la proteína entera (15 y 0,15 μM , respectivamente). Al analizar los valores de las k_{as} se encuentra que la menor afinidad del anticuerpo por el péptido se debe, casi enteramente, a una reducción de 440 veces en la velocidad de asociación (k_{as} igual a $1,14 \times 10^3$ y $4,84 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ para KIP y E2C, respectivamente). Por el contrario, las k_{dis} en uno y otro caso son comparables. Estos

resultados sugieren que la baja afinidad de ED23 por el péptido se debe a la gran libertad conformacional que el péptido posee en solución, lo cual produce una reducción importante de moléculas de KIP ofrecidas en la conformación óptima para interactuar con el anticuerpo.

La adaptación conformacional entre un antígeno y un anticuerpo puede modular la especificidad de este último. Este fenómeno ha sido primeramente propuesto como el resultado de un “ajuste inducido” (100), el cual implica que la propia reacción de unión es la que induce cambios conformacionales que llevan a una mejor complementariedad entre el epítopo y el paratopo. Posteriormente, ha surgido el concepto de “selección conformacional” (101, 102). En este caso, el anticuerpo simplemente selecciona aquellas moléculas de antígeno cuyos epítopos ya se encuentran en un estado conformacional ajustado (102), o recíprocamente, el antígeno selecciona al anticuerpo que se presente en la conformación óptima para la unión (101). En cualquier caso, tanto el ajuste inducido como la selección conformacional contribuirán al reconocimiento del antígeno. Esto es más claro en el caso en el que el antígeno es un péptido de conformación al azar. De todos los posibles estados conformacionales que el péptido puede asumir, algunos serán similares al estado unido y serán entonces seleccionados con pocos requerimientos de adaptación estructural. Otras moléculas podrían ser unidas mientras se encuentran en la conformación “equivocada”, adaptándose al sitio de combinación del anticuerpo por medio del ajuste inducido.

En general, podría concluirse que las diferencias encontradas en las constantes de disociación de los anticuerpos ED5 y ED23 contra los distintos ligandos se deben fundamentalmente a diferencias en las velocidades de asociación de las interacciones AcMo: ligando. Este fenómeno parece estar íntimamente relacionado con las diferentes conformaciones que adoptaría el epítopo en los distintos ligandos presentados, ya sean la proteína libre, unida a ADN o, más aún en forma de péptido sin estructura definida en solución.

Con esta misma metodología se determinaron luego las constantes cinéticas y al equilibrio del AcMo ED15 con la proteína E2C libre (tabla III). Los datos muestran que este AcMo tiene una constante de disociación igual a $2,14 \pm 0,25$ nM, valor 10 veces menor que el exhibido por ED5 y 70 veces menor que el de ED23. Al realizar un análisis comparativo de las constantes cinéticas de los tres anticuerpos, se observa que la k_{as} de

ED15 es un orden de magnitud mayor que la de los otros dos anticuerpos, señalando que las diferencias en las K_{DS} se deben, fundamentalmente, a diferencias en la fase de asociación.

Efecto de la sal en la interacción E2C: anti-E2C

El análisis de la distribución de cargas sobre la estructura cristalina determinada a alta resolución del dominio C-terminal de la proteína E2 del HPV-16 (51), muestra que toda la superficie de la proteína tiene carga neta positiva. Este hecho motivó el estudio del efecto de la concentración iónica en la interacción de los AcMos con E2C. Como se muestra en la figura 21, la unión de los anticuerpos ED15 y ED23 a la proteína se ve totalmente impedida a concentraciones de NaCl superiores a 0,5 M, siendo la interacción de ED15 mucho más sensible al incremento de la concentración salina.

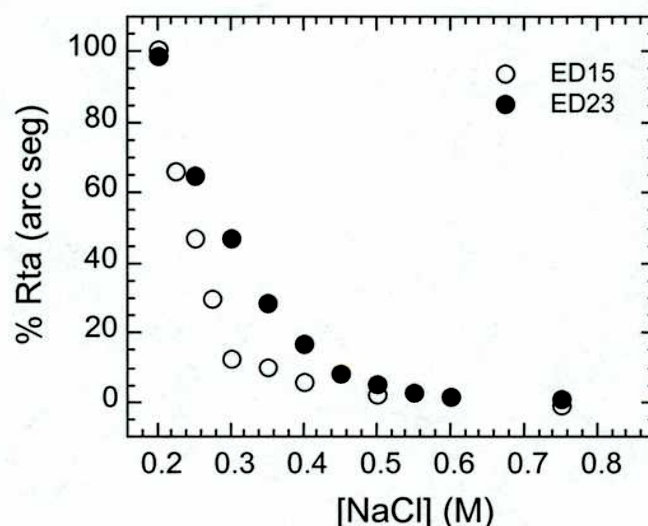


Figura 21. Efecto de la concentración salina en la interacción E2C: anti-E2C. La unión de E2C (0,1 μ M) a los fragmentos Fab ED15 y ED23 inmovilizados en presencia de concentraciones crecientes de NaCl se determinó en el biosensor IAsys plus. % Respuesta corresponde a la diferencia en unidades de resonancia arc seg entre t_0 y t_{4min} .

En el gráfico se observa que la respuesta de unión de E2C al Fab ED15 cae al 10% de su valor inicial a concentraciones de NaCl superiores a 0,3 M, mientras que la unión de E2C al anticuerpo ED23 sólo se reduce en un 50% en estas mismas condiciones. En todo

caso, el hecho que la interacción de E2C con estos dos anticuerpos sea tan sensible a la concentración salina del medio sugiere que las fuerzas electrostáticas juegan un rol importante en el modo de reconocimiento de estos AcMos, siendo más significativo en el caso de ED15. Estos resultados podrían explicar que haya sido imposible lograr que el complejo ED15: E2C se mantenga formado al ser inyectado en una columna de filtración molecular, aún a pesar de que la afinidad de ED15 por E2C es 70 veces más alta que la de ED23 (ver sección en donde se determinaron las estequiometrias de unión).

La conclusión de que las fuerzas electrostáticas son fundamentales en la interacción ED15: E2C parece coincidir con el resultado del análisis de las secuencias de los fragmentos variables de ED15. Como se muestra en la figura 22, las regiones variables de este anticuerpo poseen una notable cantidad de aminoácidos ácidos, tanto en los CDRs como en las regiones conservadas (FR) de ambas cadenas (9 aa ácidos en la región V_H y 6 en la región V_L).

REGION VARIABLE DE LA CADENA PESADA									
	1-----	FR1-----	-----	CDR1-	-----	FR2-----	-----	CDR2-----	
IGHV14S3	EVQLQQSGSELV	RSGASVKLSCTAS	GFNIK	DYYMH	WVKQRTEQG	LEWIG	WIDPENG	DTEYAPK	FQG
ED15	EE			V			S	C	D N
	67-----	FR3-----	-----	CDR3---	-----	FR4-----			
IGHV14S3	KATMTADTSSNT	AYLQLSSLTSE	D	AVYYC					
ED15		V H		FSIYYDSTY	WGQGT	TVTVSS			

REGION VARIABLE DE LA CADENA LIVIANA									
	1-----	FR1-----	-----	CR1-----	-----	FR2-----	-----	CDR2---	
ai4	DIVLTQSPA	IMASLGERVT	MTC	TASSSVSSSYLH	WYQQKPGSSPKLWIY	STSNLAS			
ED15	LM			N Y				I T	
	58-----	FR3-----	-----	CDR3---	-----	FR4-----			
ai4	GVPARFSGSGS	GTSLTIS	MEAE	DAATYYC					
ED15				HQYHRSPYT	FGG	G	T	K	LEIKR

Figura 22. Secuencia de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana del AcMo ED15. Comparación de las secuencias V_H y V_L del AcMo ED15 con sus respectivas líneas germinales: IGHV14s3 (103) y ai4 (104). Las secuencias están representadas en código de una letra y los CDRs definidos según el criterio establecido por Chothia (105). En ambos casos, se consideró como línea germinal el gen que presentaba mayor homología con la secuencia del AcMo. La línea germinal más cercana a la secuencia V_H se encontró utilizando la base de datos IMGT, the international ImMunoGeneTics database (106). El gen de la línea germinal de la secuencia V_L, en cambio, se ubicó utilizando la base de datos de BLAST (107).

La proporción de residuos ácidos en la cadena pesada de este anticuerpo es particularmente elevada (6% de aa aspárticos y 8% de aa glutámicos), resultando en un

punto isoelectrico teórico de 4,08 (ExPAsY Server). Este último es un dato notable, dado que el punto isoelectrico teórico de la mayoría de las secuencias V_H de las inmunoglobulinas de ratón de línea germinal depositadas en la base de datos del BLAST está muy por encima de este valor (PIs 6,5-9,7). Si bien el punto isoelectrico de este anticuerpo es la resultante del ensamble de la cadena pesada y la cadena liviana (completas), la alta proporción de residuos ácidos de la región V_H de este anticuerpo (junto a la alta sensibilidad a la sal del complejo ED15: E2C) refuerzan la hipótesis de que las fuerzas electrostáticas son las principales mediadoras de la interacción de este anticuerpo con la proteína básica E2C.

Las propiedades electrostáticas de una proteína radican en la proporción y distribución de los residuos polares y cargados. Estos residuos regulan dichas propiedades por medio de la formación de interacciones de corto alcance, como puentes salinos y puentes de hidrógeno, definiendo el estado electrostático global de la proteína (108). Por ejemplo, las cargas expuestas en la superficie de una proteína pueden afectar su estructura, estabilidad, solubilidad y las cinéticas del proceso de plegamiento e interacción con sus ligandos. Ha sido descripto que las fuerzas electrostáticas en o cercanas a la superficie de unión con el antígeno pueden optimizar la velocidad de asociación y afinidad de los anticuerpos (108-110). Un claro ejemplo de esto lo constituye el estudio realizado sobre la interacción del AcMo anti-lisozima HyHEL-5 con su antígeno lisozima. A partir de la estructura cristalina del complejo antígeno: anticuerpo, se realizaron estudios de simulación en computadora de la difusión de los encuentros entre las dos proteínas. De este análisis surgió como conclusión que los residuos cargados cercanos al sitio de unión ejercen la mayor influencia en conducir a las proteínas hacia la configuración más favorable para su interacción, mientras que los residuos más alejados sólo producen efectos menores (109). Esta “conducción electrostática” también ha sido descripta en otros complejos anti-lisozima: lisozima, en los que se observó una alta correlación entre la contribución de las interacciones electrostáticas y la afinidad de los anticuerpos (111).

Todo este análisis parece señalar a las fuerzas electrostáticas como las protagonistas principales de la interacción de ED15 con la proteína E2C, favoreciendo el encuentro efectivo entre los componentes del complejo al aumentar su velocidad de asociación. Dado que hasta el presente no se cuenta con las secuencias de las regiones variables del AcMo ED23, es imposible evaluar si también en este anticuerpo su

composición aminoacídica está relacionada con sus propiedades electrostáticas. Sin embargo, la alta carga positiva de superficie de E2C y la alta sensibilidad a la sal que también posee la interacción ED23: E2C (50% de unión a concentraciones de NaCl iguales a 0,3 M), sugieren que también en este caso las fuerzas electrostáticas juegan un papel clave.

Posibles aplicaciones de los AcMos anti-E2C

A principios de la década del 90 fue publicado un trabajo en el cual se realizó una caracterización preliminar de anticuerpos policlonales generados contra péptidos sintéticos cubriendo toda la superficie de la proteína E2 del HPV-16 (82). En ese entonces, no se contaba con información estructural sobre esta proteína, de modo que los autores desarrollaron estos anticuerpos con el fin de determinar la topología de la misma. Es así como arribaron a la conclusión que las regiones N- y C-terminal forman dominios estructurados y conservados, unidos entre sí por una región bisagra altamente flexible no conservada. AcMos contra la proteína homóloga E2 del papilomavirus bovino también han sido producidos y evaluados por su habilidad de interferir con las funciones de E2 *in vivo* e *in vitro* (93). Entre estos anticuerpos sólo uno, dirigido contra el dominio C-terminal de la proteína, fue capaz de inhibir tanto la unión de E2 al ADN como la formación del complejo E1.E2.origen en un ensayo de EMSA. Más aún, este anticuerpo produjo la inhibición de la replicación mediada por E2 en forma concentración dependiente. A partir de estos resultados los autores propusieron que este anticuerpo podría utilizarse con fines terapéuticos, dado su potencial para impedir la interacción de E2 con el ADN y bloquear la replicación del papilomavirus. En los últimos años se ha incrementado el número de trabajos en los que se demuestra que es factible inhibir la replicación (112-114) o la transcripción virales (92) en células transfectadas con los fragmentos variables de anticuerpos (scFV), causando efectos citotóxicos mínimos o nulos (115). Más aún, la expresión intracelular de un anticuerpo contra el factor de transcripción ATF-1, cuyo nivel está aumentado en células metastásicas de melanoma, logró reducir la tumorigenicidad y el potencial metastásico de estas células en ratones “nude” (116).

El hecho de contar con estudios estructurales de los anticuerpos anti-E2C aquí

presentados podría servir de base para el diseño racional de estrategias dirigidas a desarrollar compuestos terapéuticos que modifiquen la unión de E2 a sus secuencias de reconocimiento específicas dentro del genoma del virus. Por este motivo, se iniciaron estudios de solubilidad y cristalización del complejo ED23: E2C. Hasta el presente no se han encontrado las condiciones óptimas de solubilidad de este complejo, probablemente debido a la gran tendencia a agregar que posee la proteína E2C. Sin embargo, quedan aún muchas posibilidades por explorar en este campo, de modo que se continuarán estos estudios más adelante.

Por otro lado, la posible aplicación de estos anticuerpos en el diagnóstico está siendo investigada en el laboratorio dirigido por Norman Maitland, UK. Este grupo fue el que demostró la correlación entre el nivel de expresión de E2 y el grado de lesión causada por la infección con HPV (43). En este sentido, la utilidad de estos AcMos anti-E2C en el diagnóstico es promisorio. En particular, sería interesante que estos anticuerpos no sólo resulten buenos marcadores para el diagnóstico de infección con HPV y/o el seguimiento de pacientes infectados, sino también que puedan utilizarse en el diagnóstico diferencial infecciones y lesiones con HPVs de cepas de alto y bajo riesgo.

Conclusiones II

- El análisis del patrón de reconocimiento de los anticuerpos monoclonales derivados de un animal inmunizado con el complejo E2C: site 35 LT-CX muestra que la mayoría de ellos reconoce diferencialmente epitopes discontinuos en la proteína E2C. En particular, de los 6 AcMos generados, sólo el AcMo ED23 demostró tener una alta reactividad contra las formas nativas y desnaturalizadas de la proteína.
- El ensayo de la reactividad de los AcMos anti-E2C contra una serie de péptidos derivados de la proteína muestra que sólo el AcMo ED23 reacciona positivamente en un ensayo de ELISA, indicando que es el único AcMo que está dirigido hacia un epitope lineal en la proteína.
- El mapeo del sitio de reconocimiento del AcMo ED23 por medio del análisis de la estructura de E2C y de ensayos de reactividad contra distintos péptidos indica que este anticuerpo reconoce un epitope localizado en el extremo C-terminal de la proteína, comprendiendo la última parte del loop que conecta la hélice $\alpha 2$ y la hebra $\beta 4$.
- Los ensayos de mapeo epitópico-funcional indican que de los 6 AcMos anti-E2C estudiados, 3 de ellos (grupo 1: ED5, ED12 y ED23) son capaces de formar un complejo ternario estable AcMo: E2C: site 35, sugiriendo que reconocen un epitope no relacionado a la superficie de unión a ADN dentro del factor de transcripción. Por otro lado, los otros 3 AcMos (grupo 2: ED13, ED15 y ED19) resultaron ser capaces de inhibir eficientemente la unión de E2C a su secuencia blanco site 35, sugiriendo que reconocen un epitope en, o cercano a, la superficie de unión a ADN dentro del factor de transcripción.
- Los estudios de estequimetría de unión de los distintos AcMos hacia el antígeno E2C señalan que los AcMos ED5, ED12 y ED23 reconocen un epitope repetitivo en E2C, determinando una estequimetría AcMo: E2C 2: 1. Por el contrario, los AcMos ED13, ED15 y ED19 estarían reconociendo un epitope único en la proteína, implicando una estequimetría de unión 1: 1. Estos estudios, además, demostraron que los AcMos que pertenecen a un mismo grupo reconocen epitopes total o parcialmente solapados entre sí mientras que los anticuerpos pertenecientes a grupos diferentes no compiten entre sí por la unión a E2C.
- Los estudios de espectroscopía de fluorescencia y cinética realizados sobre los

anticuerpos ED5 y ED23 muestran que sus constantes de afinidad por la proteína libre o unida a ADN son diferentes, debido, casi exclusivamente, a las diferencias en las velocidades de asociación. Estos resultados indican que ambos anticuerpos son capaces de percibir los cambios conformacionales sufridos por E2C al interactuar con su secuencia de reconocimiento específica. Estos resultados a la vez indican que los epítopos continuos (como el reconocido por el AcMo ED23) también pueden ser conformacionales.

- El estudio del efecto de la concentración salina en la unión de los AcMos ED15 y ED23 a la proteína E2C sugiere que las fuerzas electrostáticas son fundamentales en ambas interacciones. Este supuesto es particularmente significativo en el caso del AcMo ED15, el cual posee una notable cantidad de aminoácidos ácidos en los CDRs y regiones conservadas de sus regiones variables.
- Los anticuerpos monoclonales anti-E2C descritos en este capítulo pueden ser útiles para distintas aplicaciones, tanto en el diagnóstico de la infección con HPV como en la dilucidación de los mecanismos de acción de la proteína E2 en el ciclo de vida del virus.

