



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Química Biológicas

*Reconocimiento de un antígeno de ADN por
su anticuerpo específico: Integración
mecánica, termodinámica y estructural*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires
en el área Química Biológica

Autor: Licenciado Santiago Sanguinetti
Director de tesis: Dr. Gonzalo de Prat Gay
Consejero de Estudios: Dr. Ricardo A. Wolosiuk

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir

Buenos Aires, 2007

Reconocimiento de un antígeno de ADN por su anticuerpo específico: Integración mecanística, termodinámica y estructural

Resumen

El reconocimiento antígeno-anticuerpo se basa en identificación de estructuras químicas de agentes foráneos como no-propias. El ADN suele ser escasamente inmunogénico dada su similitud química y estructural entre los distintos organismos. Sin embargo, los anticuerpos anti-ADN son un rasgo característico de enfermedades autoinmunes como el Lupus Eritematoso Sistémico. El anticuerpo monoclonal anti-ADN ED-10 fue aislado en nuestro laboratorio a partir de la inmunización de ratones normales, con un complejo formado por el dominio carboxilo terminal del factor de transcripción E2 (E2c) del virus de papiloma humano cepa 16 (HPV16) unido a su oligonucleótido blanco. En este trabajo de tesis se describe el mecanismo de interacción de ED-10 con el ADN, el primer complejo entre un anticuerpo monoclonal y el ADN que lo generó, a través de una caracterización estructural, termodinámica y cinética. Se determinó que el anticuerpo monoclonal ED-10 reconoce solamente una de las hebras del ADN doble cadena utilizado en el complejo inmunogénico. Por otra parte, se cristalizó el fragmento Fab de este anticuerpo formando un complejo con ADN inmunógeno, siendo el primer complejo anticuerpo:ADN genuino descrito al detalle atómico a la fecha. Se realizó la caracterización termodinámica y cinética de la interacción de ED-10 con el ADN inmunógeno y con oligonucleótidos de poli-Timidina. Los primeros experimentos de calorimetría demostraron que la interacción ED-10-ADN esta entálpicamente dirigida, tiene una componente entrópica desfavorable y un cambio de capacidad calorífica negativo. Los estudios cinéticos demostraron que, la asociación entre ED-10 y el ADN presenta solo una fase cinética, con una constante de asociación aproximándose al límite de velocidad descrita para interacciones anticuerpo:antígeno. La presencia de una constante de disociación cinética extremadamente lenta resultó determinante en la formación de este complejo tan estable. Por último, se demostró que ED-10 posee actividad nucleasa, aparentemente no específica, degradando ADN doble cadena tanto en forma lineal como circular.

Algunos de los resultados presentados en esta Tesis han sido incluidos en la siguiente publicación:

“Specific recognition of a DNA immunogen by its elicited antibody” **Sanguineti S**, Centeno Crowley JM, Lodeiro Merlo MF, Cerutti ML, Wilson IA, Goldbaum FA, Stanfield RL, Prat-Gay G de. (2007) *J. Mol. Biol.* Jun 29;370(1):183-95. Epub 2007 Apr 24.

Palabras claves: estructura, anticuerpo, unión ADN, termodinámica, cinética.

Specific recognition of a DNA immunogen by its elicited antibody: Mechanistic, Thermodynamic and structural integration

Summary

Antigen recognition by antibodies is based on the identification of foreign agents chemical structures as “non-self” . The DNA is barely immunogenic due to its chemical and structural similarity among the different organisms. The Systemic Lupus Erythematosus is an autoimmune disease whose main characteristic is the presence of antibodies directed against nuclear components, such as histones and DNA. The monoclonal anti-DNA antibody ED-10 was isolated in our laboratory from normal mice immunized with a complex formed by the carboxi-terminal domain of the E2 transcription factor (E2c) of the human papillomavirus 16 (HPV16) bound to its DNA target. In this thesis the mechanism of interaction of ED-10 with the DNA through a structural, thermodynamic and kinetic characterization is described. In addition it was determined that monoclonal antibody ED-10 recognizes only one of the strands of the double chain DNA used as immunogen in the complex. The Fab fragment of this antibody was crystallized forming a complex with DNA. This structure represents the first *bona fide* antibody-DNA immunogen complex described at atomic detail. The thermodynamic and kinetic characterization of the interaction of ED-10 with its immunogen DNA and with polythymidine oligonucleotides was performed. The first calorimetry experiments demonstrated that the ED-10-DNA interaction is enthalpically driven, it has an unfavorable entropic component and a negative change of heat capacity. The kinetic studies demonstrated that the association between ED-10 and DNA displays an association rate constant in the speed limit for antibody:antigen interactions. The presence of a very slow dissociation rate was decisive in the formation of a very stable complex. Finally, it was demonstrated that ED-10 has nuclease activity, apparently non specific, degrading both linear and circular double strand DNA.

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

“Specific recognition of a DNA immunogen by its elicited antibody” **Sanguineti S**, Centeno Crowley JM, Lodeiro Merlo MF, Cerutti ML, Wilson IA, Goldbaum FA, Stanfield RL, Prat-Gay G de. (2007) *J. Mol. Biol.* Jun 29;370(1):183-95. Epub 2007 Apr 24.

Key words: structure, antibody, DNA binding, Thermodynamic, Kinetic.

Agradecimientos

A Gonzalo, por confiar en mi cuando era solo un proyecto de doctor, por enseñarme bioquímica de proteínas, por hacerme ver siempre que las cosas estaban encaminadas cuando yo perdía las esperanzas, por la dedicación absoluta, por todo, gracias.

A la FIL y al CONICET por pagarme el sueldo y a la ANPCyT por darnos fondos para trabajar.

A Juan y la Flaca, precursores de ED-10. Juancito gracias por toda la ayuda, siempre. Flaqui gracias por enseñarme a ser lo más minucioso posible, por las correcciones de la tesis y por la buena onda, es un placer trabajar al lado tuyo.

A Sebas Klinke por llevar los cristales “ de onda” a Campinas.

A la Dra Robyn L. Stanfield, no solo por resolver la estructura del complejo, sino por la excelente predisposición para responder nuestras preguntas.

A todos aquellos con quienes compartí el laboratorio en estos casi 5 años. A Mary, por haberme recomendado y por las charlas de pasillo entre experimento y experimento. A Ferreiro, por sus seminarios (tal vez ahora los entienda). A Cristian, trabajador incansable. A Leo, por su sabiduría infinita (sos groso, sabelo). A Nadra por los chistes. A Ele compañera de ruta. A Marian por su mirada distinta de las cosas. A Diana por la termodinámica. A Kari por pelearme y hacerme más divertido el día a día. A Lu por las charlas del medio día. A Marce por los alfajores y el futbol. A clara por su tranquilidad. A Nachito, por enseñarme que todos los resultados se pueden analizar una vez más, por sus consejos y su buena disposición para darme una mano siempre. A Lily, por la ayuda infinita, por simplificaros es trabajo y por todo su cariño. Al último pero no la última a Angeles por su frescura y su buena onda. Si que paso mucha gente por el lab.....

A los miembros de la CST, Julio, Andrea y Wolo por dedicación, el análisis y sus consejos para el futuro.

A todos los compañeros científicos del instituto que prestaron ayuda (ó reactivos) cuando fue necesario.

A todo el personal no científicos de la FIL, sistemas, droguero, administración y especialmente a todo el equipo de biblioteca por facilitarnos el trabajo.

A Manu, Ale, Diego y Bert compañeros de Ciencia y aventuras, gracias por esas discusiones científicas y políticas de los jueves.

A los amigos de la vida, por creer que lo que hago esta bueno.....aunque no lo entiendan.

A mi gran familia, por el apoyo constante en todos mis emprendimientos. Especialmente a mi hermano, que siempre está.

A Maru, por todo y más, por el apoyo absoluto, por estar todos los días a mi lado y por sobre todas las cosas porque me enseñas a vivir

*A mis padres,
A quienes les debo lo que soy*

*Examinadlo todo,
Tomad lo bueno*

*Lao Tze,
filosofo de la antigua china*

Abreviaturas

aa: aminoácido
ADNcd: ADN cadena doble
ADNcs: ADN cadena simple
ADNi: oligonucleótido de cadena simple que contiene en su extremo 5' la secuencia 5'-TC
ASA: área de superficie accesible al solvente
 ΔG : cambio en la energía libre de Gibbs
 ΔH : cambio de entalpía del sistema
 ΔS : cambio de entropía del sistema
 ΔCp : cambio de la capacidad calorífica del sistema
EDTA: ácido etilendiamino tetra acético
HEPES: ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazina etanosulfónico
PMSF: Fenil metano sulfonil fluoruro
2-Me: 2-Mercaptoetanol
PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida
SDS: dodecilsulfato de sodio
TBS: tris *buffer* salino
Tris: tris-hidroximetil amino metano
Ac: anticuerpo
Ag: antígeno
AcMo: anticuerpo monoclonal
E2c: extremo C-terminal de la proteína E2 del papillomavirus humano cepa 16.
site 35: oligonucleótido 18 pares de bases correspondiente a uno de los cuatro sitios de unión a ADN de la proteína E2 dentro del genoma del virus HPV-16.
 K_D : constante de disociación en el equilibrio
 K_A : constante de afinidad en el equilibrio
 k_{on} : constante cinética de asociación
 k_{off} : constante cinética de disociación
IgG: inmunoglobulina de isotipo G
Fab: fragmento univalente de una inmunoglobulina
Fc: fragmento constante de una inmunoglobulina
Fv: fragmento univalente correspondiente a la región variable de la cadena pesada y liviana de una Inmunoglobulina
CDR: región de determinación de complementaridad
FR: región conservada dentro del dominio variable
H: cadena pesada de una inmunoglobulina
L: cadena liviana de una inmunoglobulina
C: dominio constante de una inmunoglobulina
V: dominio constante de una inmunoglobulina
VH: región variable de la cadena pesada de un anticuerpo
VL: región variable de la cadena liviana de un anticuerpo
L1, L2, L3: regiones CDR de la cadena liviana
H1, H2, H3: regiones CDR de la cadena pesada
ITC: Titulación calorimétrica isotérmica

Índice

| | |
|---|----|
| Introducción | 1 |
| Interacción entre proteínas y ADN | 3 |
| Conceptos generales | 3 |
| Interacción entre proteínas y ADN cadena doble | 3 |
| Interacción proteína/ADN cadena simple | 5 |
| Las Inmunoglobulinas | 6 |
| Conceptos generales | 6 |
| La topología de plegamiento del dominio Inmunoglobulina | 7 |
| Clases canónicas de CDR | 8 |
| Reconocimiento antígeno anticuerpo | 9 |
| Características del sitio de combinación | 9 |
| Anticuerpos anti-ADN | 10 |
| Anticuerpos anti-ADN y Lupus Eritematoso sistémico | 10 |
| Especificidad y afinidad por antígenos de ADN | 12 |
| Aspectos de la estructura primaria de los anticuerpos anti-ADN | 14 |
| Papel de la cadena liviana y pesada en la interacción de los anticuerpos anti-ADN-ADN | 15 |
| Estructuras cristalográficas de anticuerpos anti-ADN y complejos anti-ADN:ADN | 16 |
| Anticuerpos con actividad catalítica | 20 |
| El anticuerpo monoclonal anti-ADN ED-10 | 21 |
| | |
| Objetivos | 23 |
| Objetivos | 25 |
| | |
| Materiales y Métodos | 27 |
| Preparación de oligonucleótidos | 29 |
| Purificación de los anticuerpos y fragmentos Fab | 30 |
| Estudios de interacción anticuerpo-ADN por espectroscopía de Fluorescencia | 31 |
| Determinación de la constante de disociación al equilibrio | 32 |
| Cálculo de Energía libre de Gibbs (ΔG) | 32 |
| Cálculo de entalpía de van't Hoff | 33 |
| Ensayos de retardo en la movilidad electroforética | 34 |
| Resolución de la estructura tridimensional del complejo ED-10:ADN | 34 |
| Cristalización del complejo ED-10:ADN | 34 |
| Adquisición de datos del cristal por difracción de rayos X | 35 |
| Construcción del modelo, refinamiento y análisis | 35 |
| Adquisición de espectros de dicroísmo circular | 36 |
| Calorimetría de titulación isotérmica (ITC) | 36 |
| Principios operativos del ITC | 36 |
| Consideraciones experimentales ITC | 37 |
| Determinación de los parámetros termodinámicos | 38 |
| Experimento de cinética rápida de flujo detenido (stopped flow) | 41 |
| Principios operativos del equipo de <i>stopped-flow</i> | 41 |
| Consideraciones experimentales <i>stopped-flow</i> | 42 |
| Determinación de las constantes cinéticas | 42 |
| Determinación de los parámetros termodinámicos | 43 |
| Análisis por Biosensor óptico de resonancia de espejos | 44 |
| Principios operativos del Biosensor | 44 |
| Inmovilización de oligonucleótido biotilados: | 45 |

| | |
|---|-----|
| Mediciones en el Biosensor | 46 |
| Determinación de las constantes cinéticas | 46 |
| Análisis de la fase de asociación | 46 |
| Análisis de la fase de disociación | 47 |
| Ensayo de degradación de ADN | 47 |
| Capítulo I | |
| Caracterización Termodinámica-Estructural de la interacción ED-10:ADN | 49 |
| Reconocimiento del ADN | 51 |
| Estudios de unión al equilibrio | 51 |
| Retardo en geles | 57 |
| Cambios conformacionales en ADN unido a ADN | 58 |
| Determinación de la estructura cristalina del complejo ED-10:ADN | 61 |
| Obtención de cristales del complejo ED-10:ADN | 61 |
| Colección de datos y resolución | 62 |
| El sitio de combinación | 67 |
| Cambios conformacionales en el anticuerpo luego de la unión del ADN (cristalografía) | 69 |
| Discusión I | 71 |
| Capítulo II | |
| Estudios calorimétricos de la interacción entre ED-10 y el ADN | 77 |
| Conceptos termodinámicos | 79 |
| Obtención de los parámetros termodinámicos de la interacción ED-10-ADN | 80 |
| Estudios termodinámicos en función a la Fuerza iónica | 85 |
| Estudios termodinámicos en función de la longitud del oligonucleótido | 87 |
| Calorimetría de Desplazamiento | 89 |
| Discusión II | 92 |
| Capítulo III | |
| Estudios cinéticos de la interacción entre ED-10 y el ADN | 99 |
| Conceptos cinéticos | 101 |
| Influencia de la longitud ADN _i en la velocidad de reacción | 102 |
| Influencia de la longitud del d(T) _n en la velocidad de reacción | 110 |
| Determinación de los parámetros cinéticos de la interacción entre ED-10 y el ADN (parte II) | 111 |
| Efecto de la temperatura sobre los eventos de asociación y disociación de ADN _i : caracterización del estado de transición | 114 |
| Discusión III | 117 |
| Capítulo IV | |
| Actividad nucleasa de ADN mediada por ED-10 | 121 |
| Conceptos generales | 123 |
| Degradación de ADN plasmídico por Fab ED-10 | 124 |
| Degradación de ADN lineal por Fab ED-10 | 126 |
| Discusión IV | 130 |
| Conclusiones Generales | 135 |
| Conclusiones generales | 137 |
| Bibliografía | 143 |

Introducción

Interacción entre proteínas y ADN

Conceptos generales

La estructura y función de las proteínas que se unen específicamente al ADN ha sido un tema de interés fundamental debido al papel crucial que estas juegan en la expresión y regulación de la información contenida en los genes. En los complejos proteína:ADN la secuencia de bases del ADN reconocida en forma es directa e indirecta a través de distintas fuerzas interacción¹. A estas podemos dividir las en distintas clases: i) Fuerzas electrostáticas, son de largo alcance y en general no-específicas, contribuyendo en gran medida a la energía de unión; ii) Uniones de Hidrógeno, son interacciones dipolares de corta distancia, en general tienen una escasa contribución a la energía de unión del complejo, pero son esenciales en la especificidad; iii) Interacciones hidrofóbicas, generadas principalmente por cambios de solvatación en la superficie de interacción, son de corta distancia y sensibles a cambios de estructura, contribuyen a la energía de unión; iv) Fuerzas de dispersión, son las de más corta distancia están compuestas principalmente por el apilamiento de bases (*stacking*) en doble-hélices e interacción con ADN cadena simple. Todas estas fuerzas actúan en conjunción en la interacción proteína-ADN, no obstante es muy difícil aislarlas unas de otras y asignar sus contribuciones relativas con precisión.

Interacción entre proteína y ADN cadena doble

Desde un punto de vista puramente estructural, el proceso evolutivo ha generado una amplia variedad de estructuras proteicas que utilizan distintas estrategias para reconocer específicamente una secuencia de ADN². El reconocimiento de las bases del ADN cadena doble (ADNcd) por estas proteínas puede involucrar interacciones específicas, como la formación de puentes de hidrógeno, atracciones de van der Waals e interacciones hidrofóbicas, así como contactos electrostáticos no específicos con los fosfatos de los azúcares del esqueleto del ADN. Estos contactos de reconocimiento pueden tener lugar en el surco menor, el surco mayor o ambos, y pueden estar mediados por hélices alfa, láminas beta ó giros³. Una de las consecuencias de esta variedad de estructuras y modos de reconocimiento, es la diversidad en la superficie proteica involucrada en la interacción

específica con ADNcd, medida en área accesible de superficie (ASA). Estas son de lo más diversas y puede ir desde 600 \AA^2 a 2800 \AA^2 .⁴

Sin embargo, las interacciones entre proteína y ADN no representan un fenómeno simple, que pueda entenderse solamente en términos estructurales. Sino que resulta imperioso conocer el tipo y magnitud de las fuerzas involucradas por lo que el análisis termodinámico es de vital importancia. Así como existe una gran variedad de estructuras que reconocen el ADN, diversas estrategias desde el punto de vista termodinámico evolucionaron para lograr una energía libre de unión (ΔG) favorable en términos de entalpía (ΔH) ó entropía (ΔS). Si bien el valor del cambio de energía libre para las interacciones proteína-ADN no varía mucho,⁵ reflejando un rango de afinidades similar por la secuencia blanco. Los componentes de la misma, entálpicos ó entrópicos, pueden ser muy diversos. Para algunas interacciones específicas proteína ADN, un cambio favorable de entalpía ($\Delta H < 0$) predomina y dirige la interacción a pesar de un cambio desfavorable en la entropía ($\Delta S < 0$) mientras que para otras una cambio en la entalpía desfavorable ($\Delta H > 0$) es sobrepasado por un cambio en la entropía favorable ($\Delta S > 0$)⁵. Estas diferencias termodinámicas han sido asignadas recientemente a interacciones diferenciales con el surco menor o mayor del ADN⁶. En particular se observó que, el valor de ΔH de las proteínas que interactúan con el surco mayor es siempre negativo, es decir favorable, mientras que en las que lo hacen con el surco menor poseen ΔH siempre positivo, es decir desfavorable. Indicando que la entalpía de deshidratación del surco menor excede por lejos aquella absorbida por la formación de nuevo enlaces⁷.

Las interacciones entre biomoléculas se caracterizan por producir cambios en la capacidad calorífica (ΔCp) del sistema, medidos como la dependencia de la entalpía en función de la temperatura. Este parámetro termodinámico es muy utilizado en las interacciones proteína-ADN, ya que es extremadamente sensible a los cambios en la estructura del solvente. El cambio en la superficie apolar, y en menor medida polar, expuesta al solvente tiene distintos efectos sobre el ΔCp del sistema permitiendo entender las bases físicas que subyacen a la formación de la interfaz bimolecular^{8; 9; 10; 11}. Este tipo de comportamiento fue originalmente demostrado para plegamiento de proteínas¹². Si bien el ocultamiento de superficie al solvente es un fuerte componente en el ΔCp , no se puede explicar este

fenómeno solamente en términos de estructura y esta simple situación se complica debido a distintas contribuciones, como se verá más adelante. En los primeros estudios realizados con el factor de transcripción *cro*/ADN¹³ y el represor *trp*/operón⁹, así como en muchos trabajos subsiguientes, se propuso que las interacciones específicas proteína-ADN se caracterizan por tener un gran cambio negativo en el ΔCp . De manera opuesta, este parámetro prácticamente no se modifica en las interacciones no específicas, lo que indica que en estos caso no se producen cambios en la exposición al solvente.

Interacción entre proteína y ADN cadena simple

El reconocimiento del ADN cadena simple (ADNcs) resulta también esencial en distintos procesos biológicos, incluyendo recombinación, reparación, transcripción, entre otros. A diferencia del ADNcd, los ácidos nucleicos de cadena simple que no se arreglan en estructuras compactas, sino que forman estructuras más flexibles y exponen las bases (predominantemente hidrofóbicas) al solvente. Por lo tanto las proteínas que unen ADNcs contienen frecuentemente aminoácidos aromáticos en la superficie de interacción, ya que estos frecuentemente interactúan con las bases nitrogenadas¹⁴. Los estudios estructurales y termodinámicos de las proteínas que reconocen ADNcs aportaron conocimientos claves en cuanto a mecanismos de reconocimiento. En general la unión del ADNcs se produce por un proceso que involucra interacciones con las bases y el esqueleto del ADN, de una manera completamente distinta al ADNcd^{15; 16; 17; 18; 19}. Uno de los casos mejor caracterizados estructuralmente, es el de la proteína codificada por el gen 5 del bacteriófago fd²⁰. Cuando el ADN cadena simple viral es sintetizado esta proteína se le une evitando su degradación por nucleasas. Esta es una proteína dimérica prácticamente compuesta en su totalidad por hebras β . Las cadenas laterales de los residuos aromáticos de dos de sus hebras establecen contactos con las bases del ADN del tipo de apilamiento. Existen diversas proteínas que reconocen el ADNcs tanto en forma específica^{18; 21; 22; 23} como inespecífica²⁴. En general, los parámetros termodinámicos de este tipo de interacciones se caracterizan por estar entálpicamente dirigidas y opuestas por la entropía^{10; 25; 26}.

Las inmunoglobulinas

Conceptos generales

La estructura de una molécula de inmunoglobulina (Ig) fue propuesta por primera vez en los laboratorios de Edelman²⁷ y Porter²⁸ en la década del 50. Actualmente se sabe que estas están compuestas por 2 cadenas proteicas pesadas (50-60 kDa) y dos cadenas livianas (23 kDa) unidas entre sí por puentes disulfuro (Figura 1).

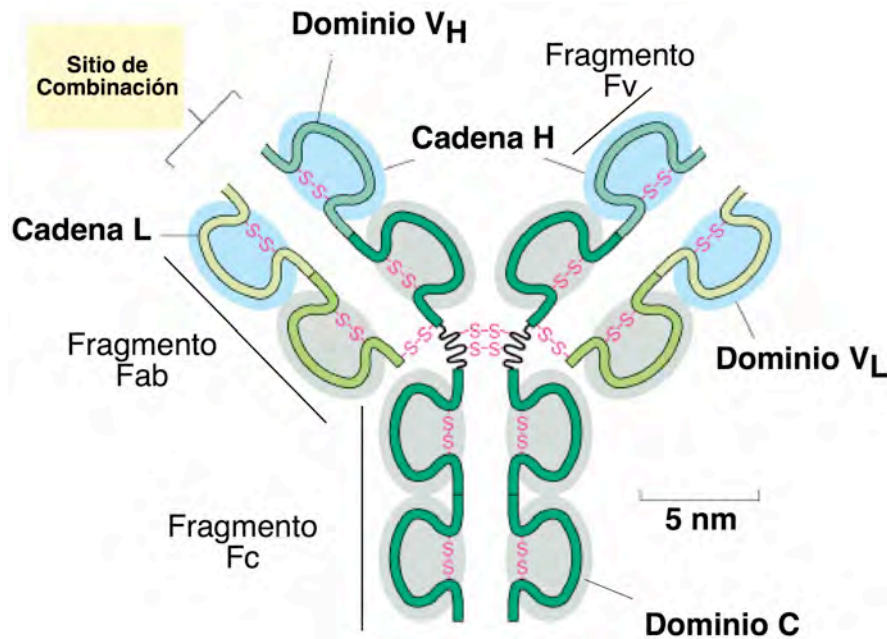


Figura 1. Ilustración esquemática de una molécula típica de inmunoglobulina. Esta compuesta por dos cadenas pesadas idénticas (H) y dos cadenas liviana idénticas (L). Estas se mantienen unidas mediante enlaces disulfuro (S-S). Los sitios de combinación (unión del antígeno) están formados por un complejo aminoterminal de las cadenas liviana y pesada. La degradación con la enzima proteolítica papaina produce los fragmentos Fab y Fc.

Todas las Ig son glicoproteínas y contienen dos o más cadenas de azúcares, usualmente adicionadas a las cadenas pesadas. En humanos y roedores existen 5 tipos de Ig denominados isotipos, los cuales difieren en secuencia de aminoácidos, contenido de carbohidratos y propiedades antigénicas de sus cadenas pesadas. En contraste, las cadenas livianas son las mismas en todos los isotipos. Estos son: *i*) IgG, la más abundante de las Ig y tienen bajo contenido de carbohidratos, son de alta afinidad y surgen tras la exposición repetida a un antígeno (Ag); *ii*) IgM, complejos de alto peso molecular compuestos por la unión de 5 subunidades de Ig, en general son de baja afinidad; *iii*) IgA, juega un papel

fundamental en inmunidad al nivel de la mucosa; *iv*) IgD, están presentes en la membrana de los linfocitos B y por último *v*) IgE, participa activamente en las reacciones alérgicas.

Cada cadena pesada (H) de una Ig esta compuesta por tres dominios constantes (C) y 1 dominio variable (V), mientras que cada cadena liviana (L) esta compuesta por un dominio C y uno V. Sin embargo, todos estos dominios se arreglan de una manera similar en el espacio. A este tipo de plegamiento se le ha dado el nombre de *immunoglobulin fold* y su estructura fue determinada en trabajos pioneros de cristalografía de rayos X en los laboratorios de Poljak y Edmunson^{29 30; 31}. Desde entonces hasta la fecha, muchas estructuras de alta resolución de Ig han sido obtenidas, mostrando características estructurales semejantes^{32; 33; 34}.

La topología de plegamiento del dominio Inmunoglobulina

A partir de estos estudios cristalográficos, se pudo determinar que el dominio de Inmunoglobulina posee una estructura globular compacta particular. La misma está formada por láminas β anti-paralelas (7 en los dominios constantes, 8 ó 9 en los variables) arregladas en 2 hojas β solapadas²⁹ (Figura 2A). Los estudios realizados por resonancia magnética nuclear (RMN) confirmaron que este dominio adquiriría prácticamente la misma estructura en solución³⁵. Existen pequeñas diferencias en el plegamiento del dominio C y el V, en el primero una hoja β es formada por tres hebras y la otra por las 4 restantes (Figura 2B). Cada hebra esta conectada con la siguiente por pequeños giros ó *loops* los cuales no poseen ninguna estructura secundaria. En el dominio V dos hebras β conectadas en forma de orquilla, o una sola hebra, se insertan en una hoja de tres hebras. Los *loops* que conectan las hebras β son mucho más largos que en el dominio constante. La lámina de cuatro cadenas localizada por fuera y la hoja de cinco hebras β interactúan entre sí, estabilizando este dominio (Figura 2B). Las regiones extendidas de los *loops* del dominio V de la cadena liviana (VL) de la cadena pesada (VH) se denominan regiones determinantes de complementariedad (CDR, que responden a la sigla en inglés *complementarity determining region*). Cada Ig contiene 6 CDRs, tres correspondientes a la cadena liviana (L1, L2, L3) y tres a la cadena pesada (H1, H2, H3), estos se agrupan en el espacio formando el sitio de combinación del Ag.

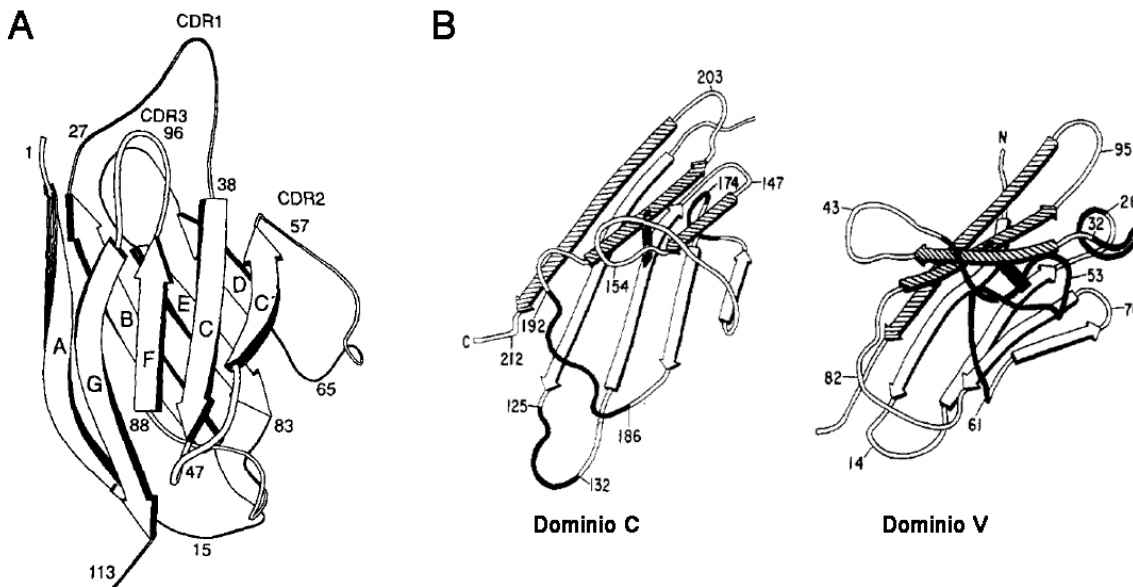


Figura 2. Representación de cintas de la estructura tridimensional del dominio de inmunoglobulina. (A) Plegamiento del dominio variable de la cadena liviana de una Ig murina. Las hebras β (indicadas con flechas) están determinadas con letras mayúsculas. Puede observarse su estructura compacta y globular compuesta por hebras β antiparalelas. (reproducido de *Constantine et al.*, 1994). (B) Dominios constante, C y variable, V de una cadena λ humana. Las flechas rayadas indican la lámina β de tres hebras mientras que las blancas pertenecen a la lámina β de cuatro cadenas. Como barras negras están representados los enlaces disulfuro intradominio estabilizando ambas hojas. (reproducido de *Edmundson et al.*, 1975).

Clases canónicas de CDR's

Los CDR's son las regiones más móviles del dominio variable. A pesar de esto, se observó que estos segmentos, a excepción del H3, poseen solo unas pocas conformaciones para el arreglo espacial de la cadena principal. A este grupo de conformaciones se las denominó "estructuras canónicas" y se determinan a partir de la longitud y composición de aminoácidos conservados de cada región CDR³⁶. De acuerdo a este criterio podemos dividir a las regiones CDR κ L1 y κ L3 en 6 clases estructurales cada una, λ L1 en cuatro clases, λ L3 en 2 clases, H1 y H2 en tres y cuatro clases respectivamente y L2 no posee variación de clase^{37 38}. La combinación de estas distintas estructuras canónicas crea una enorme variedad de sitios de combinación posibles, sin embargo en la naturaleza se encuentra una pequeña proporción de todas las combinaciones posibles³⁹.

Reconocimiento Antígeno-Anticuerpo

Características del sitio de combinación de las inmunoglobulinas

El sitio de combinación (Figura 3) puede adoptar distintos arreglos y formas dependiendo del tamaño y la secuencia de los *loops*. Estos pueden formar desde una superficie plana y chata hasta una cavidad o un surco⁴⁰. Existe una correlación entre la forma del sitio de combinación y el Ag reconocido⁴¹. En anticuerpos (Ac) vespecíficos de haptenos, el sitio de combinación se asemeja a un grieta⁴² debido a que, se cree, esta forma optimiza la cantidad de contactos entre el hapteno y el Ac. Los haptenos, son moléculas pequeñas que inducen una producción específica de Acs cuando son adheridos a una proteína que actúa como transportadora. Por ejemplo, el sitio de combinación del Ac anti-Flouoresceína 4-4-20 esta formado por un compartimiento relativamente profundo delineado por los residuos de la cadena liviana y pesada⁴³. Los sitios de combinación de los Acs anti-péptidos son generalmente descriptos como bolsillos cóncavos de distinto tamaño, formados por casi o todos los CDR's⁴⁴. Como el caso del sitio de unión del octapeptido de angiotensina II que es bastante profundo y angosto aumentando significativamente el área de contacto entre el Ag y el Ac⁴⁵. Los sitios de unión de moléculas más grandes como proteínas presentan en general superficies más extendidas y planas. La superficie del Ac y el Ag son altamente complementarias en cuanto a conformación y carga, y las protuberancias de uno de ellos coinciden con depresiones en el otro⁴⁶. El área de contacto entre el Ac y el Ag (superficie oculta al solvente) comprende entre 156 a 500 Å² para moléculas pequeñas y 632 a 916 Å² para complejos formados con Ag proteicos⁴⁷. Si embargo, no existe ninguna correlación directa entre área oculta por los Ag y afinidad por el Ac⁴⁸.

El numero de regiones CDRs involucrados en la unión al Ag depende del exclusivamente del par Ag-Ac⁴⁴. Por ejemplo, en complejos de Acs con haptenos u otras moléculas pequeñas como péptidos, la región L2 no participa en la unión con el Ag. Por el contrario, en epítopes pertenecientes a Acs de mayor tamaño como la proteína lisozima, los seis CDR's están involucrados en la interacción. De toda maneras esta no es una regla general; por ejemplo el sitio de combinación del Ac anti-dinitrofenilo utiliza los tres CDR's de la cadena liviana y el CDR H3 de la cadena pesada⁴⁹, mientras que en la estructura del Ac anti-neuroamidasa el CDR L1 no es utilizado⁵⁰. Por último, debido a su hiper-variabilidad

en la longitud y composición de secuencia, el CDR H3 es extremadamente importante para la especificidad, estando involucrado en la mayoría de las interacciones Ag-Ac⁵¹

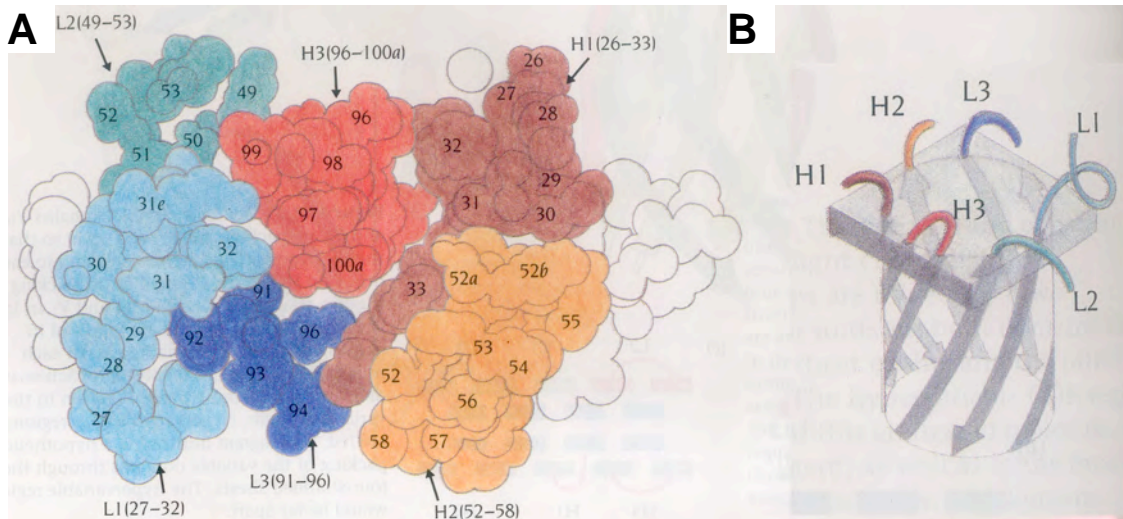


Figura 3. Representación del sitio de combinación de las inmunoglobulinas. (A) Modelo espacial de las regiones hipervariables de un fragmento Fab. (B) Representación esquemática de las 6 regiones hipervariables conformando el sitio de combinación (L1-L3, H1-H3). (reproducido de Chothia & Lesk, 1987)

Por último, la comparación de las estructuras de los Ac libres y unidos cristalizados indica que existen cambios en la estructura del Ac, tanto en el sitio de combinación como en sus cercanías, como resultado de la formación del complejo con el Ag. Estos cambios pueden generalmente ser caracterizados como una adaptación estructural al Ag⁵². Estos pueden incluir, movimientos en la cadena proteica, cambios en la orientación de las cadenas laterales de los aminoácidos y desplazamiento relativo del VH con respecto al VL.

Anticuerpos Anti-ADN

Anticuerpos anti-ADN y Lupus Eritematoso Sistémico

Los Acs anti-ADN fueron reportados por primera vez en 1957 en sueros de pacientes con Lupus eritematoso sistémico (LES)⁵³. Si bien el suero normal contiene niveles bajos de Acs anti-ADN, mayormente del tipo IgM⁵⁴, los sueros de pacientes de LES contienen concentraciones altas de Acs anti-ADN, especialmente moléculas de IgG con alta afinidad tanto por ADNcs como ADNcd. Otra característica de la enfermedad es la producción de

Acs contra otras estructuras nucleares incluyendo RNA ribosomal, histonas, ribonucleoproteínas, entre otras⁵⁵. Si bien el estímulo inmunogénico original no es conocido, los agentes etiológicos podrían abarcar desde factores ambientales como virus, bacterias y drogas hasta características genéticas hereditarias relacionadas con una mayor susceptibilidad a la desregulación del sistema inmune⁵⁶. El análisis genético de los Acs anti-ADN generados en forma espontánea en ratones genéticamente predispuestos a desarrollar la enfermedad (por ejemplo la cepa *(NZBxNZW)F1*)⁵⁷, indicó que estos Ac son el estímulo de una respuesta clonal de células B dirigido por un Ag específico; No obstante, la naturaleza o forma de los inmunógenos inductores de la respuesta anti-ADN no han sido determinados aún. En los Acs anti-ADN aislados de estos ratones predispuestos a desarrollar LES, la utilización recurrente de determinadas familias de genes variables y la extensiva mutación somática presente en las regiones variables a medida que la respuesta inmunológica madura, ha sugerido al ADN como el estímulo inductor de estos Acs^{58; 59; 60; 61}.

No obstante, estos trabajos presentaron un interrogante: Estaba el ADN actuando como un Ag en sí mismo? o solo lo hacía como hapteno? La hipótesis en la cual se considera al ADN como un hapteno, que necesita estar unido a un polipéptido transportador para inducir la respuesta T ha ido creciendo en los últimos años^{62; 63; 64; 65; 66}. A partir de esto, algunos modelos de inmunización transportador-hapteno con complejos proteína/ADN han demostrado que es posible inducir y mantener una respuesta autoinmune en ratones normales^{63; 65; 66; 67; 68}. Sorprendentemente, estos Acs presentaron características muy similares a los Acs aislados de modelos de autoinmunidad tanto en la especificidad por el ADN como en las estructuras de los CDR de las VH y VL (ver más adelante).

Uno de estos modelos es el desarrollado por el grupo de Marion^{66; 67} en el cual se utilizó como transportador el péptido *Fus1*. Este, corresponde a una porción de una proteína de *Trypanosoma cruzi* con capacidad de unir ADN y es altamente inmunogénico. La inmunización con este complejo produjo Acs con reactividad contra ADN cadena simple y doble⁶⁶. Por su parte el grupo de Rekvig postula una etiología viral para la autoinmunidad ligada al LES. Los trabajos de este grupo se demostraron que la expresión de una proteína viral (al Ag mayor T de poliomavirus) es suficiente para iniciar la producción de Acs contra

ADN entre otros^{62; 63}. Estos autores sugieren que el Ag T actúa como proteína transportadora del ADN otorgándole a éste su carácter inmunogénico.

En nuestro laboratorio se realizó la inmunización de ratones normales, con un complejo proteína:ADN formado por fragmento C terminal del factor de transcripción E2 (E2c) del virus de papiloma humano cepa 16 (HPV16) y un oligonucleótido cadena doble de 18 pares de bases correspondiendo al sitio 35 del genoma de HPV16. Esto resultó en la producción de Acs anti-ADNdc que reconocieron específicamente al ADN inmunógeno⁶⁸; el anticuerpo monoclonal (AcMo) ED-10 es uno de ellos. Así mismo, la inmunización repetida con E2c libre también indujo la producción de Ac anti-ADN, pero esta vez, sin especificidad de secuencia alguna⁶⁹. El conjunto de estos resultados indicaron que la proteína viral E2c puede inducir dos clases de respuesta anti-ADN: una dirigida contra el ADN endógeno y otra en la cual se producen Acs secuencia específicos. Un artículo publicado recientemente por Sundar y colaboradores⁷⁰ apoya esta teoría. En este trabajo los autores demostraron que la sola expresión de la proteína EBNA-1 del virus Epstein-Barr inducía la producción de Ac anti-ADN en ratones normales. El dominio carboxi-terminal de la proteína EBNA-1 es estructuralmente similar a E2c sugiriendo que la alta inmunogenicidad de este tipo de proteínas, sumada a la formación de complejos estables con el ADN, podría ser la causa de la producción de Acs anti-ADN. El hecho que complejos proteína:ADN o que proteínas heterologas con capacidad de unir ADN puedan inducir la producción de Acs anti-ADN de características similares a los desarrollados en los mecanismos de autoinmunidad, hace suponer que el mecanismo de iniciación de la respuesta autoinmune anti-ADN debe ser el reconocimiento de un complejo proteína:ADN por parte de células B y T específicas⁷¹.

Especificidad y afinidad por Antígenos de ADN

Antes del surgimiento de la tecnología de hibridomas, los estudios de afinidad y especificidad de los Ac anti-ADN y el ADN se realizaban utilizando sueros policlonales provenientes de humanos o de modelos en ratones. Mediante la inmovilización de ADN en fase sólida se identificaron por afinidad, tres tipos de Acs anti-ADN, aquellos que reconocen ADNcd, ADNcs, o ambos^{55; 72; 73}. En aquel momento, la heterogeneidad de los sueros policlonales representó un problema mayor en los estudios pioneros utilizando Acs

anti-ADN. Por lo tanto, la posibilidad de generar AcMos obtenidos principalmente de modelos murinos de lupus facilitó la caracterización de este tipo de proteínas. Relativamente pocos AcMos anti-ADNdc fueron caracterizados hasta la fecha.

En los primeros trabajos, Braun y Lee, mediante ensayos de protección frente a la desnaturalización, demostraron que cada sitio de combinación del AcMo anti-ADNcd Jel 241 reconoce aproximadamente 6 pares de bases en el ADN⁷⁴. Este valor es típico de las proteínas que unen ADN, las cuales reconocen de 6 a 10 pares de bases del ADNcd⁷⁵. Este AcMo demostró tener una constante de disociación en el equilibrio (K_D) medida por filtración en geles en el orden 10 μ M para el ADNdc. En trabajos posteriores, Herrmann *et al* utilizaron la técnica de SELEX⁷⁶ para determinar la una secuencia consenso de ADNdc para el AcMo anti-ADNcd 33.C9⁷⁷. Brevemente, esta técnica se basa en la selección de una secuencia de ADN consenso a partir de una población aleatoria de oligonucleótidos. En cada ciclo se separan los complejos AcMo:ADN de mayor afinidad, luego se extrae el ADN para ser utilizado como molde de una PCR. El producto de esa PCR es utilizado para un nuevo ciclo de selección. Recientemente este mismo grupo demostró que ese Ac reconoce al ADNdc con una alta afinidad ($K_D \approx 10$ nM)⁷⁸. En nuestro laboratorio se demostró que ED-10 reconoce al ADNdc inmunógeno con una afinidad aún mayor ($K_D \leq 1$ nM)⁶⁸. Posteriormente se demostró que, esta interacción posee entalpía y entropía favorable y produce un desplegamiento parcial del ADN⁷⁹.

Los primeros trabajos con AcMos anti-ADNcs encontraron una alta variabilidad en cuanto a la especificidad contra los oligonucleótidos sintéticos reconocidos sin embargo en la mayoría de los casos los arreglos de politimidina resultó ser el polímero mejor reconocido^{80; 81; 82}. Más aún, muchos AcMos anti-ADNcs no reconocen poliribonucleótidos⁷³. Esta observación sugirió que o bien los Acs eran capaces de discriminar entre los dos tipos de azúcares, o bien la mayor tendencia a formar estructuras secundarias o terciarias en los polímeros de ARN imposibilitaba el acceso a las bases nucleotídicas. Esta última parecería ser la hipótesis correcta ya que los AcMos son capaces de unir oligo-deoxi-uracilo^{81; 83}.

Posteriormente, Tetin y colaboradores demostraron que BV04-01, un AcMo obtenido de ratones con predisposición a desarrollar lupus (NZBXNZW)F1, posee selectividad por

oligonucleótidos de politimidina (p(dT)) presentando una $K_D \approx 0.1 \mu\text{M}$ para un polímero de 7 bases de longitud (d(T)₇)⁸⁴. Trabajos posteriores realizados por Komissarov *et al* demostraron que el AcMo DNA-1 (surgido de una biblioteca combinatorial de bacteriofagos) también era capaz de discriminar entre distintos polímeros de ADN, presentando preferencia por d(T)₁₅, $K_D \approx 0.1 \mu\text{M}$.

Más allá de poseer selectividad por el tipo de bases, los trabajos del grupo de Glick con ligandos seleccionados artificialmente han demostrado que los anti-ADNsc poseen especificidad de secuencia⁸⁵. Utilizando AcMos anti-ADNcs, derivados de un raton con predisposición a generar lupus, mediante tecnica de SELEX⁷⁶ aislaron una secuencia consenso de alta afinidad de un grupo de oligonucleótidos generados al azar⁸³. En particular el AcMo anti-ADN 11F8 ha sido extensamente caracterizado. Este es capaz de reconocer la secuencia específica seleccionada de ADNsc con una afinidad del orden $K_D \approx 10 \text{ nM}$ y discriminarla frente a otras secuencias de ADNsc⁸⁵.

Aspectos de la estructura primaria de los Anticuerpos anti-ADN

Muchos de los Acs anti-ADN se distinguen por poseer un punto isoeléctrico elevado lo que genera una carga positiva a pH neutro^{86; 87}. Esto se debe, en gran parte, a que sus regiones V poseen un inusual número de aminoácidos básicos como arginina y lisina. Especialmente la secuencia de las regiones CDR^{88; 89}. El aminoácido arginina aparece en una frecuencia inusualmente alta en los CDRs de las IgG de los autoAcs anti-ADNdc^{88; 90; 91}. Este residuo es particularmente utilizado para la unión con el ADN en Acs y otras proteínas que unen ADN, ya que puede formar uniones hidrógeno con las bases y uniones iónicas con los fosfatos del ADN⁹². La asparragina, es otro aminoácido que puede formar uniones de hidrógeno y su aparición en los CDR de los Acs anti-ADN también es muy frecuente⁹².

Aunque los anti-ADN utilizan segmentos VH de distintas líneas germinales ciertos miembros de algunas familias como: J558, Q52 y 7813 ocurren con una frecuencia mayor a la predicha por un mecanismo aleatorio⁸⁸. Como en el caso de las cadenas pesadas, el uso de las cadenas livianas no esta restringido, pero las familias Vκ1 y Vκ8 ocurren con mayor frecuencia que la predicha por el azar, al igual que ciertas combinaciones VH-VL^{59; 88}.

