

Tesis Doctoral

# Mecanismo de reconocimiento de un epítoto intrínsecamente desordenado por un anticuerpo monoclonal: integración mecanística y estructural

Fassolari, Marisol

2014-11-27

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

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

Cita tipo APA:

Fassolari, Marisol. (2014-11-27). Mecanismo de reconocimiento de un epítoto intrínsecamente desordenado por un anticuerpo monoclonal: integración mecanística y estructural. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Fassolari, Marisol. "Mecanismo de reconocimiento de un epítoto intrínsecamente desordenado por un anticuerpo monoclonal: integración mecanística y estructural". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-11-27.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



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

“ Mecanismo de reconocimiento de un epítipo intrínsecamente desordenado por  
un anticuerpo monoclonal: integración mecanística y estructural ”

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

Lic. Fassolari Marisol

Director: Gonzalo de Prat Gay

Consejero de estudio: Julio Caramelo

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Estructura-Función e Ingeniería de Proteínas, Fundación Instituto  
Leloir e IIBBA-CONICET, Buenos Aires Argentina.

Buenos Aires, 2014



*Título: “ Mecanismo de reconocimiento de un epítipo intrínsecamente desordenado por un anticuerpo monoclonal: Integración mecanística y estructural ”*

RESUMEN: El reconocimiento de antígenos por medio de anticuerpos es un evento fundamental en la respuesta inmune adaptativa. A su vez la formación de los complejos Antígeno:Anticuerpo es extensivamente utilizada como modelo de estudio de interacción proteína-proteína. En la presente tesis estudiamos el mecanismo de reconocimiento de un anticuerpo monoclonal específico, M1, por la proteína E7 del papilomavirus humano (HPV). E7 es la oncoproteína que constituye la principal actividad transformante del virus y además es paradigma de proteínas intrínsecamente desordenadas (IDP). E7 se expresa constitutivamente en tejidos de carcinoma y la aparición de anticuerpos específicos ocurre con alta frecuencia en pacientes con cáncer cervical. Llevando a cabo un mapeo epitópico determinamos que el anticuerpo M1 reconoce específicamente una región inmunodominante de la proteína de HPV-16 denominada “bisagra”, por conectar el dominio IDP N-terminal con el dominio globular C-terminal de la misma. Experimentos cinéticos mostraron que la región reconocida por M1, la cual posee dos residuos de prolina, comprende al menos dos poblaciones separadas por una alta barrera energética ( $\sim 22$  Kcal/mol). Los estudios de Resonancia Magnética Nuclear identificaron el origen de esta barrera como un evento de isomerización *cis-trans* de las prolinas presentes en el epítipo de reconocimiento. Se determinó que el anticuerpo M1 reconoce específicamente al epítipo en su conformación minoritaria (10%), que posee sus prolinas en *cis*, mediante el mecanismo de selección conformacional. Por lo tanto, se requiere que el 90% de las moléculas que se encuentran en configuración *trans* isomericen previo a la unión con el anticuerpo. La velocidad de asociación del conformero *cis* por M1 ( $k_{on} = 6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) se encuentra entre las más rápidas para las interacciones Antígeno:Anticuerpo, a pesar de que la reacción global es extremadamente lenta ( $t_{1/2} \sim 4$  min). Esto indica que la reacción de asociación se encuentra limitada por un evento de isomerización de prolina. Utilizando mutantes puntuales demostramos que la P41 en su conformación *cis* es la requerida para la unión con el anticuerpo. Luego del evento lento de pre-equilibrio y de la unión con M1, ocurre un evento de rearrreglo unimolecular, formándose finalmente un complejo consolidado de alta afinidad ( $K_D$  120 nM). Nuestros resultados sugieren que la presentación de este epítipo viral por las células presentadoras de antígeno tiene que haber estado en su configuración minoritaria *cis*, al generar el clon que produce el anticuerpo específico. Finalmente, mostramos la importancia de los determinantes estructurales presentes en regiones desordenadas en el reconocimiento entre macromoléculas. Dado que numerosas proteínas virales son multifuncionales debido a su naturaleza IDP, los resultados presentados en esta tesis sientan la bases para el análisis del mecanismo de reconocimiento por medio de anticuerpos de epítipes virales intrínsecamente desordenados.

Palabras claves: oncoproteína E7, Antígeno:Anticuerpo, selección conformacional, isomerización de prolinas, proteínas intrínsecamente desordenadas.