AcMos anti-ADN

Caracterización de los AcMos anti-ADN

Formación de un complejo estable anti-ADN: site 35

Si bien ha sido descripto que los anticuerpos autoinmunes anti-ADN generados en ratones predispuestos a desarrollar lupus y los anticuerpos generados en los modelos de inmunización poseen características genéticas muy similares (14, 21, 22), la escasa caracterización bioquímica molecular realizada sobre estos anticuerpos imposibilita un análisis detallado sobre su especificidad fina y potencial carácter patofisiológico.

Como se describió en el capítulo de respuesta inmune humoral, la inmunización con el complejo proteína: ADN E2C: site 35 LT-CX indujo una fuerte respuesta policlonal anti-site 35 en ratones no-predispuestos a desarrollar autoinmunidad (ratones BALB/c). De la caracterización preliminar de un grupo de anticuerpos monoclonales generados a partir de uno de estos ratones surgió que dos de estos anticuerpos eran capaces de reconocer al oligonucleótido site 35 en un ensayo de ELISA, AcMos ED10 y ED84 (ver tabla II). El hecho de conocer *a priori* el antígeno que dio origen a estos anticuerpos permite estudiar en detalle la interacción entre dicho antígeno: el oligonucleótido site 35, y los AcMos que lo reconocen: ED10 y ED84. Así, este sistema se convierte en un modelo ideal para el estudio del modo de reconocimiento específico y unión a ADN por anticuerpos.

En la figura 23, se muestra el patrón de reactividades de los AcMos ED10 y ED84 contra distintos antígenos en un ensayo de ELISA. Como puede observarse en la figura, ED10 y ED84 reaccionan muy fuertemente contra el oligonucleótido site 35, ya sea libre o acompañado al dominio C-terminal de la proteína E2 de las cepas HPV-16 o su homóloga, BPV-1. Por el contrario, ninguno de los dos AcMos desplegó reactividad cruzada contra ninguno de los antígenos proteicos ensayados, incluyendo a la proteína E2C, la cual formaba parte del agente inmunógeno inductor de la respuesta anti-site 35. Este resultado a la vez coincide con el análisis preliminar realizado sobre el sobrenadante de cultivo de los hibridomas productores de los anticuerpos ED10 y ED84 (tabla II).

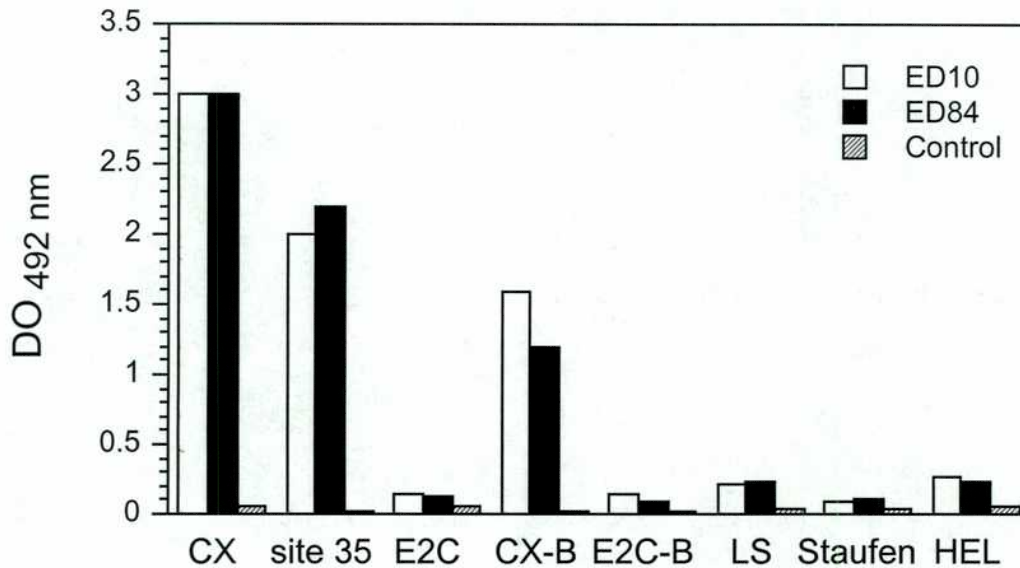


Figura 23. Reactividad en ELISA de los AcMos anti-ADN contra un panel de antígenos. Antígenos: CX, complejo E2C: site 35; site 35, secuencia de reconocimiento de E2C, oligonucleótido de 18pb; E2C: dominio C-terminal de E2 del HPV-16; CX-B, complejo E2C-B: site 35; E2C-B: dominio C-terminal de E2 del BPV-1; LS, Lumazina sintetasa de *Brucella abortus*; Staufen, proteína de *Drosophila*; HEL, lisozima de huevo de gallina. El líquido ascítico de los anticuerpos ED10 y ED84 se ensayó en una dilución 1/200. El suero de un animal no inmunizado fue utilizado como control en la misma dilución.

La interacción de los AcMos ED10 y ED84 con el oligonucleótido site 35 fue analizada posteriormente por ensayos de geles de retardo de la movilidad electroforética del oligonucleótido. Inicialmente, se utilizaron como sondas el oligonucleótido site 35 marcado con $\text{ATP}\gamma^{32}\text{P}$ o modificado con una molécula de FITC (FITC-site 35) en el extremo 5' de la cadena B. En la figura 24 se muestra que la incubación de los AcMos ED10 y ED84 con el oligonucleótido FITC-site 35 no produce ninguna alteración en el patrón de migración del ADN sonda (calles 4 y 5; resultados similares fueron obtenidos con la sonda radiactiva, datos no mostrados). Por el contrario, la incubación de E2C con FITC-site 35 produce un retardo de la banda del oligonucleótido, indicando la formación del complejo E2C: site 35 (calle 2). La formación del complejo ternario ED5: E2C: site 35 se muestra en la calle 3. La incapacidad de mantener el complejo AcMo anti-ADN: site 35 formado durante la corrida electroforética podría deberse a varias razones: 1, el efecto disociador que puede ejercer la corrida electroforética en sí misma sobre las dos moléculas interactuantes (61). 2, la modificación del extremo 5' de la cadena B del oligonucleótido site 35 podría disminuir la afinidad de los AcMos por el ADN sonda. 3, una suma de ambos eventos.

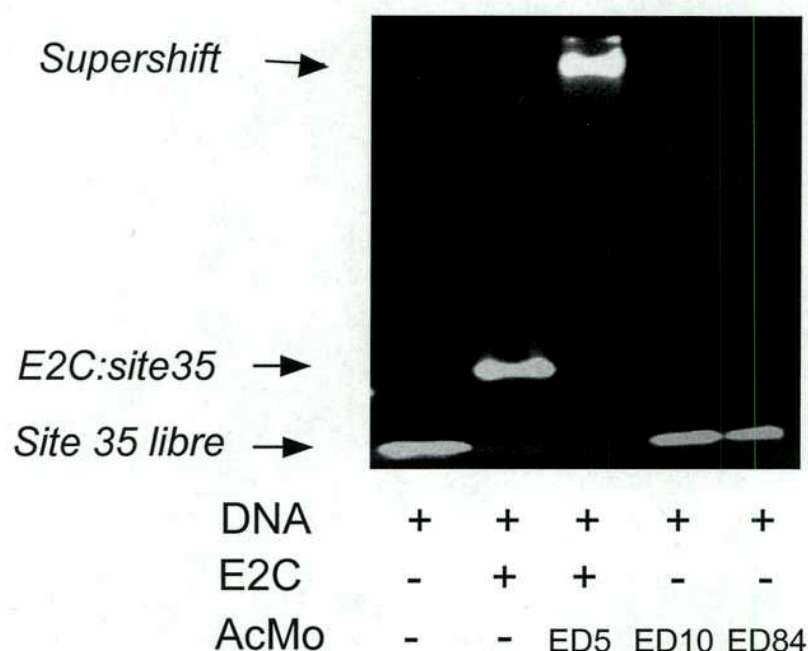


Figura 24: Análisis de la interacción de los AcMos anti-ADN con el oligonucleótido site 35 modificado. Una solución 3 μ M del oligonucleótido FITC-site 35 fue incubada con las proteínas E2C (3 μ M, calle 2), el complejo E2C: ED5 (3 y 6 μ M respectivamente, calle 3), ED10 (6 μ M, calle 4) y ED84 (6 μ M, calle 5) durante 30 min previo a la siembra. El patrón de migración de las bandas del oligonucleótido fluoresceinado se visualizó por transiluminación UV. Supershift: complejo ternario ED5: E2C: site 35.

Con el fin de evitar la utilización de un ADN modificado químicamente, se diseñó un ensayo de retardo en el cual se usó como sonda al oligonucleótido site 35 sin modificación, revelándose el patrón de migración del ADN por tinción con Bromuro de Etidio (ver figura 25). Como se observa en la figura, la incubación de ambos AcMos con el ADN sonda produce un marcado retardo de la migración del ADN, indicando que se ha formado un complejo estable anti-ADN: site 35 (panel A, líneas 2 y 3). Más aún, la formación del complejo es concentración dependiente, según lo manifiesta el incremento de la fluorescencia de la banda correspondiente al complejo al aumentar la concentración de anticuerpo (panel B, ED84 como ejemplo).

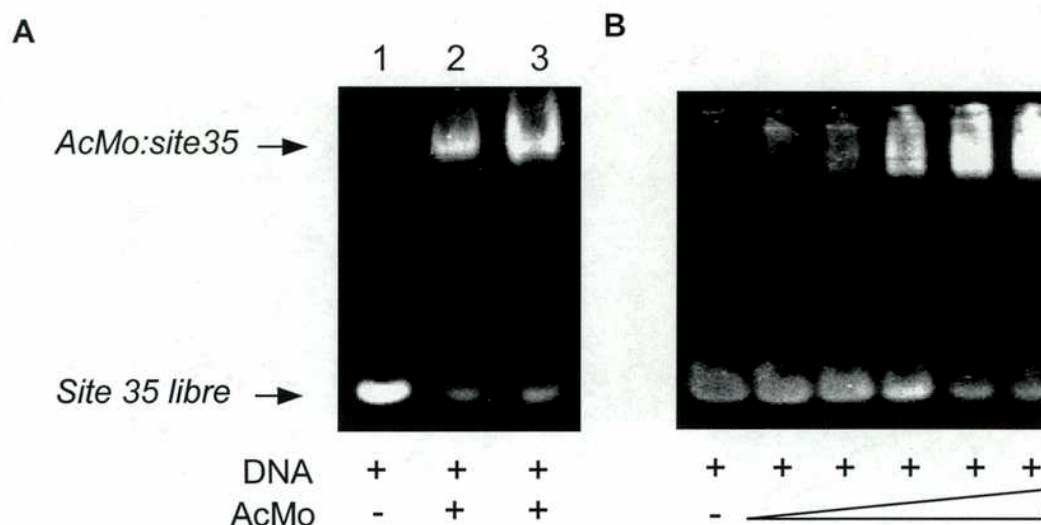


Figura 25: Formación del complejo anti-ADN: site 35 por EMSA. A, Interacción de ED10 y ED84 con el oligonucleótido site 35 sin modificación. El oligonucleótido site 35 (3 μM, calle 1) fue incubado con exceso de los Fabs ED10 (12 μM, calle 2) y ED84 (12 μM, calle 3) durante 30 min. B, La asociación de los AcMos anti-ADN con el antígeno site 35 es concentración dependiente. Calles: oligonucleótido site 35 (3 μM, calle 1), complejos site 35: ED84 (calles 2-6, 3 μM site 35, 0-12 μM Fab ED84). Resultados similares se obtuvieron con el Fab ED10 (no mostrado). Las bandas se visualizaron por transiluminación UV.

Estos resultados demuestran que los AcMos ED10 y ED84 son capaces de formar un complejo estable con el oligonucleótido site 35. El hecho de que no haya podido formarse esta clase de complejo cuando se utilizaron como sondas oligonucleótidos con el extremo 5' de la cadena B modificados, sugiere que este extremo podría estar formando parte del sitio de reconocimiento de ambos AcMos (ver más abajo).

Estequiometría de las interacciones anti-ADN: site 35

Una vez establecido que los anticuerpos anti-ADN ED10 y ED84 son capaces de formar un complejo estable con el oligonucleótido site 35 en un ensayo en solución, se determinó la estequiometría de unión de estos complejos AcMo anti-ADN: site 35 por espectroscopia de fluorescencia. Como se observa en el panel A de la figura 26, la fluorescencia intrínseca de triptófanos de los fragmentos Fab de los anticuerpos ED10 y ED84 se reduce entre un 30-40% en presencia del oligonucleótido site 35, mientras que la fluorescencia intrínseca de un Fab no relacionado (ED5) permanece invariable en las

mismas condiciones. Estos resultados indican que esta metodología es altamente sensible a los cambios de fluorescencia intrínseca sufridos por los anticuerpos anti-ADN al interaccionar con el oligonucleótido, convirtiéndose en una herramienta muy útil para la medición de sus estequiometrias de unión y constantes de disociación.

La determinación de la estequiometría de unión de los complejos Fab ED10: site 35 y ED84: site 35 se realizó por medio de curvas de titulación en el equilibrio, manteniendo constante la concentración de Fab y agregando cantidades crecientes del oligonucleótido. En ambos casos, el cambio de fluorescencia de los anticuerpos alcanza la saturación en una relación molar Fab: site 35 1:1 (panel B, ED84 como ejemplo). En estos experimentos también se observa que la unión de los dos anticuerpos alcanza la saturación en concentraciones menores o iguales a 50 nM, reflejando que ambos AcMos unen al oligonucleótido utilizado como antígeno con alta afinidad

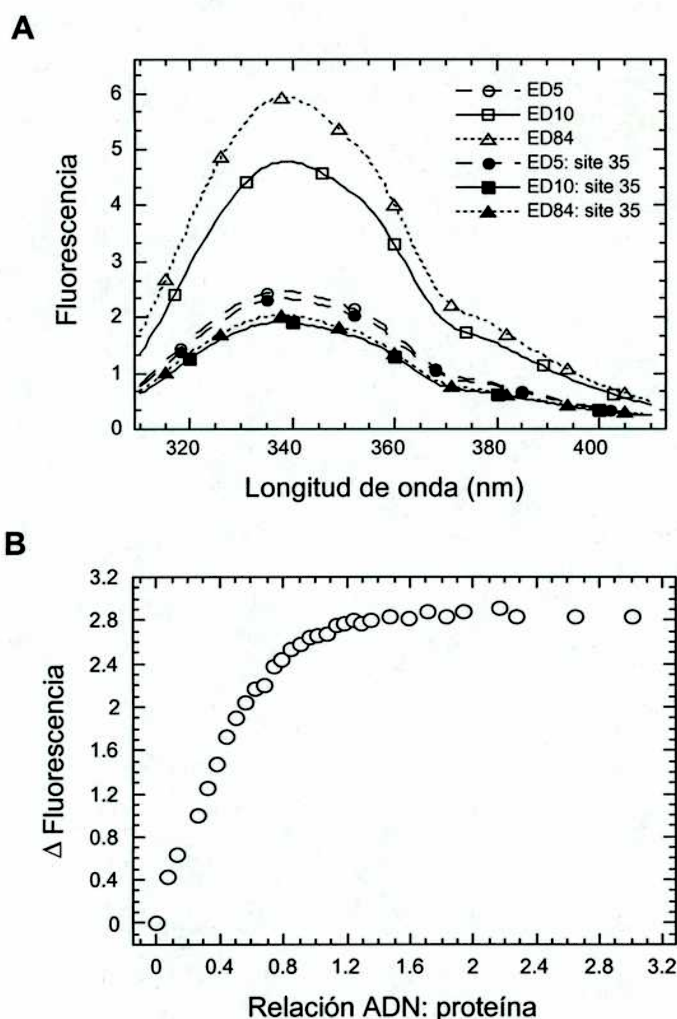


Figura 26. Interacción anti-ADN: site 35 por espectroscopia de fluorescencia. **A**, Cambio del espectro de fluorescencia de los AcMos ED10 y ED84 luego de la unión a ADN. El espectro de emisión de los anticuerpos (2 μ M Fab) fue registrado antes y después de la adición del ADN site 35 (2,5 μ M). Como control se utilizó el AcMo anti-E2C, ED5. **B**, Estequiometría de la interacción anti-ADN: site 35. Titulación estequiométrica de los fragmentos Fab de los AcMos anti-ADN con concentraciones crecientes del oligonucleótido site 35 (Fab ED84 como ejemplo, 50 nM). El cambio en la fluorescencia del Fab se midió luego de 5 min de la adición del ADN.

Determinación de las constantes de disociación anti-ADN: site 35

Una vez precisada la estequiometría de unión de los AcMos ED10 y ED84 al ADN site 35, se determinaron sus respectivas constantes de disociación en el equilibrio por la misma metodología. Un experimento típico de unión en estas condiciones se muestra en la figura 27. Los valores de K_D obtenidos fueron $0,73 \pm 0,07$ nM y $2,5 \pm 0,4$ nM para ED10 y ED84, respectivamente (tabla IV). Es interesante remarcar que la afinidad del ligando natural del oligonucleótido site 35, la proteína E2C, es levemente mayor que la desplegada por estos anticuerpos ($K_D = 0,2$ nM, medida por la misma metodología (61)). El hecho que el dominio C-terminal de la proteína E2 del papilomavirus bovino (BPV-1), el cual comparte una homología del 50% con su contraparte humana, tenga por esta secuencia de ADN una constante de disociación 300 veces más alta que la de los anticuerpos ED10 y ED84, refuerza aún más el juicio de alta afinidad que poseen estos AcMos anti-ADN.