Además, la estructura primaria muestra una gran superposición en la utilización de los genes variables entre los Acs anti-ADN generados por autoinmunidad y aquellos que resultaron de inmunizaciones experimentales^{93; 94; 95}. Esto lleva a suponer que, tanto los autoAcs anti-ADN surgidos espontáneamente como los inducidos por inmunización, surgirían del mismo grupo precursor de células, donde algunas podrían ser productoras naturales de autoAcs anti-ADN que evadieron los mecanismos de tolerancia⁹². De todas maneras no pueden descartarse el surgimiento de Acs anti-ADN mediado por la reactividad cruzada entre el ADN y otros Acs no propios.

Papel de la cadena liviana y pesada en la interacción de los anticuerpos anti-ADN-ADN

El requerimiento tanto de la cadena L como la H para formar un sitio de combinación completo fue documentado en los trabajos pioneros con Ig. En estos se demostró mediante métodos químicos que ambas cadenas participaban en la interacción con el Ag^{96; 97}. Esto también ha sido confirmado a partir de las estructuras cristalinas de complejos Ag/Ac resueltas⁹⁸. Por otra parte, la mayoría de los Acs descritos, forman el grueso de los contactos con los Acs utilizando la cadena H. Principalmente el CDR-H3 establece más contactos que cualquier otro CDR⁹⁸. Por ejemplo, en un trabajo clásico, Utsumi *et al* demostraron que sólo la cadena pesada del AcMo anti p-aminofenil- β -lactosido da cuenta del 87% de la afinidad de unión de ese Ac⁹⁹. La importancia de la cadena H en la unión al Ag de muchos Acs anti-ADN, tanto los autoinmunes como los inducidos por inmunización, fue documentada extensamente^{100; 101; 102; 103; 104; 105; 106; 107; 108}. La dominancia de la cadena pesada parecería ser universal en los Acs anti ADN de ratón¹⁰⁴, sin embargo se ha descrito para dos AcMos anti-ADN de humanos que la cadena liviana es fundamental para la unión al ADN¹⁰⁹.

Un estudio detallado realizado intercambiando los dominios CDRs del AcMos DNA-1 (alta afinidad por el ADNsc) y con los del AcMo D5A (baja afinidad por el ADN) analizó el papel de los distintos CDRs individuales del dominio VH¹¹⁰. En este trabajo se probó la importancia de los CDR-H1 y CDR-H3 de la región VH en el reconocimiento del ADN por DNA-1. Mediante el intercambio de los CDRs entre los Acs, demostraron que la afinidad y

especificidad para el reconocimiento de ácidos nucleicos está drásticamente alterada por el cambio de los mismos. Luego, mediante mutagénesis sitio dirigida, el mismo grupo determinó aquellos residuos críticos del CDRH3 de DNA-1 que determinan la afinidad y la especificidad para la unión a oligonucleótidos^{111; 112}.

Mientras que se demostró que los VH *per se* son capaces de unir ADN, muchos trabajos apuntan a que sería el VL el que modularía esta actividad. Incluso, algunos VL pueden bloquear completamente la actividad de unión al ADN de los VH^{102; 103; 107; 113}. Un ejemplo de esto es el caso del Ac anti-ADNdc 3H9, obtenido de ratones con lupus, la especificidad y afinidad de unión al ADN se vio modificada por la combinación de una cadena H con distintas cadenas L¹⁰². Por lo tanto la cadena L jugaría un papel importante en la modulación de la afinidad y especificidad de unión y podría además permitir reconocimiento de distintos determinantes antigénicos⁹². Así mismo, en estudios con AcMos anti-ADN obtenidos de ratones predispuestos a general lupus (MRL-*lpr*) se demostró que la presencia de arginina en el CDR3 de la VH y VL determinaba la dominancia de las cadenas en la unión al ADN. Indicando que, en aquellos Acs en los que ambas cadenas son necesarias para la unión al ADN, los residuos de arginina se encontraron en ambos CDR3; mientras que en los que solo interaccionan por medio de la cadena pesada, solo presentan argininas en la VH¹⁰⁴.

Estructuras Cristalográficas de Anticuerpos anti-ADN y complejos anti-ADN/ADN

De acuerdo a lo reportado en el *Protein Data Bank*¹¹⁴ (PDB) a la fecha solo existen al rededor de 400 estructuras de Acs. De esta suma, sólo 142 corresponden a complejos Ac/Ag y un puñado a complejos de Ac:ADN, mientras que hay casi 900 estructuras de complejos proteína:ADN determinadas. El análisis de estructuras cristalográficas de fragmentos Fab y Fv con distintos Ags aportó información importante en cuanto a las contribuciones de las cadenas H y L en la unión. De esta manera, se demostró que en muchos de los casos los 3 CDRs de cada una de las cadenas establecen contactos con el Ag⁹⁸.

La primera estructura cristalográfica determinada de un fragmento Fab de un Ac autoinmune fue la del AcMo Hed10¹¹⁵. Este anti-ADN fue aislado de ratones NZB/NZW

propensos a generar lupus y mostró tener cierta especificidad por oligonucleótidos p(dT). La estructura fue determinada con una resolución de 3.0 Å y en esta se observó que el dominio variable y el constante se encontraban conectados por polipéptidos cortos aportando flexibilidad al dominio Fv dentro de la estructura del Fab. La estructura general de este Fab mostró ser similar a los otros descriptos por lo que, en este trabajo, se propuso que el potencial patogénico de los Acs autoinmunes debería residir en las regiones CDR y no en la estructura general del Ac.

Herron y colaboradores realizaron un análisis detallado de la estructura de un Ac libre y formando un complejo con ADNsc¹¹⁶. En este trabajo se describió la interacción del Ac BV04-01 con un oligonucleótido de 3 bases de timidina. La comparación estructural entre el Ac libre y el complejo reveló pequeños ajustes en la orientación de los dominios VH y VL luego de la interacción. Sin embargo, se observaron grandes cambios conformacionales locales, principalmente en el CDRL1 y CDRH3 los cuales contribuyeron a mejorar la complementariedad entre el fragmento Fab y el d(T)₃. La mayor cantidad de contactos con BV04-01 se observaron con la base de la timidina central, la cual está inmobilizada por interacciones cooperativas de apilamiento de regiones hidrofóbicas y uniones hidrógeno. La timidina central está intercalada entre el anillo del triptofano H100a y el anillo de la tirosina en la posición L32 (Figura 4). Se observó un movimiento significativo de este triptofano respecto a su posición en la conformación libre para permitir este apilamiento. La orientación de la timidina es favorable también para la formación simultánea de dos uniones de hidrógeno con un oxígeno carbonilo de la cadena principal y con el grupo hidroxilo de la cadena lateral de la serina L91 (Figura 4 A). Las dimensiones determinadas para el surco del sitio de combinación de BV04-01 indicaron que era capaz de acomodar DNAs pero no DNAd. A pesar que la timidina central es la que establece la mayoría de los contactos, las otras dos establecen contactos con la cadena L o H de BV04-01. Estos aspectos de la estructura cristalina son consistentes con los resultados determinados en el mapeo químico realizado en BV04-01¹¹⁷ y con el modelado molecular del Ac de ratón anti-ADNcs V-88 y su complejo con el ADN¹¹⁸.

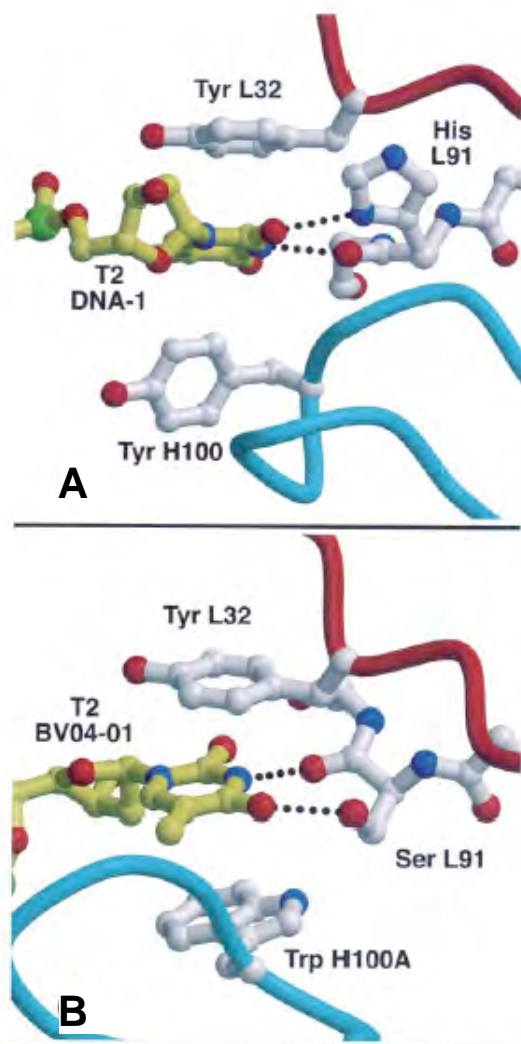


Figura 4. Módulo de reconocimiento de ADNcs de Anticuerpos (D-ARM). (A) El sitio de T2 del Fab de DNA-1:d(T)₅. (B) El sitio T2 de BV04-01:d(T)₃. Las líneas punteadas denotan uniones de Hidrógeno. El ADN (amarillo) y las cadenas laterales de los aminoácidos del D-ARM (blancas) están representados como esferas y bastones. (reproducido de *Tanner et al.*, 2001).

La porción Fab del Ac DNA-1 fue cristalizada con un ligando de 5 bases de timidina d(T)₅^{119; 120}. Esta estructura resuelta a 2.1 Å mostró que DNA-1, al igual que BV04-01, se reconoce al oligo(dT) mayormente mediante el apilamiento de las bases entre los anillos aromáticos de los aminoácidos (en este caso todas cadenas laterales de tirosina). En esta estructura también se observaron uniones de hidrógeno entre la proteína y el ADN. Los residuos de tirosina que intercálan las bases del ADN son el L32, L49, H100a mientras que la histidina L91 y la asparragina L50 establecen uniones de hidrógeno (Figura 4 B). La comparación de la estructura de DNA-1 con las otras estructuras Ac:ácido nucleico resueltas hasta ese momento permitió al grupo de Tanner sugerir un módulo común de reconocimiento para Acs que unen ADNcs¹²⁰. Este motivo se denominó “D-ARM” y consiste en la tirosina L32, una unión de hidrógeno en la posición L91 y una cadena lateral

aromática en la punta del CDRH3 (Figura 4). Las cadenas laterales de arginina del CDR-H3 de DNA-1 parecerían jugar un papel fundamental en la unión al ADN. En lugar de formar pares iónicos con d(T)₅, estas contribuirían al reconocimiento de d(T)₅ ayudando a mantener la integridad estructural del sitio de combinación. Existen otros ejemplos en los cuales algunos residuos de los CDRs no solo participan en el reconocimiento del Ag, sino que influyen también la estructura del mismo^{121; 122}. Esto sería muy importante para DNA-1 cuyo CDR-H3 posee una gran versatilidad de conformaciones. La comparación de la estructura de DNA-1:d(T)₅ con la del complejo DNA-1:HEPES, determinada posteriormente, mostró un gran movimiento en el CDR-H3. Este cambio estructural provocó que el sitio de combinación deje de ser un surco angosto, apropiado para la inserción de las bases de timidina, y se transforme un surco ancho capaz de acomodar el HEPES¹²³. En un trabajo reciente, se determinaron dos estructuras de la conformación libre de este AcMo. En ambas se observó que, los cinco residuos de la parte superior del CDR-H3, aparecían desordenados. Mientras que, la unión del ligando a este Ac provocó el ordenamiento de esta región¹²⁴. A partir de esto se sugirió que este CDR sería muy flexible y adoptaría múltiples conformaciones en el estado libre.

La estructura cristalográfica de la fracción Fab del AcMo 64M-2 fue determinada como complejo con el fotodimero dT(6-4)T a 2.4 Å de resolución¹²⁵. En este caso, todas las regiones CDR, excepto la CDR-L2, están involucradas en la interacción con el ligando. Este ligando circular es completamente acomodado en un sitio de combinación con forma de bolsillo. La base 3' de la pirimidona forma una unión de hidrógeno con la histidina H35, y está en íntimo contacto con el triptofano H33. El esqueleto de azúcar-fosfato que conecta las bases está rodeado por los residuos histidina L27d, tirosina L32, serina L92, triptofano H33 y serina H58, pero no forma uniones de hidrógeno con ninguno de estos residuos.

Las estructuras de dos Fab que reconocen ANDcd han sido determinadas en la forma libre. Jel 72¹²⁶, un Ac de ratón que reconoce dímeros de p(dG)/p(dC) y Jel 318¹²⁶ que reconoce ADN de hélice triple. Para estos Acs la interacción con el ADN fue modelada computacionalmente. En el primer caso, las simulaciones predijeron que los residuos del CDR-H3 interactúan con las bases del ADN a través del surco mayor, mientras que en el segundo AcMo los residuos del CDR-H2 forman contactos con las bases de ADN en el

surco menor de la triple hélice. El modelado computacional y las estructuras cristalográficas indicaron que el sitio de combinación de los Ac anti-ADNcd difiere considerablemente del de los anti-ADNcs. Para estos últimos, la conformación se asemeja a una grieta profunda en la cual se inserta el Ag^{116 115; 120}; mientras que en los anti-ADNcd y en los anti-ADN hélice triple, el sitio de unión del Ag es una superficie plana donde los CDRs establecen contactos electrostáticos con el ADN^{127; 128; 129}. En estos últimos, los sitios de combinación modelados están generalmente bordeados por cadenas protuberantes las cuales poseen los aminoácidos cargados. Estas proyecciones estarían ubicadas de manera tal de poder penetrar el surco mayor y menor del ADN de manera de establecer contactos específicos con las bases^{129; 130}.

Anticuerpos con actividad catalítica

Actualmente, los Acs con actividad catalítica son llamados “Abzymas” término surgido de combinar las palabras en inglés “*antibody*” y “*enzyme*”. El interés en la función catalítica de los Acs surge de la posibilidad de aumentar su potencia biológica; debido a que una sola molécula puede ser usada para escindir múltiples moléculas de Ag, y porque en muchos casos éste, al ser cortado es inactivado en forma permanente. Por el contrario, los Acs que se unen reversiblemente a un Ag lo neutralizan estequiométricamente y si se produce disociación del complejo, el Ag recupera su actividad biológica. Por esta razón, las abzymas, poseen un gran potencial como herramientas con función terapéutica. En forma opuesta, en enfermedades autoinmunes, cuando se dirigen contra autoantígenos la función catalítica puede servir como un potente amplificador de la patología de la enfermedad¹³¹.

Los conceptos que hicieron posible pensar en inducir Acs con actividad catalítica se basaron en los preceptos originales de Pauling¹³². El sugirió que la habilidad de la enzimas de acelerar las reacciones químicas era dependiente de “la complementariedad del sitio activo de la enzima con el complejo activado ó estado de transición”. Luego, Jencks¹³³ sugirió que dicha complementariedad podía ser obtenida en los Acs inducidos utilizando análogos estructurales de estados de transición. Fue por esto que, inicialmente, se creyó que la obtención de Acs con actividad catalítica era un evento forzado, que debía ser inducido mediante la inmunización. Los análogos de estados de transición provocarían la

maduración de Acs capaces de reconocer esta fase de la reacción química, disminuyendo la barrera de energía que separa los reactantes de los productos. En 1986 los trabajos de Schultz y Lerner demostraron que los Acs inducidos contra fosfatos y fosfonatos tetraédricos, podían catalizar selectivamente la hidrólisis de carbonatos y ésteres^{134; 135}. Sin embargo, se demostró luego que era posible también inducir Acs catalíticos mediante la inmunización con moléculas en el estado basal¹³⁶. En trabajos posteriores se observó la presencia de actividad catalítica en Acs anti-idiotípicos originados contra Acs dirigidos contra enzimas¹³⁷. Estos resultados tomados en su conjunto indicaron que la inmunización con análogos del estado de transición no era la única forma de obtener Acs con actividad catalítica. Incluso, en ciertas enfermedades autoinmunes, se encontraron autoanticuerpos con ésta actividad. Entre ellas, se observó que Acs policlonales aislados de pacientes con asma eran capaces de catalizar la hidrólisis de la unión peptídica entre una glutamina y una metionina en el péptido intestinal vasoactivo¹³⁸. Subsecuentemente, Shuster y colaboradores reportaron la presencia de actividad nucleasa de ADN en sueros de pacientes con LES,¹³⁹ mientras que Li y colaboradores lo hicieron para Acs que hidrolizaban tiroglobulina en pacientes con tiroiditis de Hashimoto¹⁴⁰. Estos descubrimientos confirmaron que la inmunización deliberada con el Ag no era un requisito para la expresión de la función catalítica¹⁴¹ y que, por lo tanto, la función catalítica podía surgir naturalmente.

Finalmente, a grandes rasgos existen dos hipótesis en cuanto al posible origen de la actividad catalítica en Acs. La primera indica que la actividad catalítica se generaría *de novo*, mediante mutaciones somáticas en las regiones variables durante el curso de la maduración clonal B donde la presión de selección es impuesta por el Ag. La otra, se basa en la presencia de actividad proteolítica en la cadena liviana de varios AcMos^{142; 143} y en preparaciones de Acs policlonales de individuos sanos¹⁴⁴. Esto último indica que la capacidad catalítica es una propiedad intrínseca y heredable transmitida por los genes variables de la línea germinal.

El Anticuerpo monoclonal anti-ADN ED-10

Como se mencionó anteriormente, en nuestro laboratorio se obtuvieron AcMos anti-ADN de alta afinidad y especificidad por medio de la inmunización de ratones normales de la

cepa BALB/c con el complejo formado por E2c y el site 35-18 de HPV16. El resultado de esta inmunización fue un panel de AcMos los cuales reconocieron selectivamente a la proteína, al complejo y/ó al ADN¹⁴⁵. Mediante ensayos de ELISA se determinó que los AcMos ED-10 y ED-84 reconocían al ADNdc inmunógeno. Esta actividad fue confirmada por experimentos de retardo de movilidad electroforética en geles y a través de experimentos de titulación al equilibrio seguido por el cambio de fluorescencia de triptofano de los AcMos. Se determinó una $K_D \approx$ entre 0.5-1 nM y un factor de discriminación (K_D específico/ K_D no específico) para las distintas secuencias de ADN que va desde 125 a 20.000 veces⁶⁸. El análisis de los CDRs de ambos Acs indicó hipermutaciones en el dominio VH. Sorprendentemente el CDR-H3 de ambos AcMos resultó ser idéntico, lo cual enfatiza la posibilidad de una fuerte selección mediada por el Ag. La línea germinal del VH para ambos es J558 típicamente reportada para otros Acs anti-ADN⁸⁸ mientras que la del VL es distinta explicando de alguna manera las diferencias en afinidad⁶⁸. Curiosamente, a diferencia de otros anti-ADN reportados estos AcMos no presentan alta proporción de residuos cargados en sus regiones variables.

Posteriormente, se demostró que la afinidad de ED-10 por el ADNcd se mantenía constante independientemente de la concentración de NaCl⁷⁹, sugiriendo que las interacciones electrostáticas no eran importantes para la estabilización del complejo. A esto se sumó la indiferencia de la interacción a los efectos de soluto mediados por NaCl, comportamiento que indicó que las moléculas de agua jugaban un papel marginal en la formación de la interfaz. La formación del complejo ED-10:site 35-18 doble cadena, fue acompañada por un ΔC_p positivo lo cual sugirió un rearrreglo en el oligonucleótido de ADNcd. La constante de asociación cinética con el ADNcd fue 4 ordenes de magnitud menor al de su ligando natural presente en el complejo inmunógeno (E2c). Esto indicó la existencia de una barrera energética posiblemente impuesta por la ausencia de una componente electrostática y posibles rearrreglos conformacionales⁷⁹.

Objetivos

Objetivos

El objetivo de este trabajo de tesis es caracterizar desde un punto de vista integral de la interacción de AcMo ED-10 con su ADN inmunógeno. El hecho que ED-10 haya sido obtenido por inmunización con un complejo proteína:ADN definido molecularmente, lo convierten en un excelente modelo de estudio que permite describir las bases moleculares y estructurales tanto de la interacción Ag-Ac como proteína:ADN. No solo eso, permite anticipar la posibilidad del diseño de drogas para combatir el- LES una dolencia ampliamente distribuida en mujeres (9 de cada 10 pacientes de lupus son mujeres), con perspectivas de intervención terapéutica.

Las etapas planteadas para cumplir con este objetivo fueron las siguientes:

- i) La obtención de la secuencia mínima de ADN necesaria para la unión mediante el uso de técnicas espectroscópicas en solución.
- ii) La cristalización del complejo ED-10:ADN inmunógeno y la resolución de su estructura tridimensional, para definir la arquitectura exacta del sitio de combinación.
- iii) Una caracterización termodinámica detallada de la interacción ED-10-ADN inmunógeno y ED-10-ADN.
- iv) La determinación del mecanismo cinético de formación y disociación del complejo ED-10:ADN inmunogéno; ED-10:ADN.

Materiales & Métodos

Preparación de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos de cadena simple fueron adquiridos a IDT (Coralville, IA, EEUU). Luego de la síntesis, los oligonucleótidos fueron purificados por geles de poliacrilamida. La concentración del oligonucleótido cadena simple fue calculada utilizando el coeficiente de extinción ¹⁴⁶ a 260 nm indicado por el proveedor. El apareamiento de hebras para obtener el oligonucleótido doble cadena se realizó mezclando cantidades equimolares 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 por 16 horas.

El oligonucleótido al que denominamos site 35-18 doble cadena 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 hebra B de este oligonucleótido sintético es: **site 35-18 B** 5'-TCA ACC GAT TTC GGT TAC -3'. Abajo se listan las modificaciones a este oligonucleótido cadena simple y otros oligonucleótidos sintéticos cadena simple utilizados, con su respectiva denominación:

| | |
|--------------------|--|
| site 35-18A | 5'-GTA ACC GAA ATC GGT TGA-3' |
| site 35-18B | 5'-TCA ACC GAT TTC GGT TAC-3' |
| site 35-10B | 5'-TCA ACC GAT T-3' |
| site 35-6B | 5'-TCA ACC -3' |
| site 35-4B | 5'-TCA A-3' |
| site 35-3B | 5'-TCA -3' |
| site 35-2B | 5'-TC-3' |
| site 35-48 B | 5'-TGT G(...) TCA ACC GAT TTC GGT TAC (...)G GGC-3' |
| iset 35-48 B | 5'-TGT G(...) TAC TTG ACA GGT CCA TGT (...)G GGC-3' |
| site 35-80 A | 5'-TCT T(...) GTA ACC GAA ATC GGT TGA (...)G ACG-3' |
| site 35-80 B | 5'-CGT C(...) TCA ACC GAT TTC GGT TAC (...)G ACG-3' |
| site 35-18B5'C | 5'-CCA ACC GAT TTC GGT TAC-3' |
| site 35-18B5'G | 5'-GCA ACC GAT TTC GGT TAC-3' |
| site 35-18B5'A | 5'-ACA ACC GAT TTC GGT TAC-3' |
| d(T) ₅ | 5' TTT TT-3' |
| d(T) ₁₀ | 5' TTT TTT TTT T-3' |
| d(T) ₁₅ | 5' TTT TTT TTT TTT TTT-3' |

Los oligonucleótidos de site 35-48 y site 35-80 llevan la secuencia de site 35-18 en el medio circundada por la misma secuencia de bases del genoma de HPV-16. El islet 35-48 presenta en el centro la misma composición de bases que el site 35-18 pero ordenada aleatoriamente. Los oligonucleótidos indicados con el subíndice “bio” llevan unida una molécula de biotina en su extremo 3’ a través de un brazo de 6 carbonos.

Purificación de los anticuerpos y fragmentos Fabs

Para la producción de IgGs del AcMo ED-10 se inyectaron ratones BALB/c con 0,5 ml de pristane (Sigma) intra peritoneal 15 días previos a la inoculación con las líneas de hibridoma de ED-10 ($0,5-1,5 \times 10^6$ células por ratón). A partir de las dos semanas de inoculadas las células, se comenzó con la recolección del líquido ascítico. Luego de cada extracción, el líquido ascítico se centrifugó a 12.000 rpm durante 25 min., se descartaron los componentes 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 a 4° C. Luego se centrifugó y el precipitado fue resuspendido en Tris-HCl 25 mM; NaCl 150 mM; pH 7.0 (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-Sepharcel (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 (Millipore) y se sembró en una columna de filtración por tamiz molecular Superdex 200 (Pharmacia). El pico mayoritario, con una pureza $>98\%$ correspondió al de la IgG (PM=150 kDa), el otro pico obtenido correspondió a la transferrina. Para la obtención de fragmentos univalentes Fab, se digirió la IgG con la proteasa Papaína (Sigma). En cada caso, se puso a punto la condición de la digestión, que esta entre las distintas preparaciones. En general, se utilizó una relación de masas de Papaína/IgG de 1/200 en presencia de EDTA 7 mM y β -Mercapto etanol 7 mM incubando a 37° C durante 1 hora, con inversiones cada 20 min, el ensayo se interrumpió por el agregado de PMSF. El patrón de la digestión se analizó por medio de una corrida

electroforética en un SDS-PAGE desnaturante 12,5%. Luego, el producto de la digestión se dializó contra un *buffer* NaCH₂O₂ 25 mM pH 4,0 y se sembró nuevamente en una columna VyDAC 400 VHP (BioRad), previamente equilibrada en el mismo *buffer*. El Fab quedó retenido en la columna. Para eluirlo se realizó un gradiente de NaCl de 0 a 0.5 M en 30 minutos a un flujo de 2 ml/minuto. En el gradiente se observaron 4 picos donde el primero correspondió al fragmento Fab con una pureza >98%. Como último paso de purificación, la muestra se concentró, luego se dializó contra NaC₂H₃O₂ 10mM; NaCl 150 mM pH 5,0 y se pasó por una columna de filtración molecular Superdex 75 (Pharmacia), 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 ml/mg cm⁻¹ en ambos casos. Una vez determinada la concentración se almacenó congelada a -70°C en 50% glicerol. Por último, para su uso los fragmentos Fab fueron descongelados, filtrados por el tamiz molecular supedex 75 (Pharmacia) y almacenado a 4°C con 10% glicerol y 0.05 % m/v NaN₃. Los Fab en uso, se titularon semanalmente mostrando retener su actividad de unión estequiométrica por al menos dos meses. El rendimiento promedio de las purificaciones fue de 4 mg de IgG y 1 mg de Fab por ml de líquido ascítico original.

Estudios de interacción anticuerpo-ADN por espectroscopía de Fluorescencia

Los ensayos de unión a ADN medidos por fluorescencia se realizaron con un espectrofluorímetro Aminco Bowman Series 2, con una geometría en “L” (Spectronic Co. Rochester, NY, EEUU). Las titulaciones de fluorescencia intrínseca de triptofano de ED-10 con distintos oligonucleótidos se llevaron a cabo fijando la longitud de onda de excitación en 295 nm y registrando la emisión a los 340 nm. 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 (5-200 nM), dependiendo de la afinidad del oligonucleótido utilizado. La dilución máxima al final del ensayo fue del 10%, y la fluorescencia fue corregida en forma acorde. Las mediciones se realizaron en

buffer TBS a una temperatura de $25 \pm 0.1^\circ \text{C}$ en un volumen final de 1 ml. En los casos de titulaciones en las que se empleó una concentración de proteína menor a 50 nM, el volumen se aumentó a 3 ml y se utilizó un cubeta espejada para lograr mayor sensibilidad. En las titulaciones realizadas para evaluar el efecto de la sal en la interacción Fab/ADN, la concentración salina del *buffer* TBS (0,15 M NaCl) se modificó hasta llegar a la concentración deseada (Ej., 1 M NaCl). En las mediciones realizadas para evaluar el efecto en la interacción del cambio de polaridad se agregó tanto etanol o metanol hasta obtener la polaridad deseada.

Determinación de la constante de disociación al equilibrio

Para la determinación de la constante de disociación al equilibrio, dada la estequiometría 1:1 se utilizó el siguiente modelo:



donde la constante de disociación (K_D) se definió como

$$K_D = \frac{[\text{Fab}] \cdot [\text{ADN}]}{[\text{Fab:ADN}]} \quad [2]$$

Ajustando la siguiente ecuación a los datos obtenidos pudo obtenerse el valor de K_D :

$$[\text{Fab/ADN}] = 0.5 \cdot \Delta F \cdot ([\text{ADN}] + [\text{Fab}] + K_D) - \left(([\text{ADN}] + [\text{Fab}] + K_D)^2 - (4 \cdot [\text{ADN}] \cdot [\text{Fab}]) \right)^{0.5} \quad [3]$$

Siendo ΔF la diferencia en la señal intrínseca de triptofano del Fab libre con el unido a ADN, $[\text{Fab}]$ y $[\text{ADN}]$ las concentraciones de Ac y ADN totales y K_D la constante de disociación para la interacción Fab/ADN. Finalmente la calidad del ajuste se midió por la desviación de las diferencias de cuadrados y por desvío aleatorio de residuales.

Cálculo de Energía libre de Gibbs (ΔG)

Para el cálculo de la energía libre de Gibbs a partir de los valores obtenidos para las constantes de disociación al equilibrio se utilizó la siguiente ecuación:

$$\Delta G = R \cdot T \cdot \ln(K_D) \quad [4]$$

Cálculo de entalpía de van't Hoff

La ecuación de van't Hoff relaciona la variación de la K_D con la entalpía (ΔH) de la interacción mediante la siguiente fórmula:

$$\left(\frac{\partial \ln(K_D)}{\partial (1/T)} \right)_p = \frac{-\Delta H_{obs}^\circ}{R} \quad [5]$$

Donde R es la constante de los gases ($1,987 \text{ cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$). Para la construcción del gráfico de van't Hoff se midieron los valores de las constantes de disociación de ED-10 con d(T)₅, como se indica arriba a distintas temperaturas. Los datos fueron graficados según la forma de van't Hoff ($\ln(K_D)$ vs. $1/T$) y analizados usando el programa computacional Profit. Los valores de entalpía fueron obtenidos utilizando la ecuación de van't Hoff cuando se supuso un cambio de capacidad calorífica (ΔC_p) cero:

$$\ln(K_D) = \frac{\Delta H^\circ}{R} \cdot \left[\frac{1}{T} \right] + \frac{\Delta S^\circ}{R} \quad [6]$$

Cuando se asumió un ΔC_p distinto de cero e independiente de la temperatura los datos se analizaron de acuerdo a lo establecido por Baldwin¹⁴⁷. En este modelo se detalla que, este tipo de procesos pueden ser caracterizados en forma completa a partir de un valor de ΔC_p y el de dos temperaturas características, T_H (donde la fuerza entálpica se hace cero; $\Delta H=0$) y T_S (donde la fuerza entrópica se hace cero; $\Delta S=0$). Estos parámetros se relacionan a partir de las siguientes ecuaciones¹⁴⁸:

$$\ln(K_D) = \frac{\Delta C_p^\circ}{R \cdot \left[\frac{T_H}{T} - \ln\left(\frac{T_S}{T}\right) - 1 \right]} \quad [7]$$

$$\Delta H^\circ = \Delta C_p^\circ \cdot (T - T_H) \quad [8]$$

Donde Los valores de ΔC_p , T_H y T_S son obtenidos mediante el ajuste de la ecuación [7], y el valor de entalpía obtenido a partir de la ecuación [8]¹⁴⁸.

Ensayos de retardo en la movilidad electroforética

Se prepararon mezclas de ED-10 con los distintos oligonucleótidos utilizando las condiciones estándar de unión (ver Estudios de interacción anticuerpo-ADN por espectroscopía de Fluorescencia). Típicamente la concentración de ED-10 fue de al menos 5 veces superiores a las de ADN. Las muestras se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en un volumen final de 20 μl . Al finalizar la incubación las muestras se sembraron en un gel nativo de poliacrilamida 6% equilibrado en *buffer* TBE (Tris-HCl 9 mM; ácido Bórico 9 mM, ácido etilen-dinitril-tetra-acético (EDTA) 2mM) y separadas aplicando una corriente constante de $5 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$. La detección del ADN se realizó por tinción con Bromuro de Etídio y posterior visualización por transiluminación al UV.

Resolución de la estructura tridimensional del complejo ED-10:ADN

Cristalización del complejo ED-10:ADN

Para la obtención de cristales del complejo Fab ED-10:ADN, se concentró el Fab puro a una concentración de 200 μM y se lo mezcló con una solución equimolar del oligonucleótido cadena simple site 35-6B de manera de obtener una solución final de complejo 100 μM . Con el fin de explorar las condiciones adecuadas de cristalización de este complejo, se realizó un rastreo utilizando el kit de cristalización Jena Bioscience screens (Jena, Germany). Para abarcar la mayor cantidad de concentraciones posibles se utilizaron placas de 24 pocillos. La cristalización se realizó a temperatura ambiente utilizando el método de la gota colgante, en el cual 1 μl de la solución madre del complejo se mezcló con 1 μl del agente precipitante. Esta gota se colocó en el “techo” de un reservorio que contenía 300 μl del mismo agente precipitante. La aparición de los cristales se observó utilizando un lupa cada 15 días. La mejor condición de cristalización resultó ser JBScreen *Classic 4 solución B1* que contenía 15% Polietilenglicol 6000, 0.05 M KCl; 0.01 M MgCl_2 . Una vez formados los cristales se esperó a que estos se estabilicen, es decir que detengan su crecimiento. Llegado ese momento, se aisló el cristal de la gota mediante succión con un capilar de cuarzo de Hampton Research (Aliso Viejo, CA, EEUU). Se preparó una solución de igual composición que la precipitante, pero se aumentó el polietilenglicol 6000 al 16% de manera de estabilizar el cristal en la nueva solución. El

crystal aislado en el capilar se liberó en esta nueva solución y luego fue succionado nuevamente, quedando ahora en la nueva solución. Los extremos del capilar se sellaron con parafina y se lo colocó en una caja de *petri* para protegerlo. De esta manera fueron transportados al Laboratorio Nacional de Luz Sinclotrón en Campinas, Brasil para ser difractados.

Adquisición de datos del cristal por difracción de rayos X

Los datos de difracción fueron colectados generosamente por el Dr. Sebastián Klinke (Fundación Instituto Leloir) en la línea de cristalografía de proteínas D03B-MX1 del Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (LNLS) ubicado en la ciudad de Campinas, Brasil¹⁴⁹. La misma se encuentra equipada con un detector tipo CCD de 165 mm de diámetro (Mar USA, Evanston, IL, EEUU). Se aplicó un protocolo de colección a temperatura ambiente con el cristal montado en un capilar de cuarzo de Hampton Research (Aliso Viejo, CA, EEUU). En total se obtuvieron tres juegos de datos, consistiendo cada uno de ellos en 180 fotografías de difracción con una oscilación en el eje de rotación ϕ de un grado. Debido al daño originado por la radiación X sobre el cristal, solamente el primer juego de datos rindió resultados satisfactorios, alcanzándose una resolución máxima de 1,89 Å. Por otro lado, la intensidad de los puntos o "spots" de difracción observados fue tan alta que requirió disminuir el tiempo de exposición de cada fotografía a tan sólo 15 segundos para evitar la saturación del detector. El primer juego de datos fue luego integrado, escaleado y reducido con el conjunto de programas Denzo/Scalepack¹⁵⁰ en el grupo espacial monoclinico *C2*.

Construcción del modelo, Refinamiento y Análisis

La estructura del complejo ED-10:DNA se resolvió por la técnica de reemplazo molecular mediante el programa EPMR¹⁵¹ utilizando la estructura de ED-10 libre como modelo. Esta estructura había sido previamente resuelta en el laboratorio a con el programa AMoRe¹⁵² usando como modelo la estructura del Fab 50.1 (*código del Protein data bank 1ggi*). La construcción del modelo del complejo ED-10:ADN fue llevada a cabo con el programa

Tom/Frodo¹⁵³ y la estructura refinada con el programa CNS¹⁵⁴ y Refmac¹⁵⁵ utilizando el modo TLS.

Adquisición de espectros de dicroísmo circular

Los espectros de dicroísmo se registraron en un espectropolarímetro Jasco J-810 (Nikota, Japón). Entre cinco y diez espectros fueron promediados para cada condición. La temperatura se mantuvo constante a $25 \pm 0,1$ °C con un controlador peltier. En los experimentos de interacción ED-10 /ADN, las muestras se incubaron en TBS y los datos se colectaron a $25 \pm 0,1$ °C. El espectro suma se obtuvo adicionando el espectro del ADN al de la proteína libre.

En el análisis de la estabilidad térmica de la proteína se incubó el fragmento Fab en *buffer* TBS pH= 7,0 y se registraron los espectros en el UV cercano y lejano a intervalos de 5 °C entre 10 y 45 °C. El aumento de la temperatura fue 2,5°/minuto de manera de dejar equilibrar el sistema con la nueva temperatura. Para el ADN se registro el cambio en el espectro entre 320 y 250 nm. De manera de evaluar los cambios dicroicos en el ADN¹⁵⁶. La temperatura se aumentó a 4° C/minuto de 10 a 95 °C tomando espectros cada 5 grados.

Calorimetría de Titulación Isotérmica (ITC)

Principios operativos del ITC

Todos los experimentos fueron realizados utilizando un microcalorímetro VP ITC (Figura 5) (microCal Inc., Northampton, MA). Este instrumento consiste en dos celdas idénticas insertas en un compartimiento isotérmico. Estas celdas son mantenidas en equilibrio térmico ($\Delta T=0$) a lo largo del experimento. Una de las celdas se llena con *buffer* (celda de referencia) y la otra con uno de los componentes de la interacción que se desea estudiar (celda de muestreo) equilibrado en el mismo *buffer*. Cuando el segundo componente de la interacción se introduce en forma de alícuotas a la celda de la muestra se produce un cambio entálpico. El principio del experimento es medir la energía calórica por unidad de tiempo (en general expresada en μ calorías/segundo) que debe ser aplicada a la celda que contiene la muestra para mantener en cero la diferencia de temperatura entre ambas celdas.

En un experimento típico luego de una serie de adiciones los sitios de unión de el componente de la celda se saturan, por lo tanto el calor observado en las últimas mediciones es solamente el resultante de dilución del componente agregado en la celda de la muestra.

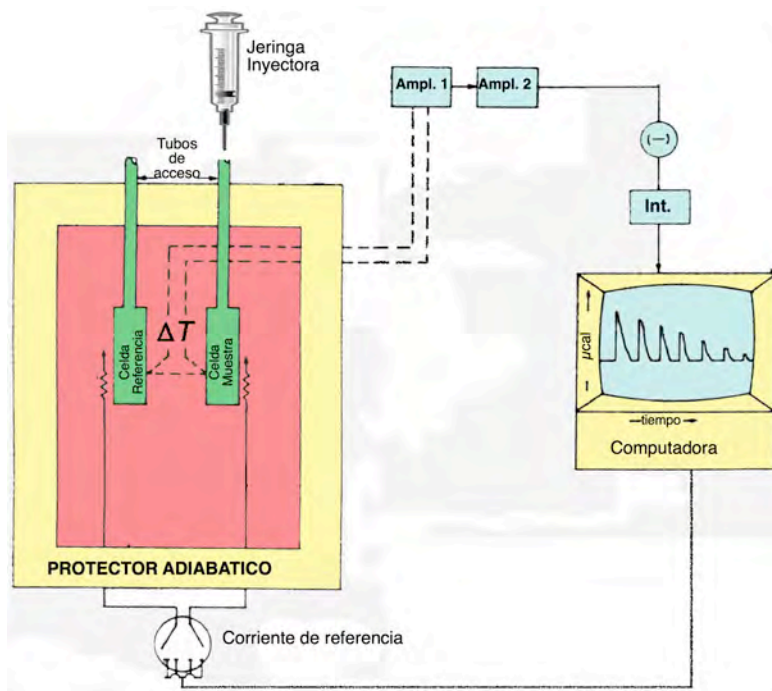


Figura 5. Diagrama de funcionamiento de un calorímetro de titulación isotérmica. La muestra es introducida en la celda por una jeringa inyectora. La energía calórica necesaria para mantener la diferencia de temperatura entre ambas celdas en cero es registrada, amplificada y transmitida a la computadora que registra estos cambios en función del tiempo.

Consideraciones experimentales ITC

Todas las titulaciones se realizaron colocando una solución de la fracción Fab de ED-10 en la celda de muestreo (rango de concentración entre 5 y 10 μM) en *buffer* TBS pH= 7,0 adicionando 0,5 mM EDTA. Esta solución fue titulada con una de ADN 10 veces más concentrada en el mismo *buffer*. En las mediciones para determinar la influencia de la fuerza iónica en los parámetros termodinámicos, la concentración de NaCl fue corregida acorde a la necesario. Todos los experimentos se realizaron a 298 K salvo los realizados para el cálculo de ΔC_p , en los cuales la temperatura se varió en el intervalo de 283- 313 K.

Típicamente, se realizaron inyecciones de entre 8 y 10 ul hasta llegar a una relación de concentración entre DNA-Fab en la celda de muestra de al menos 2. El calor de dilución del ADN fue determinado a partir de los puntos en los cuales todos los sitios de Fab disponibles fueron titulados y restado de los datos crudos obtenidos en el experimento.

En las titulaciones de desplazamiento, se colocó en la celda de muestreo una solución que contenía el 8 μM de Fab y 40 μM de d(T)₅ en TBS pH 7,0 . Para estas concentraciones y teniendo en cuenta la K_D de esta interacción, podemos calcular que un 99% de los sitios de unión del Fab están ocupados con d(T)₅. En la jeringa se colocó una solución 80 μM de site 35-6B y se procedió a realizar el experimento como se describió más arriba.

Determinación de los parámetros termodinámicos

Conociendo la concentración inicial de ambas moléculas interactuantes, los datos experimentales obtenidos luego de un experimento de titulación contienen la información suficiente para determinar el cambio de entalpía (ΔH), la constante de afinidad (K_A) y la estequiometría de reacción (n) de la interacción estudiada. Para el caso de ED-10-ADN se analizó de acuerdo a lo descrito por Ladbury¹⁵⁷. Se consideró la reacción de equilibrio de la siguiente manera:



Donde el Fab se colocó en la celda (de volumen V) y el DNA se agregó en alícuotas de igual volumen desde la jeringa. La fracción saturada (F) del Fab en cualquier punto de la titulación pudo ser determinada a partir del calor total, entregado o absorbido, (Q), usando la siguiente ecuación:

$$Q = n \cdot F \cdot [Fab]_T \cdot \Delta H \cdot V \quad [10]$$

Donde $[Fab]_T$ es la concentración total del Fab. Sabiendo que:

$$K_A = \frac{F}{(1-F) \cdot [ADN]} \quad [11]$$

$$[ADN] = [ADN]_T - n \cdot F \cdot [Fab]_T \quad [12]$$

donde $[ADN]_T$ es la concentración total de ADN. Se pudo obtener la siguiente ecuación cuadrática:

$$F^2 - F \cdot \left\{ \left(1 + \frac{[ADN]_T}{n \cdot [Fab]_T} \right) + \left(\frac{1}{n \cdot K_A \cdot [Fab]_T} \right) \right\} + \left(\frac{[ADN]_T}{[Fab]_T} \right) = 0 \quad [13]$$

Se resolvió la ecuación [13] para F y se substituyó este valor en la ecuación [10] y se obtuvo la siguiente ecuación:

$$Q = n \cdot [Fab]_T \cdot \Delta H \cdot \left(\frac{V}{2} \right) \cdot \left\{ X - \left[X^2 - \left(\frac{4 \cdot [ADN]_T}{n \cdot [Fab]_T} \right)^{1/2} \right] \right\} \quad [14]$$

Donde

$$X = \left\{ 1 + \left(\frac{[ADN]_T}{n \cdot [Fab]_T} \right) + \left(\frac{1}{n \cdot K_A \cdot [Fab]_T} \right) \right\} \quad [15]$$

Por lo tanto, Q, representa el valor de la cantidad de calor luego de cada inyección, el cual es dependiente de los valores de los parámetros independientes ΔH , K_A y n, cuyos valores se obtuvieron ajustando simulaciones del valor de Q a través de la titulación. Este cálculo se realizó con el programa ORIGIN provisto por el fabricante.

De las ecuaciones [14] y [15] se puede observar que la variación de K_A y $[Fab]_T$ determinan el perfil de la curva de titulación ajustada. La bondad de los datos ajustados es mayor cuando el producto de estas dos cantidades, denominado valor “c”, se encuentra entre 10 y 100. Fuera de este intervalo, los perfiles de titulación presentan muy pocos puntos en la región que se aproxima a la equivalencia ó directamente la transición se hace lineal, impidiendo un ajuste correcto. En la Figura 6 se muestran la simulación de isotermas de unión con distintos valores c.

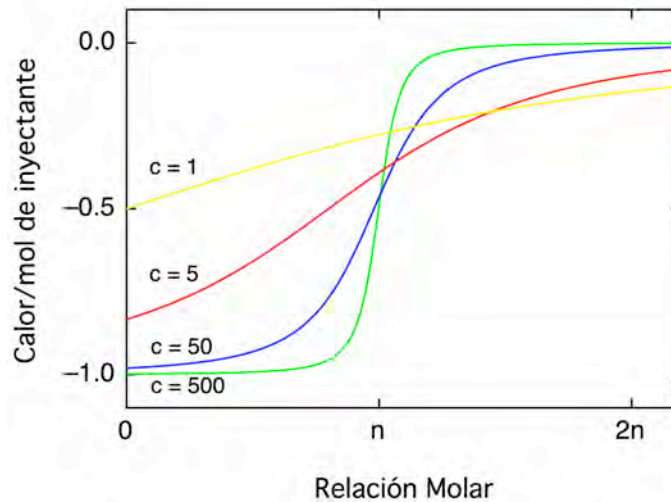


Figura 6. Isotermas simuladas para distintos valores del parámetro c . El valor c es obtenido de la multiplicación de la constante de afinidad (K_A) por la concentración de la muestra en la celda (ver texto para los detalles).

A partir de los parámetros determinados en las titulaciones calorimétricas, los valores para el cambio de entropía, ΔS , y el cambio de energía libre de Gibbs, ΔG , fueron obtenidos utilizando las siguientes ecuaciones:

$$\Delta G = R \cdot T \cdot \ln(K_D) \quad [16]$$

$$\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S \quad [17]$$

Donde R es la constante de los gases y T es la temperatura a la cual se condujo el experimento. En los casos en los cuales no pudo determinarse la K_A a partir de los datos de calorimetría se utilizó el valor de ΔG obtenido de mediciones en el equilibrio por fluorescencia para determinar el cambio de entropía.

Por último, el ΔC_p corresponde al cambio de entalpía de la interacción en función del tiempo y se calculó según la siguiente ecuación:

$$\Delta C_p = \left[\frac{d\Delta H}{dT} \right]_p \quad [18]$$

A partir de los valores de ΔH obtenidos por calorimetría, se construyó un gráfico de ΔH en función de la temperatura. Los datos fueron ajustados a un modelo a lineal acuya representa ΔC_p expresado en $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$.