Title: *Recognition mechanism of an intrinsically disordered epitope by a monoclonal antibody: mechanistic and structural integration.*

**SUMMARY:** Recognition of antigens by antibodies is a critical event in the adaptive immune response. Furthermore, the Antigen:Antibody complex is extensively used as a model of protein-protein interactions. In the present thesis, we present a detailed mechanistic study of the interaction between a specific monoclonal antibody, M1, with the E7 oncoprotein of human papillomavirus. E7 is the main transforming factor of this virus and also emerges as a paradigmatic example of an intrinsically disordered protein or IDP. E7 is constitutively expressed at high levels in carcinoma tissues and antibodies are frequently raised in patients with cervical cancer. Epitope mapping studies reveal that the M1 antibody specifically recognizes an immunodominant region of the HPV-16 E7 protein called "hinge", located between the IDP N-terminal and the globular C-terminal domains of the protein. Kinetic experiments show that this hinge, which has two proline residues, has at least two populations separated by a high energy barrier ( $\sim 22$  kcal / mol). Nuclear magnetic resonance traced the origin of this barrier to a very slow *trans/cis* prolyl isomerization event present in E7 epitope. The less populated (10%) *cis* isomer is the binding-competent species. Thus, the 90% of the molecules in the *trans* configuration require isomerization before binding. The association rate for the *cis* isomer approaches  $6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , a ceiling for antigen-antibody interactions, although the overall reaction is extremely slow ( $t_{1/2} \sim 4$  min). Therefore, the E7 epitope:M1 antibody complex formation is limited by a proline isomerization event. Mutagenesis experiments showed that Pro 41 in the epitope was required for both binding and isomerization. After the slow pre-equilibrium event and M1 binding, a post-binding unimolecular event occurs and a consolidated complex with a  $K_D = 1.2 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  is reached. Our results suggest that presentation of this viral epitope by the antigen presenting cells would have to be "locked" in the *cis* conformation in opposition to the most populated *trans* isomer in order to select the specific antibody clone. Finally, we show the importance of the structural determinants within disordered regions in the recognition mechanism between macromolecules. Many viral proteins are multifunctional due to its IDP nature. Therefore, the results presented in this thesis establish the basis for the analysis of the recognition mechanism by antibodies of intrinsically disordered viral epitopes.

**Keywords:** E7 oncoprotein, Antigen:Antibody, Conformational Selection, Prolyl isomerization, intrinsically disordered proteins.



## **Agradecimientos**

Quiero agradecerle en primer lugar a Gonzalo por haberme abierto las puertas de su laboratorio . Por confiar en mi, por orientarme a lo largo de todo el doctorado y por dejarme trabajar con libertad.

A los que forman y formaron parte del laboratorio 209, por cumplir un rol clave para mi doctorado y por tantos momentos compartidos. A Lu por su ayudarme en mi formación y en la escritura de la tesis. A MK, Gabi, Gabin, Clara y Mariana por su ayuda en la escritura de la tesis. A Leo, Seba, Esteban, Marian, Laura, Karina, Nacho, Diana, Silvina, Ivana, Nico, por formar un gran equipo de trabajo. A las AY, por ser tan AY, las quiero!

A los miembros de mi comisión de seguimiento integrado por el Dr. Ricardo Wolosiuk, y las doctoras Vanesa Gottifredi y Laura Morelli, por haberme orientado y ayudado a tomar desiciones a lo largo de mi doctorado.

Al personal del Instituto Leloir, a Lili, la gente de biblioteca, administración, droguero, mantenimiento, quienes facilitan mucho el trabajo de cada día.

A mis amigos y familia por su apoyo incondicional y por poder contar siempre con ellos.

A Diego y Guadita, por iluminarme la vida.





## **Publicaciones**

Parte del trabajo desarrollado durante la presente tesis doctoral está contenido en la siguiente publicación:

**Fassolari M**, Chemes LB, Gallo M, Smal C, Sánchez IE, de Prat-Gay G.

Minute time scale prolyl isomerization governs antibody recognition of an intrinsically disordered immunodominant epitope.

Journal of Biological Chemistry (2013) May 3;288(18):13110-23.

doi: 10.1074/jbc.M112.444554.

Epub 2013 Mar 15.