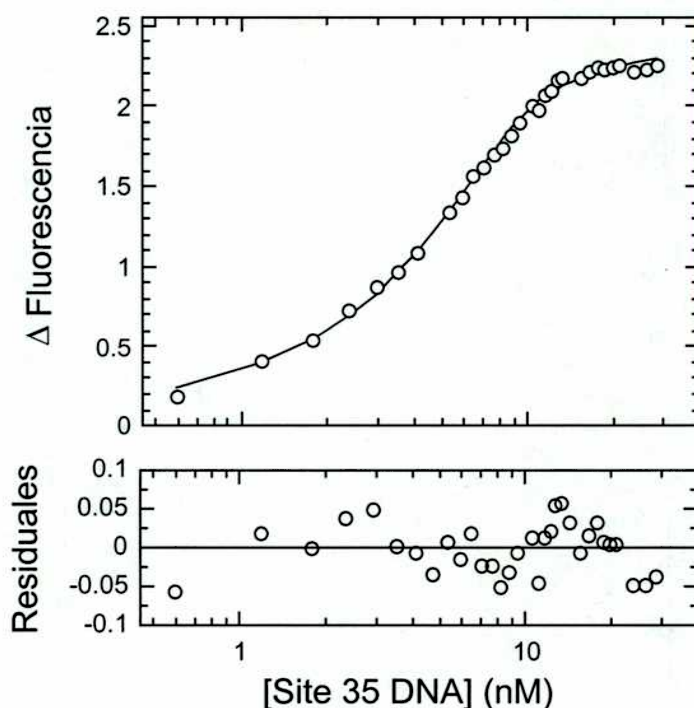


Figura 27. Determinación de las K_D de los AcMo ED10 y ED84 por espectroscopia de fluorescencia. Las K_D se determinaron en experimentos de titulación en condiciones cercanas a la disociación. En la figura se muestra la titulación del Fab ED10 (5nM) con el oligonucleótido site 35. Los datos fueron ajustados según la ecuación descrita en materiales y métodos. En el panel inferior se muestran los residuales. Los datos de unión de los dos anticuerpos con todas las secuencias de ADN ensayadas se muestran en la tabla IV.

Con el fin de corroborar la validez de las determinaciones realizadas por esta técnica, se determinaron estos mismos parámetros por medio de otra metodología, un ensayo de ELISA cuantitativo en solución (ver fundamento en la sección apéndice y materiales y métodos). En este caso, se incubaron una cantidad fija de IgG de ED10 y de ED84 con concentraciones crecientes del ADN site 35 y se reveló la cantidad de anticuerpo libre remanente luego de la incubación. Como puede observarse en la figura 28, la unión de los AcMos al oligonucleótido Bio-site 35 inmovilizado sobre la placa de ELISA disminuye a medida que aumenta la cantidad de site 35 utilizado como competidor. Del análisis de regresión lineal de estos datos se obtiene el valor de la K_D , siendo esta igual a $1,04 \pm 0,05$ y $1,91 \pm 0,08$ nM para ED10 y ED84, respectivamente (figura 28 y tabla V). Estos resultados concuerdan muy bien con los datos obtenidos por espectroscopia, no sólo en cuanto a su valor absoluto, sino también con respecto a la relación de afinidades entre los dos anticuerpos (ambas determinaciones coinciden en que ED10 tiene mayor afinidad que ED84 por el oligonucleótido). En resumen, ambos ensayos señalan que los dos anticuerpos tienen una afinidad destacadamente alta por esta secuencia de ADN.

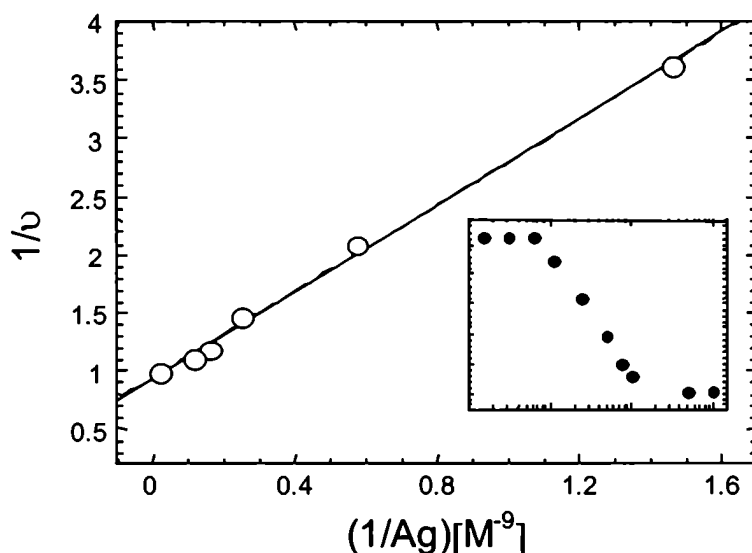


Figura 28. Determinación de las K_D de los AcMo ED10 y ED84 por ELISA cuantitativo. Las K_D de los anticuerpos anti-ADN contra el oligonucleótido site 35 se determinaron por ELISA. Una cantidad fija de anticuerpo (1,6 nM sitios de combinación) fue incubada con cantidades crecientes del oligonucleótido en solución y luego se reveló la cantidad de IgG unida al oligonucleótido Bio-site 35 retenido en la placa sensibilizada con Estreptavidina. Inserto, la unión de los AcMos anti-ADN al oligonucleótido Bio-site 35 disminuye con el incremento de la cantidad de ligando (site 35 libre). Los datos fueron transformados y graficados como $1/b$ vs $1/Ag$ (Klotz) y el valor de K_D se obtuvo de la pendiente de la recta del gráfico.

Si bien conocer el modo de reconocimiento y especificidad de los auto-anticuerpos anti-ADN es crítico para el entendimiento de su biología, el desconocimiento de su estímulo inmunogénico inicial crea una gran limitación experimental en la profundización de estos estudios. En general, en la determinación de las constantes de disociación o constantes observadas de los anticuerpos anti-ADN derivados de ratones con lupus se utilizan secuencias de ADN, ya sean simple o doble cadena, de largo y composición definidos arbitrariamente (117-119). Por este motivo, es de esperar que las afinidades atribuidas a estos anticuerpos sean sustancialmente más bajas que las que en realidad tendrían por el agente inmunogénico que los originó.

Como se describió más arriba, la interacción de los AcMos ED10 y ED84 con oligonucleótidos site 35 portando una modificación en el extremo 5' de la cadena B se ve seriamente impedida en un ensayo de EMSA, sugiriendo que este extremo del oligonucleótido doble cadena podría estar formando parte del epítopo reconocido por ambos anticuerpos. Con el fin de caracterizar con mayor detalle el sitio de reconocimiento de estos anticuerpos dentro del oligonucleótido doble cadena, se hizo uso de la gran sensibilidad de la espectroscopia de fluorescencia para estudiar la interacción de los anticuerpos con el oligonucleótido site 35 modificado químicamente y con oligonucleótidos de secuencias diferentes.

Primeramente, se determinaron las constantes de disociación en el equilibrio contra el oligonucleótido PB-site 35 (contiene un grupo fosfato en el extremo 5' de la cadena B). Como puede verse en la tabla IV, la fosforilación de site 35 produce un aumento del valor de K_D de 20 y 50 veces para ED10 y ED84, respectivamente. Por el contrario, la modificación del extremo 5' de la cadena A de este mismo oligonucleótido (RhoA-site 35) no afecta en absoluto la afinidad de los AcMos. Estos resultados explican, al menos en parte, la imposibilidad de obtener el complejo anticuerpo anti-ADN: site 35 en el ensayo de EMSA realizado con la sonda radioactiva. El efecto negativo de la modificación del extremo 5'-OH de la hebra B en el evento de unión podría interpretarse de dos formas: 1, este extremo forma parte del epítopo reconocido por ED10 y ED84; 2, la fosforilación de este extremo produce cambios en la estabilidad o conformación del oligonucleótido, afectando así la interacción en el equilibrio. Si bien a esta altura es imposible discriminar entre estas dos hipótesis, la segunda de ellas no parece explicar el hecho que la afinidad de los anticuerpos por el oligonucleótido RhoA-site 35 sea la misma que por el ADN sin modificar, sugiriendo que la primera hipótesis es

la que mejor ilustra el fenómeno.

Tabla IV. Discriminación de secuencias y constantes de disociación de los AcMos anti-ADN ED10 y ED84

ADN	ED10		ED84	
	K_D [nM]	D^a	K_D [nM]	D
DNAdc^b				
Site 35	$0,73 \pm 0,07$	1,0	$2,52 \pm 0,38$	1,0
RhoA-Site 35	$0,57 \pm 0,09$	0,8	$3,83 \pm 1,78$	1,5
PB-Site 35	$13,7 \pm 1,1$	19	122 ± 11	48
Site 7450	$2,1 \pm 1,1$	2,9	$5,6 \pm 1,6$	2,2
ARC	$158 \pm 0,3$	217	$344 \pm 0,6$	136
CRE	$208 \pm 0,2$	285	$316 \pm 0,3$	125
EBNA	973 ± 150	1333	1200 ± 153	476
V _H ratón	^c		1526 ± 244	605
HPV-16 2300	$265 \pm 0,3$	362	$444 \pm 0,4$	176
DNAsc				
A-Site 35	15100 ± 8757	20561	7570 ± 2327	3004
B-Site 35	$0,11 \pm 0,075^d$	0,11	$0,05 \pm 0,024^d$	0,05
ARC	895 ± 109	1226	2957 ± 757	1173
HPV-16 2300	579 ± 70	794	1074 ± 145	426

Las constantes de disociación en el equilibrio se determinaron como se describió en la figura 27. ^a El factor de discriminación D es la tasa $K_{D \text{ no-especifico}} / K_{D \text{ site35-18}}$. ^b Las secuencias de estos oligonucleótidos están mostrados en la figura 29. ^c La interacción de ED10 con este oligonucleótido resultó ser muy débil, lo cual dificultó el ajuste. ^d El alto error de estas determinaciones se debe a que se realizaron en el límite de la sensibilidad de la técnica (concentración de Fab menor a 5 nM), indicando que el valor de la K_D de los AcMos por este oligonucleótido es mucho menor a la desplegada contra site 35 doble cadena. PB-site 35: oligonucleótido site 35 de 18 pb con un grupo fosfato en el extremo 5' de la hebra B.

Especificidad de los AcMos anti-ADN

La región reguladora no-codificante del genoma del HPV-16 contiene cuatro sitios

de reconocimiento del factor de transcripción E2 a los cuales esta proteína se une con altísima afinidad, a pesar de poseer una gran similitud entre sí (49). El hecho que los AcMos anti-ADN posean una afinidad tan alta por el oligonucleótido site 35, acercándose a la de su ligando natural E2C, planteó como interrogante si estos AcMos poseían un poder de discriminación de secuencias tan fino como el del factor de transcripción. Con el fin de conocer la respuesta a esta pregunta, se realizaron experimentos de unión en solución de estos AcMos con uno de los sitios de reconocimiento de E2, el oligonucleótido site 7450 (figura 29, panel A). La determinación de la K_D de estas interacciones demuestra que la afinidad de los AcMos por este oligonucleótido es 2–3 veces menor que la desplegada contra site 35 (tabla IV). Estos resultados advierten que ED10 y ED84 son capaces de discriminar entre ambos oligonucleótidos, a pesar de diferir tan sólo en una base en su secuencia (comparar las secuencias de site 35 y site 7450, ver figura 29).

Como paso siguiente en el estudio de la capacidad discriminatoria de estos AcMos, se determinaron las K_D de estos anticuerpos contra una serie de oligonucleótidos palindrómicos y no-palindrómicos del mismo largo que site 35 (ver panel A, figura 29). Como se muestra en la tabla IV, las afinidades de los AcMos contra la mayoría de las secuencias probadas son marcadamente menores que la del oligonucleótido site 35, con factores de discriminación ($K_{Dno-específico}/K_{Dsite35}$) en un rango de 125–1.400 (panel B). Del análisis de los valores de K_D presentados en la tabla IV surge que ED84 se une con 3 veces menos afinidad que ED10 al ADN específico site 35, pero une a todos los otros oligonucleótidos ensayados (ya sean simple o doble cadena) con mayor afinidad. Estos resultados sugieren que la ligeramente menor afinidad de ED84 por site 35 podría estar eventualmente ligada a una menor capacidad de discriminación, siendo esta entre 2–7 veces menor que la de ED10 (D_{ED10}/D_{ED84}), dependiendo de la secuencia del ADN.

A

site 35-18bp:	5' -GTAACCGAAATCGGTTGA-3'
site 35-26bp:	5' -AGCTTCAACCGAATTTCGGTTGCATGC-3'
site 7450-18bp:	5' -GTAACCGAATTTCGGTTGA-3'
ARC:	5' -ATGATAGAAGCACTCTACTAT-3'
CRE:	5' -AAATTGACGTCATGGTAA-3'
EBNA:	5' -GGGTAGCATATGCTACCC-3'
V _H mouse:	5' -GCTACTGGCTACACATTC-3'
HPV-16 2300:	5' -GCTAACACAGGTAAATCA-3'

B

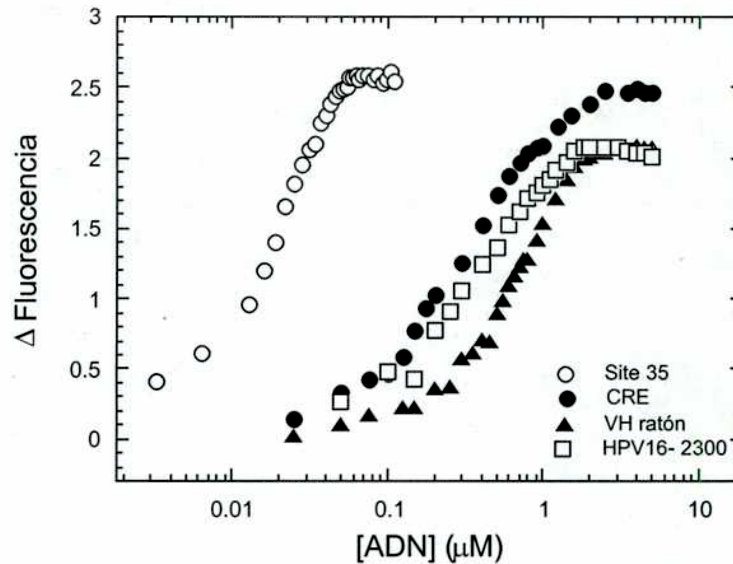


Figura 29. Discriminación de secuencias de los AcMos anti-ADN. A, Secuencias de ADN de varios oligonucleótidos utilizados en los experimentos de unión. Site 35: sitio de reconocimiento de E2C HPV-16; site 4750: sitio de reconocimiento de E2C HPV-16; ARC: secuencia específica del operador para el represor de Arc; CRE: elemento de respuesta al AMPc; EBNA: sitio de unión del antígeno nuclear del virus Epstein-Barr; V_H ratón: secuencia al azar dentro de un gen murino; HPV-16 2300: secuencia al azar dentro del genoma del HPV-16. B, Gráfico logarítmico de la unión del Fab ED84 (0,1 μM) a distintos oligonucleótidos doble cadena.

El hecho que los anticuerpos anti-ADN ED10 y ED84 reconozcan específicamente al sitio de unión de E2C, el oligonucleótido site 35, no implica que ellos reconozcan la secuencia consenso de E2, *i.e.* ACCGN₄CGGT, de la misma manera que lo hace la proteína viral. Los AcMos podrían estar reconociendo parte de esta secuencia consenso y parte de la región flexible (N₄), como lo sugiere la caída en la afinidad de ambos anticuerpos al cambiar una de estas bases (comparar site 35 y site 7450). Además, las constantes obtenidas contra los oligonucleótidos modificados (RhoA-site 35 y PB-site 35) sugieren que el extremo 5' de la cadena B podría estar involucrada en el reconocimiento.

Estudios posteriores sobre el modo en el que el AcMo ED10 reconoce al oligonucleótido site 35 han demostrado que la afinidad de este anticuerpo disminuye al modificarse el largo del oligonucleótido (120). En particular, las K_D contra oligonucleótidos conteniendo la secuencia de site 35 pero con 5 bases de más o de menos que el ADN utilizado en el plan de inmunización (oligonucleótido de 18 pb), son sólo dos veces más altas que la K_D contra el oligonucleótido de 18 pb. Por el contrario, la afinidad hacia oligonucleótidos muchos más largos (de hasta 166 pb) o mucho más cortos (10 pb)

son entre 10 y 20 veces menores. Estos resultados se correlacionan, a la vez, con la estabilidad térmica de los oligonucleótidos, estableciéndose que la afinidad del anticuerpo cae a medida que aumenta la estabilidad del oligonucleótido (cuanto más largo es el oligonucleótido más estabilidad térmica posee). Por otro lado, el hecho que la afinidad de este anticuerpo contra el oligonucleótido de 10 pb sea 5 veces menor que contra el ADN de 12 pb indica que no sólo la estabilidad, sino también la secuencia del oligonucleótido contribuye al reconocimiento.

