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

RELACIÓN ENTRE ESTRUCTURA, AFINIDAD Y ESTABILIDAD EN UN SISTEMA DE MADURACIÓN DE LA AFINIDAD DE ANTICUERPOS ANTI-LISOZIMA

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

Juan Pablo Acierno

Director de tesis: Dra. Ana Cauerhff
Consejero de Estudios: Dr. Israel Algranati

Lugar de trabajo: Fundación Instituto Leloir
Buenos Aires, 2008

Relación entre estructura, afinidad y estabilidad en un sistema de maduración de la afinidad de anticuerpos anti-lisozima

Resumen

La maduración de la afinidad es un mecanismo del sistema inmune de organismos superiores que modifica a un anticuerpo determinado con el fin de mejorar su afinidad por un antígeno determinado y así reconocerlo con mayor eficacia. Las consecuencias de la maduración de la afinidad fueron estudiadas en un sistema compuesto de dos anticuerpos monoclonales relacionados anti-lisozima, D44.1 y F10.6.6. Las mutaciones somáticas acumuladas en la región variable de F10.6.6 respecto de D44.1 produjeron cambios estructurales en el primero que incrementaron su afinidad hacia el antígeno en 700 veces. Mediante comparaciones de estructuras cristalinas, estudios cinéticos y termodinámicos de formación del complejo anticuerpo-lisozima, utilizando diversos fragmentos de anticuerpos generados en el laboratorio, se pudo determinar que la maduración de la afinidad de este sistema particular afecta la topología del sitio de combinación y la interacción en la interfaz V_L-V_H, la cual estabiliza al dominio variable de F10.6.6. Fue posible además identificar mediante el estudio de fragmentos de anticuerpo mutados aquellos residuos involucrados en la estabilización del dominio variable. Finalmente se postuló un mecanismo de maduración de la afinidad para el sistema D44.1-F10.6.6, donde las mutaciones introducidas actúan de modo conjunto para aumentar la afinidad y la estabilidad de F10.6.6.

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

"Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies" **Acierno, J. P.**, Braden, B. C., Klinke, S., Goldbaum, F. A. & Cauerhff, A. (2007). *J Mol Biol* 374, 130-46.

Palabras clave: estabilidad de anticuerpos; estructura de anticuerpos; maduración de la afinidad; interfaz V_L-V_H

Relation between structure, affinity and stability of an anti-lysozyme antibodies affinity maturation system

Summary

Affinity maturation of anti-protein antibodies is a complex mechanism of the immune system, which inserts random point mutations to a given antibody, improving its affinity towards the antigen. The affinity maturation effects were studied in a system composed of two closely related monoclonal antibodies, D44.1 and F10.6.6. Somatic mutations accumulated in the variable region of F10.6.6 modified its structure, increasing the affinity towards the antigen by 700 times related to D44.1. It was possible to observe by means of structure comparison, kinetic and thermodynamic studies of several antibody fragments, that the affinity maturation affects the topology of the combining site and improves the interacting surfaces, stabilizing the variable domain of F10.6.6. Also, the residues involved in structure stabilization were identified. Finally, an affinity maturation mechanism for this particular system was stated, in which all the mutations act as a whole, increasing both affinity and stability.

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

"Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies" **Acierno, J. P.**, Braden, B. C., Klinke, S., Goldbaum, F. A. & Cauerhff, A. (2007). J Mol Biol 374, 130-46.

Keywords: antibody stability; antibody structure; affinity maturation; V_H–V_L interface

ABREVIATURAS

ASA: superficie accesible al solvente
ΔG: cambio de 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
Ac: anticuerpo
Ag: antígeno
AcMo: anticuerpo monoclonal
K_A: constante de afinidad
k_{ass}: constante cinética de asociación
k_{diss}: constante cinética de disociación
Ig: inmunoglobulina
Fab: fragmento de unión a antígeno de una inmunoglobulina
Fv: fragmento variable de una inmunoglobulina
CDR: región determinante de complementariedad
FR: región framework
H: cadena pesada de un inmunoglobulina
L: cadena liviana de un inmunoglobulina
V_H: región variable de la cadena pesada de una inmunoglobulina
V_L: región variable de la cadena liviana de una inmunoglobulina
ANS: ácido 8-Anilino-1-naftalenesulfónico
LB: linfocito B
LT: linfoncito T
BCR: receptor de superficie de linfocitos B
CD: dicroísmo circular
DLS: dispersión de luz dinámica

INDICE

INTRODUCCIÓN 3

1.1 GENERALIDADES INMUNOLÓGICAS 3
1.2 RESPUESTA INMUNE INNATA 5
1.3 RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA 5
1.4 INTRODUCCIÓN A LAS FUNCIONES EFECTORAS DE LAS CÉLULAS B 9
1.5 DESARROLLO DE LA RESPUESTA INMUNE ADAPTATIVA 10
1.6 ANTICUERPOS 12
1.7 REPERTORIO DE ANTICUERPOS: RECOMBINACIÓN DE GENES E HIPERMUTACIÓN SOMÁTICA 15
1.8 MADURACIÓN ESTRUCTURAL DE LA AFINIDAD 21
1.9 CASO DE ESTUDIO: ANTICUERPOS MONOCLONALES D44.1 Y F10.6.6 25

OBJETIVOS 31

2 RESULTADOS 35

2.1 FRAGMENTOS FAB VS. FVS DE LOS ANTICUERPOS D44.1 Y F10.6.6 35
2.1.1 PARÁMETROS CINÉTICOS Y TERMODINÁMICOS DE UNIÓN A HEL 35
2.1.2 ANÁLISIS ESTRUCTURAL COMPARATIVO ENTRE FAB D44.1 Y FAB F10.6.6 37
2.1.3 INTERFAZ V_L-V_H 41
2.1.4 ESTABILIDAD TÉRMICA 45
2.1.5 DESNATURALIZACIÓN POR AGENTES CAOTRÓPICOS 50
2.1.6 UNIÓN A ÁCIDO 8-ANILINO-1-NAFTALENOSULFÓNICO (ANS) 53
2.1.7 CAMBIO DE LA CAPACIDAD CALORÍFICA DE UNIÓN A HEL 56
2.1.8 ENTROPÍA CONFORMACIONAL 58
2.2 EXPERIMENTOS DE INTERCAMBIO DE CADENAS (CHAIN SHUFFLING) 62
2.2.1 PARÁMETROS CINÉTICOS Y TERMODINÁMICOS 63
2.2.2 ESTABILIDAD TÉRMICA 66
2.2.3 DESNATURALIZACIÓN POR AGENTES CAOTRÓPICOS 68
2.2.4 UNIÓN A ÁCIDO 8-ANILINO-1-NAFTALENESULFÓNICO (ANS) 69
2.2.5 CAMBIO DE LA CAPACIDAD CALORÍFICA DE UNIÓN A HEL 70
2.3 ANÁLISIS DE MUTANTES 72
2.3.1 MUTANTES DE LA INTERFAZ V_L-V_H 73
ESTABILIDAD TÉRMICA 78
DESNATURALIZACIÓN POR AGENTES CAOTRÓPICOS 80
UNIÓN A ÁCIDO 8-ANILINO-1-NAFTALENESULFÓNICO (ANS) 82
2.3.2 MUTANTES DE INTERFAZ AG-AC 83
DESNATURALIZACIÓN POR AGENTES CAOTRÓPICOS 87
2.3.3 UNIÓN A ÁCIDO 8-ANILINO-1-NAFTALENESULFÓNICO (ANS) 88

3 DISCUSIÓN 93

3.1 COMPARACIÓN ESTRUCTURAL Y BIOFÍSICA ENTRE D44.1 Y F10.6.6 93
3.2 EFECTO DE LAS MUTACIONES 96
3.3 DISCUSIÓN GENERAL 101

4 CONCLUSIÓN 107

5 MATERIALES Y MÉTODOS 111

5.1 CULTIVO DE HIBRIDOMAS 111
5.2 PURIFICACIÓN DE IGG 111
5.3 OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS FAB 112
5.4 CRISTALIZACIÓN, COLECCIÓN DE DATOS, RESOLUCIÓN Y REFINAMIENTO DE LAS ESTRUCTURAS FAB F10.6.6 113
5.5 EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL Y OBTENCIÓN DE CADN DE FRAGMENTOS VARIABLES 115
5.6 CLONADO Y EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE FRAGMENTOS FV 116
5.7 PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS FV 120
5.8 GENERACIÓN DE FVS QUIMÉRICOS POR INTERCAMBIO DE CADENAS 120
5.9 DETERMINACIÓN DE PESO MOLECULAR EN SOLUCIÓN – LIGHT SCATTERING ESTÁTICO 121
5.10 GENERACIÓN DE VARIANTES CON MUTACIONES PUNTUALES 121
5.11 CONSTANTES CINÉTICAS Y DE AFINIDAD 123
5.12 DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS TERMODINÁMICOS 128
5.13 CÁLCULO DE ENTROPÍA CONFIGURACIONAL 130
5.14 DICROÍSMO CIRCULAR 132
5.15 FLUORESCENCIA 132
5.16 DISPERSIÓN DE LUZ DINÁMICA 132

6 BIBLIOGRAFÍA 135

Introducción

Introducción

1.1 Generalidades inmunológicas

El sistema inmune es una colección de mecanismos dentro de un organismo superior que lo protege contra enfermedades causadas por agentes externos, identificando dichos agentes y eliminándolos. Debido a la gran variedad de agentes que pueden causar enfermedades, el sistema inmune debe disponer de una batería de recursos para contrarrestar el progreso de infecciones. La mayoría de los agentes infecciosos que un individuo enfrenta no penetran la superficie de su cuerpo, debido a la gran cantidad de barreras físicas y bioquímicas que previenen la infección. Estas defensas forman la barrera exterior y comprenden principalmente la piel y las mucosas.

De este modo, el sitio de infección y el tipo de patógeno determinan que tipo de respuesta inmune se desarrollará como consecuencia. Pueden distinguirse dos tipos de patógenos: los que invaden las células del huésped y aquellos que no. Todos los virus, algunas bacterias y algunos protozoos utilizan como nicho replicativo las células del huésped, de esta forma, el sistema inmune debe reconocer y destruir las células infectadas para evitar la propagación de la enfermedad. Varias bacterias y parásitos a su vez viven en fluidos u espacios extracelulares. Sin embargo, aún los patógenos intracelulares deben alcanzar sus células blanco moviéndose por el torrente sanguíneo y el fluido tisular, donde son más susceptibles a ataques por parte del sistema inmune.

Cualquier respuesta inmune comprende, en primera instancia, el reconocimiento del patógeno o cualquier otro elemento foráneo y en segunda instancia, la reacción para eliminar dicha amenaza. A grandes rasgos, los diferentes tipos de respuesta inmune caen en dos categorías: la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. En la Figura 1.1 se esquematizan de modo simplificado los distintos mecanismos utilizados por la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa utilizados para contrarrestar el ataque de un patógeno.

Las respuestas inmunes de los diferentes tipos son llevadas a cabo por células denominadas leucocitos o glóbulos blancos. Existen varios tipos de leucocitos y estos median todos los tipos de respuesta, ya sea innata o adaptativa. Como encargados de la respuesta inmune innata se encuentran los neutrófilos, los cuales fagocitan bacterias y otros patógenos. Otro tipo de leucocitos son los macrófagos, encargados de fagocitar bacterias pero también células muertas, restos celulares y macromoléculas. Los macrófagos además son células secretoras de una vasta cantidad de proteínas, citoquinas y factores de crecimiento, incluyendo moléculas cruciales para la activación de células responsables de la respuesta adaptativa. Además los macrófagos son conocidos como células presentadoras de antígenos (Ags) profesionales.

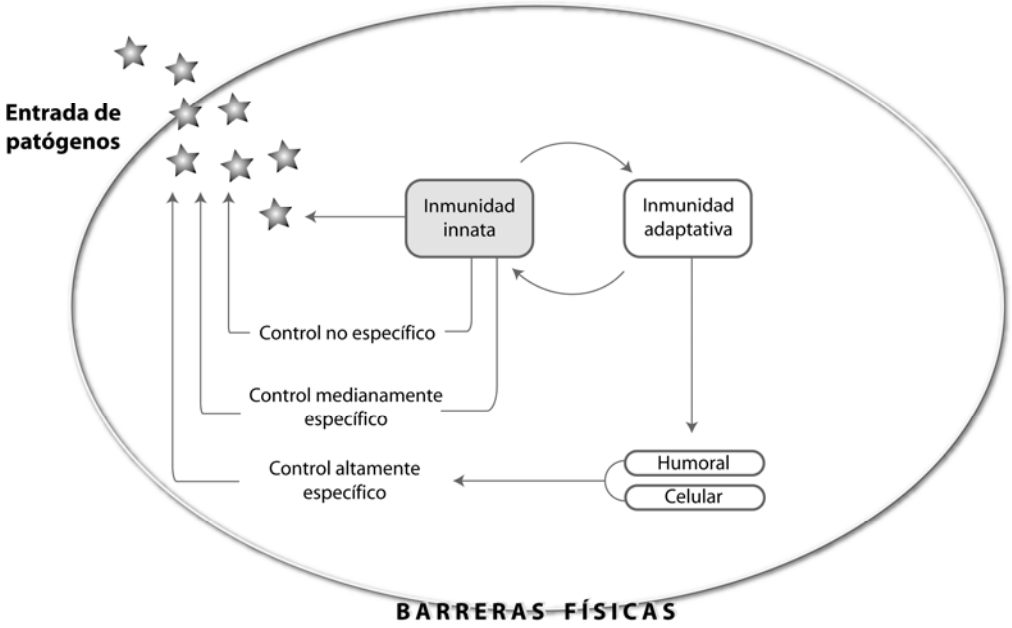


Figura 1.1 – Relación entre inmunidad innata e inmunidad adaptativa.

Efectivamente, luego de fagocitar material foráneo los macrófagos se encargan de procesarlo, rompiendo en fragmentos pequeños las macromoléculas del patógeno. Luego, este material es presentado mediante receptores de superficie conocidos como MHCs (*Major Histocompatibility Complex*, complejo mayor de histocompatibilidad). En particular, las células presentadoras Ags profesionales poseen en su superficie MHC de tipo II, mientras que el resto de las células presentan sólo MHC de tipo I. En la respuesta adaptativa los fragmentos expuestos en los distintos MHCs se unirán a aquel receptor de linfocitos T (TCR, del inglés *T-Cell receptor*) que reconozca la estructura del fragmento expuesto en el contexto de dichos MHCs.

El reconocimiento de Ags foráneos es la cualidad principal de la respuesta inmune adaptativa y dos tipos distintos de moléculas son responsables de llevar a cabo este reconocimiento específico: las inmunoglobulinas y los TCRs. Gracias a su diversidad y heterogeneidad, estas moléculas se caracterizan por su gran capacidad de reconocer distintos Ags.

Las inmunoglobulinas (Igs) son un grupo de glicoproteínas presentes en el suero y en fluidos tisulares de todos los mamíferos. Las Igs también se encuentran en la superficie de linfocitos de tipo B (LB), donde actúan como receptores para Ags específicos, mientras que otras Igs como los anticuerpos (Acs) circulan libremente en la sangre y órganos linfáticos. El contacto entre los LB y el Ag es necesario para la diferenciación de éstos en células plasmáticas con la propiedad de secretar Acs.

Son los Acs los encargados de reconocer de modo altamente específico porciones características de un patógeno particular. Precisamente, al unirse a un determinado Ag, un Ac señala al mismo para que sea reconocido por el resto del sistema inmune y así poder eliminarlo del organismo.

1.2 Respuesta inmune innata

Aquellos mecanismos que no hacen distinciones sutiles entre las entidades invasoras y que no conllevan cambios permanentes como resultado de la exposición al patógeno confieren la inmunidad innata. Una segunda exposición a un agente infeccioso provocará exactamente el mismo tipo de reacción y de la misma magnitud que la primera exposición; esto significa que no existe "memoria" de una infección previa con el mismo agente patógeno. Es posible encontrar elementos de respuesta inmune innata en todos los organismos multicelulares, mientras que los mecanismos de la respuesta inmune adaptativa (surgida hace aproximadamente 400 millones de años) se encuentran presentes solo en peces, reptiles, anfibios, aves y mamíferos.

La defensa no inducible y no específica de los vertebrados es mediada por barreras anatómicas y fisiológicas, mientras que la respuesta innata inducible de amplio espectro se da mediante mecanismos de internalización celular e inflamación. Un ejemplo de barrera anatómica es la piel intacta. El bajo pH del estómago y las enzimas hidrolíticas en las secreciones corporales son barreras fisiológicas. El término "mecanismos de internalización celular" se refiere al hecho de que si bien existen varias formas en las que cualquier célula huésped puede ingerir ciertos Ags, células fagocíticas especializadas, tales como macrófagos y neutrófilos, utilizan un mecanismo más sofisticado de reconocimiento y "engullimiento" de patógenos y sus moléculas. Los fagocitos expresan moléculas receptoras de superficie que pueden unirse a un amplio rango de moléculas comunes a ciertas de entidades invasoras. Además, el sistema inmune cuenta con células denominadas *natural killers* (*NK*), las cuales usan receptores para reconocer y causar la lisis de células tumorales o infectadas por virus en una forma específica en términos generales.

La inflamación es la afluencia de leucocitos hacia una herida y/o un sitio de infección, los cuales fagocitan y digieren Ags, produciendo señales químicas que promueven la curación de dicha herida. Al mismo tiempo, dichos linfocitos secretan citoquinas que reclutan más linfocitos de la respuesta adaptativa y los dirigen hacia el sitio de infección.

1.3 Respuesta inmune adaptativa

La respuesta inmune adaptativa es, en cambio, una respuesta altamente específica contra un patógeno en particular y comprende varios mecanismos complejos. Dicha respuesta ha

evolucionado para compartir el "peso inmunológico" entre varias células, tejidos y productos solubles. Se diferencia de la respuesta inmune innata principalmente en los siguientes conceptos:

i. Especificidad
ii. Memoria inmunológica
iii. Diversidad
iv. Tolerancia
v. División de tareas

El entendimiento de los mecanismos celulares y moleculares que involucran a estos cinco conceptos ocupa a la mayoría de la investigación inmunológica moderna.

Especificidad:

La especificidad en el contexto de la respuesta adaptativa se refiere a que todas las fases de la respuesta son específicas para un único Ag, desde el reconocimiento del Ag por el Ac (respuesta humoral) o por linfocitos T (respuesta celular). Esta especificidad es mediada por la existencia de receptores Ag-específicos sobre LB y LT que deben interactuar con el Ag para que un linfocito pueda ser activado. A nivel molecular, un linfocito tiene un solo rearreglo genético para expresar miles de copias idénticas de un solo tipo de receptor, pero estos receptores pueden reconocer más de un Ag. No obstante, el rango de especificidades de unión de un linfocito individual es muy reducido, comparándolo con el amplio rango de reconocimiento de una célula individual del sistema innato.

Memoria inmunológica:

A diferencia de la respuesta innata, la respuesta adaptativa puede "recordar" que ha visto contra un Ag particular en oportunidades anteriores. Esta "memoria inmunológica" dispara y mejora la respuesta adaptativa cada vez que el organismo vuelve a contactarse con ese Ag particular. Es así como el organismo neutraliza al patógeno antes de la aparición de los signos de enfermedad. Efectivamente, el cuerpo se ha "adaptado" y ha "adquirido" la habilidad de excluir a dicho patógeno.

La memoria inmunológica surge del siguiente modo: el cuerpo mantiene su población constante de linfocitos en estado no activado, cada uno con su correspondiente receptor de superficie. Cuando un Ag entra al cuerpo, solo aquellos clones de linfocitos latentes que portan en su superficie receptores con la capacidad de unir al Ag reaccionarán para comenzar una respuesta inmune, este proceso es denominado selección clonal. Solo aquellos linfocitos seleccionados por el Ag dejarán el estado latente y proliferarán, llevando a cabo la expansión clonal. A medida que los

clones seleccionados se expanden, algunas células hijas que portan el mismo receptor de superficie se diferencian en células efectoras de corta vida, equipadas para eliminar al Ag, mientras que otras se diferencian en células de memoria de larga vida, las cuales permanecerán en el organismo en un estado no activado a la espera de una subsecuente exposición al Ag.

Los resultados de la expansión clonal y de la diferenciación se manifiestan como respuesta inmune primaria y secundaria. La respuesta primaria ocurre con la primera exposición al Ag y resulta en la eliminación específica de dicho Ag debido a la formación de células efectoras Ag-específicas. Además, se forman grandes cantidades de células de memoria que persisten en los tejidos.

La respuesta inmune secundaria ocurre con la siguiente entrada al organismo del mismo Ag, debido a que el Ag encuentra linfocitos Ag-específicos preexistentes, que pueden sufrir una rápida diferenciación a células efectoras Ag-específicas. Esto permite al organismo establecer una respuesta más rápida y más efectiva, la cual permite prevenir y mitigar enfermedades, en muchos confiriendo inmunidad a largo contra el patógeno que originó la respuesta.

Diversidad:

La respuesta inmune adaptativa difiere también de la respuesta innata en su grado de diversidad. Mientras que la respuesta innata tiene una capacidad fija y limitada para reconocer Ags, la capacidad del sistema adaptativo es prácticamente ilimitada. Es más, se cree que nuestro cuerpo está preparado para reconocer Ags que no existen en la naturaleza. Se ha estimado a partir de la estructura de los genes de los receptores antigénicos, que teóricamente más 10^{12} Ags diferentes pueden ser reconocidos por todo el conjunto de linfocitos de un organismo. Este número se deriva de la combinatoria de varios mecanismos de recombinación genética. La primera fuente de diversidad es un proceso denominado recombinación somática, el cual transcurre durante el desarrollo de LB y LT. Los genes que codifican al receptor B (BCR) y al receptor T (TCR) son ensamblados a partir de fragmentos génicos más pequeños seleccionados a partir de una gran población preexistente de segmentos génicos. Las combinaciones aleatorias de estos segmentos generan cientos de miles de distintas secuencias de ADN que codifican para receptores de Ags. Adicionalmente, se ponen en marcha mecanismos de mutación que resultan en la diversificación estructural del receptor, asegurando el reconocimiento de moléculas complejas. Estas moléculas poseen un único sitio de combinación para facilitar el reconocimiento específico, pero también comparten ciertas estructuras comunes necesarias para la remoción del Ag. El número total de clones generados durante la respuesta inmune adaptativa garantiza que cualquier Ag pueda ser reconocido durante la vida del individuo. Estos clones con la capacidad de seleccionar al Ag forman el repertorio linfocitario de reconocimiento individual.

Tolerancia:

Es el aspecto en el cual la respuesta adaptativa presenta mucho más refinamiento que la respuesta innata. La especificidad antigénica de cada receptor de un linfocito es generada en fases tempranas del desarrollo mediante el proceso de recombinación somática. Probabilísticamente, algunos de estos rearreglos generarán receptores con la capacidad de reconocer Ags propios de los tejidos del huésped. La tolerancia depende de la identificación de linfocitos portando receptores que reconocen Ags propios del organismo, y de los mecanismos que aseguran que dichas células sean removidas del sistema o inactivadas. Es decir, que tolerancia implica el desarrollo de un repertorio activo de linfocitos que no reconozca Ags propios. Por ejemplo, en un proceso elaborado de selección que tiene lugar en el timo, la mayoría de esos linfocitos maduros que poseen receptores capaces de reconocer Ags propios son eliminados impidiendo su maduración. Este proceso se denomina tolerancia central. De forma similar, LB maduros pueden sufrir un proceso de tolerancia central en la médula ósea para prevenir el reconocimiento de lo propio. No obstante, los LB y LT que escapan al proceso de tolerancia central son funcionalmente silenciados por mecanismos adicionales de tolerancia periférica que operan fuera del timo y médula ósea.

División de tareas:

El sistema inmune utiliza diferentes estrategias de su compendio de herramientas en función de qué patógeno o qué parte del mismo está infectando al huésped. Dependiendo de la localización intracelular o extracelular del Ag se activarán distintas respuestas celulares o humorales del sistema adaptativo.

Si los Ags se encuentran en el medio extracelular o son Ags exógenos (situación comúnmente dada por infecciones con bacterias, hongos y parásitos) y logran superar las defensas de la inmunidad innata, serán reconocidos por los LB de la respuesta inmune humoral (ya que los LT son incapaces de reconocer Ags solubles). Los LB activados sintetizarán y secretarán Acs dirigidos contra dichos Ags. De hecho, el Ac secretado es una forma soluble del receptor de superficie del LB, que fue el encargado en principio de reconocer al Ag soluble. La unión de un Ac a un Ag marca al mismo para ser eliminado por uno de varios mecanismos de destrucción del sistema inmune. Sin embargo, los Ac no son capaces de penetrar membranas celulares, de modo que los Ags intracelulares (virus, patógenos intracelulares, toxinas) deben ser procesados por la respuesta inmune celular. Los LT se especializan en esta función ya que reconocen ciertas proteínas presentes en la membrana del huésped que unen fragmentos de Ag presente dentro de las células y los presentan en la superficie celular permitiendo la detección de células con entidades foráneas en su interior. La inmunidad mediada por células produce la muerte de aquellas células del huésped que fueron infectadas, protegiendo las células sanas periféricas. Esta tarea es realizada por un tipo de LT denominados citotóxicos, que reconocen, atacan y lisan específicamente a las células del

huésped que se encuentran alteradas por una infección viral o por una transformación maligna. Un segundo de linfocitos T denominados *helpers* o colaboradores secretan productos llamados citoquinas que ayudan a la mayoría de los LB en la producción de Acs y a los LT citotóxicos en la destrucción de las células blanco. Por lo tanto, un Ag es tratado por el sistema inmune dependiendo de su localización intra o extracelular y su naturaleza química. Durante el curso de una infección los patógenos complejos pueden presentar al mismo tiempo al sistema inmune Ags intra y extracelulares. De esta forma, LB, LT *helpers* y LT citotóxicos pueden ser reclutados por una sola entidad foránea de suficiente complejidad. Para coordinar la respuesta los LB, LT y células no linfocíticas secretan moléculas solubles llamadas citoquinas que influencian en la conducta de las células cercanas incluyendo a células de las respuesta inmune innata. Dichas citoquinas inducen a las células a llevar a cabo funciones particulares dependiendo del tipo celular como: proliferación celular, producción de Acs, síntesis de sustancias antibacterianas y antivirales, lisis de células blanco, entre otros procesos.

1.4 Introducción a las funciones efectoras de las células B

Colectivamente los LB son capaces de reconocer un rango casi infinito de moléculas incluyendo proteínas en su estado nativo o desnaturalizado, grupos químicos simples, lípidos, carbohidratos, ácidos nucleicos y otras moléculas. No obstante, la mayoría de los LB no pueden avanzar de aquí en adelante en el reconocimiento del Ag sin la colaboración de los LT, necesaria para la mayoría de las respuestas de los LB. La ayuda T se lleva a cabo mediante contactos directos entre los LB y LT y la unión a LB de las citoquinas específicas producidas por LT respondiendo al mismo Ag. Sin la ayuda T la mayoría de los LB, especialmente aquellos que reconocen virus, son incapaces de alcanzar una activación completa y fallan en la proliferación y diferenciación en células de memoria y en células plasmáticas productoras de anticuerpos. Los Ags que son reconocidos por los BCRs, pero que no pueden activar a los LB sin la ayuda T son llamados T-dependientes, como por ejemplo, los Ags proteicos. Existen Ags no proteicos cuya interacción con los BCRs es algunas veces suficiente para la activación de los LB. Estos Ags, que en general son polímeros, son llamados Ags T-independientes, porque dan lugar a un tipo de respuesta en la que no se requiere ayuda T para la activación del LB.

La unión del Ag al receptor de superficie de un LB maduro produce la activación completa de esta célula. Luego de esta selección, estas células sufren una rápida proliferación clonal y diferenciación en células B de memoria y células B efectoras.

Las funciones efectoras se definen como las acciones tomadas por los linfocitos para eliminar los Ags no propios. En el caso de células B, las células efectoras son células plasmáticas completamente diferenciadas que secretan Acs.

El receptor de superficie de la célula B (BCR) es un complejo molecular, la molécula que reconoce a los Ags es una proteína conocida como inmunoglobulina (Ig) de superficie. El Ac secretado por una célula B activada es una forma soluble de la Ig de superficie y por lo tanto posee idéntica especificidad. Las Igs tienen forma de "Y", los brazos de la Y poseen en su extremo la fracción variable ó Fv, con secuencias que difieren entre Ig e Ig, en dicho Fv se encuentra el sitio de combinación que reconoce al Ag. Dicho fragmento está conformado por los dominios variables de las cadenas liviana L y pesada H (V_L y V_H, respectivamente) (Figura 1.3). Las secuencias de los Fvs son idénticas en ambos brazos de las Igs. El otro dominio que forma el extremo C-terminal del brazo de la Y se denomina primera región constante y su función es estabilizar al dominio Fv, y al igual que este último está formado por un segmento de cadena L y H. Ambos dominios, el Fv y el primer dominio de la región constante (C_H1-C_L), forman el Fab o *antigen binding fraction* (Figura 1.4). El tallo de la Y se conoce como Fc y está formado por dos dominios de la cadena pesada, dando lugar en la mayoría de las Igs a los dominios C_H2 y C_H3 y es donde se encuentra la función efectora de estas proteínas. El dominio C_H2 se encuentra glicosilado mediante un carbohidrato ramificado de estructura compleja. Ambos dominios C_H2 y C_H3 tienen como funciones efectoras la unión a receptores específicos y activación del complemento, entre otras. La secuencia de aminoácidos de la región constante es similar a todas las inmunoglobulinas del mismo isotipo, de los cuales se conocen cinco diferentes: IgM, IgG, IgA, IgD e IgE. Además de las diferencias en la secuencia aminoacídica de estos isotipos, el largo y la composición de la región bisagra también es diferente entre ellos.

No obstante, dentro de cada isotipo existen subclases como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, las cuales poseen diferencias en la secuencia de sus cadenas pesadas. Dentro de cada subclase a su vez existen diferencias de aminoácidos en determinadas zonas loops dando lugar a los alotipos. Las diferencias en las secuencias aminoacídicas de la región constante de las Igs determina sus funciones efectoras.

1.5 Desarrollo de la respuesta inmune adaptativa

Una segunda exposición a un determinado Ag pone en evidencia la capacidad del sistema inmune de reaccionar más rápido y con mayor intensidad para eliminar al patógeno o al Ag soluble. A medida que la respuesta inmune adaptativa se pone en marcha por segunda vez (por intermedio

de la inmunidad humoral y celular) se puede observar el aumento de intensidad de dicha respuesta midiendo el título de Acs en el suero (inmunidad humoral).

Cuando un individuo se expone por primera vez a un Ag X, algunos linfocitos de su repertorio total reconocerán mediante su BCR dicho Ag, produciendo la selección clonal de LB. Pasada una fase inicial de aproximadamente cinco días (fase *lag*), se observa un aumento del título de Acs reactivos contra ese Ag X en sangre (Figura 1.2). Esto es lo que se conoce como respuesta primaria. A continuación, con la segunda entrada del Ag X al organismo, durante el desarrollo de la respuesta secundaria, se produce un incremento exponencial del título de Acs anti-X, debido a la expansión clonal de los LB seleccionados en la respuesta primaria y al impacto del Ag sobre LB naïves que reconocieron al Ag por primera vez. Finalmente se llega a una fase estacionaria, donde la velocidad de producción de Acs anti-X es similar a la velocidad de degradación de los mismos. En esta última fase, el Ag ya fue eliminado y por consiguiente el estímulo que desató la producción de Acs anti-X desaparece alcanzando los niveles previos a la infección o a la entrada del Ag soluble. Sin embargo, dentro de las células generadas en la expansión clonal se encuentran células que se diferenciarán a LB de memoria, específicas para reconocer el Ag X. Estas células de vida prolongada residirán en los tejidos linfáticos donde podrán permanecer durante largos períodos en estado latente. Este proceso se repite para todos los Ags a los que se expone un individuo que no son procesados por la inmunidad innata. De este modo, el suero de un adulto sano contiene una gran variedad de Acs, cada uno en una concentración relativa baja.

Las diferencias cualitativas encontradas en la respuesta secundaria (fase lag de uno a dos días) se deben a la presencia de LB de memoria generados en la respuesta primaria. Estas células tienen la capacidad de diferenciarse fácilmente en células secretoras de Acs anti-X, produciendo un aumento del título de estos Acs y prolongándose en el tiempo luego de la segunda exposición. Una comparación entre respuesta primaria y secundaria puede observarse en la Figura 1.2.

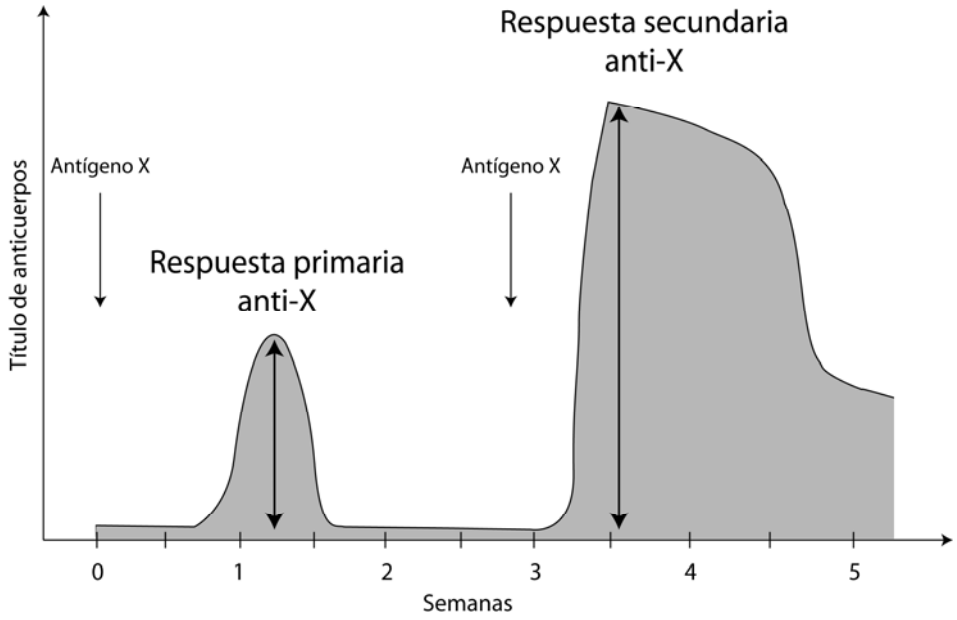


Figura 1.2 – Respuesta inmune adaptativa primaria y secundaria: evolución temporal del título de Acs en sangre.

Además del título aumentado de Acs anti-X (diferencias cuantitativas), existen diferencias cualitativas en los Acs producidos en la respuesta secundaria. Esta diferencia cualitativa se produce debido a la hipermutación somática en la región variable de los LB producto de la maduración de la afinidad. Este proceso introduce mutaciones puntuales en ciertas zonas de la región variable que están en contacto con el Ag o en otras zonas mejorando la unión entre el Ag y el sitio de combinación. Las mutaciones producidas en el proceso de hipermutación somática son al azar y los LB con sitios de combinación que unen al Ag con mayor afinidad son seleccionados a partir de un grupo de LB hipermutados.

La existencia de la respuesta secundaria es la base de la vacunación, donde un individuo es inmunizado contra un Ag que se asemeja al agente patógeno original, produciéndose una respuesta primaria. Sucesivas inmunizaciones (dependiendo del Ag) darán lugar a respuestas secundarias o terciarias de mayor intensidad. Una infección natural con el patógeno estimulará entonces las células de memoria producidas durante la inmunización producida por la vacuna, montando una respuesta inmune lo suficientemente amplificada para eliminar al Ag de modo rápido y eficiente.

1.6 Anticuerpos

Como fue explicado con anterioridad, la inmunidad innata se caracteriza por reconocer patógenos que poseen ciertos patrones moleculares, los cuales inician una respuesta no específica

que sirve como primer frente en batalla contra el agente infeccioso. Es importante recordar que este tipo de respuesta no genera memoria, ya que opera a través de receptores codificados en el genoma del huésped; es decir, si la infección reincide, todo el proceso para eliminar el patógeno vuelve a iniciarse como si nunca hubiese sucedido. Por lo tanto, la inmunidad innata no posee la característica más importante de la inmunidad adaptativa que es la memoria.

Para reconocer a la gran variedad de agentes patógenos a los que un individuo puede estar expuesto, los linfocitos del sistema inmune adaptativo han evolucionado produciendo Acs o IgGs. Estas proteínas son producidas por los LB y pueden presentarse, como fue explicado más arriba, en dos variantes: como BCR, en forma de Ig unida a la superficie de la célula que sirve de receptor celular del Ag, y como Ig libre circulante producida por células plasmáticas. La secreción de Acs es la principal función efectora de los LB de la inmunidad adaptativa. Los Acs circulantes tienen dos funciones: la primera es reconocer específicamente al Ag para el cual fue generado y la segunda es reclutar diversas células y moléculas que tienen como función destruir el patógeno una vez que el Ag se ha unido al Ac. Ambas funciones están estructuralmente separadas en la molécula del Ac, ya que una región se ocupa de reconocer al Ag (región variable) y la otra permite reclutar las células y proteínas necesarias para el reconocimiento celular del patógeno (región constante).

Las Igs son glicoproteínas de un peso molecular aproximado de 150 a 190 kDa y todos los Acs comparten la misma estructura básica: dos cadenas pesadas H (55-75 kDa) y dos cadenas livianas L (25 kDa). Una cadena liviana se combina con una cadena pesada y a su vez, este heterodímero se combina con otro similar para dar una Ig de composición H_2L_2. Genéticamente, un LB individual puede producir solamente una clase de cadena H y una clase de cadena L, por lo tanto, las dos cadenas H y las dos cadenas L en un Ac son idénticas. En general, las dos cadenas H están unidas entre sí por dos puentes disulfuro, al mismo tiempo que cada cadena H está unida a la cadena L mediante un puente disulfuro adicional. Además las cadenas H y L están unidas mediante una red de uniones no covalentes en su mayoría contactos hidrofóbicos, presentando además algunas uniones puente de hidrógeno y puente salino, formando interfaces de distintas características según la interacción V_L-V_H, C_H1-C_L, C_H2-C_H2 y C_H3-C_H3 (Figura 1.3).

Aunque la estructura básica H_2L_2 define una unidad de Ig y representa a la Ig de superficie, en el caso de los Acs circulantes las moléculas de algunos isotipos contienen más de una estructura básica. Este es el caso de las IgMs, que poseen una estructura $(H_2L_2)_5$ con 10 sitios de combinación y el de las IgAs secretorias, que con una estructura $(H_2L_2)_2$ poseen cuatro sitios de combinación.

Por otra parte, en el genoma de un individuo existen diversos tipos de cadenas L conocidas como lambda (λ) y kappa (κ). Mientras que en ratón la relación λ:κ es de 20 a 1, en humanos es de 2 a 1. Como fue expresado con anterioridad, también existen diversos tipos de cadena H, que determinan el isotipo de la Ig. La Ig de isotipo G (IgG) es la más abundante dentro de los Acs

circulantes y como se detallará en las secciones siguientes, es el isotipo de los Acs que se estudiaron en esta Tesis.

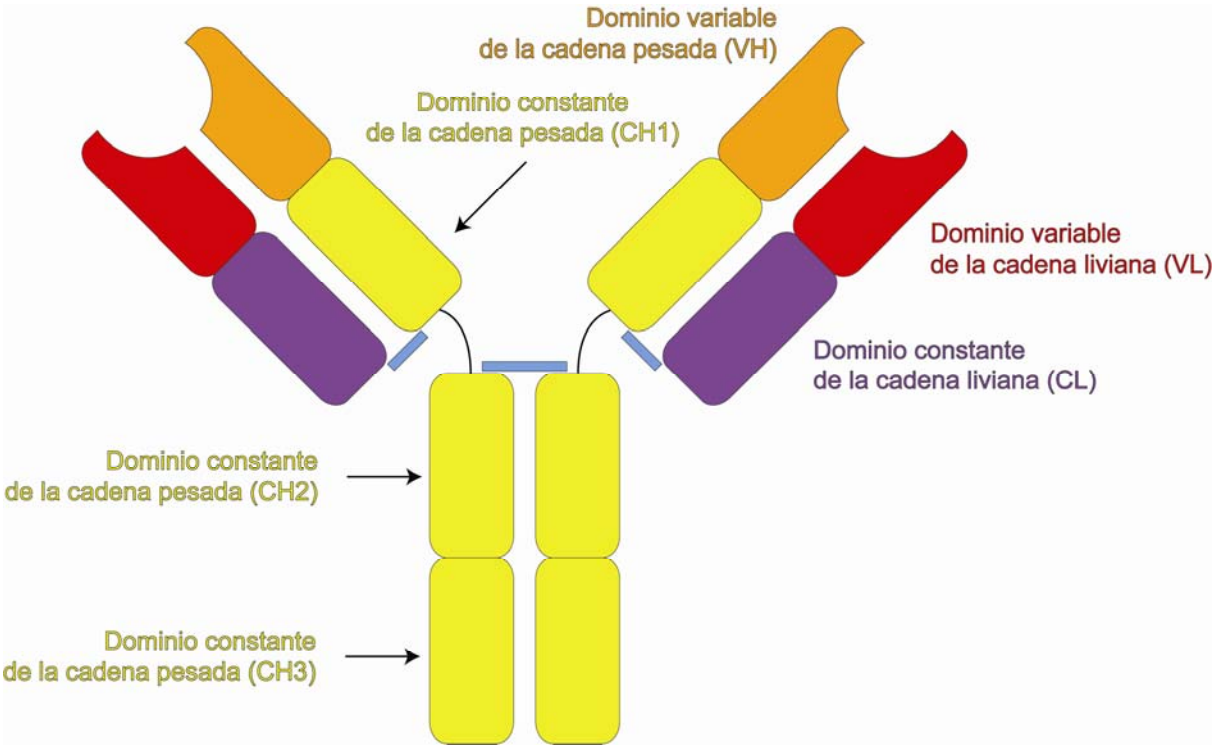


Figura 1.3 – Denominación de los dominios que componen una IgG. Detalle de los puentes disulfuro intercatenarios en color celeste.

Para resumir, podemos decir que en una IgG completa se pueden distinguir dos tipos de estructuras funcionales: dos dominios duplicados de reconocimiento del Ag denominados Fab y el dominio efector denominado Fc, el cual está formado por un dímero C_H2-C_H3 (Figura 1.4) y es el encargado de las funciones efectoras.

El fragmento Fab es una subunidad funcional conformada por los dominios V_L y C_L de la cadena L y los dominios V_H y C_H1 de la cadena H, y es el dominio encargado de reconocer al Ag mediante una zona funcional denominada sitio de combinación o paratope (Figura 1.4). Éste último está mayoritariamente conformado por los CDRs (regiones determinantes de complementariedad), los cuales son lazos (*loops*) de longitud variable y expuestos hacia la superficie que conectan las hojas β antiparalelas del plegamiento barril β achatado de Igs (*immunoglobulin fold*). Existen también en el Fv otros *loops* de menor tamaño que conectan los cordones β pero que en general no están expuestos y no reconocen al Ag, y sirven solamente para darle cierta flexibilidad al Fv.

A su vez, las regiones del Fv que no son CDRs se denominan *framework* (FR), formadas principalmente por los cordones del barril β. De este modo un dominio Fv, ya sea su cadena L ó H,

se ordena de la siguiente manera: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Aunque el Fv tiene la capacidad de unir al Ag como entidad aislada, al no poseer el efecto estabilizador de los dominios constantes C_L y C_H1 no es estrictamente equivalente al Fab. En las secciones subsiguientes se detallará este punto en particular para el caso de estudio.

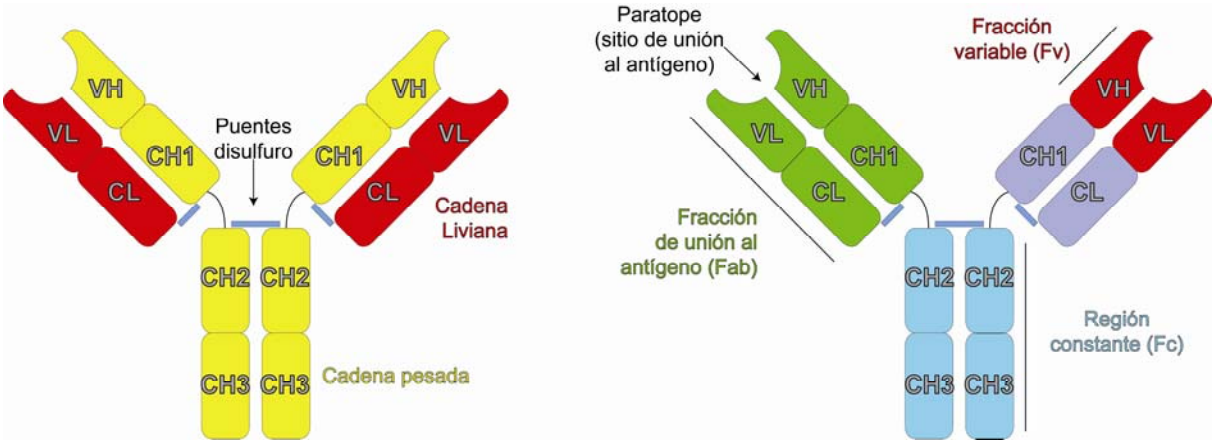


Figura 1.4 – Esquema de la estructura de un Ac de isotipo G, cadenas liviana, pesada y denominación estructural sus fragmentos funcionales.