Experimento de cinética rápida de flujo detenido (*stopped flow*)

Principios operativos del equipo de *stopped-flow*

El curso cinético de la interacción de ED-10 con el ADN se midió utilizando un aparato de flujo detenido ó *stopped-flow* Applied Photophysics SX18.MV (Figura 7) (Leatherhead, Reino Unido). El mismo permite seguir el cambio de señal (absorbancia o fluorescencia) a partir de la mezcla de dos reactantes en función del tiempo, para tiempos muy cortos. Cada una de las muestras se almacena en una jeringa. En el momento deseado, se acciona un pistón que mueve volúmenes equivalentes de cada jeringa hacia una celda donde se mezclan. El líquido que estaba en esta se desplaza hacia la jeringa de *stop* cerrando un circuito e iniciando la adquisición de datos.

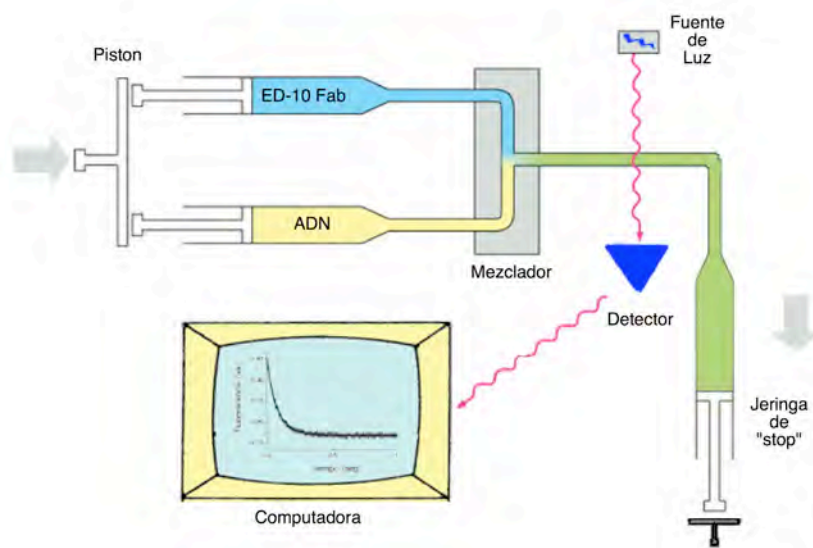


Figura 7. Diagrama de funcionamiento del equipo de *stopped flow*. El pistón empuja los émbolos de las dos jeringas donde están cargadas las muestras. Estas se juntan en el mezclador desplazando un volumen de líquido tal que acciona la jeringa de *stop* cerrando el circuito. A partir de este momento comienza a registrarse la señal de fluorescencia. El tiempo muerto del equipo es de aproximadamente 2 ms.

Para este equipo el tiempo muerto de reacción experimental es aproximadamente de 2 ms. El equipo permite la colección de 1000 puntos en intervalos de tiempo variables entre 0-20 ms hasta 0-1000 segundos.

Consideraciones experimentales *stopped-flow*

Todas las concentraciones reportadas corresponden a aquellas resultantes de la mezcla de volúmenes iguales de ambas jeringas. Las reacciones fueron monitoreadas siguiendo la fluorescencia de triptofano, excitando a 280 nm. La emisión se colectó a 90° con filtros de corte bajo 320 nm (Schott, Mainz, Alemania). Cada medición reportada corresponde al promedio de entre cinco y diez colecciones de 1000 puntos cada una. Los datos se ajustaron a las ecuaciones exponenciales descritas más abajo por minimización no-lineal de cuadrados, utilizando el software Profit. En todos los casos la temperatura se mantuvo constante a 25 ± 0.1 °C utilizando un baño térmico, a menos que se indique lo contrario.

Determinación de las constantes cinéticas

Dado que los procesos de segundo orden (Ej. Asociaciones bimoleculares) resultan en expresiones complejas y poco manejables, para el cálculo de las constantes cinéticas se utilizó la aproximación de pseudo-primer orden. Para lograr estas condiciones, la concentración de ADN se mantuvo al menos un orden mayor a la de proteína. De esta manera se supone que la concentración del primero permanece constante durante la experiencia y el proceso puede ser analizado como uno de primer orden. Entonces se define una constante de pseudo-primer orden (k_{obs}) que tiene la siguiente forma.

$$k_{obs} = k_{on}[ADN] \quad [19]$$

donde k_{on} es la constante cinética de segundo orden y $[ADN]$ la concentración del reactivo en exceso. Por lo tanto una reacción reversible de segundo orden puede ser analizada de la misma manera exponencial que una de primer orden.

$$k_{obs} = k_{on}[ADN] - k_{off} \quad [20]$$

Por lo tanto en estas condiciones k_{on} y la constante de disociación cinética (k_{off}) pueden ser determinadas mediante experimentos midiendo la k_{obs} para distintas concentraciones del reactivo en exceso (el ADN, en este caso). Así, del gráfico de k_{obs} vs. concentración de ADN se obtiene una regresión lineal de pendiente igual a k_{on} y ordenada igual a k_{off} .

Las curvas obtenidas se ajustaron a modelos de decaimiento exponencial de la forma

$$\mathbf{F(t)} = \mathbf{A} \cdot \mathbf{e}^{(k \cdot t)} + \mathbf{C} \quad [21]$$

donde F(t) es la fluorescencia al tiempo t, A la amplitud total del cambio, C la fluorescencia a $t = \infty$, y k la constante cinética observada de reacción. Cuando una fase exponencial no fue suficiente para un buen ajuste de los datos, de acuerdo al análisis de los residuales, se sumaron dos términos exponenciales de la misma forma:

$$\mathbf{F(t)} = \mathbf{A}_1 \cdot \mathbf{e}^{(k_1 \cdot t)} + \mathbf{A}_2 \cdot \mathbf{e}^{(k_2 \cdot t)} + \mathbf{C} \quad [22]$$

donde A_1 y A_2 son las amplitudes de las fases, k_1 y k_2 las constantes de reacción observadas respectivas. Para el ajuste de los datos se utilizó un algoritmo de aproximación por cuadrados mínimos no lineales, utilizando el programa Profit.

Determinación de parámetros termodinámicos

De la dependencia de las k_{on} y k_{off} con la temperatura se calcularon los parámetros termodinámicos de activación asociados al estado de transición, según lo descrito por Jackson y Fersht¹⁵⁸. En todos los casos se realizaron gráficos de Eyring ($\ln(k/T)$ vs. $1/T$) y se ajustaron por cuadrados mínimos no lineales a las siguientes ecuaciones:

en caso de dependencia lineal:

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} - \frac{\Delta H^\ddagger}{R} \cdot \frac{1}{T} \quad [23]$$

donde T es temperatura, k_B la constante de Boltzmann, h la constante de Planck, R la constante de los gases, ΔH^\ddagger la entalpía de activación y ΔS^\ddagger la entropía de activación.

Cuando se detectaron desviaciones de la linearidad de un gráfico de Eyring, se siguió el análisis presentado por Chen y Matthews¹⁵⁹ ajustando los datos a:

$$\ln\left(\frac{k}{T}\right) = \left(\frac{-\Delta C_p^\ddagger + \Delta S^\ddagger_{T_0}}{R}\right) + \ln\left(\frac{k_B}{h}\right) + \left[\frac{T_0 \cdot \Delta C_p^\ddagger - \Delta H^\ddagger_{T_0}}{R \cdot T}\right] - \frac{\Delta C_p^\ddagger}{R} \cdot \ln\left(\frac{T_0}{T}\right) \quad [24]$$

donde T_0 es la temperatura de referencia (298 K), y ΔC_p^\ddagger la capacidad calorífica de activación.

Análisis por Biosensor óptico de resonancia de espejos

Principios operativos del Biosensor

Se utilizó el biosensor óptico de resonancia de espejos, IAsys plus Affinity Sensor (ThermoLabsystems). En la Figura 8 se muestra la configuración y principios operativos del biosensor. El IAsys utiliza el fenómeno óptico conocido como campo evanescente. Este fenómeno ocurre cuando la luz experimenta reflexión interna total (RIT) y en este equipo es aumentado por una cavidad de resonancia. En RIT con ángulos mayores al crítico, la ondas de luz son completamente reflejadas a la altura de la capa de bajo índice refracción. El campo eléctrico, sin embargo, no desaparece y penetra en esta capa decayendo exponencialmente su intensidad, éste es el llamado campo evanescente. La fuerza del mismo es incrementada en el ángulo de resonancia del equipo. El ángulo de resonancia es extremadamente sensible al índice de refracción de la superficie, por lo tanto el uso de este campo para monitorear estos cambios confiere un selector de superficie al sistema (los cambios producidos fuera de esta región no serán observados). De esta manera, fijando un ligando a la superficie del sensor, es posible medir solo aquellas moléculas que se unen o disocian del mismo.

En el ángulo de resonancia, la luz de alta intensidad pasa por el prisma a través de la capa de acoplamiento y se propaga en la cavidad de resonancia como una onda evanescente de superficie. La onda retorna atravesando la capa de acoplamiento y se dirige al detector. Para resolver el ángulo de resonancia los componentes ópticos están arreglados de manera que se produzca una rotación de 90° de polarización en la luz que viaja por la cavidad de resonancia, mientras que la luz que experimenta solo RIT no cambia la fase. Un polarizador en frente del detector permite que solo sea detectada la luz que viaja a través de

la cavidad de resonancia. Lo que de hecho se detecta es el cambio en el ángulo del láser, mientras este se mueve su exacta localización es determinada. El tiempo en el cual la intensidad de luz cae es monitoreada y es convertida en un “ángulo”. Resultando en la respuesta observada en la computadora.

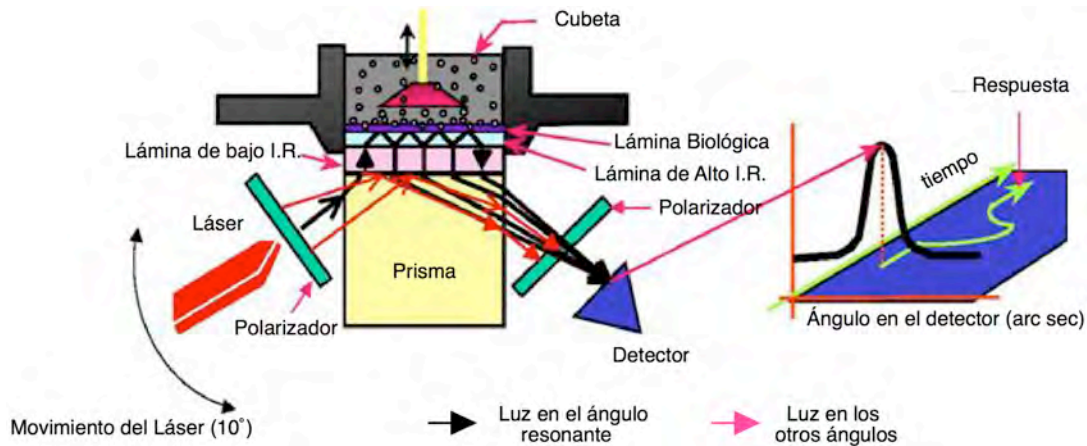


Figura 8. Diagrama del Biosensor óptico de resonancia de espejos. Los cambios de resonancia producidos por la interacción de las biomoléculas son registrados en función del tiempo (ver texto para detalles).

Inmovilización de oligonucleótidos biotinilados:

La inmovilización de estreptavidina (100 $\mu\text{g/ml}$ en $\text{NaC}_3\text{H}_3\text{O}_2$ 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 500 arc seg. de estreptavidina inmovilizada. Posteriormente, se lavó la cubeta con TBS tween 20 0.05% hasta que se estabilizó la línea de base. Luego se agregaron 10 μl de los oligonucleótidos biotinilados, site 35-10B_{Biot}, d(T)₅B_{Biot}, d(T)₁₅B_{Biot} (ver oligonucleótidos) respectivamente, a 40 μl del mismo *buffer* (concentración final 2 μM) y se incubó durante aproximadamente 10 minutos, tiempo en el cual se alcanzó el equilibrio de unión. Luego del lavado, el cambio en la posición de resonancia observado fue de 50 arc seg. 30 arc seg. 25 arc seg. para site 35-10B_{Biot}, d(T)₅B_{Biot}, d(T)₁₅B_{Biot} respectivamente.

Dado que la interacción biotina-estreptavidina es considerada casi irreversible (constante de afinidad aproximada de $1 \times 10^{-14} \text{ M}^{-1}$), 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. El *buffer* utilizado en todos los ensayos fue TBS.

Mediciones en el Biosensor óptico de resonancia de espejos

La asociación de ED-10 al ADN biotinilado inmovilizado en las cubetas 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. En las mediciones de disociación del complejo ED-10:ADN, primero se formó el complejo utilizando la máxima concentración de Fab utilizada en los ensayos de asociación, se dejó equilibrar hasta que la señal fuera constante y luego se cambió la solución por *buffer* y se registró el cambio de señal hasta que esta se hizo constante. Todos los datos fueron analizados usando el software Profit utilizando el análisis detallado abajo.

Determinación de las constantes cinéticas

Análisis de la fase de asociación

La respuesta R del instrumento (medida en arc seg) es proporcional a la masa de Ag unido al Ac inmovilizado, resultando en el siguiente modelo de asociación monofásica¹⁶⁰:

$$\mathbf{R(t)} = (\mathbf{R_{eq}} - \mathbf{R_0}) \cdot [1 - \mathbf{e^{(k_{obs} \cdot t)}}] + \mathbf{R_0} \quad [25]$$

donde R(t) es la respuesta a tiempo t, R_0 es la respuesta inicial y R_{eq} es la respuesta máxima. En este caso se utilizó también la aproximación de pseudo-primer orden para determinar el valor de las constantes cinéticas. Se realizaron múltiples determinaciones de k_{obs} utilizando distintas concentraciones de Fab y se graficó k_{obs} en función de la concentración de Fab. De la pendiente se obtuvo el valor de k_{on} .

Análisis de la fase de disociación

Una vez que el complejo se ha formado, este volverá a disociarse en sus dos componentes, el inmovilizado (en este caso el ADN) y el libre en solución (en este caso el Fab). Por lo tanto el evento de disociación pudo describirse por la siguiente ecuación exponencial¹⁶⁰:

$$R(t) = R_0 \cdot e^{(k_{off} \cdot t)} + C \quad [26]$$

donde $R(t)$ es la respuesta del complejo al tiempo t , R_0 la amplitud total del cambio, C la respuesta a $t = \infty$, y k_{off} la constante de disociación cinética.

Ensayo de degradación de ADN

Para los ensayos de degradación de ADN circular se utilizó el plásmido pGEX2T purificado a partir de bacterias *E. Coli* cepa *XL1 blue* utilizando el ensayo de maxi preparación estándar.¹⁶¹ Para los ensayos de degradación de ADN lineal se utilizó un Fragmento de 1500 pares de bases obtenido mediante PCR¹⁶² amplificando el gen que codifica para la proteína mayoritaria de la cápside del virus HPV-16, L1. La reacción a pH 7.0 se llevó a cabo en *buffer* Tris-HCl 25 mM; NaCl 150 mM, mientras que a pH 5.0 se realizó en NaC₃H₃O₂ 25 mM; NaCl 150 mM. En ambos se agregó MgCl₂ entre 0.5 y 5 mM de acuerdo al ensayo ó en los casos que no se agrego MgCl₂ se utilizó 1 mM EDTA. Los experimentos de hidrólisis se iniciaron mezclando el fragmento Fab de ED-10 (1 y 5 μM final) con, ADN circular (entre 50 y 100 ng) o ADN lineal (entre 50 y 200 ng). La mezcla de reacción se incubó por 1 hora a 37 ° C. Se terminó la reacción con el agregado de la proteasa tripsina (Sigma) (20 μg/ml) e incubando por 30 minutos a 37°C. Las muestras fueron analizadas en geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio.

Capítulo I

Caracterización Termodinámico-Estructural de la interacción entre ED-10 y el ADN

Reconocimiento del ADN

Estudios de unión al equilibrio

En los comienzos de la caracterización del AcMo ED-10 se observó que éste era capaz de unir un oligonucleótido de ADNcd de 18 pares de bases correspondiente la secuencia del sitio 35 del factor de transcripción E2 del virus HPV cepa 16⁶⁸. Esta fue utilizada como inmunógeno en complejo con la proteína E2c en el proceso de obtención de este AcMo⁶⁸. En ese mismo trabajo se determinó que la fosforilación del hidroxilo 5' de la cadena B de ese oligonucleótido llevaba a una disminución en la afinidad de ED-10 por el ADN doble cadena, agregando de alguna manera evidencias a la hipótesis en la cual se suponía que modificaciones en el extremo 5' debilitaban la unión de ED-10 al ADN. Más aún, mediante ensayos convencionales de protección de ADN, fue imposible identificar un arreglo de bases consecutivas protegidas por la unión del Ac. Considerando toda esta evidencia se decidió analizar la unión de ED-10 a la cadena A o B de este sitio en forma separada.

El método elegido para seguir la actividad de unión, y al que se referirá de aquí en adelante en este capítulo, es un método espectroscópico basado en el cambio de las propiedades fluorescentes de los triptofanos de ED-10 (es decir la fluorescencia intrínseca de la proteína) luego de la unión al ADN. Este método había sido previamente puesto a punto en el laboratorio para medir la unión de ED-10 a oligonucleótidos doble cadena (dcADN)⁶⁸. La unión de los complejos Fab ED-10 con el site 35-18A y el site 35-18B seguida por medio de curvas de titulación en el equilibrio mostró una relación molar Fab ED-10:site 35-18 (tanto A como B) 1:1 como era esperado. En la Figura 9 se muestra el caso de site 35-18B como ejemplo.

Se determinaron por este método, entonces, la K_D para ED-10 con distintos oligonucleótidos. ED-10 fue capaz de unir a la cadena B del site 35-18B con una $K_D = 0.4 \pm 0.04$ nM, siendo ésta cuatro veces menor que la afinidad reportada para el oligonucleótido doble cadena (Figura 10; Tabla I). La secuencia del oligonucleótido site 35-18dc es cuasi-palindrómico, por lo tanto las hebras simple cadena podrían formar estructuras secundarias de tipo orquilla muy similares una a la otra. Por lo tanto se ensayó la afinidad de unión de ED-10 por la hebra A del mismo sitio. Sin embargo, ésta fue 6000 veces menor que la que la medida para la hebra B (Figura 10; Tabla I). Esto correspondió a un cambio en la energía

libre de unión ($\Delta\Delta G$) de $5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Tomados en conjunto estos resultados, sugirieron que era el extremo 5' de la hebra B el que contenía los determinantes para la unión con ED-10.

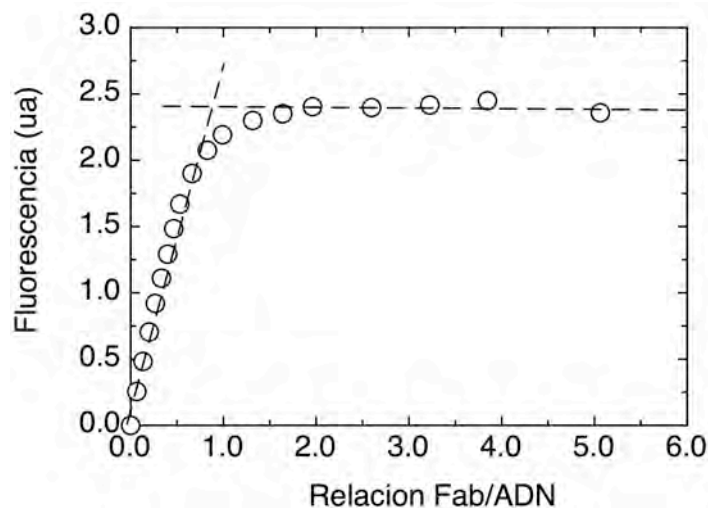


Figura 9. Estequiometría de unión ED-10:site 35-18 B. Se tituló una solución 200 nM de ED-10 en TBS pH 7,0 con concentraciones crecientes de site 35-18B. Se siguió el cambio de fluorescencia intrínseca de los triptofanos de ED-10.

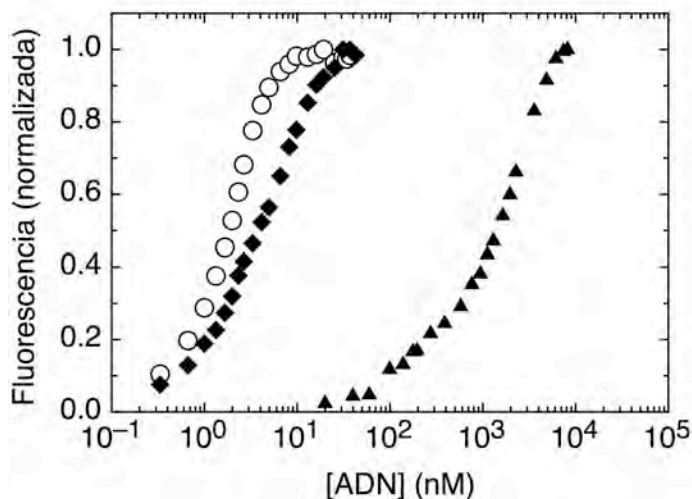


Figura 10. Discriminación de hebras del site 35-18 por ED-10. Gráfico logarítmico de la unión de Fab ED-10 a site 35-18cd (◆); site 35-18B (○); site 35-18A (▲). Se tituló una solución 5 nM (para site 35-18cd y site 35-18B) y 50 nM (para site 35-18A) de ED-10 en TBS pH 7,0 con concentraciones crecientes del oligonucleótido indicado. Los cambios de fluorescencia de cada una de las isotérmicas se normalizaron con el mayor valor.

Para reforzar la hipótesis que el reconocimiento del ADN por ED-10 sucedía por el extremo 5' y descartar cualquier interacción con el centro del oligonucleótido se construyó un oligonucleótido doble cadena de 48 pb que contenía en el centro la secuencia de site 35-

18dc (site 35-48). En este caso se registró una caída en la afinidad de 250 veces comparado con el site 35-18dc (Tabla I). Por otra parte, ED-10 unió un oligonucleótido del mismo largo y composición total de bases, pero distinta secuencia (site 35-48) con la misma afinidad que aquel que contenía la secuencia salvaje en el centro (Tabla I). Este resultado sustentó, una vez más, la hipótesis en la cual el determinante para la interacción se encontraba en la región 5' de la hebra B.

Por lo tanto, se diseñaron oligonucleótidos cadena simple de menor longitud que conservaban la secuencia 5' de la hebra B (materiales y métodos). La afinidad de unión resultó ser prácticamente igual para todos los largos de ADN mientras la secuencia 5'-TC estuviera presente, presentando una K_D promedio de 0,2 nM, $\Delta G \approx 13 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Tabla I). Llamativamente, el mono-nucleotido fosfato dTTP se unió de manera muy débil a ED-10 ($K_D \geq 0,5 \mu\text{M}$), mientras que el mononucleósido análogo, timidina (no tiene los grupos fosfato) presentó una $K_D = 2.8 \pm 0.5 \text{ nM}$, sugiriendo que los grupos fosfato en el dTTP estarían involucrados en interacciones repulsivas o impedidos estéricamente. La diferencia en la energía de unión entre la timidina y 5'-TC fue de $\Delta\Delta G = 1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, correspondiendo a casi al 10% de la energía total de unión. En cambio, la mutación de la timidina 5' en el site 35-18B por cualquiera de las otras tres bases provocó un cambio drástico energía de unión ($\Delta\Delta G \approx 5 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) (Tabla I). Por último, debido a que muchos de los AcMo anti-ADN reportados tienen alta afinidad por oligonucleótidos simple cadena de politimidina^{84; 163; 164}, se midió la afinidad de ED-10 por arreglos de 5 y 15 timidinas (d(T)₅ y d(T)₁₅, respectivamente) obteniéndose aproximadamente el mismo valor para ambas $K_D \approx 50 \text{ nM}$ ($\Delta G \approx 10 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) (Tabla I).

Debido a la alta afinidad de ED-10 por el ADN inmunógeno, en los experimentos de titulación se utilizó la menor concentración de ED-10 con la cual se obtuvo una buena relación señal/ruido dentro del rango de disociación. En este contexto no fue posible trabajar en condiciones completamente disociantes, por lo tanto los valores para las K_D obtenidas podrían ser ligeramente distintos. Surgió entonces como pregunta, si la afinidad de ED-10 por los oligonucleótidos que poseían la secuencia 5' del site 35-18 era realmente la misma. Es decir, si ésta no cambiaba con respecto a la longitud del ADN mientras esté 5'TC presente, o simplemente, las afinidades estaban por debajo del límite de detección del

Tabla I. Reconocimiento de distintos oligonucleótidos de ADN por el Fab ED-10

| ADN | K_D (nM) | $^a\Delta G$ (kcal·mol ⁻¹) | $^b\Delta\Delta G$ (kcal·mol ⁻¹) |
|-------------------------|-------------|--|--|
| site 35-18ds | 2.33 ± 0.4 | -11.8 ± 0.4 | 0 |
| site 35-18 A | 2319 ± 180 | -7.7 ± 0.2 | 5.14 |
| site 35-18 B | 0.39 ± 0.04 | -12.8 ± 0.3 | 0 |
| iset 35-48ds | 531 ± 80 | -8.5 ± 0.4 | 3.21 |
| site 35-48ds | 481 ± 28 | -8.6 ± 0.1 | 3.15 |
| site 35-10 B | 0.2 ± 0.02 | -13.2 ± 0.2 | -0.40 |
| site 35-6 B | 0.27 ± 0.03 | -13.0 ± 0.3 | -0.22 |
| site 35-4 B | 0.12 ± 0.01 | -13.5 ± 0.2 | -0.70 |
| site 35-3 B | 0.18 ± 0.02 | -13.3 ± 0.3 | -0.46 |
| site 35-2 B | 0.35 ± 0.03 | -12.9 ± 0.2 | -0.06 |
| site 35-18 B5'C | 1600 ± 120 | -7.9 ± 0.2 | 4.92 |
| site 35-18 B5'G | 2113 ± 180 | -7.7 ± 0.2 | 5.09 |
| site 35-18 B5'A | 2487 ± 250 | -7.6 ± 0.2 | 5.18 |
| site 35-80ds | 1.71 ± 0.18 | -11.9 ± 0.3 | -0.18 |
| site 35-80 ^a | 0.15 ± 0.04 | -13.4 ± 0.7 | -0.57 |
| site 35-80B | 610 ± 40 | -8.5 ± 0.2 | 4.35 |
| dTimidina | 2.8 ± 0.5 | -11.7 ± 0.4 | 1.17 |
| dT5 | 49 ± 5 | -10.0 ± 0.3 | 2.86 |
| dT15 | 45 ± 6 | -10.0 ± 0.3 | 2.81 |

^a $\Delta G = R \cdot T \cdot \ln(K_D)$; ^b $\Delta\Delta G = \Delta G_i - \Delta G_{35-18cd}$ para ADNcd y $\Delta G_i - \Delta G_{35-18B}$ para ADNcs.

ensayo y solo “parecía” no cambiar. Se planteó entonces la necesidad de encontrar alguna manera de disminuir la afinidad de ED-10 por el ADN inmunógeno perturbando la interacción. Para esto se eligió como oligonucleótido modelo a site 35-6B (correspondiente a las 6 primeras bases 5' del site 35-18B) ya que presentaba la secuencia 5'TC y poseía una longitud media, de acuerdo a los oligonucleótidos ensayados. Con éste se realizaron distintos ensayos, cambiando las condiciones de la solución para ver como afectaban estas la constante de disociación de ED-10 por el ADN. La idea fue obtener una condición en la

cual la afinidad sea menor de manera de poder medir las K_D con mayor precisión para las distintas longitudes de ADN.

Lo primero que se intentó fue cambiar la fuerza iónica de la solución. Se utilizó el mismo *buffer* que antes, sólo que se movió la concentración de NaCl entre 0 y 1M. La interacción de ED-10 con site 35-6B fue insensible al cambio de la concentración de sal (Figura 11). Esto había sido previamente demostrado en el laboratorio para la interacción de ED-10 con site 35-18dc⁷⁹. Otro posible cambio en las condiciones de una solución es modificar si pH. Por lo tanto, a continuación se analizó si el cambio de pH afectaba la afinidad de ED-10 por el ADN. Con este fin se realizaron titulaciones variando el rango de pH (el *buffer* utilizado fue Tris-Citrato, ya que permitió variar el pH en el rango deseado), manteniendo la fuerza iónica constante en 150 mM con NaCl en todos los casos. Como puede observarse en la Figura 12 la unión de ED-10 a el ADN tampoco se vio afectada por el cambio de pH en el rango de 5,0 a 9,0 .

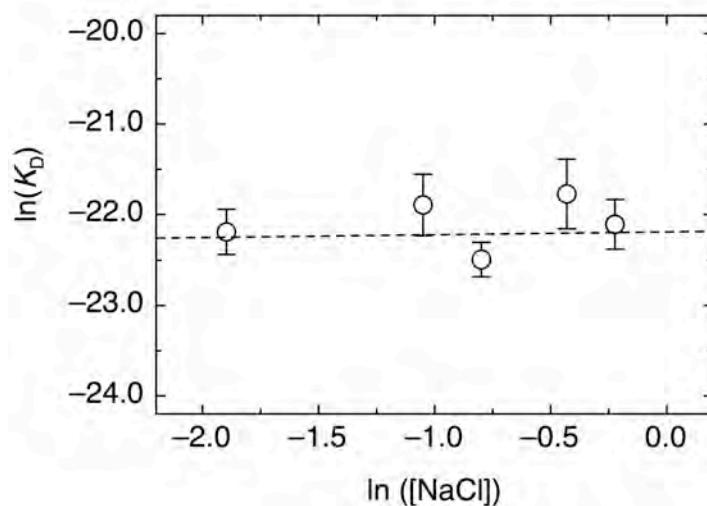


Figura 11. Dependencia de la afinidad del complejo ED-10:site 35-6B respecto de la fuerza iónica. En todos los casos se utilizó una solución 5 nM de ED-10. El *buffer* utilizado fue TBS pH 7,0 donde la concentración de NaCl se varió entre 0,15 – 0,8 M.

Los experimentos anteriores indicaron que la interacción entre ED-10 y el ADN parecía estar gobernada por interacciones no polares e insensibles al pH. Por lo tanto se decidió llevar a cabo titulaciones de ED-10 con site 35-6B en soluciones con menor polaridad. Para modificar esta condición se utilizaron mezclas acuosas de distintos alcoholes (Ej. etanol o metanol) obteniéndose una solución de menor constante dieléctrica.

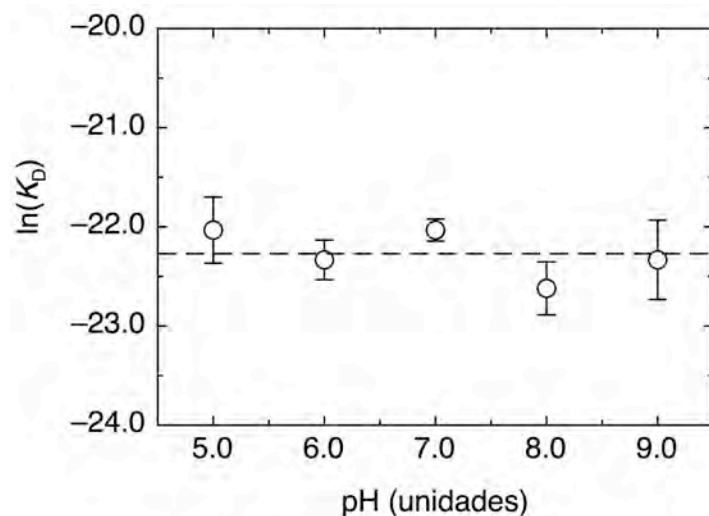


Figura 12. Dependencia de la afinidad del complejo ED-10:site 35-6B respecto al pH. En todos los casos se utilizó una solución 5 nM de ED-10. El buffer utilizado fue Tris-Citrato 25 mM 150 mM NaCl. El pH se varió entre 5,0 – 9,0.

Mediante estas mediciones se determinó que la afinidad de ED-10 disminuyó a medida que la polaridad de la solución fue reducida. Luego, se graficó el $\ln(K_D)$ en función de la constante dieléctrica de la solución (ϵ) como medida de polaridad y se observó que este cambio se ajustaba a una regresión lineal (Figura 13). Se realizó el mismo experimento utilizando metanol en lugar de etanol y se obtuvieron los mismos resultados (no mostrado), indicando que la disminución de la afinidad se debió a un cambio en la polaridad y no a un cambio debido al estrés osmótico¹⁶⁵. Los trabajos del laboratorio de Glick^{165; 166; 167} con el

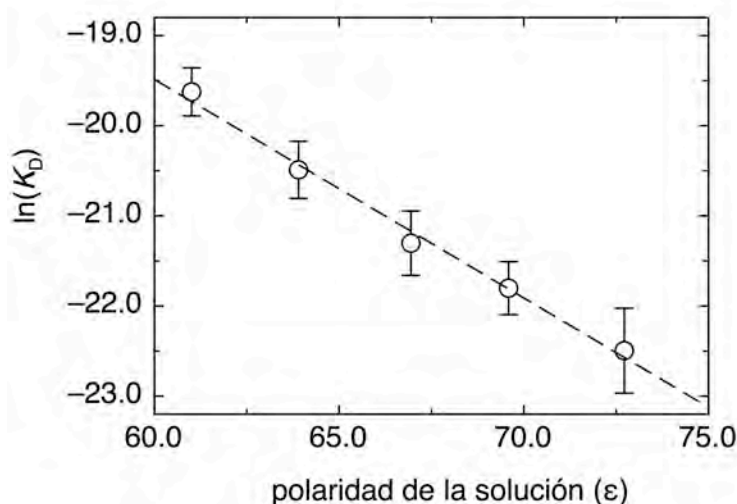


Figura 13. Dependencia de la afinidad del complejo ED-10 por site 35-6B respecto a la polaridad de la solución. En todos los casos se utilizó una solución 5 nM de ED-10. El buffer utilizado TBS pH 7,0. Se varió entre 0 – 30% m/v la concentración de etanol. La polaridad se representa como la constante dieléctrica teórica (ϵ) de la solución.

AcMo 11F8 mostraron un comportamiento similar para la interacción de este AcMo con el ADN.

Finalmente, de esta forma fue posible determinar el valor de K_D en solución acuosa, extrapolando la recta al valor de la constante dieléctrica del agua. El valor obtenido fue de $K_D = 0.04$ nM aproximadamente 1 orden de magnitud menor al obtenido mediante el ajuste de las curvas de titulación medidas en TBS. En los valores obtenidos a 30 % m/v de etanol se encontró un rango más confiable para el ensayo de titulación y por lo tanto las mediciones de afinidad entre ED-10 y los oligonucleótidos de distinta longitud se realizaron bajo estas condiciones (Tabla II). Se observó que, la afinidad de ED-10 con los distintos oligonucleótidos permaneció nuevamente invariable, corroborando que la longitud del ADN no influye en la afinidad mientras 5'-TC este presente.

Tabla II. Reconocimiento de distintos oligonucleótidos de ADN por el Fab ED-10 en 30% w/v Etanol

| DNA | K_D^a (nM) | ΔG (kcal.mol ⁻¹) | $\Delta\Delta G^b$ (kcal.mol ⁻¹) |
|---------------|--------------|--------------------------------------|--|
| site 35-18Bss | 3.8 ± 0.9 | -11.5 ± 0.6 | - |
| site 35-10 B | 2.3 ± 0.2 | -11.8 ± 0.2 | -0.30 |
| site 35-6 B | 3.3 ± 0.8 | -11.6 ± 0.6 | -0.08 |
| site 35-4 B | 2.8 ± 0.3 | -11.7 ± 0.3 | -0.18 |
| site 35-3 B | 1.2 ± 0.2 | -12.2 ± 0.4 | -0.69 |
| site 35-2 B | 5.9 ± 0.4 | -11.2 ± 0.2 | 0.26 |

^a $\Delta G = -RT \ln K$; ^b $\Delta\Delta G = \Delta G_i - \Delta G_{35-18B}$

Retardo de movilidad electroforética en geles

Estudios previos en el laboratorio sobre la interacción ED-10-ADNdc mostraron que el ADN experimentaba algún tipo de cambio conformacional o una desnaturalización parcial al formar el complejo⁷⁹. Habiendo demostrado que ED-10 reconoce ADNsc, se planteó la posibilidad en la cual la unión del AcMo tuviera la habilidad de separar las hebras del ADN, permaneciendo solamente unido a la hebra B. Alternativamente, ED-10 podría reconocer el extremo 5' de la hebra B, en un contexto de ADNcd. Para determinar cual era

la hipótesis correcta se utilizó el ensayo de retardo de movilidad electroforética en geles. A partir de este ensayo se demostró que el site 35-18dc permaneció en forma de doble cadena luego de ser retardado por la unión de ED-10 (Figura 14, panel de la izquierda) sin evidencia de la liberación de ADNcs. Además, se corroboró también por este método que ED-10 reconoce la hebra B del site 35-18 (Figura 14, panel del centro) y que puede reconocer fragmentos de ADNcs de hasta 80 bases mientras que contengan la secuencia 5'-TC (Figura 14, panel de la derecha). En este último caso, unió la hebra A en lugar de la B porque es ésta la que posee 5'-TC (ver panel de oligonucleótidos, materiales y métodos).

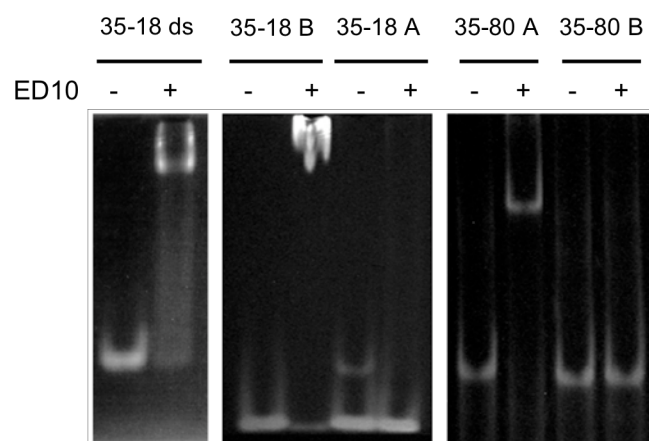


Figura 14. Formación del complejo Fab ED-10:ADN seguido por EMSA. Interacción de Fab ED-10 con el oligonucleótido site 35-18dc (panel izquierdo); site 35-18sc (panel centro); site 35-80sc (panel derecho) El complejo fue incubado 30 min a temperatura ambiente y luego cargados en el gel. Las bandas se visualizaron por transiluminación UV.

Cambios conformacionales en ED-10 unido a ADN

En los sistemas anti-ADN-ADN en los cuales se determinó la estructura cristalográfica del Fab libre y unido al ADN^{116; 120} se observaron cambios, principalmente en las regiones CDR del Ac. De la misma manera esto ha sido observado para el AcMo anti-RNA jel-3¹⁶⁸, así como para el anti-NC174¹⁶⁹ (un endulzante protéico natural).

El dicroísmo circular (CD) en la región del ultravioleta (UV) es una técnica ampliamente utilizada para evaluar cambios conformacionales en proteínas. El CD en la zona UV lejana (180-250 nm), donde absorbe el enlace peptídico, refleja principalmente el contenido de estructura secundaria de una proteína, aunque también los residuos aromáticos pueden contribuir en esta región del espectro.^{170; 171; 172; 173} Por otro lado, el CD en la zona UV

cercana (250-340 nm), donde absorben las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos y los puentes disulfuro, revela características de la estructura terciaria a través de la asimetría del entorno de esos residuos.

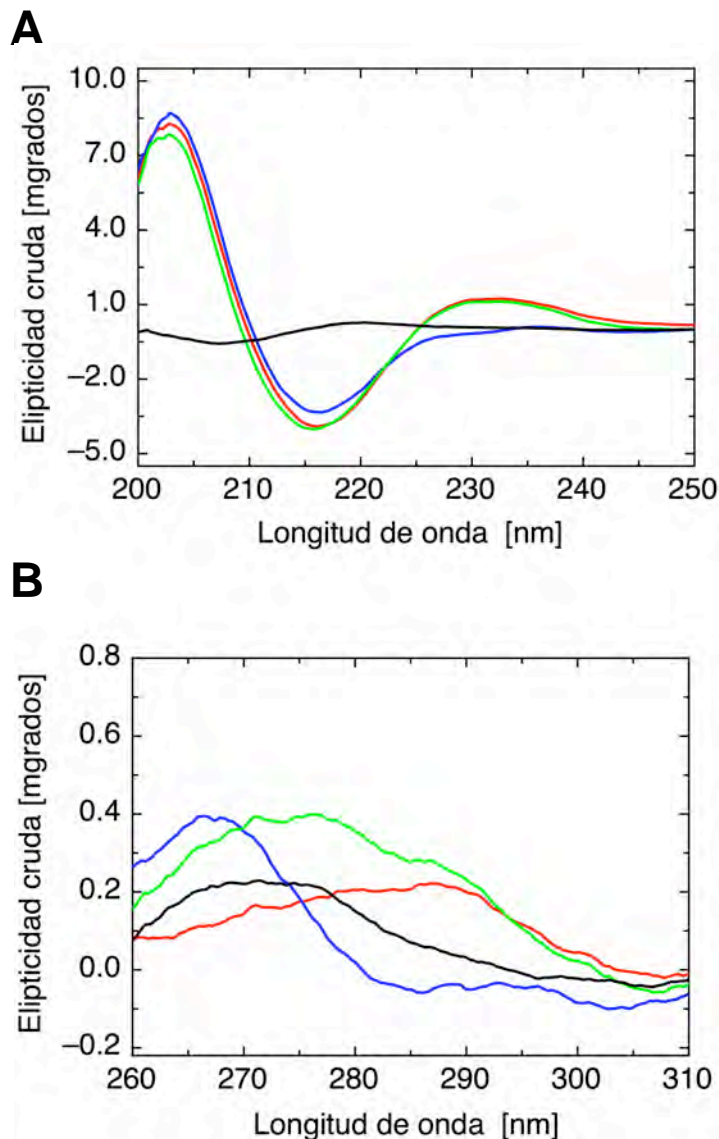


Figura 15. Análisis por dicroísmo circular ultravioleta de la porción Fab de ED-10 libre y unido a site 35-4B. Espectro de una solución 5 μM de la porción Fab de ED-10 sola (rojo); incubada con 5 μM site 35-4B (azul). Espectro de una solución 5 μM de site 35-4B (negro) y suma de ambos espectros individuales (verde). (A) espectro de UV-lejano; (B) espectro de UV-cercano.

Apuntando a determinar la presencia de cambios conformacionales en solución luego de la unión del ADN a ED-10 se realizaron experimentos de dicroísmo circular. Habiéndose demostrado la misma afinidad para ED-10 con el ADNes inmunógeno (mientras 5-TC estuviera presente), se utilizó para estos experimentos un oligonucleótido corto de manera de minimizar su señal de CD. El espectro de dicroísmo circular del Fab en el UV lejano

mostró la dominancia esperada de las láminas β con un mínimo a 216 nm y un máximo a 233 nm (Figura 15 A). El ADNsc site 35-4B mostró una contribución muy pequeña en esta región comparado con la proteína. El espectro del complejo evidenció una considerable diferencia con respecto al espectro resultante de la suma de los dos espectros individuales. Particularmente, disminuyó la intensidad de la banda negativa de 216 nm y la banda de 233 nm desapareció. Generalmente, el cambio a 216 nm en proteínas es considerado como un cambio en el contenido de láminas β . Aunque no hay que perder de vista que, en la comparación de distintos fragmentos Fabs (donde el contenido total de láminas β es similar) se producen cambios en esta región del espectro, siendo asignados a la contribución de las cadenas aromáticas de los aminoácidos en este sector del espectro.^{172; 173} Éstos son, incluso, mayores al observado para ED-10 luego de la unión del ADN. Es por esto que el cambio en la señal del UV-CD, en esta región, parecería corresponder al cambio del entorno de los residuos aromáticos.^{172; 173} El espectro en el UV-cercano de la proteína reportó un banda entre 280-290 nm, la cual se condijo con la presencia de aminoácidos aromáticos en un entorno asimétrico (Figura 15 B). El oligonucleótido también mostró una banda ancha al rededor de la misma región. Sin embargo el complejo produjo una banda positiva distintiva a 268 nm, no observada en los ligandos aislados.

Se realizó el mismo experimento utilizando ahora el oligonucleotido de 5 bases de timidina d(T)₅,^{83; 163; 172}, si bien no puede considerarse específico. Aunque con menos afinidad que su ligando inmunógeno, ED-10 fue capaz de unir d(T)₅ (Tabla I). Se utilizó este oligonucleótido corto debido a que como el site 35-4B prácticamente minimizó la señal en el espectro de CD en el UV lejano (Figura 16). Los espectros de la unión de d(T)₅ a ED-10 presentaron características similares a los medidos para site 35-4B tanto en el UV-CD lejano como en el cercano, sugiriendo que la unión de d(T)₅ produjo cambios en el entorno aromático del sitio de combinación del Fab, similares a los observados para el ADN inmunógeno.

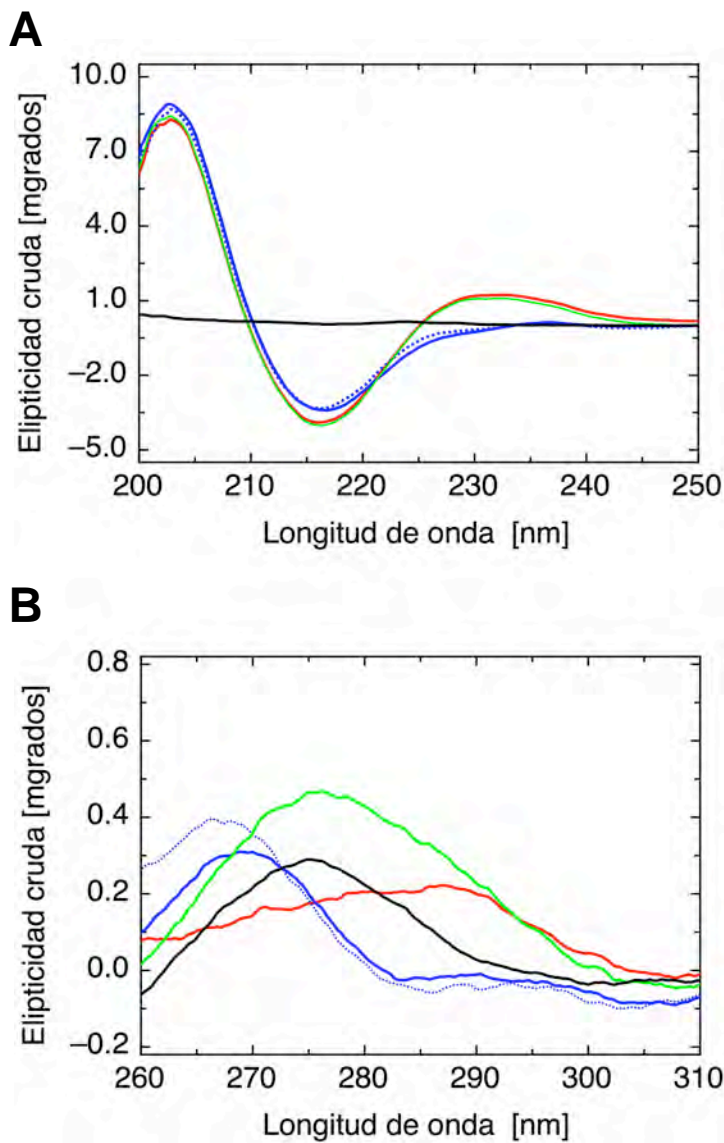


Figura 16. Análisis por dicroísmo circular ultravioleta de la porción Fab de ED-10 libre y unido a d(T)₅. Espectro de una solución 5 μ M de la porción Fab de ED-10 sola (rojo); incubada con 5 μ M d(T)₅ (azul). incubada con 5 μ M site 35-4B (azul punteada). Espectro de una solución 5 μ M de d(T)₅ (negro) y suma de ambos espectros individuales (verde). (A) espectro de UV-lejano; (B) espectro de UV-cercano.