En todo caso, estudios estructurales posteriores permitirán establecer el epítopo reconocido por estos anticuerpos, la elaborar comparaciones a nivel atómico sobre el modo en el que dos proteínas evolutiva y funcionalmente distintas, anticuerpos y factores de transcripción, reconocen e interaccionan con una misma secuencia de ADN.

Efecto de la sal en la interacción site 35: anti-ADN

La mayoría de los equilibrios proteína: ADN son altamente sensibles a los cambios en la concentración salina, observándose una disminución de sus constantes de equilibrio a medida que aumenta la concentración salina del entorno (121). Generalmente, este fenómeno está relacionado con la liberación de contra-iones de la superficie del ADN (122). Con el fin de profundizar el estudio de la interacción de los AcMos anti-ADN al ADN, se realizaron curvas de titulación de la fluorescencia intrínseca de los anticuerpos en dos concentraciones de sal diferentes (figura 30 A). Como puede observarse en la figura, las curvas de titulación realizadas a alta y baja concentración salina (1,0 y 0,15 M, respectivamente) se superponen casi completamente, indicando que la interacción de los AcMos anti-ADN es insensible a la presencia de sales. La independencia de la constante de disociación de ambos anticuerpos con la concentración de NaCl fue demostrada en condiciones experimentales similares (120).

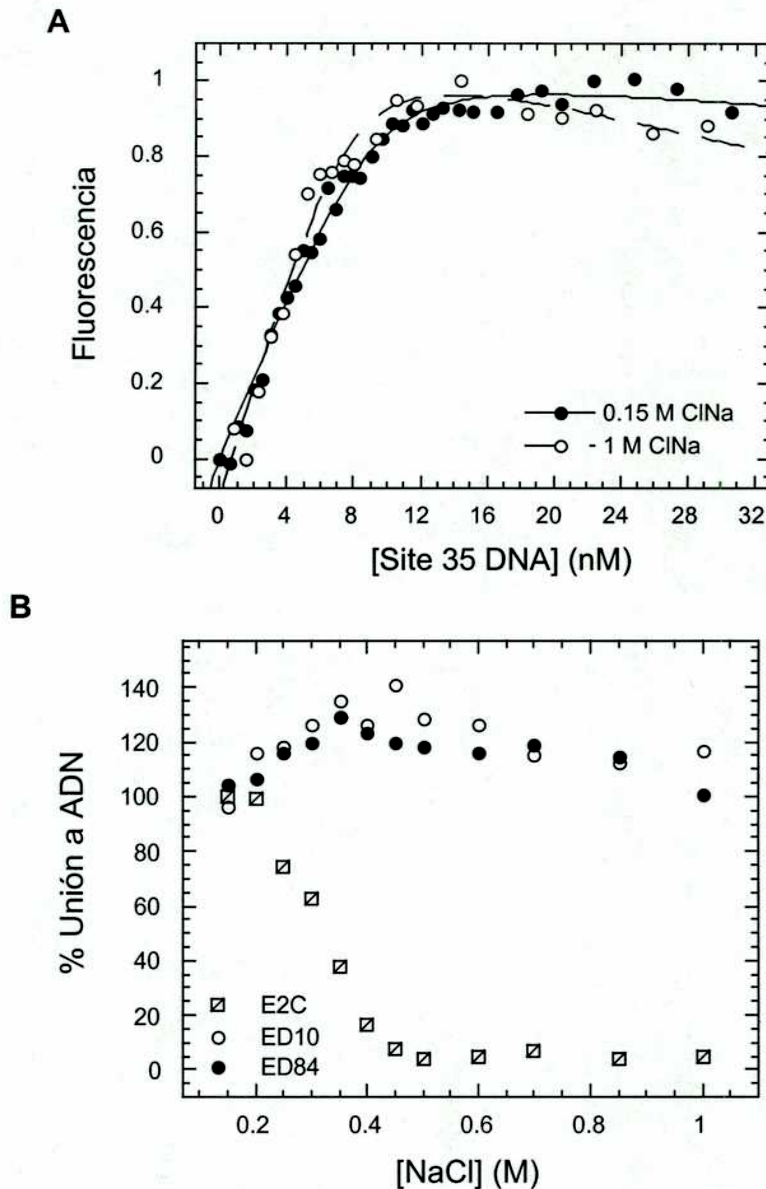


Figura 30. La interacción anti-ADN: site 35 es insensible a los efectos de la sal. A Efecto de la sal en la interacción anti-ADN: site 35 por fluorescencia. Titulaciones de fluorescencia intrínseca de triptófano de los fragmentos Fab de los AcMos anti-ADN con el oligonucleótido site 35 (Fab ED84 como ejemplo, 10 nM) en buffer TBS 0,15 M y 1 M NaCl. B, El efecto del NaCl en la interacción del factor de transcripción E2C y de los AcMos ED10 y ED84 con el oligonucleótido Bio-site 35 fue determinado por un ensayo de ELISA. Los distintos complejos proteína: ADN se incubaron durante 10 min en solución con concentraciones crecientes de NaCl (0.15-1 M).

Dado que altas concentraciones salinas pueden introducir artefactos en la medición de la fluorescencia intrínseca de triptófanos, se desarrolló un sencillo ensayo de ELISA para evaluar por otra metodología el efecto del aumento de la concentración

salina en la estabilidad de los complejos anti-ADN: site 35. Como se observa en el panel B de la figura 30, la interacción de los AcMos ED10 y ED84 con el oligonucleótido site 35 se mantiene completamente estable a altas concentraciones salinas, manteniéndose formado el 100% del complejo a concentraciones iguales a 1 M NaCl. Por otro lado, concentraciones de NaCl superiores a 0,5 M son suficientes para disociar completamente al complejo E2C: site 35.

Estos resultados sugieren que la contribución las fuerzas electrostáticas no es importante en la interacción de estos AcMos anti-ADN con el ADN site 35, siendo este fenómeno muy distinto al que ocurre con la mayoría de las proteínas que unen ADN (121).

El análisis de las secuencias de las regiones variables de ED10 y ED84 indica que estos anticuerpos poseen rasgos normalmente encontrados en los anticuerpos anti-ADN obtenidos de modelos de autoinmunidad y de inmunización con complejos hapteno-carrier. Estos rasgos son: origen oligoclonal, genes V_H pertenecientes a la familia J558, extensivas mutaciones somáticas, entre otros. (123).

Como se observa en la figura 31, ambos anticuerpos poseen exactamente la misma composición aminoacídica en los CDRs 1 y 3 de la cadena pesada. Esta última observación es notablemente llamativa, dado que la estructura genética del CDR3 es producto de la recombinación de tres genes distintos (V-D-J). Al analizar las secuencias, se encuentra que estos anticuerpos presentan una alta proporción de aminoácidos aromáticos en el CDR3 de sus cadenas pesadas (4 de 8 residuos). La presencia de varios residuos aromáticos en los CDRs coincide con la observación previa de la escasa o nula influencia de la concentración salina en la interacción de estos AcMos con site 35, sustentando la idea que las fuerzas hidrofóbicas son las principales mediadoras de la interacción. Estas conclusiones se ven apoyadas por el trabajo de Di Pietro et al (120), en el cual se demuestra por medio de técnicas espectroscópicas UV que el oligonucleótido, al interaccionar con los anticuerpos ED10 y ED84, sufre severos cambios conformacionales, los cuales permitirían un mayor contacto hidrofóbico entre las bases del ADN y las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos de las cadenas V_H de los AcMos.

REGION VARIABLE DE LA CADENA PESADA

```

1-----FR1----- -CDR1- -----FR2----- -CDR2-----
VHF102 QIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFT DYYIN WVKQKPGQGLEWIG WIYPGSGNTKYNEKFKG
ED10   EV EE                               LR           V   --I       D
ED84   V                                     D I S

67-----FR3----- -CDR3- -----FR4-----
VHF102 KATLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDYAVYFCAR
ED10   A   IV H   D N   T WTYGSSFDY WGQGTITVTVSS
ED84   S       V       I T WTYGSSFDY WGQGTITVTVSS

```

REGION VARIABLE DE LA CADENA LIVIANA

```

1-----FR1----- -CDR1- -----FR2----- -CDR2--
IGKV-cr1 DVLMTQTPLSLPVSIGDQASISCRS SQSIVHSNGNTYLE WYLQKPGQSPKLLIY KVSNR
ED10     P

61-----FR3----- -CDR3- -----FR4-----
IGKV-cr1 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKLSRVEAEDLGYYC
ED10     FQGSHIPLTFGAG TKLDVTKRS

1-----FR1----- -CDR1- -----FR2----- -CDR2--
f112     DIQMTQSPASLSASVGETVTITC GASENIYGALN WYQRKQGKSPQLLIY GATNLAD
ED84     L           K   S   ET           V

57-----FR3----- -CDR3- -----FR4-----
f112     GMSRFRSGSGSGRQYSLKISSLHPDDVATYYC
ED84     C           QNVLSTPYT FGGGTKLEIKR

```

Figura 31. Secuencia de aminoácidos de las regiones variables de las cadenas pesada y liviana de los AcMos anti-ADN. Comparación de las secuencias V_H y V_L del AcMo ED10 y ED84 con sus respectivas líneas germinales (VHF102 (123), IGKV-cr1 y f112 (104), respectivamente). Los genes de la línea germinal se asignaron utilizando la base de datos de BLAST (107).

La acumulación de argininas en el CDR3 de la cadena pesada de los anticuerpos anti-ADN suele ser considerado un rasgo característico de estos anticuerpos, normalmente relacionado con su capacidad de unir ADN con mayor afinidad y especificidad (10, 25). Por este motivo, el hecho que ninguno de los dos AcMos (ED10 y ED84) presente una gran cantidad de aminoácidos básicos en el CDR3 de sus cadena pesadas puede parecer curioso. Sin embargo, otras mutaciones ligadas a la maduración de la afinidad han sido encontradas, aún en las regiones conservadas FR (124), haciendo evidente que la correlación entre reemplazo de aminoácidos y maduración de la afinidad de anticuerpos anti-ADN aún no está claramente elucidada.

Contrariamente a lo ocurrido con la región V_H , ED10 y ED84 difieren sustancialmente en las secuencias de las regiones variables de las cadenas livianas (V_L s). Como se muestra en la figura 31, las cadenas V_L de estos dos AcMos pertenecen a familias distintas (IGKV-cr1 en ED10 y f112 en ED84 (104)), hecho que también señala que estos dos anticuerpos son el producto de la asociación de cadenas livianas y pesadas

diferentes. Esta observación, junto con la similitud de la región V_H (especialmente en el CDR3), tanto en su secuencia como en el patrón de mutaciones, son una evidencia indiscutible de que estos anticuerpos son el resultado de un proceso de maduración de la afinidad ocurrido en una respuesta inmune fuertemente dirigida por el antígeno (el complejo LT-CX).

Etiología de los AcMos anti-site 35

Los anticuerpos anti-ADN suelen generalmente ser clasificados según su patrón de reactividad como anticuerpos anti-ADN simple cadena o doble cadena. En general, los anticuerpos anti-ADN doble cadena son considerados como el rasgo distintivo de la enfermedad LES, aunque en el suero de pacientes con lupus también suele encontrarse una gran proporción de anticuerpos reactivos contra ADN de cadena simple (18). Como se describió en la introducción, hasta el presente no hay evidencias robustas sobre el origen de los anticuerpos anti-ADNdc, postulándose que estos pueden ser producidos por células B con especificidad inherente por ADNdc que escaparon del proceso de selección negativa en la médula ósea (26), o el resultado de un proceso de maduración de la afinidad ocurrido en células B productoras de anticuerpos anti-ADN simple cadena presentes en el repertorio inicial (10, 11, 21). Dentro de este marco, el hecho de conocer *a priori* el agente inmunógeno promotor de una respuesta inmune anti-ADN tan fuerte como la descrita en este trabajo, permite analizar la etiología de los anticuerpos anti-ADN producidos en ella. Por este motivo, se estudió si los AcMos ED10 y ED84 eran capaces de unir ADN simple cadena, evaluando su reactividad contra por las hebras A y B del oligonucleótido site 35.

En la figura 32, se muestra que ED10 y ED84 unen al oligonucleótido site 35 doble cadena y a sus hebras A y B con un patrón de discriminación muy similar entre sí. Sorprendentemente, ambos AcMos unen a la cadena B de site 35 con una afinidad aún mayor que la desplegada contra el oligonucleótido doble cadena, K_D $0,11 \pm 0,075$ y $0,05 \pm 0,024$ para ED10 y ED84, respectivamente (tabla IV, el alto error de estas mediciones se debe a que la técnica se encuentra en el límite de la sensibilidad para esta interacción). Por el contrario, la afinidad de estos anticuerpos contra la hebra A es notablemente

menor, teniendo un factor de discriminación entre 3 y 4 órdenes de magnitud más alto que el del oligonucleótido doble cadena. Más aún, los AcMos tienen una afinidad más alta hacia secuencias de ADN simple cadena no relacionadas que por la cadena A de site 35 (tabla IV). El hecho que los AcMos ED10 y ED84 tengan una afinidad tan alta por la cadena B del oligonucleótido explica, al menos parcialmente, la caída de la afinidad de los dos AcMos al interaccionar con el oligonucleótido site 35 portando una modificación en el extremo 5' de la cadena B, no así de la cadena A (tabla IV).

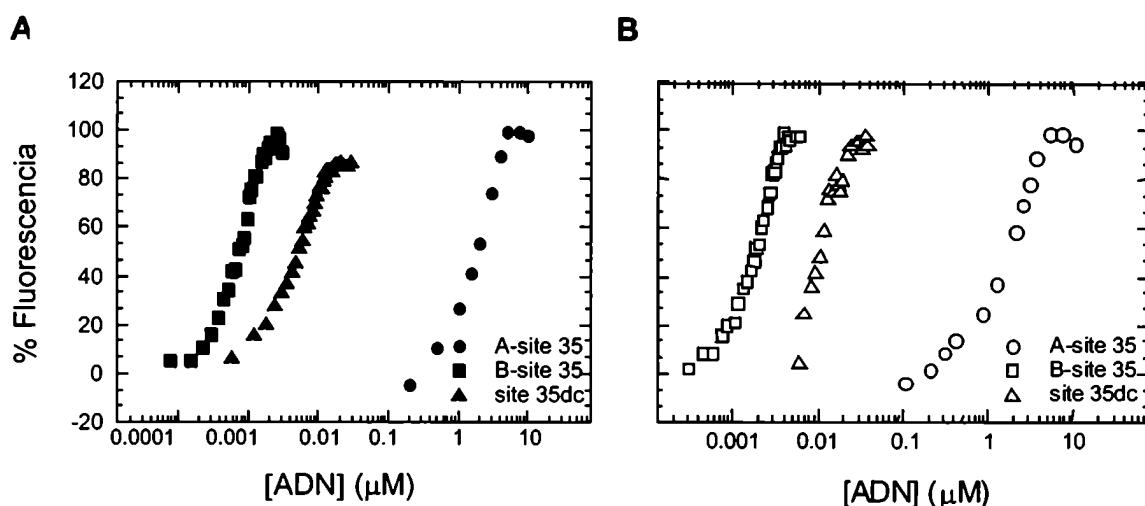


Figura 32. Unión de los AcMos ED10 y ED84 al site 35 doble y simple cadena. Comparación de las curvas de unión de los anticuerpos anti-ADN ED10 (A) y ED84 (B) al antígeno site 35 doble cadena y a cada una de las dos hebras que forman este oligonucleótido (A-Site 35 y B-Site 35) por fluorescencia.

El hecho que estos anticuerpos anti-ADN tengan una afinidad tan alta por una de las dos hebras que conforma el oligonucleótido doble cadena utilizado como antígeno, sugiere fuertemente que la evolución de la respuesta inmune contra el complejo E2C: site 35 condujo a las células B productoras de anticuerpos anti-ADN simple cadena (anti-site 35B, en este caso) a adquirir la capacidad de unir ADN doble cadena como resultado de un proceso de maduración de la afinidad. Esta conclusión coincide con la observación que las regiones variables de estos dos anticuerpos poseen estructuras genéticas y un patrón de mutaciones muy similar al observado en los anticuerpos generados de modelos de autoinmunidad y de inmunizaciones transportador-hapteno (11, 21-23, 125). Por otro lado, la posibilidad de que estos anticuerpos estén reconociendo estructuras doble cadena dentro de la hebra B no pueden descartarse. La reactividad cruzada de anticuerpos anti-

ADN doble cadena con ADN simple cadena es un fenómeno comúnmente observado (126). Durante el proceso de desnaturalización del ADN pueden formarse pequeños tramos de estructuras doble cadena. Los epitopes formados por estas estructuras doble cadena dentro del ADNdc desnaturalizado o ADNsc, son completamente diferentes a los epitopes presentes en moléculas de ADNdc nativas. Las estructuras doble cadena originadas en el ADNdc desnaturalizado o en el ADNsc son mucho más flexibles que las presentes en moléculas de ADNdc, permitiéndole adoptar distintas conformaciones e interactuar con los anticuerpos específicos por ADNdc (126, 127). Este fenómeno es el que mejor explica la reactividad contra ADNsc observada en muchos sueros o anticuerpos con especificidad por ADNdc. En este sentido, la formación de este tipo de estructuras doble cadena internas y altamente flexibles en las hebras A y B del oligonucleótido site 35 no pueden descartarse, más aún al considerar que este oligonucleótido posee una secuencia palindrómica. Esta observación plantea que la altísima afinidad de los AcMos ED10 y ED84 contra la cadena B del oligonucleótido site 35 podría también atribuirse a la formación de estructuras doble cadena. Igualmente, ciertos determinantes característicos de la secuencia de esta hebra parecen ser claramente necesarios para el reconocimiento específico de ambos anticuerpos.