Dada la naturaleza multimérica de los Acs, es posible obtener los fragmentos Fab y Fv por proteólisis, de modo tal que luego de una purificación se pueden disponer estos fragmentos de modo homogéneo para su análisis. Este es el modo más usado para obtener el fragmento Fab a partir de IgG monomérica. Gracias al surgimiento de las herramientas de manipulación de ADN, la producción de proteínas recombinantes y la disponibilidad de herramientas comerciales, es posible producir estos fragmentos de modo heterólogo y así poder obtener un alto rendimiento de producción proteica para su estudio *in vitro*.

1.7 Repertorio de anticuerpos: Recombinación de genes e hipermutación somática

Como fuera expuesto con anterioridad, el repertorio de Acs de un organismo superior tiene la potencialidad de reconocer virtualmente cualquier Ag y esta variabilidad es generada a partir de la respuesta inmune adaptativa. Este tipo de respuesta genera un nuevo repertorio de Acs cada vez que vuelve a iniciarse, y dicho repertorio de Acs es seleccionado por el Ag, de modo que el clon de LB cuya Ig posee mayor afinidad contra el Ag es estimulado y prolifera, dando lugar a la

neutralización del mismo. Luego este clon permanecerá como LB de memoria (en la mayor parte de los casos) a la espera de una nueva infección con el Ag que produjo su generación.

Existen diversos factores generadores de variabilidad que al disponerse de modo combinatorio dan origen a la gran capacidad de reconocimiento de Ags de todo tipo del sistema inmune. En primer lugar, los diversos isotipos de Igs están determinados por cinco tipos de cadenas H. A su vez, estas cadenas H pueden combinarse con distintos tipos de cadenas L, que pueden ser de tipo κ ó λ, aumentando el número de configuraciones posibles. Las Igs de la mayoría de los mamíferos son codificadas por nucleótidos que se encuentran en tres loci genéticos Igh, Igκ e Igλ, siendo los loci de las cadenas H, κ y λ respectivamente, y cada locus está localizado en un cromosoma diferente.

El ARNm para cualquier cadena polipeptídica de una Ig es transcripto desde un gen complejo a partir de un exón variable que codifica la región variable de la cadena H o L y un exón constante. Los loci de las cadenas livianas de Igλ e Igκ contienen tres tipos de segmentos génicos, V (variables), J (joining) y C (constantes), mientras que el locus de las Igh contiene 4 segmentos génicos: en adición a los segmentos V, J y C existen en este locus los segmentos D (diversity) (Figura 1.5).

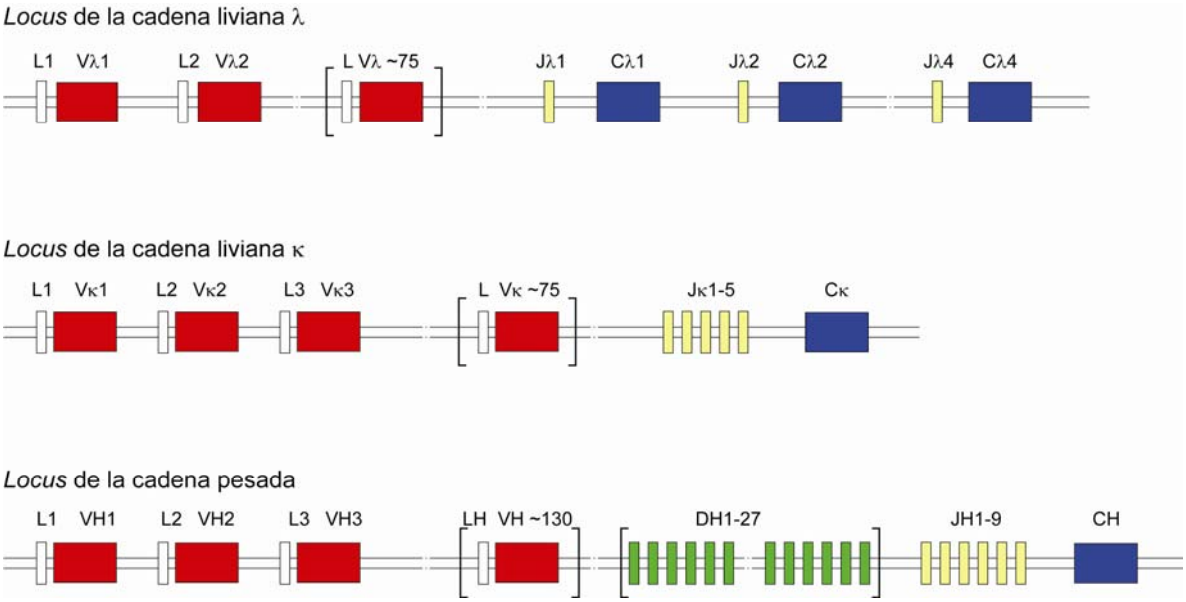


Figura 1.5 – Organización genómica de los loci de inmunoglobulinas humanas. Los segmentos L se denominan Leader por péptido líder, que dirige la proteína por la vía secretora correspondiente; J viene del inglés Joint, dado que es el segmento que une a los segmentos V y C. Los segmentos C son denominados así por ser regiones constantes. El locus de la cadena pesada posee además de los segmentos V, J y C los segmentos D del inglés Diversity.

Los segmentos génicos de un locus dado son recombinados al azar mediante un proceso de recombinación (VJ en cadenas L y VDJ en cadenas H) durante el desarrollo individual de los LB para que colectivamente se pueda obtener el repertorio de LB.

Aunque los segmentos génicos en el cromosoma están separados cada uno por secuencias no codificantes, los segmentos génicos no son exones tradicionales. Éstos no están unidos por un empalme (*splice donor*) ni por sitios que pueden ser reconocidos por los factores de *splicing* de ARN de la célula. En su lugar el ADN genómico es rearreglado por enzimas únicas de linfocitos. Por lo tanto, los segmentos son yuxtapuestos físicamente para dar lugar a un exón de la región variable. En contraste, los exones constantes no están formados por pequeños segmentos génicos, sino que son exones verdaderos separados por intrones. La secuencia de la región constante es unida al exón variable a nivel de ARN mediante splicing convencional para producir un ARNm de una cadena L o H de Ig que pueda ser traducido. En la Figura 1.6 se detalla el proceso de recombinación que da lugar a una cadena polipeptídica de Ig.

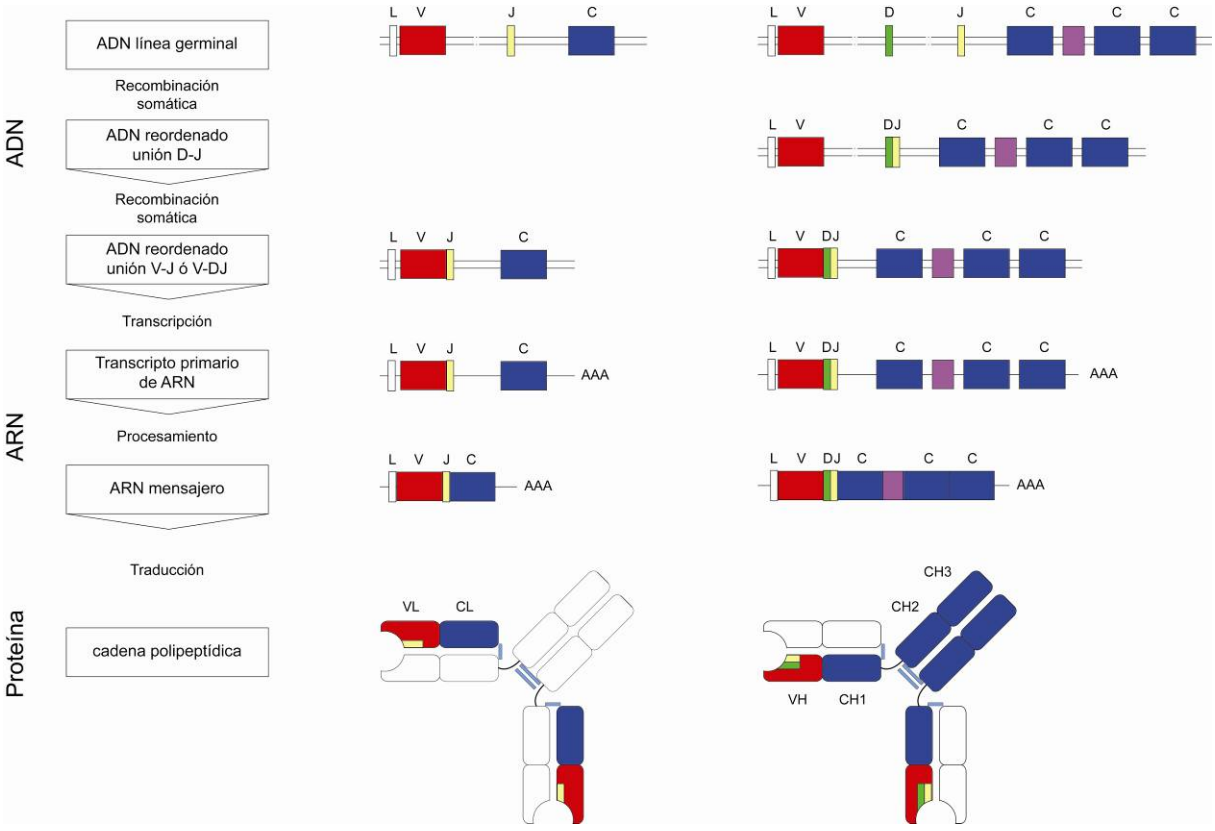


Figura 1.6 – Segmentos genéticos que dan origen a la arquitectura de una inmunoglobulina. El dominio variable tanto de la cadena liviana como de la cadena pesada es construido a partir de recombinación de distintos segmentos génicos mediante diferentes procesos.

Los segmentos V han sido agrupados en familias con una homología del 70-80% de identidad de secuencia nucleotídica entre familias. Se piensa que estas familias surgieron por una extensa duplicación de varios segmentos génicos ancestrales. Algunas secuencias de ADN codificantes para Ig se asemejan a segmentos génicos o exones pero contienen mutaciones que impiden su expresión, son llamados pseudogenes y a menudo se los denomina $J\psi$ o $C\psi$.

En el locus Igκ de ratón hay 250-300 segmentos Vκ, cinco Jκ (uno de los cuales es un pseudogen). En el humano, es similar al ratón pero tiene 75 Vκ, cinco Jκ (todos funcionales) y un exón Cκ. El locus Igλ en humanos y en ratón posee una organización más compleja ya que posee múltiples exones Cλ dando lugar a las subclases conocidas de la cadena λ. Además los segmentos génicos Jλ y Cλ se encuentran como unidades J-C. En ratón hay tres segmentos Vλ, cuatro segmentos Jλ y cuatro Cλ. El Jλ4 y el Cλ4 son pseudogenes. En humanos hay aproximadamente 75 Vλ, siete Jλ (tres de los cuales son pseudogenes) y siete Cλ (tres son pseudo genes)

En el locus Igh humano hay alrededor de 130 segmentos génicos V_H, 27 D_H, 9 J_H (tres son pseudogenes) y 11 exones C_H (dos pseudogenes). En ratón hay 100-200 segmentos génicos V_H, 15 D_H, cuatro J_H y ocho C_H. En ambas especies, en la región contigua a la región 3' de cada exón C_H hay un pequeño sub-exón llamado Se (secretorio) que codifica para una cadena de aminoácidos hidrofílicos específicos de las Igs circulantes. En cambio si la Ig es de membrana, la región 3' del C_H se une a dos sub-exones M1 y M2 que permiten la secreción de secciones transmembrana de cada isotipo de Ig.

Los exones están organizados en el cromosoma en forma similar a como aparecen durante la respuesta inmune: en la mayoría de los casos los exones en la posición 5' son Cμ y le siguen Cδ, Cγ1, Cε2, Cα1, Cγ, Cγ2, Cγ4, Cε1 y Cα2. En ratón: Cμ, Cδ, Cγ3, Cγ1, Cγ2b, Cγ2a, Cε y Cα. Cμ y Cδ están más cerca del extremo 5', ya que las IgM e IgD son las primeras en aparecer en la respuesta inmune humoral. Durante el switch de isotipo que ocurre en el LB en las fases tardías de la respuesta primaria, el exón variable $V_HD_HJ_H$ puede estar asociado con cualquiera de los exones localizados en el extremo 3' del Cδ, mediante un mecanismo que produce la eliminación del ADN interviniente.

El conjunto de estas estrategias generadoras de variabilidad se complementa con la hipermutación somática, y es aquí donde se termina de ajustar la complementariedad entre el Ag y el Ac. Durante el curso de la respuesta inmune, la afinidad de las Igs por el Ag aumenta debido a las alteraciones del sitio de combinación de dichas Igs[1] aunque la naturaleza total de dichos cambios todavía no se conoce. La hipermutación somática cumple un rol esencial en la maduración de la afinidad y es en gran parte responsable de la producción del repertorio de la respuesta secundaria. En estudios usando modelos hapténicos se observó que el grado de mutación de los genes está en relación directa con el curso de la respuesta. Existen también otros fenómenos

asociados a la hipermutación somática en la respuesta inmune secundaria y son a saber, el cambio de repertorio de genes V utilizados con respecto a la respuesta inmune primaria, predominando pocas familias de genes y además observándose un sesgo hacia ciertas combinaciones V_L-V_H. En general dichos cambios producen desde el punto de vista de la afinidad un aumento de la constante de asociación como así también la disminución de la constante de disociación.

El análisis de las mutaciones somáticas de Acs dio por resultado que las mutaciones estén confinadas en la región variable con muy pocas o ninguna mutación en la región constante. En la mayoría de los casos, las regiones donde se producen de las mutaciones son los CDRs, la región de contacto directo con el Ag. Las mutaciones en general ocurren en una región de uno o dos kilobases alrededor de los segmentos V-J. Las mutaciones se extienden desde el sitio 5' dentro del intrón líder[2; 3; 4; 5] aunque las secuencias río arriba del comienzo del sitio transcripcional mutan a baja frecuencia, siguiendo por el fragmento V hasta el intrón J-C.[6] Las mutaciones ocurren en las regiones FR y en la región hipervariable de los segmentos rearreglados.[7; 8] No obstante, se ha encontrado que dichas mutaciones se encuentran concentradas especialmente en los CDRs más que estar esparcidas al azar (Figura 1.8). Las mutaciones introducidas durante la hipermutación somática son predominantemente sustituciones de un nucleótido y las transiciones son más abundantes que las transversiones, bases guaninas aparecen más mutadas que las citosinas y las adeninas más que las timinas. Esto implica que la maquinaria enzimática de la hipermutación somática puede discriminar entre las dos hebras de ADN, existiendo una llamada "polaridad de hebra".[9] Además las mutaciones no son dirigidas al azar a lo largo del exón V, algunos residuos son mutados con mayor frecuencia que otros y son llamados "sitios calientes de mutación" (*hot spots*). Estos *hot spots* pueden ser definidos en parte con secuencias locales de ADN, llamadas secuencias consenso purina-guanina-pirimidina.[10] No obstante, algunos autores sostienen que este consenso es insuficiente para definir las regiones de hipermutación somática. Otros factores como palíndromos o repeticiones invertidas pueden jugar un rol importante en determinar el *hot spot* .[11; 12; 13]

Como fue expresado más arriba, el mecanismo de hipermutación es intrínsecamente no al azar y dado también que es probablemente más útil para dirigir mutaciones durante el proceso de maduración de la afinidad, en algunas partes de la molécula (CDRs) más que en otras (FRs). Esto lleva a pensar que los exones V han evolucionado para poseer los *hot spots* de mutación estratégicamente localizados, de un modo tal que el uso de codones de Igs ha sido seleccionado para que los residuos más "mutables" estén en posiciones donde su modificación sea productiva y de esta forma madure la afinidad de dicha Ig.

Desde el punto de vista del contexto celular en que se produce la hipermutación somática, los LB migran a los tejidos linfoides primarios, donde proliferan a partir del cuarto día desde la inmunización. Los centros germinales se desarrollan durante los subsiguientes tres a seis días.[14] Histológicamente, los centros germinales pueden ser divididos en una zona basal oscura donde hay proliferación de centroblastos, como así también una red de células dendríticas capaces de presentar Ag sobre su superficie.[15] Mediante ensayos inmunohistológicos, secuenciación de genes de LB dentro y fuera de los centros germinales, se observó que las mutaciones se producen en dichos centros.

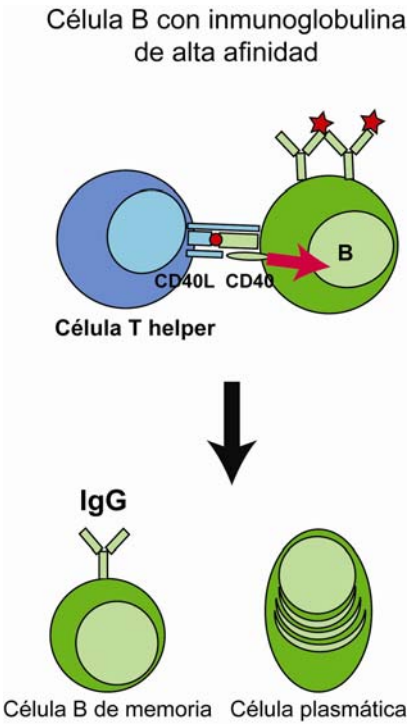


Figura 1.7 –Al poseer alta afinidad por el Ag, la célula B es seleccionada en el centro germinal para proliferar y diferenciarse a células de memoria y células plasmáticas (secretoras de IgG).

La sangre periférica contiene LB de distinto origen y madurez, tanto LB que han sido recientemente seleccionados de la médula ósea como LB de memoria. El análisis de los LB de sangre periférica humana demostró que los LB IgM+ IgD+ no habían sufrido hipermutación somática sobre sus genes V, mientras que los LB de memoria (IgM- IgD-) eran altamente mutados en sus genes V. Por lo tanto, en los centros germinales se produce la proliferación y selección de los LB a modo de ciclos y así se aumenta la eficiencia de los LB en reconocer al Ag al aumentar la afinidad por el mismo.[16]

Este proceso designa las mutaciones que se producen en la secuencia de ADN de la región V de las Igs durante la respuesta de los LB a los Ags. Algunas de estas variantes se unirán al Ag con mayor afinidad, lo cual incrementará la respuesta y la posterior selección de dichas variantes. Es importante remarcar que estas mutaciones afectan solo a los LB que los experimentan y no se heredan por transmisión de la línea germinal.

La hipermutación somática se da sobre la longitud total de los dominios variables pero luego de la selección de los clones que unen al Ag, es en los CDRs donde existe la mayor frecuencia de mutación y en especial en el CDR3. Esto se da debido a que es en el CDR3 donde se produce la unión de los segmentos V y J en la cadena liviana y V, D y J en la cadena pesada.

Se ha descripto en la literatura[17; 18] la importancia de la afinidad del BCR por el Ag en la activación de LB (Figura 1.7). En dichos estudios, se describe que para que un Ag desencadene la activación de LB, este debe tener una afinidad mayor a 10^6 M^{-1} por el BCR.[17] A su vez, existe un límite superior de afinidades de 10^{10} M^{-1}, por encima del cual la activación de LB es indistinta. Esto dice que por sobre este valor de afinidades la activación de LB es indistinta.

Se considera entonces que los procesos combinados de hipermutación somática junto con la selección clonal conforman lo que se denomina como maduración de la afinidad.

1.8 Maduración estructural de la afinidad

El concepto de maduración estructural de la afinidad se refiere a las modificaciones en la estructura de la región variable para producir un incremento en la afinidad hacia el Ag. Este proceso es característico a partir de una respuesta secundaria siendo un proceso muy estricto. En él solo proliferan una o dos células de cada cien que se someten a selección en los centros germinales y aunque su costo energético es muy alto, la generación de Acs que unan al Ag de un modo más eficaz que el generado por su línea germinal puede marcar la diferencia entre la subsistencia del individuo y su muerte.

Durante la respuesta antigénica de las células B, el ADN codificante para la región variable de una IgG sufre un proceso conocido como hipermutación somática. Las mutaciones generadas otorgarán a algunos clones de LB la capacidad de unir al Ag con mayor afinidad, permitiendo que la respuesta de Acs se fortalezca. Este tipo de mutaciones solo afecta a células somáticas y no modifican la información codificada en la línea germinal.

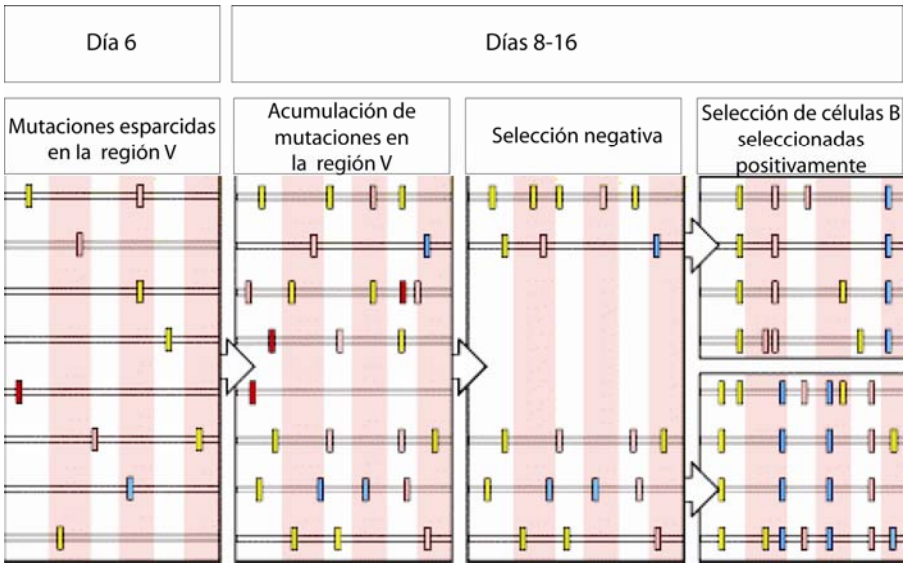
Los genes de la región variable de inmunoglobulinas acumulan mutaciones a razón de un cambio en un par de bases cada 10^3 bases por división celular. La frecuencia de mutación correspondiente a todas las demás células somáticas es mucho menor, siendo de un cambio en un par de bases cada 10^{10} par de bases por división celular. Cada región variable correspondiente a

cadena liviana o pesada es codificada por unas 360 pares de bases, y cerca de tres de cada cuatro cambios de bases resulta en una mutación. De este modo, los LB adquirirán una mutación en el receptor en cada división celular. Estas mutaciones también afectan al ADN que flanquea a la región variable recombinada, pero por lo general no se observan mutaciones en los exones de las regiones constantes. Así, estas mutaciones al azar están dirigidas a la región correspondiente a los genes V recombinados dentro de un LB.

Estas mutaciones puntuales se acumulan una a una a medida que los clones de LB se expanden en el centro germinal. Generalmente, un LB no adquiere más de una o dos mutaciones en cada generación. Estas mutaciones pueden afectar la capacidad de la célula B de unir al Ag, afectando así el destino de dicha célula B. La mayoría de las mutaciones tienen un impacto negativo sobre la capacidad del BCR de unir al Ag. Algunas mutaciones, por ejemplo, pueden introducir un codón de terminación impidiendo la traducción de la proteína y de este modo se elimina la posibilidad de proliferación de dicha célula. En otros casos, las mutaciones introducidas modifican residuos esenciales para el correcto plegamiento de las inmunoglobulinas. Además, estas mutaciones pueden recaer sobre los CDRs, modificando la naturaleza de la interacción Ag-Ac.

Con menor frecuencia, las mutaciones introducidas aumentarán la afinidad del BCR por el Ag. Las células que contienen dichas mutaciones son más eficientes en unir al Ag y son seleccionadas para proliferar y expandirse. Luego de cada ronda de mutaciones, los LB expresan su receptor de superficie y este determina que sucederá con dicho clon. De este modo, una célula seleccionada positivamente debido a la eficacia de su receptor se someterá a otra ronda de mutaciones de modo tal que el proceso se repite. La selección positiva se da al seleccionar las células con mutaciones que mejoran de algún modo la función del Ac y dichas mutaciones pueden recaer indistintamente sobre los CDRs o sobre las regiones *framework* (Figura 1.8), aunque es más frecuente observar mutaciones sobre los CDRs. Es así como, tanto la afinidad como la especificidad de un LB por un Ag dado son continuamente afinadas en los centros germinales.

(A)



(B)

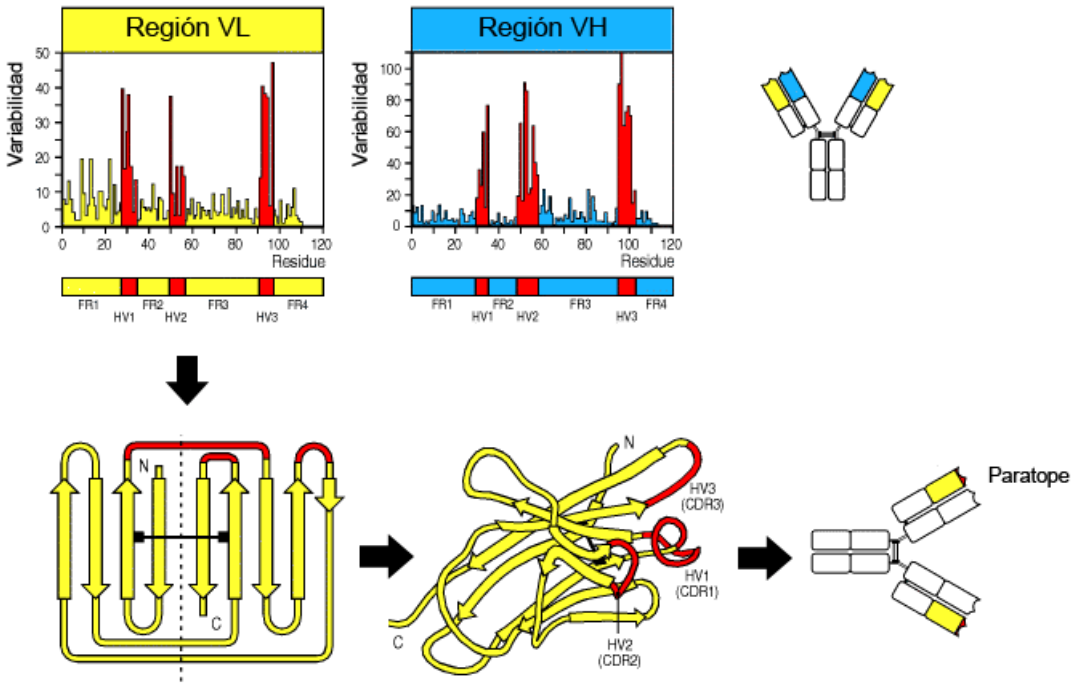


Figura 1.8 – (A) A medida que transcurren las divisiones celulares comienzan se acumulan mutaciones en la región V. Solo se seleccionan aquellas productivas (en color azul) y las mutaciones deletéreas (en rojo) producen la eliminación del clon que las acarrea. (B) La frecuencia de mutaciones es en general mayor sobre los CDRs. Esto se debe en parte a la mayor tolerancia estructural de los CDRs a las mutaciones: ya que en general no suelen influir sobre la estabilidad del Ac, como sí influyen cambios en los FR.

Las mutaciones somáticas que se acumulan en la región variable de los Acs pueden introducir una gran variedad de cambios estructurales productivos, incrementando así la afinidad hacia el Ag en particular. Estos cambios tienen la capacidad de mejorar la interacción entre Ag y Ac, y dicha estrategia puede ser llevada a cabo mediante mecanismos variados. Estos mecanismos implican la formación de contactos mediados por moléculas de agua entre las interfaces del Ag y el Ac,[19] cambios conformacionales en los CDRs[20] y la rotación de los dominios variables, que produce un cambio en la interfaz V_L-V_H[21], entre otros.

Numerosos estudios han descripto las bases moleculares de la maduración de la afinidad de Acs anti-haptenos (moléculas pequeñas conjugas a una proteína transportadora).[22; 23; 24; 25; 26] El modelo aceptado de maduración de la afinidad anti-haptenos puede ser resumido como el proceso de acumulación de mutaciones, favorecidas por una exposición al Ag a largo plazo, lo que redunda en la obtención de Acs de alta afinidad.

Como puede observarse en la Figura 1.9, la maduración de la afinidad hacia un Ag pequeño de tipo hapteno resulta en la formación de un bolsillo en el sitio de combinación del Ac (paratope), mientras que cuando se provoca una respuesta anti-ADN o contra pequeños péptidos el sitio de combinación adopta una conformación de surco. En la maduración de la afinidad de Acs anti-proteína, el sitio de combinación resultante abarca en general una superficie de contacto mucho mayor que en los casos mencionados con anterioridad.

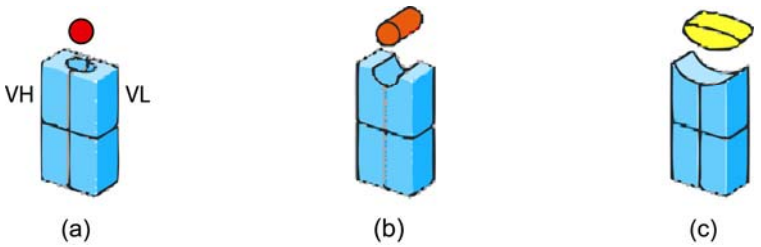


Figura 1.9 – Esquema de diferentes sitios de combinación modificados por el proceso de maduración de la afinidad. (a) hapteno; (b) péptidos y/o ADN; (c) macromoléculas.

Estructuralmente, la maduración de la afinidad resulta en un incremento de la complementariedad de los niveles topológicos y electrostáticos de las superficies que interactúan. Esto es consecuencia de las mutaciones introducidas en los Acs y posteriormente escogidas por el proceso de selección clonal, lo que implica una unión más eficiente del Ac maduro.[24] Sin embargo, existe evidencia de pérdida de flexibilidad del sitio de unión a favor de una ganancia en la afinidad,[27] que a su vez es asociada a una disminución de la componente entrópica de unión.[28]

En la respuesta inmune contra un típico Ag proteico T-dependiente, el proceso de maduración de la afinidad es rápido y está asociado a un evento temprano del cambio de isotipo de inmunoglobulinas IgM a IgG. A diferencia del caso de haptenos, el tiempo de exposición a un Ag proteico en promedio no se correlaciona con un aumento en la afinidad y constantes de asociación durante una respuesta inmune secundaria.[29]

En este punto, es importante enfatizar las diferencias entre los distintos mecanismos de maduración de la afinidad. Aquellos estudios con Acs anti-haptenos no pueden extrapolarse a estudios de maduración de afinidad de Acs anti-proteína. Existen varias causas para estudiar la respuesta inmune contra Ags proteicos: en principio, la mayor parte de los Ags que producen respuesta inmune en un organismo superior son de carácter proteico, mientras que los haptenos por si mismos no son capaces de iniciar una respuesta. Además la superficie de contacto de un Ag proteico posee a nivel estructural una superficie al menos tres veces mayor que la correspondiente a un hapteno, involucrando muchos más contactos de todo tipo, lo que eleva la complejidad del estudio de los determinantes de la afinidad. Por todo esto, es plausible considerar la presencia de varias vías de maduración de la afinidad de Acs producidos contra Ags proteicos.

1.9 Caso de estudio: anticuerpos monoclonales D44.1 y F10.6.6

Estudios previos de maduración de la afinidad sobre el Ac D1.3, específico para lisozima (HEL), mostraron que las mutaciones introducidas por el proceso de hipermutación somática fueron seleccionadas en función a la eficiencia de unión al Ag, y dichas mutaciones se situaron principalmente en las regiones determinantes de complementariedad (CDRs). Es así que el proceso de maduración de la afinidad del Ac monoclonal D1.3 está dado mayoritariamente por una disminución de la constante de disociación (k_{diss}) del complejo con HEL,[30] aumentando la vida media del mismo.

En estudios similares, al comparar las estructuras de cuatro Acs que reconocen un mismo epitope de HEL pero distinto al que es reconocido por D1.3, se pudo observar que la eficiencia de unión Ag-Ac se incrementa al aumentar la superficie apolar en la periferia de la interfaz de este complejo. Esto produce una complementariedad de superficie mejorada entre el Ag y el Ac. Estos Acs a su vez tienen una correlación entre el aumento de la afinidad y el número de mutaciones seleccionadas por la maduración de la misma, es decir, aquellos Acs que poseen mayor afinidad son los que tienen mayor cantidad de mutaciones respecto del Ac de línea germinal. Pero esta correlación no se observó entre la cantidad de mutaciones y la cantidad de puentes de hidrógeno y contactos de Van der Waals,[31] característica saliente de la maduración de la afinidad de Acs anti-hapteno.[32] Aunque la interacción de un Ac con el Ag puede implicar cambios conformacionales en el

paratope, no se han descripto muchos casos donde además el Ag produzca cambios conformacionales en la interfaz V_L-V_H al formarse el complejo. Solo algunos ejemplos de rearreglos cuaternarios y de cambios conformacionales en la interfaz Ag-Ac han sido reportados.[33]

Al mismo tiempo, al comparar las estructuras cristalográficas de los fragmentos Fab y Fv del Ac D1.3 se observa que se producen pequeños rearreglos estructurales en el Fv que producen que los contactos con HEL sean más cercanos que los mismos en el Fab, lo que sugiere un mecanismo de unión a HEL de tipo ajuste inducido o *induced-fit.*[34]

Otros ejemplos muestran que el dominio V_H puede sufrir rearreglos locales y cambios en la disposición de las moléculas de agua en la interfaz V_L-V_H de modo diferente al correspondiente al fragmento Fab.[35; 36] Estudios previos sugieren que el Fv, que sufre un efecto desfavorable producido por la supresión de la región constante C_L-C_H1 del Fab,[37] es a menudo compensado con un incremento de interacciones favorables con el Ag.[35] Aun más, estudios de estabilidad realizados sobre distintos dominios de Acs mostraron que existe una estabilización mutua entre el Fv y los dominios constantes de la cadena pesada (C_H1) y de la cadena liviana (C_L) dado por un alto grado de cooperación.[37]

El plegamiento del dominio Fv es un proceso cooperativo que requiere que ocurran en simultáneo el plegamiento de cada dominio y la asociación de los dominios variables, ya que la interacción de la interfaz V_L-V_H es crucial para la formación de una molécula estable y funcional.[38]

Se estudió el efecto de la maduración de la afinidad de Acs anti-HEL desde el punto de vista de la complementariedad de superficies y haciendo hincapié en los cambios conformacionales que se dan en la interfaz V_L-V_H al unirse el Ag. Además, se analizó la relación entre la maduración de la afinidad y la estabilidad utilizando distintas aproximaciones.

El modelo de estudio elegido consta de dos Acs monoclonales que reconocen la región β plegada de HEL.[39] Estos Acs están relacionados mediante su secuencia y su estructura, ya que sus cadenas livianas y pesadas derivan posiblemente del mismo rearreglo de genes, es decir, provienen de la misma línea germinal. Ambos Acs fueron obtenidos mediante distintos planes de inmunización: el Ac D44.1 fue obtenido mediante dos inmunizaciones separadas por 15 días y el Ac F10.6.6 fue obtenido luego de ocho inmunizaciones a lo largo de 96 días.[29] El dominio V_H de ambos Acs posee mayor cantidad de mutaciones sobre las regiones FRs que sobre los CDRs, en especial el V_H de F10.6.6, que acumula 13 mutaciones.

Ambos Acs poseen una diferencia de afinidad cercana a 700, siendo F10.6.6 el de mayor afinidad. Es así como el mayor número de mutaciones introducidas en el Ac F10.6.6 se correlaciona con un aumento en la afinidad hacia HEL.

Al disponer las estructuras cristalográficas del Fab D44.1 libre y en complejo con HEL[39] y también las estructuras del Fab de F10.6.6 en sus formas libre y unida[40; 41] es posible analizar y

comparar los cambios producidos por el proceso de maduración de la afinidad. Estas comparaciones sugieren que estos Acs se encuentran en diferentes estadíos de la maduración de la afinidad o bien utilizaron vías alternativas para llevar a cabo este proceso, revelando que se produce un ajuste fino de la complementariedad de los sitios de combinación Ag-Ac.

El número de enlaces no covalentes se incrementa de 93 en el complejo D44.1-HEL a 129 en el complejo F10.6.6-HEL, además estos enlaces se dan a menor distancia, signo de una unión más fuerte.[40]

En concordancia con estos resultados, el complejo F10.6.6 posee una mayor complementariedad de superficies y mayor cantidad de moléculas de agua estructurales que actúan como puente entre el paratope y el epitope.

Estos resultados sugieren que el sistema D44.1/F10.6.6 utiliza un mecanismo de maduración de la afinidad similar al de la respuesta anti-hapteno,[25; 42; 43] pero a diferencia de la formación de un pequeño bolsillo que acomoda al hapteno, este sistema produce cambios sobre una superficie plana de mayor magnitud.

Con todo esto, es posible realizar un estudio comparativo de los cambios conformacionales producidos desde el estado libre al estado unido al Ag, observando con detalle las superficies que interactúan, ya sea Ag-Ac o V_L-V_H. Para llevar a cabo este trabajo se analizaron estructuras, se obtuvieron cinéticas de unión entre los fragmentos de Acs y HEL, se realizaron análisis termodinámicos y estudios de estabilidad.

Este trabajo está entonces enfocado en el estudio de la unión Ag-Ac y los efectos estructurales de la maduración de la afinidad sobre las superficies interactuantes Ag-Ac y V_L-V_H.

Objetivos

Objetivos

El objetivo central de este trabajo de tesis es lograr una disección detallada de las bases estructurales que gobiernan el proceso de la maduración de la afinidad de los Acs F10.6.6 y D44.1 hacia HEL.

Al estar ambos Acs relacionados tanto genética como estructuralmente hace de este sistema un excelente modelo para el estudio de la maduración de la afinidad, ya que es posible estudiar este fenómeno desde el punto de vista estructural, cinético, termodinámico y de estabilidad.

Se plantearon diferentes objetivos parciales para cumplir con el objetivo principal:

1- Validación del uso de fragmentos Fv para el estudio de las características estructurales del dominio Fab en la maduración de la afinidad desde el punto de vista cinético y termodinámico, mediante la comparación parámetros de reacción de los Fabs y Fvs de ambos Acs.

2- Conocer el rol del dominio C_L-C_H1 en la estabilidad del dominio Fv, mediante la comparación de la estabilidad de los Fvs y Fabs de ambos Acs.

3- Investigar el rol de cada cadena del Fv del modelo D44.1-F10.6.6 en la maduración de la afinidad desde el punto de vista cinético y termodinámico de unión a HEL relacionado con la estabilidad, mediante el diseño de Fvs quiméricos por intercambio de cadenas (*Chain shuffling*).

4- Identificar el papel de las mutaciones puntuales producidas durante el fenómeno de la maduración de la afinidad, mediante la realización de mutaciones puntuales de los residuos diferenciales del Fv D44.1 y F10.6.6 que forman parte de la interfaz V_L-V_H y Ag-Ac.

5- Postular un mecanismo unión de ambos Acs y de maduración de la afinidad para el sistema D44.1-F10.6.6, mediante el análisis integrativo de todos los resultados.

Resultados

Resultados

2.1 Fragmentos Fab vs. Fvs de los anticuerpos D44.1 y F10.6.6

Según la literatura los parámetros cinéticos y termodinámicos de unión de la IgG con su Ag específico son equivalentes a los de los fragmentos Fab y en menor medida a los Fvs.[44] Como fue descripto en la introducción, la fracción variable (Fv) está contenida en el fragmento Fab, pero en dicho fragmento el Fv posee la contribución del primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1) y del dominio constante de la cadena liviana (C_L) en su estabilidad. Este hecho hace que generalmente las moléculas de IgG posean valores similares de cinética y termodinámica de unión al Ag específico a aquellos medidos para los fragmentos Fab.

Debido a que el objetivo central de este trabajo es lograr una disección detallada de las bases estructurales que gobiernan el proceso de la maduración de la afinidad de los Acs F10.6.6 y D44.1 y que el sitio de unión al Ag (paratope) se encuentra en el Fv, se han investigado los parámetros de unión de los respectivos fragmentos Fvs recombinantes. El uso de dichos fragmentos Fvs nos permite examinar la contribución de las mutaciones acumuladas en la región variable sin la restricción de las fuerzas estabilizantes de los dominios constantes. Por otra parte, las estructuras cristalográficas de los Acs F10.6.6 y D44.1 fueron obtenidas a partir de fragmentos Fabs libres y en complejo con HEL. Por todo lo expuesto y con el objetivo de validar el uso de los Fvs como proteínas que representan el comportamiento estructural del paratope en la molécula de IgG, se realizó un estudio comparativo de los parámetros cinéticos y termodinámicos de unión como así también de estabilidad entre los fragmentos Fabs y Fvs del D44.1 y F10.6.6.

2.1.1 Parámetros cinéticos y termodinámicos de unión a HEL

A pesar de reconocer el mismo epitope sobre la superficie de HEL,[40; 45] los parámetros cinéticos y termodinámicos de unión de D44.1 y F10.6.6 son muy diferentes. Este hecho fue observado previamente en estudios preliminares[29] y luego en mayor profundidad analizando la estructura de ambos complejos Ag-Ac.[40]

Como fue descripto en la introducción y como se puede observar en la Tabla 2.1.1, la afinidad de F10.6.6 por HEL es 700 veces mayor que la correspondiente para D44.1 siendo la principal causa de esta diferencia la mayor constante de asociación (k_{ass}) de la reacción F10.6.6-HEL. Por otra parte, F10.6.6 posee una constante de disociación (k_{diss}) más lenta (es decir, de menor valor absoluto) lo que contribuye al aumento total de la afinidad, dado que la misma fue calculada como $K_A = k_{ass} / k_{diss}$.

A su vez, como en la mayoría de las reacciones Ag-Ac, la reacción de unión a HEL es entálpicamente dirigida tanto para D44.1 como para F10.6.6. La energía libre de Gibbs de una reacción ($\Delta G°$) representa el balance entre la diferencias de entalpía ($\Delta H°$) y entropía ($\Delta S°$) de los reactivos y los productos. La contribución más importante en el $\Delta H°$ de una reacción incluye la diferencia de uniones puentes de hidrógeno, van der Waals y electrostáticas de los reactivos y los productos. En cambio, las principales contribuciones entrópicas en una reacción involucran cambios en la entropía del solvente en la interfaz soluto-solvente (es decir el efecto hidrofóbico en soluciones acuosas), la pérdida de entropía configuracional en la formación de estructuras compactas y la disminución de la entropía translacional en la formación del complejo, entre otras.[46] Es notorio remarcar que en el caso de la reacción F10.6.6-HEL existe una compensación entrópico-entálpica, mientras que en la reacción D44.1-HEL, los valores de $\Delta S°$ son cercanos a cero. Esto denota una marcada diferencia en el modo en que cada uno de estos Acs se une al Ag. Esta diferencia es debida al cambio de 12 aminoácidos en la V_H y de cinco residuos en la V_L, ya que las secuencias de los dominios variables de los Ac D44.1 y F10.6.6 poseen un 90% de identidad para V_H y un 96% de identidad para V_L.

Como puede observarse en la Tabla 2.1.1 los valores correspondientes de afinidad entre Fab y Fv no son significativamente distintos y siguen la misma tendencia. Las constantes cinéticas k_{ass} y k_{diss} y de afinidad K_A tanto del Fab D44.1 como del Fv D44.1 son similares y los parámetros termodinámicos de estas reacciones son equivalentes (Tabla 2.1.1), tanto el parámetro de $\Delta G°$ de formación del complejo como $\Delta H°$ no sufren cambios significativos en sus valores. No obstante, el término entrópico cambia de signo, pero su valor se mantiene cercano a cero lo que no significaría un cambio sustancial en el comportamiento termodinámico de esta reacción.