Determinación de la estructura cristalina del complejo ED-10:ADN

Obtención de cristales del complejo ED-10:ADN

Al momento del inicio de esta tesis se había cristalizado en el laboratorio la fracción Fab libre de ED-10 y su estructura de rayos X había sido resuelta. Como se mencionó anteriormente, los dos AcMo anti-ADN cristalizados, BV04-0^{163; 172} y DNA-1¹⁶⁸, mostraron cambios en su estructura luego de la interacción con el ADN.^{116; 124} Más aún, los resultados obtenidos mediante UV-CD, reportaron una situación similar para ED-10. Por lo tanto, modelar el ADN en esta estructura no aportaría información detallada y relevante. Con el

fin de comprender el mecanismo de reconocimiento en términos estructurales se planteó la necesidad de obtener cristales del complejo del AcMo y su ADN inmunógeno.

Se comenzó entonces a realizar un rastreo de métodos y condiciones para la cristalización del complejo. En intentos anteriores de cristalización, antes de obtener gran parte de la información surgida a partir de los estudios de unión al equilibrio, se había intentado cristalizar el Fab con el site 35-18. A partir de la observación que el determinante de unión parecía estar en el extremo 5' de la cadena B se comenzó a estudiar la posibilidad de obtener el complejo con oligonucleótidos simple cadena de menor longitud. En ese momento se determinó que ED-10 reconocía a las primeras se bases del site 35-18B con alta afinidad. Por lo tanto, se comenzó el rastreo con un fragmento de ADNsc correspondiente a las primeras 6 bases 5' de la hebra B (site 35-6B). El primer intento consistió en producir cristales del Fab libre y luego por la técnica de "soaking" se embebió dicho cristal con el oligonucleótido de manera de obtener el co-cristal. Estos intentos no fueron productivos, ya que una vez formado el cristal de Fab libre, el agregado del ADN produjo la disolución del cristal. Por lo tanto se decidió formar el complejo a gran concentración primero y luego utilizando el método de la gota colgante muestrear distintas condiciones de cristalización. Se adquirió el kit de cristalización *jena Bioscience screen* (Jena, Alemania) el cual provee una amplia diversidad de condiciones de cristalización. Finalmente en una de las condiciones se obtuvieron cristales de forma y tamaño definidos (ver materiales y métodos). El mejor cristal obtenido se monto en un capilar de cuarzo y fue enviado al laboratorio nacional de luz sincrotrón en Campinas, Brasil para ser difractado.

Colección de datos y resolución de la estructura

Se aplicó un protocolo de colección a temperatura ambiente obteniéndose en total de tres juegos de datos, consistiendo cada uno de ellos en 180 fotografías de difracción con una oscilación en el eje de rotación ϕ de un grado. Debido al daño originado por la radiación X sobre el cristal, solamente el primer juego de datos rindió resultados satisfactorios, alcanzándose una resolución máxima de 1,89 Å. Por otro lado, la intensidad de los puntos o "spots" de difracción observados fue muy intensa por lo que fue necesario disminuir el tiempo de exposición de cada fotografía a tan sólo 15 segundos para evitar la saturación del

detector. En la Figura 17 se muestra una de las 180 fotografías de la difracción del cristal obtenida. El primer juego de datos fue luego integrado, escaleado y reducido según se detalla en materiales y métodos.

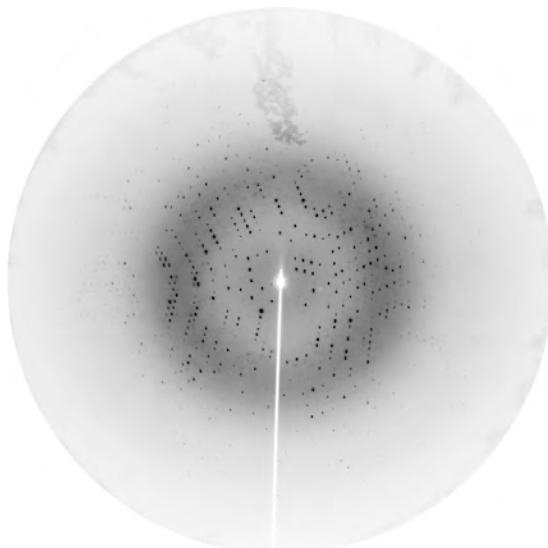


Figura 17. Fotografía de difracción del cristal del complejo ED-10:site 35-6B. La colección de los datos se realizó a temperatura ambiente con el cristal montado en un capilar de cuarzo. El tiempo de exposición de cada fotografía fue de tan sólo 15 segundos para evitar la saturación del detector.

La estructura cristalina fue resuelta por una colaboradora del laboratorio, la Dra. Robyn L. Stanfield (*The Scripps Research Institute*), mediante el método de reemplazo molecular, utilizando la estructura previamente obtenida del Fab libre de ED-10 como modelo (Tabla III). La resolución obtenida fue de 1.89 Å con un factor de acuerdo y factor de acuerdo libre (R_{crys}/R_{free}) de 17.7 %/20.4% y una buena estequiometría. El primer factor se calculó a partir de la diferencia relativa entre los valores de las intensidades de los factores de estructura observados (medidos en la experiencia de difracción) y los factores de estructura calculados (obtenidos por transformada de Fourier de las coordenadas del modelo resuelto). El segundo factor es similar al primero, salvo que se calculó sobre el 5% de las reflexiones elegidas al azar, que no se usaron para refinar la estructura. Los valores obtenidos indican la bondad de la estructura ya que la diferencia entre ellos fue menor al 6%. En la Tabla II se resumen la estadísticas de colección de datos y refinamiento para las estructuras de ED-10 libre y unido. Se encontraron dos fragmentos de Fab por unidad asimétrica en la estructura libre con ángulos de acodamiento entre la región variable y la constante de 174° y 173° (Figura 18 A) respectivamente, mientras que en el complejo se

Tabla III. Estadísticas de colección de datos y refinamiento

| | <i>Fab ED10</i> | <i>Fab ED10 + dTC</i> |
|---|---|---------------------------------|
| Colección de datos | | |
| Cinclotron, Línea de Luz | ESRF, ID14-1 | LNLSB, D03B-MX1 |
| Longitud de onda (Å) | 0.9763 | 1.427 |
| Resolución (Å) ¹ | 2.73 (2.8-2.73) | 1.89 (1.92-1.89) |
| Grupo espacial a,b,c (Å) | P2 ₁ 2 ₁ 2; 60.5, 86.8, 189.9 | C2; 124.1, 64.2, 84.1, β=116.3° |
| # Observaciones | 96108 (9239) | 110195 (5226) |
| # Refracciones únicas | 27701 (2699) | 44585 (2106) |
| Complejidad (%) | 97.9 (97.0) | 94.5 (91.5) |
| R _{sim} (%) ² | 11.0 (45.3) | 4.6 (43.3) |
| Promedio 1/s | 16.0 (3.7) | 17.2 (2.0) |
| Estadísticas del refinamiento | | |
| Resolución (Å) | 2.73-25.40 (2.80-2.73) | 1.89-40.50 (1.94-1.89) |
| # Refracciones (set de trabajo) | 26314 (1619) | 42211 (2943) |
| # Refracciones (set de prueba) | 1349 (84) | 2235 (157) |
| R _{crist} (%) ³ | 18.6 (34.6) | 19.4 (32.5) |
| R _{libre} (%) ⁴ | 26.2 (38.1) | 22.8 (40.1) |
| # Átomos de <i>Fab</i> | 3350 | 3350 |
| # Átomos de DNA | 0 | 35 |
| # Moléculas de agua | 0 | 180 |
| Valores-B promedio (Å²) | | |
| Variable | 34.6; 32.9 | 31.8 |
| Constante | 28.2; 27.8 | 36.5 |
| DNA | nd | 27.4 |
| Valor-B de Wilson (Å ²) | 47.2 | 29.7 |
| Gráfico de Ramachandran | | |
| Favorecidos | 86.3 | 89.6 |
| Permitidos adicionalmente | 12.5 | 9.9 |
| Permitidos generosamente | 0.8 | 0.3 |
| No Permitidos | 0.4 | 0.3 |
| Desviaciones por raíz cuadrada media (RMS) | | |
| Distancias de uniones (Å) | 0.024 | 0.019 |
| Ángulos (Å) | 2.14 | 1.86 |

¹Los números en paréntesis representan la máxima resolución.
²R_{sim} = S_{hkl} |I- <l>| / S_{hkl} |I| ³R_{crist} = S_{hkl} |F_o-F_c| / S_{hkl} |F_o|
⁴R_{libre} igual que R_{crist}, pero para el 5% de los datos excluidos del refinamiento.

encontró solo un Fab por unidad asimétrica con un ángulo de acodamiento de 184° (Figura 18 B).

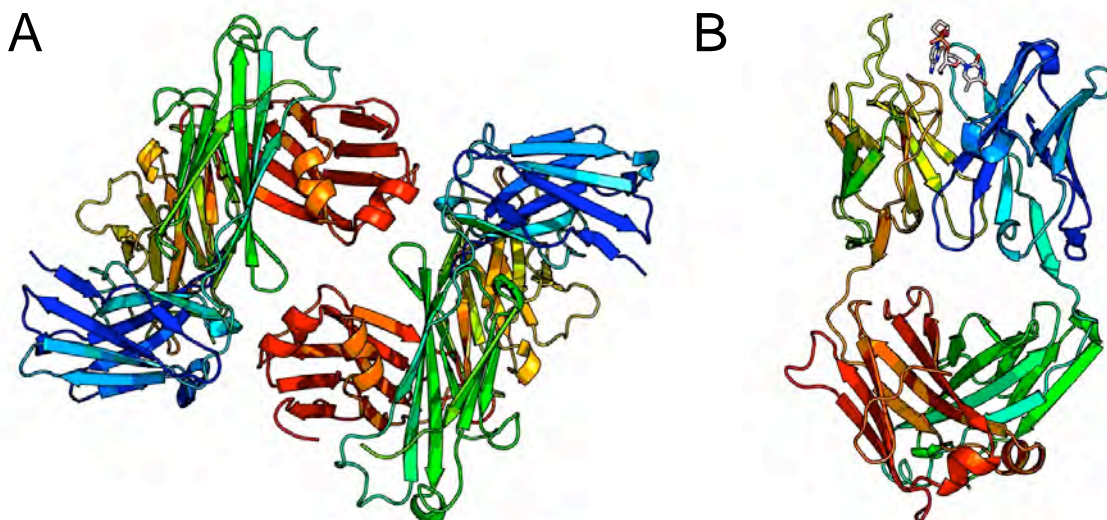


Figura 18. Representación de cintas de la unidad asimétrica. (A) ED-10 libre. (B) ED-10:site 35-6B. Las cadenas de la proteína están coloradas como arcoiris y el ADN se muestra con la representación de bastones y está coloreado según los átomos (carbono, blanco; oxígeno rojo; nitrógeno, azul y fosfato, púrpura).

A pesar que la cristalización fue realizada con un oligonucleótido de seis bases, sólo las dos primeras bases 5' presentaron densidad electrónica (5'-TC) (Figura 19). En cuanto a la estructura de ED-10, los CDR's de ED-10 resultaron pertenecer a las clases canónicas predichas de acuerdo a su secuencia: L1, clase 4; L2, clase 1; L3, clase 1; H1, clase 1^{38 37} (Figura 20).

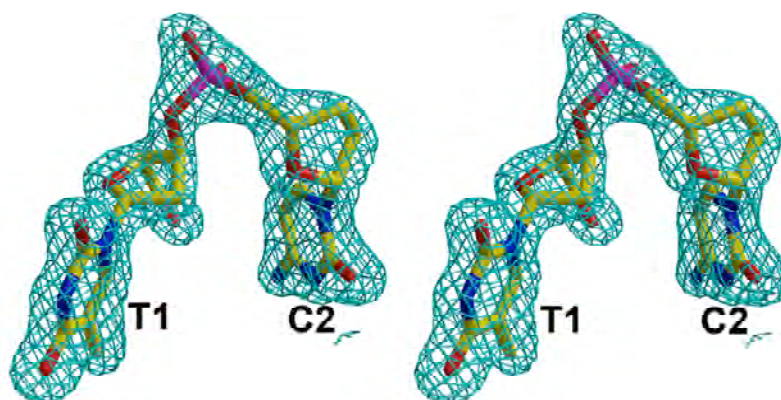


Figura 19. Vista estéreo de la densidad electrónica para el 5' dTdc3' contorneada a $3,5\sigma$.

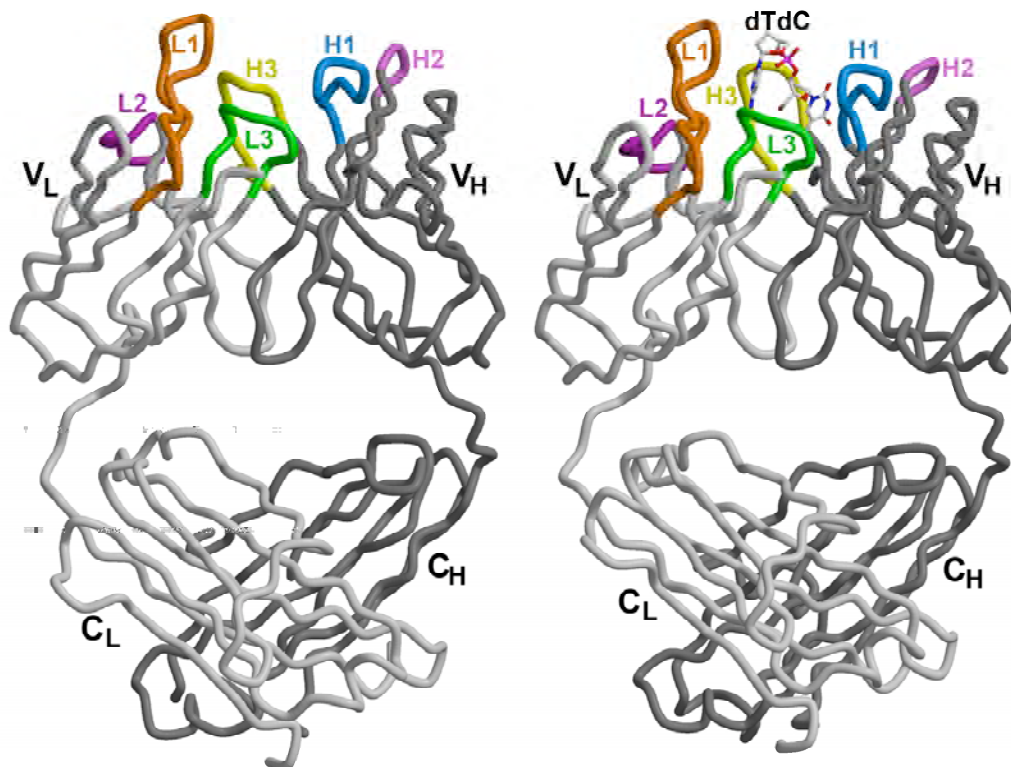


Figura 20. Trazo de carbonos alfa de Fab ED-10 y Fab ED-10:ADN. Ambas moléculas fueron orientadas de la misma manera, dejando la cadena liviana a la izquierda (gris claro) y la pesada a la derecha (gris oscuro). El ADN aparece representado como bastones y coloreado igual que en la Figura 18. Los CDR están coloreados de la siguiente manera: L1, naranja; L2, púrpura; L3, verde; H1, cian; H2, magenta; H3, amarillo.

Interesantemente, el CDR H2 resultó inusualmente corto y se lo designó como una nueva clase canónica. Hasta al momento existen cuatro clases canónicas descritas para los CDRs H2, i) clase 1, sin inserciones después del residuo 52; ii) Clases 2 y 3 con una inserción después del residuo 52; iii) Clase 4 con tres inserciones después del mismo. El CDR H2 de ED-10 tiene una delección en el residuo 53 haciéndolo más corto aún que los *loops* de los CDR clase 1 (Figura 21).

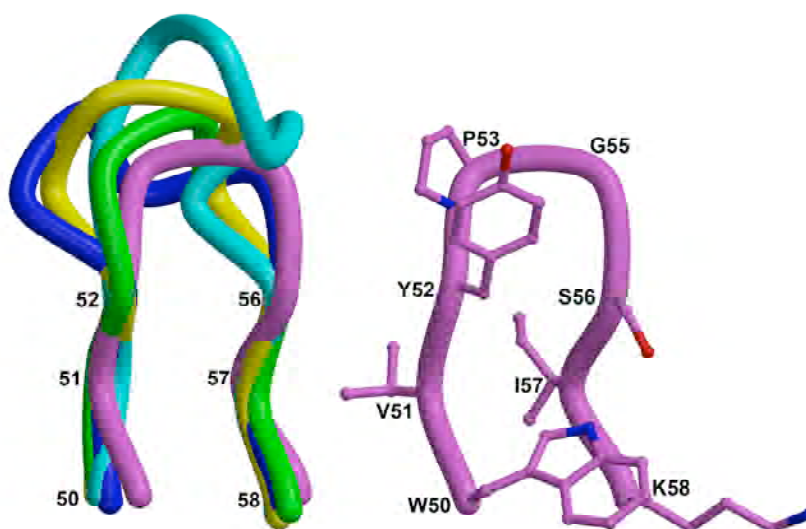


Figura 21. Comparación del CDR-H2 de ED-10 con las cuatro clases canónicas definidas para CDR-H2. El CDR-H2 de ED-10 se muestra a la derecha (en magenta) con las cadenas laterales representadas como bolas y bastones. A la izquierda se superimpuso el CDR-H2 de ED-10 con los CDR-H2 de Hy-Hel10 (verde, case 1); Hy-HEL5 (amarillo, clase 2); J539 (azul, clase 3); 4-4-20 (cian, clase 4).

El sitio de combinación del ADN

Como se mencionó arriba, en el sitio de combinación del Fab la densidad electrónica fue muy clara y bien ordenada para los primeros dos nucleótidos, dTdT (Figura 20). Ambos nucleótidos adaptaron la conformación *anti* con ángulos de torsión, con respecto de las uniones N-glicosídicas, de -133° (timidina) y -107° (citidina). Ambos azúcares se encontraron en la conformación C2 *endo* con ángulos de pseudorotación de fase de 162° para la timidina y 158° para la citidina. El ADN se encontró insertando las dos bases en el sitio de combinación del Ac y el grupo fosfato en la superficie (Figura 22). Este formó cuatro uniones de hidrógeno con los residuos de los CDR's del Fab (L1, L3, H1, H3) y cuatro uniones de hidrógeno con moléculas de agua (Figura 22, Tabla IV). Se pudo observar también una unión hidrógeno NH-aromático¹⁷⁴ entre el N3 de la timidina y la tirosina H33, con una distancia entre el centro del anillo de la tirosina y el N3 de 3.4 Å. La base de timidina se encontró apilada entre el anillo indol del triptofano H50 y H95, mientras que la citidina se apiló contra el anillo de la tirosina L32 y perpendicular a la cadena lateral del triptofano H95. El área de superficie molecular oculta tras la formación

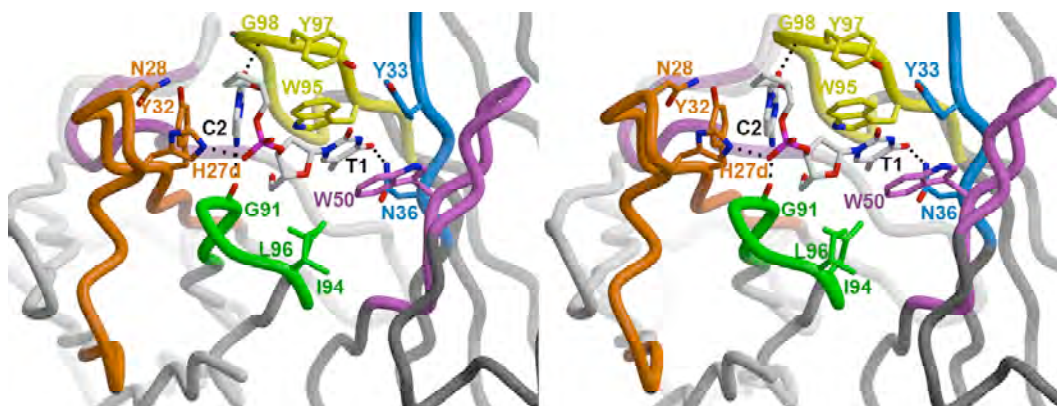


Figura 22. Vista del sitio de combinación de ED-10 en estéreo. Las regiones CDR, sus cadenas laterales y el ADN están coloreados de la misma manera que en la Figura 18. Las uniones de Hidrógeno entre el ADN y el Fab están marcadas como líneas negras punteadas.

del complejo fue de 385 \AA^2 para el Fab y 306 \AA^2 para el dinucleótido, 55 % y 45% de la timidina y citidina respectivamente. Luego de la unión entre el Fab y dTdC se formaron una gran cantidad de contactos de van der Waals (184).

Tabla IV. Distancias de las uniones hidrógeno y puentes salinos entre el Fab ED-10 y las moléculas de agua con dTdC.

| Fab o átomo de agua | Átomo de ADN | Distancia (Å) |
|-------------------------|----------------------|---------------|
| His ^{L27d} NE2 | Cyt ² O1P | 2.71 |
| Gly ^{L91} O | Cyt ² N4 | 2.69 |
| Asn ^{H35} ND2 | Thy ¹ O4 | 2.8 |
| Gly ^{H98} N | Cyt ² O2 | 2.66 |
| Wat ²⁸ O | Cyt ² O1P | 2.54 |
| Wat ¹⁶ O | Cyt ² O2 | 2.91 |
| Wat ⁴ O | Cyt ² N3 | 2.81 |
| Wat ⁸ O | Cyt ² N4 | 3.13 |

Uniones de Hidrógeno evaluadas con HBPLUS (McDonald et al, 1994) y Contacsym (Sheriff et al, 1987)

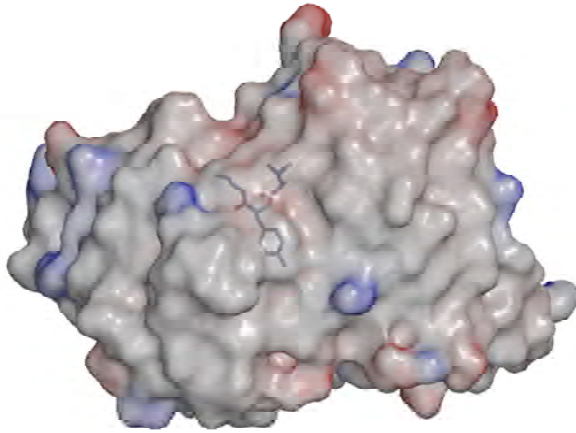
Por último, se calculó el índice estadístico de correlación de forma (Sc)¹⁷⁵ cuyo valor fue de 0,73. Este índice califica la complementariedad de forma en la interfaz de una interacción (originalmente usado para interacciones proteína-proteína). Da una idea de cuan

“bueno” es el ajuste entre las dos superficies. El valor obtenido para el complejo de ED-10 se encuentra apenas por encima del valor promedio obtenido para interacciones Ag-Ac de $0,69 \pm 0,2$.¹⁷⁵

Cambios conformacionales en el anticuerpo luego de la unión del ADN (cristalografía)

A partir de la estructura se pudo corroborar que ocurrían cambios conformacionales en el Fab tras la unión del ADN, principalmente en el sitio de combinación. Esto había sido sugerido a partir de los cambios encontrados en los espectros de UV-CD, tanto lejano como cercano, del Fab libre y unido. A fines de visualizar y cuantificar estos cambios conformacionales se superpusieron las estructuras de la cadena VH y VL de ambos cristales utilizando para el alineamiento los residuos que no pertenecían a los CDRs. La desviación de la raíz cuadrada media (Å) para las coordenadas de los carbonos α (C^α) correspondientes a los CDR fue: L1(1.01; 0.96), L2 (0.41; 0.38), L3 (0.49; 0.49), H1 (0.31; 0.31), H2 (0.65; 0.61), H3 (1.49; 1.49). El CDR H3 registró el mayor cambio, centrado alrededor de los residuos H96-H98, con un cambio de 3.8 Å en la posición del C^α la tirosina H97. Esta se encontró en la punta del CDR H3 y se alejó del centro del sitio de combinación, formando una cavidad, permitiendo la unión del ADN (Figura 23 A y B). El mayor movimiento en el CDR L1 se registró centrado entre los residuos del extremo (L28-29). Al igual que para el CDR H3, este CDR se apartó del centro del sitio de combinación permitiendo la unión del ADN.

A



B

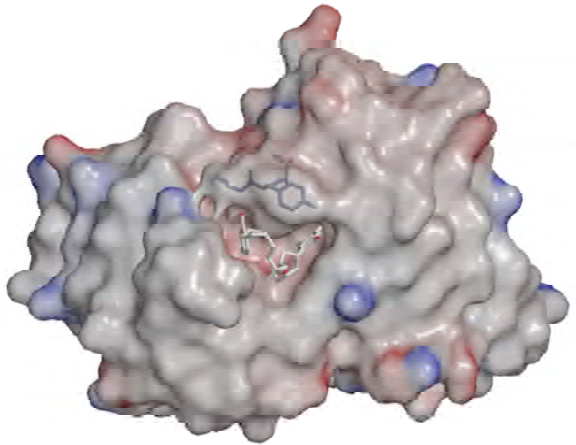


Figura 23. Representación de superficie electrostática del Fab de ED-10 a ± 15 kT. (A) complejo Fab ED-10, (B) Fab ED-10:ADN. Los residuos H96-H98 del CDR-H3 se muestran por debajo de la superficie representados como bastones para ilustrar el reacomodamiento de este CDR. De esta manera se forma una cavidad y permitiendo la unión del ADN. La representación fue producida usando GRASP.

Discusión I

Entender las bases estructurales y termodinámicas del reconocimiento de ADN mediado por Acs abarca dos aspectos fundamentales de la biología. El primero es cómo el ADN, una molécula “propia”, es reconocida por el sistema inmune como no propia. El conocimiento actual de este tema es insuficiente, especialmente si lo comparamos con lo alcanzado en cuanto al reconocimiento de proteínas y otras biomoléculas. El segundo aspecto importante, es que la respuesta inmune anti-ADN participa activamente en un grupo de enfermedades autoinmunes severas, entre las cuales la más representativa es el LES. A fin de comprender mejor este problema es necesario abordar sistemas relevantes desde distintos aspectos, como puede ser el mecanístico o el estructural.

La necesidad de más estructuras de Acs anti-ADN surge debido a que solo unas pocas han sido resueltas hasta la fecha;^{116; 120; 176; 177} principalmente si lo comparamos con el número de estructuras de otras proteínas, e incluso Acs. Es más importante aún la resolución de estructuras de complejos, ya que pese a que se han publicado trabajos en los cuales se modela el ADN en el sitio de combinación de Fab cristalizado,^{176; 178} artículos recientes han demostrado la presencia de un cambio en la conformación, luego de la unión del ADN.^{116;}¹²⁴ Por lo tanto, más allá que el modelado por homología de las regiones hipervariables de los Acs es una técnica ampliamente usada, la ubicación exacta de los ligandos no puede ser precisada, principalmente debido a que interacciones adicionales podrían formarse entre el Ac y el ADN. Incluso, aún con la estructura del complejo es difícil anticipar las características de estas interacciones. Una prueba fehaciente es la gran diferencia que existe entre la afinidad de ED-10 comparado con DNA-1 y BV04-01 por sus respectivos ligandos, algo que no podría haber sido inferido jamás a partir de la inspección de las estructuras (ver abajo).

La estructura del complejo ED-10:site 35-6B fue la primera resuelta entre un AcMo anti-ADN y el ADN que le dio origen y apenas la tercer estructura determinada de este tipo. En un trabajo previo se comparó el sitio de combinación de DNA-1¹²⁰, BV04-01^{116; 168} y Jel 103¹⁶⁸, sugiriéndose que dichos Acs utilizarían un motivo de unión que reconoce ADNcs y se lo denominó D-ARM¹²⁰. El sitio de combinación de ED-10 también presentó este motivo (Figura 24).

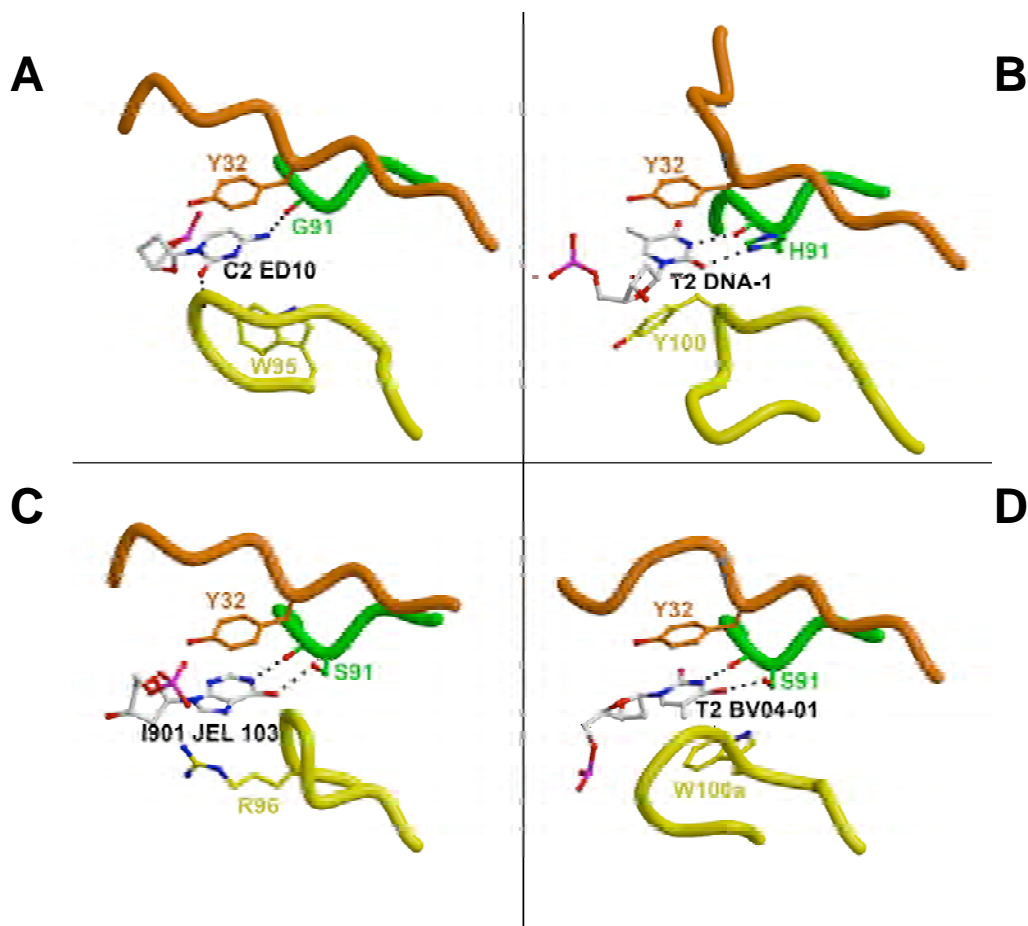


Figura 24. Comparación de los distintos motivos D-ARM. (A) El sitio de unión para C2 en ED-10; (B) El sitio de unión para T2 de DNA-1; (C) El sitio de unión para el mononucleótido en Jel3 y (D) El sitio de unión para T2 en BV04-01. Los CDR y sus cadenas laterales están coloreadas igual que en la Figura 20.

En ED-10 la citidina utiliza el D-ARM donde, el anillo de la base queda apilado entre la tirosina L32 y aproximadamente perpendicular al indol del triptofano H95 en el extremo del CDR H3. La base de la citidina se encuentra formando un enlace de hidrógeno con el carbonilo de la cadena principal de la glicina L91, en lugar de la cadena lateral del aminoácido L91 como se observó en el D-ARM de los otros Acs, y acepta también una unión de hidrógeno de la amida de la cadena principal de la glicina H98. Por lo tanto la definición original del D-ARM en la cual se describía una unión de hidrógeno con el aminoácido L91 puede ser ampliada a establecer una unión hidrógeno con cualquier aminoácido. En cuanto a los otros aminoácidos que componen este motivo, el residuo L32 es una tirosina en el 70% y 50% de las cadenas κ y λ respectivamente, mientras que el residuo H35 es mucho más variable, según la versión 2000 de la base de datos Kabat.¹⁷⁹

Como se mencionó anteriormente, el AcMo 64M-2¹⁷⁷ reconoce un fotoproducto de ADN dT(6-4)T. En este ADN, existe una unión química entre el carbono 6 y el carbono 4 de la dos bases dT(6-4)T resultando en una estructura de un dinucleótido cíclico. La estructura de este Fab es interesante ya que provee la oportunidad de poner a prueba la hipótesis de D-ARM ya que 64M-2 no une ADNsc. En este caso no se utilizaría el D-ARM y las uniones de hidrógeno importantes estarían formadas por la histidina H35, la arginina H95 y la serina H96.¹²⁰

La afinidad medida para de ED-10 por site 35-6B fue de $K_D = 0.27$ nM, mientras que la determinada para DNA-1:d(T)₅ que fue $K_D = 2.7$ μM ¹⁶³ y la de BV04-01:d(T)₃ que fue $K_D = 1.25$ μM ⁸⁴ (Tabla V). Esta diferencia de entre 80.000 y 40.000 veces respectivamente, muestra como en el AcMo ED-10, seleccionado luego de la inmunización con un complejo proteína:ADN, ocurrió un proceso natural de maduración de afinidad¹⁸⁰. Existiendo una diferencia en la energía libre de unión de 6.7 kcal·mol⁻¹ y 5.1 kcal·mol⁻¹ respectivamente, con respecto al complejo DNA1:d(T)₅ y BV04-01:d(T)₃ donde no se conoce el inmunógeno que les dio origen. Es difícil reconciliar tan grandes diferencias de afinidad de acuerdo a los resultados estructurales y a que los complejos ocultan áreas de superficie similares luego de la unión (385 Å² / 306 Å²) para ED-10 y 402 Å² / 404 Å² para DNA-1 y (338 Å² / 310 Å²) para BV04-01 y cada uno forma cuatro uniones hidrógeno con el ADN. Más aún, el complejo DNA-1 mostró una superficie más complementaria con el ADN, de acuerdo al valor $Sc = 0,82$ comparado con un valor de $Sc = 0,73$ para el complejo ED-10 y BV04-01 (Tabla V). Sin embargo, como se verá más adelante en este trabajo lo definitorio termina siendo la naturaleza y fuerza de las interacciones formadas.

Tabla V. Comparación de parámetros termodinámico-estructurales entre los distintos Fabs cristalizados

| Fab | K_D^a (nM) | ΔG (kcal·mol ⁻¹) | ΔASA (Å ²) Fab/ADN | ^b Sc |
|---------|--------------|--------------------------------------|--|-----------------|
| ED-10 | 0.27 ± 0.03 | -13.0 ± 0.3 | 385/306 | 0.73 |
| DNA-1 | 2700 ± | -7.6 ± 0.0 | 402/404 | 0.82 |
| BV04-01 | 1270 ± | -8.0 ± 0.0 | 338/310 | 0.73 |

^a $\Delta G = -RT \ln K$; ^b índice estadístico de correlación de forma (Lawrence et al, 1993).

Los experimentos de fluorescencia en el equilibrio demostraron que la afinidad de ED-10 por la secuencia de ADN le dio origen se mantuvo igual amén de la longitud del ADN, siempre y cuando 5'-TC esté presente. Por el contrario, La afinidad de DNA-1 aumentó para arreglos más largos de politimidina ($K_D = 0,45 \mu\text{M}$ d(T)₁₀ y $K_D = 0.14 \mu\text{M}$ d(T)₁₅)¹⁶³ igual que para BV04-01 ($K_D = 0,13 \mu\text{M}$ para d(T)₈).⁸⁴ Por lo tanto, resultaría interesante determinar si los oligonucleótidos de politimidina más largos forman interacciones adicionales con los CDRs o si la estructura secundaria o terciaria de estos oligonucleótidos interfieren la unión. ED-10 fue capaz de unir oligonucleótidos d(T) con una constante de afinidad apenas menor que las calculadas para DNA-1 y BV04-01 con su ligando de longitud óptima ($K_D = 0,05 \mu\text{M}$ d(T)₅). En forma opuesta a estos últimos AcMos, el aumento del largo del ADN hasta 15 bases no produjo ningún cambio en la afinidad de ED-10 ($K_D = 0,05 \mu\text{M}$ d(T)₁₅). Sin embargo, ED-10 une la base timidina con una afinidad 20 veces mayor al polímero de timidinas, indicando que la segunda timidina es la responsable de esta disminución en la afinidad, probablemente por un impedimento estérico. Tomados en su conjunto, estos resultados apoyan la hipótesis en la cual el sitio de combinación de ED-10 al haber madurado con un complejo proteína:ADN presenta una regulación muy fina. Donde modificaciones en la secuencia inmunógena afectan la afinidad, pero esta última no se ve afectada si la secuencia correcta está presente. A partir de lo expuesto arriba, surge que de la mera inspección de la estructuras no pueden anticiparse las diferencias en la energía de las distintas uniones que forman la interfaz de unión, y por lo tanto, las mediciones termodinámicas proveen siempre la respuesta final.

Como se mencionó más arriba, existen numerosas revisiones acerca de los cambios conformacionales producidos en los fragmentos Fab luego de la unión del Ag. Estos pueden implicar: movimientos de cadenas laterales, movimientos de las regiones CDR como un cuerpo rígido, hasta una reestructuración total de los mismos. Mientras que el CDR H3 es, generalmente, el involucrado en estos cambios conformacionales debido a su naturaleza variable,^{181; 182} los otros CDR están frecuentemente involucrados. Las regiones VL y VH pueden desplazarse con respecto una de la otra para formar un sitio de combinación más adecuado para la unión del Ag. Los movimientos registrados en los CDRs de ED-10 luego de la unión del ADN fueron del tipo concertado. Las regiones CDR

L1 y H3 mantuvieron la conformación total, moviéndose como cuerpos rígidos alejándose del sitio de combinación permitiendo el ingreso del ADN (Figura 23) .

Como complemento de los experimentos cristalográficos, los cambios de conformación asociados a la unión del ADN fueron observados también por métodos espectroscópicos en solución. Tanto las regiones lejanas como cercanas del espectro de UV-CD estuvieron dominadas por las contribuciones aromáticas de las cadenas laterales de los aminoácidos. El gran cambio observado en el espectro UV-cercano es indicativo del apilamiento de las bases de dTdT entre las cadenas aromáticas en excelente acuerdo con los datos cristalográficos. Cabe resaltar que el apilamiento de las bases entre las cadenas laterales aromáticas mostró un cambio en la elipticidad tan grande o más al observado en el apilamiento de bases en ácidos nucleicos.

Estas observaciones sugieren que la unión entre ED-10 y el ADN presenta un mecanismo de unión complejo, en el cual los movimientos en la proteína juegan un papel importante. El ajuste inducido “*induced fit*” es uno de los mecanismos más comúnmente discutidos que involucran el movimiento de Ac. El ajuste inducido para anticuerpos fue sugerido por primera vez por estructuras de dímeros Bence-Jones^{183; 184} y luego descrito en detalle para un AcMo generado con péptidos de la hemaglutinina del virus de la influenza (Fab 17/9)¹⁸⁵¹⁸⁶. En el escenario más simple, el Ac libre adopta una conformación y la unión del Ag causa cambios estructurales en el Ac o el ligando que llevan a una geometría de unión mejorada. El grupo de Edmunson ha provisto evidencia estructural del ajuste inducido en BV04-01 así como el de Tanner para DNA-1. Por lo que podríamos explicar la inusual afinidad de ED-10 por el ADN dTdT por un mecanismo de ajuste inducido que permitió un extenso y robusto apilamiento de ambas bases del ADN entre cadenas laterales aromáticas, maximizando el número de contactos y enterrando al oligonucleótido en un bolsillo profundo en el centro del sitio de combinación, que fue formado precisamente como consecuencia del evento de unión y asociado al cambio conformacional.

Otra hipótesis que podría plantearse, es la de la existencia de un equilibrio preexistente entre distintos isómeros estructurales. El Ac libre se encontraría en distintas conformaciones, las cuales estarían en equilibrio en la solución. En ese caso la conformación observada en el cristal del complejo sería la estabilizada con la unión del

ADN generando un complejo de muy alta afinidad. Si el mecanismo de reconocimiento del ADN por ED-10 es un caso de ajuste inducido extremo o de un equilibrio preexistente no puede ser resuelto solamente a partir de los datos cristalográficos. Para dilucidar el mecanismo de reconocimiento será necesario realizar estudios cinéticos detallados.

En resumen, se determinaron las contribuciones energéticas de las bases y la estructura del complejo ED-10:ADN, el cual presentó un sitio de combinación similar a otros Acs naturales autoinmunes aislados. El principal determinante para la afinidad de unión para el AcMo ED-10 se localizó en las primeras dos bases 5'-TC de la hebra B del ADN utilizado como inmunógeno indicando que la afinidad de ED-10 por el ADN se mantuvo constante independientemente de la longitud del oligonucleótido.

Capítulo II

Estudios Calorimétricos de la interacción entre ED-10 y el ADN

Conceptos termodinámicos

Entre los distintos parámetros termodinámicos la Energía libre de Gibbs (ΔG) es el que realmente determina la dirección en la cual el proceso sucede (en este caso la formación del complejo proteína:ADN). La ecuación [17] muestra el cambio de energía libre, para un proceso a presión constante, donde ΔH y ΔS representan el cambio de entalpía y en la entropía, respectivamente, luego de la formación del complejo. En el nivel molecular, esto refleja la oposición de dos efectos fundamentales, la tendencia a caer en un nivel energético menor mediante la formación ó ruptura de enlaces de diversa naturaleza física (hidrofóbicas, de van der Waals y electrostáticas, ΔH negativo) opuesto por la tendencia igualmente natural al desorden ó caos en los sistemas (ruptura de interacciones, ganancia de grados de libertad, ΔS positivo). Estos parámetros son fundamentales para el análisis integral de un fenómeno o reacción química. Para determinarlos, en nuestro sistema, se utilizó la técnica de Titulación Calorimétrica Isotérmica (ITC, *isothermal titration calorimetry*). Con este método se midió directamente el cambio de entalpía (ΔH), constante de afinidad K_A , valor recíproco de la K_D usada anteriormente,¹⁵⁷ y la estequiometría de reacción. Luego a partir de estos valores, utilizando distintas relaciones termodinámicas (ver materiales y métodos) se calculó la componente entrópica de la interacción. Otro método comúnmente utilizado para estimar el valor de la entalpía una interacción es a través de la ecuación de van't Hoff. De esta manera, ésta puede obtenerse indirectamente midiendo la dependencia de la constante de disociación con respecto a la temperatura, por ejemplo mediante experimentos espectroscópicos. Por lo tanto, este valor representa la entalpía íntimamente asociada al evento de unión que causa el cambio de señal. En el caso de ED-10 la disminución en la fluorescencia intrínseca de un triptofano luego de la formación del complejo. Si bien este cálculo es ampliamente utilizado, los valores de entalpía calculados por este método y por calorimetría no siempre coinciden (ver discusión)

Por último el cambio de capacidad calorífica a presión constante (ΔC_p) en sistemas biomoleculares resulta de medir el cambio de entalpía en función de la temperatura, por lo que también pudo ser determinada por esta técnica. Generalmente, los cambios de ΔC_p están relacionados al ocultamiento de superficie del solvente luego de formada la interfaz molecular (como se lo ha utilizado en plegamiento de proteínas)¹⁸⁷. Sin embargo se cree

que, si bien es la de mayor peso, esta no es la única fuente de ΔC_p (ver discusión). Las interacciones proteína-ADN específicas se caracterizan por presentar un cambio negativo en la capacidad calorífica luego de la unión, el cual proviene del ocultamiento de las bases del ADN y la superficie protéica complementaria, mientras que las no específicas generalmente se asocian con ΔC_p mínimos o cercanos a cero.^{5; 9; 10; 13}

Obtención de los parámetros termodinámicos de la interacción ED-10-ADN

Como se mencionó en el capítulo anterior el AcMo ED-10 reconoce el ADN utilizando el motivo “D-ARM” al igual que los AcMos DNA-1 y BV04-01¹²⁰. Sin embargo la afinidad por el ADN presente en el cristal, medida por técnicas espectroscópicas, es entre 80.000 y 40.000 veces mayor, a la obtenida para estos dos últimos. Por un lado a partir de los datos cristalográficos, se pudo obtener información acerca de la “arquitectura” y los residuos de contacto del sitio de combinación de ED-10. No obstante, ésta técnica no permitió explicar las diferencias de afinidad por el ADN entre ED-10 y los distintos AcMos cristalizados. La termodinámica entonces aporta respuestas a estas preguntas y genera nuevas perspectivas para comprender los orígenes de la especificidad y la estabilidad resultando en un complemento fundamental para los datos estructurales.

En base a lo expuesto, se realizó una comparación de las propiedades termodinámicas de la unión a ED-10 site 35-6B (posee la secuencia 5' de la cadena B de oligonucleótido inmunógeno), así como al oligonucleótido d(T)₅ (sustrato de los AcMos anti-ADN cristalizados que comparten el D-ARM^{163; 172}). Al primero lo llamaremos ADN inmunógeno (ADNi) y al otro politimidina d(T)_n. En el primer experimento de calorimetría se tituló una solución conteniendo el Fab de ED-10 con el ADNi (Figura 25), esto produjo un cambio en la entalpía de $-26,0 \pm 0,1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Tabla VI). Los datos experimentales crudos indicaron una interacción fuerte y saturada (Figura 25, inserto). Estos fueron ajustados a una ecuación estándar de unión mostrando una estequiometría de aproximadamente 1:1. El valor de n obtenido en el ajuste fue de $n \approx 0,7$; esto podría reflejar un error en el cálculo de la concentración, o bien la presencia de proteína la cual fue incapaz de unir ADN (algo similar se observó en los ensayos de unión al equilibrio).

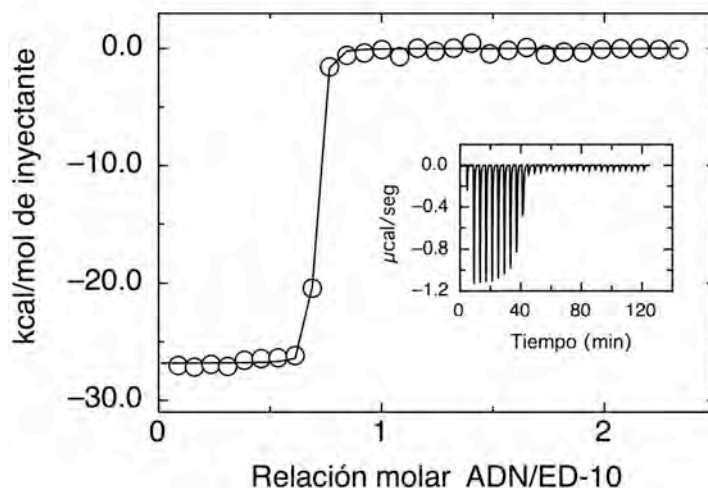


Figura 25. Titulación Calorimétrica del Fab ED-10 con el oligonucleótido de ADN site 35-6B. Una solución conteniendo $8 \mu\text{M}$ se tituló con una solución de site 35-6B $80 \mu\text{M}$ a 298 K en TBS con $1 \text{ mM EDTA pH } 7,0$. Los datos se analizaron con el programa ORIGIN para obtener los valores de ΔH , K_A , n . El valor de K_A obtenido no es confiable bajo estas condiciones experimentales. En el inserto se muestran los datos crudos de calorimetría.