Formación del complejo ternario E2C: site 35: anti-ADN

Dado que el inmunógeno que dio origen a esta respuesta inmune anti-ADN fue el complejo proteína: ADN E2C: site 35, era interesante estudiar si los AcMos eran capaces de reconocer al oligonucleótido site 35 acomplejado a E2C. Alternativamente, el hecho que tanto los AcMos ED10 y ED84 como el factor de transcripción E2C reconozcan la misma secuencia de ADN con afinidades comparables plantea como interrogante si los AcMos son capaces de provocar la disociación del complejo E2C: site35. Con la finalidad de discriminar entre estas dos posibilidades, se realizó un ensayo de ELISA en solución en el cual se incubó al complejo E2C: Bio-site 35 (relación molar 1:1, 20 nM) con concentraciones crecientes de las IgG de ED10 y ED84 (0-120 nM) en solución, y luego se transfirió esta mezcla a una placa de ELISA sensibilizada con estreptavidina. Posteriormente se reveló la presencia de E2C y de IgG anti-ADN en forma paralela. La unión de E2C al oligonucleótido se reveló a través del anticuerpo ED5 conjugado a

peroxidasa (HRPO-ED5). Los resultados de este ensayo se muestran en la figura 33 (ED84 como ejemplo. Resultados similares se encontraron con el AcMo ED10).

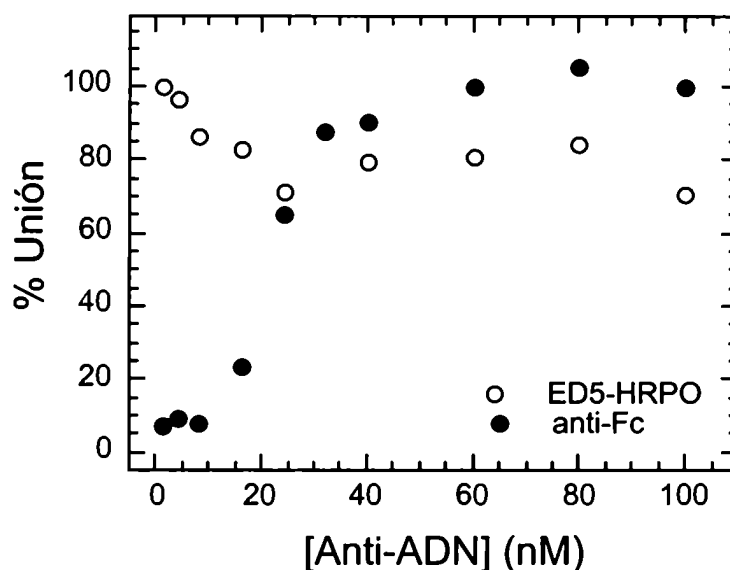


Figura 33. Formación del complejo ternario anti-ADN: site 35: E2C. La interacción de los AcMos ED10 y ED84 con el complejo E2C: site 35 fue analizada por ELISA. Una mezcla estequiométrica de E2C y el oligonucleótido Bio-site 35 (20 nM cada uno) fue incubada con concentraciones crecientes de las dos IgGs anti-ADN en solución (rango utilizado 0–100 nM sitios de combinación, ED84 se muestra como ejemplo). La presencia de E2C en cada pocillo fue revelada por medio del AcMo ED5-HRPO (ver materiales y métodos). Unión 100% anti-Fc corresponde al pocillo sin agregado de E2C en la máxima concentración de IgG anti-ADN utilizado.

Como se muestra en la figura, a medida que la concentración de IgG anti-ADN aumenta, la unión de E2C al oligonucleótido site 35 permanece casi invariable, indicando que la adición de anticuerpo no perturba la interacción E2C: site 35. Por el contrario, este resultado demuestra que el agregado de cantidades crecientes de anticuerpo anti-ADN produce la formación de un complejo ternario estable, observado por el incremento concentración dependiente de la señal correspondiente al AcMo y el mantenimiento casi total de la señal correspondiente a E2C.

Una vez establecido que los AcMos ED10 y ED84 son capaces de formar un complejo ternario estable con el complejo proteína: ADN utilizado como inmunógeno, se determinaron las K_D de ambos anticuerpos contra el oligonucleótido unido a la proteína E2C. Las constantes de disociación se determinaron por medio de un ELISA cuantitativo, similar al utilizado anteriormente para determinar las constantes de estos anticuerpos contra site 35 libre. Como se muestra en la tabla V, los valores de las K_D de ambos

anticuerpos contra el oligonucleótido acomplejado a la proteína son prácticamente iguales a los determinados contra site 35 libre, indicando que la presencia del factor de transcripción no ejerce ningún tipo de efecto en la interacción de los anticuerpos con el oligonucleótido. Lamentablemente no pudieron determinarse estas constantes por técnicas espectroscópicas debido a la contribución de fluorescencia intrínseca de la proteína E2C.

Tabla V. Análisis comparativo de las constantes de disociación de los AcMos anti-ADN contra distintos antígenos

AcMo	Site 35 ^a	Site 35 ^b	E2C: site 35 ^b
ED10	0,73 ± 0,07	1,04 ± 0,05	1,85 ± 0,05
ED84	2,52 ± 0,38	1,91 ± 0,08	1,92 ± 0,08

^a Las constantes de disociación (nM) fueron determinadas por experimentos de titulación por espectroscopia de fluorescencia. ^b Las constantes de disociación (nM) fueron determinadas por ELISAs cuantitativos (ver materiales y métodos).

El hecho que ED10 y ED84 reconozcan al oligonucleótido site 35 acomplejado a E2C con altísima afinidad es consistente con todos los resultados previos, que indican que estos anticuerpos fueron originados en una respuesta inmune en la cual el estímulo antigénico (complejo E2C: site 35) se mantuvo sostenido en el tiempo.

Características inmunogénicas del complejo E2C: site 35

Como una primera forma de caracterizar la superficie antigénica del complejo E2C: ADN, se evaluó si la interacción de E2C con site 35 bloquea alguno de los epitopes de E2C, caso en el que se observaría una sobre-representación de anticuerpos anti-E2C dirigidos contra la superficie libremente expuesta de la proteína en el complejo macromolecular. En este caso, a modo de representación de lo ocurrido durante la respuesta inmune policlonal, se comparó la proporción de anticuerpos con reactividad tipo ED5 en hibridomas derivados de ratones inmunizados con E2C libre o unida a ADN

(planes de inmunización E2C/MPL y CT-CX/MPL, respectivamente). Se midió entonces, la inhibición de la unión del anticuerpo ED5 marcado con peroxidasa (HRPO-ED5) en los sobrenadantes de hibridomas incubados en placas de ELISA sensibilizadas con E2C. Este ensayo arrojó como resultado que aproximadamente el 40% de los sobrenadantes de hibridoma derivados del ratón inmunizado con la proteína libre poseen reactividad tipo ED5 (35 de 94 pocillos positivos, ver materiales y métodos). Por el contrario, sólo el 2% de los hibridomas derivados de un ratón inmunizado con la proteína acomplejada al oligonucleótido mostraron reactividad de este tipo (2 de 94 pocillos positivos). Estos resultados indican que cuando E2C es incubada con el ADN site 35 en condiciones cercanas a la sobresaturación el complejo se agrega, ocultando la superficie del epítipo reconocido por el AcMo ED5. Este dato indica que los residuos localizados en esta cara de la proteína podrían estar involucrados en la formación de estrechos contactos proteína-proteína. En estas condiciones, el reconocimiento y unión de anticuerpos dirigidos contra esta superficie de la proteína se vería impedido estéricamente, debido a los contactos macromoleculares entre distintos dímeros de E2C establecidos durante el período de incubación. Los resultados de reactividad tipo ED5 obtenidos, junto con la observación de que el complejo agrega en exceso de proteína (61) señalan que la formación de esta estructura está fuertemente relacionada con la adquisición de propiedades inmunogénicas por parte del oligonucleótido, evento crucial para el desarrollo de esta respuesta anti-ADN específica.

En los últimos años se ha establecido una clara relación entre la organización cuaternaria, o de mayor orden, de las proteínas y su inmunogenicidad (85). Man et al han demostrado que el tratamiento de la creatina quinasa humana con glutaraldehído incrementa el título de anticuerpos dirigidos contra los epítopes nativos de la enzima. Los autores hipotetizaron que el efecto causado por el glutaraldehído podía deberse al aumento del tamaño y estructura multimérica del inmunógeno (86). Korematsu et al demostraron que mutaciones del alérgeno mayor Derf-2, causantes de cambios importantes en la estructura secundaria y propiedades de agregación, induce la polimerización de la proteína. Esta proteína mutante mostró cambios muy marcados en su inmunogenicidad, siendo capaz de inducir una fuerte respuesta T_H1 , esencial para la terapia de hiposensibilización (128). Clair et al, utilizando la albúmina sérica humana como antígeno modelo, demostraron que los cristales de la proteína pre-tratada con agentes entrecruzadores tienen un profundo efecto adyuvante *per sé*, incluso comparable al del adyuvante de Freund (87). Estos autores postularon que la estructura altamente

repetitiva que adopta la proteína en el cristal es la razón fundamental del aumento de su inmunogenicidad. Todas estas evidencias señalan hacia una clara correlación: cuanto mayor es el orden molecular del antígeno, mayor es la respuesta inmune generada contra él. En este sentido, la respuesta inmune desarrollada contra el complejo E2C: site 35 presentada en este trabajo coincide con este supuesto. Posteriores análisis de las propiedades de agregación del complejo E2C: site 35 en distintas condiciones son necesarios para disecar las bases moleculares y biofísicas causantes de la ganancia de potencial inmunogénico que el ADN unido a la proteína puede adquirir en una posterior presentación *in vivo*.

Conclusiones III

- Los resultados arrojados por los ensayos de ELISA (en fase sólida) y EMSA (en solución) demuestran que los dos AcMos anti-ADN: ED10 y ED84, son capaces de formar un complejo estable con el oligonucleótido site 35.
- Los estudios de espectroscopía de fluorescencia utilizados para determinar la estequiometría de unión de los complejos Fab ED10: site 35 y ED84: site 35 indican que, en ambos casos, el cambio de fluorescencia de los anticuerpos alcanza la saturación en una relación molar Fab: site 35 1:1.
- La determinación de las constantes de disociación en el equilibrio de los AcMos ED10 y ED84 contra el ADN site 35 muestra que ambos anticuerpos unen este oligonucleótido con alta afinidad, desplegando ED10 una afinidad levemente mayor por esta secuencia que el AcMo ED84. En todo caso, la constante de disociación de ambos anticuerpos es sólo un orden de magnitud mayor que la de su ligando natural, el factor de transcripción E2C.
- El estudio de la interacción de los anticuerpos ED10 y ED 84 con el oligonucleótido site 35 modificado químicamente señala que modificaciones en el extremo 5'-OH de la hebra B del oligonucleótido producen un aumento de la constante de disociación de entre 20 y 50 veces. Por el contrario, la modificación del extremo 5' de la cadena A de este mismo oligonucleótido no afecta en absoluto la afinidad de los AcMos. Por otro lado, los experimentos de unión con el sitio de reconocimiento de E2 site 7450 demuestran que las K_D de los anticuerpos por esta secuencia son entre 2 y 3 veces menores que las desplegadas contra el oligonucleótido utilizado en el plan de inmunización, evidenciando que ED10 y ED84 son capaces de discriminar entre ambos oligonucleótidos a pesar de diferir solamente en una base de su secuencia. Todos estos resultados señalan que los anticuerpos anti-ADN reconocen en el oligonucleótido site 35 rasgos distintos a los reconocidos por el factor de transcripción E2C, *i.e.* ACCGN₄CGGT.
- El estudio de la interacción de ED10 y ED84 contra una serie de oligonucleótidos palindrómicos y no-palindrómicos del mismo largo que site 35, indica que estos anticuerpos poseen una gran capacidad para discriminar al oligonucleótido site 35 de otros oligonucleótidos de distinta secuencia, evidenciando su alta especificidad.

- El estudio del efecto de la concentración salina en la unión de los AcMos ED10 y ED84 con el oligonucleótido site 35 indica que la contribución las fuerzas electrostáticas no es importante en estas interacciones.
- El análisis de las secuencias de las regiones variables de ED10 y ED84 indica que estos anticuerpos poseen rasgos normalmente encontrados en los anticuerpos anti-ADN generados a partir de modelos de autoinmunidad y de inmunización con complejos hapteno-carrier, tales como origen oligoclonal, genes V_H pertenecientes a la familia J558 y extensivas mutaciones somáticas. Además, la similitud de la región V_H , tanto en su secuencia como en el patrón de mutaciones, conforma una evidencia indiscutible de que estos anticuerpos son el resultado de un proceso de maduración de la afinidad ocurrido en una respuesta inmune fuertemente dirigida por el antígeno.
- El estudio de la interacción de los AcMos ED10 y ED84 contra las hebras A y B del oligonucleótido site 35 señala que ambos AcMos unen a la cadena B del oligonucleótido con una afinidad aún mayor que la desplegada contra el oligonucleótido doble cadena. Por el contrario, la afinidad de estos anticuerpos contra la hebra A es entre 3 y 4 órdenes de magnitud más baja que por el oligonucleótido doble cadena. Estos resultados junto con la observación que las estructuras genéticas y el patrón de mutaciones de las regiones variables de estos dos anticuerpos son muy similares entre sí sugieren fuertemente que estos anticuerpos anti-ADN son el resultado de un proceso de maduración de la afinidad ocurrido en células B productoras de anticuerpos anti-ADN simple cadena, a partir del cual adquirieron la capacidad de unir ADN doble cadena.
- El estudio de la interacción de los AcMos ED10 y ED84 contra el complejo E2C: site 35 indica que ambos anticuerpos son capaces de formar un complejo ternario estable con el complejo proteína: ADN utilizado como inmunógeno. Más aún, las mediciones de sus constantes de disociación en el equilibrio contra dicho complejo muestra que estas son prácticamente iguales a las determinadas contra el oligonucleótido site 35 libre, hecho que refuerza la hipótesis de que estos anticuerpos fueron originados en una respuesta inmune en la cual el estímulo antigénico, complejo E2C: site 35, se mantuvo sostenido en el tiempo.
- La caracterización preliminar de la superficie antigénica del complejo E2C: site 35 indica que la incubación de la proteína E2C con el ADN site 35 en condiciones cercanas a la sobresaturación produce la agregación del complejo E2C: site 35, ocultando la superficie de E2C reconocida por el AcMo ED5. A su vez, el evento de

agregación que sufre el complejo está claramente relacionado con la adquisición de propiedades inmunogénicas por parte del oligonucleótido, evento crucial para el desarrollo de esta respuesta anti-ADN específica.

Discusión

General

Discusión general

El estudio de la respuesta policlonal inducida por el factor de transcripción viral E2C unido a su secuencia de reconocimiento site 35 descrito en este trabajo, demuestra que este complejo proteína: ADN puede actuar como una nueva entidad inmunogénica, diferente a la de sus componentes aislados. Así, del análisis de la respuesta inmune generada contra el oligonucleótido site 35 surge como conclusión que las condiciones experimentales aplicadas sobre el complejo E2C: site 35 son determinantes para que éste pueda inducir una respuesta inmune ADN específica. Al respecto, el estudio de las propiedades inmunogénicas del complejo E2C: site 35 incubado señala que éste podría estar agregado, ocultando una cara de la proteína. Si bien hasta el presente no ha sido posible caracterizar en detalle las modificaciones estructurales sufridas por el complejo E2C: site 35 en estas condiciones, la posible agregación del complejo (originando la formación de una estructura de mayor orden molecular) no sólo podría haber contribuido a otorgarle al ADN site 35 su carácter inmunogénico, sino que también podría haber aumentado la vida media del complejo in vivo, permitiendo el desarrollo de una respuesta anti-ADN específica. Como se describió en el capítulo de caracterización de los AcMos anti-ADN, el análisis genético de las estructuras V de los anticuerpos monoclonales anti-site 35 sugiere fuertemente que estos anticuerpos fueron originados en una respuesta inmune dirigida por el antígeno, producto de una estimulación concertada de células B y T específicas. En este caso, el complejo E2C: site 35 (o una estructura supramolecular de este) pudo haber sido internalizado por linfocitos B site 35-específicos, los cuales subsecuentemente podrían presentar péptidos derivados de E2C a células T_H E2C-específicas. La ocurrencia de este proceso implicaría la toma y presentación de péptidos de E2C mediada por el receptor de células B ADN-específico, eventos que requieren que la proteína haya permanecido unida al oligonucleótido durante el proceso de estimulación (ver figura). De esta manera, el desarrollo de una respuesta inmune específica contra el oligonucleótido site 35 (hapteno) implican la participación de E2C como proteína transportadora, la cual brindaría la colaboración T necesaria para el inicio y maduración de la respuesta B anti-site 35.