Anticuerpo	k_{ass}* (M^{-1} s^{-1})	k_{diss}* (s^{-1})	K_A* (M^{-1})	$\Delta G°^{\ddagger}$	$\Delta H°$	$-T\Delta S°^{\ddagger}$
Fab F10.6.6	$7.19 \pm 0.02\ 10^{6}$	$7.00 \pm 0.09\ 10^{-4}$	$1.02 \pm 0.13\ 10^{10}$	-13.52	-18.25 ± 0.81	-4.53
Fv F10.6.6	$1.43 \pm 0.07\ 10^{6}$	$2.50 \pm 0.25\ 10^{-4}$	$5.72 \pm 0.63\ 10^{9}$	-13.31	-15.72 ± 0.06	-2.41
Fab D44.1	$4.21 \pm 0.55\ 10^{4}$	$2.92 \pm 0.01\ 10^{-3}$	$1.44 \pm 0.1\ 10^{7}$	-9.67	-10.34 ± 0.45	-0.67
Fv D44.1	$5.95 \pm 0.52\ 10^{4}$	$6.30 \pm 0.01\ 10^{-3}$	$9.44 \pm 0.82\ 10^{6}$	-9.51	-9.17 ± 0.18	0.34

*Tabla 2.1.1 – Parámetros cinéticos y termodinámicos de las reacciones de los fragmentos Fab y Fv de D44.1 y F10.6.6 con HEL. Las unidades correspondientes a $\Delta G°$, $\Delta H°$ y $T\Delta S°$ son kcal mol^{-1}. *Determinado por Biosensor. ‡Calculado mediante la ecuación $\Delta G=\Delta H-T\Delta S$.*

A su vez, al observar los parámetros termodinámicos de unión del Fv F10.6.6 y compararlos con los del Fab F10.6.6 se notó una disminución de alrededor de medio orden de magnitud en la K_A. La causa de esta disminución es a expensas de la k_{ass} como del leve aumento de la k_{diss}, y en consecuencia la leve disminución de K_A, se debe a la pérdida de estabilidad brindada por el dominio constante C_L-C_H1. En varios AcMos se ha observado este fenómeno.[34]

De todos modos, como se expresó más arriba, la tendencia o la relación de los parámetros cinéticos y termodinámicos de reacción de ambos Acs Fvs vs. Fabs se mantiene constante. Más aún, la relación de los valores de $\Delta H°$ entre el Fab D44.1 y el Fab F10.6.6 resulta del mismo valor que el correspondiente al cociente entre Fv D44.1 y Fv F10.6.6, lo que denota que a nivel entálpico y entrópico, el uso de Fabs tanto como el de Fvs es equivalente.

2.1.2 Análisis estructural comparativo entre Fab D44.1 y Fab F10.6.6

Previo a este trabajo de Tesis, fueron resueltas varias estructuras cristalográficas que se utilizaron como modelos para lograr una comprensión más acabada del sistema de estudio. En la actualidad se puede acceder a las estructuras tridimensionales del Fab D44.1 en su forma libre (código del PDB 1MLB), en su forma unida a HEL (1MLC), del Fab F10.6.6 en su forma libre (2Q76) y en su forma unida a HEL (1P2C). El estudio de la estructura de un Ac en su forma libre y unida antes a su Ag permite observar qué cambios conformacionales se producen al formarse el complejo Ag-Ac tanto a nivel de la interfaz Ag-Ac como en la V_L-V_H y si existe algún rearreglo de moléculas de agua en el paratope. De esta forma, identificando los fenómenos estructurales asociados a la formación de ambos complejos Ag-Ac se puede relacionar dichos cambios a las diferencias cinéticas y termodinámicas de ambas reacciones.

El estudio de los cambios estructurales en estos fragmentos se clasificó en dos categorías: movimientos concertados de la cadena peptídica y cambios en la orientación de las cadenas laterales de aminoácidos. Para el estudio de los movimientos de la primera categoría, se superpusieron los átomos de carbono α ($C\alpha$) de los dominios Fab, Fv, V_H y V_L de las especies libre y unida de D44.1 y F10.6.6 utilizando el método de superposición de estructuras por desvío cuadrático medio (*rmsd*, del inglés *Root Mean Square Deviation*), cuyos valores representan la distancia promedio que existe dos átomos. Para los alineamientos correspondientes al F10.6.6, los valores obtenidos (Tabla 2.1.2) son mayores que aquellos de D44.1, sobre todo cuando son superpuestos los dominios Fv. Esto se debe a la suma de distintos cambios conformacionales que se producen en toda la estructura de Fv F10.6.6 a nivel terciario y cuaternario. A nivel cuaternario, se analizaron los cambios conformacionales superponiendo los dominios V_L de las estructuras libres

con los V_L de las estructuras unidas a HEL y se midió el ángulo de rotación y la distancia necesaria para superponer los dominios V_H. Para el Fab F10.6.6 la rotación y translación necesaria para superponer los V_H fue de 2.9º y 1.1 Å, respectivamente. Valores de rotación y translación similares se encontraron para el Fab D44.1, aunque los valores de traslación fueron menores al error de cálculo del *rmsd*.[39] De acuerdo con estos resultados, para ambos Acs la consecuencia de unirse a HEL es un cambio sutil en la posición de V_H respecto de V_L, aunque como se describirá más adelante este cambio es más notorio para el F10.6.6.

Los valores de *rmsd* que se obtuvieron al superponer las estructuras libre y unidas resaltan el cambio conformacional a nivel de la estructura terciaria que se produce sobre el dominio V_H, especialmente para el F10.6.6 (Figura 2.1). Los mayores valores de *rmsd* se observan en las regiones *framework* (FRs) $FR2_H$ y $FR3_H$ para F10.6.6. En contraste, D44.1 solo presenta pequeños cambios en V_H, incluyendo los CDRs H2 y H3. Estos movimientos de las regiones FRs del F10.6.6 son consistentes con el mayor contenido de mutaciones que posee la V_H de este Ac con respecto a la línea germinal, y se producen por el desplazamiento de dos regiones, una comprendida por el segmento de Arg40H a Leu45H ($FR2_H$) que se desplaza 4 Å y la otra comprendida por la región Asn61H a Lys67H ($FR3_H$) produciendo un desplazamiento de 4.5 Å de la cadena principal (*backbone*).

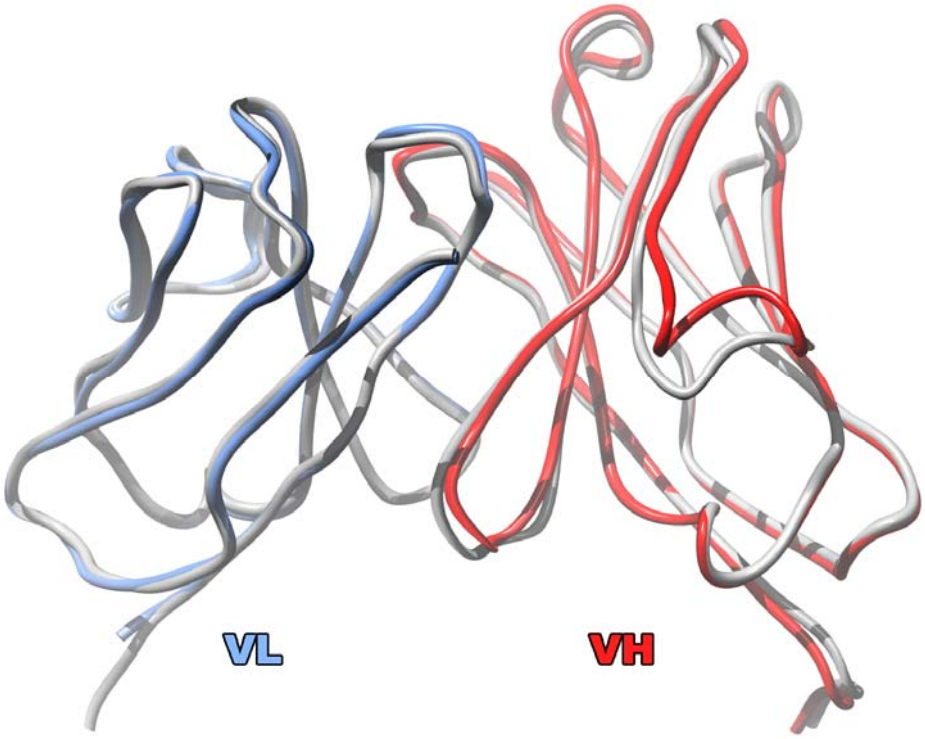


Figura 2.1 – Superposición estructural entre el Fv F10.6.6 libre (en color gris) y el Fv F10.6.6 en complejo con HEL (en colores azul y rojo). El rmsd obtenido superponiendo los carbonos α de la cadena principal es menor a 1 Å.

Al analizar el Fab D44.1 se observaron pequeños cambios conformacionales en todo el Fv, como también se observaron desplazamientos del *backbone* en zonas FRs, pero estos cambios fueron menos notorios (2.5 Å en $FR2_H$ y 1.5 Å en $FR3_H$). De este modo, V_H F10.6.6 parece tener una conformación más compacta, donde sólo hay cambios conformacionales notables en el $FR2_H$ y $FR3_H$ al unirse a HEL. En contraste, todo el Fv D44.1 presenta pequeños cambios conformacionales sobre toda su superficie sugiriendo una organización tridimensional menos estable.

Dominio	**F10.6.6**	**D44.1**
Fab	0.90	0.83
Fv	0.84	0.62
V_H	0.91	0.60
V_L	0.50	0.38
$FR1_H$	0.40	0.41
H1	0.48	0.82
$FR2_H$	1.21	0.69
H2	0.77	1.38
$FR3_H$	1.14	0.36
H3	0.52	0.83
$FR4_H$	0.41	0.32
$FR1_L$	0.48	0.55
L1	0.42	0.36
$FR2_L$	0.20	0.26
L2	0.64	0.45
$FR3_L$	0.48	0.41
L3	0.43	0.60
$FR4_L$	0.36	0.41

Tabla 2.1.2 – Alineamiento estructural de los Fab, Fv, V_H y V_L en forma libre y unida de los AcMos F10.6.6 y D44.1. Los valores informados son rmsd medidos en Å y obtenidos alineando los C^{α} de todas las estructuras encontradas en la unidad asimétrica.

Por su parte, el dominio V_L del F10.6.6 sufre pequeños cambios conformacionales confinados al $CDR3_L$. El desplazamiento del *backbone* del residuo Gly92L produce un cambio de orientación de las cadenas laterales de la Ser93L y el Trp94L.

En resumen, los cambios conformacionales del Fab F10.6.6 al unirse a HEL reflejan que los desplazamientos del *backbone* de los CDRs son de menor magnitud y que los cambios conformacionales en los residuos del paratope están restringidos a las cadenas laterales. En cambio, se produce un gran desplazamiento del *backbone* de los FRs del F10.6.6 al unirse al Ag. Por el contrario, los cambios conformacionales en los CDRs del Fab D44.1 implican movimientos tanto a nivel del *backbone* como de cadenas laterales y desplazamientos menores en los FRs.

Se ha estudiado la presencia de moléculas de agua en todas las estructuras, y como las estructuras cristalográficas del Fab F10.6.6 tanto libre como unido a HEL son de mayor resolución que las de Fab D44.1, se pueden observar mayor cantidad de moléculas de agua. No obstante, considerando los factores B (de temperatura) de las moléculas de agua que forman puentes de hidrógeno entre el paratope y HEL se pudo observar un desplazamiento promedio de cuatro moléculas de agua tanto para la formación de complejo Fab D44.1-HEL como para el Fab F10.6.6-HEL. Por lo tanto, no hay diferencias en el número de moléculas de agua desplazadas en la formación de ambos complejos Ag-Ac.

Se estudió también mediante experimentos cinéticos cómo afecta a la unión Ag-Ac el stress generado por la presencia de solventes. Así, se midieron las constantes cinéticas k_{ass}, k_{diss} y K_A en presencia de solventes de distintos tipos a distintas concentraciones y dichos resultados se muestran en la Figura 2.1.0 como constantes en función de la concentración de agua.[47]

Si bien es posible observar la tendencia a la disminución de las constantes k_{ass} y K_A y aceleración de k_{diss} a medida que aumenta la concentración de solventes (disminución de la concentración de agua), no fue posible obtener un resultado concluyente. No fue posible asignar un efecto discreto a los solventes utilizados, en todo caso el efecto de dichos solventes es similar tanto sobre D44.1 como sobre F10.6.6.

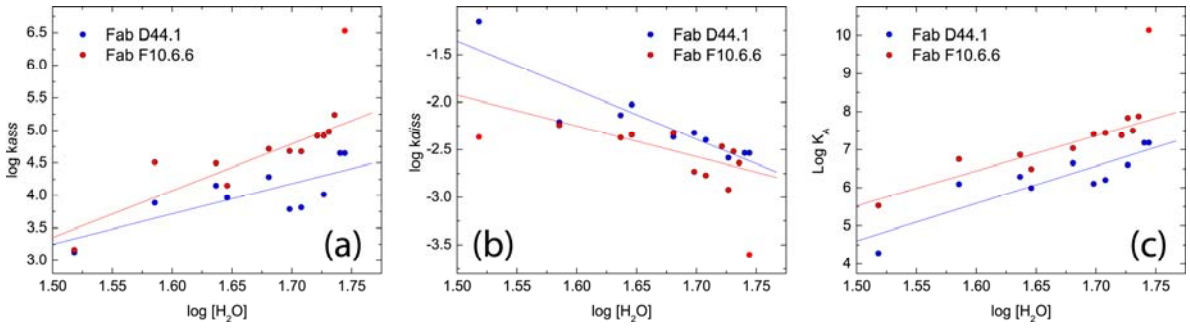


Figura 2.1.0 – Constantes cinéticas y de afinidad de los Fabs D44.1 y F10.6.6 en presencia de metanol, dioxano y glicerol. (a) k_{ass}, (b) k_{diss} y (c) K_A.

Tanto el Fab D44.1 como el F10.6.6 muestran un decrecimiento de tipo lineal a medida que se aumenta la concentración de solventes. Solo el F10.6.6 en condiciones fisiológicas (es decir, sin solventes) presenta constantes significativamente desviadas de la linealidad con respecto a las condiciones de menor concentración de solventes. Esta diferencia podría estar dada por la existencia de aguas estructurales en la interfaz Ag-Ac del complejo F10.6.6 que son removidas al disminuir la actividad de agua en el seno de la solución. Estas aguas no han sido observadas en las estructuras cristalográficas disponibles y se deberían obtener estructuras con soluciones mayores para afirmar con mayor certeza la presencia de dichas aguas estructurales.

Además, dichos resultados no son concluyentes, ya que el comportamiento observado puede ser causado por un componente del Fab F10.6.6 sensible a los cambios de polaridad y de actividad de agua del entorno y no solo a la presencia de aguas con función estructural en la interfaz Ag-Ac. Al utilizar altas concentraciones de solvente podrían estar afectándose otros componentes estructurales de la proteína, afectando otros factores más allá de la actividad de agua.

2.1.3 Interfaz V_L-V_H

En la Figura 2.1.1 se presenta el alineamiento de secuencias de los dominios variables de D44.1 y F10.6.6, donde se marca en color azul los residuos que conforman la interfaz V_L-V_H de D44.1 y de rojo la correspondiente de F10.6.6. Se puede observar que existen pocas mutaciones sobre la superficie V_L-V_H: cuatro para V_H y una para V_L.

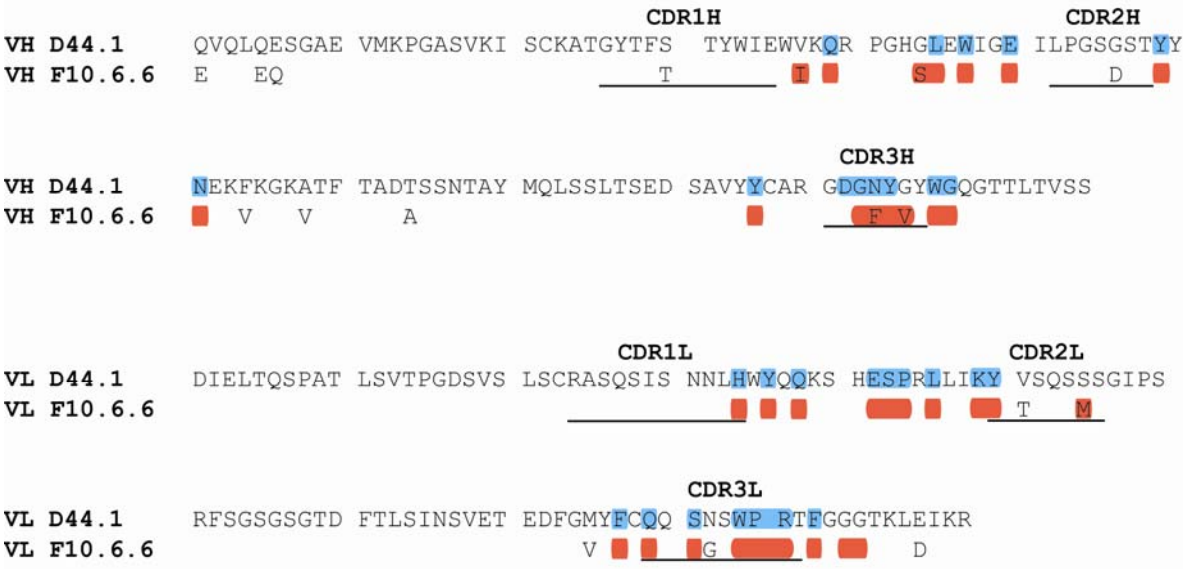


Figura 2.1.1 – Alineamiento de las cadenas V_H y V_L del dominio Fv de los AcMos D44.1 y F10.6.6. En azul se representan aquellos residuos de la interfaz de V_L-V_H de D44.1 y en rojo los de F10.6.6.

Como se explicó más arriba, la unión de HEL al Fab F10.6.6 produce cambios más evidentes a nivel cuaternario, provocando el desplazamiento discreto y rotación de los dominios V_L y V_H. Para un estudio más profundo de los cambios sufridos en la interfaz V_L-V_H se calcularon la superficie oculta al solvente (BSA, del inglés *Buried Surface Area*), el número de contactos y la complementariedad de superficie (SC, del inglés *surface complementarity*) de la forma libre y unida al Ag de ambos Acs. El estudio de la BSA de dicha interfaz tanto para el Fab D44.1 como para el Fab F10.6.6 no resaltó ninguna diferencia significativa entre ambos complejos (25 $Å^2$ para F10.6.6 y 9 $Å^2$ para D44.1). Sin embargo, la BSA de la V_L-V_H del Fab F10.6.6 en su forma libre es 8% mayor que la correspondiente al Fab D44.1 (1527 $Å^2$ vs. 1412 $Å^2$). Cuando se analizó la SC[48] (Tabla 2.1.3) se pudo observar que el Fab F10.6.6 tiene un valor significativamente mayor (39%) que el del Fab D44.1, lo que implica una interacción más fuerte entre los dominios V_H y V_L. No se observó diferencia en SC entre las estructuras libre y unida del Fab F10.6.6, mientras que se encontró una diferencia del 19% para las estructuras del Fab D44.1, sugiriendo que la interfaz V_L-V_H se ajusta mejor por la unión del Ag.

Se calcularon a su vez los contactos atómicos tales como puentes de hidrógeno y uniones de Van der Waals que forman la interfaz V_L-V_H tanto para el Fab D44.1 como para el Fab F10.6.6, ambos en su forma libre y unida a HEL.

	Fab F10.6.6 (libre)	**Fab F10.6.6 (unido)**	**Fab D44.1 (libre)**	**Fab D44.1 (unido)**
Puentes hidrógeno	7	9	7	8
Van der Waals	151	110	114	107
Contactos totales	158	119	121	115
Complementariedad (SC)	-130.2	-126.5	-93.1	-114.8

Tabla 2.1.3 – Contactos atómicos y complementariedad de superficie (SC) de la interfaz V_L-V_H de las formas libre y unidas del Fab D44.1 y F10.6.6. Los contactos atómicos fueron calculados utilizando un corte de 4.0 Å como distancia máxima. Los valores de SC fueron calculados con el software FADE[48]. Valores absolutos mayores de SC significan mayor complementariedad.

En la Tabla 2.1.3 se detallan los tipos de contactos en la interfaz V_L-V_H y los valores de SC. Es notable que ambos Acs posean un número similar de contactos en su forma unida, 115 para el Fab D44.1 y 119 para el Fab F10.6.6 mientras que en su forma libre existe una gran diferencia en la cantidad de contactos de la interfaz V_L-V_H, así es que D44.1 tiene 121 contactos en total mientras que F10.6.6 tiene 158. De este modo el Ac D44.1 pierde solo siete contactos de Van der Waals y gana un puente de hidrógeno al unirse a HEL, mientras que el F10.6.6 pierde 41 contactos de Van der Waals y gana dos puentes de hidrógeno. Además, cabe resaltar que cerca de la mitad de los contactos que pierde F10.6.6 en su interfaz V_L-V_H al unirse a HEL se encuentran en su región $FR2_H$ y en $CDR3_L$. La Figura 2.1.2 muestra la superficie del dominio V_H de los Acs F10.6.6 y D44.1 resaltando los átomos que contactan con el dominio V_L y la ubicación de los cambios conformacionales más importantes ocurridos por la unión al Ag.

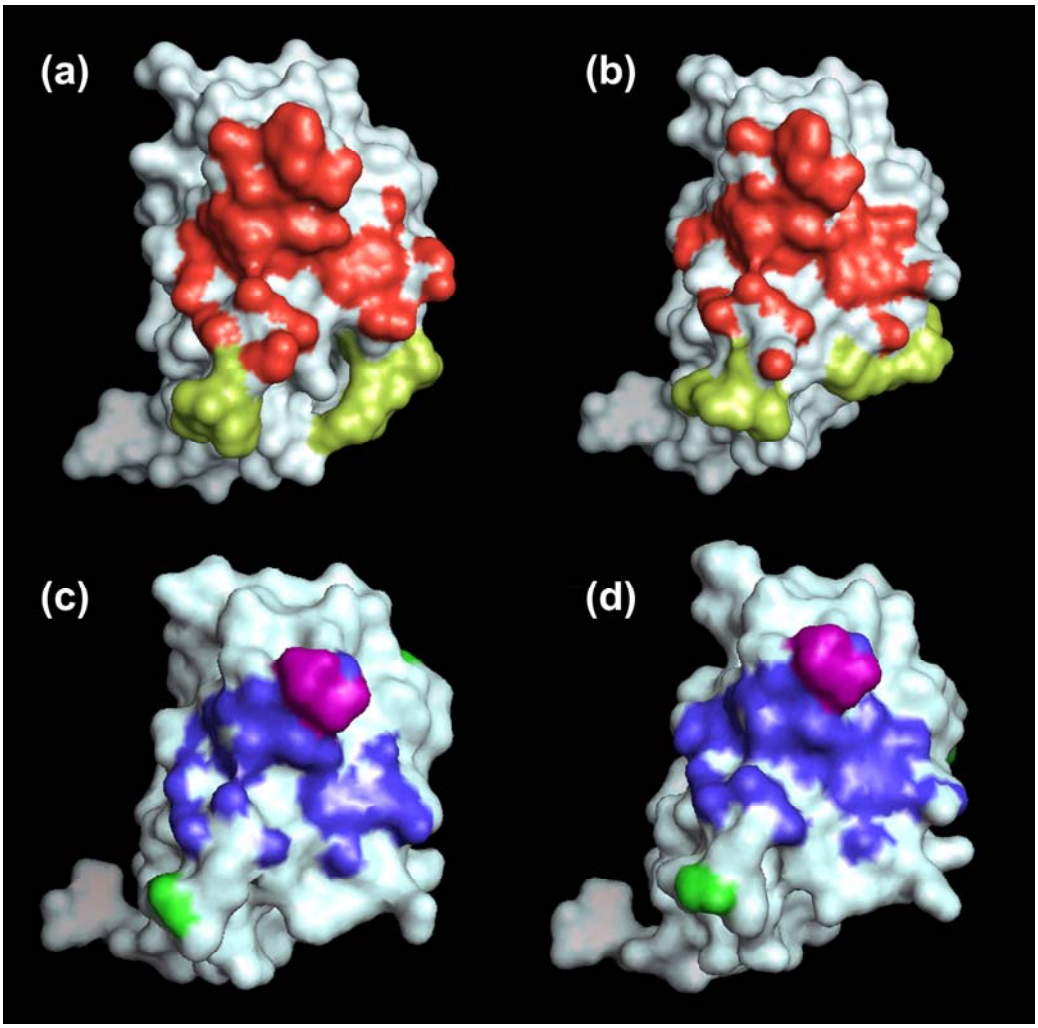


Figura 2.1.2 – Cambios producidos en sobre la interfaz V_L-V_H al unirse HEL, se observa en la figura aquellos cambios que afectan al dominio V_H. (a) V_H F10.6.6 libre y (b) unido. Los átomos que forman la interfaz V_L-V_H se colorean en rojo y aquellos residuos de mayor rmsd se encuentran en color amarillo. (c) V_H D44.1 libre y (d) unido. En azul se encuentran los átomos que conforman la interfaz V_L-V_H, los residuos con mayores valores de rmsd dentro de la interfaz se colorean con púrpura y aquellos fuera de la interfaz que poseen mayor rmsd con verde.

Dicha figura muestra que los residuos con valores altos de *rmsd* (superponiendo la forma libre y unida de la V_H F10.6.6) están fuera de la interfaz V_L-V_H (Gly42H, His43H, Glu62H, Val64H y Lys65H). Estos residuos constituyen los dos segmentos del $FR2_H$ y del $FR3_H$ que conllevan desplazamientos descriptos en la sección previa. En cambio, para el D44.1 se encontraron menos contactos en la interfaz V_L-V_H (Tabla 2.1.3 y Figura 2.1.2) Los residuos que tienen valores altos de *rmsd* están dentro (Asp100H, Gly101H y Asn102H) y fuera de la interfaz V_L-V_H (Gly42H, Gly54H y Gly56H).

Las diferencias entre las interfaces de los dos Ac se pueden visualizar fácilmente en la Figura 2.1.2 donde existen más contactos en el Fab F10.6.6 que en el Fab D44.1. Además según la Tabla 2.1.3 la cantidad de dichos contactos observados en la interfaz V_L-V_H de la forma libre del Fab F10.6.6 son 37% mayor que los encontrados en el Fab D44.1, hecho que está de acuerdo con los datos de BSA y SC. Así, la dislocación de la cadena principal en los $FR2_H$ y $FR3_H$ del F10.6.6 permitiría un rearreglo interno para mantener la unión a V_L sin alterar la estabilidad debido a la unión a HEL.

A modo de resumen, con lo expuesto en las Tablas 2.1.2 y 2.1.3 y en la Figura 2.1.2, es posible establecer que el F10.6.6 es más plástico, lo que le permitiría soportar los cambios conformacionales que ocurren en la interfaz V_L-V_H al unirse a HEL. Como contraparte, D44.1 parece incapaz de sufrir dichos cambios conformacionales que se necesitan para incrementar la eficiencia de unión a HEL. Más aún, los análisis de BSA, SC y el análisis de los contactos de las formas libres y unidas de la interfaz V_L-V_H para ambos Acs demuestra que la interacción V_L-V_H es más fuerte en F10.6.6 que en D44.1, sugiriendo que el dominio Fv F10.6.6 posee una mayor estabilidad estructural que el dominio Fv D44.1.

2.1.4 Estabilidad térmica

Con el fin de estudiar la estabilidad de los fragmentos Fv y la contribución del dominio constante C_L-C_H1 en la estabilización del dominio Fv se analizó el contenido de estructura secundaria de los fragmentos Fab en solución y en sus correspondientes estructuras cristalinas. En el caso de los Fvs recombinantes se realizó únicamente el análisis en solución, dado que no fue posible obtener cristales de buena calidad de estas especies.

Se tomaron espectros de dicroísmo circular (CD) de los fragmentos Fv y Fab en estado nativo de D44.1 y F10.6.6 a 20°C (detallados como insertos en la Figura 2.1.3). Los espectros obtenidos muestran la típica señal de estructura β con un mínimo a 216 nm y con picos positivos a 203 nm y a 233 nm, es decir un espectro típico del plegamiento de Acs. Dicho pico a 233 nm fue descripto en la literatura[49] como una consecuencia de un entorno particular en el entorno asimétrico de residuos aromáticos. En el caso de los Fabs, se puede observar a simple vista que tanto D44.1 como F10.6.6 poseen un contenido similar de estructura secundaria (Figura 2.1.3a, inserto), mientras que para los Fvs (Figura 2.1.3b, inserto) existe una diferencia notable de amplitud, donde el Fv F10.6.6 posee mayor señal dicroica a 216 nm y a 233 nm, sugiriendo la posibilidad de un mayor contenido de estructura secundaria.

Utilizando el método sugerido por Tetin *et al*[50] se calculó el contenido de estructura secundaria a partir de estos espectros con el objetivo de cuantificar la diferencia (Tabla 2.1.4), utilizando el software CDPro[51].

	$H_{regular}$	$H_{distorted}$	H_{total}	$S_{regular}$	$S_{distorted}$	S_{total}	*Turn*	*Random*
Fv F10.6.6	0.004	0.025	0.029	0.268	0.158	0.426	0.248	0.297
FV D44.1	0.006	0.015	0.021	0.243	0.128	0.371	0.202	0.361

Tabla 2.1.4 – Contenido de estructura secundaria de los Fvs F10.6.6 y D44.1, calculada a partir de los espectros de dicroísmo circular. Los valores indican la fracción de estructura secundaria para cada tipo: H=hélice α, S=hoja β, Turn=loops y Random=sin estructura. $H_{regular}$ o $S_{regular}$ refiere a la fracción de residuos en la parte central de estructuras tipo hélice α u hoja β; $H_{distorted}$ o $S_{distorted}$ refiere a los residuos terminales en ambos casos; H_{total} o S_{total} es la suma de ambos componentes.[51]

Este análisis mostró que el Fv D44.1 posee estructura desordenada en un 18% mayor que el Fv F10.6.6, mientras que este último posee una mayor proporción de estructura β, 12.9% mayor que el Fv D44.1, además de una mayor cantidad de loops estructurados. Esta diferencia de estructura secundaria podría significar una menor estabilidad termodinámica del Fv D44.1. Estos datos fueron coincidentes con los hallados usando el programa DSSP[51] analizando los dominios Fvs en la estructura de los Fabs libres de ambos Acs.

En la Figura 2.1.3 se describe la desnaturalización por temperatura de ambos Fabs y Fvs, medida por la señal dicroica a 216 nm. Cabe aclarar que debido a que el fenómeno de desnaturalización térmica es irreversible tanto para los Fabs como para los Fvs (lo que significa que la señal dicroica no se recupera al volver a la temperatura inicial de la curva de desnaturalización), se determinaron temperaturas de transición *aparentes* (T_m app) en todos los casos. Como se puede observar en la Figura 2.1.3a ambos Fabs tienen el mismo comportamiento frente a la desnaturalización térmica, con una línea de base similar hasta alcanzar la desnaturalización/agregación a 77ºC. Analizando los resultados de la desnaturalización térmica observamos que el Fv F10.6.6 es más estable que el Fv D44.1.

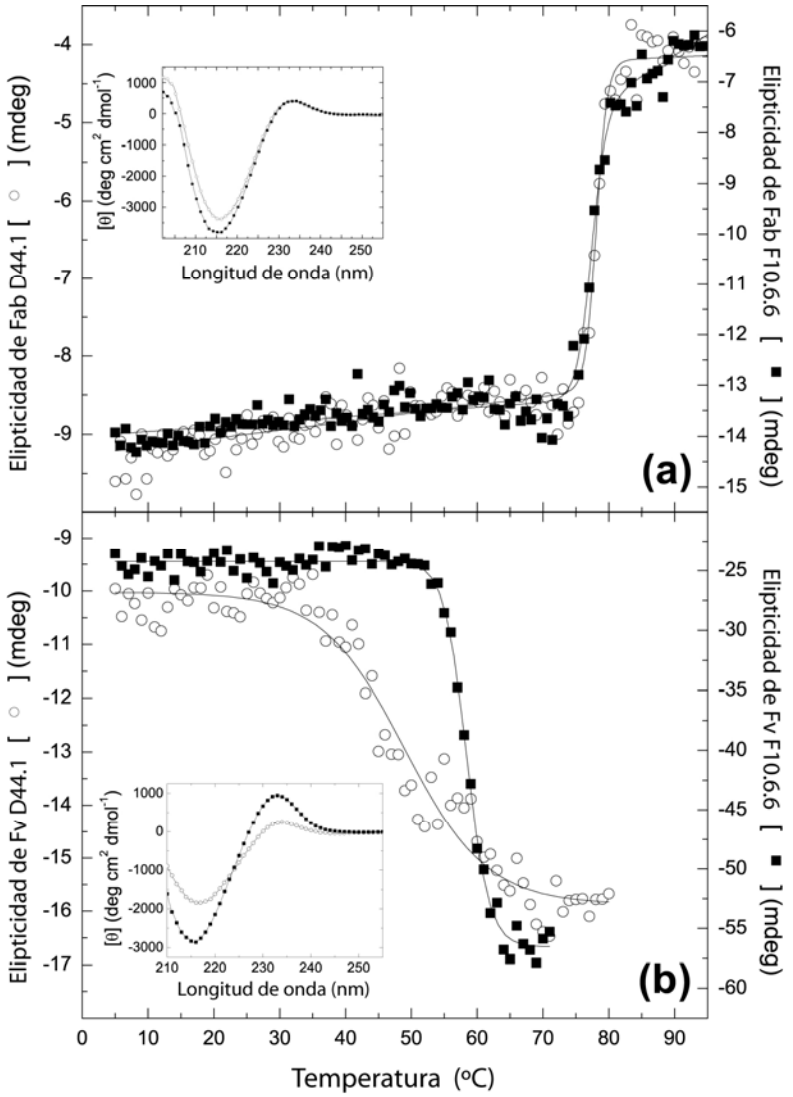


Figura 2.1.3 – Desnaturalización térmica de los fragmentos (a) Fabs y (b) Fvs, seguida por la señal dicroica a 216 nm. F10.6.6 es representado con cuadrados negros y D44.1 con círculos blancos. Tanto en (a) como en (b) se encuentran insertos los espectros de dicroísmo circular en estado nativo de ambos Acs en sus dos versiones Fab y Fv.

Este comportamiento se siguió mediante el cambio de la señal dicroica a 216 nm (Figura 2.1.3) y a 233 nm con resultados idénticos. Esto significa que tanto la estructura secundaria (señal a 216 nm) como la señal correspondiente al entorno tridimensional de triptofanos (dada por la señal a 233 nm) cambian simultáneamente. No solamente posee el Fv D44.1 menor estabilidad térmica, si no que además mediante el análisis de su curva de desnaturalización se puede deducir que el mecanismo de desnaturalización es notoriamente menos cooperativo, dado que su estado nativo es menos estable y la pendiente de la transición es mucho menor que en el caso del Fv F10.6.6.

Se midió también como complemento a los experimentos de CD la estabilidad térmica de los

fragmentos Fabs y Fvs mediante dispersión dinámica de luz (DLS, del inglés *Dynamic Light Scattering*). Particularmente, esta técnica se fundamenta en que la cantidad de luz que dispersan partículas en solución está relacionada con su tamaño. Así, una proteína en conformación nativa dispersa menos luz que la misma proteína en estado desnaturalizado. De este modo, a medida que la temperatura del sistema aumenta las proteínas aumentan su energía conformacional teniendo como consecuencia un aumento de su radio hidrodinámico (R_H), dispersando mayor cantidad de luz hasta alcanzar el estado desnaturalizado. El análisis de las bases teóricas de la dispersión de luz se encuentran bien explicadas en la literatura[52; 53] y describirlo en detalle va más allá de los objetivos de esta Tesis. Cabe aclarar que esta técnica proporciona información acerca del estado oligomérico de las proteínas en solución, su R_H y su PM, por lo que es una técnica sumamente poderosa y de gran utilidad en el estudio conformacional de proteínas.

A medida que aumenta la temperatura, comienzan a suceder nuevos fenómenos de agregación, fluctuación del R_H que tienen como consecuencia el aumento de la luz dispersada, señal que se observa en mediante el parámetro CR (*count rate*). Este parámetro se refiere al número de fotones detectados por segundo y es expresado en kilocuentas por segundo (kcps) es decir el número de fotones promedio detectado en 1000 cuentas por segundo. Este parámetro es una medida de la capacidad de dispersión de la muestra y es útil para establecer la calidad de la muestra. Si se evidencia un aumento de este parámetro en función del tiempo de medida indica agregación, contrariamente una disminución indica sedimentación.

Dicho parámetro es normalizado en fracción molar de proteína desplegada tomando en cuenta los estados nativos y desnaturalizados. La fracción molar es graficada en función de la temperatura y así es posible determinar transiciones entre los estados nativo y desnaturalizado.

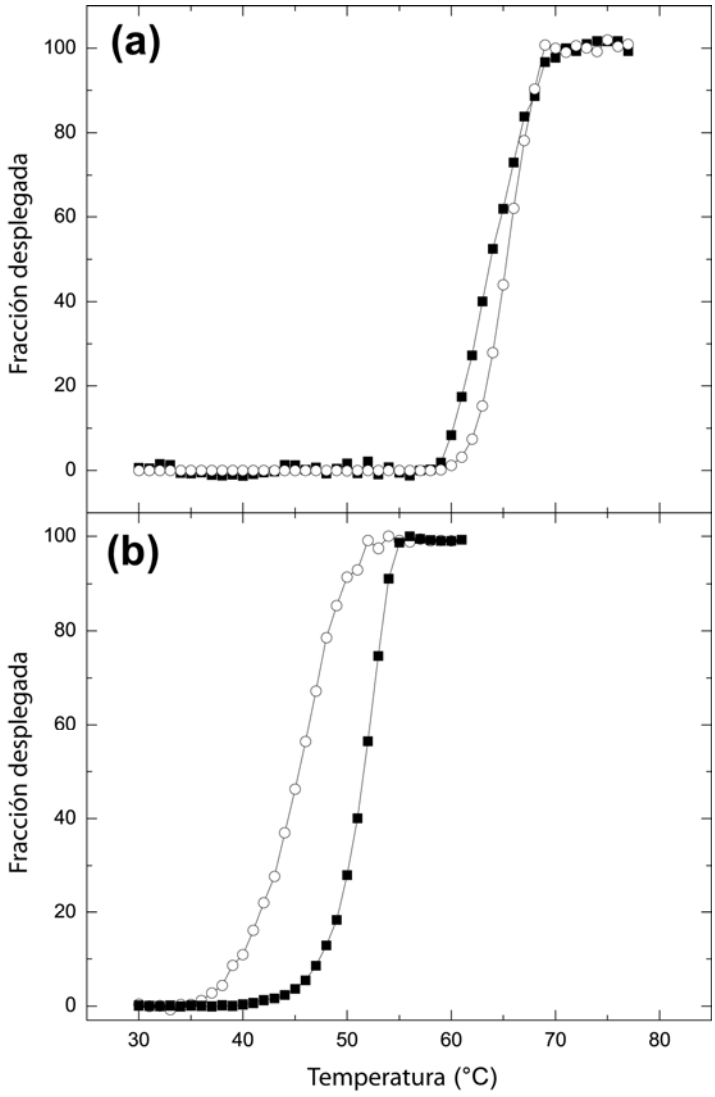


Figura 2.1.4 – Desnaturalización térmica de los fragmentos (a) Fab y (b) Fv, seguida por DLS. F10.6.6 es representado con cuadrados negros, D44.1 con círculos blancos. Los datos son representados como porcentaje de proteína desplegada en función de la temperatura.

Como se puede observar en la Figura 2.1.4, la desnaturalización térmica estudiada por DLS sigue la misma tendencia que aquella seguida por CD. Los fragmentos Fab tienen comportamientos similares (Figura 2.1.4a), con casi la misma T_m app. La desnaturalización de los Fvs (Figura 2.1.4b) sigue la misma tendencia por DLS que por CD el Fv D44.1 tiene una estabilidad menor que el Fv F10.6.6.

Asimismo, se puede representar el incremento de CR en función de la temperatura como el incremento de la fracción de proteína desplegada, seguida de agregación. Como se describió anteriormente, las temperaturas de transición calculadas para DLS en función de la temperatura

son *aparentes*, la señal inicial no se recupera al retornar a la temperatura inicial y la proteína en solución se encontró totalmente agregada en todos los casos en el estado final, lo que demuestra que la desnaturalización no es reversible.

Aunque las tendencias entre estas dos técnicas se mantienen, las T_m varían levemente en algunos casos y en otros de modo más notorio (detalle en la Tabla 2.1.5).

Fragmento	**CD T_m (ºC)**	**DLS T_m (ºC)**
Fab F10.6.6	77.2	64.0
Fab D44.1	77.4	65.3
Fv F10.6.6	58.4	51.4
Fv D44.1	49.5	44.2

Tabla 2.1.5 – Estudios de desnaturalización térmica mostrando las temperaturas de transición aparentes (T_m) de distintos fragmentos de Acs.

Esta diferencia se debe a diversos factores que influyen en la determinación de las T_m. El primer factor determinante es la rampa de temperatura utilizada en cada experimento. En el caso del CD se utilizó 1ºC/min mientras que en DLS se utilizó 2ºC/min. Esto resulta en diferentes períodos de tiempo de exposición a altas temperaturas para una misma proteína.

Aun con esta diferencia encontrada entre estos dos métodos, las tendencias se mantienen y el Fv F10.6.6 es más estable térmicamente que el Fv D44.1, mientras que ambos Fabs poseen estabilidades térmicas similares, lo que demuestra el fuerte efecto estabilizador que ejerce el dominio constante C_L-C_H1 sobre el dominio Fv. Así entonces, podemos clasificar estos fragmentos de Acs según su estabilidad térmica:

Fab D44.1 = Fab F106.6 > Fv F10.66. > Fv D44.1

2.1.5 Desnaturalización por agentes caotrópicos

Además de la desnaturalización térmica, se estudió la desnaturalización por agentes caotrópicos midiendo el cambio de la fluorescencia intrínseca de triptofanos. Los residuos de triptofano en el Fv D44.1 y el Fv F10.6.6 están conservados en número y en su posición en la secuencia (Figura 2.1.1), por lo tanto se consideró que estructuralmente estos residuos son similares en ambos AcMos, lo que permite comparar el comportamiento de los mismos al exponerse al solvente debido al aumento de concentración de urea o cloruro de guanidinio.

Se midieron espectros de emisión de fluorescencia desde 300 a 400 nm, con excitación a 295 nm para todos los casos y se calculó el centro de masa de fluorescencia (CM) para cada concentración ensayada de desnaturalizante. El valor CM para el estado nativo (sin urea) refleja el cambio promedio en el entorno polar de los residuos de Trp. En el caso de los Fabs, ese cambio es nulo (Figura 2.1.5a); el estado nativo de ambos Fabs tiene un CM de fluorescencia similar y una transición del estado nativo al desnaturalizado aproximadamente a 3.0 M de cloruro de guanidinio para el Fab D44.1 y a 3.2 M para el Fab F10.6.6, por lo que se considera que ambos fragmentos no se diferencian significativamente en su mecanismo de desplegado, así como tampoco en la exposición al solvente de los triptofano de la molécula. A diferencia de los Fabs, los Fvs se diferencian notablemente en lo que respecta a la desnaturalización por agentes caotrópicos (Figura 2.1.5b).

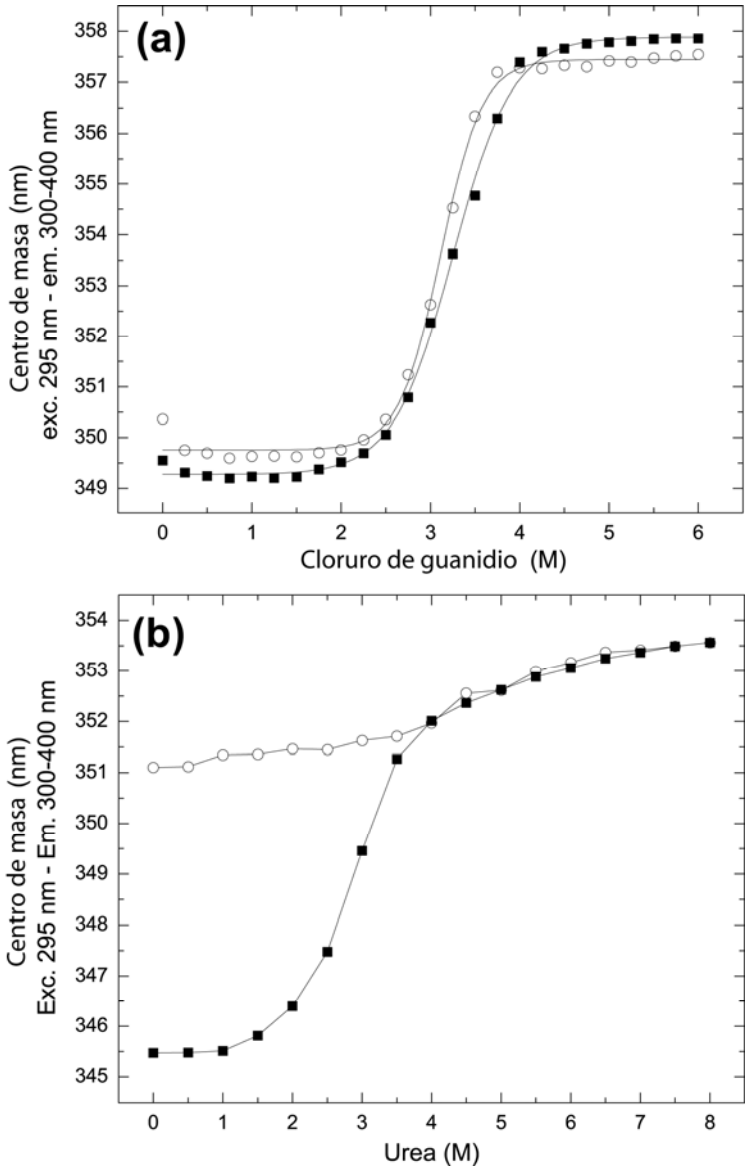


Figura 2.1.5 – Desnaturalización por agentes caotrópicos medido por fluorescencia intrínseca de triptofanos. (a) Desnaturalización por cloruro de guanidinio de los Fabs. (b) Desnaturalización por urea de los Fvs, F10.6.6 es representado con cuadrados negros, D44.1 con círculos blancos.