Sin embargo esta discrepancia tuvo un efecto muy pequeño en el valor de ΔH ajustado y suele suceder en interacciones muy afines seguidas por este método, habiendo sido ya reportadas en particular para Acs^{188} . Lamentablemente, debido a la falta de puntos en la región de equivalencia los datos no pueden ser ajustados para calcular la K_A . En los experimento de ITC la naturaleza abrupta de la transición de los datos es proporcional a la K_A multiplicada por la concentración de sitios de unión disponible, esta relación se denomina valor c^{189} (ver materiales y métodos). A medida que el valor c se hace más grande, la pendiente de la transición se torna más empinada, haciendo imposible el ajuste para determinar la constante.

Ante la imposibilidad de obtener el valor de ΔG a partir de la K_D obtenida por calorimetría, para el cálculo de la entropía se suele utilizar el valor obtenido en las mediciones al equilibrio por fluorescencia. De esta manera utilizando el valor obtenido anteriormente, $\Delta G = -13,0 \pm 0,2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ y utilizando la ecuación [17] se despejó el valor de $T\Delta S = -13,0 \pm 0,3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Tabla VI). Indicando que la formación del complejo ED-10:ADNi está dirigida entálpicamente y opuesta por la entropía.

Cuando se realizó el mismo experimento para el d(T)₅ (Figura 26), se observó un cambio de entalpía de $-16.0 \pm 0.3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, $10 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ menor que el valor obtenido para el ADN_i (Tabla VI). Esta diferencia en el ΔH entre ambas interacciones indicó menos cantidad de interacciones y/o que las formadas fueron más débiles. Luego, los datos obtenidos fueron ajustados a la misma ecuación anterior y se determinó la constante de afinidad $K_A = (1.1 \pm 0.2)\cdot 10^7 \text{ M}^{-1}$ y su valor recíproco $K_D = 90 \pm 10 \text{ nM}$. Este valor se encontró en excelente acuerdo con el valor calculado por mediciones al equilibrio $K_D = 49 \pm 5 \text{ nM}$. La magnitud de la entropía pudo ser calculada entonces directamente de los datos calorimétricos, $T\Delta S = -6.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ (Tabla VI), mostrando que la unión del d(T)₅ al igual que el caso anterior se encontró dirigida entálpicamente y opuesta por la entropía. Para este caso, se calculó también el valor de $T\Delta S$ en forma similar a lo hecho en el caso anterior. El valor obtenido para $T\Delta S = -6.0 \pm 0.4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$, coincidió con el obtenido por ITC (Tabla VI) validando de alguna manera el cálculo hecho en el primer caso.

Tabla VI. Parámetros termodinámicos de la interacción de Fab ED-10 con site 35-6B y d(T)₅

| | ADN | site 35-6B | dT5 |
|---|----------------|-------------|-----|
| ^a ΔH (kcal·mol ⁻¹) | -26.0 ± 0.3 | -16.0 ± 0.1 | |
| ^{ab} $K_D^{(ITC)}$ (nM) | - | 90 ± 16 | |
| ^a n | 0.72 ± 0.02 | 0.73 ± 0.05 | |
| ^a $T\Delta S^{(ITC)}$ (kcal·mol ⁻¹) | - | -6.6 | |
| ^c $K_D^{(calc)}$ (nM) | 0.27 ± 0.03 | 49 ± 5 | |
| ^d $T\Delta S^{(calc)}$ (kcal·mol ⁻¹) | -13.0 ± 0.3 | -6.0 ± 0.4 | |
| ^a ΔCp (kcal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹) | -0,163 ± 0,008 | - | |

^a Valor obtenido por ITC; ^b $K_D = 1/K_A$ obtenido de ITC; ^c Obtenido por ensayos de Fluorescencia en el equilibrio; ^d $T\Delta S = R \cdot T \cdot \ln(K_D^{(calc)}) - \Delta H$

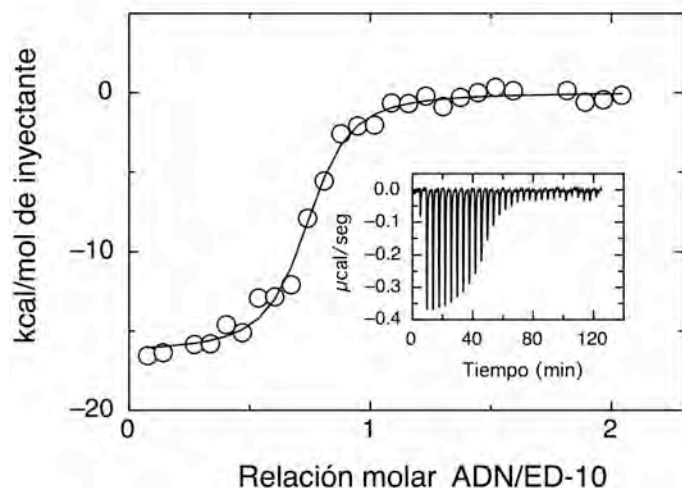


Figura 26. Titulación Calorimétrica del Fab ED-10 con el oligonucleótido de ADN d(T)₅. Una solución conteniendo 8 μM se tituló con una solución de d(T)₅ 80 μM a 298 K en TBS con 1 mM EDTA pH 7,0. Los datos se analizaron con el programa ORIGIN para obtener los valores de ΔH , K_A , n . En el inserto se muestran los datos crudos de calorimetría.

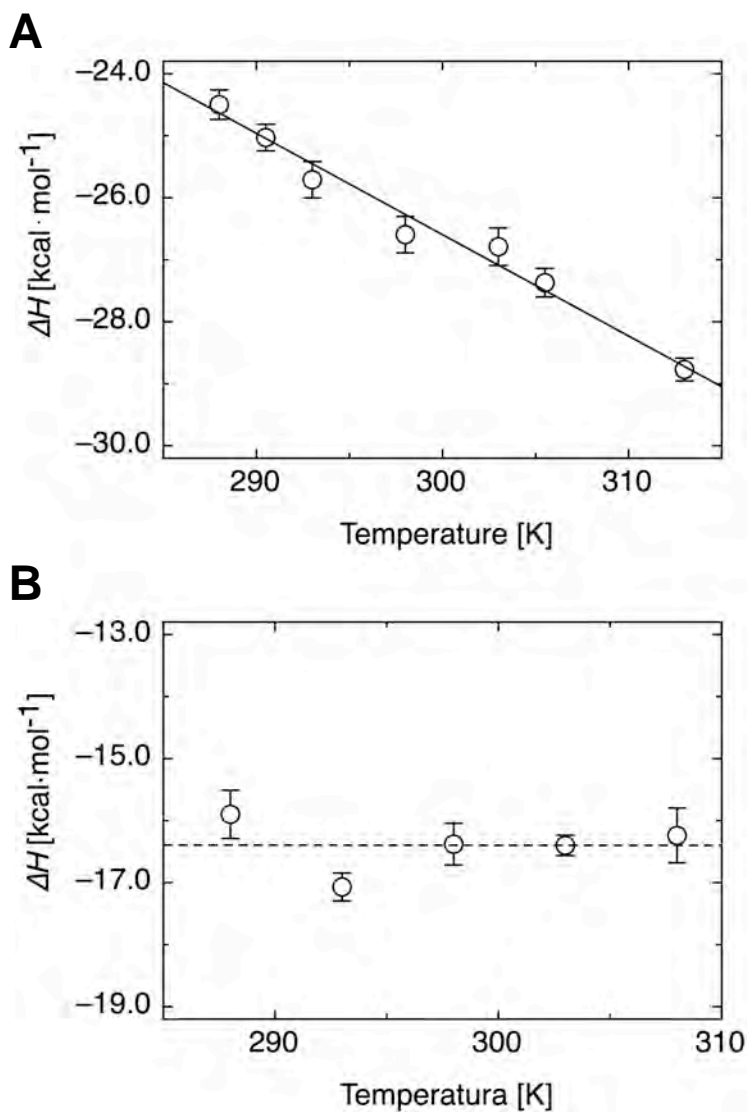


Figura 27. Entalpía de unión en función de la temperatura, cálculo del ΔC_p . (A) Unión del Fab ED-10 con el site 35-6B. (B) con el d(T)₅. Las líneas representan el ajuste de los datos a una recta utilizando el método de cuadrados mínimos. De la pendiente de las rectas se extrajo el valor de ΔC_p .

Como se mencionó anteriormente el cálculo de ΔC_p es de gran interés en las interacciones proteína-ADN ya que permite realizar inferencias importantes en relación al área de superficie que se oculta luego de la interacción. Por lo tanto, se realizaron experimentos de ITC a distintas temperaturas y se graficó ΔH en función de la temperatura (Figura 27). Los datos de este gráfico fueron ajustados a la ecuación de una recta por el método de cuadrados mínimos y de la pendiente se obtuvo el valor de ΔC_p . La unión del ADN_i a ED-10 presentó un cambio de capacidad calorífica negativa $\Delta C_p = -0,163 \pm 0,008$ (Figura 27 A), típicamente reportado en interacciones proteína-ADN.

El grupo de Record utilizó la información obtenida a partir de la transferencia de pequeñas moléculas del estado líquido a soluciones acuosas y el plegamiento de proteínas para obtener una relación empírica entre el ΔC_p y el ocultamiento de superficies al solvente¹⁹⁰; ¹⁹¹. Esta relación fue luego aplicada, por el mismo grupo, a interacciones entre proteínas y ADN⁸. Una expresión alternativa de esta relación empírica, es la obtenida por Freire y colaboradores a partir de información experimental de cambios de ΔC_p y estructuras cristalográficas de proteínas y complejos de proteínas quedando expresada en la ecuación [27].¹⁹²

$$\Delta C_p = (0,45 \pm 0,02) \cdot (\Delta A_{np}) - (0,26 \pm 0,03) \cdot (\Delta A_p) \cdot \text{cal} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1} \quad [27]$$

Donde ΔA_{np} corresponde a el área de superficie no polar oculta y ΔA_p al área de superficie polar. Se aplicó esta ecuación a los datos obtenidos del cristal de complejo ED-10:ADN, teniendo en cuenta las superficies polares y no polares tanto en el Ac como en el ADN. El valor de ΔC_p obtenido según la fórmula fue de $\Delta C_p = -0,115 \pm 0,05$ (Tabla VI) en concordancia con el obtenido por ITC. En forma contraria la unión de d(T)₅ no mostró un cambio de la entalpía en el rango de temperatura medido por lo que se estimó un $\Delta C_p \approx 0$ (Tabla VI, Figura 27 B). Este resultado sugirió que en este caso, si bien hay unión, quedaría solvente en la interfaz.

La Ecuación de van't Hoff relaciona la variación de la constante de disociación al equilibrio K_D con la entalpía (ΔH) de la interacción. De esta manera, es posible determinar las contribuciones entálpicas y entrópicas de la interacción estudiada. Se midió la constante al equilibrio para la unión de ED-10 a d(T)₅ a distintas temperaturas y se graficó $\ln(K_D)$ en función de $1/T$ (ver van't Hoff, materiales y métodos). De acuerdo a lo determinado en

calorimetría para esta interacción, se consideró un ΔC_p nulo por lo tanto los datos obtenidos se ajustaron a un modelo lineal obteniéndose como pendiente $\Delta H/R$ y como ordenada al origen $\Delta S/R$ (Figura 28).

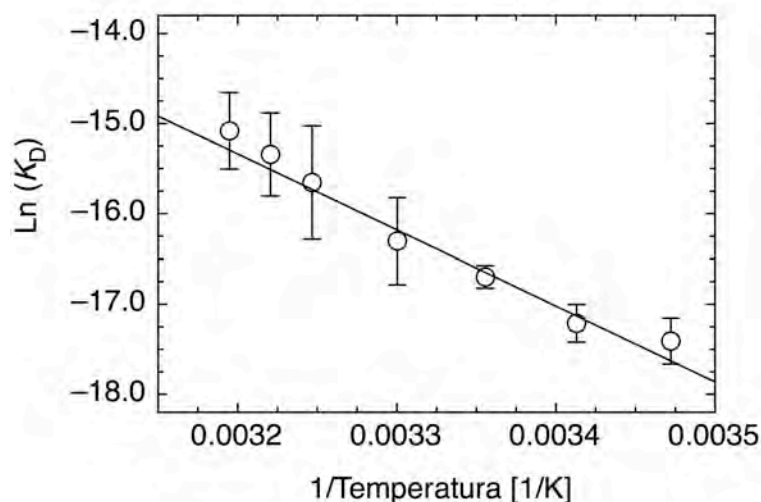


Figura 28. Gráfico de van't Hoff para la unión de Fab ED-10 a $d(T)_5$. Los datos fueron medidos en TBS pH 7,0 y analizados suponiendo que no existe un cambio en la capacidad calorífica ($\Delta C_p = 0$).

La pendiente de la recta fue $-8500 \pm 1000 \text{ K}^{-1}$, se multiplicó por el valor de R en calorías obteniéndose un valor de $\Delta H \approx -17 \pm 2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Este valor coincide con el ΔH obtenido por ITC para la interacción ($-16 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). Este tipo de concordancia es generalmente asociada a reacciones de dos estados. El valor de entropía obtenido por este método $T\Delta S = 6.8 \pm 2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ también coincidió sorprendentemente con el obtenido por ITC ($-6.6 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$).

Estudios termodinámicos en función a la Fuerza iónica

Se estudió el comportamiento de la interacción del Fab con el ADN_i y $d(T)_5$ con respecto al cambio de fuerza iónica. Se determinó la K_D para ambos siguiendo el cambio de la fluorescencia intrínseca de los triptofanos, mediante la misma metodología que en el capítulo I. La concentración de NaCl se varió entre 25 mM y 1 M. Sólo se observaron cambios despreciables en la afinidad con respecto a la fuerza iónica tanto para el ADN_i

como para el d(T)₅ (Figura 29), indicando la ausencia de una componente electrostática, generalmente reportada en interacciones proteína-ADN.

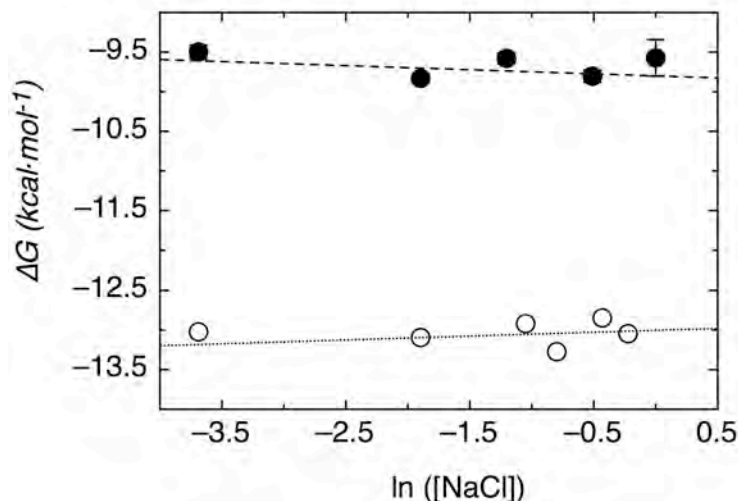


Figura 29. Dependencia de la afinidad en función de la fuerza iónica. Los datos para site 35-6B (○) y d(T)₅ (●) se obtuvieron midiendo la constante de afinidad al equilibrio por fluorescencia, con Fab ED-10 en TBS pH 7,0. La concentración de NaCl se varió entre 0.025 -1 M.

Se decidió profundizar este análisis, y determinar que sucedía con los componentes de la energía libre de Gibbs, la entropía y la entalpía, en función de este cambio. Para esto se realizaron estudios calorimétricos variando la concentración de NaCl y se determinó el cambio de entalpía y entropía luego de la formación del complejo (Figura 30). Para el ADN_i no se observó un cambio significativo ni en el ΔH ni en el $T\Delta S$ con el cambio de la fuerza iónica. No obstante, los valores obtenidos en para ΔH los distintos experimentos de ITC presentaron leve tendencia a ser menos favorables con el aumento de la fuerza iónica. Pese a esto, la dispersión de los datos no permitió realizar un ajuste lineal correcto. De manera similar, para la interacción con el d(T)₅ se observó un aumento gradual de la componente entálpica (menos favorable) de la reacción con el aumento de la fuerza iónica. Ésta fue compensada por un cambio favorable de entropía. Estos resultados analizados en conjunto confirman que la interacción de ED-10 con el ADN presentó una componente electrostática casi nula. Donde las pequeñas variaciones observadas en la entalpía y la entropía pudieron deberse tanto a efectos iónicos como a efectos de soluto a

concentraciones altas de NaCl, esto deberá ser confirmado realizando experimentos adicionales.

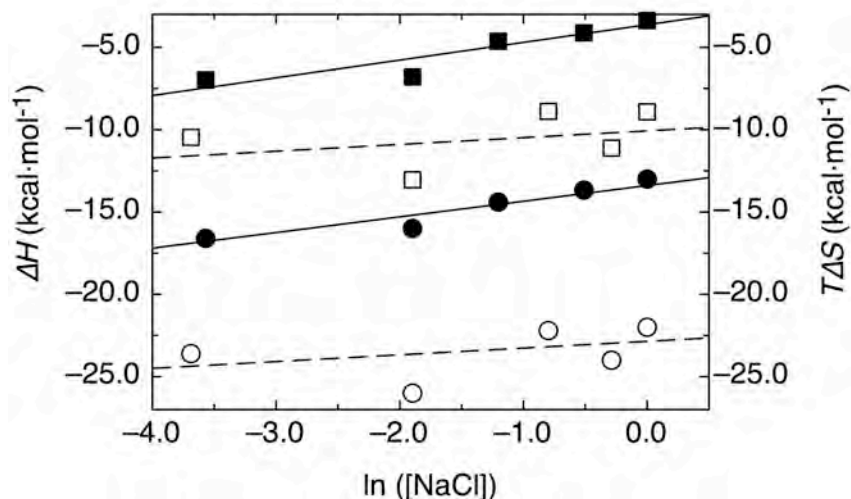


Figura 30. Dependencia de la entalpía y la entropía en función de la fuerza iónica. Los valores la entalpía de la unión del site 35-6B (○) y el d(T)₅ (●) a ED-10 se obtuvieron mediante ITC. Los valores la entropía de unión del site 35-6B (□) y el d(T)₅ (■) se obtuvieron mediante las ecuaciones [4] y [25] utilizando la constante de afinidad calculada en el equilibrio por fluorescencia y la entalpía obtenida por ITC. Todas las mediciones se realizaron en TBS pH 7,0 variando la concentración de NaCl entre 0.025-1 M.

Estudios termodinámicos en función de la longitud del oligonucleótido

En el capítulo anterior se determinó que la afinidad de ED-10 por el ADN no se modificaba siempre y cuando la secuencia 5'-TC estuviera presente independientemente de la longitud del oligonucleótido. Para este tipo de interacciones se obtuvo un valor de ΔG de que rondaba las $-13 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ para todos los casos estudiados. Para interacciones proteína:ADN se ha observado que para distintos tipos de complejos específicos, el ΔG de formación varía en un rango pequeño, sin embargo las componentes del mismo ΔH y $T\Delta S$ presentan variaciones mucho más amplias⁵. Es decir que existe una compensación entre la entropía y la entalpía del sistema para mantener invariable la energía de unión. Por lo tanto se decidió estudiar si existían este tipo de diferencias en la interacción de ED-10 con los oligonucleótidos de distinta longitud. Para mantener la nomenclatura utilizada en este capítulo se denominó ADN_i a todos aquellos que llevaron las bases TC en su extremo 5'.

Se realizaron titulaciones calorimétricas con ADN cadena simple de 2 a 18 bases de largo (site 35-2B a site 35-18B, ver materiales y métodos) usando los mismos oligonucleótidos que en el capítulo anterior. Sorprendentemente, se observó un cambio lineal en la entalpía de unión a medida que se aumentaba el número de bases de ADN (Figura 31, Tabla VII). Con este aumento, el componente entálpico se hizo menos negativo, vale decir, menos favorable en términos de la interacción.

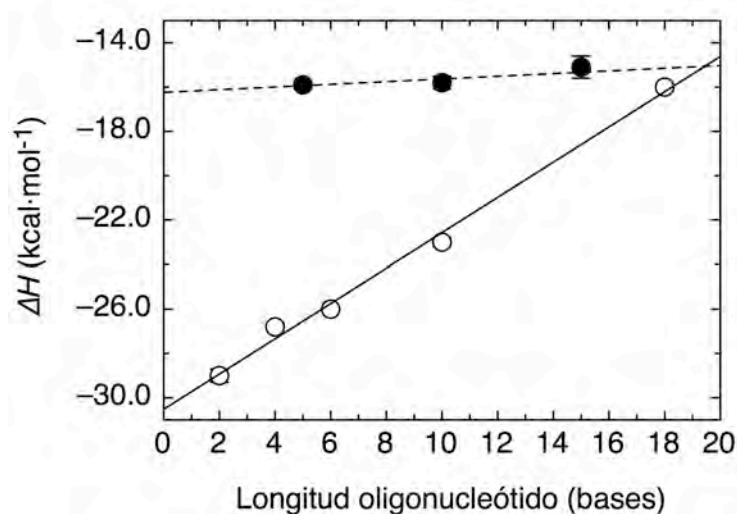


Figura 31. Dependencia de la entalpía en función de la longitud del oligonucleótido. Los valores de la entalpía de la unión de los distintos oligonucleótidos a ED-10 se obtuvieron mediante ITC. En el gráfico se muestran dos series, aquellos que poseen en su extremo 5'dTC(○) y los poli(dT) (●).

Sin embargo, en el rango de longitudes estudiado, todas las reacciones fueron dirigidas entálpicamente. Como se demostró en el capítulo anterior el ΔG no varió en función de la longitud, por lo tanto usando la ecuación [17] se calculó el valor de $T\Delta S$. Este valor si bien continuó siendo opuesto al desarrollo de la reacción se hizo más pequeño en módulo, es decir se oponía menos (Tabla VII). Estos resultados indicaron una compensación entálpico-entrópica isotérmica en la unión del ADN_i de distinta longitud a ED-10 reflejada en un ΔG invariable.

Tabla VII. Parámetros termodinámicos de la interacción de Fab ED-10 con oligonucleótidos de ADN de distinta longitud y composición

| ADN | ΔG^a (kcal·mol ⁻¹) | ΔH^b (kcal·mol ⁻¹) | T ΔS^c (kcal·mol ⁻¹) |
|--------------|--|--|--|
| site 35-18 B | -12.8 ± 0.3 | -16.0 ± 0.2 | -3.2 ± 0.5 |
| site 35-10 B | -13.2 ± 0.2 | -23.0 ± 0.2 | -9.8 ± 0.4 |
| site 35-6 B | -13.0 ± 0.3 | -26.0 ± 0.1 | -13.0 ± 0.4 |
| site 35-4 B | -13.5 ± 0.2 | -26.8 ± 0.2 | -13.3 ± 0.4 |
| site 35-2 B | -12.9 ± 0.2 | -29.0 ± 0.3 | -16.1 ± 0.5 |
| dT15 | -10.0 ± 0.3 | -15.1 ± 0.5 | -5.1 ± 0.8 |
| dT10 | -10.0 ± 0.3 | -15.8 ± 0.3 | -5.8 ± 0.6 |
| dT5 | -10.0 ± 0.3 | -15.9 ± 0.2 | -5.9 ± 0.5 |

^a $\Delta G = R \cdot T \cdot \ln K_D$; ^b Valor obtenido por ITC; ^c $T\Delta S = \Delta G - \Delta H$

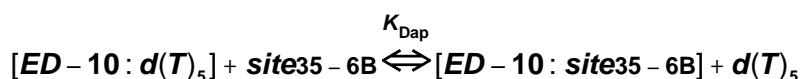
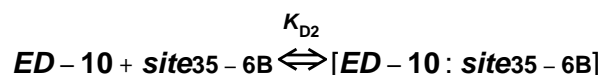
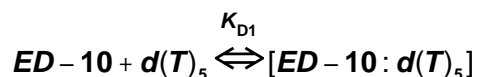
En la sección anterior se demostró también que ED-10 reconoció a d(T)₅. Incluso, fue capaz de reconocer arreglos de politimidina cadena simple de hasta 15 bases manteniendo la misma afinidad, es decir con el mismo ΔG . Por lo tanto se investigó que sucedía con las componentes de la energía libre en el caso de la unión con este tipo de ADN. Se observó que para arreglos de entre 5 y 15 bases no existió un cambio significativo o una tendencia en cuanto al valor de ΔH en función de la longitud de los oligonucleótidos (Figura 31). Por lo tanto como el ΔG tampoco varió, de la ecuación 1 se desprende que el T ΔS también se mantuvo constante (Tabla VII). Aportando una diferencia más entre la interacción de ED-10 con el ADN_i y el d(T)₅.

Titulación calorimétrica de desplazamiento

Como se mencionó anteriormente, es una limitación de la calorimetría determinar el valor de la K_D cuando la afinidad entre los reactantes estudiados es muy alta (ver materiales y métodos). La alta afinidad de la interacción entre ED-10 y site 35-6B, provocó una titulación de naturaleza abrupta sin puntos en la transición. Por lo que, no fue posible medir los cambios de calor tras la formación del complejo en esas condiciones. Una forma de solucionar este fenómeno es plantear múltiples equilibrios y determinar una constante de

disociación aparente (K_{Dap}) para el ligando más afín en presencia del ligando que es reconocida más débilmente. A esto se lo denomina titulación calorimétrica de desplazamiento^{193; 194}.

Para determinar entonces la constante de afinidad de ED-10, por el site 35-6B por este método se plantearon los siguientes equilibrios.



Se incubó ED-10 con un exceso de $d(T)_5$ de manera de saturar todos los sitios de unión con este ligando, es decir que todo el ED-10 se encuentre formando complejo con el $d(T)_5$. Luego se realizó un experimento de ITC en el cual se tituló este complejo inyectando site 35-6B (Figura 32).

Se observó un cambio de entalpía de aproximadamente $-7,0 \pm 0,4 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Por lo tanto si no mediara otro proceso este valor debería ser igual a la diferencia de las entalpías para el site 35-6B con la del $d(T)_5$, es decir la diferencia de entalpía entre la disociación del complejo ED-10: $d(T)_5$ y la formación del complejo ED-10:site 35-6B. El valor obtenido para la diferencia entre los ΔH determinados para el $d(T)_5$ y site 35-6B en experimentos separados (este último con el signo invertido, ya que corresponde a la disociación del complejo) fue de $\Delta H = -10,6 \pm 0,3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$. Si bien los valores de entalpía calculados por ambos métodos no coincidieron exactamente, estos son muy similares considerando el abordaje. Por lo tanto la K_{Dap} obtenida (en el ajuste correspondió a de la unión de ADNi a ED-10 en presencia de $d(T)_5$ $K_{Dap} = 66 \pm 9 \text{ nM}$. Como K_{D2} es significativamente más grande que K_{D1} (ver arriba), entonces podemos plantear que, K_{Dap} esta relacionada con K_{D2} según la siguiente ecuación.

$$K_{D2} = \frac{K_{Dap}}{\left(1 + \frac{[d(T)_5]}{K_{D1}}\right)} \quad [28]$$

Utilizando esta fórmula se obtuvo un valor para $K_{D2} = 0,14 \pm 0,4$ nM en total concordancia con el obtenido a través de las mediciones en el equilibrio realizadas espectroscópicamente, confirmando una vez más este valor de K_D para el site 35-6B.

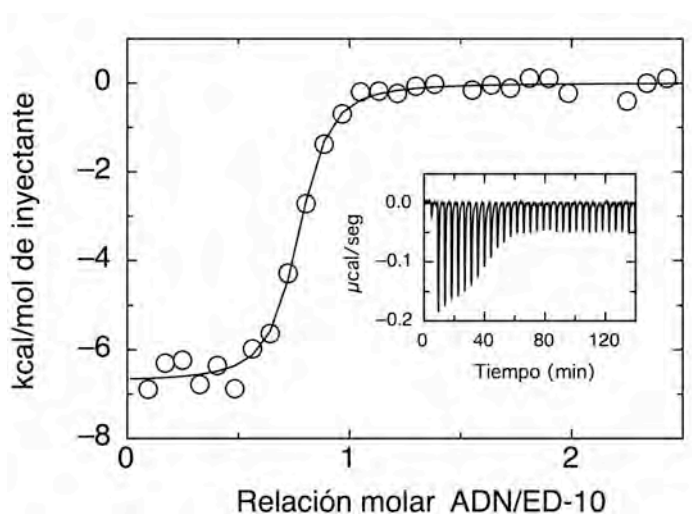


Figura 32. Titulación Calorimétrica de desplazamiento del complejo Fab ED-10:d(T)₅ con el oligonucleótido de ADN site 35-6B. Una solución conteniendo 8 μ M de Fab ED-10 y 40 μ M d(T)₅ se tituló con una solución de site 35-6B 80 μ M a 298 K en TBS con 1 mM EDTA pH 7,0. Los datos se analizaron con el programa ORIGIN para obtener los valores de ΔH_{ap} , K_{Aap} , n. En el inserto se muestran los datos crudos de calorimetría

Discusión II

En el capítulo anterior se determinó la estructura del complejo de ED-10:ADN y se definió la mínima secuencia necesaria para el reconocimiento del ADN_i con alta afinidad. Como se comentó allí, los datos estructurales obtenidos no permitieron explicar la diferencia en la afinidad de ED-10 con su ADN_i comparada con la de DNA-1 y BV04-01 (los otros AcMos anti-ADN cristalizados) por los oligonucleótidos de timidina. Remarcando que, la afinidad de unión no es simplemente una función de la complementariedad espacial, ni la suma de interacciones favorables entre moléculas consideradas como cuerpos rígidos. Sino que la unión de dos macromoléculas flexibles (como una proteína y el ADN) involucra una serie de cambios energéticos para pasar del estado libre al unido, en el complejo final. Estas transformaciones involucran procesos tanto nivel de la interfaz como internos de cada molécula, además de considerables contribuciones del solvente. Se planteó entonces el desarrollo más amplio de la termodinámica de este tipo de interacciones, como la fuente donde podrían encontrarse las bases de este tipo de diferencias. La ITC fue la metodología elegida por ser capaz de medir directamente el cambio de entalpía de la interacción.

Por este método se determinaron entonces, los parámetros termodinámicos de la interacción de ED-10 con el ADN. La unión de ED-10 a el oligonucleótido de 6 bases conteniendo la secuencia inmunógena fue dirigida entálpicamente y opuesta por el cambio de entropía y acompañada de un cambio negativo de ΔC_p ($\Delta H = -26 \pm 2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$; $T\Delta S = -11 \pm 2 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$; $\Delta C_p = -0,163 \pm 0,008 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). Típicamente el cambio negativo de entalpía esta asociado con la formación de interacciones favorables tanto electrostáticas como de van der Waals. En este sentido, el ADN formó cuatro uniones de hidrógeno con los residuos de los CDRs, L1, L3, H1 y H3 así como otras uniones hidrógeno con el agua (ver capítulo 1) y el apilamiento de bases entre los residuos de triptofano y tirosina produjo una gran cantidad de interacciones de van der Waals

De acuerdo a los datos cristalográficos, el apilamiento de las bases del ADN entre las cadenas laterales hidrofóbicas de los CDRs pareció ser la interacción predominante. Por lo tanto, la desolvatación de estas superficies hidrofóbicas podría aportar gran parte de la energía necesaria para la unión del ADN. Sin embargo, este es un proceso generalmente asociado a $T\Delta S > 0$ y $\Delta H > 0$ debido a la naturaleza altamente ordenada de las aguas fijas

circundantes (efecto “*hidrofóbico clásico*”)¹⁹⁵ de manera opuesta a lo observado para ED-10-ADNi en las mediciones calorimétricas realizadas. No obstante, los parámetros termodinámicos asociados con la liberación de agua son fuertemente influidos por el patrón de hidratación de la superficie.¹⁹⁶ Donde la desolvatación de moléculas grandes puede resultar en un cambio de entalpía negativo debido a que, las moléculas de agua en contacto con esta superficie experimentan menos uniones hidrógeno que las presentes en el solvente. Por lo tanto al volver a éste forman más uniones de hidrógeno aportando una entalpía negativa, a este fenómeno se lo denominó efecto “*hidrofóbico no clásico*”^{197; 198}.

Este fenómeno ha sido observado en distintos sistemas experimentales proteína-carbohidrato¹⁹⁹ proteína-ligando²⁰⁰ proteína-péptido.²⁰¹ En particular ha sido demostrado para el AcMo anti-ADN 11F8 aislado de ratones con predisposición a generar LES.⁸³ El AcMo 11F8 comparte varias características termodinámicas con ED-10 en cuanto a la unión al ADN, con la diferencia que en este caso el ADN utilizado no es el inmunógeno sino que ha sido obtenido artificialmente por la técnica de SELEX⁸⁵. En trabajos anteriores, 11F8 mostró una $K_D = 10$ nM por ADN seleccionado⁸⁵ y de $94 \mu\text{M}$ por d(T)₅⁸³ en forma similar a ED-10. Asimismo, para 11F8 se demostró también, que la reacción es entálpicamente dirigida con una entropía desfavorable y ΔC_p negativo ($\Delta H = -26,0 \pm 0,1$ kcal·mol⁻¹; $T\Delta S = -13 \pm 0,3$ kcal·mol⁻¹; $\Delta C_p = -0,3 \pm 0,1$ kcal·mol⁻¹)¹⁶⁵ resultados similares a los observados para ED-10. A partir de estudios de mutagénesis sitio específica en residuos aromáticos de 11F8 involucrados en la interacción con el ADN se demostró que estos contribuyeron con la entalpía asociada a la unión.¹⁶⁶ Más aún, titulaciones seguidas por fluorescencia de triptofano realizadas en solventes de distinta polaridad para las distintas mutantes demostraron que la entalpía negativa de la unión de 11F8 al ADN provenía del efecto hidrofóbico no clásico.¹⁶⁶ Si bien la estructura de 11F8 no ha sido determinada, se cree que utiliza el D-ARM como ED-10. En función de estas similitudes y teniendo en cuenta que, como se demostró en el capítulo anterior, la disminución de la polaridad de la solución disminuyó la afinidad de ED-10 por el ADN parece razonable inferir que el efecto hidrofóbico no clásico jugaría un papel importante en el reconocimiento del ADN por ED-10. Por lo tanto se asignó el origen de este efecto a la desolvatación de residuos aromáticos presentes en el sitio de combinación.

De manera similar, la interacción con el d(T)₅ también fue impulsada por la entalpía y opuesta por la entropía. Sin embargo la magnitud del cambio fue muy distinta ($\Delta H = -16,0 \pm 0,1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$; $T\Delta S = -6,6 \pm 0,3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$; $\Delta Cp \approx 0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). La entalpía fue casi 10 $\text{kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ menor a la del ADN_i y la entropía también desfavoreció la interacción pero en menor medida que en el ADN_i. Estos valores son similares a los obtenidos por Schuermann y colaboradores para el complejo DNA-1:d(T)₅ ($\Delta H = -16,8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$; $T\Delta S = -10,3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$; $\Delta Cp \approx 0 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$).^{112 123} Esto permitiría plantear que, si bien de acuerdo a las estructuras de complejos AcMo anti-ADN:ADN resueltas, las formas de interacción entre los Acs con el ADN parecerían estar regidas por el D-ARM, los componentes energéticos de estas interacciones cambian de acuerdo a la “especificidad” por el ADN. En el complejo ED-10:site 35-6B, (ADN inmunógeno) y 11F8:WT (ADN seleccionado por SELEX) se observó una componente entálpica de gran envergadura, una alta penalización entrópica y un ΔCp negativo. Mientras que en el complejo DNA-1:d(T)₅ y ED-10:d(T)₅ se observó una menor componente entálpica, menor penalización entrópica y un $\Delta Cp \approx 0$. Por lo tanto, así como el D-ARM es una característica estructural de las interacciones anti-ADNcs:ADNcs. Se podría proponer entonces que un cambio favorable en la entalpía y desfavorable en la entropía sería una característica termodinámica de la interacción antiADNcs:ADNcs. De manera que, cuando la interacción es con una secuencia de ADN “seleccionada” reconocida con alta afinidad, como en el caso del complejo ED-10:ADN_i (natural) y 11F8:WT (SELEX), se observa un ΔCp negativo, “firma termodinámica” de las interacciones específicas proteína-ADN.^{8; 13; 148} Por otro lado, cuando la interacción es con una secuencia no seleccionada ED-10:d(T)₅ y DNA-1:d(T)₅ se observa un ΔCp cercano a cero típico de interacciones proteína-ADN inespecíficas.^{9 5}

Existen numerosos trabajos que vinculan los cambios en el ΔCp con los cambios en la superficie (apolar y en menor medida polar) expuesta al solvente luego de la interacción.^{8; 192; 202; 203} La ecuación [27]¹⁹² establece una relación numérica empírica, a partir de la cual se calculó el valor de ΔCp para la interacción entre ED-10 y site 35-6B utilizando los datos de cristalografía. Este valor ($-0,115 \pm 0,05 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) es menor al obtenido a partir de las mediciones de ITC ($-0.163 \pm 0.008 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). Si bien los valores son similares, el valor obtenido utilizando los datos estructurales subestima el de ITC. Este tipo de discrepancia es habitualmente encontrada en interacciones proteína-ADN ya que el ΔCp en este tipo de

sistemas no es tan predecible como en plegamiento de proteínas.²⁰⁴ En muchos casos, tanto la proteína y como el ADN interactuantes no se comportan como cuerpos rígidos tras la unión. Como resultado de esto, efectos de plegamiento local (ocultando o exponiendo superficies al solvente) pueden influir este valor.⁸ En ED-10, más allá del reacomodamiento principalmente del CDRH3, no se observan grandes cambios conformacionales. Sin embargo, este movimiento podría ser una de las bases de esta discrepancia. Otra posible fuente de discrepancia podrían ser eventos de protonación o unión de iones,²⁶ pero esto parecería poco probable ya el cambio de la fuerza iónica y el pH demostraron no tener efecto en la unión entre ED-10 y el ADN (Capítulo 1). Una explicación alternativa, descrita recientemente, para justificar este tipo de diferencias es el papel que juega de la red de moléculas de agua en la interfaz. Al ser incorporadas a ésta, las moléculas de agua pueden sufrir una reducción en sus modos vibracionales “suaves” reduciendo su capacidad calorífica, con una posible disminución del ΔC_p de la formación del complejo.^{157; 205; 206} Esta última interpretación parecería viable para el caso del complejo ED-10:ADN donde, de acuerdo a lo determinado en el cristal, el ADN unido forma uniones de hidrógeno con moléculas de agua (capítulo I), pudiendo ser esta la explicación para la discrepancia entre el ΔC_p calculado y el determinado por ITC.

El valor de la entalpía calculado para d(T)₅ por van't Hoff y calorimetría coincidieron de manera notoria. En la literatura existen muchos caso en los cuales estos valores caen en discrepancias sistemáticas.²⁰⁷ Sin embargo, la coincidencia en este caso puede explicarse en términos en los cuales el evento de unión se corresponde con un equilibrio de dos estados, en el cual las moléculas libres pasan a formar el complejo con pocas contribuciones de reorganización de agua, rearreglos conformacionales o cambios de protonación²⁰⁷. Lo cual indicaría una interfaz poco consolidada para el complejo ED-10:d(T)₅. No fue posible calcular la entalpía de van't Hoff para la interacción de ED-10/ADNi debido a que la afinidad medida estuvo en el límite de detección y pareció no cambiar con la temperatura imposibilitando la construcción de este gráfico.

Si bien la afinidad de ED-10 por el ADN_i se mantuvo constante sin importar la longitud del oligonucleótido (Capítulo 1), se observó un cambio en los valores de entalpía y la entropía produciéndose una compensación entálpico-entrópica “isotérmica”. Este tipo de fenómeno

fue muy estudiado para moléculas pequeñas del tipo hospedador-huesped (*host-guest*)²⁰⁸ y ha sido descrita recientemente para interacciones proteína-ADN.⁵ En el primer caso se comparó la unión de una serie de ligandos homólogos en condiciones constantes de temperatura en las cuales ΔH y ΔS mostraron cambios compensatorios. En el segundo caso, el trabajo de Jen-Jacobson y colaboradores realizado con la endonucleasa EcoRI demostró que existe un paralelismo a este fenómeno en las interacciones proteína-ADN cuando el sitio de reconocimiento es mantenido constante, mientras que se establecieron variaciones en la secuencia contexto, vale decir, en las bases que no establecen contactos sino que encierran el sitio de unión. Distintas teorías sobre el origen de este tipo de variación han sido desarrolladas, algunas asignando un papel fundamental a la reorganización del solvente y las propiedades del agua,²⁰⁹ hasta una visión más general en la cual esta compensación es una consecuencia intrínseca del de interacción.²¹⁰ Para la interacción de ED-10 con el ADN esto puede ser visto de dos maneras: 1) la geometría de los contactos nos polares y las uniones de hidrógeno estuvo optimizada en los oligonucleótidos más cortos, tal vez sutilmente, de manera que la entalpía general de la interacción fue más favorable, sin embargo la restricción entrópica fue mayor y por lo tanto esta fue más desfavorable; 2) En los oligonucleótidos más cortos se forman menos interacciones intramoleculares entre las bases en el ADN libre, por lo tanto el costo entálpico de romper esas interacciones tras la unión fue menor que para los oligonucleótidos largos, lo cual se vio reflejado en un aumento de la entalpía de la interacción, mientras que la mayor movilidad adquirida por el ADN tras la unión repercutió favorablemente en la entropía. Esta última explicación está de alguna manera reforzada por el hecho que, para los distintos largos de politimidina prácticamente no se observó cambio con respecto al largo (en estos casos la formación de estructuras secundarias se supone menor debido a que no existe complementariedad de bases).

Por último, la calorimetría de desplazamiento permitió determinar la K_D de ED-10 por el site 35-6B, lo cual no fue posible mediante la calorimetría convencional debido a la alta afinidad. Si bien este valor ya había sido calculado por otra metodología (mediciones de fluorescencia intrínseca del Ac en el equilibrio) es importante destacar el uso de esta modalidad para determinar constantes de afinidad en casos en los que no fuera posible determinarla mediante otra manera. Sin embargo será un requisito contar con otro ligando

con afinidad significativamente menor al ligando de interés, del cual se pretenda investigar la constante. El hecho que esta sea una medición directa de la interacción, sin perturbar prácticamente el sistema la hace una técnica muy útil y confiable, sobre todo para interacciones con no tan alta afinidad.

En síntesis, en este capítulo se determinaron los parámetros termodinámicos de la interacción de ED-10 con distintos oligonucleótidos demostrando que en todos los casos la reacción estuvo entálpicamente dirigida y con un cambio de entropía desfavorable. Lo cual parece ser una firma termodinámica de las interacciones Ac-ADNcs. La unión de ED-10 al ADN_i presento un ΔC_p negativo al igual que las interacciones proteína-ADN específicas y $\Delta C_p \approx 0$ para la interacción con el d(T)₅. Finalmente, estos resultados permitieron explicar ciertas diferencias en la interacción de ED-10-ADN_i y los otros AcMo anti-ADNcs-ADN no determinables a partir de los datos cristalográficos.

Capítulo III

Estudios cinéticos de la interacción entre ED-10 y el ADN

Conceptos cinéticos

El estudio cinético de la interacción entre macromoléculas permite apreciar los eventos involucrados en la interacción estas durante la formación de un complejo. De esta manera, es posible obtener información fundamental acerca de sucesos temporales y discernir los distintos mecanismos involucrados en la asociación y disociación de las moléculas estudiadas. La posibilidad de monitorear una reacción a lo largo del tiempo posibilita determinar la aparición de intermediarios no detectables al equilibrio y de esta manera diseccionar el mecanismo de dicha reacción.

La teoría del estado de transición se utiliza para analizar la cinética de interacción entre dos moléculas. En esta, los procesos por los cuales los reactivos colisionan son ignorados y las únicas entidades físicas consideradas son los reactivos, o estado basal, y las especies más inestables en la coordenada de reacción, los estados de transición. En el estado de transición las interacciones intermoleculares están en proceso de formación y ruptura. Este estado representa la barrera energética que tienen que superar los reactantes para proceder hacia los productos, por lo tanto, cuanto más grande es, más lenta es la reacción y viceversa²¹¹. La teoría del estado de transición puede ser aplicada en interacciones proteína ADN permitiendo una caracterización termodinámica de las especies de alta energía²¹².

Al igual que en el capítulo anterior definimos a todos aquellos oligonucleótidos que contienen 5'-TC como ADN_i y a aquellos oligonucleótidos de politimidina como d(T)_n. Se utilizó un equipo de cinética rápida de flujo detenido ó *stopped flow*, en el cual se mezcló ED-10 con el ADN. Se siguió el cambio de la fluorescencia de los triptofanos de la proteína, asignando este cambio a la formación del complejo ED-10:ADN; ya que se produjo en forma dependiente de la concentración de ADN. Los experimentos cinéticos de unión entre ED-10 y el ADN fueron determinados en condiciones de pseudo-primer orden respecto a ED-10. Se determinó la constante de pseudo-primer orden (k_{obs}) para distintas concentraciones de ADN y se graficaron los valores obtenidos en función de la concentración del mismo (ver materiales y métodos, ecuación [20]).

Influencia de la longitud ADNi en la velocidad de reacción

Se comenzó primero mezclando ED-10 con un exceso de ADNi de 6 bases (site 35-6B) por ser el utilizado como referencia también en calorimetría. En la Figura 33 se muestra la disminución de fluorescencia de la proteína en función del tiempo luego de formado el complejo AcMo:ADN. Como se especificó en materiales y métodos estos procesos se ajustan a decaimientos exponenciales por lo tanto primero se lo ajustó esta curva a un modelo de decaimiento mono-exponencial. El análisis de los residuales de un determinado ajuste permite determinar la bondad del mismo. Si el ajuste elegido para los datos no es el correcto, entonces se vera un desvío no al azar en la distribución de los residuales de ajuste a lo largo del mismo. De manera opuesta, cuando el modelo de ajuste elegido es correcto, se observa una distribución aleatoria de los residuales. De este análisis, se determino la

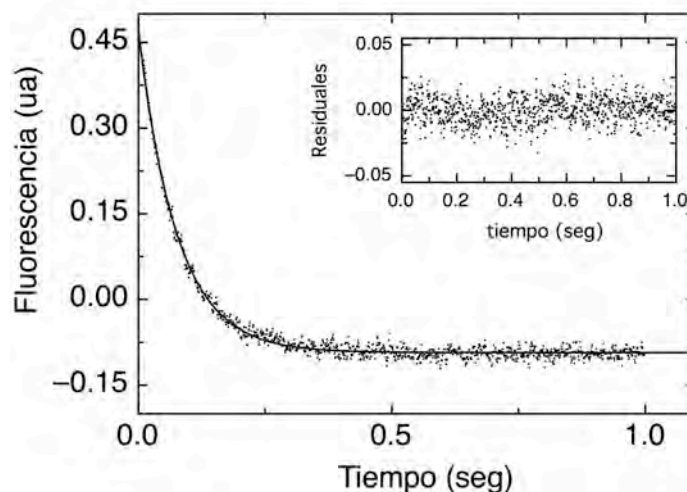


Figura 33. Asociación cinética entre Fab ED-10 y site 35-6B bajo condiciones de pseudo-primer orden. Curva de asociación cinética típica entre 100 nM de ED-10 Fab y 4 μ M de site 35-6B. La línea corresponde al mejor ajuste de los datos a un decaimiento exponencial. Los residuales de ajuste a un decaimiento mono-exponencial se muestran en el inserto.

presencia de una única fase cinética, es decir una exponencial (Figura 33).