Por otro lado, se ha demostrado que la inmunización con el complejo E2C: site 35 y la proteína E2C libre pueden desencadenar una respuesta autoinmune anti-ADN

doble cadena de características similares a las descritas en otros modelos de inmunización transportador-hapteno (ya sea en el título, especificidad y cinética de la respuesta). Estos resultados podrían explicarse según el modelo desarrollado por Rekvig (ver introducción), en el cual postula que péptidos derivados de proteínas de agentes infecciosos pueden formar complejos con nucleosomas y actuar como proteínas transportadoras in vivo, desencadenando una respuesta autoinmune anti-ADNdc. Si bien la capacidad de E2 de unir nucleosomas no ha sido descrita en la bibliografía, el hecho que los ratones inmunizados con la proteína E2 libre hayan desarrollado una respuesta anti-ADN simple y doble cadena es un fuerte indicio de que la interacción física entre E2 y el ADN nucleosomal ha tenido lugar in vivo. En la figura 34 se muestra un modelo esquemático de los mecanismos celulares y moleculares desencadenados en una respuesta inmune contra la proteína E2, ya sea libre o unida a su secuencia de reconocimiento específico.

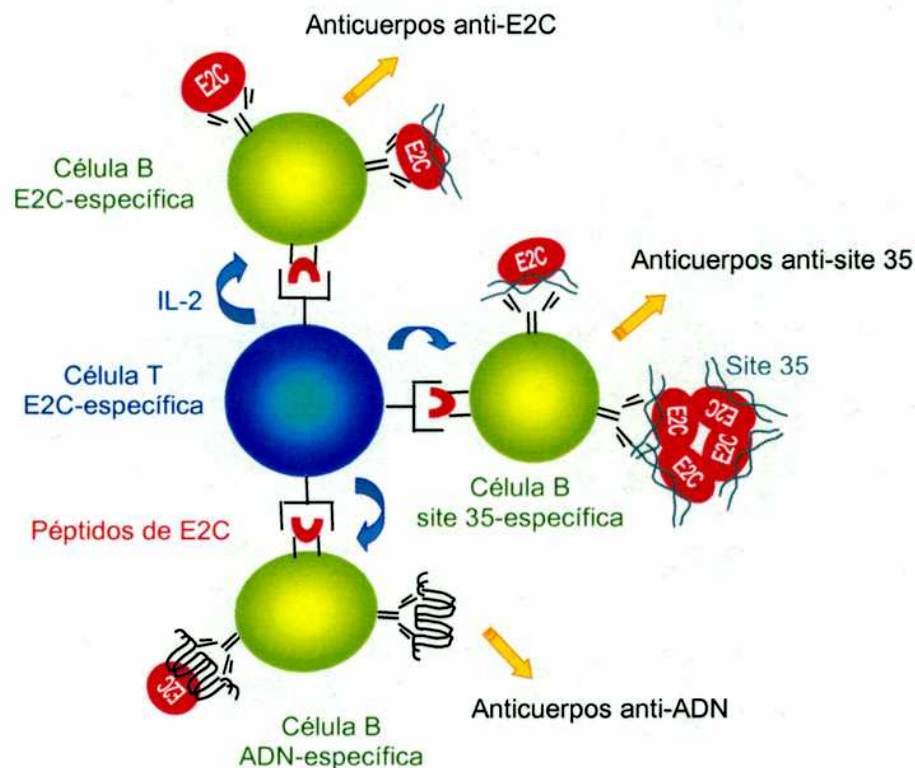


Figura 34: modelo de los mecanismos moleculares y celulares involucrados en una respuesta inmune contra la proteína E2C y el complejo E2C: site 35. El complejo E2C: site 35 es capaz, en determinadas condiciones experimentales, de inducir una potente respuesta anti-ADN específica contra el oligonucleótido utilizado como inmunógeno. En este caso, la conservación del complejo (o de una estructura supramolecular de mayor orden) durante el protocolo de inmunización es un evento decisivo para el

desarrollo de anticuerpos anti-ADN de alta afinidad y especificidad. Además de generar una respuesta inmune específica anti-site 35, la inmunización con este complejo proteína: ADN puede desencadenar una respuesta autoinmune contra ADN. Esta respuesta pudo haberse originado a partir de la estimulación no-antígeno específica de células B ADN-específicas que se encontraban momentáneamente en ese mismo lugar. Por otro lado, el hecho que la proteína viral E2C libre sea también capaz de inducir una respuesta autoinmune contra ADN, abre la posibilidad de que una activación específica de células B presentadoras de péptidos derivados de E2C, producto de la interacción de ésta con el ADN nucleosomal haya tenido lugar. En todos los casos, la inmunización con las formas libre y unida de E2C resultan en la producción de anticuerpos específicos contra la proteína, destacando que la gran inmunogenicidad de E2C no se ve afectada por la presencia del oligonucleótido.

Si bien mediante distintos modelos de inmunización (o infección) transportador-hapteno se ha logrado desarrollar una respuesta autoinmune contra ADNdc, el potencial patogénico de los anticuerpos anti-ADNdc originados durante estas respuestas autoinmunes no está claro. En este sentido, a pesar de estar ampliamente demostrado que los anticuerpos anti-ADN generados en estos modelos de inmunización poseen características genéticas muy similares a las de los anticuerpos desarrollados en los modelos murinos de lupus, hasta el presente no ha sido posible establecer cuáles son los rasgos determinantes de su potencial patogénico. Al respecto Rekvig postuló (7) que las diferencias en el potencial patológico de los anticuerpos anti-ADNdc generados en los modelos de inmunización transportador-hapteno o en modelos de deficiencias genéticas podrían hallar su explicación en la persistencia del estímulo y su presión antigénica, en un caso u otro. En los modelos de inmunización transportador-hapteno, los mecanismos desencadenantes de la respuesta anti-ADN operarían transitoriamente, resultando en una presión antigénica mucho más leve que la presente en los modelos de alteraciones o predisposiciones genéticas (ver más abajo). Esto resultaría en una producción débil y transitoria de anticuerpos, consecuencia de una pobre activación de clones B con capacidad de unir ADNdc. Por otro lado, en los modelos de alteraciones genéticas o en pacientes con LES, la producción progresiva de anticuerpos anti-ADNdc estaría basada en mecanismos inherentes al individuo, presentándose una presión antigénica (ADN/nucleosoma) mucho más fuerte y sostenida en el tiempo. La naturaleza sostenida del estímulo podría, en este caso, no sólo reclutar muchos más clones B con especificidad por ADN, ya sea simple o doble cadena, sino también favorecer la ocurrencia de mutaciones somáticas en los anticuerpos, generando anticuerpos anti-ADNdc de alta aidez. De este modo, la distinción entre las bases adquiridas o inherentes de la producción de anticuerpos anti-ADN podría ser fundamental en el discernimiento del potencial de un individuo de desarrollar autoinmunidad patogénica o un simple

epifenómeno autoinmune no-patogénico (7).

En resumen, el estudio de la respuesta inmune contra el complejo proteína: ADN E2C: site 35 presentado en este trabajo de tesis no sólo abarcó el desarrollo de un nuevo modelo de estudio de un sistema de inmunización transportador-hapteno generador de una respuesta autoinmune anti-ADN, sino que también permitió el estudio de una respuesta inmune específica contra una molécula de ADN, hecho no descrito hasta ahora en la bibliografía. Esto último abre la puerta al estudio de los mecanismos involucrados en el origen y desarrollo de una respuesta anti-ADN específica, permitiendo establecer similitudes y diferencias con aquellos comprendidos en una respuesta autoinmune contra ADN nativo. Por otro lado, la continuación de los estudios sobre las características inmunogénicas del complejo E2C: site 35 y su relación con sus propiedades bioquímicas ayudarán a elucidar los eventos involucrados en la adquisición de su carácter inmunogénico, proveyendo información valiosa para el entendimiento de las bases moleculares subyacentes en la etiología de los anticuerpos anti-ADN y su relación con el desarrollo de LES.

Bibliografía

Bibliografía

1. Smeenk, R. J. T., J. H. M. Berden, and A. J. G. Swaak. 1996. dsDNA autoantibodies. In *Autoantibodies*. J. B. a. S. Peter, Y., ed. Elsevier Science.
2. Marshall, E. 2002. Lupus: mysterious disease holds its secrets tight. *Science* 296:689.
3. Lipsky, P. E. 2001. Systemic lupus erythematosus: an autoimmune disease of B cell hyperactivity. *Nat. Immunol.* 2:764.
4. Grammer, A. C., T. Dörner, and P. E. Lipsky. 2001. V gene usage in systemic autoimmunity. *Mol. Pathol. Autoimmune Dis.* 2:282.
5. Gonzalez, M., F. Mackay, J. L. Browning, M. Kosco-Vilbois, H., and R. J. Noelle. 1998. The sequential role of lymphotoxin and B cells in the development of splenic follicles. *J. Exp. Med.* 187:997.
6. Flynn, S., K. M. Toellner, C. Raykundalia, M. Goodall, and P. Lane. 1998. CD4 T cell cytokine differentiation: the B cell activation molecule, OX40 ligand, instructs CD4 T cells to express interleukin 4 and upregulates expression of the chemokine receptor, Blr-1. *J. Exp. Med.* 188:297.
7. Rekvig, O. P., and J. C. Nossent. 2003. Anti-double-stranded DNA antibodies, nucleosomes, and systemic lupus erythematosus: a time for new paradigms? *Arthritis Rheum.* 48:300.
8. Andrews, B. S., R. A. Eisenberg, A. N. Theofilopoulos, S. Izui, C. B. Wilson, P. J. McConahey, E. D. Murphy, J. B. Roths, and F. J. Dixon. 1978. Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J. Exp. Med.* 148:1198.
9. Marion, T. N., A. L. Bothwell, D. E. Briles, and C. A. J. Janeway. 1989. IgG anti-DNA autoantibodies within an individual autoimmune mouse are the products of clonal selection. *J. Immunol.* 142:4269.
10. Radic, M. Z., and M. Weigert. 1994. Genetic and structural evidence for antigen selection of anti-DNA antibodies. *Annu. Rev. Immunol.* 12:487.
11. Tillman, D. M., N.-T. Jou, J. Hill, and T. N. Marion. 1992. Both IgM and IgG anti-DNA antibodies are the products of clonally selective B cell stimulation in (NZBxNZW) F1 mice. *J. Exp. Med.* 176:761.
12. van Es, J. H., F. H. Gmelig Meyling, W. R. van de Akker, H. Aanstoot, R. H. Derksen, and T. Logtenberg. 1991. Somatic mutations in the variable regions of a human IgG anti-double-stranded DNA autoantibody suggest a role for antigen in the induction of systemic lupus erythematosus. *J. Exp. Med.* 173:461.
13. Madaio, M. P., S. Hodder, R. S. Schwartz, and B. D. Stollar. 1984. Responsiveness of autoimmune and normal mice to nucleic acid antigens. *J. Immunol.* 132:872.
14. Desai, D. D., M. R. Krishnan, J. T. Swindle, and T. N. Marion. 1993. Antigen-specific induction of antibodies against native mammalian DNA in nonautoimmune mice. *J. Immunol.* 151:1614.
15. Marchini, B., A. Pucceti, M. P. Dolcher, M. P. Madaio, and P. Migliorini. 1995. Induction of anti-DNA antibodies in non-autoimmune mice by immunization with a DNA-DNAase complex. *Clin. Exp. Rheumatol.* 13:7.
16. Moens, U., I. Mathiesen, M. V. Ghelue, and O. P. Rekvig. 2002. Green fluorescent protein modified to bind DNA initiates production of anti-DNA antibodies when expressed in vivo. *Mol Immunol.* 38:505.
17. Moens, U., O. M. Seternes, A. W. Hey, Y. Silsand, T. Traavik, B. Johansen, and O. P. Rekvig. 1995. In vivo expression of a single viral DNA-binding protein generates systemic lupus erythematosus-related autoimmunity to double-stranded DNA and histones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:12393.
18. Rekvig, O. P., U. Moens, A. Sundsfjord, G. Bredholt, A. Osei, H. Haaheim, T. Traavik, E. Arnesen, and H. J. Haga. 1997. Experimental expression in mice and spontaneous expression in human SLE of polyomavirus T-antigen. A molecular basis for induction of

- antibodies to DNA and eukaryotic transcription factors. *J. Clin. Invest.* 99:2045.
19. Stollar, B. D. 1973. Nucleic acid antigens. In *The Antigens*. M. Sela, ed. Academic Press, New York.
20. Desai, D. D., and T. N. Marion. 2000. Induction of anti-DNA antibody with DNA-peptide complexes. *Int. Immunol.* 12:1569.
21. Rekvig, O. P., K. Fredriksen, K. Hokland, U. Moens, T. Traavik, M. R. Krishnan, and T. N. Marion. 1995. Molecular analyses of anti-DNA antibodies induced by polyomavirus BK in BALB/c mice. *Scand. J. Immunol.* 41:593.
22. Krishnan, M. R., and T. N. Marion. 1993. Structural similarity of antibody variable regions from immune and autoimmune anti-DNA antibodies. *J. Immunol.* 150:4948.
23. Shlomchik, M., M. Mascelli, H. Shan, M. Z. Radic, D. Pisetsky, A. Marshak-Rothstein, and M. Weigert. 1990. Anti-DNA antibodies from autoimmune mice arise by clonal expansion and somatic mutation. *J. Exp. Med.* 171:265.
24. Krishnan, M. R., N. T. Jou, and T. N. Marion. 1993. Correlation between the amino acid position of arginine in VH-CDR3 and specificity for native DNA among autoimmune antibodies. *J. Immunol.* 157:2430.
25. Krishnan, M. R., and T. N. Marion. 1998. Comparison of the frequencies of arginines in heavy chain CDR3 of antibodies expressed in the primary B-cell repertoires of autoimmune-prone and normal mice. *Scand. J. Immunol.* 48:223.
26. Bynoe, M. S., L. Spatz, and B. Diamond. 1999. Characterization of anti-DNA B cells that escape negative selection. *Eur. J. Immunol.* 29:1304.
27. Andreassen, K., S. Bendiksen, E. Kjeldsen, M. Van Ghelue, U. Moens, E. Arnesen, and O. P. Rekvig. 2002. T cell autoimmunity to histones and nucleosomes is a latent property of the normal immune system. *Arthritis Rheum.* 46:1270.
28. Laimins, L. A. 1998. Regulation of transcription and replication by human papillomaviruses. In *Human tumor viruses*. D. J. McCance, ed. Library of Congress Cataloging-in-publication data, Washington.
29. Howley, P. M., and D. R. Lowy. 2001. Papillomaviruses and their replication. In *Fields. Virology*. D. M. Knipe, and P. M. Howley, eds. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
30. Lambert, P. F., N. L. Hubbert, P. M. Howley, and J. T. Schiller. 1989. Genetic assignment of multiple E2 gene products in bovine papillomavirus-transformed cells. *J. Virol.* 63:3151.
31. Lambert, P. F., B. A. Spalholz, and P. M. Howley. 1987. A transcriptional repressor encoded by BPV-1 shares a common carboxy-terminal domain with the E2 transactivator. *Cell* 50:69.
32. Dyson, N., P. M. Howley, K. Munger, and E. Harlow. 1989. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 243:934.
33. Lechner, M. S., D. H. Mack, A. B. Finicle, T. Crook, K. H. Vousden, and L. A. Laimins. 1992. Human papillomavirus E6 proteins bind p53 in vivo and abrogate p53-mediated repression of transcription. *EMBO J.* 11:3045.
34. Munger, K., W. C. Phelps, V. Bubbs, P. M. Howley, and R. Schlegel. 1989. The E6 and E7 genes of the human papillomavirus type 16 together are necessary and sufficient for transformation of primary human keratinocytes. *J. Virol.* 63:4417.
35. Gissmann, L., M. Boshart, M. Durst, H. Ikenberg, D. Wagner, and H. zur Hausen. 1984. Presence of human papillomavirus in genital tumors. *J. Invest. Dermatol.* 83:26.
36. Dowhanick, J. J., A. A. McBride, and P. M. Howley. 1995. Suppression of cellular proliferation by the papillomavirus E2 protein. *J. Virol.* 69:7791.
37. Hwang, E. S., D. J. n. Riese, J. Settleman, L. A. Nilson, J. Honig, S. Flynn, and D. DiMaio. 1993. Inhibition of cervical carcinoma cell line proliferation by the introduction of a bovine papillomavirus regulatory gene. *J. Virol.* 67:3720.
38. Nishimura, A., T. Ono, A. Ishimoto, J. J. Dowhanick, M. A. Frizzell, P. M. Howley, and H. Sakai. 2000. Mechanisms of human papillomavirus E2-mediated repression of viral oncogene expression and cervical cancer cell growth inhibition. *J. Virol.* 74:3752.
39. de Gruijl, T. D., H. J. Bontkes, J. M. Walboomers, M. J. Stukart, F. S. Doekhie, A. J.