El estado nativo del Fv D44.1 es notablemente diferente al del Fv F10.6.6, con un valor de CM notoriamente corrido hacia el rojo, lo que denota una mayor exposición al solvente de los residuos Trp en promedio. Además, a diferencia del Fv F10.6.6, la desnaturalización del Fv D44.1 no posee una transición sigmoidea típica de una desnaturalización en dos estados, como es el caso del Fv F10.6.6, sino que la curva de desnaturalización es casi una recta. Una posible explicación de este fenómeno es que la conformación nativa del Fv D44.1 no sea lo suficientemente estable y al

desnaturalizarse no es posible observar una típica transición entre el estado nativo y el estado desnaturalizado, comportamiento típico de una conformación de glóbulo fundido.[54]

Como en el caso de la desnaturalización térmica, se clasificaron los fragmentos de acuerdo a su estabilidad ante agentes caotrópicos:

Fab D44.1 = Fab F10.6.6 > Fv F10.6.6 > Fv D44.1

2.1.6 Unión a ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico (ANS)

Cuando el ANS se une a regiones hidrofóbicas expuestas al solvente en la superficie o en cavidades de las proteínas, su rendimiento cuántico de fluorescencia se incrementa y el máximo de emisión cambia de 520 a 480 nm.[55] Así, el ANS es utilizado para monitorear la cantidad de parches o cavidades hidrofóbicas que contiene una proteína, este método es uno de los más difundidos para detectar posibles conformaciones parcialmente plegadas, también conocidas como glóbulo fundido.

Durante este trabajo el experimento de unión a ANS se utilizó para comprobar si los fragmentos Fvs poseen conformación de glóbulo fundido en condiciones de estado nativo. Esta posibilidad fue sugerida por el experimento de desnaturalización por urea, donde la falta de transición entre estado nativo y desnaturalizado dada por una baja cooperatividad es evidencia de una posible conformación de glóbulo fundido.[54]

Se midieron entonces los espectros de emisión de fluorescencia de los Fabs y Fvs en PBS y en presencia de concentraciones crecientes de desnaturalizantes. En la Figura 2.1.6 se observan los espectros de emisión de ANS al incubarse con los distintos fragmentos. El espectro de emisión de ANS incubado con el Fv F10.6.6 en PBS no tiene diferencias significativas respecto del espectro de emisión del control de ANS en PBS (Figura 2.1.6a), su CM no cambia y su intensidad de emisión cambia imperceptiblemente. Sucede lo mismo con la emisión del ANS en el caso del Fv F10.6.6 en urea 8M, no hay diferencias respecto de la emisión control. Esto es indicativo de que el Fv F10.6.6 no une cantidades detectables de ANS medidas por este método.

A diferencia del caso anterior, el Fv D44.1 presenta evidencias notorias de unión a ANS. Su máximo de emisión se desplaza hacia el azul en aproximadamente 21 nm, además de tener una emisión de fluorescencia incrementada respecto del Fv F10.6.6 (Figura 2.1.6a). Los espectros de emisión de ANS en presencia de urea 8M fueron en todos los casos equivalentes, denotando la pérdida de la capacidad del Fv D44.1 de unir ANS al perder su estructura terciaria por el efecto desnaturalizante de la urea.

Cuando se midió la fluorescencia de ANS al incubarlo con los fragmentos Fabs (Figura 2.1.6b) no hubo diferencia con los espectros control, indicando que tanto Fab D44.1 como el Fab F10.6.6 no unen ANS en cantidades significativas. De este modo el único fragmento que une ANS es el Fv D44.1. El hecho que esto sea así y ningún otro fragmento una esta sonda puede estar dado por el potencial efecto estabilizador que el dominio constante C_L-C_H1 contenido en el fragmento Fab tiene sobre el Fv D44.1.

En la Figura 2.1.7 se midió la unión de ANS (como emisión a 485nm) a los fragmentos Fvs en función de concentraciones crecientes de desnaturalizante, con el objetivo de observar la pérdida de unión a ANS causada por la desestabilización de la estructura terciaria de estos fragmentos. La transición observada en esta figura correspondiente al Fv D44.1 cercana a los 2.0 M de urea se correlaciona con la pérdida de estructura terciaria y los parches hidrofóbicos que unen ANS. En contraste, la curva de unión a ANS correspondiente al Fv F10.6.6 no muestra una transición y una correlación lineal de la emisión de fluorescencia con el aumento de la concentración de urea.

En resumen, el Fv D44.1 muestra una inusual unión a ANS en condiciones nativas, lo que sugiere que este fragmento presenta parches hidrofóbicos sobre su superficie que pueden ser el producto de una conformación de glóbulo fundido. Esta conducta no ha sido observada ni en los Fabs estudiados ni en el Fv F10.6.6.

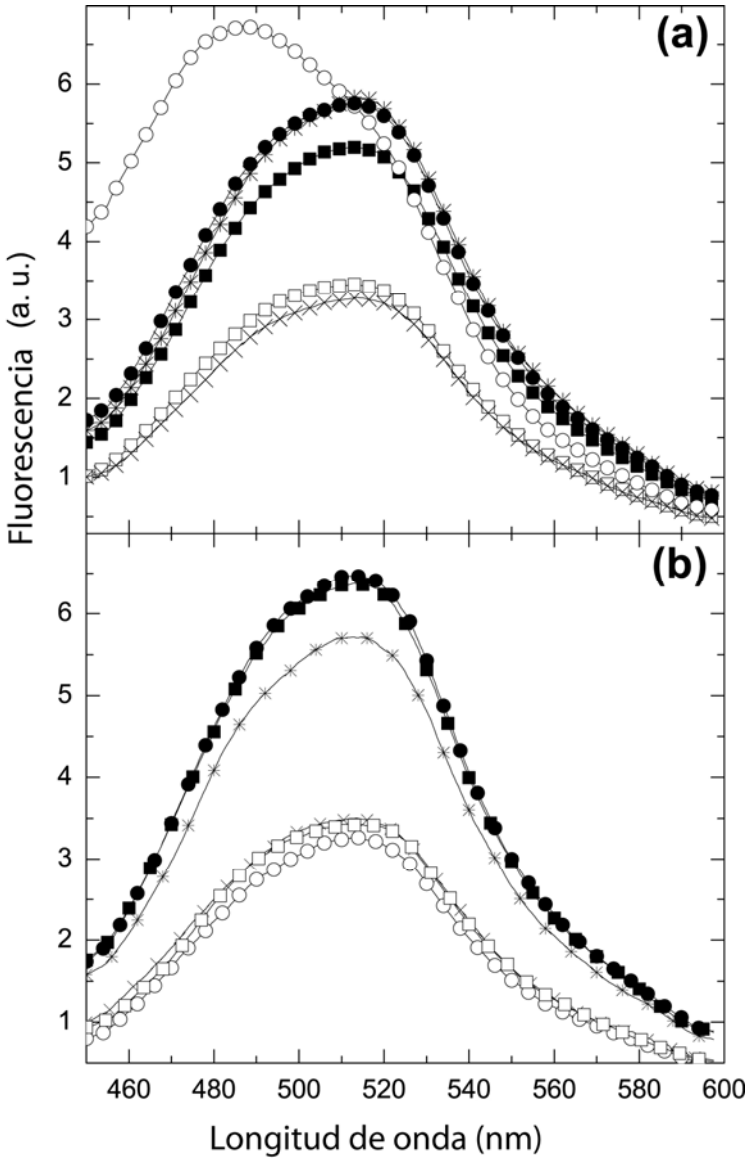


Figura 2.1.6 – Espectros de emisión de fluorescencia de ANS en unión con (a) fragmentos Fv y (b) fragmentos Fab en PBS y en urea 8M. Se puede observar en (a) un corrimiento del pico de emisión del Fv D44.1 en PBS de 21 nm hacia el azul respecto del Fv F10.6.6, indicando que el ANS se une de modo diferencial al Fv D44.1. Controles, PBS (-×-) y urea 8M (-✳-).Fragmentos D44.1 en PBS (-○-), en urea 8M (-●-). Fragmentos F10.6.6 en PBS (-□-), en urea 8M (-■-).

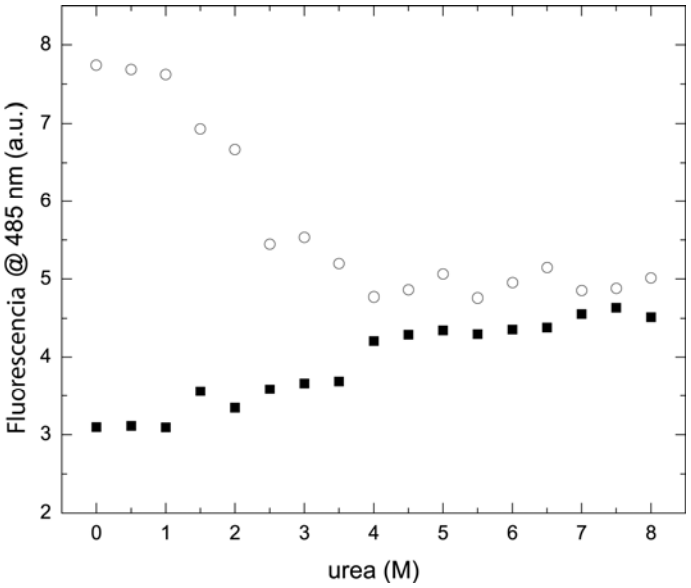


Figura 2.1.7 – Unión a ANS en función de la concentración creciente de urea. Se observa una clara pérdida de intensidad de la fluorescencia del Fv D44.1 (círculos blancos) a medida que se incrementa la concentración del desnaturalizante. El fragmento Fv F10.6.6 (cuadrados negros) posee un comportamiento lineal y constante a lo largo de toda la recta.

2.1.7 Cambio de la capacidad calorífica de unión a HEL

La particularidad de este sistema de dos AcMos relacionados genética y estructuralmente con una diferencia de afinidad de alrededor de 700 veces al unir su Ag específico, permite estudiar la evolución de la capacidad calorífica de la reacción Ac-HEL (ΔCp) y asociar este parámetro al proceso de la maduración de la afinidad.

Varios estudios han definido al ΔCp de reacción como una función con una débil dependencia de la temperatura que tiene su origen en los cambios de hidratación, y que puede ser parametrizada según cambios en la superficie accesible al solvente (ΔASA, del inglés *accesible surface area*)[56]. Así, es posible calcular valores teóricos de ΔCp de unión, basándose en parametrizaciones estructurales[57; 58; 59] utilizando como dato solo los valores correspondientes de ΔASA para cada complejo. Para ello se utilizó la siguiente ecuación:

$$\Delta Cp = a\Delta ASA_{apolar} + b\Delta ASA_{polar} \qquad (1)$$

donde a=0.45 y b=-0.26 son las contribuciones polares y apolares elementales por mol de Å^2.

Por otra parte, el método para medir ΔCp de unión de dos especies en solución utilizado con

mayor frecuencia consta en obtener el ΔH en función de la temperatura y ajustar los valores obtenidos a una función lineal. El valor de ΔCp obtenido finalmente es la pendiente de la recta ajustada.

Como se puede apreciar en el caso de las reacciones del Fab F10.6.6 y D44.1 (Tabla 2.1.6) con HEL el ΔCp de unión toma valores negativos, típicos de interacciones proteína-proteína.[60] En el caso del Fv F10.6.6, el valor del ΔCp experimental coincide con el calculado mediante la ecuación (1), -221.5 y -219.0 cal mol^{-1} K^{-1} respectivamente. Sin embargo, al comparar los valores experimentales y teóricos para la reacción del Fv D44.1, el valor absoluto del ΔCp experimental es mucho mayor que el calculado.

En general, si se considera que el ΔCp está gobernado principalmente por las interacciones hidrofóbicas, teniendo en cuenta el valor del ΔCp experimental la superficie hidrofóbica de interacción en el complejo Fv D44.1-HEL sería mayor que en el complejo Fv F10.6.6.

Complejo	**ΔASA (Å^2) apolar**	**ΔASA (Å^2) polar**	**$\Delta Cp_{teórico}$ (cal mol^{-1} K^{-1})**	**$\Delta Cp_{calculado}$ (cal mol^{-1} K^{-1})**
Fv F10.6.6-HEL	-841.9	-614.7	-219.0	-221.5 ± 6.0
Fv D44.1-HEL	-802.5	-589.0	-208.0	-330.1 ± 2.5

Tabla 2.1.6 – ΔCp de unión teórico y experimental de los fragmentos Fvs de D44.1 y F10.6.6. Los valores de ΔASA de la interfaz Fv-HEL fueron calculados con el software NACCESS, utilizando una sonda de 1.4 Å.

Sin embargo, por el análisis de la estructura cristalina del Fab F10.6.6-HEL se observó que este complejo posee un incremento del 9.5% (58.6 Å^2) de ΔASA en comparación al complejo Fab D44.1-HEL a expensas de un incremento del 16.5% en ΔASA_{apolar} (51.0 Å^2), mientras que el ΔASA_{polar} se incrementa solo en un 2.3% respecto al Fab D44.-HEL.[40] Como consecuencia, el valor incrementado del ΔCp correspondiente a la reacción del Fv D44.1-HEL no puede ser atribuido con certeza al efecto de una superficie hidrofóbica de contacto con el Ag y a interacciones de grupos no polares en agua,[61; 62] ya que esta superficie hidrofóbica se espera que sea menor a la del Fv F10.6.6-HEL. Más aun, esta discrepancia se puede observar, aunque en menor medida, en los ΔCp de las reacciones de los fragmentos Fabs, Fab D44.1-HEL posee un ΔCp de -269.20 cal mol^{-1} K^{-1} mientras que el Fab F10.6.6-HEL posee un ΔCp de -259.20 cal mol^{-1} K^{-1}.[44]

Otro factor destacable en el cálculo del ΔCp de unión es la pérdida de la linealidad en la recta ajustada a los valores de ΔH en función de la temperatura, como se puede observar en la Figura 2.1.8. Esta pérdida de linealidad evidencia una dependencia mayor de la entalpía con la

temperatura a medida que ésta aumenta, y puede asociarse a que los eventos de unión están acoplados al plegamiento.

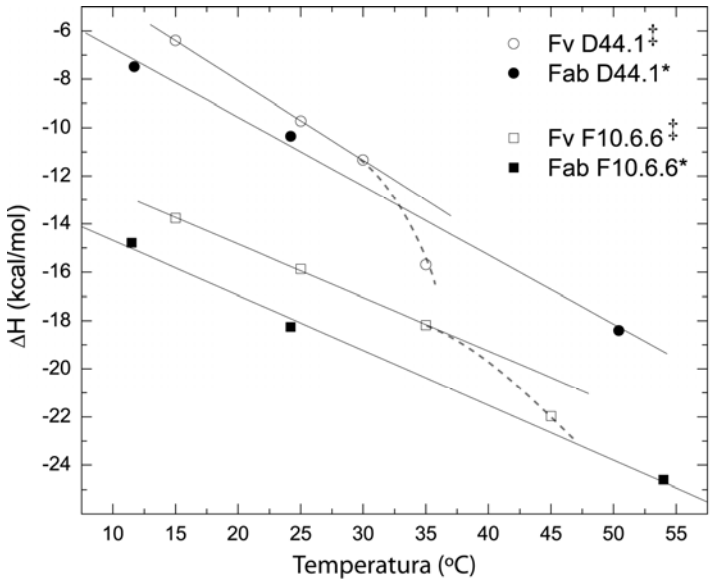


*Figura 2.1.8 – Determinación del ∆Cp de unión a HEL. Los valores correspondientes a los fragmentos Fvs fueron tomados en el período correspondiente a esta Tesis, salvo indicación contraria (‡, este trabajo; *, tomados de Schwartz et al[44]), mientras que los valores de Fabs fueron publicados previamente. Se detalla con línea punteada la pérdida de linealidad del ∆H en función de la temperatura.*

Efectivamente, el ∆Cp de la reacción Fv D44.1-HEL es mayor que para la reacción del Fv F10.6.6-HEL y la linealidad del ∆H se pierde a temperaturas inferiores que en el caso de la reacción Fv F10.6.6.-HEL. Si se toman como referencia los experimentos de desnaturalización térmica, es posible asociar la pérdida de linealidad del ∆Cp a eventos de cambios conformacionales y/o desplegado. Por otra parte, los ∆Cp informados en la literatura para Fab/IgG-HEL conservan la linealidad por encima de los 50º [44], sugiriendo que la falta del efecto estabilizador del dominio constante C_L-C_H1 en los Fvs podría traducirse en un mecanismo de unión asociado al plegamiento. Así, para este sistema, se espera que cuanto menos estable sea la proteína, mayor sea la dependencia de la entalpía de unión con la temperatura.

2.1.8 Entropía conformacional

Con el objetivo de observar cambios en la entropía de residuos que sean determinantes de la diferencia de entropía de formación del complejo que existe entre D44.1 y F10.6.6, se realizaron cálculos de simulación computacional para determinar entropía conformacional. Se calcularon perfiles energéticos para aquellos residuos que forman parte de la interfaz Ag-Ac, tanto de D44.1 como de F10.6.6 (descripto en la sección 5.13 de Materiales y Métodos). Estos perfiles permiten observar cual es la conformación de menor energía de cada residuo,[63] posibilitando estimar qué residuos cambian su perfil energético al formarse el complejo, lo que permite establecer un valor de entropía para el estado libre, S_{libre}, y un valor para el complejo, S_{unido}. Es posible obtener así el valor de diferencia de entropía $\Delta S_{conformacional}$. Aunque estos cálculos son estimados, podrían ayudar a determinar qué aminoácidos son cruciales en la diferencia de entropía de formación del complejo Ag-Ac en el sistema D44.1-F10.6.6.

Los resultados obtenidos en esta parte del trabajo son parciales y deben ser corroborados, aunque se pudieron analizar los perfiles energéticos de ciertos residuos y explicar cómo afectan a la cadena lateral el evento de unión a otra proteína. Los perfiles energéticos de los residuos que interactúan en la interfaz Ag-Ac tanto de D44.1 como de F10.6.6 fueron utilizados para calcular el correspondiente valor de entropía y consecuentemente el valor $\Delta S_{conformacional}$ del residuo en cuestión.

Se obtuvieron resultados parciales que fueron agrupados en tres tipos diferentes:

- $\Delta S_{conformacional}$ cercano a cero, fue el resultado más frecuente, indicativo de que existe la misma probabilidad de encontrar dicho residuo en la misma conformación en tanto en el estado libre o en el unido.

- $\Delta S_{conformacional}$ menor a cero, este es un resultado intuitivo e indica que el estado unido tiene menos entropía que el libre. Las conformaciones de menor energía del estado unido se traducen en menor entropía y esto posibilita que la diferencia sea menor a cero.

- $\Delta S_{conformacional}$ mayor a cero. La entropía del estado unido es mayor que la del estado libre, produciendo un $\Delta S_{conformacional}$ favorable. Esta diferencia puede estar dada por interacción de solventes (los cuales no fueron incluidos en nuestros cálculos) o por sucesos asociados a residuos con carga (todos los casos de $\Delta S_{conformacional}$ mayor a cero se dieron en residuos de glutamina, asparragina ó arginina).

En la Figura 2.1.9 se observan los perfiles del residuo de VH Ser57 para D44.1 y para F10.6.6. En dicha figura es posible apreciar cómo los perfiles de los estados libres son de mayor energía (es decir, de mayor entropía) y los perfiles de los estados unidos son de menor energía, produciendo un $\Delta S_{conformacional}$ menor que cero. Este residuo tiene una diferencia de entropía conformacional de -1.18 kcal/mol para D44.1 y de -1.42 kcal/mol para F10.6.6.

En la Figura 2.1.10 se observan los perfiles energéticos de Glu35H, en ejes de tres coordenadas para D44.1 y en proyección para F10.6.6. Debido a los dos ángulos dihedros Ji1 y Ji2 que tiene el residuo de glutamina en su cadena lateral, se calcula la energía a lo largo de 360 grados de rotación de ambos dihedros y se calcula la energía en cada coordenada. Este residuo en particular tiene un ΔS_{confor} mayor a cero, donde la energía del estado unido es menor que aquella del estado libre. En estos cuatro perfiles se observan conformaciones de alta energía, lo que disminuye la probabilidad de encontrar el residuo en dicha conformación. Los cálculos para este residuo resultaron en un ΔS_{confor} para D44.1 de 1.56 kcal/mol y de 4.07 kcal/mol para F10.6.6.

Tanto en los perfiles de dos como de tres dimensiones se vieron picos y discontinuidades. Estos saltos de energía se corresponden con estructuras no favorables y choques (clashes) que se dan al rotar un residuo voluminoso en un entorno no permisivo para el movimiento de una serie de átomos. Esto es un indicador de que los cálculos pueden ser mejorados, ya que de realizar una minimización de energía adecuada para cada residuo estos "clashes" pueden disminuir, permitiendo un perfil energético de menor energía.

Varios de los perfiles correspondientes a residuos de HEL y del paratope de D44.1 y F10.6.6 no pudieron ser calculados, lo que impide el análisis global de la entropía configuracional del sistema. Aunque algunos perfiles se obtuvieron de modo satisfactorio, no fueron suficientes para establecer una hipótesis acerca de cómo la entropía configuracional cambia al unirse HEL con D44.1 y F10.6.6. Por dicho motivo los perfiles que se muestran fueron analizados desde un punto de vista descriptivo.

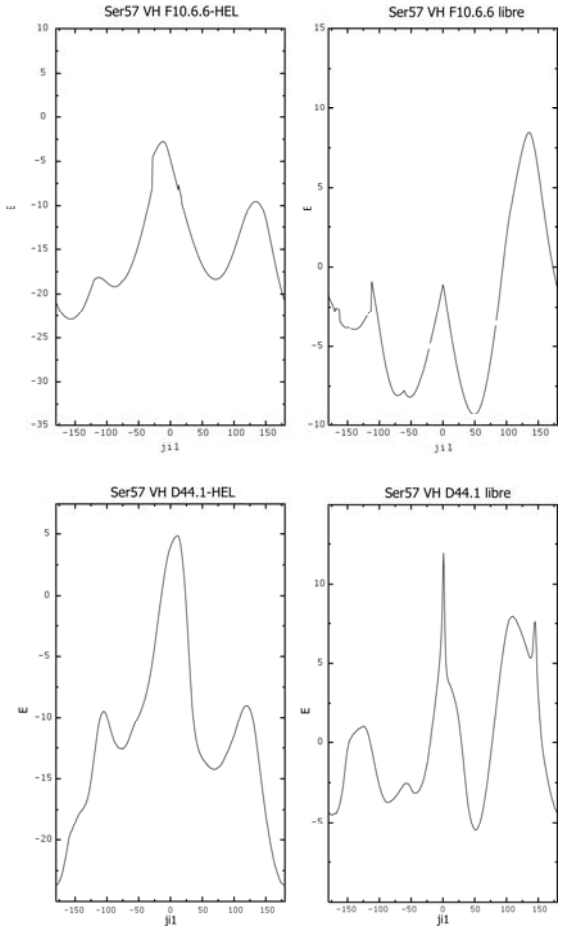


Figura 2.1.9 – Perfiles de energía de Ser57H libre y unido, para D44.1 y F10.6.6. ΔS_{confor} D44.1 = -1.18 kcal/mol. ΔS_{confor} F10.6.6 = -1.42 kcal/mol.

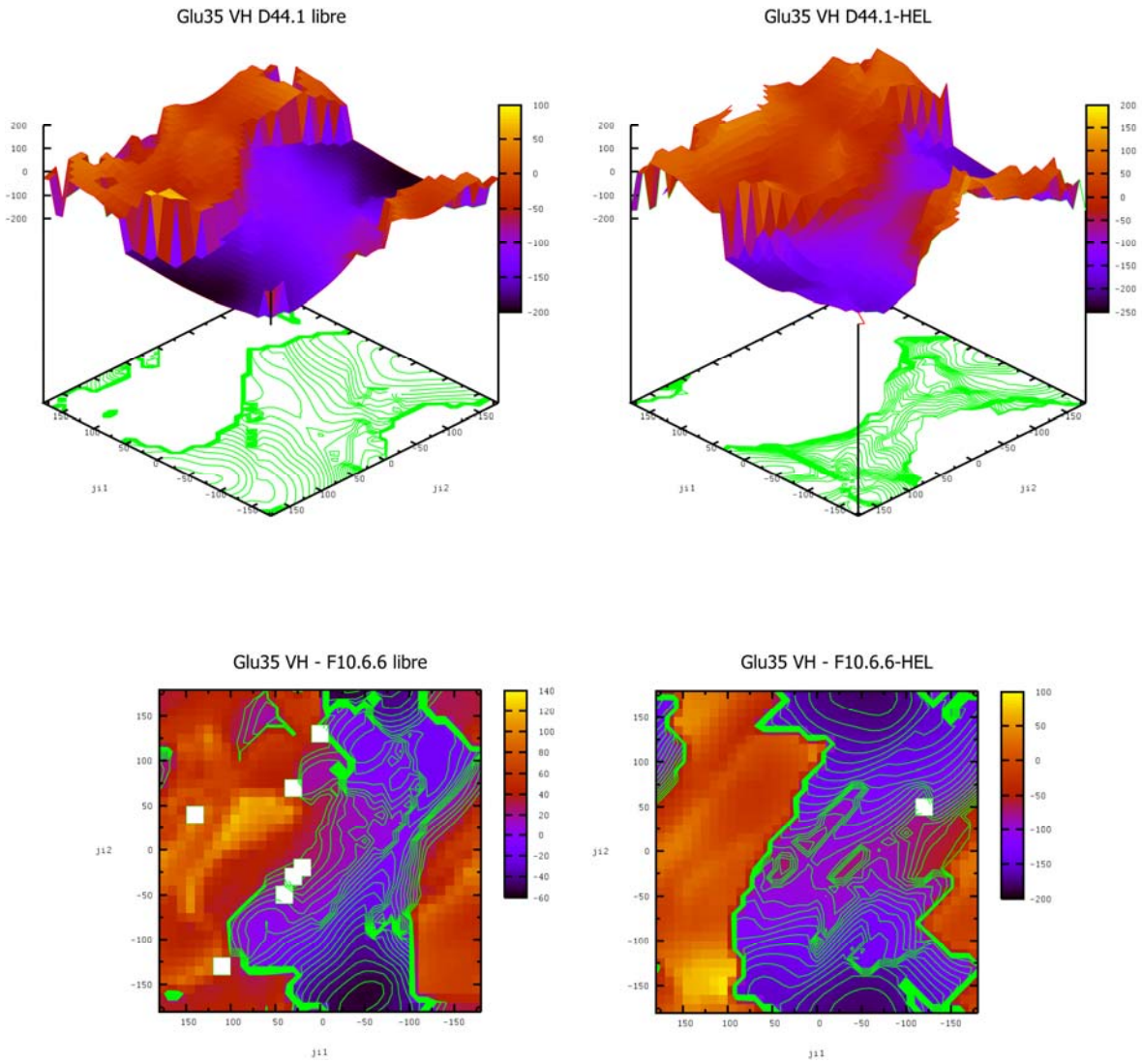


Figura 2.1.10 - Perfiles de energía de Glu35H libre y unido, para D44.1 y F10.6.6. ΔS_{confor} D44.1 = 1.56 kcal/mol. ΔS_{confor} F10.6.6 = 4.07 kcal/mol.

2.2 Experimentos de intercambio de cadenas (*chain shuffling*)

En la sección previa se pudo observar que los fragmentos Fv y Fab son equivalentes desde el punto de vista cinético y termodinámico de unión a HEL. Debido a que las cadenas V_H y V_L de ambos AcMos están relacionadas genética y estructuralmente, se desarrollaron una serie de experimentos de producción de proteínas híbridas las cuales forman dos fragmentos Fvs quiméricos que resultan del intercambio de V_H y V_L (*chain shuffling*) entre el D44.1 y F10.6.6. Esta estrategia se desarrolló para investigar el rol de cada cadena del Fv del modelo D44.1-F10.6.6 en la maduración de la afinidad desde el punto de vista cinético, termodinámico y de estabilidad. Por lo tanto, se obtuvieron dos Fvs quiméricos que denominamos V_LD-V_HF (dominio variable de la cadena

liviana de D44.1 replegada con el dominio variable de la cadena pesada de F10.6.6) y V_LF-V_HD (dominio variable de la cadena liviana de F10.6.6 replegada con el dominio variable de la cadena pesada de D44.1).

2.2.1 Parámetros cinéticos y termodinámicos

Al igual que entre los fragmentos Fabs y Fvs de ambos AcMos, se realizó una comparación de los parámetros cinéticos y termodinámicos de unión de los fragmentos Fvs D44.1 y F10.6.6 con los Fvs quiméricos generados. En la Tabla 2.2.1 se detallan los valores obtenidos para V_LD-V_HF y V_LF-V_HD. El valor de k_{ass} de la reacción Fv D44.1-HEL es similar al de la reacción del V_LF-V_HD, aunque levemente menor; mientras que el valor de k_{ass} del Fv F10.6.6 es coincidente con el del V_LD-V_HF.

Ordenando los fragmentos según k_{ass} creciente:

Fv D44.1 < V_LF-V_HD < V_LD-V_HF < Fv F10.6.6

Estos resultados demuestran que para este modelo el dominio variable de la cadena pesada (V_H), ha madurado para aumentar la velocidad de unión a HEL, lo que se traduce en un aumento de k_{ass} de la reacción Fv F10.6.6-HEL.

En lo que respecta a la velocidad de disociación k_{diss}, si bien la k_{diss} de ambos Fvs quiméricos posee valores similares e intermedios entre los de Fv D44.1 y Fv F10.6.6, la k_{diss} del V_LD-V_HF es 2.84 veces más rápida que la del V_LF-V_HD, 15.5 veces más rápida que para el Fv F10.6.6 y 1.6 veces más lenta que para el Fv D44.1. Por otro lado, la k_{diss} del V_LF-V_HD es 5.5 veces más rápida que para el Fv F10.6.6 pero 4.6 veces más lenta que para el Fv D44.1.

Ordenando los fragmentos según k_{diss} decreciente:

Fv D44.1 > V_LD-V_HF > V_LF-V_HD > Fv F10.6.6

(a)

Anticuerpo	k_{ass}* **(M^{-1} s^{-1})**	k_{diss}* **(s^{-1})**	K_A* **(M^{-1})**
Fv D44.1	$5.95 \pm 0.52\ 10^4$	$6.30 \pm 0.01\ 10^{-3}$	$9.44 \pm 0.82\ 10^6$
Fv F10.6.6	$1.43 \pm 0.07\ 10^6$	$2.50 \pm 0.25\ 10^{-4}$	$5.72 \pm 0.63\ 10^9$
V_LD-V_HF	$1.15 \pm 0.05\ 10^6$	$3.87 \pm 0.05\ 10^{-3}$	$2.97 \pm 0.13\ 10^8$
V_LF-V_HD	$7.45 \pm 0.24\ 10^4$	$1.36 \pm 0.02\ 10^{-3}$	$5.48 \pm 0.19\ 10^7$

(b)

Anticuerpo	**$\Delta G^{o\ ‡}$**	**ΔH^o**	**$-T\Delta S^{o‡}$**	**ΔS^o**
Fv D44.1	-9.51	-9.17 ± 0.18	0.34	$1.14\ 10^{-3}$
Fv F10.6.6	-13.30	-15.72 ± 0.06	-2.42	$-8.12\ 10^{-3}$
V_LD-V_HF	-11.55	-10.10 ± 0.03	1.45	$4.86\ 10^{-3}$
V_LF-V_HD	-10.54	-15.41 ± 0.05	-4.87	$1.60\ 10^{-2}$

*Tabla 2.2.1 – Parámetros cinéticos (a) y termodinámicos (b) de unión para los Fvs D44.1, F10.6.6, V_LD-V_HF y V_LF-V_HD. Las unidades correspondientes a $\Delta G°$, $\Delta H°$ y $T\Delta S°$ son kcal mol^{-1}. Las unidades de $\Delta S°$ son kcal mol^{-1} K^{-1}. *, Determinado por Biosensor. ‡, Calculado mediante la ecuación $\Delta G°=\Delta H°-T\Delta S°$.*

Estos resultados demuestran que la disminución de la velocidad de disociación y el aumento de la vida media del complejo Fv F10.6.6-HEL están asociados a la maduración de VL.

Por lo tanto, se puede argumentar que el aumento de k_{ass} coincide con el mayor número de mutaciones encontradas en la V_H F10.6.6 con respecto a la V_H D44.1 y con respecto a la línea germinal que le dio origen[40] mientras que la disminución de k_{diss} puede estar dada por un aumento de la flexibilidad de la V_L en el Fv F10.6.6 y un mejor ajuste estructural al Ag.

Finalmente, los valores de K_A de las reacciones de los Fvs quiméricos son intermedios a las de los Fvs salvajes. El V_LD-V_HF que contiene el dominio V_H de F10.6.6 posee una k_{ass} rápida y al mismo tiempo una k_{diss} rápida por contener el dominio V_L de D44.1. Al mismo tiempo que V_LF-V_HD posee una k_{ass} lenta y una k_{diss} lenta.

Ordenando según K_A creciente:

Fv D44.1 < V_LF-V_HD < V_LD-V_HF < Fv F10.6.6

Considerando los valores de K_A en la Tabla 2.2.1 y observando que este ordenamiento es coincidente con el realizado por k_{ass} creciente, podemos afirmar que los valores de K_A son a expensas de los valores de k_{ass} tal como fue descripto con anterioridad en Cauerhff et al.[40]

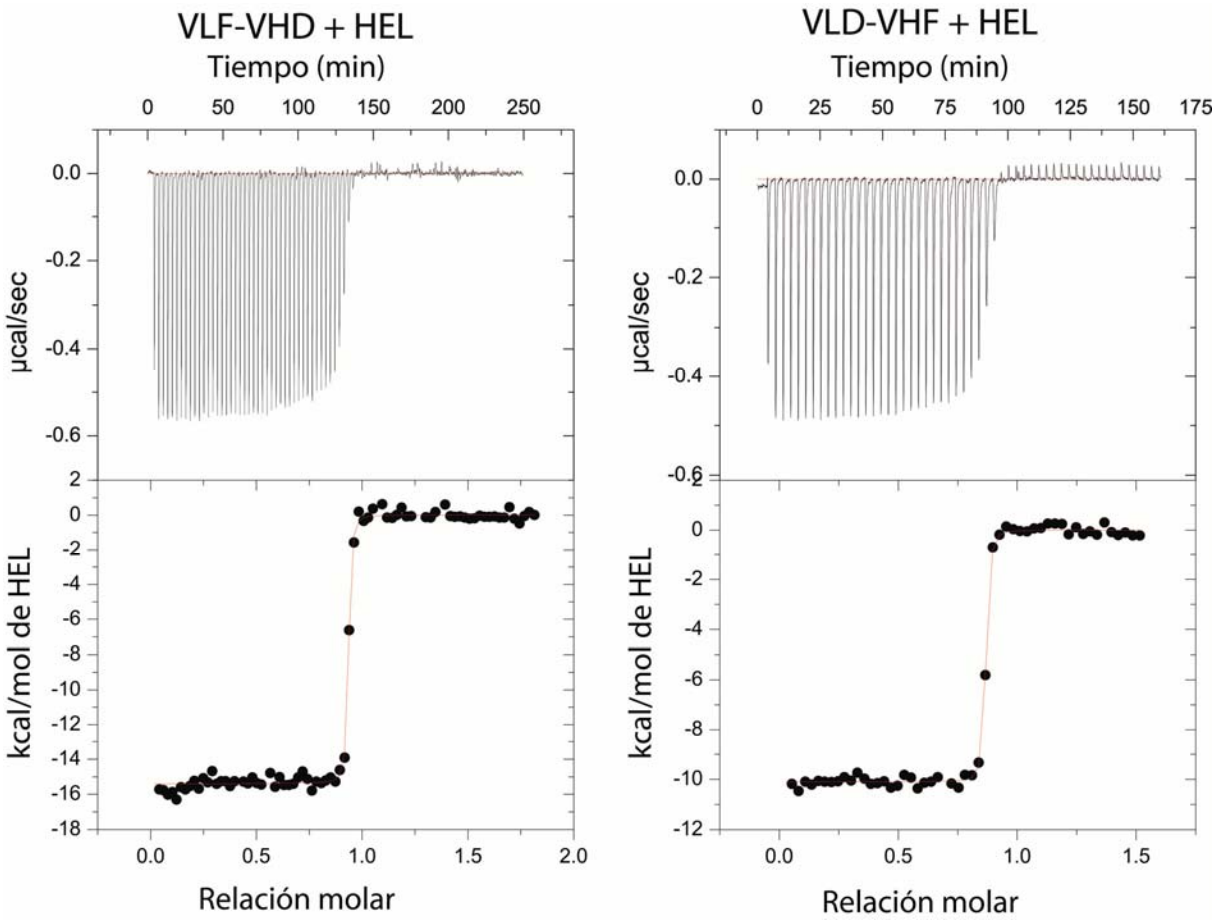


Figura 2.2.1 – Entalpías molares de unión de los Fvs quiméricos V_LD-V_HF y V_LF-V_HD, obtenidas mediante el uso de ITC.

En el caso de los parámetros termodinámicos el escenario es diferente. Los fragmentos Fv F10.6.6 y V_LD-V_HF poseen una $\Delta G°$ de unión a HEL con una diferencia de casi 2 kcal/mol entre sí, pero cuando comparamos $\Delta H°$, existe una diferencia de más de 5 kcal/mol (un 33% aproximadamente) a favor del Fv F10.6.6. Al comparar todos los valores de $\Delta H°$ (Figura 2.2.1), se observó que aquellos Fvs que contienen la misma V_L tienen valores similares de $\Delta H°$. Hecho que se ve claramente cuando se compara el Fv F10.6.6 con la quimera V_LF-V_HD. La entalpía de unión del F10.6.6-HEL depende de la maduración de su V_L, sugiriendo que dicha cadena asegura una unión con más y mejores fuerzas no covalentes.

Analizando el parámetro entrópico $T\Delta S°$ para el caso del Fv D44.1, dichos valores permanecen inalterados respecto del Fab D44.1, ambos $T\Delta S°$ se acercan cero, lo que sugiere que a la temperatura experimental ambas reacciones poseen compensado los componentes que conforman el término entrópico ΔS_{solv}, ΔS_{conf} y ΔS_{rt}.[64]

Por otra parte, la reacción del Fv F10.6.6, al igual que la del Fab F10.6.6, posee una compensación entrópico-entálpica notable. Cuando se analiza la reacción del V_LD-V_HF que tiene un ΔH° similar a la del Fv D44.1 y un ΔG° intermedio entre el Fv D44.1 y el Fv F10.6.6, se observa una contribución favorable del término TΔS°. Mientras que el V_LF-V_HD, con ΔH° similar a la reacción del Fv F10.6.6 y un ΔG° similar a la reacción del Fv D44.1, posee la mayor compensación entrópico-entálpica.

No obstante, todas las reacciones son entálpicamente dirigidas ya que el componente entálpico es mucho mayor que el antrópico, aunque este último componente sea o no favorable. Esto es concordante con la mayoría de los resultados calorimétricos de las reacciones Ag-Ac, especialmente cuando el Ag es una proteína.

Queda claro que el aumento de ΔH° no puede ser separado estructuralmente de la compensación entrópica, ya que en ambos casos el dominio V_L contribuye al aumento del valor ΔH° y en el incremento de la compensación entrópica. De esta forma podemos hipotetizar que la mayor entalpía y compensación entrópica de la reacción del F10.6.6-HEL se debe a la maduración de VL.

2.2.2 Estabilidad térmica

Para realizar una disección de la contribución de cada cadena del Fv en la estabilidad térmica de ambos Fvs se estudió la estabilidad térmica de los Fvs quiméricos por CD y DLS de la misma forma que fue realizado anteriormente con los Fvs salvajes.

Como se observó en secciones previas, cuando se utiliza CD existen dos tipos de curvas de transición del estado nativo al desnaturalizado. Una de estas curvas, la de menor cooperatividad, correspondió al Fv D44.1 y la otra, de mayor cooperatividad, a Fv F10.6.6. En la Figura 2.2.2 se puede observar que los Fvs quiméricos adoptan una u otra tendencia. En el caso del V_LD-V_HF sigue la tendencia del Fv F10.6.6, presentando ambas curvas de desnaturalización grados similares de cooperatividad (parámetro dado por la pendiente de la curva donde ocurre la transición). No obstante, la quimera V_LD-V_HF presenta mayor valor de Tm aparente que el Fv F10.6.6. (Tabla 2.2.2).

Para el V_LF-V_HD la estabilidad es menor que para V_LD-V_HF, pero es más estable que el Fv D44.1. También tiene una desnaturalización menos cooperativa que el Fv F10.6.6 evidenciando un mecanismo de desplegado gradual y más complejo, similar a lo que sucede para el Fv D44.1. Dado que el Fv D44.1 tiene una posible conformación de glóbulo fundido, la posibilidad de una desnaturalización en varios estados es plausible.[65; 66] Aunque las T_m app de los Fvs quiméricos tienen valores cercanos, éstos se desnaturalizan mediante mecanismos con distintos grados de cooperatividad.

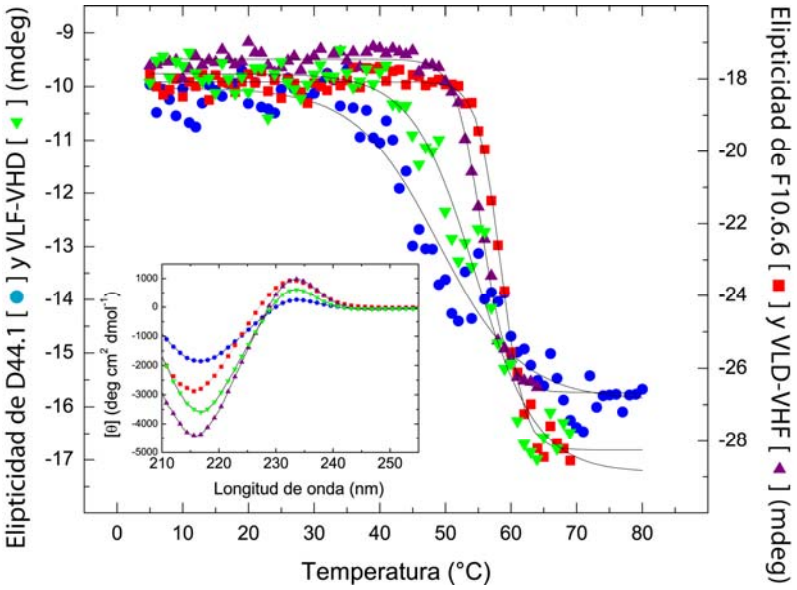


Figura 2.2.2 – Desnaturalización térmica de los Fvs quiméricos seguida por la señal dicroica a 216 nm. Se observan claramente dos tendencias, una correspondiente a fragmentos que poseen V_H de F10.6.6 y otra correspondiente a fragmentos con V_H de D44.1.

Por otra parte, el fragmento V_LF-V_HD comienza a perder señal dicroica alrededor de los 40ºC, mientras que V_LD-V_HF la pierde a partir de los 50ºC. Se podría argumentar entonces que los Fvs que estructuralmente poseen la V_H de F10.6.6 presentan una transición cooperativa evidenciando la presencia de dos estados discretos: nativo y desnaturalizado, mientras que en los Fvs que poseen V_H del D44.1 la transición es lenta y gradual evidenciando un mecanismo de desnaturalización térmica más complejo.

Utilizando la técnica de DLS para obtener datos de estabilidad térmica se obtuvieron resultados si bien distintos en cuanto a los valores absolutos de las T_m app pero con la misma tendencia que la observada para la estabilidad térmica usando CD.

Anticuerpo	**T_m CD (ºC)**	**T_m DLS (ºC)**
Fv D44.1	49.5	44.3
V_LF-V_HD	54.6	45.8
V_LD-V_HF	55.8	48.2
Fv F10.6.6	58.4	51.4

Tabla 2.2.2 – Temperaturas de desnaturalización térmica aparentes, seguidas por CD y DLS.