De esta manera, se determinó una k_{obs} para cada concentración de ADN utilizada y se las graficó en función de la concentración de ADN. La unión de site 35-6B a ED-10 presentó una única fase de asociación cinética dependiente de la concentración (2^{do} orden), sin observarse por fluorescencia una fase de rearrreglo conformacional (1^{er} orden) (Figura 34).

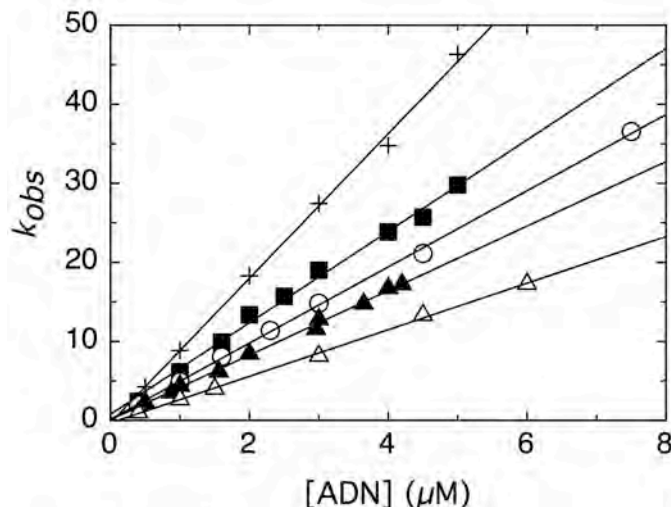


Figura 34. Asociación cinética entre Fab ED-10 y ADNcs de distinta longitud. Curva de pseudo-primer orden de las constantes extraídas de la asociación de Fab ED-10 con site 35-14B (Δ); site 35-10B (\blacktriangle); 35-6B (\circ); 35-4B (\blacksquare); site 35-2B ($+$)

El valor obtenido para esta constante, fue 3 ordenes menor al del límite de la difusión teórico estimado para la colisión de dos esferas ($10^9 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$).²¹³ y se encontró en el límite superior de lo descrito para interacciones Ag-Ac en las cuales no existe un componente electrostático ($10^6 \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$).^{214; 215}. Esto coincidió con lo determinado por termodinámica en donde se sugirió que la interacción entre ED-10 y el ADN era principalmente hidrofóbica. Por tratarse de reacciones muy lentas, los valores de k_{off} no pudieron ser extraídos del gráfico ya que el valor del error del ajuste de la ordenada al origen fue superior al del parámetro.

Para estimar el valor de k_{off} se planteó un modelo simple de dos estados, en el cual solo hay una fase de asociación y una fase de disociación:



Donde se definió la constante de disociación (K_D) como la relación entre k_{off}/k_{on} . Se calculó entonces, el valor de k_{off} a partir de la K_D obtenida en el equilibrio en el capítulo 1 (Tabla I). El valor para la k_{off} obtenido a partir de este cálculo indicaría, efectivamente, que la disociación del complejo es un proceso muy lento ($\approx 1 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$) (Tabla VIII).

Tabla VIII. Parámetros cinéticos para la asociación y disociación de Fab ED-10 con ADN_i obtenidos por cinética rápida de *stopped flow*

| DNA | k_{on} $10^6 \text{ (s}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}\text{)}$ | $^a k_{off}$ $10^{-4} \text{ (s}^{-1}\text{)}$ | $^b K_D^{(Eq)}$ (nM) |
|-------------|--|---|-------------------------|
| site 35-2B | 9.1 ± 0.2 | 31 ± 1 | 0.35 ± 0.03 |
| site 35-4B | 5.7 ± 0.2 | 7 ± 1 | 0.12 ± 0.01 |
| site 35-6B | 4.8 ± 0.1 | 13 ± 2 | 0.27 ± 0.03 |
| site 35-10B | 4.1 ± 0.1 | 8 ± 1 | 0.20 ± 0.02 |
| site 35-14B | 2.9 ± 0.6 | 11 ± 3 | 0.40 ± 0.03 |

^a $k_{off} = K_D \cdot k_{on}$; ^b valor obtenido por medición de fluorescencia en equilibrio

En el capítulo primero se demostró que la K_D no se modificó en función de la longitud del oligonucleótido, mientras que en el capítulo segundo se demostró que los parámetros termodinámicos sufrían cambios en función del mismo. Por lo tanto, con el fin de investigar que sucedía con las constantes cinéticas en función de la longitud del oligonucleótido, se repitió este experimento utilizando oligonucleótidos de ADN_i de ente 2 y 14 bases (Figura 34). La unión de los distintos oligonucleótidos de ADN_i a ED-10 presentó una única fase de asociación cinética el igual que el site 35-6B. Más aún, no se observaron grandes diferencias entre los valores de las k_{on} con respecto al largo de los oligonucleótidos ensayados (Tabla. VIII). Sin embargo, existió una leve tendencia a asociaciones más rápidas para los ADNs más cortos, sugiriendo que al experimentar menos conformaciones posibles la etapa de unión procedió con más velocidad (Figura 34, Tabla VIII). De la misma manera que para site 35-6B, por la lentitud de la etapa de disociación, la k_{off} no pudo ser determinada del gráfico.

Un caso particular se observó con el site 35-18B, que es más largo y por lo tanto puede explorar más conformaciones. La formación del complejo con ED-10 seguido por el decaimiento de la fluorescencia de triptofano no pudo ser ajustado a un modelo mono-exponencial como los anteriores. Los residuales del ajuste de los datos evidenciaron que el proceso fue mejor descrito como un decaimiento bi-exponencial, es decir dos fases cinéticas (Figura 35).

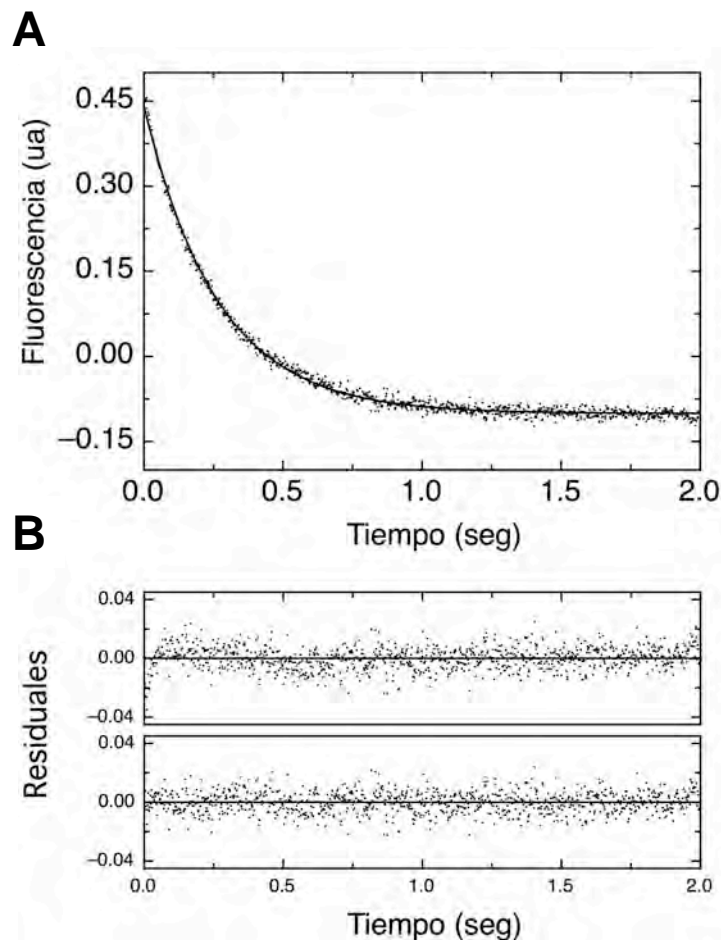


Figura 35. Asociación cinética entre Fab ED-10 y site 35-18B bajo condiciones de pseudo-primer orden. Curva de asociación cinética típica entre 100 nM de Fab ED-10 y 4 μ M de site 35-18B. La línea corresponde al mejor ajuste de los datos a un decaimiento exponencial. (B) Residuales del ajuste de los datos a una exponencial (panel de arriba) o dos exponenciales (panel de abajo).

Ambas fases resultaron ser dependientes de la concentración, indicando que en ambos casos se trata de procesos cinéticos de segundo orden. En este caso, los valores de las constantes cinéticas de segundo orden calculadas para ambos eventos de colisión fueron $k_1 = 4,3 \cdot 10^6$ ($M^{-1} \cdot s^{-1}$) y $k_2 = 1,4 \cdot 10^6$ ($M^{-1} \cdot s^{-1}$) (Figura 36 A). La fase más lenta representó al rededor del 80 % de la amplitud total (Figura 36 B). Cabe aclarar que, el valor de la k_{on} de la fase más lenta coincidió con lo esperado para un oligonucleótido de esta longitud. Es decir, fue más lenta que la del oligonucleótido de 14 bases, en acuerdo con la tendencia demostrada anteriormente (Tabla VIII). Por otra parte, el valor de la k_{on} determinada para la más rápida correspondió a la de un oligonucleótido más corto lo que podría indicar una estructura compacta. (Tabla VIII).

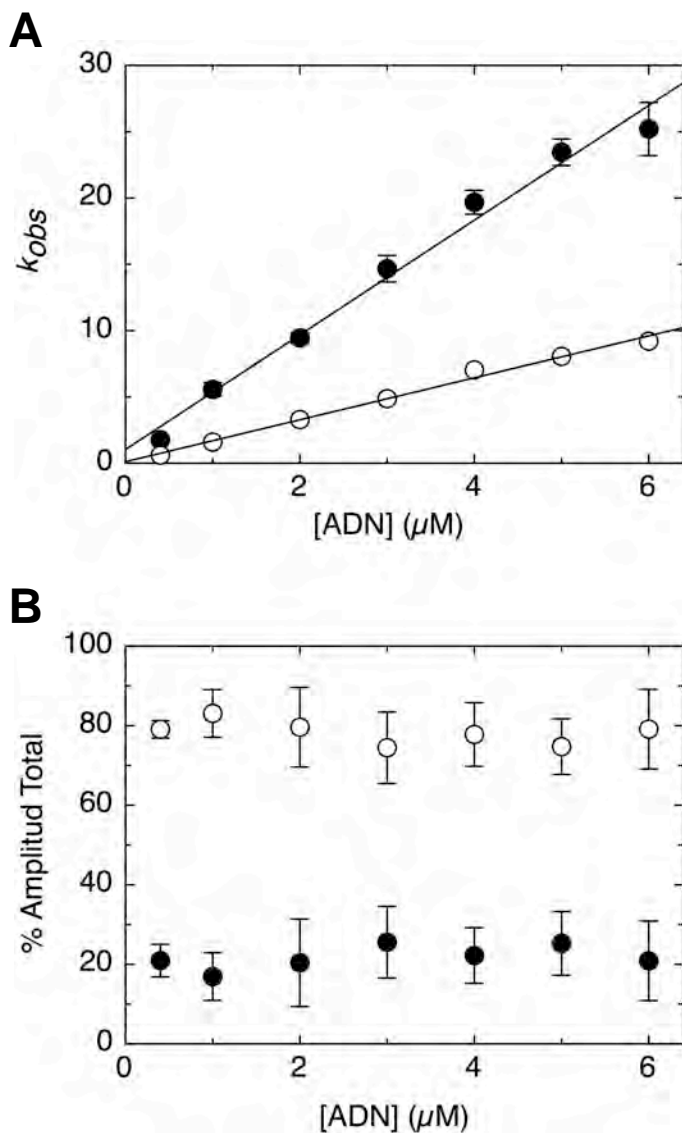


Figura 36. Asociación cinética entre ED-10 Fab y site 35-18. (A) Curva de pseudo-primer orden de las constantes extraídas de ambas fases dependientes de la concentración k_1 (●) y k_2 (○). (B) Amplitudes relativas de las fases de asociación k_1 (●) y k_2 (○).

Una explicación posible para esto fue plantear la existencia de algún tipo de estructura de orquilla en el oligonucleótido de 18 bases (dado que el site 35-18B posee una secuencia semi-palindrómica) no detectada en los de menor tamaño. Estas serían reconocidas de manera diferencial por ED-10. Para corroborar esto, se analizó la existencia de estructuras secundarias en el site 35-18B mediante UV-CD, sometiéndolo a desnaturalización térmica. Se decidió seguir el cambio de elipticidad a 275 nm por ser la longitud de onda que presentaba mayor diferencia entre los espectros en los extremos de temperatura. Este ADN demostró poseer algún tipo de estructura que se perdía de manera cooperativa con un T_m

aparente de 35 °C (Figura 37) mientras que los oligonucleótidos más cortos no mostraron esa transición (no mostrado).

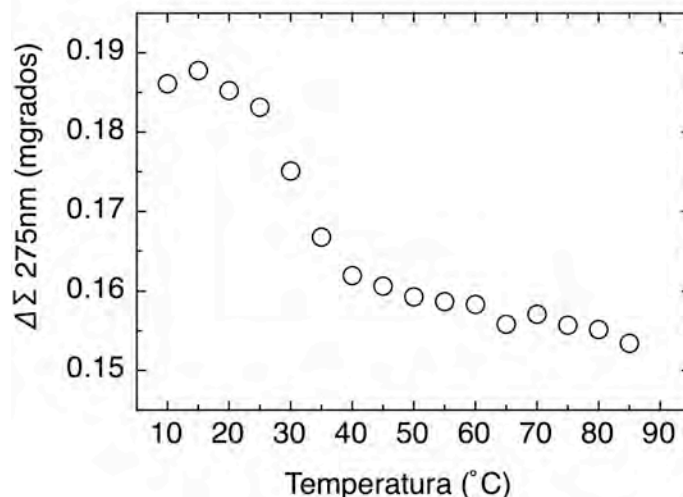


Figura 37. Desnaturalización térmica del site 35-18B seguida por dicróismo circular ultravioleta. Se registro el cambio de elipticidad a 275 nM de una solución 10 μM de site 35-18B en TBS pH 7,0 entre 10 – 85 °C.

Se analizó la estabilidad térmica de ED-10 tanto en el UV-cercano como en el lejano, para descartar cualquier posible cambio conformacional del Fab en el rango de temperatura utilizado. El AcMo no presentó cambios de estructura secundaria y terciaria en el rango de los 10-45 °C de acuerdo a los espectros de UV- lejano y cercano respectivamente (Figura 38).

Teniendo en cuenta estos datos, se realizó el experimento de pseudo-primer orden, manteniendo una concentración de fija ED-10 y site 35-18 y siguiendo los cambios de las fases cinéticas y sus amplitudes en función de la temperatura. A partir de estos, se determinó que a superando los 35°C el decaimiento de la fluorescencia fue mejor descrito por una función mono-exponencial en lugar de una bi-exponencial. Asignando ahora toda la amplitud del cambio a la fase más lenta (Figura 39).

En su conjunto, estos resultados indicaron que la presencia de dos fases de asociación cinética se debió a heterogeneidades en el ADN. En acuerdo también, con la presencia de una única fase cinética de asociación observada para los oligonucleótidos cortos. A una temperatura mayor al T_m , sólo estaría presente la forma desestructurada del

oligonucleótido, explicando por que se encuentra una sólo fase cinética. De manera opuesta por debajo de este valor coexistirían ambas conformaciones en el ADN indicando la presencia de dos fases de asociación de segundo orden.

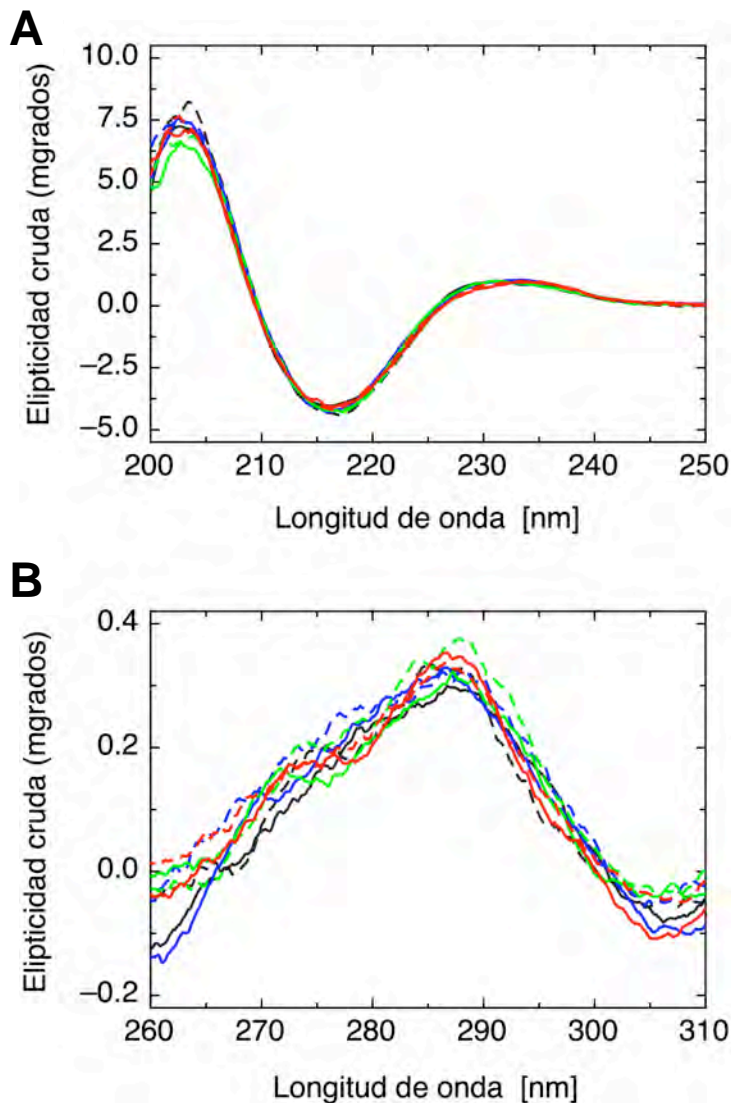


Figura 38. Análisis por dicroísmo circular ultravioleta de Fab de ED-10 a distintas temperaturas. Se registró el espectro de una solución 5 μM Fab ED-10 a distintas temperaturas. 10°C (Línea negra continua); 15°C (Línea negra discontinua); 20°C (Línea azul continua); 25°C (Línea azul discontinua); 30°C (Línea verde continua); 35°C (Línea verde discontinua); 40°C (Línea roja continua); 45°C (Línea roja discontinua). (A) espectro de UV-lejano; (B) espectro de UV-cercano.

Por último, ante la imposibilidad de estimar el valor de k_{off} por el método utilizado y a fines de estimar este valor en solución, se realizaron experimentos de cinética rápida marcando al ADN con distintas sondas fluorescentes. Entre otras, se marcó el extremo 3' con fluoresceína ó se reemplazó la primer base 5' de adenina por una de aminopurina.

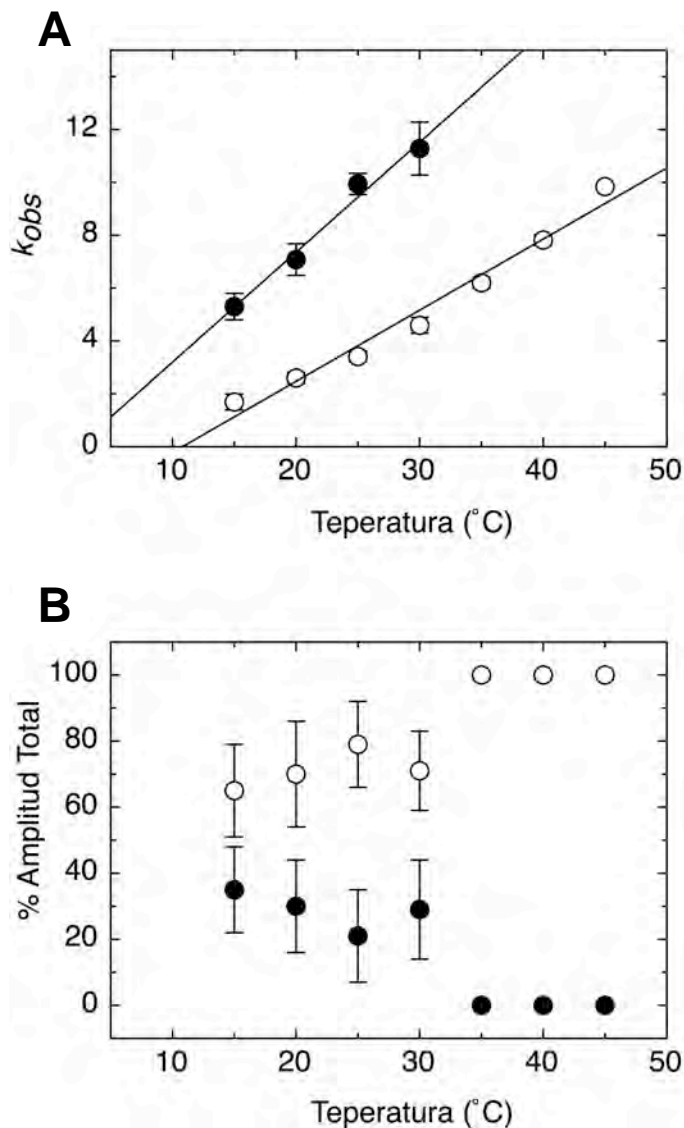


Figura 39. Dependencia de las constantes observadas y las amplitudes con la temperatura. (A) Constantes observadas k_1 (●) y k_2 (○). (B) Amplitudes de las fases de asociación k_1 (●) y k_2 (○).

De manera de obtener una sonda fluorescente, distinta a los triptofanos, que permitiera observar la entrada y la salida del sitio de combinación. En ninguno de los casos se observó un cambio de fluorescencia luego de la unión de los reactantes o de la disociación del complejo, imposibilitando el uso de estas metodologías para determinar las constantes cinéticas de esta disociación. Por lo tanto se planteó la necesidad de encontrar otro método alternativo que permitiera medirlas (ver más abajo).

Influencia de la longitud del $d(T)_n$ en la velocidad de reacción

Se estudió luego cinética de la unión de $d(T)_n$ a ED-10. Al igual que para el ADN_i se siguió la interacción entre ambas moléculas por el decaimiento de la fluorescencia de triptofano de la proteína. Se utilizó la misma aproximación de pseudo-primer orden y se ajustaron los datos a decaimientos exponenciales para determinar las k_{obs} . Estas se graficaron en función de la concentración de ADN (Figura 40, ecuación [20]) y a partir de este gráfico se determinaron los parámetros cinéticos (k_{on} y k_{off}) de la misma manera que para el ADN_i (Tabla IX).

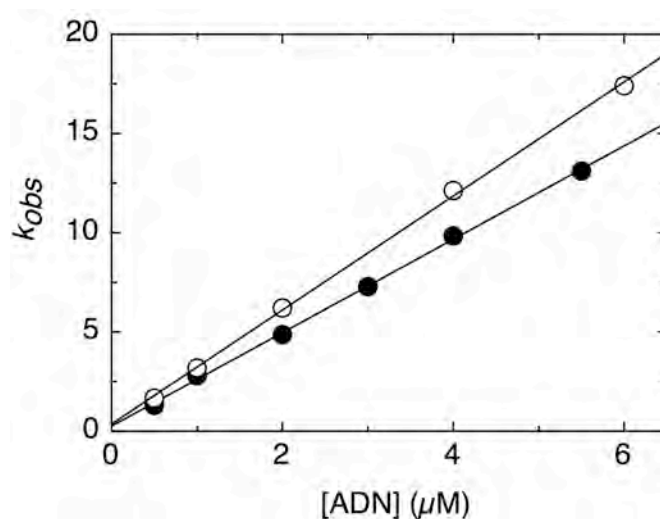


Figura 40. Asociación cinética entre Fab ED-10 y ADNcs. Curva de pseudo-primer orden de las constantes extraídas de la asociación de ED-10 Fab con $d(T)_5$ (○); $d(T)_{15}$ (●).

Tabla IX. Parámetros cinéticos para la asociación y disociación de Fab ED-10 con $d(T)_n$ obtenidos por cinética rápida de *stopped flow*

| DNA | k_{on} $10^6 (s^{-1} \cdot M^{-1})$ | k_{off} (s^{-1}) | ${}^a K_D^{(Cin)}$ (nM) | ${}^b K_D^{(Eq)}$ (nM) |
|------|--|-------------------------|----------------------------|---------------------------|
| dT5 | 2.9 ± 0.1 | 0.4 ± 0.1 | 125 | 49 ± 5 |
| dT15 | 2.4 ± 0.1 | 0.3 ± 0.1 | 106 | 45 ± 6 |

^a $K_D = k_{off} / k_{on}$; ^b valor obtenido por medición de fluorescencia en equilibrio; ^c no determinado

En este caso, ambos parámetros cinéticos fueron obtenidos del gráfico, ya que el valor de la k_{off} pudo precisarse a partir de la intersección de la recta de ajuste con el eje Y. Para el $d(T)_n$ no se observaron diferencias significativas para las k_{on} y k_{off} con respecto a la longitud del oligonucleótido. Más aún, el valor obtenido para la k_{on} fue similar al valor obtenido para para el ADNi. Sin embargo, a diferencia del ADNi no se observó esa diferencia con el largo del ADN e incluso el valor concuerda con el más lento medido para las interacciones específicas. Dado que para $d(T)_n$ se determinó una única constante de asociación y una única constante de disociación se utilizó el mismo modelo que para el ADNi se determinó esta vez la K_D a partir de los valores cinéticos, se comparó este valor con el obtenido por mediciones de fluorescencia en el equilibrio para $d(T)_n$ observándose un excelente acuerdo entre ambos valores (Tabla IX). Estos resultados indican que se trata claramente de una reacción dos estados.

Determinación de los parámetros cinéticos de la interacción entre ED-10 y el ADN (parte II)

La lentitud de la disociación del complejo ED-10:ADNi imposibilitó extrapolar su valor en los gráficos de k_{obs} en función de la concentración de ADN. Asimismo, la dificultad de encontrar una etiqueta fluorescente en el ADN que reporte la interacción desechó toda posibilidad de utilizarlas para medir la disociación del complejo. El biosensor óptico de resonancia de espejos es un equipo ampliamente utilizado para la determinación de las constantes cinéticas de interacciones entre macromoléculas. Por lo tanto se planteó el uso de esta técnica para medir la cinética de la interacción entre ED-10 y el ADN. En este equipo, es posible medir los valores experimentales de las constantes cinéticas, valiéndose del cambio en índice de refracción de una superficie donde se ha fijado uno de los ligandos. El extremo 3' de oligonucleótidos de ADNi y $d(T)_n$ se modificó con biotina y se los adhirió a la superficie de las cubetas. Luego se procedió a medir la asociación y disociación de ED-10 con sendos ADNs inmovilizados. Para determinar la constante de asociación cinética se realizaron mediciones variando las concentraciones de ED-10 utilizadas para la unión. Las curvas se ajustaron a un proceso de asociación monofásica (ver materiales y métodos) obteniéndose un valor de k_{obs} para cada una de ellas. Finalmente se graficaron

estos valores en función de la concentración de ED-10 y la de pendiente de ese gráfico se obtuvo el valor de la k_{on} . En la figura 41 se muestra, a modo de ejemplo, los gráficos del ajuste de los datos y la determinación de la constante cinética de asociación del Fab ED-10 con $d(T)_{15-biot}$.

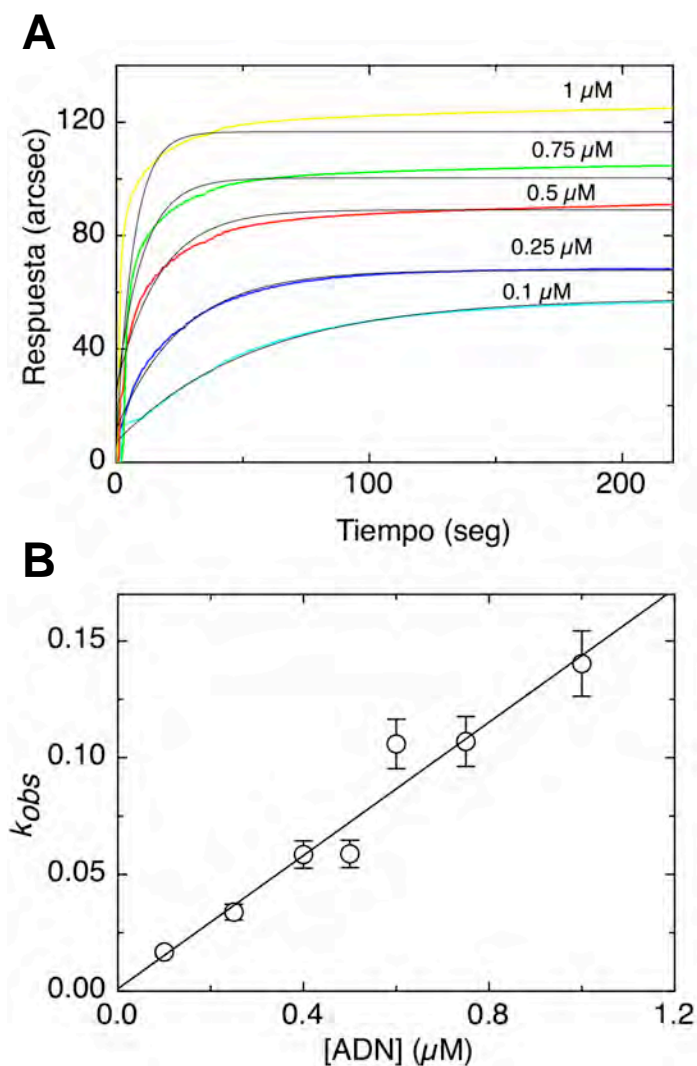


Figura 41. Determinación de la constante cinética de asociación por biosensor. Análisis de los datos cinéticos obtenidos en el biosensor óptico IAsys plus. La obtención del valor de k_r del $d(T)_{15-biot}$ inmovilizado con concentraciones crecientes de Fab ED-10 en solución se muestra como ejemplo. Los datos se analizaron con el software Profit. (A) Ajuste de datos a un modelo de asociación monofásica. (B) Determinación de la constante cinética de asociación. El valor de k_{on} es la pendiente del gráfico k_{obs} vs [ADN].

Para determinar la k_{off} se formó el complejo como se mencionó anteriormente, una vez alcanzado el equilibrio se cambió la solución que contenía ED-10 por una solución de *buffer* de unión de manera de desplazar el Fab unido. Se siguió el cambio de respuesta en función del tiempo. Este cambio en la señal del equipo se ajustó a un decaimiento exponencial. En este caso nuevamente el mejor ajuste se logró con un modelo de una sola fase. Finalmente, mediante esta técnica fue posible determinar k_{off} tanto para los

oligonucleótidos de ADN_i como los de d(T)_n. En la Figura 42 se muestra como ejemplo un ajuste mono exponencial de los datos del biosensor para la disociación de ED-10 del site 35-10B_{biot}. Los valores de las constantes cinéticas para ED-10 con los distintos ligandos determinadas utilizando el biosensor se muestran en la Tabla X.

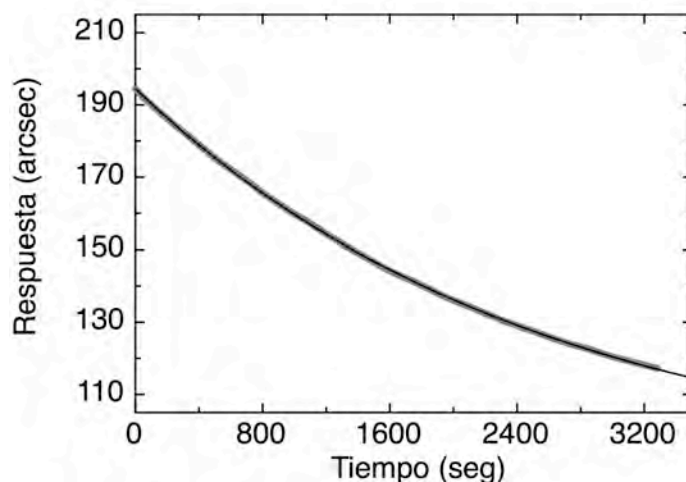


Figura 42. Determinación de la constante cinética de disociación por biosensor. Análisis de los datos cinéticos obtenidos en el biosensor óptico IAsys plus. La obtención del valor de k_{off} del site 35-10B_{biot} inmovilizado desplazando el Fab ED-10 con una solución de TBS pH 7,0 se muestra como ejemplo. Los datos se analizaron con el software Profit.

Tabla X. Parámetros cinéticos para la asociación y disociación de Fab ED-10 con site 35-10B_{biot} y d(T)_{n-biot} obtenidos por Biosensor óptico

| ADN | k_{on} $10^5 (s^{-1} \cdot M^{-1})$ | k_{off} $10^{-4}(s^{-1})$ | ${}^a K_D^{(Cin)}$ (nM) | ${}^b K_D^{(Eq)}$ (nM) |
|-----------------------------|--|--------------------------------|----------------------------|---------------------------|
| site 35-10B _{biot} | 1.4 ± 0.8 | 3.9 ± 0.2 | 2.8 | 0.2 ± 0.02 |
| dT5 _{biot} | 1.5 ± 0.3 | 155 ± 30 | 116 | 49 ± 5 |
| dT15 _{biot} | 1.4 ± 0.1 | 171 ± 50 | 116 | 49 ± 5 |

^a $K_D = k_{off} / k_{on}$; ^b valor obtenido por medición de fluorescencia en equilibrio; ^c no determinado

En general, los datos mostraron una buena correlación con los previamente obtenidos en los experimentos de *stopped flow*. Sin embargo las k_{on} obtenidas tanto para el ADN_i como para el d(T)_n fueron de aproximadamente 1 orden menor. En cuanto a la k_{off} obtenida por el biosensor para el ADN_i, esta mostró un excelente acuerdo con la estimada a partir de los datos de cinética rápida (Tabla VIII, Tabla X); mientras que las k_{off} determinadas para d(T)_n

fueron aproximadamente un orden más lentas que las obtenidas por el método anterior (Tabla IX, Tabla X). Estas discrepancias pudieron deberse a artefactos en las mediciones realizadas en el biosensor debido al uso de una fase sólida y a que la k_{off} determinada a partir del gráfico de pseudo-primer orden es un valor que difícil de estimar.

Más allá de este inconveniente y de los valores absolutos, se determinó mediante esta técnica que las constantes de asociación para el ADN_i y el d(T)_n no presentaron diferencias significativas. Por el contrario, la constante de disociación para el ADN_i fue aproximadamente 40 veces más lenta explicando de esta manera las diferencias de afinidad entre uno y otro ADN. Se calculó la K_D a partir de los datos cinéticos utilizando el mismo modelo que se menciona arriba y se obtuvo un valor de $K_D = 2,8$ y $K_D = 116$ nM para el ADN_i y d(T)_n respectivamente. Mientras que, los valores obtenidos por mediciones al equilibrio seguido por fluorescencia fueron de $K_D = 0,2 \pm 0,02$ y $K_D = 49 \pm 5$ nM para el ADN_i y d(T)_n, lo que constituye una muy buena concordancia considerando la gran diferencia de técnicas.

Efecto de la temperatura sobre los eventos de asociación y disociación de ADN_i: caracterización del Estado de transición

La dependencia de los eventos cinéticos con la temperatura es una herramienta fundamental para obtener información acerca de los intermediarios y de las barreras energéticas (los estados de transición) que los separan²¹¹. Se utilizó el Biosensor óptico para evaluar el efecto de la temperatura sobre el evento de disociación de Fab ED-10 con ADN_i. Como en los experimentos anteriores se fijó el oligonucleótido site 35-10B_{biot} y esta vez se varió la temperatura del equipo entre 15 y 35 °C (288 y 308 K). La dependencia de la k_{off} en función de la temperatura se analizó utilizando el gráfico de Eyring (Figura 43). Como era esperado, el cambio entálpico de activación (ΔH^\ddagger) fue desfavorable (Tabla XI). El gráfico mostró una dependencia lineal con respecto a la temperatura indicando la ausencia de ΔCp^\ddagger . Como se mencionó anteriormente, la presencia de ΔCp estaría dado principalmente por el cambio del área accesible por el solvente^{191; 216}. Por lo tanto, la linealidad en el gráfico de Eyring sugirió que no hay cambios en la exposición al solvente entre el complejo ED-10:site 35-6B y el estado de transición en el sentido de la disociación. No obstante, en

las mediciones de ITC de la formación del complejo Fab ED-10:site 35-6B se determinó un ΔC_p negativo. Por lo tanto es posible que la componente de ΔC_p^\ddagger se evidencie en la reacción reversa, es decir en la formación del complejo.

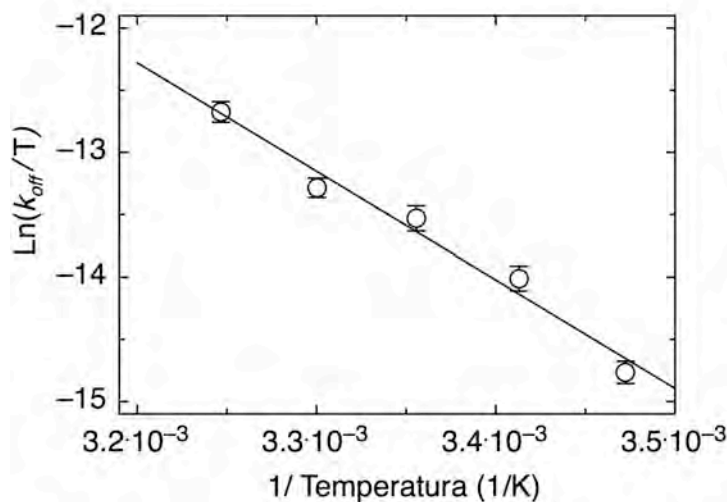


Figura 43. Efecto de la temperatura sobre la disociación Fab ED-10:site 35-10B_{biot}. Gráfico de Eyring de las k_{off} observadas para las disociaciones del complejo Fab ED-10:site 35-10_{biot} obtenidas por biosensor óptico. Las constantes fueron medidas como en la Figura 42.

Con el objetivo de medir el efecto de la temperatura en la reacción de asociación, se realizaron experimentos de unión en condiciones de pseudo-primer orden respecto a ED-10 utilizando el equipo de *stopped flow*. Al igual que antes se siguió el cambio de la fluorescencia intrínseca de triptofanos de ED-10 y se utilizó, en este caso, el site 35-6B. Esta vez, se midió el valor k_{obs} a una concentración fija de ligandos en función de la temperatura (el rango utilizado fue 10-45°C; no mostrado). Utilizando el ajuste de los datos obtenidos en la Figura 43 se extrapolaron los valores de las k_{off} para las temperaturas medidas para k_{obs} en el *stopped flow*. Luego, mediante la ecuación [20], se determinó el valor de la k_{on} para cada temperatura y se construyó el gráfico de Eyring esta vez para k_{on} (Figura 44). En este caso el ΔH^\ddagger de los reactantes al estado de transición fue pequeño comparado con el de la reacción global en el equilibrio (tablaXI). En esta reacción se observó una curvatura en el gráfico de Eyring indicando la presencia de un ΔC_p^\ddagger negativo entre los reactantes libres y el estado de transición. El valor determinado para el ΔC_p^\ddagger en esta dirección coincidió con el determinado para la reacción global por ITC (Tablas VI y

XI). Por lo tanto, esto sugeriría que el acultamiento de área accesible al solvente de la reacción global ocurre en esta etapa.

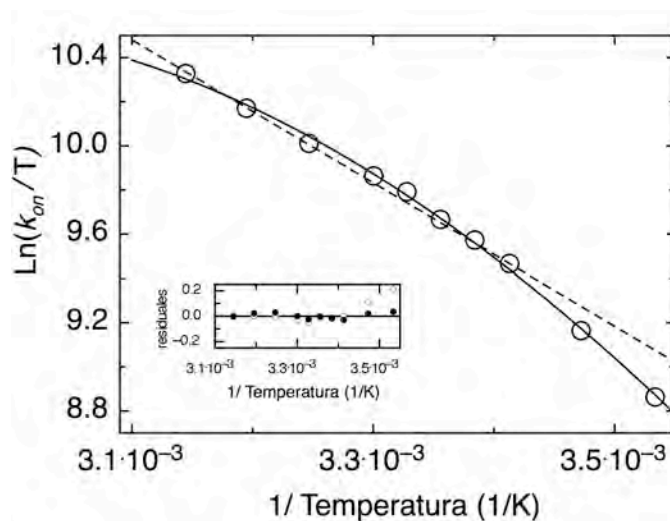


Figura 44. Efecto de la temperatura sobre la asociación de Fab ED-10 y site 35-6B. Gráfico de Eyring de las constantes de asociación observadas. Las k_{on} para cada temperatura fueron determinadas mediante la ecuación [22]. Utilizando el valor de k_{obs} determinado a una concentración de $2 \mu\text{M}$ site 35-6B, y el de k_{off} extrapolado del ajuste del gráfico de la Figura 42 para cada temperatura. La línea continua muestra el ajuste a la ecuación de Eyring teniendo en cuenta un $\Delta C_p \neq 0$; la línea punteada muestra el ajuste, lineal que considera $\Delta C_p = 0$. En el inserto se muestran los residuos de los ambos ajustes, (●) ajuste no lineal; (○) ajuste lineal.

Tabla XI. Parámetros termodinámicos para las energías de activación extraídas de la dependencia de la temperatura de las constantes cinéticas

| Parámetro | k_{on} | k_{off} |
|--|------------------|----------------|
| $\Delta H^{\ddagger a}$ (kcal·mol ⁻¹) | 7.7 ± 0.1 | 17.2 ± 0.8 |
| ΔC_p^{\ddagger} (kcal·mol ⁻¹ ·K ⁻¹) | -0.17 ± 0.02 | - |
| ^a 298 K | | |

Discusión III

Mediante el uso del *stopped flow*, se logró determinar las constantes cinéticas de asociación para el ADN_i de distintas longitudes. El valor promedio obtenido para la asociación de ED-10 con el ADN_i fue de $k_{on} = 10^6 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Si bien este valor se encontró en límite de lo descripto para interacciones Ac-Ag,^{214; 215} es tres ordenes menor que la velocidad de asociación descripta por Smoluchowski para reacciones limitadas por la difusión ($10^9 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)²¹³. Recientemente, van Holde redefinió el límite difusional para reacciones entre proteínas y sustratos pequeños ($10^8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$)²¹⁷, donde se tiene en cuenta que, sólo el contacto del ligando con una pequeña fracción de la superficie de la proteína lleva a la unión. Este nuevo límite sigue siendo dos órdenes mayor que la constante de asociación entre Fab ED-10 y el ADN. Por lo tanto, el cambio conformacional observado en Fab ED-10 luego de la unión del ADN podría ser causa de la presencia de una k_{on} menor a la esperada por difusión. Para el AcMo ED-15, que reconoce al factor de transcripción E2c²¹⁸, se determinó una $k_{on} = 10^4 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$. Este valor más lento que el difusional, fue asignado a rearrreglos en ambas macromoléculas como consecuencia de la interacción, presentando una barrera de energía que lentificó la interacción²¹⁸. En ED-10, este cambio conformacional sería menor, no presentado una barrera energética tal grande para la unión con el ADN.

Para diversas interacciones proteína-ADN se ha demostrado que el valor de la constante de asociación cinética puede ser mayor al límite descripto por la difusión,²¹² en estos sistemas las asociaciones más rápidas son el resultado de fuerzas coulombicas atractivas que operan favoreciendo la formación de complejos productivos.^{219; 220; 221} Un caso relevante de este tipo de direccionamiento se observó para el AcMo anti-ADN 11F8, para el que se demostró una $k_{on} = 10^8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ para la interacción con el ADN.²²² Esta asociación rápida se atribuyó a una direccionamiento electrostático, ya que los CDR de este AcMo, poseen una alta densidad de residuos cargados positivamente (arginina y lisina) que atraerían los fosfatos negativos del ADN_{sc}. Es de esperar entonces que en ED-10 donde se demostró la ausencia de un componente electrostático en la interacción (capítulo 1) se observe una k_{on} menor a esta.

Existió una pequeña disminución en la constante de asociación en función de la longitud del ADN_i (Tabla VIII). Esta variación pudo deberse a que los oligonucleótidos más cortos tienen mayor posibilidad de producir choques efectivos con ED-10, ya que exploran una menor cantidad de conformaciones (estructuras) posibles, presentando por lo tanto una k_{on} sutilmente más rápida.

Para el d(T)_n se determinó una k_{on} en el mismo orden a la obtenida para el ADN_i. En este caso el longitud del ADN no pareció afectar este valor (Tabla IX). Por lo tanto, la diferencia de afinidad de ED-10 observada para el ADN_i y d(T)_n, no fue debido a la mayor velocidad de formación del complejo específico, sino que ambos complejos se asocian con la misma velocidad. Sugiriendo que la diferencia en la afinidad debió generarse a partir de diferencias en las k_{off} . Por este método, sólo fue posible determinar experimentalmente este valor para el d(T)_n. Si embargo, la k_{off} para el ADN_i pudo ser estimada a partir del valor de k_{on} y la K_D determinada al por fluorescencia en el equilibrio. De este análisis surgió que la k_{off} para el ADN_i fue 2 ordenes de magnitud más lenta que la de d(T)_n (Tabla VIII, IX). Indicando que el complejo se forma con la misma velocidad, sin embargo la disociación del complejo con el ADN inespecífico d(T)_n tiene una barrera energética menor que el complejo formado con el ADN inmunógeno, por lo que se disocia más rápido y es consecuentemente menos estable.