- Remmink, T. J. Helmerhorst, R. H. Verheijen, M. F. Duggan-Keen, P. L. Stern, C. J. Meijer, and R. J. Scheper. 1998. Differential T helper cell responses to human papillomavirus type 16 E7 related to viral clearance or persistence in patients with cervical neoplasia: a longitudinal study. *Cancer Res.* 58:1700.
40. Luxton, J. C., A. J. Rowe, J. C. Cridland, T. Coletart, P. Wilson, and P. S. Shepherd. 1996. Proliferative T cell responses to the human papillomavirus type 16 E7 protein in women with cervical dysplasia and cervical carcinoma and in healthy individuals. *J. Gen. Virol.* 77:1585.
41. Lehtinen, M., M. Pawlita, K. Zumbach, K. Lie, M. Hakama, E. Jellum, P. Koskela, T. Luostarinen, J. Paavonen, E. Pukkala, E. Sigstad, S. Thoresen, and J. Dillner. 2003. Evaluation of antibody response to human papillomavirus early proteins in women in whom cervical cancer developed 1 to 20 years later. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 188:49.
42. Rocha-Zavaleta, L., D. Jordan, S. Pepper, G. Corbitt, F. Clarke, N. J. Maitland, C. M. Sanders, J. R. Arrand, P. L. Stern, and S. N. Stacey. 1997. Differences in serological IgA responses to recombinant baculovirus-derived human papillomavirus E2 protein in the natural history of cervical neoplasia. *Br. J. Cancer* 75:1144.
43. Maitland, N. J., S. Conway, N. S. Wilkinson, J. Ramsdale, J. R. Morris, C. M. Sanders, J. E. Burns, P. L. Stern, and M. Wells. 1998. Expression patterns of the human papillomavirus type 16 transcription factor E2 in low- and high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *J. Pathol.* 186:275.
44. Bontkes, H. J., T. D. de Gruijl, A. Bijl, R. H. Verheijen, C. J. Meijer, R. J. Scheper, P. L. Stern, J. E. Burns, N. J. Maitland, and J. M. Walboomers. 1999. Human papillomavirus type 16 E2-specific T-helper lymphocyte responses in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *J. Gen. Virol.* 80:2453.
45. Rosales, C., V. V. Graham, G. A. Rosas, H. Merchant, and R. Rosales. 2000. A recombinant vaccinia virus containing the papilloma E2 protein promotes tumor regression by stimulating macrophage antibody-dependent cytotoxicity. *Cancer Immunol. Immunother.* 49:347.
46. Valdez Graham, V., G. Sutter, M. V. Jose, A. Garcia-Carranca, V. Erfle, N. Moreno Mendoza, H. Merchant, and R. Rosales. 2000. Human tumor growth is inhibited by a vaccinia virus carrying the E2 gene of bovine papillomavirus. *Cancer* 88:1650.
47. Davidson, E. J., M. D. Brown, D. J. Burt, J. L. Parish, K. Gaston, H. C. Kitchener, S. N. Stacey, and P. L. Stern. 2001. Human T cell responses to HPV-16 E2 generated with monocyte-derived dendritic cells. *Int. J. Cancer.* 94:807.
48. Antson, A. A., J. E. Burns, O. V. Moroz, D. J. Scott, C. M. Sanders, I. B. Bronstein, G. G. Dodson, K. S. Wilson, and N. J. Maitland. 2000. Structure of the intact transactivation domain of the human papillomavirus E2 protein. *Nature* 403:805.
49. Hegde, R. S. 2002. The papillomavirus E2 proteins: structure, function, and biology. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 31:343.
50. Bussiere, D. E., X. Kong, D. A. Egan, K. Walter, T. F. Holzman, F. Lindh, T. Robins, and V. L. Giranda. 1998. Structure of the E2 DNA-binding domain from human papillomavirus serotype 31 at 2.4 Å. *Acta Crystallogr. D* 54:1367.
51. Hegde, R. S., and E. J. Androphy. 1998. Crystal structure of the E2 DNA-binding domain from human papillomavirus type 16: implications for its DNA binding-site selection mechanism. *J. Mol. Biol.* 284:1479.
52. Kim, S. S., J. K. Tam, A. F. Wang, and R. S. Hegde. 2000. The structural basis of DNA target discrimination by papillomavirus E2 proteins. *J. Biol. Chem.* 275:31245.
53. Hegde, R. S., S. R. Grossman, L. A. Laimins, and P. B. Sigler. 1992. Crystal structure at 1.7 Å of the bovine papillomavirus-1 E2 DNA-binding domain bound to its DNA target. *Nature* 359:505.
54. Liang, H., A. M. Petros, R. P. Meadows, H. S. Yoon, D. A. Egan, K. Walter, T. F. Holzman, T. Robins, and S. W. Fesik. 1996. Solution structure of the DNA-binding domain of a human papillomavirus E2 protein: evidence for flexible DNA-binding regions. *Biochemistry* 35:2095.
55. Veeraraghavan, S., C. C. Mello, E. J. Androphy, and J. D. Baleja. 1999. Structural

- correlates for enhanced stability in the E2 DNA-binding domain from bovine papillomavirus. *Biochemistry* 38:16115.
56. Hegde, R. S., A. F. Wang, S. S. Kim, and M. Schapira. 1998. Subunit rearrangement accompanies sequence-specific DNA binding by the bovine papillomavirus-1 E2 protein. *J. Mol. Biol.* 276:797.
57. Strauss, J. K., and L. J. r. Maher. 1994. DNA bending by asymmetric phosphate neutralization. *Science* 266:1829.
58. Nicholls, A., K. A. Sharp, and B. Honig. 1991. Protein folding and association: insights from the interfacial and thermodynamic properties of hydrocarbons. *Proteins* 11:281.
59. Kerppola, T. K. 1996. Fos and Jun bend the AP-1 site: effects of probe geometry on the detection of protein-induced DNA bending. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93:10117.
60. Kerppola, T. K., and T. Curran. 1997. The transcription activation domains of Fos and Jun induce DNA bending through electrostatic interactions. *EMBO J.* 16:2907.
61. Ferreira, D. U., L. M. T. R. Lima, L. G. Alonso, F. A. Goldbaum, and G. de Prat Gay. 2000. Distinctive cognate sequence discrimination, bound DNA conformation and binding modes in the E2 C-terminal domains from prototype human and bovine papillomaviruses. *Biochemistry* 39:14692.
62. Lima, L. M., and G. de Prat Gay. 1997. Conformational changes and stabilization induced by ligand binding in the DNA-binding domain of the E2 protein from human papillomavirus. *J. Biol. Chem.* 272:19295.
63. Sanders, C. M., and N. J. Maitland. 1994. Kinetic and equilibrium binding studies of the human papillomavirus type-16 transcription regulatory protein E2 interacting with core enhancer elements. *Nucleic Acids Res.* 22:4890.
64. Ramon, G. 1924. Sur la toxine et sur l'anatoxine diptheriques. *Ann. Inst. Pasteur* 38:1.
65. Singh, M., and D. O'Hagan. 1999. Advances in vaccine adjuvants. *Nat Biotechnol.* 17:1075.
66. Wijburg, O. L., G. P. van den Dobbelsteen, J. Vadolas, A. Sanders, R. A. Strugnell, and N. van Rooijen. 1998. The role of macrophages in the induction and regulation of immunity elicited by exogenous antigens. *Eur. J. Immunol.* 28:479.
67. Freund, J., and K. McDermott. 1942. Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 49:548.
68. Allison, A. C. 1999. Squalene and squalane emulsions as adjuvants. *Methods* 19:87.
69. Scibienski, R. J. 1973. Denaturation of lysozyme by Freund's complete adjuvant. *J. Immunol.* 111:114.
70. Kenney, J. S., B. W. Hughes, M. P. Masada, and A. C. Allison. 1989. Influence of adjuvants on the quantity, affinity, isotype and epitope specificity of murine antibodies. *J. Immunol. Methods* 121:157.
71. Foguel, D., J. L. Silva, and G. de Prat Gay. 1998. Characterization of a partially folded monomer of the DNA-binding domain of human papillomavirus E2 protein obtained at high pressure. *J. Biol. Chem.* 273:9050.
72. Galfré, G. A., and C. Milstein. 1981. Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods Enzymol.* 73:3.
73. Dattamajumdar, A. K., D. P. Jacobson, L. E. Hood, and G. E. Osman. 1996. Rapid cloning of any rearranged mouse immunoglobulin variable genes. *Immunogenetics* 43:141.
74. Kabat, E. A., T. T. Wu, M. Reid-Miller, H. M. Perry, and K. S. Gottesman. 1987. *Sequences of proteins of immunological interest*. Public Health Service. National Institutes of Health.
75. Tijssen, P., and E. Kurstak. 1984. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates for enzyme immunoassays. *Anal. Biochem.* 136:451.
76. Harlow, E., and D. Lane. 1999. *Using antibodies, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Lab Press, NY.
77. Friguet, B., L. Djavadi-Ohianiance, and M. E. Goldberg. 1997. Immunochemical analysis of protein conformation. In *Protein Structure*. T. E. Creighton, ed. Oxford University

- Press Inc., New York.
78. Hassen, E., A. Chaieb, N. Bouaouina, H. Khairi, S. Remadi, and L. Chouchane. 2001. Strategies for detection of papillomavirus specific antibodies. *Mod. Asp. Immunobiol.* 2:8.
 79. Moore, J. P., A. Trkola, and T. Dragic. 1997. Co-receptors for HIV-1 entry. *Curr. Opin. Immunol.* 9:551.
 80. LaCasse, R. A., K. E. Follis, M. Trahey, J. D. Scarborough, D. R. Littman, and J. H. Nunberg. 1999. Fusion-competent vaccines: broad neutralization of primary isolates of HIV. *Science* 283:357.
 81. Kang, C. L., K. Hariharan, P. L. Nara, J. Sodroski, and J. P. Moore. 1994. Immunization with a soluble CD4-gp120 complex preferentially induces neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 antibodies directed to conformation-dependent epitopes of gp120. *J. Virol.* 68:5854.
 82. Gauthier, J.-M., J. Dillner, and M. Yaniv. 1991. Structural analysis of the human papillomavirus type 16-E2 transactivator with anti-peptide antibodies reveals a high mobility region linking the transactivation and the DNA-binding domains. *Nucleic Acid Res.* 19:7073.
 83. Margeat, E., C. Le Grimelec, and C. A. Royer. 1998. Visualization of trp repressor and its complexes with DNA by atomic force microscopy. *Biophys. J.* 75:2712.
 84. Wyman, C., I. Rombel, A. K. North, C. Bustamante, and S. Kustu. 1997. Unusual oligomerization required for activity of NtrC, a bacterial enhancer-binding protein. *Science* 275:168.
 85. Bachmann, M. F., U. H. Rohrer, T. M. Kunding, K. Burki, and R. M. Zinkernagel. 1993. The influence of antigen organization on B cell responsiveness. *Science* 262:1448.
 86. Man, N., A. J. Cartwright, K. M. Andrews, and G. E. Morris. 1989. Treatment of human muscle creatine kinase with glutaraldehyde preferentially increases the immunogenicity of the native conformation and permits production of high-affinity monoclonal antibodies which recognize two distinct surface epitopes. *J. Immunol. Methods* 125:251.
 87. St. Clair, N., B. Shenoy, L. D. Jacob, and A. Margolin. 1999. Cross-linked protein crystals for vaccine delivery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:9469.
 88. Janeway, C. A. J., P. Travers, M. Walport, and J. D. Capra. 1999. *Immunobiology. The immune system in health and disease*. Elsevier Science Ltd/Garland Publishing, London. NY.
 89. Mandik-Nayak, L., A. Bui, H. Noorchashm, A. Eaton, and J. Erikson. 1997. Regulation of anti-double-stranded DNA B cells in nonautoimmune mice: localization to the T-B interface of the splenic follicle. *J. Exp. Med.* 186:1257.
 90. Sobel, E. S., C. Mohan, L. Morel, J. Schifflbauer, and E. K. Wakeland. 1999. Genetic dissection of SLE pathogenesis: adoptive transfer of Sle1 mediates the loss of tolerance by bone marrow-derived B cells. *J. Immunol.* 162:2415.
 91. Stollar, B. D. 1994. Molecular analysis of anti-DNA antibodies. *FASEB J.* 8:337.
 92. Bosilevac, J. M., C. A. Gilchrist, P. E. Jankowski, S. Paul, A. R. Rees, and S. H. Hinrichs. 1998. Inhibition of activating transcription factor 1- and cAMP-responsive element-binding protein-activated transcription by an intracellular single chain Fv fragment. *J. Biol. Chem.* 273:16874.
 93. Kurg, R., J. Parik, E. Juronen, T. Sedman, A. Abroi, I. Liiv, U. Langel, and M. Ustav. 1999. Effect of bovine papillomavirus E2 protein-specific monoclonal antibodies on papillomavirus DNA replication. *J. Virol.* 73:4670.
 94. Mantovani, R., U. Pessara, F. Tronche, X. Li, A. M. Knapp, J. L. Pasquali, C. Benoist, and D. Mathis. 1992. Monoclonal antibodies to NF-Y define its function in MHC class II and albumin gene transcription. *EMBO J.* 11:3315.
 95. Orten, D. J., J. M. Strawhecker, S. D. Sanderson, D. Huang, M. B. Prystowsky, and S. H. Hinrichs. 1994. Differential effects of monoclonal antibodies on activating transcription factor-1 and cAMP response element binding protein interactions with DNA. *J. Biol. Chem.* 269:32254.
 96. Nieba, L., A. Krebber, and A. Pluckthun. 1996. Competition BIAcore for measuring true affinities: large differences from values determined from binding kinetics. *Anal. Biochem.*

- 234:155.
97. Skern, T., C. Neubauer, L. Frasel, P. Grundler, W. Sommergruber, M. Zorn, E. Kuechler, and D. Blaas. 1987. A neutralizing epitope on human rhinovirus type 2 includes amino acid residues between 153 and 164 of virus capsid protein VP2. *J. Gen. Virol.* 68:315.
 98. Hastings, G. Z., S. A. Speller, and M. J. Francis. 1990. Neutralizing antibodies to human rhinovirus produced in laboratory animals and humans that recognize a linear sequence from VP2. *J. Gen. Virol.* 71:3055.
 99. Tormo, J., D. Blaas, N. R. Parry, D. Rowlands, D. Stuart, and I. Fita. 1994. Crystal structure of a human rhinovirus neutralizing antibody complexed with a peptide derived from viral capsid protein VP2. *EMBO J.* 13:2247.
 100. Koshland, D. E. J. 1958. Application of a theory of enzyme specificity to protein synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 44:98.
 101. Foote, J., and C. Milstein. 1994. Conformational isomerism and the diversity of antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10370.
 102. Leder, L., C. Berger, S. Bornhauser, H. Wendt, F. Ackermann, I. Jelesarov, and H. R. Bosshard. 1995. Spectroscopic, calorimetric, and kinetic demonstration of conformational adaptation in peptide-antibody recognition. *Biochemistry* 34:16509.
 103. Schiff, C., M. Milili, I. Hue, S. Rudikoff, and M. Fougereau. 1986. Genetic basis for expression of the idiotypic network. One unique Ig VH germline gene accounts for the major family of Ab1 and Ab3 (Ab1') antibodies of the GAT system. *J. Exp. Med.* 163:573.
 104. Schaeble, K. F., R. Thiebe, A. Bensch, J. Brensing-Kuppers, V. Heim, T. Kirschbaum, R. Lamm, M. Ohnrich, S. Pourrajabi, F. Roschenthaler, J. Schwendinger, D. Wichelhaus, I. Zocher, and H. G. Zachau. 1999. Characteristics of the immunoglobulin V kappa genes, pseudogenes, relics and orphans in the mouse genome. *Eur. J. Immunol.* 29:2082.
 105. Chothia, C., and A. Lesk. 1987. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J. Mol. Biol.* 196:901.
 106. Lefranc, M.-P. 2001. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acid Res.* 29:207.
 107. Altschul, S., T. Madden, A. Schaffer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller, and D. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389.
 108. Sinha, N., and S. J. Smith-Gill. 2002. Electrostatics in protein binding and function. *Curr. Protein Pept. Sci.* 3:601.
 109. Kozack, R. E., and S. Subramaniam. 1993. Brownian dynamics simulations of molecular recognition in an antibody-antigen system. *Protein Sci.* 2:915.
 110. Weidenhaupt, M., M. B. Khalifa, N. Hugo, L. Choulier, D. Altschuh, and T. Vernet. 2002. Functional mapping of conserved, surface-exposed charges of antibody variable domains. *J. Mol. Recognit.* 15:94.
 111. Sinha, N., S. Mohan, C. A. Lipschultz, and S. J. Smith-Gill. 2002. Differences in electrostatic properties at antibody-antigen binding sites: implications for specificity and cross-reactivity. *Biophys. J.* 83:2946.
 112. Bai, J., J. Sui, R. Y. Zhu, A. S. Tallarico, F. Gennari, D. Zhang, and W. A. Marasco. 2003. Inhibition of Tat-mediated transactivation and HIV-1 replication by human anti-hCyclinT1 intrabodies. *J. Biol. Chem.* 278:1433.
 113. Mhashilkar, A. M., D. K. Biswas, J. LaVecchio, A. B. Pardee, and W. A. Marasco. 1997. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in vitro by a novel combination of anti-Tat single-chain intrabodies and NF-kappa B antagonists. *J. Virol.* 71:6486.
 114. Tewari, D., A. L. Notkins, and P. Zhou. 2003. Inhibition of HIV-1 replication in primary human T cells transduced with an intracellular anti-HIV-1 p17 antibody gene. *J. Gene Med.* 5:182.
 115. Marasco, W. A. 2001. Intrabodies as antiviral agents. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 286:587.
 116. Jean, D., C. Tellez, S. Huang, D. W. Davis, C. J. Bruns, D. J. McConkey, S. H. Hinrichs,