La diferencia en el valor absoluto de las T_m app usando distintos métodos se debe a que un método detecta cambios en la señal de estructura secundaria como es el CD y el otro método

detecta cambios en la agregación o la formación de precipitado por acción del aumento de la temperatura como es el DLS.

Ordenando los Fvs según estabilidad térmica creciente:

Fv D44.1 < V_LF-V_HD < V_LD-V_HF < Fv F10.6.6

Por lo expuesto, la V_H del dominio Fv es la determinante de la naturaleza de la estabilidad térmica en este sistema. Por lo que el F10.6.6 en el proceso de la maduración de la afinidad afinó su V_H para estabilizar su dominio Fv.

2.2.3 Desnaturalización por agentes caotrópicos

Siguiendo el mismo razonamiento de la sección 2.1.5 se analizó el comportamiento frente a agentes caotrópicos siendo al igual que para la estabilidad térmica el Fv F10.6.6 más estable que el Fv D44.1.

En la Figura 2.2.3 se pueden observar las curvas correspondientes a la desnaturalización seguida por fluorescencia de triptofanos de los Fvs salvajes junto con los Fvs quiméricos.

Tanto el Fv F10.6.6 como el V_LD-V_HF tienen curvas de desnaturalización similares, aunque este Fv quimérico tiene una estabilidad levemente menor frente a concentraciones crecientes de urea. Más aún, ambas curvas tienen valores similares de CM en ausencia de urea, lo que evidencia que los triptofanos de estas dos moléculas se encuentran en entornos polares similares. A medida que aumenta la concentración de desnaturalizante el valor de CM se desplaza a valores mayores, este comportamiento es asignado al aumento gradual de la exposición de estos residuos aromáticos. Posteriormente a la transición del estado nativo al desnaturalizado, ambos Fvs llegan a valores similares de CM, indicando que ambos estados desnaturalizados interactúan del mismo modo con la urea.

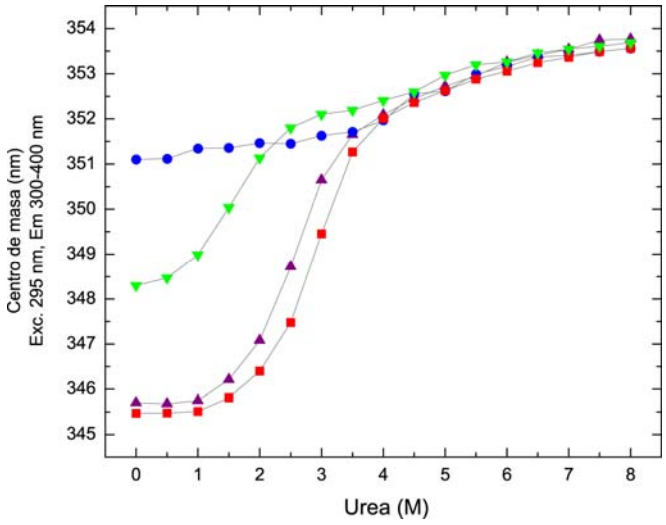


Figura 2.2.3 – Experimentos de equilibrio de desplegado medido por fluorescencia intrínseca de triptofanos. Fv D44.1 ● - Fv F10.6.6 ■ - V_LD-V_HF ▲ - V_LF-V_HD ▼

Como fue descripto en la sección 2.1.5, el Fv D44.1 tiene un estado nativo que no es estable, debido a una posible conformación de glóbulo fundido. Por su parte, el V_LF-V_HD, que contiene la V_H de D44.1, tiene un CM de fluorescencia de su estado nativo a mayor longitud de onda que el calculado para el Fv F10.6.6 y V_LD-V_HF. Esto evidencia una mayor exposición al solvente de los residuos de triptófano del Fv D44.1 en comparación con los otros Fvs.

Por otra parte, el V_LF-V_HD tiene la "primer transición" a 1.5 M de urea, con un menor grado de cooperatividad que el Fv F10.6.6 y V_LD-V_HF. De este modo, la contribución del dominio V_H a la estabilidad frente a agentes caotrópicos es notoria, dado que los Fvs que contienen el V_H del F10.6.6 poseen una estabilidad mayor y mayor grado de cooperatividad que los que poseen el V_H del D44.1. Por lo tanto, el V_H del F10.6.6 ha madurado para otorgarle al Fv mayor estabilidad frente agentes caotrópicos.

2.2.4 Unión a ácido 8-Anilino-1-naftalenesulfónico (ANS)

Se midió también la unión de ANS a V_LD-V_HF y V_LF-V_HD, con el fin de observar si existe un comportamiento similar al observado en el caso del Fv D44.1. En la Figura 2.2.4 se puede observar la comparación entre los espectros de emisión de ANS de los Fvs salvajes y quiméricos.

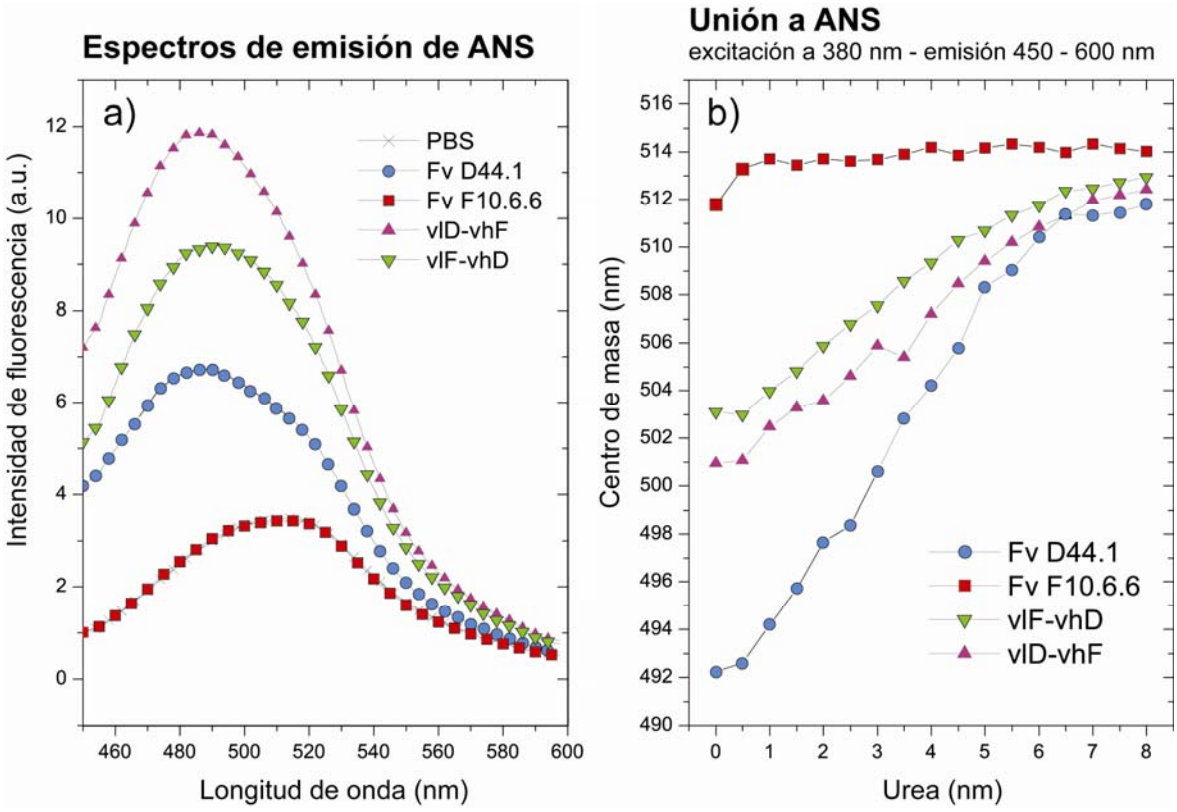


Figura 2.2.4 – Unión de ANS a Fvs salvajes y quiméricos. (a) Espectros de emisión de ANS, se observa como los Fvs quiméricos unen ANS en mayor grado que el Fv D44.1. (b) Unión de ANS en función de la concentración de urea.

Como se observó con anterioridad, el Fv D44.1 une ANS mientras que el Fv F10.6.6 no lo hace en cantidades detectables. Los Fvs quiméricos también unen ANS (Figura 2.2.4a), inclusive en mayor proporción que el Fv D44.1, siendo el V_LD-V_HF el fragmento que emite más fluorescencia. Por otra parte, en la Figura 2.2.4b, donde se describe la unión a ANS en función de la concentración de urea, es posible observar que los CM en condiciones nativas (0M urea) y totalmente desnaturalizadas (8M urea) de los espectros correspondientes del V_LD-V_HF y V_LF-V_HD tienen valores que se encuentran comprendidos entre los del Fv D44.1 y Fv F10.6.6. Pero la transición observada para los Fvs quiméricos no es tan pronunciada como la del Fv D44.1. Los resultados de unión a ANS nos demuestran la importancia de la unión de ambas cadenas del Fv formando la interfaz V_L-V_H para dar el una estructura correctamente plegada en el F10.6.6.

2.2.5 Cambio de la capacidad calorífica de unión a HEL

En párrafos anteriores se describió que la capacidad calorífica de unión a HEL del Fv D44.1 tiene valores absolutos mayores que los del Fv F10.6.6, mostrando una mayor dependencia del ΔH^o con la temperatura, al mismo tiempo que una pérdida de linealidad a temperaturas inferiores a la fisiológica. Para estudiar el efecto de la maduración de la afinidad sobre el ΔCp de unión a HEL, se calculó este parámetro para los Fvs quiméricos.

En la Figura 2.2.5 y en la Tabla 2.2.3 se representan los valores de entalpía en función de la temperatura de los Fvs salvajes y de los Fvs quiméricos. Analizando los valores de ΔCp de unión, dados por la pendiente de la recta ajustada a la entalpía en función de la temperatura, observamos que el V_LD-V_HF posee un valor intermedio al Fv F10.6.6 y al Fv D44.1. Además, para la reacción de V_LF-V_HD es mayor incluso que para la reacción del Fv D44.1.

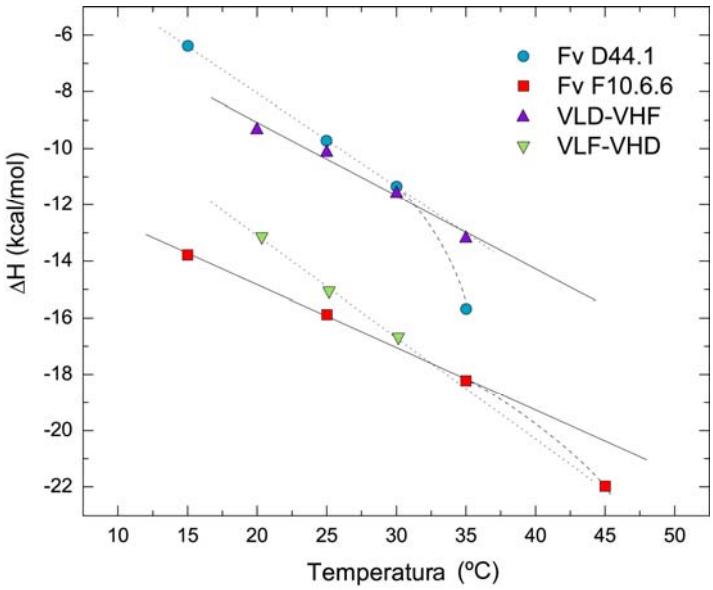


Figura 2.2.5 – Entalpía en función de la temperatura. Comparación de capacidades caloríficas de Fvs salvajes (en círculos y cuadrados) con V_LF-V_HD y V_LD-V_HF (triángulos).

Anticuerpo	**ΔCp**
Fv D44.1	-330.1 ± 2.5
Fv F10.6.6	-221.5 ± 6.0
V_LF-V_HD	-360.2 ± 20.6
V_LD-V_HF	-259.4 ± 26.6

Tabla 2.2.3 – Valores de ΔCp de los Fvs salvajes y de los Fvs quiméricos (unidades: cal mol^{-1} K^{-1}).

Los valores del ΔCp para los Fvs quiméricos y la pérdida discreta de la linealidad a altas temperaturas parecen estar relacionados a la estabilidad y al plegamiento proteico, al comparar estos parámetros con los resultados obtenidos de la unión a ANS. Esto se evidencia en particular para el Fv D44.1 cuando se lo compara con el V_LF-V_HD. Por lo tanto, en lo que se refiere al valor del ΔCp de unión, el F10.6.6 ha madurado para estabilizar la interfaz V_L-V_H y de esta forma producir un Fv bien plegado sin la contribución notoria del dominio constante C_L-C_H1. Esto da como resultado que en la reacción F10.6.6-HEL el ΔCp sea dependiente exclusivamente de las características de la unión proteína-proteína.

2.3 Análisis de mutantes

En la sección anterior se estudió el rol de cada cadena del Fv del modelo D44.1-F10.6.6 en la maduración de la afinidad desde el punto de vista cinético y termodinámico de unión a HEL relacionado con la estabilidad. Con el objetivo de identificar el papel de las mutaciones puntuales producidas durante el fenómeno de la maduración de la afinidad, se realizaron Fvs mutantes de D44.1 mutando residuos por aquellos encontrados en el Fv F10.6.6. Debido a la cantidad de mutaciones encontradas en el Fv F10.6.6 con respecto al Fv D44.1 (12 en V_H y 5 en V_L) y la imposibilidad de investigar todas las mutaciones, se siguió el criterio de mutar aquellos residuos que se encuentran formando parte de una interfaz, ya sea Ag-Ac o V_L-V_H. Por lo tanto, se diseñaron en total siete mutantes, en las posiciones que se indican en la Figura 2.3.1, de las cuales cuatro fueron diseñadas cambiando residuos sobre la interfaz V_L-V_H (señalas en la figura con color verde) y las tres restantes (señaladas con color naranja). De esta forma, el estudio del comportamiento de dichas mutantes nos dará información sobre la estabilidad del dominio Fv en función de la maduración de la afinidad hacia el Ag.

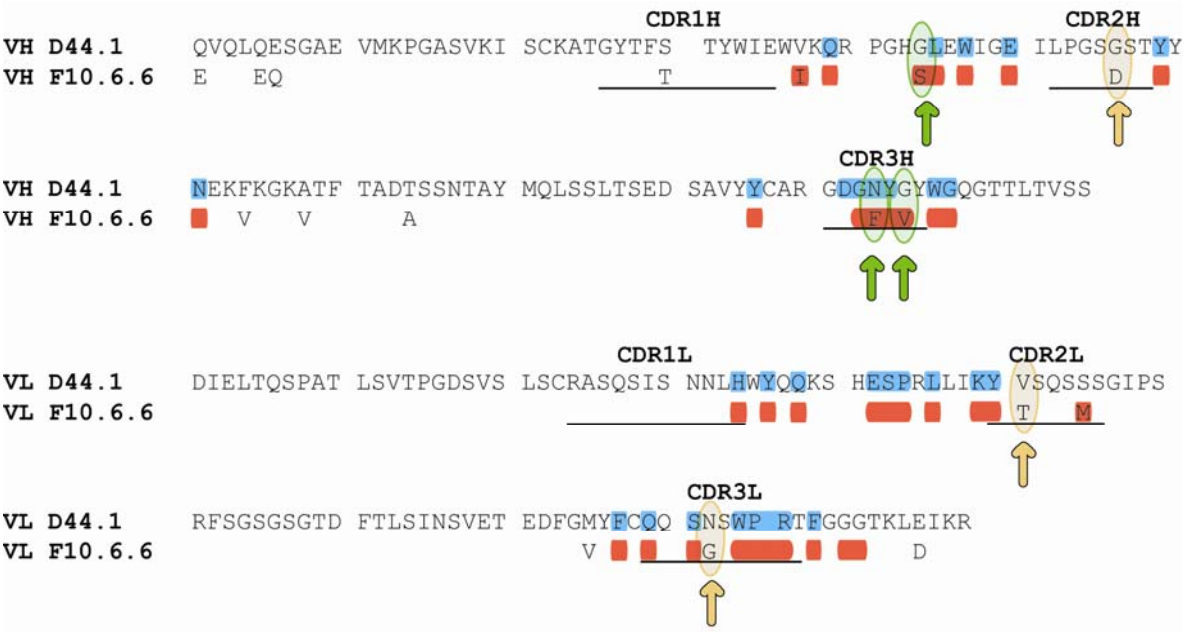


Figura 2.3.1 – Detalle de las mutaciones efectuadas sobre el Fv D44.1, tanto sobre la interfaz V_L-V_H (en flechas verdes) como sobre la interfaz Ag-Ac (en flechas naranjas)

Por una cuestión de claridad en la exposición de los resultados, se dividirá el análisis de las variantes generadas en dos secciones:

2.3.1 - Análisis detallado de las mutantes de interfaz V_L-V_H.

2.3.2 - Análisis detallado de las mutantes de interfaz Ac-Ag.

2.3.1 Mutantes de la interfaz V_L-V_H

Analizando la estructura cristalográfica de ambos complejos Fab F10.6.6 y Fab D44.1 con HEL se seleccionaron como principales candidatos tres residuos en la V_H de D44.1.

Como se detalla en la Figura 2.3.1 con elipses de color verde, los mutantes generados fueron Fv D44.1 V_H-N102F, Fv D44.1 V_H-G104V y Fv D44.1 V_H-G44S. El criterio utilizado para realizar estas mutaciones se basó en observar los residuos que conforman la interfaz V_L-V_H de ambos Acs están conservados y cuales no lo están. El primer seleccionado fue el 44 de V_H, que en el Ac D44.1 es una glicina. El análisis de las estructuras mostró que en esta posición en F10.6.6 se encuentra una serina y el mismo se encuentra formando un puente de hidrógeno intercatenario con el oxígeno de la cadena principal de la glicina 100 de V_L (Figura 2.3.2), mientras que la glicina del Fv D44.1 no lo forma. Este hecho sugiere que este cambio podría estabilizar la interfaz V_L-V_H y de este modo influenciar sobre la estabilidad del fragmento Fv.

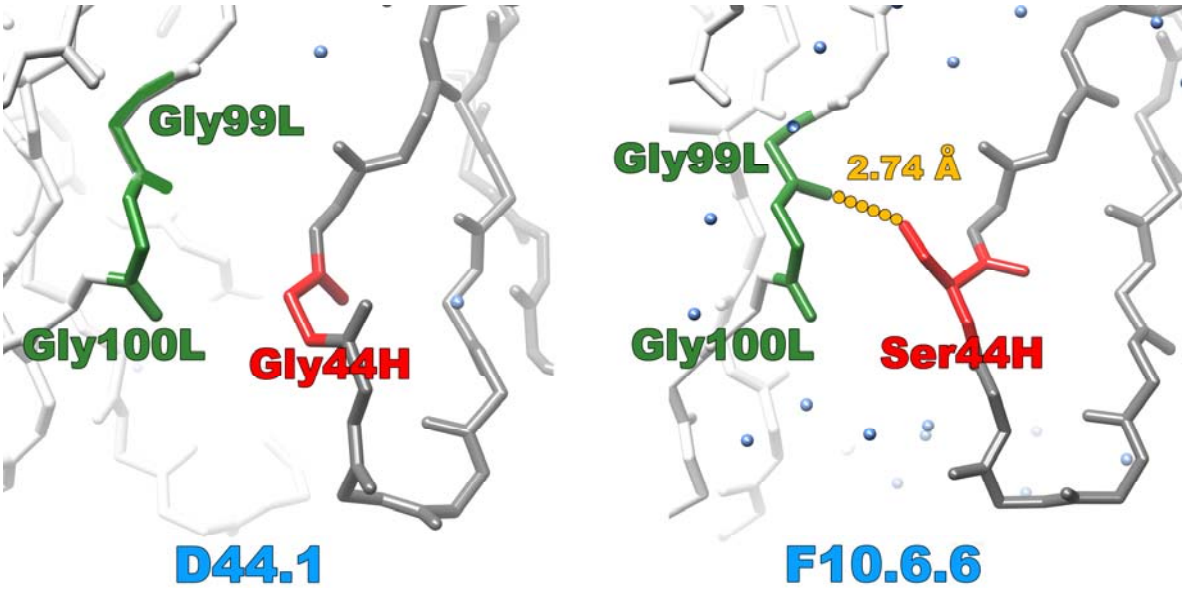


Figura 2.3.2 – Detalle de la mutación en la posición 44 del fragmento variable de la cadena pesada. El residuo serina en la posición 44 de la V_H de F10.6.6 forma un puente de hidrógeno con el oxígeno de la cadena principal correspondiente a la glicina 99 de la V_L.

Los resultados correspondientes a las curvas de desnaturalización térmica y química mostraron que la mutación G44S en la V_H del Fv D44.1 no es beneficiosa desde el punto de vista de la estabilidad, esta mutación produjo una desestabilización del dominio Fv, ya que hubo un deterioro en sus parámetros cinéticos, termodinámicos y de estabilidad, siendo inclusive menos estable y afín que el Fv D44.1 salvaje. Los parámetros termodinámicos de esta mutante no fueron determinados.

Los otros dos residuos seleccionados con el mismo criterio fueron la Asn102 y la Gly104 que se encuentran sobre el $CDR3_H$, y forman una especie de costura entre la V_H y V_L, muy cercana a la interfaz de contacto con el Ag. No obstante, aunque el análisis estructural no reveló contacto entre estos residuos y HEL.

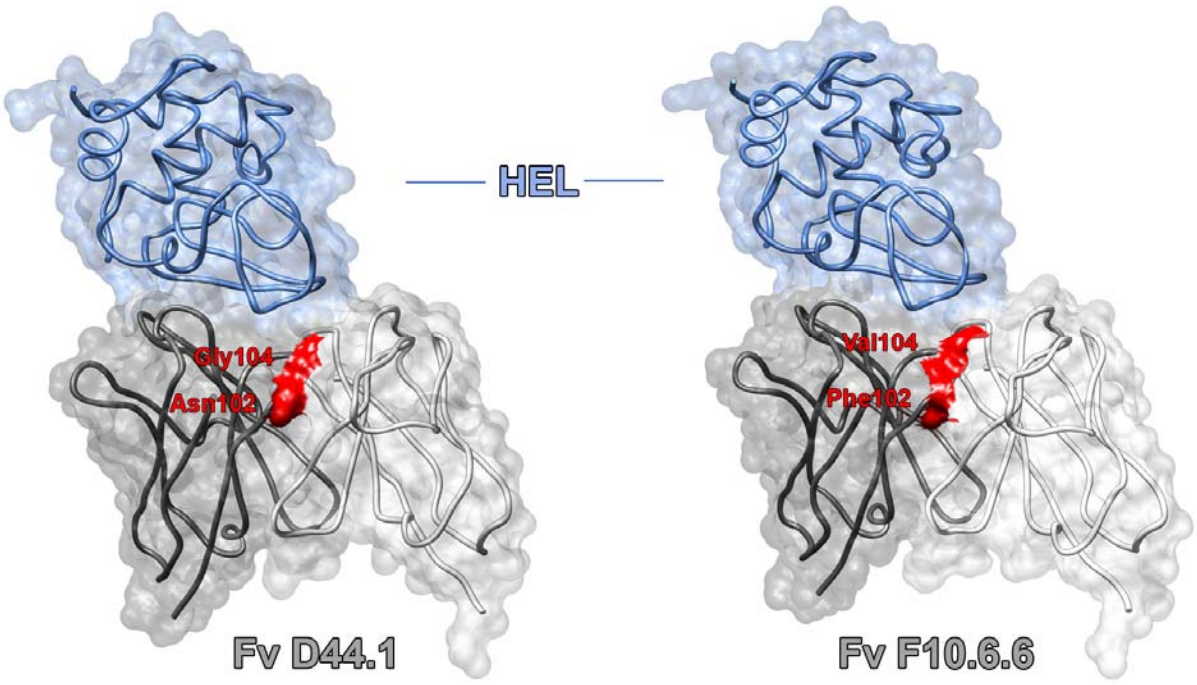


Figura 2.3.3 – Detalle de la posición de los residuos 102 y 104 (en color rojo) del fragmento variable de la cadena pesada.

Se generaron entonces cuatro mutantes del Fv D44.1 con el objetivo de observar si estos cambios producen alteraciones sobre el Fv D44.1 a nivel de afinidad y estabilidad: dos mutantes puntuales Fv D44.1 V_H N102F (denominada N102F), Fv D44.1 V_H-G104V (denominada G104V); la doble mutantes Fv D44.1 V_H-N102F/G104V (denominada 102/104) y un Fv quimérico con la doble mutante en V_H y la V_L de F10.6.6 que se denominó V_LF-V_HD N102F/G104V.

Parámetros cinéticos y termodinámicos

Las mutantes generadas N102F y G104V tienen una k_{ass} levemente mayor que la del Fv D44.1 en cambio la doble mutante N102F/G104V, posee una k_{ass} 4,5 veces mayor que la del Fv D44.1. Las k_{diss} de N102F y de G104V son 1,7 veces más rápidas, mientras que la k_{diss} de N102F/G104V es 1,42 veces más rápida que la del Fv D44.1 (Tabla 2.3.1). Esto se traduce en un aumento de 3.16 veces en la K_A para la doble mutante y como consecuencia un igual aumento del $\Delta G°$ de esta variante respecto del Fv D44.1 salvaje. La mutante N102F tiene la misma afinidad que el Fv D44.1 mientras que la G104V sufre cambios improductivos y sus parámetros cinéticos se ven ligeramente disminuidos respecto del Fv D44.1, traduciéndose en una afinidad menor.

(a)

Anticuerpo	k_{ass}* **(M^{-1} s^{-1})**	k_{diss}* **(s^{-1})**	K_A* **(M^{-1})**
Fv D44.1	$5.95 \pm 0.52\ 10^4$	$6.30 \pm 0.01\ 10^{-3}$	$9.44 \pm 0.82\ 10^6$
Fv F10.6.6	$1.43 \pm 0.07\ 10^6$	$2.50 \pm 0.25\ 10^{-4}$	$5.72 \pm 0.63\ 10^9$
D44.1 V_H-N102F	$1.05 \pm 0.08\ 10^5$	$1.07 \pm 0.02\ 10^{-2}$	$9.81 \pm 0.77\ 10^6$
D44.1 V_H-G104V	$9.36 \pm 0.30\ 10^4$	$1.07 \pm 0.01\ 10^{-2}$	$8.75 \pm 0.29\ 10^6$
D44.1 V_H-N102F/G104V	$2.67 \pm 0.01\ 10^5$	$8.97 \pm 0.03\ 10^{-3}$	$2.98 \pm 0.01\ 10^7$
V_LF-V_HD N102F/G104V	$2.52 \pm 0.11\ 10^5$	$3.42 \pm 0.02\ 10^{-3}$	$7.37 \pm 0.32\ 10^7$
Fv D44.1 V_H-G44S	$4.44 \pm 0.44\ 10^4$	$4.20 \pm 0.42\ 10^{-3}$	$1.06 \pm 0.14\ 10^7$

(b)

Anticuerpo	**$\Delta G^{o\ ‡}$**	**ΔH^o**	**$-T\Delta S^{o‡}$**
Fv D44.1	-9.50	-9.17 ± 0.18	0.33
Fv F10.6.6	-13.30	-15.72 ± 0.06	-2.42
D44.1 V_H-N102F	-9.53	-8.31 ± 0.09	1.22
D44.1 V_H-G104V	-9.46	-8.19 ± 0.07	1.27
D44.1 V_H-N102F/G104V	-10.18	-9.27 ± 0.14	0.91
V_LF-V_HD N102F/G104V	-10.72	-14.48 ± 0.09	-3.76
Fv D44.1 V_H-G44S	N/D	N/D	N/D

*Tabla 2.3.1 – Parámetros cinéticos (a) y termodinámicos (b) de las mutantes de interfaz V_L-V_H de Fv D44.1. Las unidades correspondientes a $\Delta G°$, $\Delta H°$ y $T\Delta S°$ son kcal mol^{-1}. *Determinado por Biosensor. ‡ Calculado mediante la ecuación $\Delta G°=\Delta H°-T\Delta S°$.*

En el caso del Fv quimérico V_LF-V_HD N102F/G104V se observó que debido al rol estabilizador de

la V_L del F10.6.6 en el Fv, su k_{diss}, es 2.6 veces más lenta que la doble mutante N102F/G104V, aunque su k_{ass} es similar a esta última pero 3.4 veces mayor que para la quimera V_LF-V_HD.

Por otro lado, analizando los parámetros de la doble mutante quimera V_LF-V_HD N102F/G104V observamos que posee una K_A 1.34 veces más alta que el V_LF-V_HD y 7.8 veces mayor que el Fv D44.1 y 77 veces menor que el Fv F10.6.6. La mutante D44.1 V_H G44S posee parámetros cinéticos 1.5 veces más lentos que el Fv D44.1 con una afinidad similar.

Por lo tanto, a modo de resumen, podemos decir que las mutaciones en el $CDR3_H$: N102F y G104V se sinergizan, ya que al darse al mismo tiempo aumentan la k_{ass} 4,5 veces y 3,6 veces la K_A a expensas de la primera.

Ordenando según k_{ass} creciente:

G44S < D44.1 < G104V < N102F < V_LF-V_HD N102F/G104V = N102F/G104V < F10.6.6

En cuanto a la k_{diss} las mutaciones aisladas empeoran este parámetro que mejora sin llegar a los valores del Fv D44.1 cuando ambas mutaciones se dan al mismo tiempo y con la contribución de la V_L de F10.6.6.

Ordenando según k_{diss} decreciente:

N102F = G104V > N102F/G104V > D44.1 > G44S > V_LF-V_HD N102F/G104V > F10.6.6

Desde el punto de vista termodinámico, podemos observar que tanto el mutante N102F como el G104V dan reacciones con un ΔH^o de menor valor absoluto que para el Fv D44.1 pero con una contribución entrópica mayor que este último. En cambio, el doble mutante N102F/G104V da reacciones con un ΔH^o similar al Fv D44.1 pero con un $T\Delta S^o$ menor que si las mutaciones se produjeran en forma aislada (más cercano a cero) pero tres veces mayor que para el Fv D44.1. La doble mutante quimera V_LF-V_HD N102F/G104V posee un ΔH^o de unión de mayor valor absoluto (1.56 veces) que la doble mutante N102F/G104V pero al mismo tiempo una mayor compensación entrópica (4 veces) debido a la contribución de la V_L del F10.6.6, dicha compensación es mayor que la observada para la reacción del Fv F10.6.6

Ordenando por $\Delta H°$ creciente en valor absoluto:

G104V < N102F < D44.1 < N102F/G104V < V_LF-V_HD N102F/G104V < F10.6.6

Ordenando por $T\Delta S°$ en orden creciente de "compensación":

D44.1 < N102F/G104V < N102F ≤ G104V < F10.6.6 < V_LF-V_HD N102F/G104V

Como se puede observar las mutaciones aisladas en el $CDR3_H$ producen una disminución en la entalpía y al mismo tiempo un aumento en la entropía favorable a la reacción. Ambas mutaciones si

se dieran al mismo tiempo producen un leve aumento de la entalpía pero con una disminución de la contribución favorable de la entropía con respecto a las mutantes aisladas.

Ordenando por K_A creciente:

G44S < G104V < D44.1 < N102F < G44S < N102F/G104V < V_LF-V_HD N102F/G104V < F10.6.6

En general ninguna de las mutaciones de la interfaz V_L-V_H de darse en forma aislada mejora la afinidad del Fv D44.1, solo la doble mutante N102F/G104V en el $CDR3_H$.

Estabilidad térmica

Consecuentemente con los estudios previos, los Fvs D44.1 mutantes de los residuos de la interfaz V_L-V_H fueron sometidos a la desnaturalización térmica con el objeto de observar si estas mutaciones introducidas modifican la estabilidad de estos Fvs frente a la temperatura creciente.

Ya que los residuos mutados intervienen en la unión V_L-V_H, produjeron alteraciones en la estabilidad térmica de los Fvs mutantes. En la Tabla 2.3.2 se presentan los valores de las T_m app correspondientes, determinados por CD y por DLS. En el caso de la mutante G104V se observaron dos transiciones claras en los gráficos de las medidas de CD, sugiriendo la posible existencia de estados intermedios en el proceso de desplegado. Así, esta mutante tiene una primera transición a los 41ºC y luego otra transición a 60ºC aproximadamente (detallada en la Figura 2.3.4), luego de esta temperatura el Fv se agregó irreversiblemente.

Anticuerpo	**CD T_m (ºC)**	**DLS T_m (ºC)**
Fv D44.1	49.5	44.3
Fv F10.6.6	58.4	51.4
V_H-G104V	40.8	36.1
	60.2	
V_H-N102F	55.3	51.7
V_H-N102F/G104V	58.7	54.2
V_LF-V_HD N102F/G104V	57.9	35.1
		51.0

Tabla 2.3.2 – Temperaturas de transición aparentes (T_m app) de mutantes de interfaz V_L-V_H, determinadas por dicroísmo circular (CD) y dispersión de luz dinámica (DLS).

Por otro lado, por DLS se obtuvo una Tm app de 36.1°C, 8°C por debajo del Fv D44.1 usando la misma técnica, sugiriendo que en la primera transición observada por CD el Fv no posee actividad. Para la mutante N102F solo se observó una transición a 55ºC (por CD), 6°C mayor que la

correspondiente al Fv D44.1 y 2°C por debajo que para el Fv F10.6.6.

Resultados similares se observaron para este experimento seguido por DLS (Figura 2.3.5), la transición fue levemente mayor que para el Fv F10.6.6. A su vez, la doble mutante N102F/G104V tuvo una T_m app de 58ºC, llegando a niveles similares al Fv F10.6.6, con DLS tuvo una T_m superior casi en 3°C al Fv F10.6.6, siendo el Fv de mayor estabilidad descripto en este sistema.

En los tres casos N102F, G104V y la doble mutante N102F/G104V fue determinada la transición térmica por CD siguiendo tanto la pérdida de la señal dicroica a 216 nm, mínimo correspondiente a la estructura β, como a 233 nm, correspondiente a la estructura terciaria de residuos aromáticos.

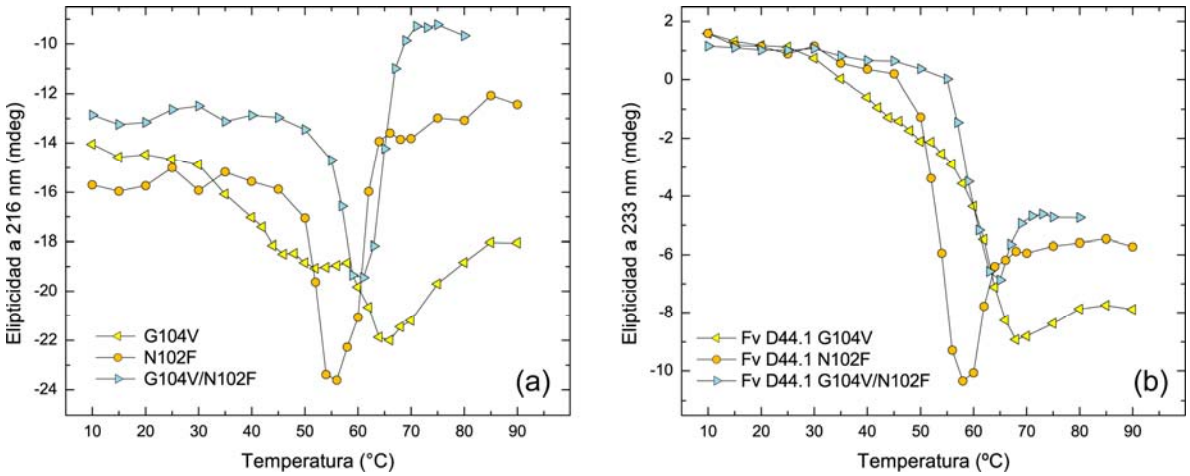


Figura 2.3.4 – Desnaturalización térmica de los Fvs mutantes de interfaz V_L-V_H seguida por elipticidad a (a) 216 nm y (b) 233 nm.

Como puede observarse en la Figura 2.3.4, los resultados son similares en ambos experimentos. Esto da un indicio de que ambas señales fluctúan en sincronía, con la simultánea pérdida de las estructuras secundaria y terciaria.

Analizando los resultados de la desnaturalización térmica de la quimera formada por la doble mutante V_LF-V_HD N102F/G104V, se pudo observar que el valor de T_m por CD es prácticamente igual al Fv F10.6.6 mientras que los experimentos con DLS muestran la existencia de un posible intermediario, obteniéndose dos T_m, el primero de ellos a temperatura fisiológica (Figura 2.3.5). Este resultado podría estar evidenciando que esta quimera es un tanto inestable a la agregación aunque preserve su estructura secundaria a temperaturas similares al resto de las especies estudiadas.

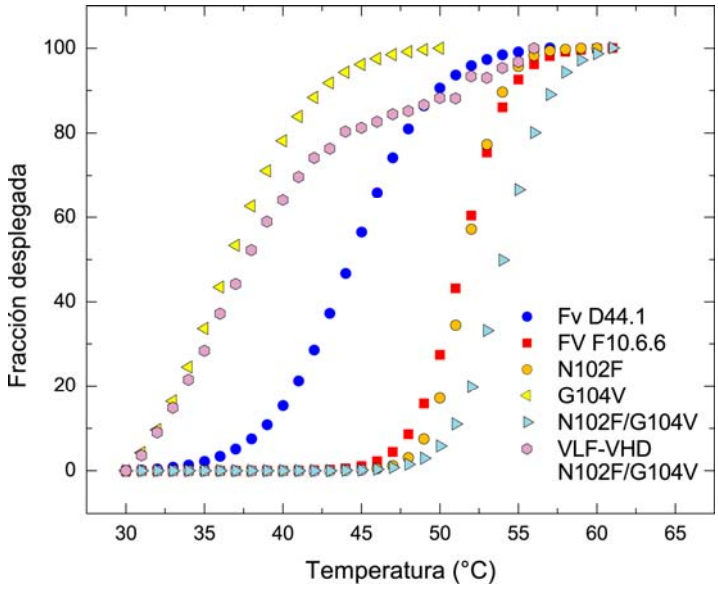


Figura 2.3.5 - Desnaturalización térmica de los Fvs mutantes de interfaz V_L-V_H seguida por DLS.

Ordenando los Fvs mutantes y quiméricos según estabilidad térmica creciente por CD y considerando que la primera transición da un intermediario inactivo o inestable:
G104V < D44.1 < V_LF-V_HD < N102F < V_LD-V_HF < V_LF-V_HD N102F/G104V < F10.6.6 < N102F/G104V

Según DLS:
G104V = V_LF-V_HD N102F/G104V < D44.1 < V_LF-V_HD < V_LD-V_HF < F10.6.6 = N102F < N102F/G104V

Analizando las dos escalas nos queda claro que la doble mutante N102F/G104V es la especie molecular más estable por CD y por DLS, pero no mejorando cuando la V_H doblemente mutada se repliega con la V_L F10.6.6.

Desnaturalización por agentes caotrópicos

La desnaturalización por agentes caotrópicos arrojó resultados similares a los correspondientes a la desnaturalización térmica. Así, la mutante G104V mostró dos transiciones bien marcadas (se detallan las curvas en la Figura 2.3.6), una a bajas concentraciones de urea, 1M aproximadamente, y la otra a 5M urea. En la desnaturalización del N102F se observó una D_{50} mayor que en G104V, con una mayor cooperatividad; mientras que la doble mutante N102F/G104V mostró una D_{50} a 3M de urea con una transición aún más definida.

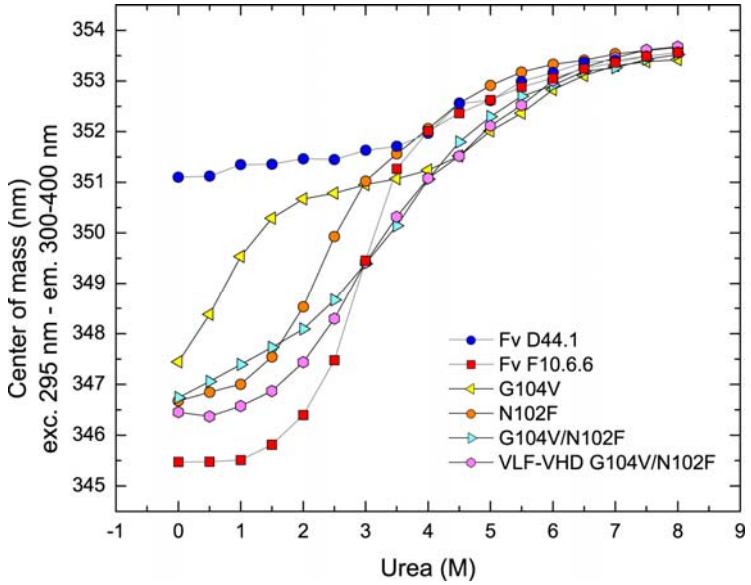


Figura 2.3.6 – Equilibrio de desplegado medido por fluorescencia intrínseca de triptofanos. Mutantes de interfaz V_L-V_H.

La estabilidad de la quimera V_LF-V_HD con la doble mutación N102F/G104V en V_H presentó la mayor estabilidad, con un D_{50} de 3.5M de urea, mayor al Fv F10.6.6 pero con un menor grado de cooperatividad. En este punto, es necesario aclarar que aunque este Fv quimérico tiene una estabilidad mayor, el CM correspondiente al estado nativo está levemente desplazado hacia el rojo, indicando una mayor exposición de los residuos de triptófano. Además, ninguna de estas mutantes o Fvs quiméricos tiene una transición tan marcada como la del Fv F10.6.6; todas las curvas tienen transiciones de menor pendiente que no llegan a los niveles de cooperatividad del Fv F10.6.6. Este comportamiento puede ser explicado por un plegamiento parcialmente anómalo en el sentido de las características del "immunoglobulin fold", lo que conduciría a una estabilidad disminuida del estado nativo, ya que estas proteínas fueron generadas en el laboratorio mediante diseño racional con el objeto de estudiar los efectos de las mutaciones sufridas por el Fv D44.1 hacia la formación del Fv F10.6.6 no siendo el producto de una selección natural. Por esto, es probable que las mutantes o quimeras no lleguen a una conformación estructural de un mínimo energético (lo que conllevaría a una estabilidad mayor) este comportamiento se ve reflejado en el modo en que estas proteínas se desnaturalizan.

Comparando los resultados de estabilidad por agentes caotrópicos y de estabilidad térmica observamos que ambos experimentos dan resultados con una tendencia similar, apoyando la idea de que en los residuos 102 y 104 de la V_H del Fv F10.6.6 han madurado para brindar una mejor unión V_L-V_H y por ende una mayor estabilidad del dominio Fv en el F10.6.6.

Unión a ácido 8-Anilino-1-naftalenesulfónico (ANS)

Se midió a su vez la unión de ANS a las mutantes de la interfaz V_L-V_H, con el fin de observar si existe un comportamiento similar al observado en el caso del Fv D44.1 y del Fv F10.6.6. En la Figura 2.3.7 se puede observar la comparación entre los espectros de emisión de ANS de los Fvs salvajes y los mutados.

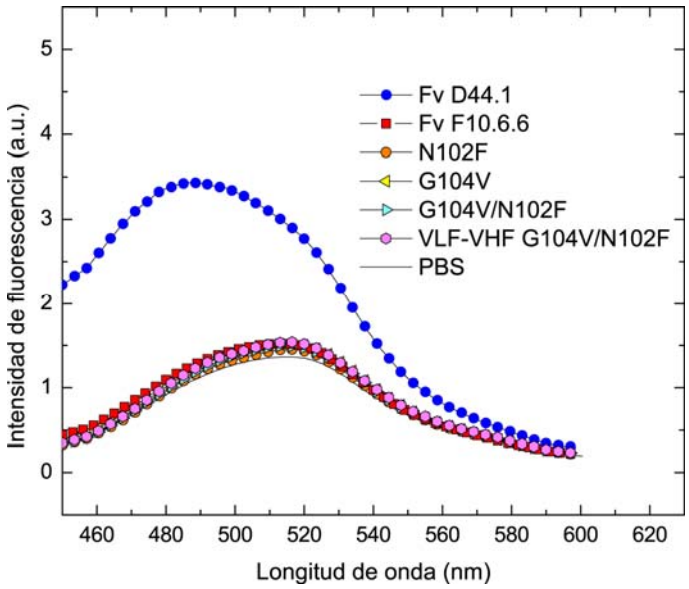


Figura 2.3.7 – Unión a ANS de mutantes de la interfaz V_L-V_H.

No hay unión significativa de ANS a estos Fvs, la señal de fluorescencia es similar a la del Fv F10.6.6 y al control de ANS en buffer PBS. Por lo tanto, las mutaciones en las posiciones 102 y 104 de la V_H produjeron que el Fv D44.1 deje de unir ANS. Como se expresó más arriba, la unión a ANS se utiliza para monitorear el grado de exposición de regiones hidrofóbicas sobre la superficie de las proteínas y evaluar posibles estructuras glóbulo fundido que resultan de proteínas parcialmente plegadas.[67] Por lo tanto, la pérdida de fluorescencia del ANS se puede atribuir a un reacomodamiento de la interfaz V_L-V_H producto de las mutaciones 102 y 104 en V_H, mejorando el plegamiento total del Fv.