El biosensor óptico permitió determinar experimentalmente las constantes de asociación y disociación cinéticas para ADN_i y d(T)_n. A pesar que los valores determinados por esta última difirieron de los obtenidos por *stopped flow*, las conclusiones fueron las mismas (Tabla VIII-X1). Las k_{on} para ADN_i y d(T)_n no presentaron diferencias significativas, mientras que hubo 2 ordenes de diferencia entre las k_{off} (Tabla X). Indicando, nuevamente, que la diferencia de afinidad entre el ADN_i y el d(T)_n surgió a partir da la formación de un complejo que se mantiene unido por más tiempo. Estas diferencias entre los valores obtenidos en ambos métodos pudieron deberse a que, en uno las mediciones fueron realizadas totalmente en solución, mientras que en el otro un de los reactantes (el ADN es este caso) se encontró fijado a una superficie sólida. Esto podría dar cuenta de una asociación más lenta debido a un restricción impuesta en cuanto a la difusión libre en solución. Estas discrepancias entre las constantes cinéticas calculadas por *stopped flow* y el

Biosensor fueron descriptas para la interacción de la Colicina N con la proteína de *E.coli* TolA.²²³

El hecho que la afinidad de ED-10 por su ADN inmunógeno sea mayor que los otros anticuerpos anti-ADN surgiría debido a la maduración del sitio de combinación de ED-10 con este ligando. Podríamos suponer entonces a la interacción con el d(T)_n como una interacción anfígeno-Ac “menos madura”. La visión canónica, surgida del estudio de haptenos con Acs, acepta que aquellos aislados en la primera semana post inmunización poseen baja afinidad, K_D entre 10 - 1 μM (similar a la de ED-10 por el d(T)_n) mientras que a los aislados luego de un tiempo de exposición al ligando la K_D disminuye entre 1-10 nM (similar a la de ED-10 por el ADNi).²²⁴ Este experimento fue repetido para distintos sistemas de haptenos^{225; 226} y luego reconfirmado utilizando la tecnología de hibridomas²²⁷. Los primeros estudios cinéticos disecando los mecanismos de esta variación indicaron que esta se basaba en un aumento de la constante cinética de la asociación entre el hapteno y el Ac.²²⁸ Sin embargo, en trabajos posteriores en otros sistemas, como por ejemplo con el AcMo anti-citocromo c²²⁹, se demostró que la reducción de la constante de disociación cinética podía ser responsable del aumento de afinidad durante la maduración. Podríamos suponer entonces en este caso, la interacción de ED-10 con el d(T)_n como una interacción Ac-ADN no madura. Si bien la conformación del sitio de combinación de ED-10, es apta para reconocer el ADN, en el caso del d(T)_n no existió maduración antigénica, por lo tanto la afinidad fue baja ($K_D \approx 0,1 \mu\text{M}$). Por el contrario, en la interacción de ED-10 con el ADNi donde existió maduración, la afinidad es mayor ($K_D \approx 0,1 \text{nM}$) esto fue debido a una disociación más lenta (Tabla VIII-X). Sería interesante para comprobar esta hipótesis, determinar tanto la afinidad como los parámetros cinéticos de la interacción de la línea germinal de ED-10 para d(T)_n y para el ADNi. En este caso, la interacción con ambos oligonucleótidos debería presentar una $K_D \approx 0,1 \mu\text{M}$ y formar un complejo que presente parámetros cinéticos similares a los de complejo ED-10:d(T)_n.

A partir del estudio de las constantes cinéticas en función de la temperatura se caracterizó el estado de transición de la interacción de ED-10 con el ADN. Por un lado se observó que el ΔC_p^\ddagger de la reacción de asociación coincidió con el ΔC_p global de la interacción, mientras que la reacción de disociación no presentó ΔC_p^\ddagger . Por lo tanto podemos inferir que, en

cuanto a superficie expuesta al solvente el estado de transición se parece al complejo, es decir todo el ocultamiento de área determinado para la reacción global ocurre en el estado de transición de asociación. Por otro lado, la formación del estado de transición de asociación esta acompañada por un cambio entálpico pequeño ($\Delta H_{as}^{\ddagger} = 7,7 \pm 0,1 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) comparado al global de la reacción para site 35-6B ($\Delta H_{eq} = 26,0 \pm 0,3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$). No obstante el cambio entálpico en la dirección de disociación ($\Delta H_{dis}^{\ddagger} = 17 \pm 0,8 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$) es menor al esperado si la única fuente de contribución al ΔH fueran los enlaces con el ligando, es decir el evento de unión. Si se calcula el ΔH global a partir de los ΔH^{\ddagger} se observa una clara discrepancia con el valor obtenido por ITC.

$$\Delta H_{eq} > (\Delta H_{as}^{\ddagger} - \Delta H_{dis}^{\ddagger}) \quad [30]$$

Existen distintas fuentes para esta discrepancia en el cambio entálpico. En principio, podría asignarse al cambio conformacional observado por cristalografía entre el Fab libre y el unido al ADN. Este cambio en la posición de los distintos residuos de los CRDs principalmente en el CDR H3 y CDR L1 involucran la formación y deformación de enlaces que producirían un cambio entálpico considerable. Por lo tanto se puede definir al cambio total como la suma del generado por la unión y el generado por el cambio conformacional.

$$\Delta H_{total} = \Delta H_{unión} + \Delta H_{conf} \quad [31]$$

Debido al gran número de residuos que se movilizan es esperable que el valor de entalpía conformacional sea considerable, ya que éste traerá aparejado la ruptura y formación de nuevos enlaces. Esto sumado a la ausencia de ΔCp^{\ddagger} detectable en la reacción de disociación indicaría que estos cambios de enlaces son internos del Fab y no involucrarían cambio en la exposición al solvente.

Otra fuente de discrepancia posible radica en que la dependencia de constante de disociación cinética para el complejo se midió con uno de los ligandos fijos a una superficie en lugar de en solución. Si bien es difícil que esto modifique la dependencia de la k_{off} con respecto a la temperatura en cuanto a la forma (léase aparición de curvatura en el gráfico de Eyring). Puede perfectamente alterar componentes de la entalpía como el vibracional o el translacional que en suma terminen afectando el balance de los componentes o el valor total.

Capítulo IV

Actividad nucleasa de ADN mediada por ED-10

Conceptos generales

En 1992 Shuster y colaboradores describieron la presencia de una actividad nucleasa de ADN (DNAsa) en sueros de pacientes con LES. En este mismo trabajo se describió que esa actividad era realizada por una Ig G¹³⁹. Luego, Gololovov y colaboradores¹⁴¹ describieron que BV04-01¹⁰⁰, un AcMo anti-ADN simple cadena era capaz de hidrolizar tanto ADN simple como doble cadena. Un trabajo reciente describió que el AcMo anti-ADN 3D8 también poseía actividad DNAsa¹⁷⁶.

Durante el análisis de los datos cristalográficos del sitio de combinación del complejo ED-10:ADN, se observó que el residuo de histidina (L27d) se encontraba formando un puente de hidrógeno con el enlace fosfato entre las dos bases del ADN y que otro residuo de histidina (L93) también se orientado hacia el ADN (Figura 45). Además curiosamente esta última histidina aparecía conservada en la misma posición en otras de las estructuras de AcMos anti-ADN con actividad DNAsa resueltas. Por otra parte, se observó que el pH no afectó la afinidad de ED-10 por el ADN en el rango del pka de dichas histidinas (Capítulo 1), por lo que su conservación podía estara asociada a una función química.

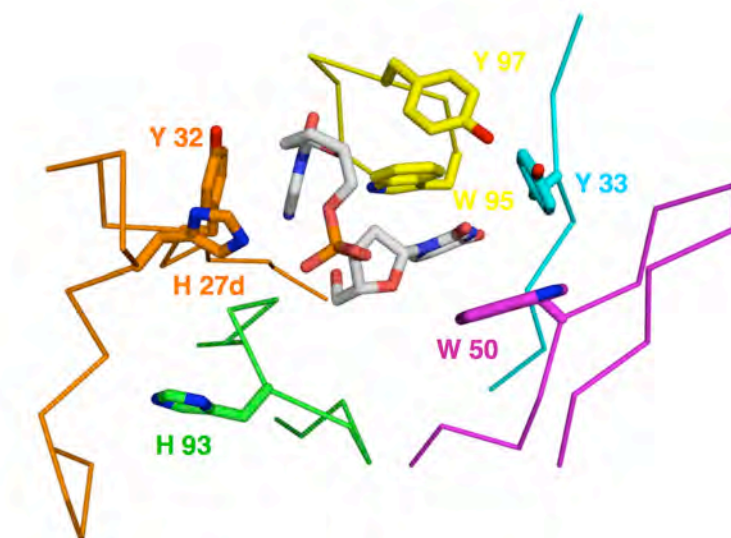


Figura 45. Vista del sitio de combinación de ED-10. Las regiones CDR, sus cadenas laterales y el ADN están coloreados de la misma manera que en la Figura 20. Se muestran las cadenas laterales de las histidinas L27d y L93, la tirosina L32, H33 y H97, y la de los triptofanos H50 y H95 en representación de bastones, al igual que el ADN (coloreado como en la figura 20).

Existen numerosos ejemplos que muestran a los residuos de histidina reactivos en funciones químicas que están fuertemente involucrados en la hidrólisis catalítica de enlaces fosfodiéster en las nucleasas²³⁰. En base a toda esta información se decidió investigar la presencia de una actividad hidrolítica de ADN en el AcMo ED-10.

Degradación de ADN plasmídico por Fab ED-10

La actividad DNAsa ocurre por mecanismos diversos, de acuerdo a la enzima que realiza esta actividad. Si embargo, es aceptado que cualquiera sea el mecanismo, este requiere la presencia de cationes divalentes para ser efectiva, además de un nucleófilo. Los trabajos realizados hasta el momento reportaron que la presencia de 2 mM Mg^{2+} era necesaria para la hidrólisis de ADN por los Acs anti-ADN^{141; 176}. Por lo tanto, se comenzó a analizar el efecto de este ión en la reacción. Teniendo en cuenta el valor teórico tabulado para el pKa del residuo de histidina de 6,0 unidades de pH se trabajó a pH=5,0 suponiendo que dichas histidinas, a menos que posean un pKa anómalo, se encontrarían en la forma protonada. Por el contrario, a pH=7,0 las mismas se encontrarían desprotonadas.

Lo primero que se estudió fue la degradación de ADN circular utilizando como sustrato un plásmido. El vector utilizado fue el pGEX-2T (promega) de un tamaño de 7200 pares de bases (pb). Este fue incubado con distintas cantidades de Fab ED-10 purificado en presencia de 2 mM $MgCl_2$ tanto a pH=5,0 como a pH=7,0 a 37°C durante una hora. Luego de transcurrido el tiempo de reacción, ésta se interrumpió por el agregado de tripsina, de manera de degradar el Ac según lo reportado en trabajos anteriores¹⁷⁶. El ADN producto de la reacción se separó mediante un gel de agarosa y se visualizaron las bandas plasmídicas por tinción con Bromuro de Etídio (Figura 46).

La degradación del ADN plasmídico (ADNp) se determinó primero por la desaparición de la banda superenrollada del plásmido (Figura 46), y luego por la desaparición total del ADN. La degradación de ADNp resultó ser dependiente de la concentración de Fab ED-10 tanto a pH=5,0 como a pH=7,0 (Figura 46, calles 3-7); apuntando a que era producto del agregado del Fab. Así mismo, el pH jugó un papel fundamental en la actividad DNAsa de ED-10, ya que 1 μM de Fab fue suficiente para hidrolizar todo el ADNp presente en la

mezcla de reacción a pH=7,0 mientras que a pH=5,0 la hidrólisis no fue completa. Indicando que la misma en presencia de Mg^{2+} es más eficiente a pH=7,0 que a pH=5,0.

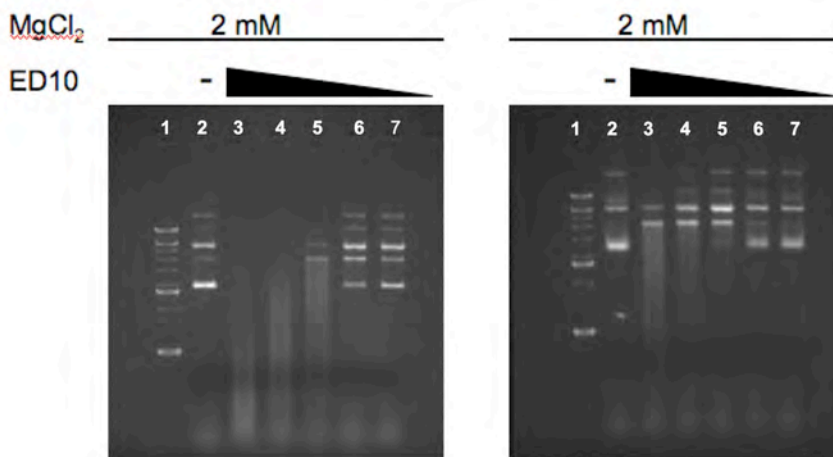


Figura 46. Actividad nucleasa de ADNp de Fab ED-10. El plásmido superenrollado pGEX2T (100 ng) fue incubado con distintas concentraciones de Fab ED-10 (5-0.5 μ M) por 1 hora a 37°C. La reacción transcurrió a pH 7,0 (panel izquierdo) o a pH 5,0 (panel derecho). Calles: 1, marcador de peso molecular; 2 sin Fab ED-10; 3-7, concentraciones decrecientes de Fab ED-10. Las muestras fueron cargadas y separadas por electroforesis en gel de agarosa. El ADN se tiñó con BrEt y se visualizó mediante iluminación con luz UV.

La catálisis mediada por estos Acs fue lenta, por lo tanto fue necesario descartar la presencia de DNAsas provenientes del líquido ascítico original; aunque esto se creyó poco probable debido a la cantidad y diversidad de pasos de purificación utilizados para obtener el Fab ED-10 (ver materiales y métodos). De todas maneras para descartar totalmente esta posibilidad, se realizó el mismo ensayo utilizando como control los Fab de dos AcMos distintos. Estos Acs al igual que ED-10, fueron purificados a partir del líquido ascítico de ratones de la misma cepa. El ensayo demostró que ninguna de las dos IgG presentó actividad hidrolítica de ADN (no mostrado) confirmando que la degradación del ADN observada en presencia de Fab ED-10 es debido a una actividad de este AcMo y no es causa de una DNAsa contaminante arrastrada durante el proceso de purificación.

El paso siguiente fue determinar si el Mg^{2+} era imprescindible para la hidrólisis de ANDp. En un ensayo como en el mencionado anteriormente se incubó esta vez el ADNp con y sin Mg^{2+} en en aquellas reacciones en las cuales no se colocó Mg^{2+} además se adicionó 1 mM EDTA. De manera de retirar de la mezcla de reacción cualquier traza de Mg^{2+} u otro catión divalente (Figura 47).

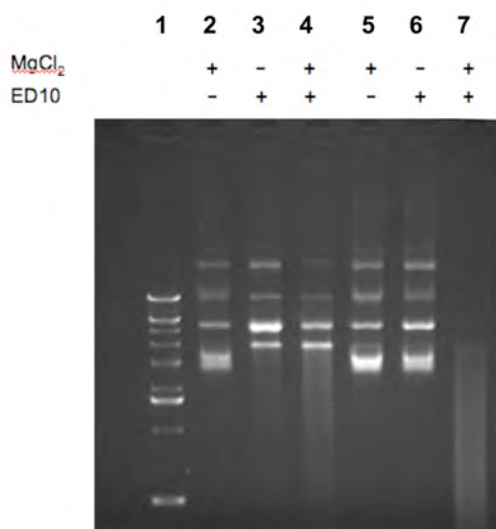


Figura 47. Dependencia de Mg²⁺ de la actividad nucleasa de ADNp de Fab ED-10. El plásmido superenrollado pGEX2T (100 ng) fue incubado con Fab ED-10 (1 μM) por 1 hora a 37°C. La reacción transcurrió a pH 7,0 (calle 5, 6, 7) o a pH 5,0 (2, 3, 4). Calles: 1, marcador de peso molecular; 2 y 5 sin Fab ED-10; 3 y 6, con de Fab ED-10 sin Mg²⁺; 4 y 7 con Fab ED-10 y Mg²⁺. Las muestras fueron cargadas y separadas por electroforesis en gel de agarosa. El ADN se tiñó con BrEt y se visualizó mediante iluminación con luz UV.

Se observó también que a pH=5,0 el Fab ED-10 fue capaz de hidrolizar el ADNp en ausencia de Mg²⁺ (Figura 47, calles 3-4), mientras que a pH=7,0 el agregado de este catión fue imprescindible para la hidrólisis (Figura 45, calles 6-7). Por lo tanto, podemos concluir de estas dos figuras que el Fab ED-10 es capaz de degradar ADNp tanto a pH=5,0 como a pH=7,0 siendo determinante en este último caso, la presencia de Mg²⁺ es para la catálisis.

Degradación de ADN lineal por Fab ED-10

Una vez determinada la actividad nucleasa de Fab ED-10 se decidió luego, estudiar la capacidad para degradar ADN lineal (ADNI). De ser esto posible nos permitiría obtener un método más cuantificable de la hidrólisis, ya que se observaría la desaparición de una sola banda en el gel, en lugar de las distintas bandas plasmídicas. Para esto se utilizó un fragmento de ADNI de 1200 pb obtenido a partir de una reacción en cadena de polimerasa (PCR) utilizando como molde un plásmido que contenía el gen que codifica para la proteína mayor de la cápside del HPV-16, L1. Este procedimiento permitió obtener grandes cantidades de ADNI de composición conocida. En un ensayo similar a los anteriores se

determinó la capacidad de Fab ED-10 de degradar ADNl. Para esto se incubaron distintas cantidades de ADNl (50-200 ng) con 1 μM de Fab ED-10 en presencia de 2 mM MgCl_2 durante 1 hora a 37 °C. Nuevamente el ADN fue separado por electroforesis en un gel de agarosa (Figura 48).

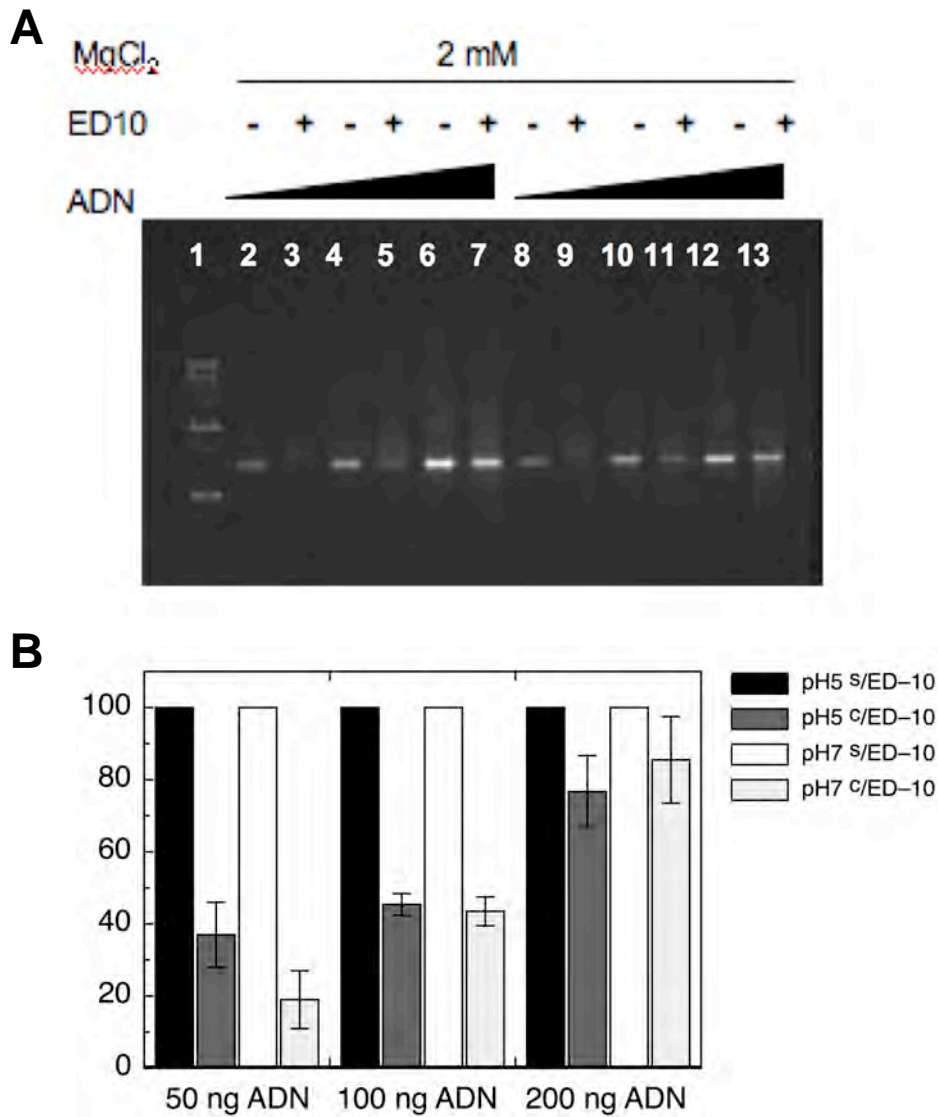


Figura 48. Actividad nucleasa de ADNl de Fab ED-10. (A) Distintas concentraciones del fragmento de PCR (50-200 ng) fueron incubados con Fab ED-10 (1 μM) por 1 hora a 37°C. La reacción transcurrió a pH 7,0 (calles 2-7) o a pH 5,0 (8-13). Calles: 1, marcador de peso molecular; 2, 3, 8 y 9, 50 ng; 4, 5, 10 y 11, 100 ng; 6, 7, 12, 13, 200 ng. Las muestras fueron cargadas y separadas por electroforesis en gel de agarosa. El ADN se tiñó con BrEt y se visualizó mediante iluminación con luz UV. (B) Las imágenes fueron digitalizadas y las bandas correspondientes al ADN fueron cuantificadas con el programa *ImageJ*. Se muestra el resultado de tres experimentos independientes.

El gel muestra que Fab ED-10 fue capaz de hidrolizar casi completamente 50 ng de ADN lineal en una hora de ensayo tanto a pH = 5,0 como a pH = 7,0 en presencia de 2 mM Mg²⁺ (Figura 48 A, calles 2-3; 8-9 y B). Se decidió entonces utilizar esta misma cantidad de ADNl para determinar la dependencia del catión Mg²⁺ para la degradación de ADNl a los pH utilizados en los ensayos anteriores. Se pudo ver entonces que, al igual que en el caso de ADNp, Fab ED-10 fue capaz de degradar ADNl en forma independiente de Mg²⁺ a pH=5,0 mientras que a pH=7,0 , al igual que para el ADNp, lo hace en forma dependiente de la concentración (Figura 49).

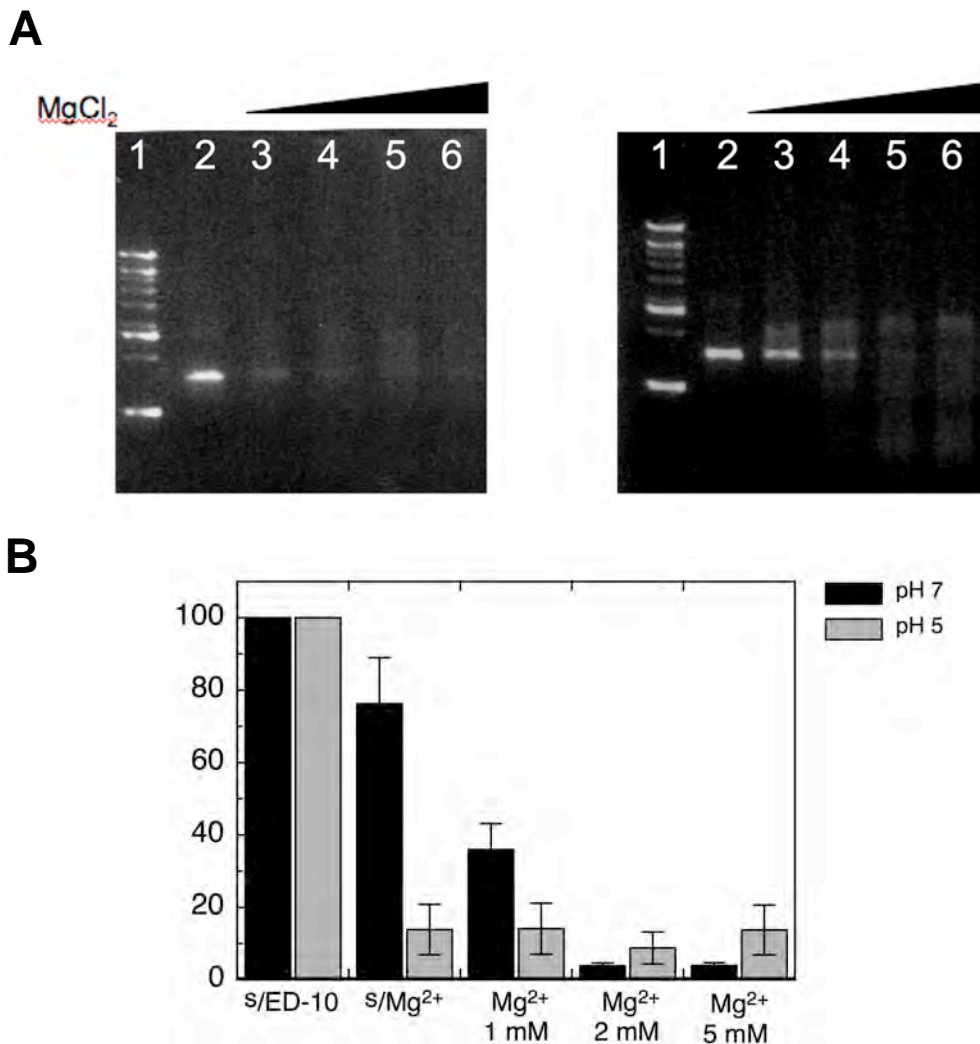


Figura 49. Dependencia de Mg²⁺ de la actividad nucleasa de ADNl de Fab ED-10. (A) El fragmento de PCR (50 ng) fue incubado con Fab ED-10 (1 μ M) por 1 hora a 37°C. La reacción transcurrió a pH 7,0 (panel de la derecha) o a pH 5,0 (panel de la izquierda). Calles: 1, marcador de peso molecular; 2, sin Fab ED-10; 3, sin Mg²⁺; Calle 4-6, concentraciones crecientes de Mg²⁺. Las muestras fueron cargadas y separadas por electroforesis en gel de agarosa. El ADN se tiñó con BrEt y se visualizó mediante iluminación con luz UV. (B) Las imágenes fueron digitalizadas y las bandas correspondientes al ADN fueron cuantificadas. Se muestra el resultado de tres experimentos independientes.

De esta manera se demostró que Fab ED-10 puede degradar ADNl tanto a pH=5,0 como pH=7,0 siendo esta actividad en el primer caso independiente de Mg^{2+} .

Discusión IV

Hasta aquí el AcMo ED-10 ha sido extensivamente caracterizado, incluyendo determinación de la estructura tridimensional del fragmento Fab por resolución de rayos-X, así como la caracterización termodinámica y cinética de la interacción con el ADN. La conformación del ADN en el sitio de combinación, determinada en el cristal del complejo, mostró que este adoptó una conformación específica. Fue esta conformación, sumada al tipo de residuos presentes y su conservación, la que indicó la posibilidad de encontrar actividad nucleasa de ADN en ED-10. En particular, un residuo de histidina conservado en el sitio de combinación indicaba ó bien la modulación de la unión por pH o una posible actividad nucleasa.

Se demostró que el Fab ED-10 fue capaz de hidrolizar ADNdc tanto en forma circular como lineal al igual que otros Acs anti-ADN previamente descritos^{141; 176}. A pH=7,0 como para otras DNAsas y Abzimas la degradación fue completamente dependiente de Mg^{2+} ^{141 139; 231; 232}. Sin embargo a pH=5,0 la degradación de ADN procedió tanto en presencia como en ausencia de Mg^{2+} , aunque en forma menos eficiente. La hidrólisis de ADN en ausencia de cationes divalentes había sido ya descrita para otra IgG (proveniente de leche de humanos)²³³. Si embargo, esta actividad fue encontrada a pH=7,0 indicando distintos requerimientos para la catálisis. Distintos trabajos realizados en cuanto al análisis estructural y mutacional de diversas DNAsas demostraron que, el corte de ADN ocurre por un mecanismo catalítico acido-base para la ruptura del enlace fosfodiéster. Donde dos residuos de histidina juegan un papel importante, uno como dador de protones a moléculas de agua que actúan como nucleófilos atacando la unión fosfato con la ayuda de iones metálicos bivalentes y la otra como acceptor de protones del anión oxígeno^{234; 235}. En ED-10, el pKa de las histidinas 27d y 93 de la cadena liviana del AcMo (L27D y L93 según la denominación cristalográfica, utilizada en el capítulo I) podría suponerse al rededor de 6,0 ya que ambas se encuentran en un entorno polar, accesibles al solvente. A pH 5,0 dichas histidinas estarían cargadas positivamente, permitiendo la hidrólisis del enlace fosfodiéster en la ausencia de un metal divalente, aunque menos eficientemente.

Como se mencionó anteriormente el AcMo de BV04-01 posee actividad DNAsa, para este Fab se construyó por simulación un modelo en el cual la histidina L27d junto con la

tirosina L32 y el fosfato 3' del d(T)₃ estaban alineados de manera de coordinar Mg²⁺. Más aún la mutación de esa histidina a alanina resultó en una disminución dramática de la actividad²³⁶. En un trabajo recientemente publicado¹⁷⁶ se asigna la actividad catalítica del AcMo anti-DNA 3D8 a las dos histidinas presentes en las regiones CDR de este AcMo. La primera H35 no está conservada en ED-10 ni en BV04-01, mientras que la segunda L94 está conservada posicionalmente en ED-10 y BV0401. En ese mismo trabajo se indicó que la histidina H35 no pareciera ser fundamental para la actividad DNAsa mientras que la L94 lo fue. Si se compara las estructuras cristalográficas y las secuencias de los CDRs de ED-10 y BV04-01 (Figura 50 A y D). Se puede ver que las dos histidinas están conservadas en cuanto a su disposición espacial, así como la tirosina L32.

De la misma manera, el alineamiento de las estructuras de ED-10 con 3D8 muestra que en ésta última, la tirosina L32 se encuentra en una posición muy similar a ED-10. La histidina L27d no está presente no obstante en una posición similar se encuentra una asparragina (L26), residuo que ha sido descrito en sitios activos de nucleasas. La histidina L94, está conservada en el mismo CDR, solo que en la estructura de 3D8 está un poco más alejada. No hay que perder de vista que no se cuenta con la estructura de 3D8 unida al ADN, por lo tanto se utilizó en esta comparación la libre. Por lo cual tras la unión, este CDR podría moverse y posicionarse como en ED-10, acercándose a la tirosina al ADN para coordinar el metal (Figura 50 B y D). Por el contrario, si se compara la estructura cristalográfica de ED-10 con la de DNA-1, para el cual nunca se describió actividad DNAsa, se observa que la contraparte de la histidina L27d de ED-10 está ausente y que la histidina L90 y la L91 de DNA-1 no se encuentran posicionadas correctamente (Figura 50 C y D). Esto, sumado a que la correspondencia estructural general entre ED-10 y DNA-1 es mucho menor que entre ED-10 y los otros dos casos AcMos descritos arriba marca una diferencia entre DNA-1 y los otros tres AcMos.

En cuanto la eficiencia de la actividad nucleasa, si la comparamos con la descrita por Kim y colaboradores¹⁷⁶ vemos que a pH=7,0 en presencia de Mg²⁺, tanto 1 uM de ED-10 Fab como 1 uM scFv de 3D8 son capaces de hidrolizar 100 ng de plásmido en 1 h. Sin embargo esta actividad es menor que la descrita para DNAsas naturales como DNAsa-1¹⁷⁶. Esto no llama la atención ya que ED-10 fue seleccionado de entre los otros AcMos de

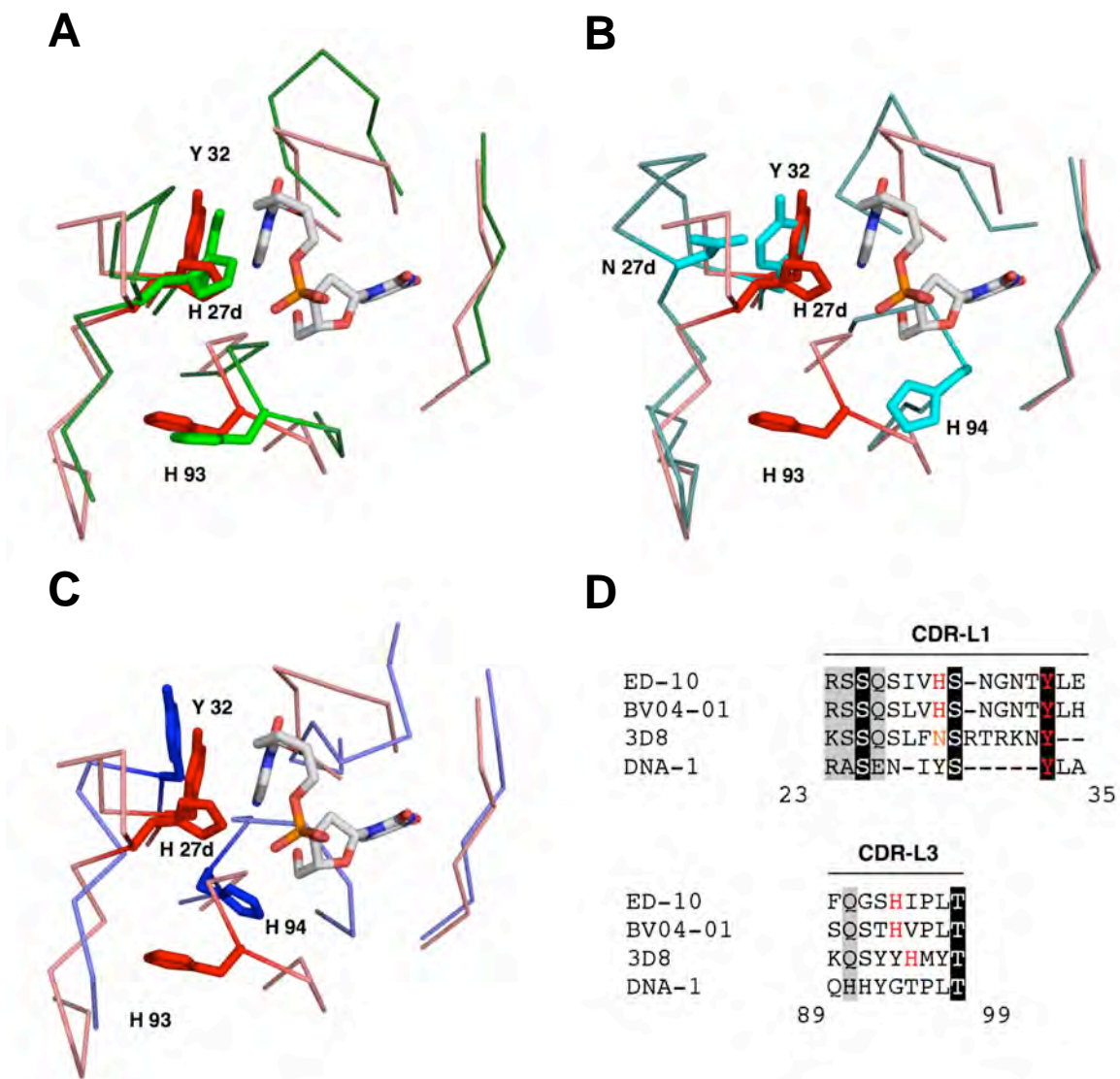


Figura 50. Comparación del sitio de combinación de ED-10 con distintos AcMos anti-ADN cristalizados. En todos los casos ED-10 aparece en rojo y (A) BV04-01 (verde); (B)3D8 (cian); (C) DNA-1 (azul). Las cadenas laterales de las histidinas L27d, L93 y la tirosina L32 se muestran representadas como bastones al igual que el ADN. (D) Alineamiento de las secuencias de los CDR L1 y L3 de los distintos anticuerpos. Resaltado en negro se muestran los aminoácidos conservados y en gris los semi-conservados entre los distintos CDRs. Resaltadas en rojo están los residuos propuestos como importantes para la actividad nucleasa.

acuerdo a su capacidad de unión a ADN y no la de hidrólisis, actividades aparentemente disociadas.¹⁷⁶

Por lo tanto, para encontrar un Fab con mayor actividad DNAsa habrá que realizar una nueva búsqueda, en los clones a partir de los cuales surgió ED-10, seleccionando esta vez por su máxima capacidad catalítica. También sería posible aleatorizar los CDR de ED-10 con la técnica de *phage display* de manera de mejorar la actividad enzimática. De esta manera se aprovecha la estructura tridimensional del sitio de combinación de ED-10, optimizado para la unión a ADN, como estructura inicial para obtener una actividad DNAsa más eficiente.

Conclusiones Generales

Conclusiones generales

Como se planteó inicialmente, el objetivo de este trabajo de tesis fue caracterizar un mecanismo biológico de alta relevancia tanto básica e inmunológica como en patologías humanas, integrando diversas metodologías. En una primera etapa, se determinó que el epítotope reconocido por el AcMo ED-10 comprende el extremo 5' TC de una de las hebras del oligonucleótido de ADN presente en el complejo inmunógeno. Se demostró también, que éste es capaz de reconocer dicha secuencia tanto en un contexto de ADN cadena simple como doble con una afinidad similar. Asimismo, se determinó que la interacción de ED-10 con el ADN presenta características opuestas a la mayoría de proteínas que unen ADN cadena doble. En particular, ésta resultó ser insensible a la fuerza iónica y al pH, sin embargo, el cambio en la polaridad de la solución produjo una disminución en las afinidad, sugiriendo fuertemente que las fuerzas hidrofóbicas juegan un papel central en la interacción. Este resultado coincidió, notablemente, con lo determinado por estructura. El análisis de la unión del ADNsc al Fab por dicroísmo circular, evidenció un cambio en el entorno de cadenas aromáticas del sitio de combinación, indicando que la unión con el ADN se da a través de la interacción entre las bases del ADN y las cadenas laterales de los residuos aromáticos del Fab.

Con el fin de completar el estudio de la interacción entre ED10 y el ADN y conocer el detalle de residuos y bases involucrados se planteó cristalizar el complejo ED-10:ADN. La resolución de esta estructura permitió confirmar el modo de unión del ADN al sitio de combinación del anticuerpo, inferido anteriormente mediante técnicas espectroscópicas. Además, la comparación con la estructura del Fab libre obtenida anteriormente en el laboratorio confirmó que existe un reacomodamiento de los segmentos hipervariables del Fab. Este ocurre principalmente en el CDRH3 y en menor medida en el CDRL1, posibilitando la unión del ADN. La ubicación diferencial de estos CDRs en la estructura del complejo con respecto a la estructura del Fab libre sugiere un mecanismo de ajuste inducido entre ED-10 y el ADN inmunógeno, el cual se evaluó posteriormente en estudios cinéticos.

La conformación adoptada por ED-10 para reconocer al ADN es similar a la utilizada por los únicos dos AcMos anti-ADN cristalizados (BV04-01 y DNA-1). Con la diferencia que,

tanto BV04-01 y como DNA-1 fueron aislados de ratones propensos a desarrollar lupus y por lo tanto no se conoce el inmunógeno que les dio origen. Sin embargo, a pesar de compartir la misma *firma estructural*, ED-10 posee una afinidad mucho mayor por el ADN que estos anticuerpos, hecho que se puede asignar a una maduración dirigida por el antígeno en el animal inmunizado. Si bien la obtención de la estructura del complejo ED-10:ADN permitió avanzar hacia el conocimiento de las bases estructurales de la interacción, ésta no pudo explicar las diferencias en la afinidad observadas entre ED-10 y los otros dos AcMos anti-ADN cristalizados. La caracterización termodinámica de la unión de ED-10 con su ADN inmunógeno proveyó el complemento indispensable para evaluar las fuerzas involucradas.

La comparación de los parámetros termodinámicos de la interacción de ED-10 con el ADN inmunógeno (ADNi) y con un ADN no específico ($d(T)_n$) permitió explicar la diferencia en la afinidad entre los complejos formados. En ambos casos la interacción está dirigida entálpicamente y opuesta por la entropía. Sin embargo, la magnitud del cambio entálpico tras la unión del ADNi es mucho mayor que la medida luego de la del $d(T)_5$. Lo cual es interpretado como formación de un mayor número de enlaces entre el ADNi y el Fab acompañando la unión. Esta condición da idea de una interacción más íntima lograda mediante un proceso de maduración del anticuerpo ante la inmunización repetida con este antígeno. Otra evidencia de esto es que la interacción con el ADNi está acompañada por un ΔC_p negativo, *firma termodinámica* de las interacciones específicas proteína-ADN. Esto es debido a que reflejan las características de una interfaz ajustada, como el ocultamiento del solvente de la superficie hidrofóbica y la restricción en los grados de libertad de la proteína, el ADN y las moléculas de agua atrapadas en la interfaz. Estos factores no están presentes en las interacciones no específicas, por lo que poseen un $\Delta C_p \approx 0$. En la interacción de ED-10 con el ADN $d(T)_5$ no se observa un ΔC_p apreciable indicando la presencia de una interacción no consolidada, con presencia de solvente. Los experimentos de UV-CD sugirieron que la interacción de tanto el ADNi como con el $d(T)_5$ con ED-10 en solución, induce cambios similares en el entorno de las cadenas laterales aromáticas de los residuos del sitio de combinación del Fab. Por lo tanto, se puede inferir que ambos ADN se unen de una manera globalmente semejante, utilizando el D-ARM. No obstante, al haber sufrido un proceso de maduración antigénica dirigido por el antígeno, la interacción del Fab con el

ADNi esta profundamente optimizada formando más enlaces y/o enlaces más estables y específicos. En su conjunto estos resultados demuestran que, la energía de las interacciones formadas no puede ser determinada *a priori* a partir de la cristalografía. Siendo en definitiva la termodinámica, la que aporta la respuesta final en cuanto a las diferencias de afinidad observadas entre los distintos complejos: ED-10:site 35-6B y DNA-1:d(T)₅ y BV04-01:d(T)₃.

La cinética resultó ser una herramienta fundamental para definir el mecanismo de la interacción entre ED-10 y el ADN. La interacción entre ED-10 y el ADN se asignó a un mecanismo de dos estados, tanto al equilibrio como cinéticamente, con una única fase detectable de asociación y otra de disociación. En este caso, también, resultó útil comparar los parámetros cinéticos de una interacción anticuerpo-ADN madura (ED-10:ADNi) y otra inmadura (ED-1:d(T)_n). La velocidad de asociación entre ED-10 y el ADN es la misma en ambos casos, indicando que, en esta etapa no prima el reconocimiento de una secuencia específica. El valor obtenido está en el límite de las velocidades de asociación determinadas para interacciones antígeno-anticuerpo ($\sim 10^6$). A pesar de esto, este valor es dos ordenes menor que la velocidad de asociación puramente difusional propuesta por van Holde para una proteína y una molécula pequeña. La presencia de una constante de asociación cinética más lenta que la difusional sugiere la ocurrencia del cambios estructurales en algunos de los CDRs de ED-10 con la unión del ADN (determinados en solución por UV-CD y observados en las estructuras cristalográficas). Si bien estos cambios en el anticuerpo se detectaron tanto para la unión con el ADNi como para d(T). El complejo final formado con el ADNi resulta ser mucho más estable de acuerdo a una constante de disociación cinética medida de 2 ordenes de magnitud más lenta que la medida para la interacción entre ED-10 y d(T). En su conjunto, estos resultados indican que si bien ambos complejos se asocian con la misma velocidad, la presencia de una constante de disociación extremadamente lenta para el complejo ED-10:ADNi es la fuente de su alta afinidad.

Estos resultados combinados con los obtenidos de la caracterización termodinámica permiten plantear un modelo en el proceso de maduración ocurrido en ED-10 luego de sucesivas exposiciones a el ADNi resultó en una interacción muy afín, que se explica a partir de una fuerte componente entálpica, que dirige la reacción, y una consecuente

velocidad de disociación muy lenta. Esta interacción trae aparejado un cambio de capacidad calorífica negativo, típico de ocultamiento de área de superficie en interacciones proteína-ADN específicas. Por otro lado, la interacción entre ED-10 y d(T)_n, antígeno con el cual ED-10 no ha madurado, esta caracterizada por tener muchísimo menor afinidad, aún con los anticuerpos como modelo de interacción. Este complejo, termodinámicamente, se caracteriza por presentar una componente entálpica menor, indicando menor formación de enlaces con respecto a ED-10-ADNi. Donde, la ausencia de cambio de capacidad calorífica indica una interfaz menos consolidada, la que permanece solvatada y dinámica. Finalmente la diferencia de afinidad se apoya también en una disociación aproximadamente 100-veces más rápida del complejo.

Por último, la presencia de actividad nucleasa de ADN en ED-10 puede explicarse a partir de la presencia de residuos en posiciones claves que se encuentran conservados en otros AcMos anti-ADN para los que se demostró esta actividad. Si bien ED-10 fue seleccionado a partir del panel de AcMos por su actividad de unión a ADN. El hecho que posea actividad de nucleasa podría representar una actividad primaria en el anticuerpo codificada en una ó más subclases de genes de la línea germinal. Más aún, el hecho que ED-10 sea capaz de hidrolizar completamente un plásmido sugeriría que la catálisis no requeriría una localización precisa de las bases del ADN intercaladas entre los residuos aromáticos del sitio de combinación. En acuerdo con la hipótesis que esta actividad proviene de la línea germinal. Por lo tanto una profundización del estudio de esta actividad será necesario para determinar el mecanismo de esta actividad catalítica descrita en ED-10.

Finalmente, la caracterización detallada de la interacción entre ED-10 y el ADN es la primera realizada entre un AcMo anti-ADN y el ADN que le dio origen. Esta caracterización aportó avances cruciales para un completo entendimiento de la formación de complejos anti-ADN:ADN, generando progresos en dos aspectos fundamentales. El primero, colaborar con el entendimiento de la patología del LES, donde como se describió más arriba los anticuerpos anti-ADN son una característica fundamental en la patología. El segundo aspecto, como se resaltó, es el conocimiento de los mecanismos moleculares del reconocimiento entre proteína-ADN cadena simple.

En cuanto al primer aspecto, sin ser este un trabajo cuyo propósito fue estudiar la patología generada por los anticuerpos anti-ADN, clarificar los mecanismos por los cuales éstos reconocen al ADN ayuda a dilucidar los mecanismos por los cuales generan daño tisular y definir las bases de su patogenicidad. En este sentido, es una ventaja poseer un sistema caracterizado en detalle atómico y molecular. Estos descubrimientos permitirán en un futuro encarar el desarrollo de abordajes terapéuticos, basados en el bloqueo del sitio de unión de anticuerpos patogénicos por moléculas pequeñas.