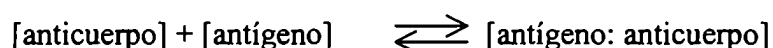
- and M. Bar-Eli. 2000. Inhibition of tumor growth and metastasis of human melanoma by intracellular anti-ATF-1 single chain Fv fragment. *Oncogene* 19:2721.
117. Ballard, D. W., S. P. Lynn, J. F. Gardner, and E. W. J. Voss. 1984. Specificity and kinetics defining the interaction between a murine monoclonal autoantibody and DNA. *J. Biol. Chem.* 259:349.
118. Eivazova, E. R., J. M. McDonnell, B. J. Sutton, and N. A. Staines. 2000. Specificity and binding kinetics of murine lupus anti-DNA monoclonal antibodies implicate different stimuli for their production. *Immunology* 101:371.
119. Stollar, B. D., G. Zon, and R. W. Pastor. 1986. A recognition site on synthetic helical oligonucleotides for monoclonal anti-native DNA autoantibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 83:4469.
120. Di Pietro, S. M., J. M. Centeno, M. L. Cerutti, F. Lodeiro, D. U. Ferreira, L. G. Alonso, F. P. Schwarz, F. A. Goldbaum, and G. de Prat Gay. 2003. Specific antibody-DNA interaction: A novel strategy for tight DNA recognition. *Biochemistry*, in press. DOI: 10.1021/bi026866u.
121. Record, M. T. J., J. H. Ha, and M. A. Fisher. 1991. Analysis of equilibrium and kinetic measurements to determine thermodynamic origins of stability and specificity and mechanism of formation of site-specific complexes between proteins and helical DNA. *Methods Enzymol.* 208.
122. Record, M. T. J., W. Zhang, and C. F. Anderson. 1998. Analysis of effects of salts and uncharged solutes on protein and nucleic acid equilibria and processes: a practical guide to recognizing and interpreting polyelectrolyte effects, Hofmeister effects, and osmotic effects of salts. *Adv. Protein Chem.* 51:281.
123. Haines, B., C. Angeles, A. Parmelee, P. McLean, and P. Brodeur. 2001. Germline diversity of the Expressed BALB/c VhJ558 Gene Family. *Mol Immunol.* 38:9.
124. Hirose, S., M. Wakiya, Y. Kawano-Nishi, J. Yi, R. Sanokawa, S. Taki, T. Shimamura, T. Kishimoto, H. Tsurui, and H. Nishimura. 1993. Somatic diversification and affinity maturation of IgM and IgG anti-DNA antibodies in murine lupus. *Eur. J. Immunol.* 23:2813.
125. Ohnishi, K., F. M. Ebling, B. Mitchell, R. R. Singh, B. H. Hahn, and B. P. Tsao. 1994. Comparison of pathogenic and non-pathogenic murine antibodies to DNA: antigen binding and structural characteristics. *Int. Immunol.* 6:817.
126. Aarden, L. A., and R. J. T. Smeenk. 1982. Immunochemical properties of antibodies to DNA and their influence on detection methods. In *Antibodies to nuclear antigens*. J. R. Kalden, and T. E. Feltkamp, eds. Excerpta Medica, Amsterdam, p. 23.
127. Stollar, B. D., and M. Papalian. 1980. Secondary structure in denatured DNA is responsible for its reaction with anti-native DNA antibodies of systemic lupus erythematosus sera. *J. Clin. Invest.* 66:210.
128. Korematsu, S., Y. Tanaka, S. Hosoi, S. Koyanagi, T. Yokota, B. Mikami, and N. Minato. 2000. C8/119S mutation of major mite allergen Derf-2 leads to degenerate secondary structure and molecular polymerization and induces potent and exclusive Th1 cell differentiation. *J. Immunol.* 165:2895.

Apéndice

Apéndice

Aspectos teóricos de la interacción antígeno-anticuerpo

La reacción de formación de un complejo antígeno-anticuerpo dada por la interacción entre un sitio de anticuerpo y un sitio antigénico puede ser descrita por la siguiente ecuación:



La concentración de sitios de anticuerpo libres $[Ac]$ y de sitios antigénicos libres $[Ag]$ en el equilibrio, están relacionadas con el número total de sitios de anticuerpo $[Ac_t]$ y el total de sitios antigénicos $[Ag_t]$ por la siguiente ecuación:

$$[Ac] = [Ac_t] - [Cx]$$

$$[Ag] = [Ag_t] - [Cx]$$

Siendo $[Cx]$ el complejo antígeno: anticuerpo

La constante de disociación en el equilibrio (K_D) del complejo antígeno-anticuerpo esta definido por:

$$K_D = [Ag] [Ac] / [Cx]$$

Si $[Ag_t]$ varía mientras $[Ac_t]$ es mantenida constante:

$$K_D = [Ag] ([Ac_t] - [Cx]) / [Cx]$$

Entonces,

$$[Cx] / [Ac_t] = [Ag] / ([Ag] + K_D)$$

Las formas de linealización más utilizadas para esta última ecuación son:

Ecuación de Scatchard:

$$[Cx] / [Ag] = ([Ac_t] - [Cx]) / K_D$$

Ecuación de Klotz:

$$[Ac_t] / [Cx] = K_D / [Ag] + 1$$

Si $[Ac_t]$ y $[Ag_t]$ son conocidas, la determinación experimental de K_D (ó $K_A = 1 / K_D$) requiere la medición precisa de sólo una de las tres concentraciones: $[Ag]$, $[Ac]$ ó $[Cx]$.

Determinación de la constante de disociación por ELISA

La determinación de las K_{Ds} de los AcMos anti-ADN contra el oligonucleótido site 35 y el complejo E2C: site 35 se realizaron acorde a las premisas establecidas previamente por Friguet et al (77).

El método desarrollado por Friguet et al consta de dos pasos:

- 1- Una concentración fija de anticuerpo es incubada con distintas concentraciones de antígeno en solución hasta que la mezcla alcance el equilibrio.
- 2- La concentración de anticuerpo libre remanente en el equilibrio es medida por un ensayo de ELISA indirecto clásico, en el cual se sensibiliza la placa con el mismo antígeno u otro ligando del anticuerpo.

En el paso de la sensibilización, el estado final del antígeno (nativo o parcialmente desnaturalizado) o incluso la utilización de un ligando diferente al antígeno soluble (involucrando el reconocimiento de un epítopo diferente) no es importante, siempre y cuando el anticuerpo pueda unir específica y cuantitativamente al antígeno soluble.

Requisitos del método

Los requisitos del método para determinar correctamente la concentración de anticuerpo libre en el equilibrio son los siguientes:

- 1- La absorbancia obtenida en el último paso del ELISA indirecto, el cual refleja la concentración de anticuerpo libre, debe ser proporcional a la concentración de anticuerpo utilizada.
- 2- Sólo una pequeña fracción de moléculas de anticuerpo libre (menos del 10%) deben haber quedado retenidas en la fase sólida por el antígeno utilizado en la sensibilización, para evitar desplazar el equilibrio de la fase líquida
- 3- Dado que la constante de disociación generalmente es dependiente de la temperatura, ésta debe mantenerse constante.

Para satisfacer los puntos 1 y 2 es necesario determinar previamente por ELISA indirecto: la concentración de antígeno a sensibilizar, el rango de concentración de anticuerpo total a utilizar y el tiempo óptimo de incubación de la solución de anticuerpo en la placa. De este modo, deben ajustarse las condiciones tal que la cantidad de anticuerpo retenido en la placa sea menor al 10% de la cantidad total de anticuerpo empleada en el ensayo.

Cuantificación del anticuerpo retenido en la fase sólida

Para la cuantificación del anticuerpo retenido en la placa se utiliza una cantidad fija de antígeno en la sensibilización. Luego se preparan diluciones seriadas del anticuerpo (rango inicial de 10^{-7} a 10^{-11} M) y se coloca en la placa por triplicado. Al finalizar la incubación, se retira del pocillo con cuidado la solución de anticuerpo correspondiente a cada dilución, se mezclan en tubo de microcentrífuga y se vuelve a incubar en otra placa (ya sensibilizada) por duplicado. Posteriormente, ambas placas son incubadas con un anticuerpo anti-Fc de ratón. Es importante que el tiempo de reacción enzimática en el revelado sea el mismo en las dos placas. Finalmente se grafican las absorbancias resultantes en cada placa vs la concentración de anticuerpo utilizada en la primer placa. El gráfico es lineal dentro de un rango de concentración de anticuerpo muy limitado, alcanzando gradualmente un plateau. La concentración de anticuerpo a elegir para la posterior determinación de K_D debe estar dentro de la parte lineal del gráfico. Dentro de este rango lineal, la fracción de anticuerpo retenido por el antígeno en la fase sólida de la primer placa es deducida de la relación: $V_1 - V_2 / V_1$, donde V_1 es la pendiente de la recta de la primer placa, y V_2 de la segunda placa. Si esta relación resulta en una fracción de anticuerpo retenido menor al 10%, entonces se han cumplido los tres requisitos necesarios para la determinación de la K_D de la interacción antígeno: anticuerpo. Es importante notar que, en los estudios de unión en equilibrio la concentración total de anticuerpo debe ser cercana o menor al valor de la constante de disociación. Por esta razón, dentro del rango de concentraciones de anticuerpo establecido, debe elegirse la menor concentración de anticuerpo que dé una señal de absorbancia cercana a 1,0.

El siguiente paso es la determinación de la K_D . Para esto, se sensibiliza la placa con la cantidad de antígeno definida a partir del ensayo anterior y se incuba el anticuerpo (en la concentración establecida en el punto anterior) con distintas cantidades de antígeno soluble, permitiendo que la solución llegue al equilibrio. Luego se revela la cantidad de anticuerpos retenido en la fase sólida. Dado que la concentración de anticuerpo utilizada se encuentra dentro de un rango de concentraciones en el cual la absorbancia es proporcional a la concentración de anticuerpo, la absorbancia obtenida en cada pocillo se corresponderá con la concentración de anticuerpo libre en el mismo.

Cálculos

a- A_0 es la absorbancia medida en el pocillo que contiene la cantidad total de anticuerpo

$[Ac_i]$ en ausencia de antígeno.

b- $A_1, A_2, \dots, A_n$ son las absorbancias medidas en los pocillos conteniendo las concentraciones de antígeno total $Ag_1, Ag_2, \dots, Ag_n$, la cantidad total de anticuerpo $[Ac_i]$, y las concentraciones de anticuerpo libre $Ac_1, Ac_2, \dots, Ac_n$ en el equilibrio.

c- La concentración de anticuerpo libre $[Ac]$ en cada pocillo, está relacionado con la absorbancia medida en el ELISA por la siguiente ecuación:

$$[Ac] = [Ac_i]/(A - A_0)$$

entonces,

$$[Ac_1] = [Ac_i]/(A_1 - A_0); [Ac_2] = [Ac_i]/(A_2 - A_0); \dots [Ac_n] = [Ac_i]/(A_n - A_0)$$

d- $[CX]$ está relacionado con la concentración total de sitios de anticuerpo $[Ac_i]$ y la concentración de sitios de anticuerpo libre $[Ac]$:

$$[CX] = [Ac_i] - [Ac] = [Ac_i] - [Ac_i]/(A - A_0) = [Ac_i](A_0 - A)/A_0$$

entonces,

$$[CX_1] = [Ac_i](A_0 - A_1)/A_0; [CX_2] = [Ac_i](A_0 - A_2)/A_0; \dots [CX_n] = [Ac_i](A_0 - A_n)/A_0$$

e- $[Ag]$, la concentración de antígeno libre, está relacionada con la concentración total de sitios antigénicos $[Ag_i]$ y la concentración de complejos antígeno-anticuerpo $[Cx]$ por:

$$[Ag] = [Ag_i] - [CX]$$

entonces,

$$[Ag_1] = [Ag_i] - [CX_1]; [Ag_2] = [Ag_i] - [CX_2]; \dots [Ag_n] = [Ag_i] - [CX_n]$$

f- como se indicó arriba,

$$[CX] = [Ac_i](A_0 - A)/A_0$$

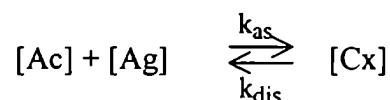
$$[Ag_1] = [Ag_i] - [CX_1] = [Ag_i] - [Ac_i](A_0 - A_1)/A_0; [Ag_2] = [Ag_i] - [Ac_i](A_0 - A_2)/A_0;$$

$$\dots [Ag_n] = [Ag_i] - [Ac_i](A_0 - A_n)/A_0$$

g- Para la representación de Klotz se calcula $1/[Ag]$ y $[Ac_i]/[CX]$ usando la absorbancia obtenida. La ecuación de Klotz, $[Ac_i]/[CX] = K_D/[Ag] + 1$, se puede expresar de la siguiente manera: $A_0/(A_0 - A_1) = K_D/[Ag] + 1$. De la pendiente del gráfico $[Ac_i]/[CX]$ vs $1/[Ag]$ se obtiene el valor de K_D

Determinación de las constantes cinéticas y de equilibrio por biosensor

Como se mencionó más arriba, la reacción bimolecular de unión antígeno-anticuerpo en solución puede ser descripta por la siguiente ecuación:



donde la tasa de formación del complejo está descrita por la constante de asociación cinética de segundo orden k_{as} . A su vez, la tasa de disociación del complejo está descrito por la constante de disociación de primer orden k_{dis} . Además, la velocidad de asociación del anticuerpo con el antígeno es igual a $k_{as}[Ac][Ag]$, y la velocidad de disociación del complejo es $k_{dis} [Cx]$.

Una vez mezclados el anticuerpo con el antígeno ocurrirá la formación y disociación del complejo hasta que, eventualmente, se llegue al estado de equilibrio del sistema, en el cual las velocidades de asociación y disociación serán iguales. En el equilibrio $[Cx]$, $[Ac]$ y $[Ag]$ son constantes.

Entonces, en el equilibrio:

$$k_{as} [Ac][Ag] = k_{dis} [Cx]$$

Esto a la vez puede ser expresado como:

$$[Ac][Ag] / [Cx] = k_{dis} / k_{as} = K_D$$

En general, este desarrollo matemático puede también utilizarse para describir las interacciones llevadas a cabo en el IAsys, aunque las mediciones se realizan bajo diferentes condiciones experimentales, inmovilización irreversible de uno de las moléculas interactuantes.

Análisis de la fase de asociación

En un experimento típico de asociación, la “curva de asociación” es la resultante de los eventos de asociación y disociación. Entonces, la cantidad de complejo formado en un tiempo t ($[CX_t]$) está dado por:

$$[CX_t] = [CX_{eq}] [1 - \exp(-k_{on}t)]$$

donde $[CX_{eq}]$ es la concentración del complejo al equilibrio. k_{on} es la tasa de pseudo-primer orden para la interacción, siendo:

$$k_{on} = k_{as} [Ag] + k_{dis} \quad \text{Implicando que } k_{on} \text{ varía con la concentración de antígeno libre.}$$

La respuesta R del instrumento (medida en arc seg) es proporcional a la masa de antígeno unido al anticuerpo inmovilizado, resultando en:

$$R_t = (R_{eq} - R_0) [1 - \exp(-k_{on} t)] + R_0$$

donde R_t es la respuesta a tiempo t , R_0 es la respuesta inicial y R_{eq} es la respuesta máxima.

Todos estos valores pueden ser calculados experimentalmente, dejando solamente a k_{on} como incógnita a una determinada concentración de antígeno. Entonces, múltiples determinaciones de k_{on} son obtenidas corriendo distintas concentraciones de antígeno. Luego, del gráfico de k_{on} vs concentración de antígeno se obtiene una regresión lineal de pendiente igual a k_{as} y ordenada igual a k_{dis} . El valor k_{dis} así calculado suele tener un error muy alto, de modo que este parámetro se calcula directamente a partir del análisis de los datos de los experimentos de disociación.

Análisis de la fase de disociación

Una vez que el complejo se ha formado, este volverá a disociarse en sus dos componentes (el inmovilizado, ej anticuerpo, y el libre en solución, ej, antígeno).

El evento de disociación puede describirse por la siguiente ecuación:

$$R_t = R_0 \exp(-k_{dis} t)$$

Donde la respuesta del complejo a tiempo t (R_t) es dependiente de la respuesta inicial del complejo R_0 y la constante de velocidad de disociación k_{dis} . Si bien la disociación del complejo ocurre también durante la fase de asociación (luego de la formación del complejo), la k_{dis} puede determinarse con mayor precisión luego de remover el ligando libre de la cubeta, reemplazando el mismo volumen con buffer. De esta manera se desenmascara la fase de disociación, observándose una disminución de la respuesta como consecuencia de la disociación del complejo y la supresión del proceso de asociación por eliminación del antígeno libre.

Análisis de mediciones al equilibrio

Si bien la constante de disociación al equilibrio puede obtenerse a partir de la división de la constante de disociación sobre la de asociación, esta puede determinarse directamente permitiendo que la fase asociación siga hasta llegar a R_{eq} . Entonces, si la velocidad de formación del complejo CX está dada por:

$$d[CX]/dt = k_{as} [Ag][Ac] - k_{dis} [CX]$$

Al expresarlo en términos de respuesta del instrumento se obtiene:

$$dR/dt = k_{as} [Ag] (R_{max} - R_t) - k_{dis} R_t$$

relacionando a R_{max} con $[Ac]$ y R_t con $[CX]$.

En el equilibrio $dR/dt = 0$ y $R_t = R_{eq}$ Entonces,

$$K_A R_{max} - R_{eq} K_A = R_{eq} / [Ag]$$

Graficando R_{eq} en función de $R_{eq} / [Ag]$ se obtiene una recta cuya pendiente es igual a $-K_A$

y la intersección en el eje y es igual a $R_{\max}$.

Notas

Notas