A modo de resumen, de los resultados encontrados en esta sección podemos decir que las mutaciones N102F y G104V en el $CDR3_H$ del F10.6.6 con respecto al D44.1 producen un aumento de 3.6 veces la K_A a expensas de la k_{ass}, mejorando levemente la entalpía de unión y haciendo más favorable el término entrópico de la reacción. En cuanto a la estabilidad, brindan una mayor estabilidad térmica y hacia agentes caotrópicos, mejorando a su vez el plegamiento del Fv evitando

la exposición de parches hidrofóbicos encontrados en el Fv D44.1.

2.3.2 Mutantes de interfaz Ag-Ac

Se generaron tres mutantes puntuales sobre el Fv D44.1 por residuos encontrados en el Fv F10.6.6 en la interfaz Ag-Ac (Figura 2.3.1) con el fin de observar si estos cambios tienen un rol importante en la maduración del comportamiento cinético y termodinámico de la reacción Ag-Ac, al mismo tiempo si están además involucrados en el mejoramiento de la estabilidad del dominio Fv.

Parámetros cinéticos y termodinámicos

En la Tabla 2.3.3 se presentan los parámetros cinéticos y termodinámicos de las mutantes del Fv D44.1 V_L-V51T, V_L-N92G y V_H-G56D. Ninguna de estas mutantes sufrió un aumento significativo en los parámetros cinéticos de la reacción Ag-Ac que pudiese relacionarse con un comportamiento cercano al del Fv F10.6.6. Mientras que la mutante V51T tuvo valores de k_{ass} y k_{diss} similares al Fv D44.1, con la consecuente afinidad similar, los parámetros cinéticos de N92G tanto como aquellos de G56D se vieron afectados de modo improductivo, de modo tal que las k_{ass} de estas dos mutantes fueron menores que la correspondiente a la reacción Fv D44.1-HEL. Por otra parte, mientras que G56D tuvo una k_{diss} un poco más rápida que el Fv D44.1, la introducción del cambio N92G en la V_L produjo la disminución de la k_{diss} en un 50% de modo tal que compensó su débil k_{ass}, logrando así una afinidad similar al D44.1 salvaje. De esta forma, V51T y N92G poseen afinidades similares al Fv D44.1, mientras que G56D posee una K_A inclusive menor, producto de una k_{ass} tres veces más lenta.
Ordenando por k_{ass} creciente:
G56D < N92G < Fv D44.1 < V51T < Fv F10.6.6

Aunque este ordenamiento muestra que la mutante V51T posee una k_{ass} superior al Fv D44.1 este aumento es muy discreto.
Ordenando por k_{diss} decreciente:
G56D < Fv D44.1 < V51T < N92G < Fv F10.6.6

Lo mismo es válido para la k_{diss}, V51T produjo una disminución muy discreta, N92G produce una disminución del 50% en la k_{diss} con respecto al Fv D44.1

También desde el punto de vista termodinámico la mutante G56D sufrió un detrimento en los valores de sus parámetros de $\Delta G°$ y $\Delta H°$ de reacción con HEL, siendo de menor valor absoluto que para la reacción del Fv D44.1. Como fue descripto en secciones anteriores el termino $\Delta H°$ es

dependiente del T∆S° por lo que para esta mutante el término T∆S° aumenta haciéndose más favorable que para la reacción del Fv D44.1.

Anticuerpo	k_{ass}* **(M-1 s-1)**	k_{diss}* **(s-1)**	K_A* **(M^{-1})**	**∆G° ‡**	**∆H°**	**-T∆S°‡**
Fv D44.1	$5.95 \pm 0.52\ 10^4$	$6.30 \pm 0.01\ 10^{-3}$	$9.44 \pm 0.82\ 10^6$	-9.50	-9.17 ± 0.18	0.33
Fv F10.6.6	$1.43 \pm 0.07\ 10^6$	$2.50 \pm 0.25\ 10^{-4}$	$5.72 \pm 0.63\ 10^9$	-13.30	-15.72 ± 0.06	-2.42
Fv D44.1 V_L-V51T	$6.54 \pm 0.25\ 10^4$	$5.78 \pm 0.02\ 10^{-3}$	$1.13 \pm 0.04\ 10^7$	-9.61	-12.47 ± 0.18	-2.86
Fv D44.1 V_H-G56D	$2.28 \pm 0.11\ 10^4$	$7.97 \pm 0.01\ 10^{-3}$	$2.86 \pm 0.14\ 10^6$	-8.80	-7.35 ± 0.09	1.45
Fv D44.1 V_L-N92G	$3.30 \pm 0.14\ 10^4$	$3.22 \pm 0.01\ 10^{-3}$	$1.02 \pm 0.06\ 10^7$	-9.55	-15.57 ± 0.11	-6.02

*Tabla 2.3.3 – Parámetros cinéticos y termodinámicos de las mutantes de interfaz Ag-Ac del Fv D44.1. Las unidades correspondientes a ∆G°, ∆H° y T∆S° son kcal mol^{-1}. *Determinado por Biosensor. ‡ Calculado mediante la ecuación ∆G°=∆H°-T∆S°.*

Por otra parte, ambos cambios introducidos en la V_L tuvieron efectos notorios sobre los parámetros de ∆G°, ∆H° y T∆S° de unión. El cambio V51T introdujo una aumento en el valor absoluto del ∆H° de reacción de aproximadamente 3 kcal/mol. Debido a que éste es un cambio no conservativo que introduce en dicha posición un residuo con un grupo hidroxilo, posiblemente dicho cambio en ∆H° se deba a la formación de uno o más puentes de hidrógeno. Esta hipótesis surge porque ambos residuos poseen aproximadamente el mismo volumen.

En lo que concierne a la entropía, dicho cambio favorable en el ∆H° produce un cambio desfavorable en el T∆S° con respecto a la contribución nula en la reacción del Fv D44.1-HEL, produciendo de este modo una compensación entrópico-entálpica.

En el caso de la reacción de la mutante N92G en comparación con todas las mutantes analizadas, se puede observar que esta mutación produce el cambio más drástico en el término entrópico al cambiar un residuo de asparragina por una glicina. Ya que se sumaron grados de libertad a la cadena principal del $CDR3_L$, de modo tal que ésta puede hacerse más flexible y así acomodarse mejor a HEL. Por lo tanto el valor de ∆H° de N92G es similar al del Fv F10.6.6, sufriendo además como en la reacción de este último, una compensación entrópico-entálpica pero de una magnitud superior.

Ordenando por ∆H° creciente:

G56D < Fv D44.1 < V51T < N92G < Fv F10.6.6

Ordenando por compensación T∆S° creciente:
G56D < Fv D44.1 < Fv F10.6.6 < V51T < N92G

Es así entonces como se puede explicar (mediante experimentos diferentes) que la constante de disociación k_{diss} de N92G es un 50% más lenta que la correspondiente a la reacción del Fv D44.1 salvaje, lo que se traduce en una mayor vida media del complejo gracias a un aumento de contactos productivos introducidos en la cadena liviana. Aunque esto no explique la diferencia de afinidad entre las reacciones del Ac D44.1 y F10.6.6 con HEL (producida mayoritariamente por la diferencia en la k_{ass} debido a mayores contactos atómicos realizados por la V_H), es posible hipotetizar que el $CDR3_L$ sea un determinante principal de la vida media del complejo F10.6.6-HEL, y que al mismo tiempo produzca el aumento de la entalpía y de la compensación entrópica de unión, hecho que concuerda con los resultados obtenidos en los experimentos de intercambio de cadenas.
Ordenando por K_A creciente:
G56D < Fv D44.1 < N92G < V51T < F10.6.6

En resumen, aunque el aumento de K_A sea discreto, la disección de los parámetros cinéticos y termodinámicos mediante las mutantes de V_L en la interfaz Ag-Ac sugiere que la maduración de la afinidad en esta cadena produce un leve aumento de la k_{ass} (V51T), un enlentecimiento de la k_{diss}, un aumento de la entalpía y un aumento de la compensación entrópica.

Estabilidad térmica

En la Tabla 2.3.4 se detallan las T_m app para estas mutantes obtenidas por CD y por DLS.

Anticuerpo	CD T_m (°C)	DLS T_m (°C)
Fv D44.1	49.5	44.3
Fv F10.6.6	58.4	51.4
Fv D44.1 VL-V51T	52.9	45.1
Fv D44.1 VH-G56D	40.8	35.6
Fv D44.1 VL-N92G	49.6	43.9

Tabla 2.3.4 – Temperaturas de transición de las mutantes del Fv D44.1 en la interfaz Ag-Ac determinadas por CD y DLS.

Analizando los experimentos de CD, N92G presentó un T_m app similar al Fv D44.1 salvaje pero con un grado mayor de cooperatividad, G56D un T_m app 9°C menor y V51T 3.4°C mayor con una leve disminución en la cooperatividad (Figura 2.3.8).

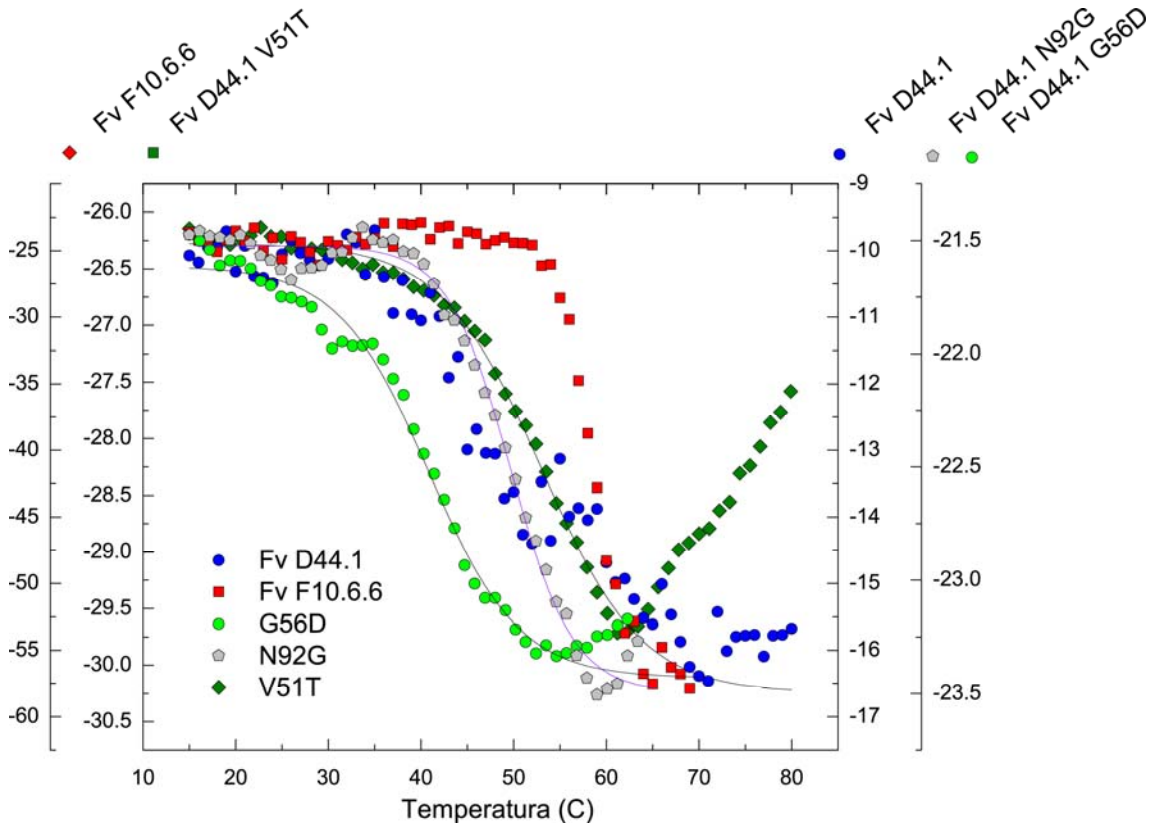


Figura 2.3.8 - Desnaturalización térmica de las mutantes de interfaz Ag-Ac seguida por la señal dicroica a 216 nm.

En el caso de los experimentos de DLS, la mutante G56D tuvo un valor de T_m app 8.7°C menor que el Fv D44.1 (Figura 2.3.9), lo que indica que la introducción de este cambio no es productiva. Los resultados de las T_m para N92G y V51T fueron similares al Fv D44.1 con una leve disminución en la cooperatividad del V51T.

Ordenando según estabilidad térmica creciente por CD y DLS:

G56D < Fv D44.1 = N92G < V51T < Fv F10.6.6

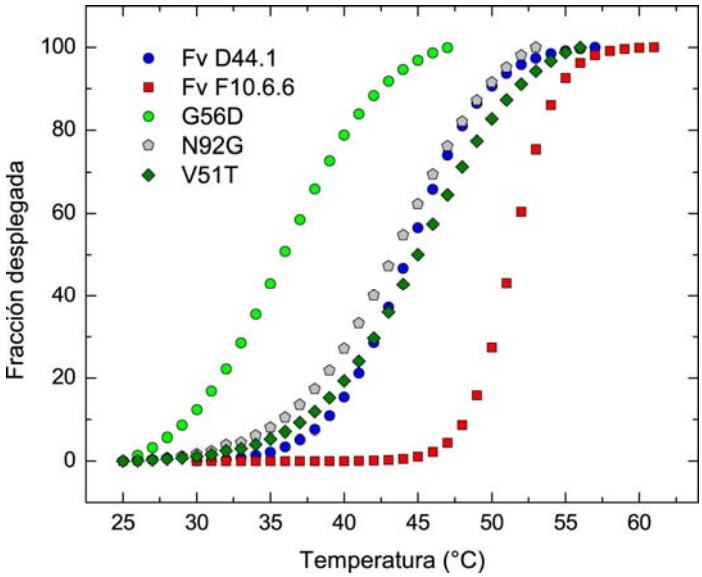


Figura 2.3.9 - Desnaturalización térmica de las mutantes de interfaz Ag-Ac seguida por DLS.

Desnaturalización por agentes caotrópicos

En el caso de la desnaturalización por urea se observó un menor grado de cooperatividad que el Fv F10.6.6 y transiciones prácticamente nulas en los tres casos estudiados (Figura 2.3.10).

Los valores de D_{50} para los mutantes de la interfaz Ag-Ac están esquematizados en la Tabla 2.3.5. No obstante, la presencia de intermediarios y el grado de cooperatividad sugiere que estas especies son menos estables que el Fv F10.6.6, lo que concuerda con los experimentos de estabilidad térmica.

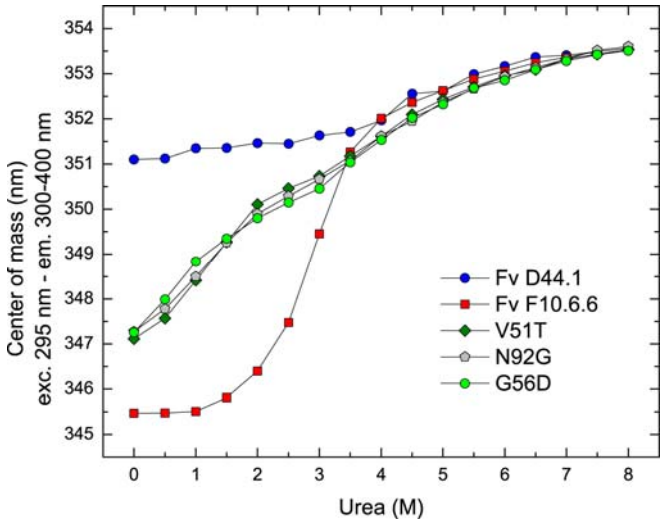


Figura 2.3.10 – Equilibrio de desplegado medido por fluorescencia intrínseca de triptofanos. Mutantes de interfaz Ag-Ac.

Por lo tanto, se pueden discriminar dos tendencias claras: aquellos Fvs que se poseen intermediarios (Fv D44.1) y sus mutantes en V_H (G104V y G56D) y V_L (V51T y N92G) y aquellos en los cuales puede observarse una transición (Fv F10.6.6, V_LD-V_HF, V_LF-V_HD, N102F, la doble mutante N102F/G104V y la quimera V_LF-V_HD N102F/G104V).

Anticuerpo	D_{50}
Fv D44.1	N/D
Fv F10.6.6	3.0
V_LD-V_HF	2.5
V_LF-V_HD	1.5
Fv D44.1 V_L-V51T	1.25/4.0
Fv D44.1 V_H-G56D	1.25/3.5
Fv D44.1 V_L-N92G	1.25/3.5
Fv D44.1 V_H-G104V	1.0/5.0
Fv D44.1 V_H-N102F	2.5
Fv D44.1 V_H-N102F/G104V	3.0
V_LF-V_HD G104V/N102F	3.5

Tabla 2.3.5 – D_{50} de los Fvs salvajes y de mutantes de interfaces V_L-V_H y Ag-Ac.

2.3.3 Unión a ácido 8-Anilino-1-naftalenesulfónico (ANS)

Se midió a su vez la unión de ANS a todas las mutantes de la interfaz Ag-Ac, con el fin de observar si existe un comportamiento similar al observado en el caso de Fv D44.1 y Fv F10.6.6. En la Figura 2.3.11 se puede observar la comparación entre los espectros de emisión de ANS.

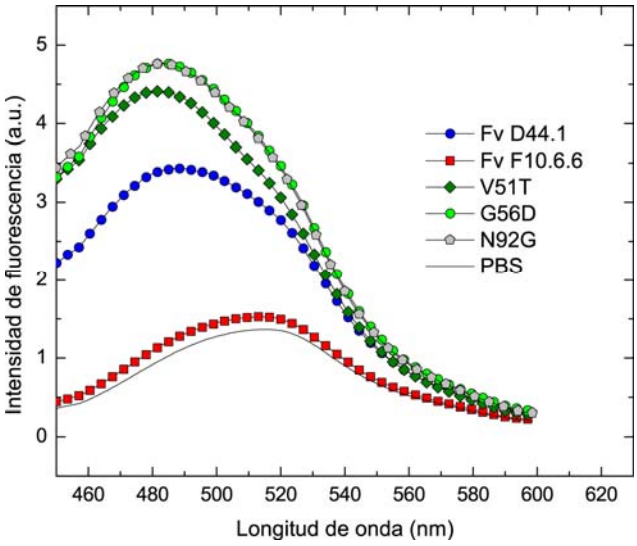


Figura 2.3.11 – Unión a ANS de las mutantes de interfaz Ag-Ac.

En la Figura 2.3.11 se puede observar como las mutaciones N92G, V51T y G56D sobre el Fv D44.1 no inhiben la unión de ANS, sino por el contrario se observa un aumento de la intensidad de fluorescencia. Este aumento denota un plegamiento aún más defectuoso, dando una estructura de tipo glóbulo fundido con mayor capacidad de unión a ANS de todas las mutantes de esta sección.

En resumen, las mutantes de la interfaz Ag-Ac producen Fvs más inestables que el Fv F10.6.6 aunque más estables que el Fv D44.1, hecho que puede observarse con claridad en los experimentos de desnaturalización frente a agentes caotrópicos, presentando además estos mutantes mayor tendencia a la formación de estructuras del tipo glóbulo fundido. Otro resultado remarcable es que la mutación N92G en la V_L produce un aumento notable de la entalpía de reacción con la mayor compensación entrópica observada, demostrando ser la responsable de la compensación entrópica encontrada en la reacción del F10.6.6-HEL y que el F10.6.6 gracias a esta mutación y en menor grado a V51T maduró hacia una mayor vida media del complejo (mediante la disminución de su k_{diss}) y hacia el aumento de la entalpía y la compensación entrópica acoplada.

Discusión

Discusión

3.1 Comparación estructural y biofísica entre D44.1 y F10.6.6

El proceso de maduración de la afinidad consiste en la introducción de mutaciones al azar en la región variable de un Ac produciendo cambios estructurales. Dichos cambios estructurales pueden ser productivos o no productivos, aunque se seleccionan únicamente aquellos clones que poseen cambios productivos. Por lo tanto, son seleccionados aquellos clones de alta afinidad con los mejores sitios de combinación Ag-Ac.

En nuestro caso de estudio (el sistema D44.1-F10.6.6) el aumento de la afinidad surge de la combinación de varios factores, entre los que se incluyen la complementariedad de superficies (SC), la superficie oculta al solvente (BSA) y los contactos de Van der Waals y puentes de hidrógeno.[40] Todos estos eventos son producto de un posible mecanismo de ajuste inducido (*induced fit*[20]) utilizado para mejorar la unión al Ag. Este mecanismo de unión se basa en el hecho de que el Fv F10.6.6 es lo suficientemente flexible para acomodar al Ag. Esta flexibilidad se ve reflejada en los cambios conformacionales que se producen en la unión V_L-V_H en el dominio V_H y que se ven reflejados en los altos valores de *rmsd* entre la estructura del V_H libre y unida del F10.6.6.

Los cambios conformacionales locales en conjunto con los cambios de estructura cuaternaria en la interfaz V_L-V_H y algunos cambios en las cadenas laterales de residuos del paratope provocan que el sitio de unión amplíe su extensión cambiando su forma para mejorar la complementariedad Ag-Ac.

Por el contrario, la unión del D44.1 a HEL no se produce del mismo modo que en el F10.6.6 y no puede ser descripta como una unión mediada por *induced fit*. En primer lugar, no se observaron grandes cambios estructurales entre las estructuras del Fv D44.1 libre y unido a HEL. Además, no fue posible observar una pérdida de contactos en la interfaz V_L-V_H como en el caso del Fv F10.6.6 al unirse a HEL; por el contrario, esta pérdida es insignificante y puede estar dada por una organización estructural menos sólida. A su vez, puede ser producida por los pequeños cambios conformacionales distribuidos globalmente a lo largo de toda la estructura del dominio V_H. Este hecho alude a la falta de complementariedad entre D44.1 y HEL y puede deberse a la relativa inestabilidad de la interfaz V_L-V_H de D44.1 en la forma libre, como fue constatado por los experimentos de desnaturalización seguida por CD, DLS y fluorescencia.

Es así como el estudio de la interfaz V_L-V_H de los Acs es tomado en cuenta a la hora de generar Ac recombinantes con fines de diagnóstico y terapia, ya que los fragmentos Fv pueden ser producidos con relativa facilidad.[68]

Se ha descripto que las mutaciones introducidas en los FR cumplen roles importantes en la preservación de la estructura, el rendimiento del plegamiento y en la posterior estabilidad de la proteína funcional, factores que conjuntamente afectan la afinidad de un Ac.[69; 70] Recientemente, se ha descripto la importancia del rol de los residuos del FR2 de ambas cadenas V_L y V_H, las cuales juegan papeles preponderantes en la interacción de la interfaz V_L-V_H y en la afinidad por HEL.[71] Dichos autores encontraron que una glutamina en V_H en la posición 39 de VH es crucial para ambas interacciones. En nuestro sistema, ambos Acs D44.1 y F10.6.6 poseen dicho residuo en V_H, pero no forma un puente de hidrógeno con la Tyr87L, como sí se pudo observar para otros Acs. En cambio, la Gln39H forma dos puentes de hidrógeno con la Gln38L en la forma libre (con distancias de enlaces menores en el caso de F10.6.6). Sin embargo, la diferencia de interacción V_L-V_H encontrada entre ambos Acs parece estar dada por una interacción diferencial entre el $FR2_H$, la región apical del $CDR3_H$ y el extremo N terminal del $FR4_H$ con el dominio V_L. Adicionalmente, los cambios conformacionales en la interfaz V_L-V_H inducidos por la unión al Ag proveen evidencia experimental para la hipótesis del adaptador de interfaz, propuesta por Colman.[72] Esta hipótesis se aplica al Fab 50.1, el cual reconoce un Ag peptídico (Stanfield *et al*[21]). En el trabajo de Stanfield y colaboradores se analizaron los cambios cuaternarios y los rearreglos de la interfaz V_L-V_H que acompañan a la unión del Ag, relacionando los cambios observados con la afinidad por el mismo. El mecanismo observado de unión por induced fit ha mostrado involucrar, en ciertas ocasiones, la rotación y traslación de la disposición de la interfaz V_L-V_H.[21] Estos cambios en la disposición V_L-V_H observados en varios Fabs libres y unidos caen en el rango de 0.7 a 16.3º para la rotación y 0.2 a 2.8 Å para la traslación. En el caso del Fab F10.6.6 existe una rotación de 2.9º y una traslación de 1.1Å, mientras que para el D44.1 hay una rotación de 3.0º y una traslación no significativa. Estos valores están cercanos al límite inferior del rango de Acs comparados. Sin embargo, se observa una leve diferencia en las traslaciones del Fv D44.1 y del Fv F10.6.6, la cual correlaciona con la pérdida de contactos atómicos en la interfaz V_L-V_H dada al unirse el Ag. Más aun, como describe Stanfield y colaboradores, la superficie de contacto de la interfaz V_L-V_H se correlaciona con el tamaño de los CDRs, particularmente con el $CDR3_H$. En nuestro sistema, el $CDR3_H$ tiene el mismo tamaño (siete residuos) tanto para D44.1 como para F10.6.6 y para ambos Acs, el valor de BSA de esta interfaz (medido con el mismo método que en Stanfield *et al*) no se correlaciona con la longitud del $CDR3_H$ ni sigue la misma tendencia observada en dicho trabajo. De esta forma, D44.1 y F10.6.6 poseen un valor mayor de BSA de la interfaz V_L-V_H que aquellos observados en Acs con $CDR3_H$ de la misma longitud.

Las características estructurales de la unión de los Acs D44.1 y F10.6.6 a HEL se traducen en la termodinámica de unión: para las reacciones del F10.6.6-HEL se observaron altos valores de entalpía para ambos fragmentos Fv y Fab, debido a la presencia de una mayor cantidad y mejor calidad de contactos en la interfaz Ag-Ac.[40] Estos contactos favorables son el producto de cambios

cuaternarios y de rearreglos en la interfaz V_L-V_H. Sin embargo, la reacción Fv F10.6.6-HEL es de una afinidad de un orden de magnitud menor que aquella correspondiente al Fab F10.6.6 con HEL. Esto es debido mayoritariamente a la falta de estabilización del dominio constante presente en el fragmento Fab.[34; 73] Por el contrario, la reacción Fv D44.1-HEL es de una afinidad similar a la reacción Fab D44.1-HEL, lo que indica que si existen rearreglos conformacionales para el Fv D44.1, aunque pequeños, los mismos no afectan la afinidad.

No obstante, el estudio de la estabilidad química y térmica de los fragmentos Fv y Fab de ambos Acs (por intermedio de diversas técnicas) sugiere una fuerte estabilización del dominio constante,[37; 74] la cual es más notoria en el caso del fragmento Fv D44.1. Así, durante la maduración de la afinidad del F10.6.6 la mayoría de las mutaciones ocurren en el dominio V_H, en especial en las regiones FR.[40] De este modo, la cooperatividad observada en los procesos de desplegado/desnaturalización del Fv F10.6.6 se debería al efecto estabilizador de estas mutaciones.

La estabilidad del fragmento Fv de ambos Acs concuerda con el contenido de estructura secundaria calculado al analizar los espectros de dicroísmo circular, los mecanismos de desplegado y la unión a ANS, sugiriendo la existencia de parches hidrofóbicos sobre la superficie del Fv D44.1 y una posible estructura característica de glóbulo fundido. Aunque los fragmentos Fab de ambos Acs no unen ANS, la presencia de superficies hidrofóbicas con las cuales pueda interactuar esta sonda es descripta por Braden *et al.*[39] En este trabajo, se describen "agujeros" en la interfaz del complejo Fab D44.1-HEL situados en un entorno hidrofóbico de las cadenas laterales de V_H.

Este modelo particular de dos Acs relacionados tanto genética como estructuralmente ofrece la posibilidad de estudiar la evolución del cambio de la capacidad calorífica (ΔCp) relacionado al proceso de maduración de la afinidad. En el pasado, los estudios de ΔCp de interacción proteína-proteína atribuían los valores negativos de ΔCp casi exclusivamente al efecto hidrofóbico.[75; 76] Este efecto resulta de la formación de jaulas de agua estructural con una Cp anormalmente alta y una baja entropía de los grupos no polares.[77; 78] De hecho, como fue descripto,[78] las fuentes del ΔCp y entropía son numerosas y diversas: cambios electrostáticos, puentes de hidrógeno, entropía conformacional, estados vibracionales, cambios de equilibrio, entre otros, siendo mucho más ubicuos que lo que se pensaba. En este trabajo, el valor experimental del ΔCp para la reacción F10.6.6-HEL es coincidente con el valor teórico calculado a partir de la ecuación de Murphy y Freire,[58] la cual toma en cuenta la superficie del área polar y no polar de interacción. Se han reportado con anterioridad resultados similares para la reacción HyHEL5-HEL,[79] lo que sugiere que los ΔCp de reacción del F10.6.6 y HyHEL5 son fuertemente dependientes de la superficie de interacción. HyHEL5 reconoce un epitope que se superpone al reconocido por D44.1 y F10.6.6[39; 40; 80] con una constante de afinidad de $4x10^{10}$ M^{-1}. Su asociación a HEL es acompañada por un cambio de entalpía favorable[79] a la temperatura ensayada para D44.1 y F10.6.6 (ver resultados). Es

importante poner énfasis en que los tres Acs D44.1, F10.6.6 y HyHEL5 comparten una secuencia variable derivada del mismo rearreglo de la V_H, aunque con segmentos D (diversidad) diferentes, el cual otorga una naturaleza distintiva al $CDR3_H$ de HyHEL5. Por lo tanto, en los casos de reacciones de alta afinidad (F10.6.6-HEL y HyHEL5-HEL) es posible observar una compensación entrópico-entálpica, cosa que no ocurre en el caso de la reacción D44.1-HEL. Esta "homeostasis termodinámica" confiere estabilidad termodinámica y amortigua los cambios potenciales que pueden ser introducidos por mutaciones puntuales introducidas.[60]

La curvatura observada al graficar entalpía de unión en función de la temperatura para la reacción D44.1-HEL sugiere que la unión a HEL está acoplada a un evento de plegamiento.[62] Así, la estructura de glóbulo fundido podría añadir una componente a la entalpía de unión que no está presente en interacciones convencionales proteína-proteína. Sin embargo, la componente de plegamiento del ΔCp no es simple de calcular, ya que las curvas de desnaturalización térmica y química de D44.1 no corresponden con procesos cooperativos y el estado nativo es difícil de definir.

3.2 Efecto de las mutaciones

Existen sólo 17 residuos diferentes entre D44.1 y F10.6.6, los cuales son responsables de todas las diferencias estructurales y biofísicas que existen entre estos dos Ac. Todos estos cambios fueron seleccionados durante el proceso de maduración de la afinidad y produjeron sobre D44.1 efectos que van desde el notorio aumento de la afinidad, pasando por un cambio en el mecanismo de unión a HEL, hasta el aumento significativo de la estabilidad del dominio variable.

Las estrategias utilizadas en la actualidad para obtener Acs in Vitro de cada vez mayor afinidad se basan en la optimización de la vida media del complejo Ag-Ac. Es decir, se buscan obtener Acs con constantes de disociación (k_{diss}) cada vez más lentas.[68] En nuestro sistema, donde esta optimización fue llevada a cabo por el proceso natural de maduración de la afinidad, el dominio V_L del D44.1 adquirió cinco mutaciones (el 5% de cambios sobre el total de residuos aproximadamente), mientras que el dominio V_H adquirió 12 (aproximadamente el 10%) para transformarse en F10.6.6.

El dominio variable de la cadena pesada sufrió luego de la maduración de la afinidad una frecuencia de mutación del doble que su contraparte V_L. Mientras que las mutaciones de V_L se encuentran polarizadas entre los $CDR2_L$ y $CDR3_L$, los cambios introducidos en V_H se encuentran dispersos a lo largo de todo el dominio V_H. Esto puede estar relacionado con una mayor permisividad del dominio V_H a la introducción de mutaciones. El hecho de que los determinantes de la estabilidad estén incluidos dentro del dominio V_H de D44.1 junto con la falta de plasticidad del

mismo[41] indicaría que los genes de la línea germinal que codifican a V_H de D44.1 están menos preparados para unir a HEL que los de V_L.

Con el objetivo de conocer cuales son los efectos producidos por las mutaciones introducidas se llevaron a cabo dos estrategias experimentales. La primera de ellas consistió en generar Fvs con cadenas variables intercambiadas (*chain shuffling*) y sirvió para investigar el rol de cada dominio variable del Fv (del modelo D44.1-F10.6.6) en la maduración de la afinidad. La segunda estrategia consistió en la introducción de mutaciones puntuales sobre el Fv D44.1 tomando como criterio de mutación aquellos residuos que sufrieron cambios no conservativos, estudiando su comportamiento cinético, termodinámico y su estabilidad de modo tal de compararlo con el Fv F10.6.6.

Ambos Fvs producidos por *chain shuffling*, V_LD-V_HF y V_LF-V_HD, mostraron tener características de aquellas de cada uno de los Fvs D44.1 y F10.6.6. V_LD-V_HF, que posee el dominio V_H de F10.6.6, mostró tener una k_{ass} similar a la de F10.6.6 aunque levemente menor, lo que se traduce en que ambos se unen a HEL a velocidades comparables (Figura 3.1). Del mismo modo, D44.1 y V_LF-V_HD se diferencian del F10.6.6 y V_LD-V_HF y poseen menores valores de k_{ass}, aunque parecidos entre sí.

Tomando en cuenta la estabilidad, el Fv F10.6.6 y V_LD-V_HF son los Fvs más estables desde todos los enfoques experimentales. Como contraparte, V_LF-V_HD posee una estabilidad baja (aunque levemente mayor a D44.1) debido a su contenido de V_H de D44.1 y se encuentra dentro del rango inferior de estabilidad de las proteínas estudiadas en este trabajo.

Los valores de ΔCp del Fv F10.6.6 y V_LD-V_HF se encuentran en el mismo rango, mientras que los ΔCp del Fv D44.1 y V_LF-V_HD son de una magnitud negativa mayor (son más dependientes de la temperatura). Aquellos Fvs con el mismo dominio V_H tienen ΔCp similares, reaccionando de modo similar en función de la temperatura. Las entalpías del Fv F10.6.6 y V_LD-V_HF tienen menor dependencia de la temperatura, aunque las magnitudes de sus ΔCp son disímiles. Esto indica que el efecto de la estabilización de V_H no tendría influencia sobre la magnitud de la entalpía, y esta estabilización estaría disminuyendo los eventos de plegado relacionados a la unión a HEL a altas temperaturas, aumentando de este modo la dependencia de la entalpía con la temperatura.[62] Además, en la Figura 2.2.5 se observa cómo aquellos Fvs con el mismo V_H tienen pendientes de ΔHº vs. temperatura similares, mientras que la magnitud del ΔHº está dada por el contenido de V_L.

Aquellos Fvs que contienen el mismo V_L también poseen características particulares. D44.1 y V_LD-V_HF poseen k_{diss} similares con la consecuencia de una similar vida media (vida media = $\ln(2)/k_{diss}$). Las entalpías de V_LF-V_HD y de F10.6.6 son prácticamente idénticas, mientras que D44.1 y V_LD-V_HF poseen entalpías de unión en el mismo rango. Aunque el dominio V_L tiene menor frecuencia de mutación que el V_H y estos cambios se encuentran polarizados en los $CDR2_L$ y $CDR3_L$, estas pocas mutaciones en conjunto producen el incremento de la vida media del complejo y de la entalpía de unión, complementando a las características obtenidas por las mutaciones de V_H. De

este modo, la mutación del 5% de los residuos de V_L influye la vida media del complejo Fv-HEL, y estos cambios estarían influenciando la vida media de D44.1-HEL, llevándola de 2 minutos a los 45 minutos correspondientes al complejo F10.6.6-HEL.

Con esta evidencia experimental es posible hipotetizar que los dominios variables de D44.1 han madurado de modo autónomo en el sentido de la afinidad, la estabilidad y la termodinámica. Estos dominios funcionan como entidades discretas desde el punto de vista de estos parámetros y su inclusión en un Fv es suficiente para otorgar las características encontradas en los Acs salvajes. En resumen, un Fv posee una velocidad de unión a HEL, estabilidad térmica y ΔCp determinado por la V_H que contiene, y la entalpía está determinada por la V_L que posee un Fv dado.

Es preciso destacar en este momento que la maduración de cada dominio variable no es independiente. Por el contrario, existe una interacción que también es sometida a selección mediante la viabilidad de los receptores B en los centros germinales, y sin la cual no sería posible obtener clones de células B productoras de Acs funcionales. Es la interfaz V_L-V_H, la cual debe ser seleccionada positivamente. Es necesario que siga siendo viable, ya que si una interacción productiva en esta interfaz no habría Ac funcional.[37] Esto implica que una mejora sustancial sobre un dominio variable, por ejemplo en su estabilidad estructural, pero que no sea compatible en el sentido de complementariedad estructural con su par variable no será seleccionado, por el simple hecho de la imposibilidad de ensamblar un Ac con una interfaz V_L-V_H defectuosa.

Así, una mutación en un dominio variable puede mejorar ciertos aspectos de la interacción del Ac con el Ag, pero además debe ser compatible con su par de interacción dentro del Ac. La interfaz V_L-V_H debe ser permanecer inalterada o en caso de ser modificada, debe tener alguna mejora respecto de su versión anterior, para poder ser seleccionada de entre sus competidores. Como es posible observar en la Figura 3.1, existe una clara dependencia de los parámetros cinéticos con la cantidad de mutaciones y a medida que se acumulan mutaciones se ven mejoradas la afinidad y las velocidades de unión y de disociación de los distintos Fvs con HEL. Las mutaciones puntuales tuvieron diversos efectos sobre estos parámetros y mientras que en algunos casos el cambio puntual fue improductivo, en otras ocasiones se observaron mejorías significativas respecto de D44.1.

En el sistema D44.1-F10.6.6 un solo residuo que forma parte de la interfaz V_L-V_H sufrió una mutación no conservativa, la mutación G44S en V_H. Es posible observar en las estructuras cristalinas cómo la mutación G44S (Figura 2.3.2) introduce la capacidad de realizar un puente de hidrógeno en la interfaz V_L-V_H de F10.6.6 que no existe en D44.1. Contrario a la hipótesis de que el cambio G44S en V_H recae en un *hot spot*, esta mutación individual no produce ningún cambio

productivo por sí mismo en D44.1. Por el contrario, su sola presencia ocasiona un detrimento de la estabilidad global del Fv, que en consecuencia produce la disminución de la afinidad por HEL. Las mutaciones introducidas dentro de las regiones FR son más restrictivas que aquellas que recaen dentro de los CDRs[81] y la mutación G44S recae sobre el $FR2_H$. Es posible que este cambio no tenga efecto estructural en la estabilidad global de D44.1 por sí mismo y puede haber sido seleccionado para F10.6.6 en un marco de sinergia estructural producida por las demás mutaciones de los dominios V_H y V_L.

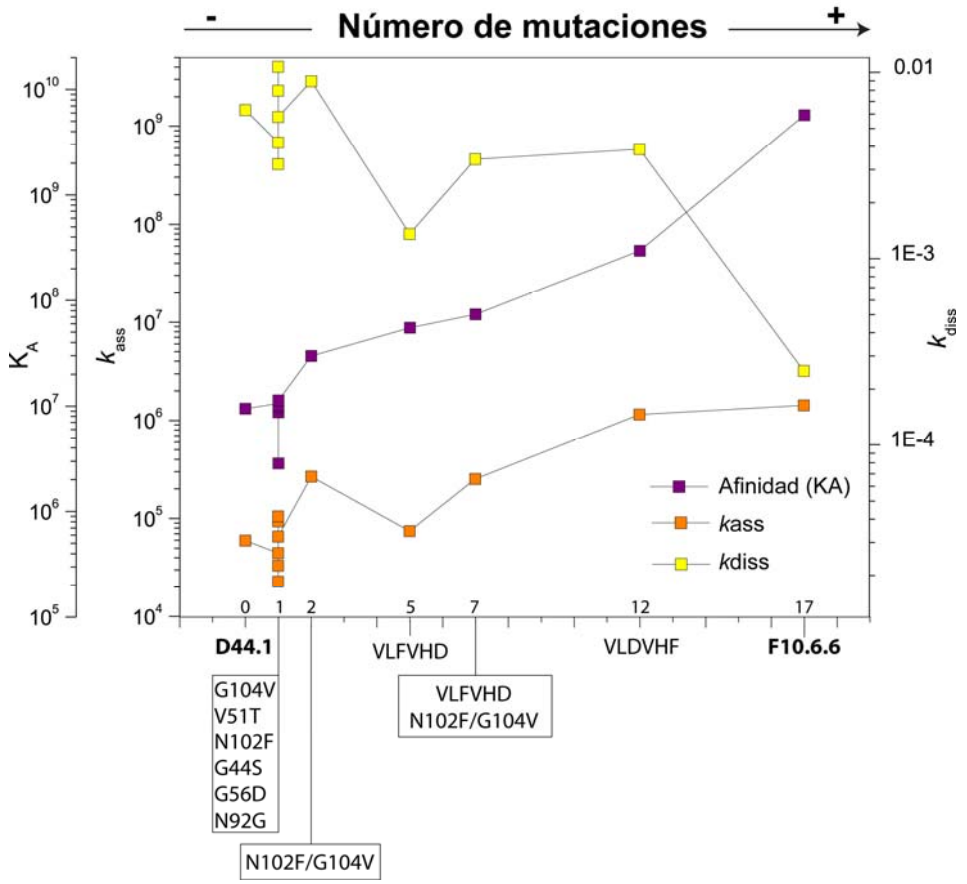


Figura 3.1 – Parámetros cinéticos en función de la frecuencia de mutación para todos los Fvs generados durante este trabajo.

Cada dominio variable cuenta con una suma de cambios que en conjunto producen la diferencia de afinidad y estabilidad entre D44.1 y F10.6.6. Al discriminar los efectos de cada una de estas mutaciones (mediante la obtención de los parámetros cinéticos y termodinámicos de mutantes puntuales) es posible observar si existe un efecto sinérgico entre las mutaciones introducidas o si cada mutación influye individualmente sobre el comportamiento global. Ya se ha

descripto el caso de la mutación G44S, donde su sola presencia es contraproducente para los parámetros de afinidad y estabilidad de D44.1.

Las mutaciones N102F y G104V tienen la característica particular de interactuar cercano al sitio de combinación con HEL además de estar situadas sobre la superficie expuesta al solvente de la interfaz V_L-V_H (Figura 2.3.3). Los ensayos de estabilidad mostraron que efectivamente, la combinación de ambas mutaciones produce un aumento en la estabilidad estructural alcanzando niveles de estabilidad comparables al Fv F10.6.6, mientras que por sí solas, las mutaciones N102F y G104V tuvieron efectos parciales. La mutante N102F se desnaturaliza con un mecanismo similar a F10.6.6, de modo cooperativo y con un estado nativo parecido, aunque la estabilidad de éste es menor y la transición se encuentra alrededor de 3ºC por debajo de la de F10.6.6. La mutante G104V, a diferencia de N102F, tiene una estabilidad baja. Tanto por CD como por fluorescencia se observaron dos transiciones entre el estado nativo y el desnaturalizado, correspondientes a estados intermediarios de plegamiento. La primera transición resultó ser muy lábil, por CD se observa a 41ºC, por DLS a 36ºC y por desnaturalización con urea no fue posible definir un estado nativo: a bajas concentraciones de urea comienza a desnaturalizarse, con una primera transición de nativo al primer intermediario en 1 M urea. Por su lado, la doble mutante 102/104 combina los efectos de ambas mutaciones individuales y mostró una estabilidad siguiendo su estructura secundaria por CD de igual magnitud que F10.6.6, mientras que por DLS se observó una transición 3ºC por sobre F10.6.6. La desnaturalización por urea mostró una transición a niveles de F10.6.6, pero con un estado nativo más lábil.

Además, no sólo se observó el salto en la estabilidad estructural del Fv D44.1 N102F/G104V, sino que además existe un aumento de cuatro veces de la magnitud de la k_{ass} de la doble mutante respecto del D44.1. La variante V_LF-V_HD 102/104 tiene la particularidad de contar con un V_L maduro y las dos mutaciones estabilizadoras en V_H. Este Fv híbrido tiene parámetros de estabilidad similares a F10.6.6, aunque su estado nativo fue menos estable y más dependiente de la concentración de urea.[82] A diferencia de F10.6.6, donde el estado nativo es estable y fácil de definir, el V_LF-V_HD 102/104 no posee dichas características debido a que le "faltan" el resto de los cambios en V_H que terminan de optimizar al Fv. Además, V_LF-V_HD 102/104 tiene una k_{ass} mayor que V_LF-V_HD, sugiriendo que la estabilidad está relacionada con la maduración de la afinidad en el sistema D44.1-F10.6.6.