Bibliografía

1. Oda, M., Furukawa, K., Ogata, K., Sarai, A. & Nakamura, H. (1998). Thermodynamics of specific and non-specific DNA binding by the c-Myb DNA-binding domain. *J Mol Biol* **276**, 571-90.
2. Harrison, S. C. (1991). A structural taxonomy of DNA-binding domains. *Nature* **353**, 715-9.
3. Jen-Jacobson, L. (1997). Protein-DNA recognition complexes: conservation of structure and binding energy in the transition state. *Biopolymers* **44**, 153-80.
4. Jones, S., van Heyningen, P., Berman, H. M. & Thornton, J. M. (1999). Protein-DNA interactions: A structural analysis. *J Mol Biol* **287**, 877-96.
5. Jen-Jacobsen, L., Engler, L.E., Ames, J. T., Kurpiewski, M.R. and Grigorescu, A. . (2000). Thermodynamic Parameters of Specific and Nonspecific Protein-DNA Binding. *Supramolecular Chemistry* **12**, 143-160.
6. Privalov, P. L., Jelesarov, I., Read, C. M., Dragan, A. I. & Crane-Robinson, C. (1999). The energetics of HMG box interactions with DNA: thermodynamics of the DNA binding of the HMG box from mouse sox-5. *J Mol Biol* **294**, 997-1013.
7. Privalov, P. L., Dragan, A. I., Crane-Robinson, C., Breslauer, K. J., Remeta, D. P. & Minetti, C. A. (2007). What drives proteins into the major or minor grooves of DNA? *J Mol Biol* **365**, 1-9.
8. Spolar, R. S. & Record, M. T., Jr. (1994). Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. *Science* **263**, 777-84.
9. Ladbury, J. E., Wright, J. G., Sturtevant, J. M. & Sigler, P. B. (1994). A thermodynamic study of the trp repressor-operator interaction. *J Mol Biol* **238**, 669-81.
10. Ferrari, M. E. & Lohman, T. M. (1994). Apparent heat capacity change accompanying a nonspecific protein-DNA interaction. Escherichia coli SSB tetramer binding to oligodeoxyadenylates. *Biochemistry* **33**, 12896-910.
11. Lundback, T. & Hard, T. (1996). Sequence-specific DNA-binding dominated by dehydration. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 4754-9.
12. Murphy, K. P., Privalov, P. L. & Gill, S. J. (1990). Common features of protein unfolding and dissolution of hydrophobic compounds. *Science* **247**, 559-61.
13. Takeda, Y., Ross, P. D. & Mudd, C. P. (1992). Thermodynamics of Cro protein-DNA interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 8180-4.
14. Gait, M. J. & Blackburn, G. M. (1997). *Nucleic acids in chemistry and biology*. Interactions of proteins with nucleic acids, oxford university press, Oxford.
15. Theobald, D. L., Mitton-Fry, R. M. & Wuttke, D. S. (2003). Nucleic acid recognition by OB-fold proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **32**, 115-33.
16. Desveaux, D., Allard, J., Brisson, N. & Sygusch, J. (2002). A new family of plant transcription factors displays a novel ssDNA-binding surface. *Nat Struct Biol* **9**, 512-7.
17. Datta, S., Larkin, C. & Schildbach, J. F. (2003). Structural insights into single-stranded DNA binding and cleavage by F factor TraI. *Structure* **11**, 1369-79.
18. Braddock, D. T., Louis, J. M., Baber, J. L., Levens, D. & Clore, G. M. (2002). Structure and dynamics of KH domains from FBP bound to single-stranded DNA. *Nature* **415**, 1051-6.
19. Braddock, D. T., Baber, J. L., Levens, D. & Clore, G. M. (2002). Molecular basis of sequence-specific single-stranded DNA recognition by KH domains: solution structure of a complex between hnRNP K KH3 and single-stranded DNA. *Embo J* **21**, 3476-85.
20. Brayer, G. D. & McPherson, A. (1984). Mechanism of DNA binding to the gene 5 protein of bacteriophage fd. *Biochemistry* **23**, 340-9.
21. Stern, J. C., Anderson, B. J., Owens, T. J. & Schildbach, J. F. (2004). Energetics of the sequence-specific binding of single-stranded DNA by the F factor relaxase domain. *J Biol Chem* **279**, 29155-9.
22. Nugent, C. I., Hughes, T. R., Lue, N. F. & Lundblad, V. (1996). Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science* **274**, 249-52.
23. Lei, M., Baumann, P. & Cech, T. R. (2002). Cooperative binding of single-stranded telomeric DNA by the Pot1 protein of Schizosaccharomyces pombe. *Biochemistry* **41**, 14560-8.
24. Lohman, T. M. & Ferrari, M. E. (1994). Escherichia coli single-stranded DNA-binding protein: multiple DNA-binding modes and cooperativities. *Annu Rev Biochem* **63**, 527-70.
25. Lopez, M. M., Yutani, K. & Makhatazde, G. I. (1999). Interactions of the major cold shock protein of Bacillus subtilis CspB with single-stranded DNA templates of different base composition. *J Biol Chem* **274**, 33601-8.
26. Kozlov, A. G. & Lohman, T. M. (1998). Calorimetric studies of E. coli SSB protein-single-stranded DNA interactions. Effects of monovalent salts on binding enthalpy. *J Mol Biol* **278**, 999-1014.

27. Edelman, G. M. (1959). DISSOCIATION OF γ -GLOBULIN. *J. Am. Chem. Soc.* **81**, pp 3155 - 3156.
28. Porter, R. R. (1959). The hydrolysis of rabbit γ -globulin and antibodies with crystalline papain. *Biochem. J.* **73**, 119-127.
29. Poljak, R. J., Amzel, L. M., Avey, H. P., Chen, B. L., Phizackerley, R. P. & Saul, F. (1973). Three-dimensional structure of the Fab' fragment of a human immunoglobulin at 2,8-Å resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**, 3305-10.
30. Davies, D. R. & Chacko, S. (1993). Antibody Structure. *Acc. Chem. Res.* **26**, 421-427.
31. Guddat, L. W., Herron, J. N. & Edmundson, A. B. (1993). Three-dimensional structure of a human immunoglobulin with a hinge deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 4271-5.
32. Alzari, P. M., Lascombe, M. B. & Poljak, R. J. (1988). Three-dimensional structure of antibodies. *Annu Rev Immunol* **6**, 555-80.
33. Poljak, R. J. (1991). Structure of antibodies and their complexes with antigens. *Mol Immunol* **28**, 1341-5.
34. Davies, D. R. & Cohen, G. H. (1996). Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7-12.
35. Constantine, K. L., Friedrichs, M. S., Metzler, W. J., Wittekind, M., Hensley, P. & Mueller, L. (1994). Solution structure of an isolated antibody VL domain. *J Mol Biol* **236**, 310-27.
36. Chothia, C., Lesk, A. M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S. J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E. A., Davies, D., Tulip, W. R. & et al. (1989). Conformations of immunoglobulin hypervariable regions. *Nature* **342**, 877-83.
37. Martin, A. C. & Thornton, J. M. (1996). Structural families in loops of homologous proteins: automatic classification, modelling and application to antibodies. *Journal of Molecular Biology* **263**, 800-815.
38. Al-Lazikani, B., Lesk, A. M. & Chothia, C. (1997). Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* **273**, 927-948.
39. Vargas-Madrazo, E., Almagro, J. C. & Lara-Ochoa, F. (1995). Structural repertoire in VH pseudogenes of immunoglobulins: comparison with human germline genes and human amino acid sequences. *J Mol Biol* **246**, 74-81.
40. Rees, A. R., Pedersen, J. T., Searle, S. J., Henry, A. H. & Webster, D. M. (1995). *Immunochemistry. Antibody Structure from x-Ray Crystallography and Molecular Modeling* (van Oss, C. J. & van Regenmoertel, M. H. V., Eds.), Marcel Dekker, New York.
41. MacCallum, R. M., Martin, A. C. & Thornton, J. M. (1996). Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J Mol Biol* **262**, 732-45.
42. Segal, D. M., Padlan, E. A., Cohen, G. H., Rudikoff, S., Potter, M. & Davies, D. R. (1974). The three-dimensional structure of a phosphorylcholine-binding mouse immunoglobulin Fab and the nature of the antigen binding site. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 4298-302.
43. Herron, J. N., He, X. M., Mason, M. L., Voss, E. W., Jr. & Edmundson, A. B. (1989). Three-dimensional structure of a fluorescein-Fab complex crystallized in 2-methyl-2,4-pentanediol. *Proteins* **5**, 271-80.
44. Stanfield, R. L. & Wilson, I. A. (1993). Antibody-antigen interactions. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 113-118.
45. Garcia, K. C., Ronco, P. M., Verroust, P. J., Brunger, A. T. & Amzel, L. M. (1992). Three-dimensional structure of an angiotensin II-Fab complex at 3 Å: hormone recognition by an anti-idiotypic antibody. *Science* **257**, 502-7.
46. Padlan, E. A. (1990). On the nature of antibody combining sites: unusual structural features that may confer on these sites an enhanced capacity for binding ligands. *Proteins* **7**, 112-24.
47. Nezlin, R. S. (1998). *The Immunoglobulins: Structure and Function*, Academic Press, New York.
48. Sheriff, S. (1993). Antibody-protein complexes. *Immunomethods* **3**, 222-227.
49. Brunger, A. T., Leahy, D. J., Hynes, T. R. & Fox, R. O. (1991). 2.9 Å resolution structure of an anti-dinitrophenyl-spin-label monoclonal antibody Fab fragment with bound hapten. *J Mol Biol* **221**, 239-56.
50. Tulip, W. R., Varghese, J. N., Laver, W. G., Webster, R. G. & Colman, P. M. (1992). Refined crystal structure of the influenza virus N9 neuraminidase-NC41 Fab complex. *J Mol Biol* **227**, 122-48.
51. Kabat, E. A. & Wu, T. T. (1991). Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes,

- minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol* **147**, 1709-19.
52. Colman, P. M. (1988). Structure of antibody-antigen complexes: implications for immune recognition. *Adv Immunol* **43**, 99-132.
 53. Capellini, R., Polli, C. & Celada, F. (1957). DNA-reacting factor in serum of a lupus patient. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* **96**, 572.
 54. Ternynck, T. & Avrameas, S. (1986). Murine natural monoclonal autoantibodies: a study of their polyspecificities and their affinities. *Immunol Rev.* **94**, 99-112.
 55. Tan, E. M. (1989). Antinuclear antibodies: diagnostic markers for autoimmune diseases and probes for cell biology. *Adv Immunol* **44**, 93-151.
 56. Marshall, E. (2002). Lupus: mysterious disease holds its secrets tight. *Science* **296**, 689-91.
 57. Andrews, B. S., Eisenberg, R. A., Theofilopoulos, A. N., Izui, S., Wilson, C. B., McConahey, P. J., Murphy, E. D., Roths, J. B. & Dixon, F. J. (1978). Spontaneous murine lupus-like syndromes. Clinical and immunopathological manifestations in several strains. *J Exp Med* **148**, 1198-215.
 58. Marion, T. N., Bothwell, A. L., Briles, D. E. & Janeway, C. A., Jr. (1989). IgG anti-DNA autoantibodies within an individual autoimmune mouse are the products of clonal selection. *J Immunol* **142**, 4269-74.
 59. Radic, M. Z. & Weigert, M. (1994). Genetic and structural evidence for antigen selection of anti-DNA antibodies. *Annu Rev Immunol* **12**, 487-520.
 60. Tillman, D. M., Jou, N. T., Hill, R. J. & Marion, T. N. (1992). Both IgM and IgG anti-DNA antibodies are the products of clonally selective B cell stimulation in (NZB x NZW)F1 mice. *J Exp Med* **176**, 761-79.
 61. van Es, J. H., Gmelig Meyling, F. H., van de Akker, W. R., Aanstoot, H., Derksen, R. H. & Logtenberg, T. (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**, 461-70.
 62. Rekvig, O. P., Moens, U., Sundsfjord, A., Bredholt, G., Osei, A., Haaheim, H., Traavik, T., Arnesen, E. & Haga, H. J. (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**, 2045-54.
 63. Moens, U., Seternes, O. M., Hey, A. W., Silsand, Y., Traavik, T., Johansen, B. & Rekvig, O. P. (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 U S A* **92**, 12393-7.
 64. Moens, U., Mathiesen, I., Ghelue, M. V. & Rekvig, O. P. (2002). Green fluorescent protein modified to bind DNA initiates production of anti-DNA antibodies when expressed in vivo. *Mol Immunol* **38**, 505-14.
 65. Marchini, B., Puccetti, A., Dolcher, M. P., Madaio, M. P. & Migliorini, P. (1995). Induction of anti-DNA antibodies in non autoimmune mice by immunization with a DNA-DNAase I complex. *Clin Exp Rheumatol* **13**, 7-10.
 66. Desai, D. D., Krishnan, M. R., Swindle, J. T. & Marion, T. N. (1993). Antigen-specific induction of antibodies against native mammalian DNA in nonautoimmune mice. *J Immunol* **151**, 1614-26.
 67. Desai, D. D. & Marion, T. N. (2000). Induction of anti-DNA antibody with DNA-peptide complexes. *Int Immunol* **12**, 1569-78.
 68. Cerutti, M. L., Centeno, J. M., Goldbaum, F. A. & de Prat-Gay, G. (2001). Generation of sequence-specific, high affinity anti-DNA antibodies. *J Biol Chem* **276**, 12769-73.
 69. Cerutti, M. L., Zarebski, L. M., de Prat Gay, G. & Goldbaum, F. A. (2005). A viral DNA-binding domain elicits anti-DNA antibodies of different specificities. *Mol Immunol* **42**, 327-33.
 70. Sundar, K., Jacques, S., Gottlieb, P., Villars, R., Benito, M. E., Taylor, D. K. & Spatz, L. A. (2004). Expression of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 (EBNA-1) in the mouse can elicit the production of anti-dsDNA and anti-Sm antibodies. *J Autoimmun* **23**, 127-40.
 71. Rekvig, O. P. & Nossent, J. C. (2003). Anti-double-stranded DNA antibodies, nucleosomes, and systemic lupus erythematosus: a time for new paradigms? *Arthritis Rheum* **48**, 300-12.
 72. Stollar, B. D. (1981). The antigenic potential and specificity of nucleic acids, nucleoproteins, and their modified derivatives. *Arthritis Rheum* **24**, 1010-8.
 73. Voss, E. W., Jr. (1988). *Antibodies in SLE*, Boca Raton.

74. Braun, R. P. & Lee, J. S. (1987). Equilibrium binding parameters of an autoimmune monoclonal antibody specific for double-stranded DNA. *J Immunol* **139**, 175-9.
75. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (1994). *Molecular Biology of the Cell* 3er ed edit, Garland, New York.
76. Tuerk, C. & Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**, 505-10.
77. Herrmann, M., Winkler, T. H., Fehr, H. & Kalden, J. R. (1995). Preferential recognition of specific DNA motifs by anti-double-stranded DNA autoantibodies. *Eur J Immunol* **25**, 1897-904.
78. Wellmann, U., Letz, M., Herrmann, M., Angermuller, S., Kalden, J. R. & Winkler, T. H. (2005). The evolution of human anti-double-stranded DNA autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 9258-63.
79. Di Pietro, S. M., Centeno, J. M., Cerutti, M. L., Lodeiro, M. F., Ferreira, D. U., Alonso, L. G., Schwarz, F. P., Goldbaum, F. A. & de Prat-Gay, G. (2003). Specific antibody-DNA interaction: a novel strategy for tight DNA recognition. *Biochemistry* **42**, 6218-27.
80. Lee, J. S., Lewis, J. R., Morgan, A. R., Mosmann, T. R. & Singh, B. (1981). Monoclonal antibodies showing sequence specificity in their interaction with single-stranded DNAs. *Nucleic Acids Res* **9**, 1707-21.
81. Lee, J. S., Dombroski, D. F. & Mosmann, T. R. (1982). Specificity of autoimmune monoclonal Fab fragments binding to single-stranded deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* **21**, 4940-5.
82. Ballard, D. W. & Voss, E. W., Jr. (1985). Base specificity and idiotyping of anti-DNA autoantibodies reactive with synthetic nucleic acids. *J Immunol* **135**, 3372-80.
83. Swanson, P. C., Yung, R. L., Blatt, N. B., Eagan, M. A., Norris, J. M., Richardson, B. C., Johnson, K. J. & Glick, G. D. (1996). Ligand recognition by murine anti-DNA autoantibodies. II. Genetic analysis and pathogenicity. *J Clin Invest* **97**, 1748-60.
84. Tetin, S. Y., Rumbley, C. A., Hazlett, T. L. & Voss, E. W., Jr. (1993). Elucidation of anti-ssDNA autoantibody BV 04-01 binding interactions with homooligonucleotides. *Biochemistry* **32**, 9011-7.
85. Stevens, S. Y. & Glick, G. D. (1999). Evidence for sequence-specific recognition of DNA by anti-single-stranded DNA autoantibodies. *Biochemistry* **38**, 560-8.
86. Gavalchin, J., Nicklas, J. A., Eastcott, J. W., Madaio, M. P., Stollar, B. D., Schwartz, R. S. & Datta, S. K. (1985). Lupus prone (SWR x NZB)F1 mice produce potentially nephritogenic autoantibodies inherited from the normal SWR parent. *J Immunol* **134**, 885-94.
87. Dang, H. & Harbeck, R. J. (1982). A comparison of anti-DNA antibodies from serum and kidney eluates of NZB x NZW F1 mice. *J Clin Lab Immunol* **9**, 139-45.
88. Marion, T. N., Tillman, D. M., Jou, N. T. & Hill, R. J. (1992). Selection of immunoglobulin variable regions in autoimmunity to DNA. *Immunol Rev* **128**, 123-49.
89. Radic, M. Z. & Seal, S. N. (1997). Selection of recurrent V genes and somatic mutations in autoantibodies to DNA. *Methods* **11**, 20-6.
90. Shlomchik, M., Mascelli, M., Shan, H., Radic, M. Z., Pisetsky, D., Marshak-Rothstein, A. & Weigert, M. (1990). Anti-DNA antibodies from autoimmune mice arise by clonal expansion and somatic mutation. *J Exp Med* **171**, 265-92.
91. Ohnishi, K., Ebling, F. M., Mitchell, B., Singh, R. R., Hahn, B. H. & Tsao, B. P. (1994). Comparison of pathogenic and non-pathogenic murine antibodies to DNA: antigen binding and structural characteristics. *Int Immunol* **6**, 817-30.
92. Jang, Y. J. & Stollar, B. D. (2003). Anti-DNA antibodies: aspects of structure and pathogenicity. *Cell Mol Life Sci* **60**, 309-20.
93. Brigido, M. M. & Stollar, B. D. (1991). Two induced anti-Z-DNA monoclonal antibodies use VH gene segments related to those of anti-DNA autoantibodies. *J Immunol* **146**, 2005-9.
94. Wloch, M. K., Alexander, A. L., Pippen, A. M., Pisetsky, D. S. & Gilkeson, G. S. (1997). Molecular properties of anti-DNA induced in preautoimmune NZB/W mice by immunization with bacterial DNA. *J Immunol* **158**, 4500-6.
95. Krishnan, M. R. & Marion, T. N. (1993). Structural similarity of antibody variable regions from immune and autoimmune anti-DNA antibodies. *J Immunol* **150**, 4948-57.
96. Metzger, H., Wofsy, L. & Singer, S. J. (1964). The Participation of a and B Polypeptide Chains in the Active Sites of Antibody Molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* **51**, 612-8.
97. Tanford, C. (1968). Chemical basis for antibody diversity and specificity. *Acc. Chem. Res.* **1**, 161-167.

98. Padlan, E. A. (1994). Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* **31**, 169-217.
99. Utsumi, S. & Karush, F. (1964). The Subunits of Purified Rabbit Antibody. *Biochemistry* **3**, 1329-38.
100. Rumbley, C. A., Denzin, L. K., Yantz, L., Tetin, S. Y. & Voss, E. W., Jr. (1993). Construction, characterization, and selected site-specific mutagenesis of an anti-single-stranded DNA single-chain autoantibody. *J Biol Chem* **268**, 13667-74.
101. Chen, Y. & Stollar, B. D. (1999). DNA binding by the VH domain of anti-Z-DNA antibody and its modulation by association of the VL domain. *J Immunol* **162**, 4663-70.
102. Radic, M. Z., Mascelli, M. A., Erikson, J., Shan, H. & Weigert, M. (1991). Ig H and L chain contributions to autoimmune specificities. *J Immunol* **146**, 176-82.
103. Polymenis, M. & Stollar, B. D. (1995). Domain interactions and antigen binding of recombinant anti-Z-DNA antibody variable domains. The role of heavy and light chains measured by surface plasmon resonance. *J Immunol* **154**, 2198-208.
104. Park, J. S., Kim, Y. T., Chung, H. Y., Baek, K. & Jang, Y. J. (2001). Primary structures and chain dominance of anti-DNA antibodies. *Mol Cells* **11**, 55-63.
105. Kieber-Emmons, T., von Feldt, J. M., Godillot, A. P., McCallus, D., Srikantan, V., Weiner, D. B. & Williams, W. V. (1994). Isolated VH4 heavy chain variable regions bind DNA characterization of a recombinant antibody heavy chain library derived from patient(s) with active SLE. *Lupus* **3**, 379-92.
106. Jang, Y. J. & Stollar, B. D. (1990). Ultraviolet cross-linking of helical oligonucleotides to two monoclonal MRL-1pr/1pr anti-DNA autoantibodies. Variations in H and L chain binding to DNA. *J Immunol* **145**, 3353-9.
107. Jang, Y. J., Lecerf, J. M. & Stollar, B. D. (1996). Heavy chain dominance in the binding of DNA by a lupus mouse monoclonal autoantibody. *Mol Immunol* **33**, 197-210.
108. Barry, M. M. & Lee, J. S. (1993). Cloning and expression of an autoimmune DNA-binding single chain Fv. Only the heavy chain is required for binding. *Mol Immunol* **30**, 833-40.
109. Kumar, S., Kalsi, J., Ravirajan, C. T., Rahman, A., Athwal, D., Latchman, D. S., Isenberg, D. A. & Pearl, L. H. (2000). Molecular cloning and expression of the Fabs of human autoantibodies in *Escherichia coli*. Determination of the heavy or light chain contribution to the anti-DNA/-cardiolipin activity of the Fab. *J Biol Chem* **275**, 35129-36.
110. Calcutt, M. J., Komissarov, A. A., Marchbank, M. T. & Deutscher, S. L. (1996). Analysis of a nucleic-acid-binding antibody fragment: Construction and characterization of heavy-chain complementarity-determining region switch variants. *Gene* **168**, 9-14.
111. Komissarov, A. A., Marchbank, M. T., Calcutt, M. J., Quinn, T. P. & Deutscher, S. L. (1997). Site-specific mutagenesis of a recombinant anti-single-stranded DNA Fab. Role of heavy chain complementarity-determining region 3 residues in antigen interaction. *J Biol Chem* **272**, 26864-70.
112. Komissarov, A. A. & Deutscher, S. L. (1999). Thermodynamics of Fab-ssDNA interactions: contribution of heavy chain complementarity determining region 3. *Biochemistry* **38**, 14631-7.
113. Ibrahim, S. M., Weigert, M., Basu, C., Erikson, J. & Radic, M. Z. (1995). Light chain contribution to specificity in anti-DNA antibodies. *J Immunol* **155**, 3223-33.
114. Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., Shindyalov, I. N. & Bourne, P. E. (2000). The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **28**, 235-42.
115. Cygler, M., Boodhoo, A., Lee, J. S. & Anderson, W. F. (1987). Crystallization and structure determination of an autoimmune anti-poly(dT) immunoglobulin Fab fragment at 3.0 Å resolution. *J Biol Chem* **262**, 643-8.
116. Herron, J. N., He, X. M., Ballard, D. W., Blier, P. R., Pace, P. E., Bothwell, A. L., Voss, E. W., Jr. & Edmundson, A. B. (1991). An autoantibody to single-stranded DNA: comparison of the three-dimensional structures of the unliganded Fab and a deoxynucleotide-Fab complex. *Proteins* **11**, 159-75.
117. Swanson, P. C., Cooper, B. C. & Glick, G. D. (1994). High resolution epitope mapping of an anti-DNA autoantibody using model DNA ligands. *J Immunol* **152**, 2601-12.
118. Hobby, P., Ward, F. J., Denbury, A. N., Williams, D. G., Staines, N. A. & Sutton, B. J. (1998). Molecular modeling of an anti-DNA autoantibody (V-88) and mapping of its V region epitopes recognized by heterologous and autoimmune antibodies. *J Immunol* **161**, 2944-52.
119. Prewitt, S. P., Komissarov, A. A., Deutscher, S. L. & Tanner, J. J. (2000). Crystallization and molecular-replacement studies of a recombinant antigen-binding fragment complexed with single-stranded DNA. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **56**, 1007-11.

120. Tanner, J. J., Komissarov, A. A. & Deutscher, S. L. (2001). Crystal structure of an antigen-binding fragment bound to single-stranded DNA. *J Mol Biol* **314**, 807-22.
121. Foote, J. & Winter, G. (1992). Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol Biol* **224**, 487-99.
122. Schildbach, J. F., Near, R. I., Brucoleri, R. E., Haber, E., Jeffrey, P. D., Ng, S. C., Novotny, J., Sheriff, S. & Margolies, M. N. (1993). Heavy chain position 50 is a determinant of affinity and specificity for the anti-digoxin antibody 26-10. *J Biol Chem* **268**, 21739-47.
123. Schuermann, J. P., Henzl, M. T., Deutscher, S. L. & Tanner, J. J. (2004). Structure of an anti-DNA fab complexed with a non-DNA ligand provides insights into cross-reactivity and molecular mimicry. *Proteins* **57**, 269-78.
124. Schuermann, J. P., Prewitt, S. P., Davies, C., Deutscher, S. L. & Tanner, J. J. (2005). Evidence for structural plasticity of heavy chain complementarity-determining region 3 in antibody-ssDNA recognition. *J Mol Biol* **347**, 965-78.
125. Yokoyama, H., Mizutani, R., Satow, Y., Komatsu, Y., Ohtsuka, E. & Nikaido, O. (2000). Crystal structure of the 64M-2 antibody Fab fragment in complex with a DNA dT(6-4)T photoproduct formed by ultraviolet radiation. *J Mol Biol* **299**, 711-23.
126. Boodhoo, A., Mol, C. D., Lee, J. S. & Anderson, W. F. (1988). Crystallization of immunoglobulin Fab fragments specific for DNA. *J Biol Chem* **263**, 18578-81.
127. Mol, C. D., Muir, A. K., Lee, J. S. & Anderson, W. F. (1994). Structure of an immunoglobulin Fab fragment specific for poly(dG).poly(dC). *J Biol Chem* **269**, 3605-14.
128. Mol, C. D., Muir, A. K., Cygler, M., Lee, J. S. & Anderson, W. F. (1994). Structure of an immunoglobulin Fab fragment specific for triple-stranded DNA. *J Biol Chem* **269**, 3615-22.
129. Barry, M. M., Mol, C. D., Anderson, W. F. & Lee, J. S. (1994). Sequencing and modeling of anti-DNA immunoglobulin Fv domains. Comparison with crystal structures. *J Biol Chem* **269**, 3623-32.
130. Stollar, B. D., Zon, G. & Pastor, R. W. (1986). A recognition site on synthetic helical oligonucleotides for monoclonal anti-native DNA autoantibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 4469-73.
131. Gololobov, G. V., Sun, M. & Paul, S. (1999). Innate antibody catalysis. *Mol Immunol* **36**, 1215-1222.
132. Pauling, L. (1948). Nature of forces between large molecules of biological interest *Nature (London)* **161**, 707-709.
133. Jencks, W. P. (1969). *Catalysis in Chemistry and Enzymology*, McGraw-Hill, New York.
134. Pollack, S. J., Jacobs, J. W. & Schultz, P. G. (1986). Selective chemical catalysis by an antibody. *Science* **234**, 1570-3.
135. Tramontano, A., Janda, K. D. & Lerner, R. A. (1986). Catalytic antibodies. *Science* **234**, 1566-70.
136. Paul, S., Sun, M., Mody, R., Tewary, H. K., Stemmer, P., Massey, R. J., Gianferrara, T., Mehrotra, S., Dreyer, T., Meldal, M. & et al. (1992). Peptidolytic monoclonal antibody elicited by a neuropeptide. *J Biol Chem* **267**, 13142-5.
137. Izadyar, L., Friboulet, A., Remy, M. H., Roseto, A. & Thomas, D. (1993). Monoclonal anti-idiotypic antibodies as functional internal images of enzyme active sites: production of a catalytic antibody with a cholinesterase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8876-80.
138. Paul, S., Volle, D. J., Beach, C. M., Johnson, D. R., Powell, M. J. & Massey, R. J. (1989). Catalytic hydrolysis of vasoactive intestinal peptide by human autoantibody. *Science* **244**, 1158-62.
139. Shuster, A. M., Gololobov, G. V., Kvashuk, O. A., Bogomolova, A. E., Smirnov, I. V. & Gabibov, A. G. (1992). DNA hydrolyzing autoantibodies. *Science* **256**, 665-7.
140. Li, L., Kaveri, S., Tyutyulkova, S., Kazatchkine, M. D. & Paul, S. (1995). Catalytic activity of anti-thyroglobulin antibodies. *Ann N Y Acad Sci* **764**, 570-2.
141. Gololobov, G. V., Rumbley, C. A., Rumbley, J. N., Schourov, D. V., Makarevich, O. I., Gabibov, A. G., Voss, E. W., Jr. & Rodkey, L. S. (1997). DNA hydrolysis by monoclonal anti-ssDNA autoantibody BV 04-01: origins of catalytic activity. *Mol Immunol* **34**, 1083-93.
142. Matsuura, K., Yamamoto, K. & Sinohara, H. (1994). Amidase activity of human Bence Jones proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **204**, 57-62.
143. Paul, S., Li, L., Kalaga, R., Wilkins-Stevens, P., Stevens, F. J. & Solomon, A. (1995). Natural catalytic antibodies: peptide-hydrolyzing activities of Bence Jones proteins and VL fragment. *J Biol Chem* **270**, 15257-61.

144. Kalaga, R., Li, L., O'Dell, J. R. & Paul, S. (1995). Unexpected presence of polyreactive catalytic antibodies in IgG from unimmunized donors and decreased levels in rheumatoid arthritis. *J Immunol* **155**, 2695-702.
145. Cerutti, M. L. (2003). Desarrollo y caracterización de anticuerpos contra un factor de transcripción viral unido a su ADN específico UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES, FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES.
146. Cantor, C. R., Warshaw, M. M. & Shapiro, H. (1970). Oligonucleotide interactions. 3. Circular dichroism studies of the conformation of deoxyoligonucleotides. *Biopolymers* **9**, 1059-77.
147. Baldwin, R. L. (1986). Temperature dependence of the hydrophobic interaction in protein folding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 8069-72.
148. Ha, J. H., Spolar, R. S. & Record, M. T., Jr. (1989). Role of the hydrophobic effect in stability of site-specific protein-DNA complexes. *J Mol Biol* **209**, 801-16.
149. Polikarpov, I., Oliva, G., Castellano, E. E., Garratt, R. C., Arruda, P. et al. . (1998). The protein crystallography beamline at LNLS, the Brazilian National Synchrotron Light source. . *Nucl. Instr. Meth. Phys. Res. A*, 159-164.
150. Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Meth. Enzymol.* **276A**, 307-326.
151. Kissinger, C. R., Gehlhaar, D. K. & Fogel, D. B. (1999). Rapid automated molecular replacement by evolutionary search. *Acta Cryst.* **D55**, 484-491.
152. Navaza, J. (1994). AMoRe: an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallogr.* **A50**, 157-163.
153. Jones, T. A. (1982). FRODO: a graphics fitting program for macromolecules. In *Computational chemistry* (Sayre, D., ed.), pp. 303-317. Clarendon Press, Oxford.
154. Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T. & Warren, G. L. (1998). Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallogr.* **D54**, 905-921.
155. Winn, M. D., Isupov, M. N. & Murshudov, G. N. (2001). Use of TLS parameters to model anisotropic displacements in macromolecular refinement. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **D57**, 122-33.
156. Gray, D. (1996). *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules* (Fasman, G. & Ed., Eds.), Plenum Press, New York.
157. Ladbury, J. E. & Chowdhry, B. Z. (1996). Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions. *Chem Biol* **3**, 791-801.
158. Jackson, S. E. & Fersht, A. R. (1991). Folding of chymotrypsin inhibitor 2. 1. Evidence for a twostate transition. . *Biochemistry* **30**, 10428-35.
159. Chen, X. & Matthews, C. R. (1994). Thermodynamic properties of the transition state for the rate-limiting step in the folding of the alpha subunit of tryptophan synthase. *Biochemistry* **33**, 6356-62.
160. AffinitySensors. *Iasys Methos Guide*. Interaction Analysis – 1theoretical approaches (Human-Computer Interface Limited, C., England., Ed.), 4, Affinity Sensors, Cambridge, England.
161. Heiling, K. L. B., Elbing; Bent, Roger (1998). *Current Protocols in Molecular Biology*, 1.7.1-1.7.16, John Wiley & Sons, Inc.
162. Coen, D. M. (2006). *Current Protocols in Molecular Biology*, 15.0.1-15.0.3, John Wiley & Sons, Inc.
163. Komissarov, A. A., Calcutt, M. J., Marchbank, M. T., Peletskaya, E. N. & Deutsher, S. L. (1996). Equilibrium binding studies of recombinant anti-single-stranded DNA Fab. Role of heavy chain complementarity-determining regions. *J Biol Chem* **271**, 12241-6.
164. Bill, R. M., Blatt, N. B. & Glick, G. D. (1997). Anti-DNA autoantibodies: the other DNA-binding proteins. *Bioorg Med Chem* **5**, 467-72.
165. Ackroyd, P. C., Cleary, J. & Glick, G. D. (2001). Thermodynamic basis for sequence-specific recognition of ssDNA by an autoantibody. *Biochemistry* **40**, 2911-22.
166. Cleary, J. & Glick, G. D. (2003). Mutational analysis of a sequence-specific ssDNA binding lupus autoantibody. *Biochemistry* **42**, 30-41.

167. Beckingham, J. A., Cleary, J., Bobeck, M. & Glick, G. D. (2003). Kinetic analysis of sequence-specific recognition of ssDNA by an autoantibody. *Biochemistry* **42**, 4118-26.
168. Pokkuluri, P. R., Bouthillier, F., Li, Y., Kuderova, A., Lee, J. & Cygler, M. (1994). Preparation, characterization and crystallization of an antibody Fab fragment that recognizes RNA. Crystal structures of native Fab and three Fab-mononucleotide complexes. *J Mol Biol* **243**, 283-97.
169. Guddat, L. W., Shan, L., Anchin, J. M., Linthicum, D. S. & Edmundson, A. B. (1994). Local and transmitted conformational changes on complexation of an anti-sweetener Fab. *J Mol Biol* **236**, 247-74.
170. Azuma, T., Hamaguchi, K. & Migita, S. (1972). Denaturation of Bence Jones proteins by guanidine hydrochloride. *J Biochem (Tokyo)* **72**, 1457-67.
171. Chakrabarty, A., Kortemme, T., Padmanabhan, S. & Baldwin, R. L. (1993). Aromatic side-chain contribution to far-ultraviolet circular dichroism of helical peptides and its effect on measurement of helix propensities. *Biochemistry* **32**, 5560-5.
172. Tetin, S. Y. & Linthicum, D. S. (1996). Circular dichroism spectroscopy of monoclonal antibodies that bind a superpotent guanidinium sweetener ligand. *Biochemistry* **35**, 1258-64.
173. Tetin, S. Y., Prendergast, F. G. & Venyaminov, S. Y. (2003). Accuracy of protein secondary structure determination from circular dichroism spectra based on immunoglobulin examples. *Anal Biochem* **321**, 183-7.
174. Levitt, M. & Perutz, M. F. (1988). Aromatic rings act as hydrogen bond acceptors. *J Mol Biol* **201**, 751-4.
175. Lawrence, M. C. & Colman, P. M. (1993). Shape complementarity at protein/protein interfaces. *J Mol Biol* **234**, 946-50.
176. Kim, Y. R., Kim, J. S., Lee, S. H., Lee, W. R., Sohn, J. N., Chung, Y. C., Shim, H. K., Lee, S. C., Kwon, M. H. & Kim, Y. S. (2006). Heavy and light chain variable single domains of an anti-DNA binding antibody hydrolyze both double- and single-stranded DNAs without sequence specificity. *J Biol Chem* **281**, 15287-95.
177. Yokoyama, H., Mizutani, R., Satow, Y., Komatsu, Y., Ohtsuka, E. & Nikaido, O. (1999). Crystal structures of the 64M-2 and 64M-3 antibody Fabs complexed with DNA (6-4) photoproducts. *Nucleic Acids Symp Ser*, 267-8.
178. Radic, M. Z., Mackle, J., Erikson, J., Mol, C., Anderson, W. F. & Weigert, M. (1993). Residues that mediate DNA binding of autoimmune antibodies. *J Immunol* **150**, 4966-77.
179. Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. & Foeller, C. (1991). *Sequences of proteins of immunological interest*. 5 edit, 1, U.S. Department of health and human services.
180. Griffiths, G. M., Berek, C., Kaartinen, M. & Milstein, C. (1984). Somatic mutation and the maturation of immune response to 2-phenyl oxazolone. *Nature* **312**, 271-5.
181. Wedemayer, G. J., Patten, P. A., Wang, L. H., Schultz, P. G. & Stevens, R. C. (1997). Structural insights into the evolution of an antibody combining site. *Science* **276**, 1665-9.
182. Yin, J., Beuscher, A. E. t., Andryski, S. E., Stevens, R. C. & Schultz, P. G. (2003). Structural plasticity and the evolution of antibody affinity and specificity. *J Mol Biol* **330**, 651-6.
183. Edmundson, A. B., Ely, K. R., Girling, R. L., Abola, E. E., Schiffer, M., Westholm, F. A., Fausch, M. D. & Deutsch, H. F. (1974). Binding of 2,4-dinitrophenyl compounds and other small molecules to a crystalline lambda-type Bence-Jones dimer. *Biochemistry* **13**, 3816-27.
184. Davies, D. R. & Padlan, E. A. (1992). Twisting into shape. *Curr Biol* **2**, 254-6.
185. Rini, J. M., Schulze-Gahmen, U. & Wilson, I. A. (1992). Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen recognition. *Science* **255**, 959-65.
186. Wilson, I. A. & Stanfield, R. L. (1994). Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes. *Curr Opin Struct Biol* **4**, 857-67.
187. Murphy, K. P. & Gill, S. J. (1991). Solid model compounds and the thermodynamics of protein unfolding. *J Mol Biol* **222**, 699-709.
188. Murphy, K. P., Freire, E. & Paterson, Y. (1995). Configurational effects in antibody-antigen interactions studied by microcalorimetry. *Proteins* **21**, 83-90.
189. Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F. & Lin, L. N. (1989). Rapid measurement of binding constants and heats of binding using a new titration calorimeter. *Anal Biochem* **179**, 131-7.
190. Livingstone, J. R., Spolar, R. S. & Record, M. T., Jr. (1991). Contribution to the thermodynamics of protein folding from the reduction in water-accessible nonpolar surface area. *Biochemistry* **30**, 4237-44.

191. Spolar, R. S., Livingstone, J. R. & Record, M. T., Jr. (1992). Use of liquid hydrocarbon and amide transfer data to estimate contributions to thermodynamic functions of protein folding from the removal of nonpolar and polar surface from water. *Biochemistry* **31**, 3947-55.
192. Murphy, K. P. & Freire, E. (1992). Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Adv Protein Chem* **43**, 313-61.
193. Sigurskjold, B. W., Berland, C. R. & Svensson, B. (1994). Thermodynamics of inhibitor binding to the catalytic site of glucoamylase from *Aspergillus niger* determined by displacement titration calorimetry. *Biochemistry* **33**, 10191-9.
194. Sigurskjold, B. W. (2000). Exact analysis of competition ligand binding by displacement isothermal titration calorimetry. *Anal Biochem* **277**, 260-6.
195. Tanford, C. (1980). *The Hydrophobic Effect 2nd edn* John Wiley & sons, New York.
196. Southall, N. T. & Dill, K. A. (2000). The mechanism of hydrophobic solvation depends on solute radius. *J. Phys. Chem. ser. B* **104**, 1326-1331.
197. Isbister, B. D., St. Hilaire, P. M. & Toone, E. J. (1995). "Spatial Organization versus Total Surface Area as a Predictor of Protein Hydrophobicity. The Hydrophobicity of the Concanavalin A Binding Site". *J. Am. Chem. Soc.*, 12877-12878.
198. Southall, N. T. & Dill, K. A. (2002). Potential of mean force between two hydrophobic solutes in water. *Biophys Chem* **101-102**, 295-307.
199. Williams, B. A., Chervenak, M. C. & Toone, E. J. (1992). Energetics of lectin-carbohydrate binding. A microcalorimetric investigation of concanavalin A-oligomannoside complexation. *J Biol Chem* **267**, 22907-11.
200. Faergeman, N. J., Sigurskjold, B. W., Kragelund, B. B., Andersen, K. V. & Knudsen, J. (1996). Thermodynamics of ligand binding to acyl-coenzyme A binding protein studied by titration calorimetry. *Biochemistry* **35**, 14118-26.
201. Gao, X. & Wong, T. C. (1998). Studies of the binding and structure of adrenocorticotropin peptides in membrane mimics by NMR spectroscopy and pulsed-field gradient diffusion. *Biophys J* **74**, 1871-88.
202. Privalov, P. L. & Gill, S. J. (1988). Stability of protein structure and hydrophobic interaction. *Adv Protein Chem* **39**, 191-234.
203. Privalov, P. L. & Makhatadze, G. I. (1990). Heat capacity of proteins. II. Partial molar heat capacity of the unfolded polypeptide chain of proteins: protein unfolding effects. *J Mol Biol* **213**, 385-91.
204. Myers, J. K., Pace, C. N. & Scholtz, J. M. (1995). Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding. *Protein Sci* **4**, 2138-48.
205. Morton, C. J. & Ladbury, J. E. (1996). Water-mediated protein-DNA interactions: the relationship of thermodynamics to structural detail. *Protein Sci* **5**, 2115-8.
206. Sturtevant, J. M. (1977). Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 2236-40.
207. Naghibi, H., Tamura, A. & Sturtevant, J. M. (1995). Significant discrepancies between van't Hoff and calorimetric enthalpies. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5597-9.
208. Lemieux, R. U., Delbaere, L. T., Beierbeck, H. & Spohr, U. (1991). *Host-Guest Molecular Interactions from Chemistry to Biology* CIBA fundation Symposium, Wiley, Chichester, UK.
209. Lumry, R. & Rajender, S. (1970). Enthalpy-entropy compensation phenomena in water solutions of proteins and small molecules: a ubiquitous property of water. *Biopolymers* **9**, 1125-227.
210. Dunitz, J. D. (1995). Win some, lose some: enthalpy-entropy compensation in weak intermolecular interactions. *Chem Biol* **2**, 709-12.
211. Fersht, A. (1999). *Structure and mechanism in protein science*, W. H. Freeman & Company, New York.
212. Ferreiro, D. U. & de Prat-Gay, G. (2003). A protein-DNA binding mechanism proceeds through multi-state or two-state parallel pathways. *J Mol Biol* **331**, 89-99.
213. Smoluchowski. (1916). Drei Vorträge über Diffusion, Brownsche Molekularbewegung und Koagulation von Kolloidteilchen. *Phys. Z.*, 557-571.
214. Northrup, S. H. & Erickson, H. P. (1992). Kinetics of protein-protein association explained by Brownian dynamics computer simulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3338-42.
215. Raman, C. S., Jemmerson, R., Nall, B. T. & Allen, M. J. (1992). Diffusion-limited rates for monoclonal antibody binding to cytochrome c. *Biochemistry* **31**, 10370-9.

216. Murphy, K. P., Bhakuni, V., Xie, D. & Freire, E. (1992). Molecular basis of co-operativity in protein folding. III. Structural identification of cooperative folding units and folding intermediates. *J Mol Biol* **227**, 293-306.
217. van Holde, K. E. (2002). A hypothesis concerning diffusio-limited protein-ligand interactions *Biophys Chem* **101**, 249-254.
218. Cerutti, M. L., Ferreiro, D. U., Sanguinetti, S., Goldbaum, F. A. & de Prat-Gay, G. (2006). Antibody recognition of a flexible epitope at the DNA binding site of the human papillomavirus transcriptional regulator E2. *Biochemistry* **45**, 15520-8.
219. von Hippel, P. H. & Berg, O. G. (1989). Facilitated target location in biological systems. *J Biol Chem* **264**, 675-8.
220. Sharp, K., Fine, R. & Honig, B. (1987). Computer simulations of the diffusion of a substrate to an active site of an enzyme. *Science* **236**, 1460-3.
221. Eltis, L. D., Herbert, R. G., Barker, P. D., Mauk, A. G. & Northrup, S. H. (1991). Reduction of horse heart ferricytochrome c by bovine liver ferrocycytochrome b5. Experimental and theoretical analysis. *Biochemistry* **30**, 3663-74.
222. Beckingham, J. A. & Glick, G. D. (2001). Sequence specific recognition of ssDNA by a lupus autoantibody: kinetics and mechanism of binding. *Bioorg Med Chem* **9**, 2243-52.
223. Gokce, I., Raggett, E. M., Hong, Q., Virden, R., Cooper, A. & Lakey, J. H. (2000). The TolA-recognition site of colicin N. ITC, SPR and stopped-flow fluorescence define a crucial 27-residue segment. *J Mol Biol* **304**, 621-32.
224. Foote, J. & Eisen, H. N. (1995). Kinetic and affinity limits on antibodies produced during immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 1254-6.
225. Macario, A. J. & De Macario, E. C. (1973). Letter: Low and high affinity antibodies can alternate during the immune response. *Nature* **245**, 263-4.
226. Kranz, D. M., Ballard, D. W. & Voss, E. W., Jr. (1983). Expression of defined idiotypes throughout the BALB/c anti-fluorescyl antibody response: affinity and idiotypic analyses of heterogeneous antibodies. *Mol Immunol* **20**, 1313-22.
227. Kaartinen, M., Griffiths, G. M., Hamlyn, P. H., Markham, A. F., Karjalainen, K., Pelkonen, J. L., Makela, O. & Milstein, C. (1983). Anti-oxazolone hybridomas and the structure of the oxazolone idiotypic. *J Immunol* **130**, 937-45.
228. Foote, J. & Milstein, C. (1991). Kinetic maturation of an immune response. *Nature* **352**, 530-2.
229. Liu, J., Liu, L. & Jemmerson, R. (2000). Immunoglobulin gene joints compensate for reduced on-rates imposed by somatic mutations in a V(H) gene. *Mol Immunol* **37**, 95-105.
230. Gerlt, J. A. (1993). "Mechanistic Principles of Enzyme-catalyzed Cleavage of Phosphodiester Bonds". Nucleases, 2nd ed. (Linn, S. M. L., Stephen; Galveston, Branch ; Roberts, Richard J. , Ed.), Cold Spring Harbor Press.
231. Nevinsky, G. A. & Buneva, V. N. (2002). Human catalytic RNA- and DNA-hydrolyzing antibodies. *J Immunol Methods* **269**, 235-49.
232. Baranovskii, A. G., Ershova, N. A., Buneva, V. N., Kanyshkova, T. G., Mogelnitskii, A. S., Doronin, B. M., Boiko, A. N., Gusev, E. I., Favorova, O. O. & Nevinsky, G. A. (2001). Catalytic heterogeneity of polyclonal DNA-hydrolyzing antibodies from the sera of patients with multiple sclerosis. *Immunol Lett* **76**, 163-7.
233. Kanyshkova, T. G., Semenov, D. V., Khlimankov, D., Buneva, V. N. & Nevinsky, G. A. (1997). DNA-hydrolyzing activity of the light chain of IgG antibodies from milk of healthy human mothers. *FEBS Lett* **416**, 23-6.
234. Suck, D. & Oefner, C. (1986). Structure of DNase I at 2.0 A resolution suggests a mechanism for binding to and cutting DNA. *Nature* **321**, 620-5.
235. Clark, P. & Eichhorn, G. L. (1974). A predictable modification of enzyme specificity. Selective alteration of DNA bases by metal ions to promote cleavage specificity by deoxyribonuclease. *Biochemistry* **13**, 5098-102.
236. Gololobov, G. V., Bogomolova, A. E., Iadav, R. P., Ermolaeva, M. V., Belostotskaia, K. M., Prokaeva, T. B., Shuster, A. M. & Gabibov, A. G. (1993). [Isolation and characteristics of catalytic antibodies to DNA in systemic lupus erythematosus]. *Biokhimiia* **58**, 313-8.