Es así como las mutaciones N102F y G104V, las cuales se encuentran en el $CDR3_H$, son necesarias para la estabilización del F10.6.6, modulando la interfaz V_L-V_H en la cercanía al sitio de combinación a HEL. Estas mutaciones además tienen un efecto sobre la afinidad, aumentando la efectividad de la unión.

Se generaron además tres mutantes puntuales sobre el Fv D44.1 en residuos con influencia sobre la interfaz Ag-Ac, V_L-V51T, V_L-N92G y V_H-G56D.

Desde el punto de vista de la afinidad, estas mutaciones no produjeron que el Fv mutado en cualquiera de estos tres residuos variase significativamente su afinidad respecto de D44.1. Por el contrario, la introducción de la mutación G56D (sobre el $CDR2_H$) deteriora la estabilidad y todos los parámetros cinéticos y termodinámicos, producto de una desestabilización estructural general sobre el Fv. Es de todas las variantes de Fvs estudiadas en este trabajo la de menor estabilidad y afinidad.

La mutante V51T tiene una afinidad levemente superior a D44.1 y aunque su estabilidad es levemente superior, permanece en el rango de D44.1. Es posible que la introducción de la capacidad de formar puentes de hidrógeno con el $FR3_L$ ayude a estabilizar la molécula al ser complementada por los demás cambios. Desde el punto de vista termodinámico, su entalpía se encuentra 3 kcal/mol por sobre D44.1. Nuevamente, esta variación puede tener su origen en la capacidad de formar nuevos puentes de hidrógeno de la treonina introducida. Aun así, su afinidad es similar a D44.1, aunque paga un costo energético que se traduce en una mayor compensación entrópico-entálpica.

La mutación N92G sobre V_L de D44.1 es la única que recae sobre el $CDR3_L$. El cambio de una asparragina por una glicina es un cambio drástico desde el punto de vista estructural, ya que este cambio le otorga mayor número de grados de libertad al $CDR3_L$. Con la introducción de una glicina en un *loop*, las posibles conformaciones aumentan considerablemente[83] de modo que el loop entero puede moverse con menos restricciones y reacomodarse para unir a HEL. La mutación N92G tiene una entalpía prácticamente idéntica a F10.6.6 y podría deberse a los eventos que suceden debido a esta mutación. Ya que la afinidad de esta mutante no se vio mejorada, la compensación entrópico-entálpica de N92G es la mayor observada dentro de este sistema.

Esta compensación estaría indicando que esta sola mutación sirve para alcanzar los niveles de entalpía de F10.6.6. Como D44.1 V_L-N92G no está optimizado con las restantes 16 mutaciones, resulta imposible lograr la estabilidad y la afinidad del Ac maduro.

La mutación N92G otorga una mayor flexibilidad conformacional permitiendo que el $CDR3_L$ se acomode para unir a HEL, y esto se traduce en una entalpía similar a D44.1.

3.3 Discusión general

Los Acs D44.1 y F106.6 tienen diferencias marcadas en afinidad, estabilidad y termodinámica de formación del complejo que son causadas por las 17 mutaciones de diferencia entre ambos Acs. Si bien cada dominio variable otorga características particulares al Fv, la interacción entre V_L y V_H es crucial para la unión a HEL. La maduración de la afinidad produjo mejoras sobre esta interfaz

además de la complementariedad del sitio de combinación con HEL. Al probar el efecto de mutaciones puntuales sobre D44.1 en algunos casos se obtuvieron mejoras parciales, es decir, se observaron mejoras notables en la estabilidad (por ejemplo, la doble mutación 102/104) pero resultados parciales sobre la afinidad y termodinámica. En otros casos fue posible observar un aumento de la entalpía hasta llegar a valores equivalentes a F10.6.6, como en el caso de la mutación N92G, aunque dicha mutación no tuvo efecto significativo sobre la afinidad y la estabilidad. Finalmente, en algunos casos las mutaciones introducidas no produjeron ningún beneficio de tipo alguno, si no que por el contrario, dichos cambios desestabilizaron la molécula disminuyendo su afinidad y estabilidad.

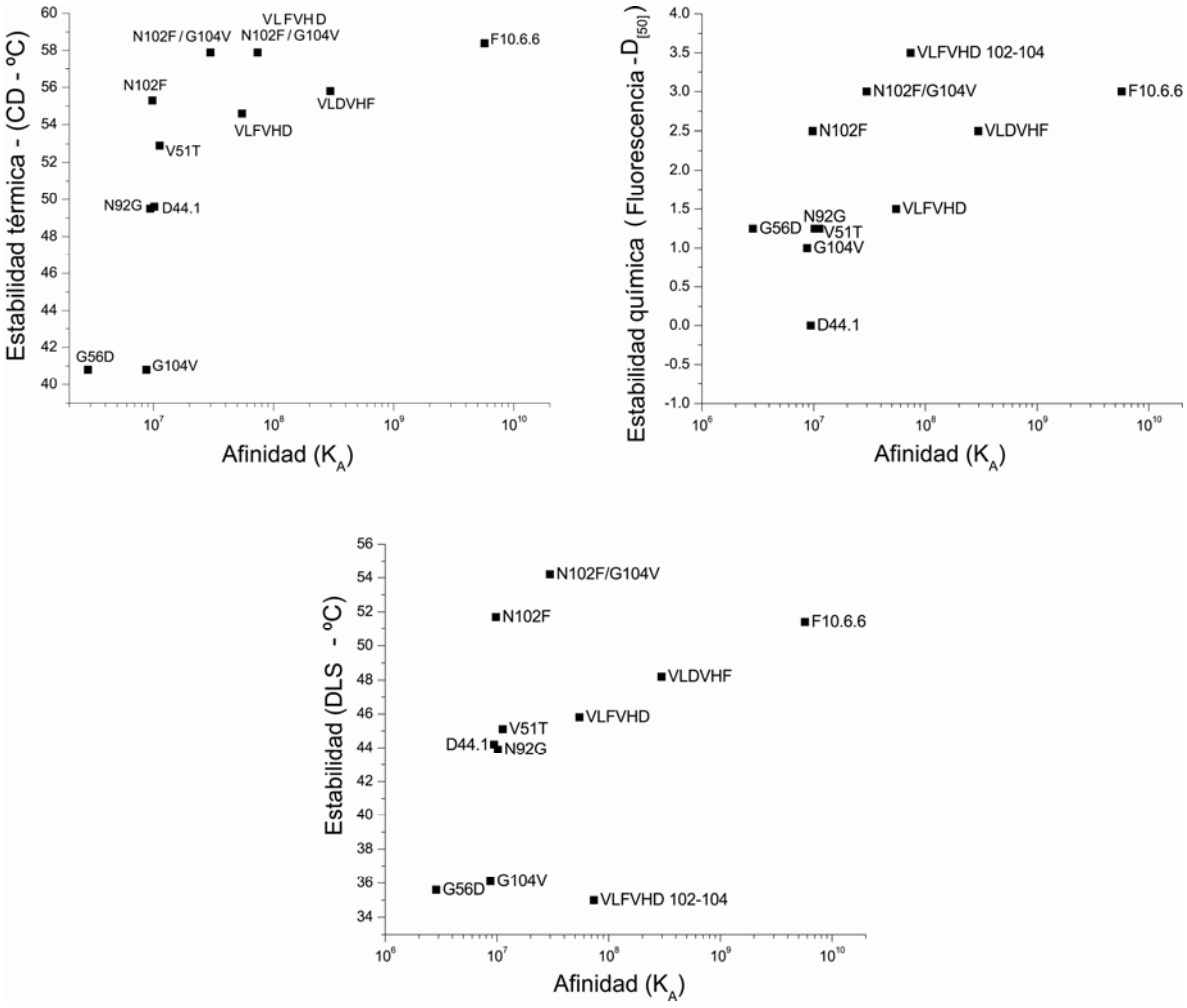


Figura 3.2 – Estabilidad en función de la afinidad de todas los Fvs generados. En los casos de Fvs con más de una transición se graficó la de más baja estabilidad.

La maduración de la afinidad introdujo mutaciones en F10.6.6, de modo tal que cada una aporta su porción de beneficios que le permitió a F10.6.6 ser seleccionado de entre sus

competidores. Algunas mutaciones produjeron un mayor efecto que otras, pero cada uno de ellas tiene un sentido estructural para mejorar la estabilidad y plasticidad estructural del Ac para así lograr una unión al Ag más eficiente.

Al observar como varía la estabilidad en función de la afinidad (Figura 3.2) resulta clara la relación que existe entre ambos parámetros: a medida que aumenta la afinidad es posible encontrar Fvs de mayor estabilidad. La mayor población se encuentra en el rango de afinidad de 10^7, debido a que el efecto de una mutación individual no tuvo efectos significativos en la afinidad, aunque sí afectó la estabilidad. No se observaron Fvs con alta afinidad y baja estabilidad (con la excepción de V_LF-V_HD 102/104, el cual mostró dos transiciones en los experimentos de DLS), aunque sí fue posible encontrar Fvs con baja afinidad y alta estabilidad (N102F).

Es sistema D44.1-F10.6.6 es un sistema de alta complejidad, donde cada una de las variables afecta de modo individual y colectivo al comportamiento colectivo. Fue posible dilucidar una relación entre la cantidad de mutaciones, la afinidad y la estabilidad y discriminar cuales dominios V_L o V_H están involucrados. El enfoque de una mutación un efecto individual mostró ser reduccionista, salvo en casos como el de la mutaciones N102F y G104V, lo que confirma la complejidad de este sistema, indicando la existencia de redes complejas de interacción proteica.

Conclusión

Conclusión

Según lo planteado al inicio, el objetivo general de este trabajo de tesis fue lograr una disección detallada de las bases estructurales que gobiernan el proceso de la maduración de la afinidad de los Acs F10.6.6 y D44.1 hacia HEL, los cuales son diferentes tanto en su estructura como es su afinidad y estabilidad.

En primer lugar se logró validar el uso de fragmentos Fv para el estudio de las características estructurales del dominio Fab en la maduración de la afinidad desde el punto de vista cinético y termodinámico, mediante la comparación parámetros de reacción de los Fabs y Fvs de ambos Acs.

Se estableció que el dominio constante C_L-C_H1 es importante en la estabilización del dominio Fv, siendo más notoria esta estabilización en D44.1. El complejo Fab D44.1-HEL es de una estabilidad similar al complejo Fab F10.6.6 gracias a la estabilización del dominio constante, mientras que la falta de este dominio produce cambios drásticos en la estabilidad de los Fvs.

Las mutaciones del dominio V_H tienen un predominante efecto estabilizador en la estructura del Fv. Adicionalmente, estas mutaciones tienen un efecto significativo sobre la velocidad de unión a HEL y consecuentemente en la afinidad. En resumen, un Fv de este sistema posee una velocidad de unión a HEL, estabilidad térmica y ΔCp determinado por factores contenidos en su dominio V_H, mientras que la entalpía está determinada por factores contenidos en el V_L de un Fv.

Con el objetivo de conocer los residuos involucrados en otorgar la estabilidad a F10.6.6 se generaron varias mutaciones puntuales sobre el Fv D44.1. Las mutaciones N102F y G104V, las cuales recaen sobre residuos que se encuentran en el $CDR3_H$, son necesarias para estabilizar al D44.1. Ambos cambios aumentan los parámetros de estabilidad de D44.1 a niveles cercanos a F10.6.6. Esta dupla de residuos modula la interfaz V_L-V_H en la cercanía al sitio de combinación a HEL aumentando la estabilidad estructural. Además, estas mutaciones tienen efecto sobre la afinidad, incrementando la efectividad de la unión y relacionando el aumento de la afinidad con la estabilidad.

Las mutaciones puntuales G44S, G56D produjeron una desestabilización general del D44.1. Estas mutantes actuaron en detrimento de la afinidad y de la estabilidad del Fv. Las mismas pueden haber sido seleccionadas por la maduración de la afinidad en un contexto de sinergia. Esto significa que el efecto de estas mutaciones individuales no producen mejoras notorias si los factores adicionales para producir dicha sinergia no se encuentran presentes.

Por otra parte, la mayor libertad conformacional introducida en el $CDR3_L$ de D44.1 gracias a la incorporación de una glicina (N92G) otorga una mayor flexibilidad, permitiendo que dicho $CDR3_L$ se acomode para unir a HEL. Esta capacidad de formar nuevos contactos con HEL introducida por la

mutación N92G podría producir el incremento en los valores de entalpía observados, llegando a una entalpía similar a F10.6.6. La mutación V51T incorpora la capacidad de formar un puente de hidrógeno en el $CDR2_L$, aumentando levemente su afinidad por HEL, que, aunque superior a D44.1, no llega a niveles cercanos a F10.6.6.

Como conclusión general, los resultados obtenidos con este modelo experimental sugieren que el proceso de maduración de la afinidad de Acs anti-proteína afecta la forma del sitio de combinación con el Ag. Este proceso también afecta el contenido de estructura secundaria del dominio variable, fortalece la interacción V_L-V_H y consecuentemente incrementa la plasticidad y la estabilidad del dominio Fv. Al mismo tiempo, todos estos cambios conformacionales actúan de modo sinérgico para mejorar la unión a HEL.

Materiales y Métodos

Materiales y métodos

5.1 Cultivo de hibridomas

Los hibridomas D44.1 y F10.6.6 fueron obtenidos previo al período correspondiente a esta tesis mediante el método descrito por Milstein.[45; 84] El hibridoma D44.1 fue obtenido por el grupo de Roberto Poljak en el año 1994[39] luego de un plan de inmunización de dos semanas. Más tarde, el mismo grupo obtuvo el hibridoma F10.6.6, producto de un plan de inmunización prolongado de 14 semanas.[29] Dichos hibridomas están disponibles en el laboratorio y a partir de viales conservados en nitrógeno líquido se obtuvieron clones secretores de inmunoglobulinas de isotipo G (IgG), tanto D44.1 como F10.6.6, mediante cultivos en botellas en medio RPMI (Gibco, USA) con suero fetal bovino al 5% y glutamina al 1% adicionada como fuente de nitrógeno y un ambiente de CO_2 al 5%. Estas células pueden ser utilizadas para producción de Acs (mediante inoculación de las células en ratones) así como también para extracción de ARN total y mensajero.

Para producir Acs monoclonales, dichas células fueron utilizadas como inóculo. Aproximadamente $2x10^6$ células de hibridoma se inyectaron en el peritoneo de ratones Balb/C previamente sensibilizados con Pristane (alcano que genera una mejor predisposición a la instalación de tumores). Este inóculo genera tumores en el ratón que secretan IgG de origen monoclonal junto con otras proteínas en un humor conocido como líquido ascítico. A partir de tres días posteriores a la inoculación se constató la presencia de tumores en dichos ratones y se procedió a la extracción periódica de líquido ascítico del peritoneo de los ratones para la posterior purificación de IgG.

5.2 Purificación de IgG

Se utilizó el procedimiento de purificación de IgG descripto en Goldbaum *et al.*[29] El líquido ascítico previamente obtenido fue centrifugado con el fin de remover células y otros componentes no proteicos de la muestra. El sobrenadante obtenido se precipitó por goteo sobre hielo con una solución saturada al 50% de $(NH_4)_2SO_4$ por un período de dos horas. Luego se centrifugó la muestra descartando el sobrenadante y conservando el *pellet*, donde se encuentran como componentes mayoritarios el Ac monoclonal correspondiente y transferrina. La muestra se resuspendió con agua en la cantidad mínima necesaria para obtener las proteínas solubles. Luego se dializó durante la noche (*overnight*) contra un buffer fosfato (Na_3PO_4) 40 mM pH=8.0. Se construyó una columna de intercambio iónico débil DEAE (Sigma, EEUU) de 20 ml, la cual debió ser

activada con dos volúmenes de columna de Na_3PO_4 1M pH=8.0, para luego ser estabilizada con varios volúmenes de Na_3PO_4 40 mM pH=8.0. La muestra con la IgG de interés (dializada overnight) se sembró en la columna DEAE y se recogió la proteína eluida en los primeros volúmenes, fracción donde se encuentra la IgG en mayor proporción. El contenido de IgG del eluido se corroboró por electroforesis en gel de poliacrilamida con detergentes (SDS-PAGE). Dicho eluido se concentró hasta una concentración de 10 mg/ml mediante filtración en Centricon YM-10 (Millipore, EEUU). La IgG concentrada se conservó en heladera para su posterior uso.

5.3 Obtención de fragmentos Fab

Para obtener los fragmentos Fab se procedió a digerir con papaína la proteína IgG previamente purificada (el procedimiento es indistinto tanto para IgG D44.1 como para IgG F10.6.6). Se testearon varias condiciones para obtener la condición ideal de digestión, variando tanto la relación IgG/papaína como el tiempo de reacción:

- Relación IgG/papaína 100:1, 1 hora a 37°C
- Relación IgG/papaína 100:1, 2 horas a 37°C
- Relación IgG/papaína 50:1, 1 hora a 37°C
- Relación IgG/papaína 50:1, 2 horas a 37°C

El buffer de reacción utilizado fue Na_3PO_4 40 mM pH=8.0, EDTA 7 mM, β-mercaptoetanol 7 mM. La condición ideal varió entre muestras, mientras que para D44.1 fue de una relación 100:1 durante dos horas, para F10.6.6 fue de 50:1 durante dos horas. El total de la IgG se digirió en la condición ideal previamente testeada; la digestión se detuvo con iodoacetamida 50 mM por una hora en oscuridad a temperatura ambiente. La mezcla de reacción previamente digerida se dializó overnight contra Na_3PO_4 17 mM pH=8.0. Se preparó una columna DEAE en condiciones similares a las mencionadas anteriormente, se activo con Na_3PO_4 1 M pH=8.0 para luego ser estabilizada con Na_3PO_4 17 mM pH=8.0. Se conservaron las fracciones eluidas en los primeros volúmenes, correspondientes al fragmento Fab. Estas fracciones fueron concentradas por filtrado mediante Centricon YM-10 para luego ser purificadas mediante filtración en gel utilizando una columna Superdex S-75 (General Electric (GE) Healthcare Life Sciences, USA) con buffer PBS 0.5 M NaCl. La fracción correspondiente al fragmento Fab puro fue corroborada mediante SDS-PAGE. Finalmente se concentró el fragmento Fab puro y se guardó a -20° C para su posterior uso.

5.4 Cristalización, colección de datos, resolución y refinamiento de las estructuras Fab F10.6.6

Las estructuras presentadas en este trabajo de Tesis correspondientes a Fab D44.1 libre (código PDB 1MLB) y Fab D44.1-HEL (código PDB 1MLC) fueron previamente resueltas por el grupo de Roberto Poljak en USA. La estructura correspondiente al complejo Fab F10.6.6-HEL fue resuelta con anterioridad a esta Tesis, por nuestro laboratorio en colaboración con Bradford Braden.[40] La estructura del fragmento Fab F10.6.6 libre fue resuelta en nuestro laboratorio en colaboración con Bradford Braden,[41] aunque no formó parte del trabajo de esta tesis.

Fab F10.6.6-HEL

Esta estructura fue resuelta previamente al período correspondiente a esta Tesis. Se cristalizó el Fab F10.6.6 junto con HEL por el método de difusión de vapor por gota colgante. La concentración del complejo Fab F10.6.6-HEL fue de 10 mg/ml en un buffer 5 mM Tris pH=7.5 y fue cristalizado en una solución conteniendo 28% polietilenglicol 1000 0.2 M $CaCl_2$ AcNa 0.1 M pH=4.6. Los cristales crecieron en 24 horas y crecieron hasta un tamaño máximo de 0.4 x 0.05 x 0.05 mm en cuatro días. Se colectaron datos hasta 2.0 Å a 100 K en un detector Raxis IV (Rigaku, MSC, USA) utilizando una fuente de rayos X Rigaku microfocus y un sistema de espejos de foco confocal Osmic. Un total de 111,920 reflexiones fueron reducidas a 60,488 reflexiones únicas. El grupo espacial de dicho cristal fue *P*1, con parámetros de celda a = 44.66, b = 73.75, c = 83.78 y α = 66.59, β = 74.74 y γ = 85.44. Los datos fueron integrados y escalados, con una completitud de 95% a una resolución de 2.0 Å. La estructura fue resuelta mediante reemplazo molecular (*molecular replacement*) utilizando el programa CNS[85] recurriendo al complejo previamente resuelto Fab D44.1-HEL como modelo para realizar el reemplazo.[39] Se encontraron dos complejos en la unidad asimétrica y el modelo se refinó por medio de templado simulado (*simulated annealing*) utilizando CNS. Luego de 10 ciclos de refinado, el valor de R cayó a 0.204 (con un R_{free} = 0.242) para los datos a 2.0 Å de resolución. La desviación cuadrática media (*rmsd*) para el modelo final fue 0.006 Å para las distancias de enlaces atómicos y 1.395° para los ángulos de enlaces. En la Tabla 5.3 de detallan con detalle los parámetros de resolución para esta estructura. Esta estructura se encuentra online en el Protein Data Bank (www.pdb.org) bajo el código 1P2C.

Fab F10.6.6 libre

El fragmento libre Fab F10.6.6 fue cristalizado en el grupo espacial *C*2 por el método de difusión de vapor por gota colgante utilizando 0.1 M AcNa pH=4.7 24% polietilenglicol 1000 0.2 M CaCl2 como buffer de cristalización. Se obtuvieron cristales con forma de prisma de 0.30 x 0.05 x 0.05 mm luego de varias semanas. Estos cristales fueron embebidos en el licor madre de cristalización con el

agregado de 14% de glicerol como agente crioprotector necesario para la colecta de datos a 100 K. El juego de datos utilizado para la resolución de esta estructura fue colectado en la línea de cristalografía de proteínas D03B-MX1 en las facilidades del Laboratorio Nacional de Luz Sincrotrón (Campinas, Sao Paulo, Brazil) con un detector MarCCD 165 mm con rayos X de λ=1.431 Å. Se tomaron un total de 380 fotografías colectadas con una oscilación de 1°, resultando en un set de datos altamente redundante a una resolución de 2.0 Å. Los datos fueron procesados con la suite de programas HKL2000[86] y las fases correspondientes fueron asignadas por molecular replacement usando el programa AmoRe[87] utilizando como modelo la estructura del Fab F10.6.6-HEL. Se encontraron dos moléculas en la unidad asimétrica y el refinamiento del modelo se llevó a cabo con CNS por medio de templado simulado (*simulated annealing*). Se logró un modelo final con un R=0.196 y un R_{free}=0.233 con buena geometría. En la Tabla 5.1 de detallan con detalle los parámetros de resolución para esta estructura. Esta estructura se encuentra depositada en el Protein Data Bank con el código 2Q76.

Colecta de datos	**Fab F10.6.6-HEL (PDB id: 1P2C)**	**Fab F10.6.6 libre (PDB id: 2Q76)**
Número de frames	360	380
Oscilación (deg.)	1	1
Longitud de onda (Å)	1.542	1.431
Indexado y escaleo		
Parámetros de celda (Å)		
a, b, c	44.66, 73.75, 83.78	108.76, 80.25, 91.50
Ángulos de celda (deg.)		
α, β, γ	66.59, 74.74, 85.44	90, 91.50, 90
Grupo espacial	*P*1	*C*2
Límite de resolución (Å)	2.00	2.00
Total de reflexiones únicas	60488	50300
Multiplicidad[a]	1.85	8.1 (8.2)
I/σ	N/D	9.8 (3.3)
R_{merge} (%)[b]	0.013	6.9 (19.5)
Completitud (%)	95.0	96.0 (92.0)
Moléculas / unidad asimétrica	2	2
Contenida de solvente (%)	38.5	41.0

Coeficiente de Matthews(Å^3/Da)	2.0	2.1
Refinamiento		
Límite de resolución (Å)	20.0-2.00	20.0-2.00
Factor *R*	0.204	0.196
Factor R_{free}	0.242	0.233
Non hydrogen protein atoms	8463	6486
Moléculas de solvente	887	518
Rmsd de enlaces (Å)	0.006	0.006
Rmsd de ángulos (deg.)	1.39	1.41
Factor *B* (promedio, Å^2)	21.6	22.0
Gráfico de Ramachandran		
Más favorecidos (%)	98.0	88.7
Permitidos adicionales (%)	1.4	10.2
Generosamente permitidos (%)	0.6	0.7
Rechazados (%)	-	0.4

Tabla 5.1 - Parámetros de colecta de datos y refinamiento para las estructuras 1P2C y 2Q76.

5.5 Extracción de ARN total y obtención de cADN de fragmentos variables

A partir de células de hibridoma cultivadas hasta confluencia (en las condiciones que se indican en la sección 5.1) en botellas de 200 ml se procedió a la obtención de ARN total de dichas células, para luego obtener el material genético que codifica para el fragmento variable, tanto de la cadena pesada como de la liviana. Para ello se levantaron las células de la botella y se centrifugaron a baja velocidad para evitar su ruptura. Se procedió al recuento de células en una cámara de Neubauer y se utilizó 1 ml de Trizol (Invitrogen, USA) por cada 5x10^6 células como reactivo para extraer el ARN total. La muestra de células con Trizol se homogeneizó, se incubó durante cinco minutos a temperatura ambiente para luego agregar 0.2 ml de cloroformo por cada ml de Trizol utilizado. La muestra se agitó vigorosamente durante 15 segundos, luego se incubó en hielo durante tres minutos para ser centrifugada a 14000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Se conservó la fase acuosa, la cual contiene el ARN, y en un tubo limpio dicho ARN fue precipitado a -80°C *overnight* con 0.5 ml de isopropanol por cada ml de Trizol. La muestra fue centrifugada a 14000 rpm por 10 minutos a

4°C. Luego el sobrenadante fue descartado y el pellet se lavó con etanol 75%. Se dejó secar el etanol 75% para luego resuspender el pellet libre de alcoholes en agua libre de ARNasas. Finalmente, el ARN total resuspendido en agua fue cuantificado por absorción UV, donde una unidad de absorción es equivalente a 40 μg/ml de ARN, obteniendo una relación de absorbancia 260/280 nm mayor a 1.5. La síntesis de la primera cadena del ADN copia (cADN) de todos los mensajeros se llevó a cabo mediante RT-PCR[88] (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*). Se utilizó un oligonucleótido de politimidina (poliT) como primer no específico; éste se aparea en el extremo 3' donde las moléculas de los ARN mensajeros contienen repeticiones de adenosina conocidas como poliA. El oligonucleótido poliT se aparea al poliA y este complejo es reconocido por la enzima transcriptasa reversa, una ADN-polimerasa dependiente de ARN, transcribiendo la cadena complementaria al ARN mensajero. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo utilizando como molde 5 μg de ARN total en 14 μl de agua, los cuales fueron desnaturalizados a 70°C durante 10 minutos, para luego ser incubados en una mezcla de reacción conteniendo 1 μl de transcriptasa reversa AMV (Promega, USA), 5 μl de buffer de reacción AMV 10x, 1 μl de RNAsin (Promega, USA) por 10 minutos a temperatura ambiente, luego una hora a 42°C y finalmente 15 minutos a 70°C. Para la obtención de los fragmentos variables de las cadenas pesadas (V_H) y livianas (V_L) a partir de la síntesis de la primera cadena de cADN se utilizó un juego de primers previamente diseñados por el Dr. Orlando Burrone. Estos primers fueron diseñados sobre las secuencias conocidas de los fragmentos variables de las inmunoglobulinas conocidas de ratón. Se realizó una combinatoria de los primers del extremo 5' junto con otra correspondiente al extremo 3' para dar un total de 12 condiciones de reacción de PCR distintas. Dichas reacciones de PCR fueron separadas en un gel de agarosa al 1% y se observó la presencia de fragmentos de entre 300 y 400 pares de bases (bp); estos fragmentos de ADN fueron clonados en el vector pGemT-easy (Promega, USA) para su secuenciación por el método de Sanger.[89]

5.6 Clonado y expresión heteróloga de fragmentos Fv

Las secuencias de ADN de los fragmentos variables de D44.1 y F10.6.6 se conocían previamente[29] y se utilizaron para comparar con el resultado de la secuenciación de los fragmentos de PCR[88] (*polymerase chain reaction*) entre 300 y 400 bp obtenidos con los primers degenerados diseñados por Burrone a partir de RNA total extraído de cultivo de ambos hibridomas. Aquellas condiciones correspondientes a la secuencia de V_H y V_L de D44.1 y F10.6.6 fueron aisladas y se utilizaron como molde para una nueva PCR, esta vez con primers específicamente diseñados para clonar los fragmentos V_L y V_H de cada Ac por separado en un vector de expresión heteróloga, pET22b(+) (Novagen, USA).

Se utilizaron los siguientes oligonucleótidos como primers de PCR para obtener los fragmentos variables de F10.6.6 y de D44.1:

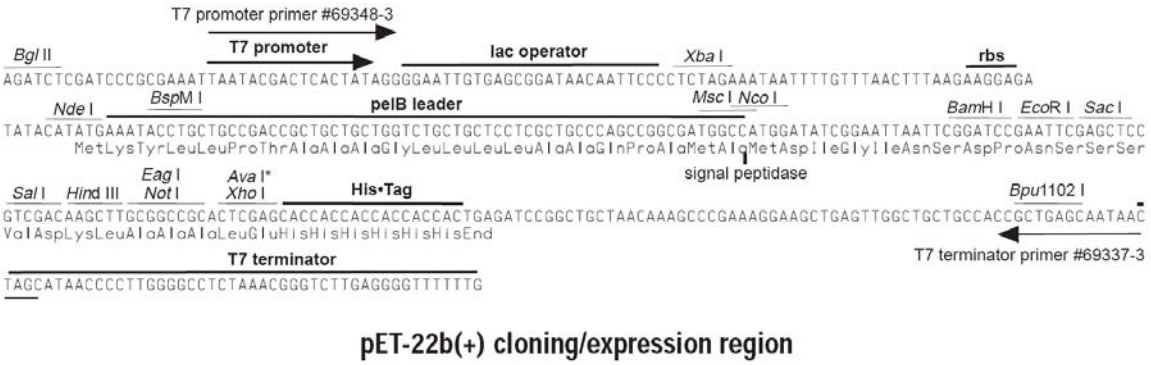
V_L F10.6.6 - NdeI y HindIII
Primer 5' (*Nde*I): CAT ATG GAC ATT GAG CTG ACT CAG TCT CC
Primer 3' (*Hin*dIII): AAG CTT TTA TTA ACG TTT TGA GTC CAG CTT G

V_H F10.6.6 - NdeI y BamHI
Primer 5' (*Nde*I): CAT ATG GCC GAG GTG CAG CTG GAG CAG TCA G
Primer 3' (*Bam*HI): GGA TCC TTA TTA TGA GGA GAC TGT GAG AGT GG

V_L D44.1 - NdeI y XhoI
Primer 5' (*Nde*I): CAT ATG GCC GAC ATC GAG CTC AC
Primer 3' (*Xho*I): CTC GAG TTA TTA CCG TTT GAT CT

V_H D44.1 - NdeI y XhoI
Primer 5' (*Nde*I): CAT ATG GCC CAG GTG CAG CTG C
Primer 3' (*Xho*I): CTC GAG TTA TTA TGA GGA GAC GGT GA

Estos primers fueron diseñados (como se indica previamente a la secuencia) con sitios corte de enzimas de restricción, de modo tal que el producto de PCR obtenido con estos primers sea ligado en el vector de expresión pET22b(+) de modo tal que no sea exportado al periplasma de la bacteria (quitando del extremo N-terminal el péptido de señal de exportación a periplasma *pel*B) ni modificado con una etiqueta de histidinas (His-tag, correspondiente al extremo C-terminal), ambas características del vector de expresión utilizado. Para ello, en todos los casos se utilizó como enzima de restricción para ligar en el extremo 5' *Nde*I y *Xho*I (para V_L y V_H D44.1), *Bam*HI (para V_H F10.6.6) y *Hin*dIII (para V_L F10.6.6) para ligar en el extremo 3'. De este modo al cortar el plásmido con ambas enzimas se quitan los elementos pelB e His-tag, para obtener una proteína en el citoplasma de la bacteria sin modificaciones. En la Figura 5.1 se detalla el sitio múltiple de clonado (MCS) de pET22b(+).



pET-22b(+) cloning/expression region

Figura 5.1 - MCS de pET22b(+).

En la Figura 5.2 se esquematiza el diseño experimental para el clonado de los fragmentos variables. Este diseño es equivalente tanto para V_L como para V_H de D44.1 y F10.6.6.

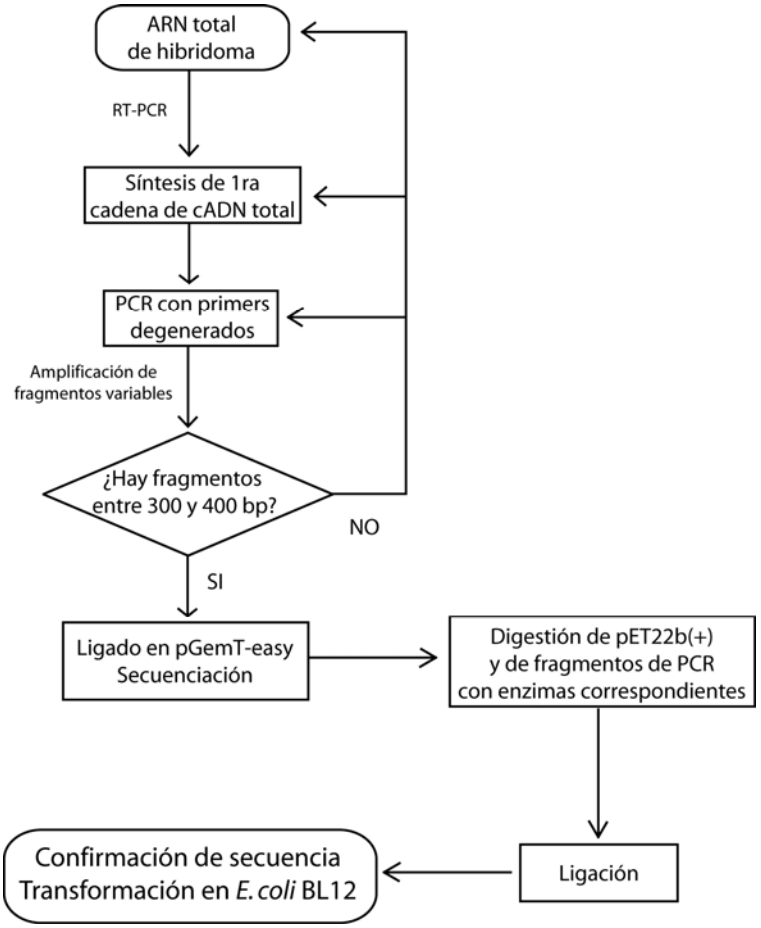


Figura 5.2 – Diseño experimental del clonado de los fragmentos variables.

La cepa utilizada para la producción de proteínas fue *Escherichia coli* BL21(DE3) (F^- ompT gal dcm lon $hsdS_B(r_B^- m_B^-)$ λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])). Esta cepa tiene como ventaja para la expresión de proteínas una baja actividad de proteasas y la inducción de la síntesis de proteína mediada por el promotor de la ARN polimerasa del fago T7 por isopropil-β-D-tio-galactósido (IPTG). Para transformar *E. coli* BL21(DE3) con los plásmidos con los insertos de interés se utilizó el protocolo de shock térmico a 42ºC.[88] El producto fue plaqueado en cajas de Petri con medio LB/agar con 0.1 mg/ml de ampicilina. Las colonias fueron sometidas a pruebas de expresión del fragmento variable en cultivos de 5 ml de LB-ampicilina 0.1 g/l. Dichos cultivos se crecieron a 37°C hasta llegar a una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) cercana a 0.8 y luego fueron inducidos con IPTG durante cuatro horas. Como control de expresión se sembró en un SDS-PAGE al 15% una cantidad de células sin inducir y en la calle vecina la misma cantidad de células inducidas por IPTG. Como se puede observar en la Figura 5.3, los pesos moleculares observados de los fragmentos variables fueron de alrededor de 15 kDa.

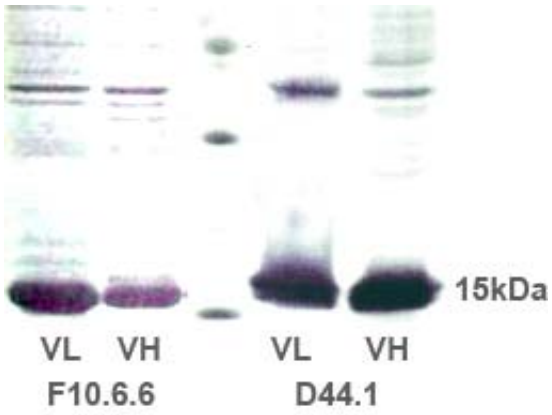


Figura 5.3 – Dominios variables de D44.1 y F10.6.6.

Los cultivos a mayor escala fueron hechos en erlenmeyers de 2 l conteniendo 0.5 l de LB con 0.1 g/l de ampicilina, utilizando como inóculo un precultivo de 5 ml de LB-ampicilina 0.1 g/l crecido overnight. El cultivo se creció hasta DO_{600}=0.8 y luego fue inducido con IPTG por un período de cuatro horas. Luego las células fueron cosechadas en botellas de 250 ml para su centrifugación por un período de 10 minutos a 4000 *g*. El sobrenadante se descartó y las células fueron resuspendidas en 50 ml de buffer Tris·HCl 50 mM pH=8.0 EDTA 5 mM pH=8.0 Triton 1% para ser disrumpidas por sonicación por un período de cinco minutos, con intervalos cada 20 segundos. La solución resultante se centrifugó a 25000 *g* a 4°C, se descartó el sobrenadante y una muestra del pellet se corrió en un SDS-PAGE 15% para corroborar presencia de la proteína en cuestión. Este proceso es similar para todas las variantes de V_L y V_H de D44.1 y F10.6.6, ya sean las variantes salvajes como las mutadas. Cada variante fue producida en un cultivo independiente.

5.7 Purificación de fragmentos Fv

Dada la condición de heterodímeros de los fragmentos variables de las inmunoglobulinas, cada cadena es insoluble en ausencia de su cadena complementaria, por este motivo estas proteínas se expresan como cuerpos de inclusión en el citoplasma de *Escherichia coli* BL21(DE3). Los cuerpos de inclusión son agregados insolubles de proteínas y pueden ser separados por centrifugación del resto de los componentes bacterianos debido a su capacidad de permanecer insolubles. A los efectos de obtener Fvs funcionales, se diseño un protocolo de replegado (*refolding*) de los fragmentos Fv a partir de los fragmentos variables insolubles. El *pellet* bacteriano correspondiente a 0.5 l de cultivo fue sonicado y el total de la fracción insoluble resultante se solubilizó en 40 ml de urea 8 M. Esto permite cuantificar por SDS-PAGE el contenido real de proteína de cada muestra para luego mezclar las cadenas complementarias y llevar a cabo el refolding. Una vez cuantificada la cantidad de proteína expresada se procedió a mezclar las cadenas complementarias para obtener un Fv funcional en una relación molar de 1:1. Esta mezcla se sometió a dos pasos de diálisis contra 2 l de buffer PBS por un período de dos horas y un tercer paso de diálisis similar *overnight*. La muestra de diálisis fue centrifugada y se conservó la fracción soluble, en esta fracción se encuentran V_L y V_H combinadas en forma de Fv soluble. Se utilizó una columna de afinidad HEL-Sepharose para obtener selectivamente los Fvs funcionales. Esta columna fue derivatizada con HEL en el laboratorio a partir de DEAE-Sepharose 4B activada con BrCN (Amersham, USA). Los fragmentos Fv replegados fueron incubados overnight con la resina HEL-Sepharose y luego fueron empaquetados en una columna de elución por gravedad. Se decantó la resina para eliminar aquellas proteínas que no se pegaron a la columna y la misma fue lavada con dos volúmenes de PBS 0.5 M NaCL. Para eluir los Fvs recombinantes activos se utilizó una solución de dietilamina 50 mM (Sigma, USA) como disociante por pH. Las fracciones de 5 ml fueron colectadas sobre 1 ml de Tris·HCl 0.5 M pH=8 para neutralizar el alto pH de la solución de dietilamina. Las fracciones enriquecidas en Fvs se eligieron mediante SDS-PAGE y se dializaron contra PBS, para ser concentradas con Centricon YM-10 y subsecuentemente purificadas a homogeneidad con una columna de filtración en gel Superdex S-75. Una vez obtenido el pico mayoritario correspondiente a los Fvs, se volvió a concentrar para ser guardadas a -20°C para su posterior uso.

5.8 Generación de Fvs quiméricos por intercambio de cadenas

Además de los Fvs salvajes, se obtuvieron en este trabajo Fvs híbridos mediante el intercambio de cadenas. Debido a la similitud estructural y de secuencias de estos Acs fue posible el *refolding* de los fragmentos variables combinando dichas cadenas como se indica en la Tabla 5.2:

Fv	**V_L**	**V_H**
D44.1	D44.1	D44.1
F10.6.6	F10.6.6	F10.6.6
V_LD-V_HF	D44.1	F10.6.6
V_LF-V_HD	F10.6.6	D44.1

Tabla 5.2 - Fvs quiméricos generados durante este trabajo.

5.9 Determinación de peso molecular en solución – Light scattering estático

El peso molecular promedio de las distintas variantes de Fvs fue determinado en un equipo de dispersión de luz estático (*static light scattering*, SLS) Precision Detectors PD2010. El mismo fue conectado en tándem a un HPLC y a un refractómetro diferencial LKB 2142. Se utilizaron entre 100 y 300 μl de Fv a una concentración no menor a 0.2 mg/ml para sembrar en una columna Superdex S-75 eluida con buffer PBS con 0.5 M de NaCl. Los datos correspondientes a las señales de SLS e índices de refracción fueron almacenados en una PC y analizados con el software Discovery32, proporcionado por Precision Detectors. Todos los pesos moleculares medidos se encontraron entre 24 y 25 kDa, una diferencia no mayor al 5% del peso molecular calculado mediante Protparam, algoritmo online proporcionado por el sitio Expert Protein Analysis System (http://ca.expasy.org/tools/protparam.html).

5.10 Generación de variantes con mutaciones puntuales

Con el fin de conocer mejor la interacción entre Ag y Ac, se generaron variantes mutadas en posiciones clave del fragmento Fv. Se utilizó como método de introducción de mutaciones puntuales el método del *megaprimer*,[90] esquematizado en la Figura 5.4.

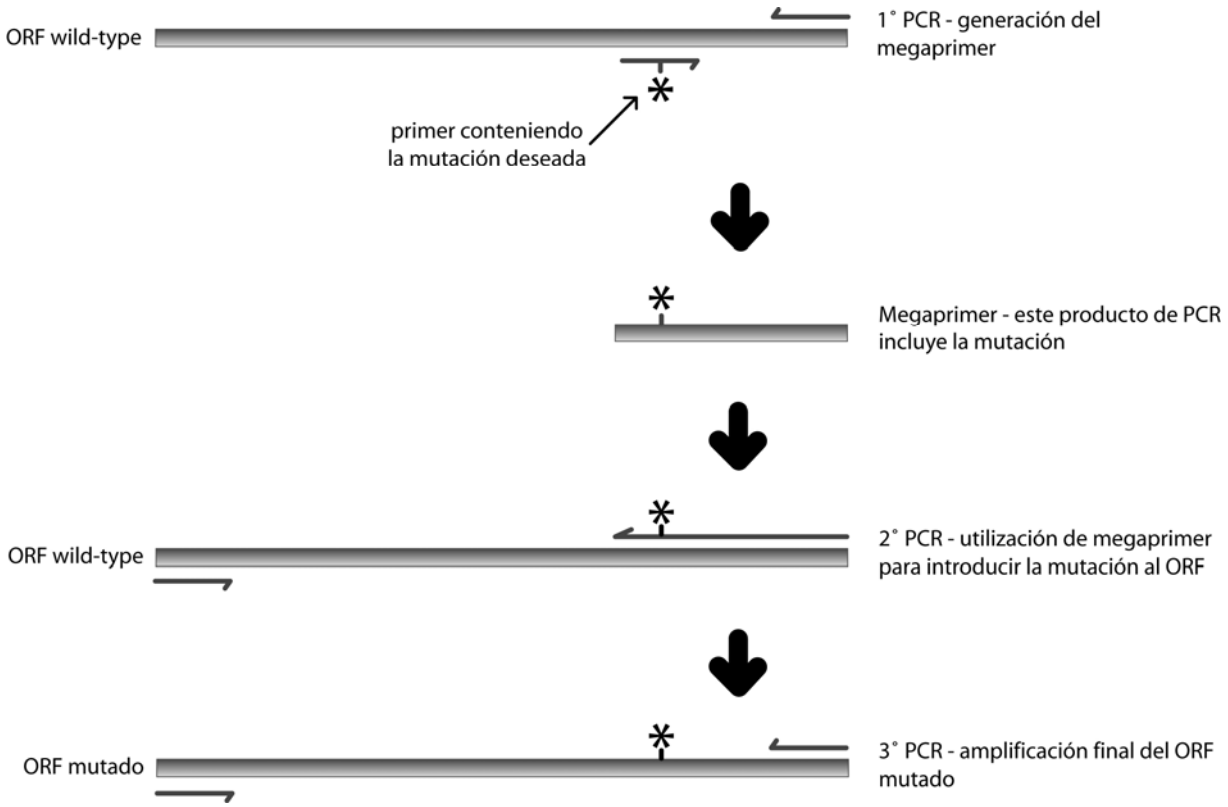


Figura 5.4 - Método del megaprimer

Este método consiste en realizar una primer PCR con un juego de primers donde una de ellos contiene la mutación elegida. De este modo se genera un fragmento parcial del ORF a amplificar que contiene la mutación, este fragmento es lo que se conoce como megaprimer. El mismo se utiliza para realizar una segunda PCR donde se amplifica el total del ORF, esta vez introduciendo la mutación en el total del ORF. Así, una vez introducida la mutación deseada, se vuelve a amplificar en una tercer PCR el ORF mutado para proceder con el clonado normal en el vector de expresión. Este método se utilizó de modo equivalente para introducir mutaciones puntuales ya sea sobre V_L o V_H. En la Tabla 5.3 se detallan los mutantes utilizados durante el período de esta tesis.

Fv	**V_L**	**V_H**
D44.1 V_H-N102F/G104V	D44.1	D44.1 N102F/G104V
D44.1 V_H-N102F	D44.1	D44.1 N102F
D44.1 V_H-G104V	D44.1	D44.1 G104V
V_LF-V_HD-N102F/G104V	F10.6.6	D44.1 N102F/G104V
D44.1 V_H-G44S	D44.1	D44.1 G44S
D44.1 V_L-V51T	D44.1 V51T	D44.1
D44.1 V_H-G56D	D44.1	D44.1 G56D
D44.1 V_L-N92G	D44.1 N92G	D44.1

Tabla 5.3 – Mutantes generadas durante este trabajo.

5.11 Constantes cinéticas y de afinidad

Se utilizó el modelo de Langmuir de interacción de componentes en solución como fundamento para el desarrollo de metodologías analíticas. El evento más sencillo es aquel donde una especie se une a otra en solución para dar un complejo formado por las dos anteriores. En nuestro caso particular,

$$Ab + HEL \xrightarrow{k_{ass}} Ab \cdot HEL$$

$$Ab \cdot HEL \xrightarrow{k_{diss}} Ab + HEL \qquad (1)$$

$$Ab + HEL \xleftrightarrow{k_{ass} * k_{diss}^{-1} = K_A} Ab \cdot HEL$$

donde Ab es cualquier fragmento de Ac y HEL es lisozima. Entonces, al equilibrio se puede plantear la siguiente igualdad:

$$k_{ass}[Ab][HEL] = k_{diss}[Ab \cdot HEL] \qquad (2)$$

$$\frac{[Ab \cdot HEL]}{[Ab][HEL]} = \frac{k_{ass}}{k_{diss}} = K_A \qquad (3)$$

Así, la reacción HEL-Ab puede describirse del siguiente modo:

$$[Ab \cdot HEL]_t = [Ab \cdot HEL]_{eq}[1 - \exp(-k_{on}t)] \qquad (4)$$

donde $[Ab \cdot HEL]_{eq}$ es la concentración del complejo en el equilibrio, t es el tiempo y k_{on} es la constante cinética de pseudo primer orden. A su vez k_{on} es descripto por la ecuación (5), donde se observa la dependencia de la constante de asociación k_{ass} con la concentración de Ab:

$$k_{on} = k_{ass}[Ab] + k_{diss} \qquad (5)$$

Para medir los parámetros cinéticos y de afinidad de cada una de las variantes de Abs se utilizó la técnica conocida como Resonancia de plasmones de superficie (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) mediante el uso de un equipo IASys Plus (Affinity Sensors, Saxon Hill, Cambridge, U.K.).

Un plasmón es una cuasipartícula resultante de la cuantización de las oscilaciones de plasma. A su vez, los plasmones de superficie son aquellos plasmones que están confinados a superficies y que interactúan fuertemente con luz, resultando en un polariton. Los plasmones de superficie ocurren en la interfaz de un material con una constante dieléctrica positiva con otra superficie de constante dieléctrica negativa, usualmente metálica. La explicación fundamental de la naturaleza de los plasmones va más allá de los objetivos de este trabajo y se procederá a explicar cómo son utilizados estos plasmones para nuestro objetivo. La excitación de los plasmones de superficie por luz se conoce como SPR y este fenómeno es la base de muchas aplicaciones donde se mide adsorción de un material a una superficie metálica plana (típicamente oro o plata). Asimismo, dicha excitación se puede seguir en el tiempo y describir un cambio en las propiedades del sistema observado. Particularmente, el sistema IASys funciona con un chip comercial que se conforma de un prisma con una serie de capas que conforman lo que se conoce como estructura resonante (Figura 5.5). En dichas capas se produce el fenómeno de resonancia de plasmones. Por encima de la estructura resonante se encuentra una última capa de hidrogel, que será modificada químicamente para acoplar una de los ligandos y estará en contacto con la solución donde se producirá la reacción de unión de las especies.

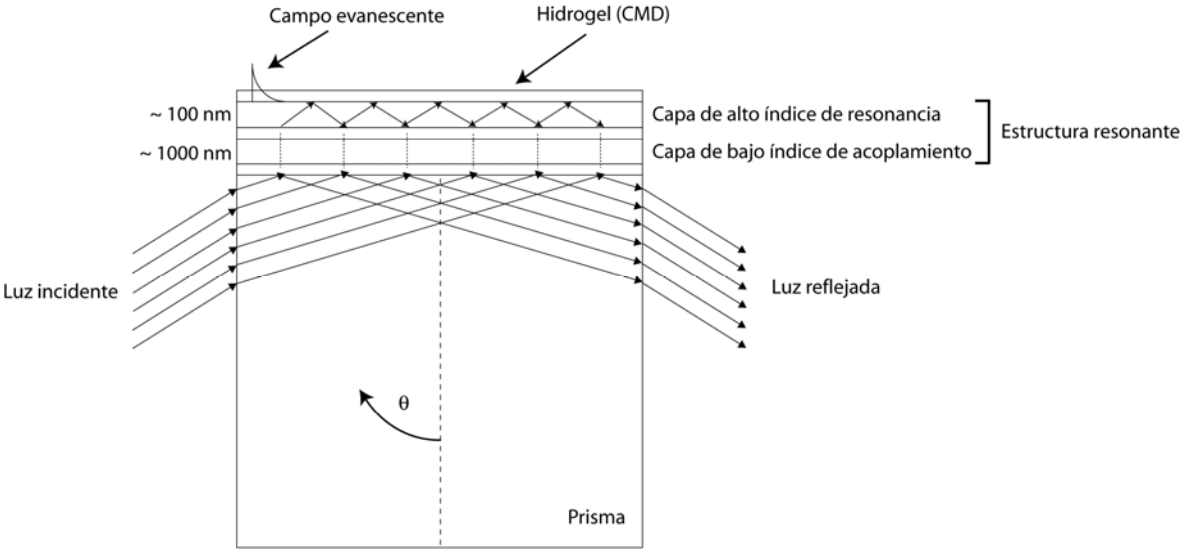


Figura 5.5 - Esquema de un chip de biosensor IASys.

Al excitar la estructura resonante con una luz adecuada se produce la resonancia de los plasmones. Este fenómeno se verá afectado dependiendo de la conformación de de la estructura resonante y su entorno inmediato; así, los ligandos que se unan preferentemente a la superficie modificada del chip modifican el ángulo de la luz reflejada. Al medir este cambio en función del tiempo es posible determinar las velocidades de unión y de disociación y las constantes de equilibrio de las especies que reaccionan con el marco teórico previamente descripto. Este sistema permite inmovilizar las moléculas de interés a un hidrogel, particularmente carboxi-metil-dextrano (CMD). El CMD es un polímero rico en carboxilatos y puede ser activado mediante la química de acoplamiento EDC/NHS (Figura 5.6) facilitando la unión covalente de aminas primarias a dichos carboxilatos. De este modo el ligando HEL se une irreversiblemente por intermedio de enlaces covalentes entre sus aminas primarias (presentes en los residuos de lisina y arginina) a los carboxilatos activados de la matriz de CMD en altas concentraciones locales (cercanas a mM) pero en bajas cantidades absolutas (en el rango de los ng/mm^2). A su vez la solución de proteína que contiene el receptor del ligando (en nuestro caso los Abs) se encuentra en una concentración relativamente baja (en el orden nM) y en exceso respecto de HEL ligada al CMD, debido a la mayor cantidad relativa de volumen de la solución de Abs. La concentración de Ab permanece esencialmente constante durante el transcurso de la reacción, lo que permite medir la constante de asociación (k_{ass}) en condiciones de pseudo-primer orden.

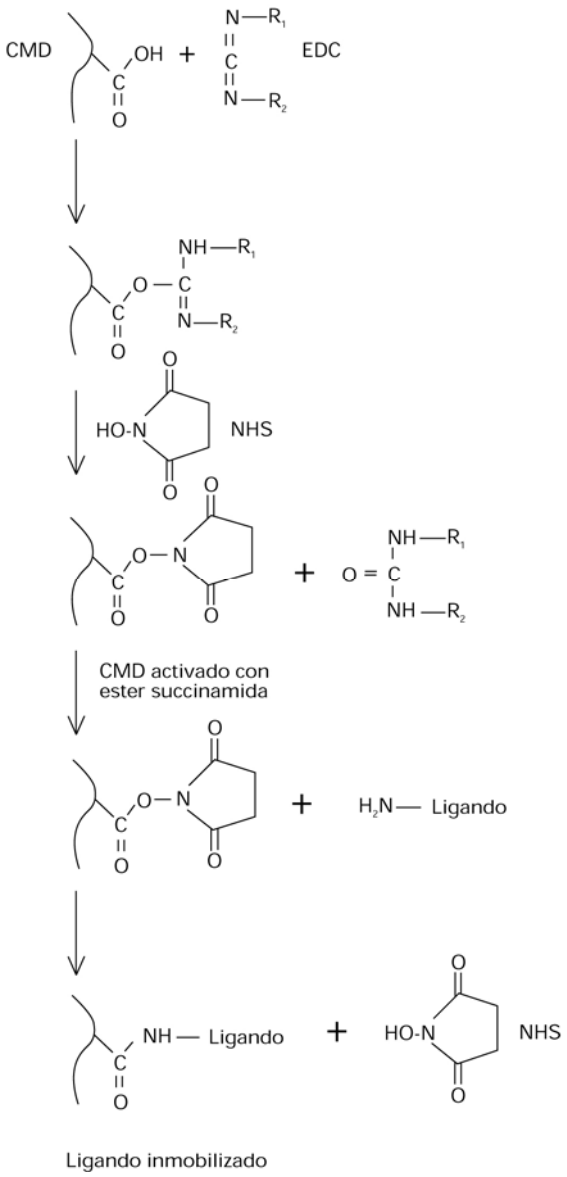


Figura 5.6 - Química de acoplamiento mediada por EDC/NHS.

Como fue planteado en la ecuación (5) k_{on} depende de la concentración de Ab y variando dicha concentración se obtienen distintas curvas que describen las velocidades de unión a HEL en las concentraciones dadas. En la ecuación (6) se describe la función utilizada para describir dicho comportamiento,

$$R_t = \left(R_{eq} - R_0\right)\left[1 - \exp\left(-k_{on}t\right)\right] + R_0 \qquad (6)$$

La respuesta del equipo R (medida en arcseg) es proporcional a la masa de HEL acoplada al CMD, lo que resulta en la ecuación (6), donde R_t es la respuesta a tiempo t, R_0 es la respuesta

inicial y R_{eq} es la respuesta máxima. Como se puede apreciar en la Figura 5.9, estas ecuaciones responden a un modelo exponencial sencillo, tan solo variando la concentración en sucesivas curvas de unión para calcular k_{on} y utilizando la ecuación (5) es posible mediante un ajuste lineal obtener la constante k_{ass}.

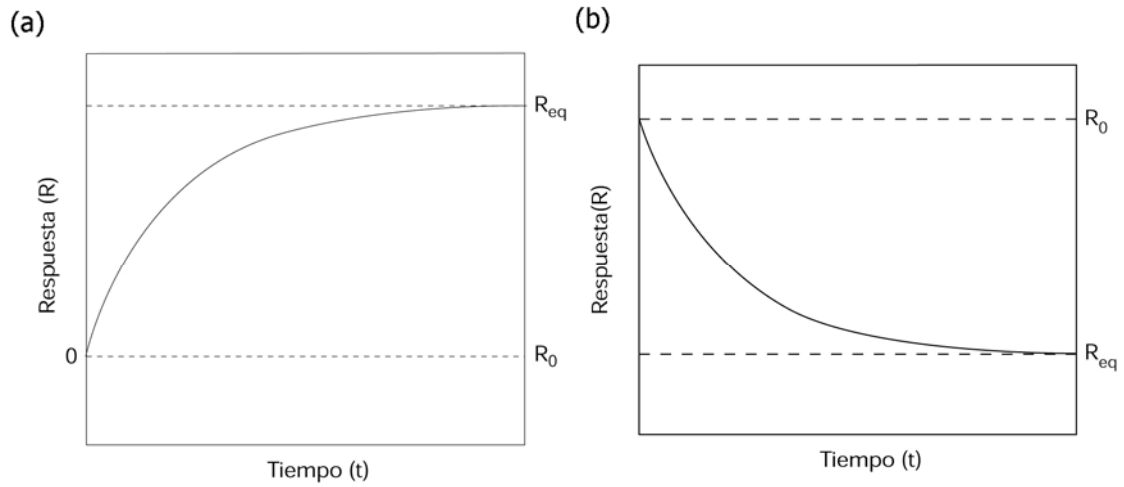


Figura 5.7 - (a) Reacción de unión monofásica y (b) disociación monofásica de dos especies modelo.

Para el cálculo de k_{diss} se utilizó la siguiente ecuación:

$$R_t = R_0 \exp(-k_{diss} t) \qquad (7)$$

Al ser k_{diss} independiente de la concentración de Ab solo con el ajuste exponencial es posible obtener dicha constante. Finalmente, utilizando la ecuación (3) se realiza el cociente entre k_{ass} y k_{diss} para obtener la constante de afinidad K_A. Las reacciones de unión fueron llevadas a cabo en cubetas inmobilizadas con entre 4 y 10 ng de HEL, utilizando buffer PBS con 0.025% Tween 20 a 20°C con una agitación seteada en el equipamiento de 95%. La unión de Abs fue monitoreada a varias concentraciones, generalmente en un rango de 10 veces por debajo del valor de la K_A hasta 10 veces por encima de la misma. Para los ajustes se utilizaron los softwares FastPlot y FastFit (Affinity Sensors) provistos por el fabricante y Microcal Origin 7.0 (Microcal, USA).

Para los experimentos de stress por solventes se utilizaron las condiciones previamente mencionadas con el agregado de tres solventes. Los solventes utilizados se eligieron en base a su carácter de alta o baja polaridad, carácter orgánico y su fluidez. De este modo se midieron las respectivas constantes utilizando glicerol, dioxano y metanol. El glicerol se utilizó para medir

constantes en el rango del 50% al 5%, el dioxano en el rango de 3.5 M a 125 mM y el metanol de 3 M a 0.5 M. Los valores de las constantes obtenidas se presentaron en un gráfico de log de la constante en función del log de la concentración de agua. El valor de log[H2O] proviene del valor calculado de concentración de agua. Los valores de actividad de agua son técnicamente difíciles de obtener, por ese motivo se utilizó dicho valor como la mejor aproximación.

5.12 Determinación de parámetros termodinámicos

Se determinaron los parámetros termodinámicos de la reacción Ab-HEL por medio de titulación calorimétrica isotérmica (ITC). La técnica ITC se usa comúnmente para determinar los parámetros termodinámicos de interacciones bioquímicas. Se utiliza frecuentemente para estudiar desde unión de moléculas pequeñas hasta macromoléculas como proteínas y ADN. Es una técnica cuantitativa que mide directamente y sin perturbaciones la afinidad, el cambio de entalpía (ΔH^o) y la estequiometría de unión (n) entre dos o más especies en solución. A partir de estas mediciones iniciales es posible determinar la energía libre de Gibbs (ΔG^o) y el cambio de entropía ($T\Delta S^o$) utilizando la ecuación (8),

$$\Delta G^\circ = -RT\ln(K_A) = \Delta H^\circ - T\Delta S^\circ \qquad (8)$$

donde R es la constante de los gases y T la temperatura absoluta.

Se utilizó un VP-ITC (Microcal Inc., USA) para la determinación de todos los parámetros termodinámicos. Éste esta compuesto por dos celdas idénticas fabricadas de una aleación conocida como Hasteloy, un material conductor de calor óptimo, rodeadas de de una camisa adiabática (Figura 5.8). Una de estas celdas se utiliza como referencia y la otra se utiliza para medir el experimento en cuestión. Cada celda tiene circuitos que sensan la temperatura y el equipo se ocupa de medir las diferencias que surjan entre ambas celdas. Durante el experimento, la solución contenida en la celda muestra se titula con alícuotas conocidas de ligando, produciendo el calentamiento o el enfriamiento de la celda (dependiendo de la naturaleza de la reacción). Así, si la muestra se enfrió, el equipo se encarga de compensar calentando la celda muestra a la temperatura de la celda referencia y si la muestra al reaccionar produjo calor, se deja de calentar la muestra para volver a tener temperaturas comparables entre muestra y referencia. Cada medida consiste entonces en la cantidad de potencia requerida en un período de tiempo para mantener iguales temperaturas entre muestra y referencia.

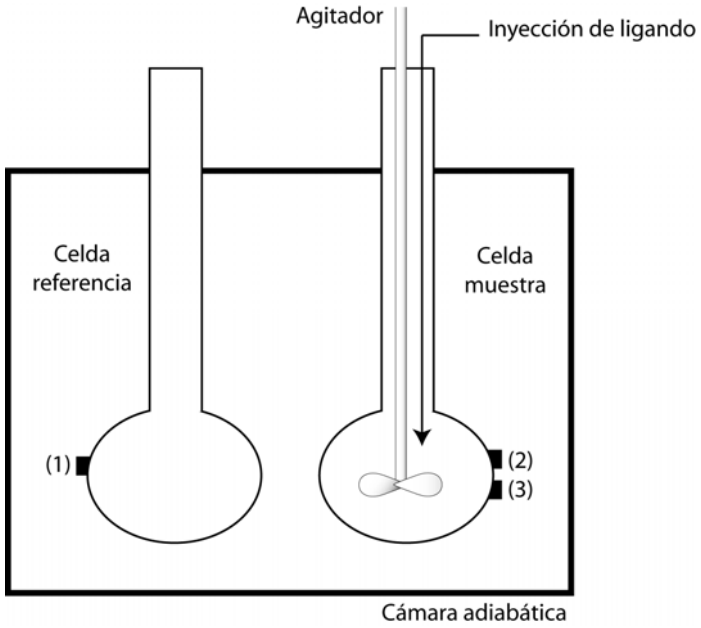


Figura 5.8 - Esquema de la cámara adiabática del Microcal VP-ITC. (1) Control de temperatura de la celda referencia, (2) calentador de la celda muestra y (3) calentador de calibración.

En una reacción exotérmica, la temperatura de la celda muestra se incrementa con la adición de ligando. Esto causa que el calentador de la celda muestra deje de calentar hasta compensar la temperatura de la muestra con la referencia. En una reacción endotérmica, ocurre lo opuesto; el calentador de la muestra incrementa su potencia para mantener mínima la diferencia de temperatura entre celda muestra y referencia. Esto se conoce como operación isotérmica. De este modo, cada medida es graficada como μcal/seg que se necesitan para mantener a idéntica temperatura la celda referencia y la celda que contiene la muestra. Los parámetros termodinámicos para la unión de todos los tipos de fragmentos de Acs Abs (ya sea Fv recombinantes o Fab provenientes de proteólisis de IgG) a HEL fueron determinados utilizando un VP-ITC. Los Abs purificados a homogeneidad (controlada por SDS-PAGE) fueron dializados exhaustivamente contra buffer PBS. En un experimento típico, alícuotas de entre 3 y 10 μl de 0.3 a 0.9 mM HEL fueron inyectadas con una jeringa conteniendo 300 μl de esta solución sobre la celda muestra, la cual contiene 1.47 ml de Abs en una concentración entre 10 y 30 μM. Se utilizó una agitación de 290 rpm. Se utilizó el método de ajuste de cuadrados mínimos para determinar el valor de ΔH, y se asumió un equilibrio termodinámico reversible para calcular los valores de ΔG y ΔS a partir de la ecuación (8). La adquisición de datos fue realizada con el software provisto por el fabricante, Microcal Origin 5.0. Se midieron entalpías a diferentes temperaturas, cubriendo un rango entre 15 y 45°C.

5.13 Cálculo de entropía configuracional

Los cambios de entropía de unión entre dos proteínas involucran mayoritariamente cambios en la entropía configuracional de las cadenas laterales. Cuando el ligando se encuentra libre, éste puede adoptar mayor número de conformaciones que en su estado unido. Los grados de libertad que se pierden al formarse el complejo incluyen cambios en los ángulos dihedros de las cadenas laterales y principal. Entonces, el cambio de entropía incluye los siguientes términos:

$$\Delta S_{conf} = \Delta S_{conf,mc} + \Delta S_{conf,sc} + \Delta S_{rt}$$

Donde $\Delta S_{conf,mc}$ y $\Delta S_{conf,sc}$ son los cambios en la entropía configuracional de la cadena principal y de las cadenas laterales, respectivamente. ΔS_{rt} es el cambio de entropía rotacional y trasnacional.

La pérdida entropía configuracional de cadena principal y cadenas laterales tiene dos componentes principales:

1.- restricción en el número de confórmeros accesibles a cada ángulo dihedro, y

2.- restricción en la amplitud del movimiento dentro del pozo energético correspondiente a cada confórmero.

La estimación de ΔS_{conf} requiere el cálculo del perfil energético completo del sistema, o sea, el valor de energía para cada posible conformación de todos los átomos.

La pérdida de energía puede ser calculada entonces como

$$\Delta S = S_{unido} - S_{libre}$$

donde

$$S_X = \sum_{conformaciones} p_i \ln p_i \qquad (9)$$

siendo

$$p_i = \frac{\exp(-E_i / kT)}{\sum \exp(-E_i / kT)} \qquad (10)$$

En la mayoría de los casos, llevar a cabo estos cálculos sobre todas las posibles conformaciones es impracticable desde el punto de vista computacional, debido a la gran cantidad de proceso requerido. Por otro lado, se deduce de las ecuaciones anteriores que los estados de baja energía contribuyen mayoritariamente al valor de entropía.

Una buena aproximación es calcular el perfil energético solo sobre los valores de los ángulos dihedros. Este proceso solo usa un número discreto de conformaciones mientras que permite observar la mayor cantidad de conformaciones de baja energía. Sin embargo, al calcular la energía como función de la conformación de los dihedros no resulta en un perfil energético realista. En particular, se exagera el número de conformaciones de alta energía por el simple hecho de rotar alrededor de un ángulo, produciendo conformaciones con altos valores de repulsión. En muchos casos, estas conformaciones de alta energía pueden ser relajadas localmente minimizando la energía. La estimación de entropía requiere entonces conocer los valores de energía del sistema para todas las conformaciones relevantes. La energía del sistema en función de un juego limitado de ángulos dihedros se denomina perfil energético.

Estimación de perfiles energéticos

El método propuesto puede ser utilizado para estimar la entropía configuracional de una cadena lateral en una determinada estructura. Durante el cálculo del perfil energético de una dada cadena lateral, todos los demás átomos se mantuvieron en sus posiciones originales. Para cada residuo que forma parte de la interfaz Ag-Ac se calculó un perfil energético al rotar 1º sobre el dihedro seleccionado. Se utilizaron las ecuaciones (9) y (10) para obtener los valores de energía y probabilidad para cada conformación. Las energías fueron calculadas utilizando el potencial CHARMM.[91; 92] Para cada combinación de dihedros las estructuras fueron llevadas a la conformación de equilibrio utilizando una rutina de minimización por gradientes conjugados. Una vez obtenidos los perfiles energéticos de los residuos que conforman la interfaz Ag-Ac de D44.1, F10.6.6 y HEL se calculó la entropía configuracional para cada uno con el objetivo de observar cambios en la entropía de residuos que sean determinantes de la diferencia de entropía de formación del complejo observada entre D44.1 y F10.6.6.

Dado que existen residuos con uno o más ángulos dihedros, se utilizaron para residuos con dos ángulos dihedros perfiles energéticos en ejes de tres coordenadas, siendo el eje Z la energía, mientras en el caso más sencillo, se utilizaron perfiles energéticos en ejes de dos coordenadas.

5.14 Dicroísmo circular

Se utilizó un espectropolarímetro Jasco J810 para medir espectros de dicroísmo circular en el UV lejano. Esta técnica permitió determinar el contenido de estructura secundaria a 20°C de los Fvs y Fabs, mediante soluciones de 20 y 8 μM respectivamente. Con estas mismas soluciones se midieron perfiles de desnaturalización térmica utilizando el sistema peltier incluido con el equipo. El rango de temperaturas medido fue de 5 a 95°C aumentando la temperatura 2°C/min. No se observó reversibilidad para nuestro sistema, medida por la recuperación de la elipticidad luego del enfriado de la muestra desnaturalizada, demostrando la irreversibilidad del proceso. Esto invalida el cálculo de las energías libres de desnaturalización; así, las temperaturas de transición informadas son consideradas como temperaturas de transición aparente.

5.15 Fluorescencia

Se midió la fluorescencia intrínseca de triptófano de Abs y unión a ANS de los mismos con un espectrofluorómetro Perkin Elmer LS50B. En todos los casos se utilizó 1 μM de concentración de Abs (ya sea Fv o Fab), utilizando un paso de 4 nm tanto para la excitación como para la emisión. Para medir la fluorescencia intrínseca de los triptófano de los Abs se utilizó una excitación a 295 nm con un barrido de emisión de 300 a 400 nm. Para los experimentos de unión a ANS se utilizaron 50 μM de esta sonda, con una excitación a 380 nm y un barrido de emisión de 450 a 600 nm. Todos los espectros fueron tomados a 25°C en buffer PBS (pH=7.4).

5.16 Dispersión de luz dinámica

Se midió dispersión de luz dinámica (Dynamic light scattering, DLS) utilizando un equipo Malvern ZetaSizer Nano-S (Malvern, USA). La concentración de Ab utilizada fue de 20 μM para los Fvs y 10 μM para los Fabs. La desnaturalización térmica se llevo a cabo incrementando la temperatura del sistema 1°C/min con el Peltier incorporado al equipo. Cada medida fue promediada a partir de seis medidas individuales de 5 segundos cada una. El enfriado de las muestras no mostró signos de recuperación de la señal original, confirmando la irreversibilidad de la desnaturalización térmica. De este modo, las temperaturas de transición se consideraron aparentes para todos los experimentos de DLS. Todos los parámetros del equipo se utilizaron por defecto.

Bibliografía

Bibliografía

1. Steiner, L. A. & Eisen, H. N. (1967). Sequential changes in the relative affinity of antibodies synthesized during the immune response. *J Exp Med* **126**, 1161-83.
2. Rada, C., Gonzalez-Fernandez, A., Jarvis, J. M. & Milstein, C. (1994). The 5' boundary of somatic hypermutation in a V kappa gene is in the leader intron. *Eur J Immunol* **24**, 1453-7.
3. Rogerson, B. J. (1994). Mapping the upstream boundary of somatic mutations in rearranged immunoglobulin transgenes and endogenous genes. *Mol Immunol* **31**, 83-98.
4. Both, G. W., Taylor, L., Pollard, J. W. & Steele, E. J. (1990). Distribution of mutations around rearranged heavy-chain antibody variable-region genes. *Mol Cell Biol* **10**, 5187-96.
5. Rothenfluh, H. S., Taylor, L., Bothwell, A. L., Both, G. W. & Steele, E. J. (1993). Somatic hypermutation in 5' flanking regions of heavy chain antibody variable regions. *Eur J Immunol* **23**, 2152-9.
6. Insel, R. A. & Varade, W. S. (1994). Bias in somatic hypermutation of human VH genes. *Int Immunol* **6**, 1437-43.
7. Selsing, E. & Storb, U. (1981). Somatic mutation of immunoglobulin light-chain variable-region genes. *Cell* **25**, 47-58.
8. Wagner, S. D. & Neuberger, M. S. (1996). Somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Annu Rev Immunol* **14**, 441-57.
9. Betz, A. G., Rada, C., Pannell, R., Milstein, C. & Neuberger, M. S. (1993). Passenger transgenes reveal intrinsic specificity of the antibody hypermutation mechanism: clustering, polarity, and specific hot spots. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 2385-8.
10. Rogozin, I. B. & Kolchanov, N. A. (1992). Somatic hypermutagenesis in immunoglobulin genes. II. Influence of neighbouring base sequences on mutagenesis. *Biochim Biophys Acta* **1171**, 11-8.
11. Berek, C. & Milstein, C. (1987). Mutation drift and repertoire shift in the maturation of the immune response. *Immunol Rev* **96**, 23-41.
12. Golding, G. B., Gearhart, P. J. & Glickman, B. W. (1987). Patterns of somatic mutations in immunoglobulin variable genes. *Genetics* **115**, 169-76.
13. Kolchanov, N. A., Solovyov, V. V. & Rogozin, I. B. (1987). Peculiarities of immunoglobulin gene structures as a basis for somatic mutation emergence. *FEBS Lett* **214**, 87-91.
14. Liu, Y. J., Zhang, J., Lane, P. J., Chan, E. Y. & MacLennan, I. C. (1991). Sites of specific B cell activation in primary and secondary responses to T cell-dependent and T cell-independent antigens. *Eur J Immunol* **21**, 2951-62.
15. Tew, J. G. & Mandel, T. (1978). The maintenance and regulation of serum antibody levels: evidence indicating a role for antigen retained in lymphoid follicles. *J Immunol* **120**, 1063-9.
16. Agur, Z., Mazor, G. & Meilijson, I. (1991). Maturation of the humoral immune response as an optimization problem. *Proc Biol Sci* **245**, 147-50.
17. Batista, F. D. & Neuberger, M. S. (1998). Affinity dependence of the B cell response to antigen: a threshold, a ceiling, and the importance of off-rate. *Immunity* **8**, 751-9.
18. 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.
19. Bhat, T. N., Bentley, G. A., Boulot, G., Greene, M. I., Tello, D., Dall'Acqua, W., Souchon, H., Schwarz, F. P., Mariuzza, R. A. & Poljak, R. J. (1994). Bound water molecules and conformational stabilization help mediate an antigen-antibody association. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1089-93.
20. 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.
21. Stanfield, R. L., Takimoto-Kamimura, M., Rini, J. M., Profy, A. T. & Wilson, I. A. (1993). Major antigen-induced domain rearrangements in an antibody. *Structure* **1**, 83-93.
22. Foote, J. & Milstein, C. (1991). Kinetic maturation of an immune response. *Nature* **352**, 530-2.
23. Foote, J. & Winter, G. (1992). Antibody framework residues affecting the conformation of the hypervariable loops. *J Mol Biol* **224**, 487-99.
24. Scotti, C. & Gherardi, E. (2006). Structural basis of affinity maturation of the TEPC15/Vkappa45.1 anti-2-phenyl-5-oxazolone antibodies. *J Mol Biol* **359**, 1161-9.
25. 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.
26. 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.

27. Zimmermann, J., Oakman, E. L., Thorpe, I. F., Shi, X., Abbyad, P., Brooks, C. L., 3rd, Boxer, S. G. & Romesberg, F. E. (2006). Antibody evolution constrains conformational heterogeneity by tailoring protein dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13722-7.
28. Thorpe, I. F. & Brooks, C. L., 3rd. (2007). Molecular evolution of affinity and flexibility in the immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 8821-6.
29. Goldbaum, F. A., Cauerhff, A., Velikovsky, C. A., Llera, A. S., Riottot, M. M. & Poljak, R. J. (1999). Lack of significant differences in association rates and affinities of antibodies from short-term and long-term responses to hen egg lysozyme. *J Immunol* **162**, 6040-5.
30. England, P., Nageotte, R., Renard, M., Page, A. L. & Bedouelle, H. (1999). Functional characterization of the somatic hypermutation process leading to antibody D1.3, a high affinity antibody directed against lysozyme. *J Immunol* **162**, 2129-36.
31. Li, Y., Li, H., Yang, F., Smith-Gill, S. J. & Mariuzza, R. A. (2003). X-ray snapshots of the maturation of an antibody response to a protein antigen. *Nat Struct Biol* **10**, 482-8.
32. Milstein, C. & Rada, C. (1995). *The maturation of the antibody response*. 2nd edit. Immunoglobulin genes (Honjo, T. & Alt, F. W., Eds.), Academic press, London.
33. Monaco-Malbet, S., Berthet-Colominas, C., Novelli, A., Battai, N., Piga, N., Cheynet, V., Mallet, F. & Cusack, S. (2000). Mutual conformational adaptations in antigen and antibody upon complex formation between an Fab and HIV-1 capsid protein p24. *Structure* **8**, 1069-77.
34. Bhat, T. N., Bentley, G. A., Fischmann, T. O., Boulot, G. & Poljak, R. J. (1990). Small rearrangements in structures of Fv and Fab fragments of antibody D1.3 on antigen binding. *Nature* **347**, 483-5.
35. Kondo, H., Shiroishi, M., Matsushima, M., Tsumoto, K. & Kumagai, I. (1999). Crystal structure of anti-Hen egg white lysozyme antibody (HyHEL-10) Fv-antigen complex. Local structural changes in the protein antigen and water-mediated interactions of Fv-antigen and light chain-heavy chain interfaces. *J Biol Chem* **274**, 27623-31.
36. Padlan, E. A., Silverton, E. W., Sheriff, S., Cohen, G. H., Smith-Gill, S. J. & Davies, D. R. (1989). Structure of an antibody-antigen complex: crystal structure of the HyHEL-10 Fab-lysozyme complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5938-42.
37. Rothlisberger, D., Honegger, A. & Pluckthun, A. (2005). Domain interactions in the Fab fragment: a comparative evaluation of the single-chain Fv and Fab format engineered with variable domains of different stability. *J Mol Biol* **347**, 773-89.
38. Jager, M. & Pluckthun, A. (1999). Folding and assembly of an antibody Fv fragment, a heterodimer stabilized by antigen. *J Mol Biol* **285**, 2005-19.
39. Braden, B. C., Souchon, H., Eisele, J. L., Bentley, G. A., Bhat, T. N., Navaza, J. & Poljak, R. J. (1994). Three-dimensional structures of the free and the antigen-complexed Fab from monoclonal anti-lysozyme antibody D44.1. *J Mol Biol* **243**, 767-81.
40. Cauerhff, A., Goldbaum, F. A. & Braden, B. C. (2004). Structural mechanism for affinity maturation of an anti-lysozyme antibody. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3539-44.
41. Acierno, J. P., Braden, B. C., Klinke, S., Goldbaum, F. A. & Cauerhff, A. (2007). Affinity maturation increases the stability and plasticity of the Fv domain of anti-protein antibodies. *J Mol Biol* **374**, 130-46.
42. Alzari, P. M., Spinelli, S., Mariuzza, R. A., Boulot, G., Poljak, R. J., Jarvis, J. M. & Milstein, C. (1990). Three-dimensional structure determination of an anti-2-phenyloxazolone antibody: the role of somatic mutation and heavy/light chain pairing in the maturation of an immune response. *Embo J* **9**, 3807-14.
43. Yang, P. L. & Schultz, P. G. (1999). Mutational analysis of the affinity maturation of antibody 48G7. *J Mol Biol* **294**, 1191-201.
44. Schwarz, F. P., Tello, D., Goldbaum, F. A., Mariuzza, R. A. & Poljak, R. J. (1995). Thermodynamics of antigen-antibody binding using specific anti-lysozyme antibodies. *Eur J Biochem* **228**, 388-94.
45. Harper, M., Lema, F., Boulot, G. & Poljak, R. J. (1987). Antigen specificity and cross-reactivity of monoclonal anti-lysozyme antibodies. *Mol Immunol* **24**, 97-108.
46. Novotny, J., Bruccoleri, R. E. & Saul, F. A. (1989). On the attribution of binding energy in antigen-antibody complexes McPC 603, D1.3, and HyHEL-5. *Biochemistry* **28**, 4735-49.
47. Goldbaum, F. A., Schwarz, F. P., Eisenstein, E., Cauerhff, A., Mariuzza, R. A. & Poljak, R. J. (1996). The effect of water activity on the association constant and the enthalpy of reaction between lysozyme and the specific antibodies D1.3 and D44.1. *J Mol Recognit* **9**, 6-12.
48. Mitchell, J. C., Kerr, R. & Ten Eyck, L. F. (2001). Rapid atomic density methods for molecular shape characterization. *J Mol Graph Model* **19**, 325-30, 388-90.
49. Tetin, S., Mantulin, W. W., Denzin, L. K., Weidner, K. M. & Voss, E. W., Jr. (1992). Comparative circular dichroism studies of an anti-fluorescein monoclonal antibody (Mab 4-4-20) and its derivatives. *Biochemistry* **31**, 12029-34.

50. Tetin, S. Y. & Linthicum, D. S. (1996). Circular dichroism spectroscopy of monoclonal antibodies that bind a superpotent guanidinium sweetener ligand. *Biochemistry* **35**, 1258-64.
51. Sreerama, N. & Woody, R. W. (2000). Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set. *Anal Biochem* **287**, 252-60.
52. Nobbmann, U., Connah, M., Fish, B., Varley, P., Gee, C., Mulot, S., Chen, J., Zhou, L., Lu, Y., Shen, F., Yi, J. & Harding, S. E. (2007). Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies. *Biotechnol Genet Eng Rev* **24**, 117-28.
53. Philo, J. S. (2006). Is any measurement method optimal for all aggregate sizes and types? *Aaps J* **8**, E564-71.
54. Privalov, P. L. (1996). Intermediate states in protein folding. *J Mol Biol* **258**, 707-25.
55. Semisotnov, G. V., Rodionova, N. A., Razgulyaev, O. I., Uversky, V. N., Gripas, A. F. & Gilmanshin, R. I. (1991). Study of the "molten globule" intermediate state in protein folding by a hydrophobic fluorescent probe. *Biopolymers* **31**, 119-28.
56. Luque, I. & Freire, E. (1998). Structure-based prediction of binding affinities and molecular design of peptide ligands. *Methods Enzymol* **295**, 100-27.
57. 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.
58. Murphy, K. P. & Freire, E. (1992). Thermodynamics of structural stability and cooperative folding behavior in proteins. *Adv Protein Chem* **43**, 313-61.
59. Murphy, K. P., Xie, D., Garcia, K. C., Amzel, L. M. & Freire, E. (1993). Structural energetics of peptide recognition: angiotensin II/antibody binding. *Proteins* **15**, 113-20.
60. Cooper, A., Johnson, C. M., Lakey, J. H. & Nollmann, M. (2001). Heat does not come in different colours: entropy-enthalpy compensation, free energy windows, quantum confinement, pressure perturbation calorimetry, solvation and the multiple causes of heat capacity effects in biomolecular interactions. *Biophys Chem* **93**, 215-30.
61. Cooper, A. (2005). Heat capacity effects in protein folding and ligand binding: a re-evaluation of the role of water in biomolecular thermodynamics. *Biophys Chem* **115**, 89-97.
62. Spolar, R. S. & Record, M. T., Jr. (1994). Coupling of local folding to site-specific binding of proteins to DNA. *Science* **263**, 777-84.
63. Amzel, L. M. (2000). Calculation of entropy changes in biological processes: folding, binding, and oligomerization. *Methods Enzymol* **323**, 167-77.
64. Murphy, K. P., Xie, D., Thompson, K. S., Amzel, L. M. & Freire, E. (1994). Entropy in biological binding processes: estimation of translational entropy loss. *Proteins* **18**, 63-7.
65. Chen, E., Van Vranken, V. & Kliger, D. S. (2008). The folding kinetics of the SDS-induced molten globule form of reduced cytochrome c. *Biochemistry* **47**, 5450-9.
66. Kuwajima, K. (1996). The molten globule state of alpha-lactalbumin. *Faseb J* **10**, 102-9.
67. Stryer, L. (1965). The interaction of a naphthalene dye with apomyoglobin and apohemoglobin. A fluorescent probe of non-polar binding sites. *J Mol Biol* **13**, 482-95.
68. Morfill, J., Blank, K., Zahnd, C., Luginbuhl, B., Kuhner, F., Gottschalk, K. E., Pluckthun, A. & Gaub, H. E. (2007). Affinity-matured recombinant antibody fragments analyzed by single-molecule force spectroscopy. *Biophys J* **93**, 3583-90.
69. David, M. P., Asprer, J. J., Ibana, J. S., Concepcion, G. P. & Padlan, E. A. (2007). A study of the structural correlates of affinity maturation: antibody affinity as a function of chemical interactions, structural plasticity and stability. *Mol Immunol* **44**, 1342-51.
70. Jung, S., Spinelli, S., Schimmele, B., Honegger, A., Pugliese, L., Cambillau, C. & Pluckthun, A. (2001). The importance of framework residues H6, H7 and H10 in antibody heavy chains: experimental evidence for a new structural subclassification of antibody V(H) domains. *J Mol Biol* **309**, 701-16.
71. Masuda, K., Sakamoto, K., Kojima, M., Aburatani, T., Ueda, T. & Ueda, H. (2006). The role of interface framework residues in determining antibody V(H)/V(L) interaction strength and antigen-binding affinity. *Febs J* **273**, 2184-94.
72. Colman, P. M. (1988). Structure of antibody-antigen complexes: implications for immune recognition. *Adv Immunol* **43**, 99-132.
73. Padlan, E. A. (1994). Anatomy of the antibody molecule. *Mol Immunol* **31**, 169-217.
74. Lilie, H. & Buchner, J. (1995). Domain interactions stabilize the alternatively folded state of an antibody Fab fragment. *FEBS Lett* **362**, 43-6.
75. Kauzmann, W. (1959). Some factors in the interpretation of protein denaturation. *Adv Protein Chem* **14**, 1-63.

76. Sigurskjold, B. W. & Bundle, D. R. (1992). Thermodynamics of oligosaccharide binding to a monoclonal antibody specific for a Salmonella O-antigen point to hydrophobic interactions in the binding site. *J Biol Chem* **267**, 8371-6.
77. Kuntz, I. D., Jr. & Kauzmann, W. (1974). Hydration of proteins and polypeptides. *Adv Protein Chem* **28**, 239-345.
78. Sturtevant, J. M. (1977). Heat capacity and entropy changes in processes involving proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 2236-40.
79. Hibbits, K. A., Gill, D. S. & Willson, R. C. (1994). Isothermal titration calorimetric study of the association of hen egg lysozyme and the anti-lysozyme antibody HyHEL-5. *Biochemistry* **33**, 3584-90.
80. Sheriff, S., Silverton, E. W., Padlan, E. A., Cohen, G. H., Smith-Gill, S. J., Finzel, B. C. & Davies, D. R. (1987). Three-dimensional structure of an antibody-antigen complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8075-9.
81. Di Noia, J. M. & Neuberger, M. S. (2007). Molecular mechanisms of antibody somatic hypermutation. *Annu Rev Biochem* **76**, 1-22.
82. Eftink, M. R. (1994). The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biophys J* **66**, 482-501.
83. Kim, S. T., Shirai, H., Nakajima, N., Higo, J. & Nakamura, H. (1999). Enhanced conformational diversity search of CDR-H3 in antibodies: role of the first CDR-H3 residue. *Proteins* **37**, 683-96.
84. Milstein, C. & Cuello, A. C. (1983). Hybrid hybridomas and their use in immunohistochemistry. *Nature* **305**, 537-40.
85. Brunger, 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 D Biol Crystallogr* **54**, 905-21.
86. Otwinowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. *Methods Enzymol* **276**, 307-326.
87. Navaza, J. (2001). Implementation of molecular replacement in AMoRe. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **57**, 1367-72.
88. Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
89. Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fiddes, C. A., Hutchison, C. A., Slocombe, P. M. & Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* **265**, 687-95.
90. Burke, E. & Barik, S. (2003). Megaprimer PCR: application in mutagenesis and gene fusion. *Methods Mol Biol* **226**, 525-32.
91. Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, D. J., States, D. J., Swaminathan, S. & Karplus, M. (1983). CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *Journal of Computational Chemistry* **4**, 187-217.
92. MacKerel Jr, A. D., Brooks Iii, C. L., Nilsson, L., Roux, B., Won, Y. & Karplus, M. (1998). In *CHARMM: The Energy Function and Its Parameterization with an Overview of the Program*, Vol. 1, pp. 271-277. John Wiley & Sons: Chichester.