## Abreviaturas

**aa:** aminoácido  
**Ac:** anticuerpo  
**AcMo:** anticuerpo monoclonal  
**Ag:** antígeno  
**Ag:Ac:** complejo antígeno:anticuerpo  
**AI:** ajuste inducido  
**BSA:** seroalbúmina bovina  
**CC:** cáncer de cuello de útero.  
**CD:** Dicroísmo circular  
**C<sub>H</sub>:** dominio constante de la cadena pesada de las inmunoglobulina  
**C<sub>L</sub>:** dominio constante de la cadena pesada de las inmunoglobulina  
**CDR:** regiones determinantes de complementariedad de los anticuerpo  
**DTT:** ditioneitol  
**E7-FITC:** proteína E7 del virus modificada químicamente con isotiocianato de fluoresceína  
**E7 HPV-16:** proteína E7 del papilomavirus tipo -16  
**E7N:** dominio N terminal de la proteína E7  
**E7C:** dominio C terminal de la proteína E7  
**E7Ep:** epítotope de reconocimiento del anticuerpo M1  
**EDTA:** ácido etilendiamino tetra acético  
**Fab:** Fragmento univalente de una inmunoglobulina  
**FabM1:** fragmento univalente del anticuerpo monoclonal M1  
**Fc:** fragmento constante de una inmunoglobulina  
**FITC:** isotiocianato de fluoresceína  
**HPV:** virus del papiloma humano  
**IgG:** Inmunoglobulina de isotipo G  
**K<sub>D</sub>:** constante de disociación  
**LAT:** líquido ascítico  
**NIC:** Neoplasia  
**ON:** toda la noche.  
**P:** residuos de prolina  
**P/V:** peso/volumen  
**PII:** estructura tipo poliprolina  
**PAGE:** electroforesis en geles de poliacrilamida  
**PV:** virus del papiloma  
**SC:** Selección conformacional  
**SDS:** duodecilsulfato de sodio  
**TBS:** tris *buffer* salino  
**TFE:** 2.2.2 trifluoroetanol  
**Tris:** tris (hidroximetil) amino metano  
**V<sub>H</sub>:** dominio variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas  
**V<sub>L</sub>:** dominio variable de la cadena liviana de las inmunoglobulinas  
**V/V:** volumen/volumen



INDICE	Pág
<b>Introducción</b>	15
<b>Las inmunoglobulinas</b>	17
<i>Fuentes de diversidad y maduración de la afinidad en las inmunoglobulinas</i>	17
<i>Características estructurales de las Inmunoglobulinas.</i>	17
<b>Interacción Antígeno:Anticuerpo</b>	18
<i>Mecanismos de unión presentes en los complejos Ag:Ac</i>	19
<b>Los papilomavirus</b>	21
<i>Papilomavirus humano y cáncer.</i>	22
<i>Estructura genómica y proteínas virales.</i>	24
<i>Ciclo de vida.</i>	25
<b>La proteína viral E7</b>	26
<i>Función</i>	26
<i>Arquitectura modular de la proteína E7</i>	28
<i>Propiedades bioquímicas de HPV-16 E7 en solución.</i>	29
<i>E7 como paradigma de proteína intrínsecamente desordenada.</i>	30
<i>Expresión y localización celular de E7 HPV-16.</i>	32
<i>Respuesta inmune contra E7</i>	32
<i>El Anticuerpo monoclonal anti-E7: M1.</i>	32
<b>Objetivo general de la tesis</b>	35
<b>Capítulo I. Mapeo epítópico y análisis termodinámico de la interacción entre E7 y AcMo M1.</b>	37
I.1. <i>Reactividad de M1 frente a E7 HPV-16, -18,-11</i>	40
I.2. <i>Determinación de la estequiometría y de la afinidad del AcMo M1 por E7.</i>	40
I.3. <i>Efecto de la fuerza iónica en la interacción FITC-E7:FabM1.</i>	43
I.4. <i>Mapeo epítópico del anticuerpo M1.</i>	44
I.5. <i>Cálculo de la afinidad del FabM1 por diferentes fragmentos de E7.</i>	45
I.6. <i>Análisis de la especificidad del anticuerpo M1 por E7 HPV-16.</i>	47
<i>Conclusiones</i>	49
<b>Capítulo II. Mecanismo cinético de la interacción entre el anticuerpo FabM1 y E7Ep.</b>	51
II.1. <i>Cinética de disociación del complejo E7Ep:FabM1.</i>	55
II.2. <i>Cinética de asociación del complejo E7Ep:FabM1.</i>	57
II.2.1. <i>Cálculo de la constante de asociación bimolecular del complejo E7Ep:FabM1.</i>	57
II.2.2. <i>Fase lenta de asociación del complejo FITC-E7Ep:FabM1.</i>	58
II.3. <i>Mecanismo de interacción de E7Ep:FabM1.</i>	59
II.4. <i>Cambios conformacionales asociados a la formación del complejo E7Ep:FabM1.</i>	64
<i>Conclusiones</i>	67
<b>Capítulo III. Rol de las Prolinas en el mecanismo de selección conformacional.</b>	69
III.1. <i>Dependencia de la reacción de pre-equilibrio con la temperatura.</i>	73
III.2. <i>Análisis del péptido E7Ep por Resonancia Magnética Nuclear.</i>	75
III.2.1. <i>Asignación de los desplazamientos químicos del péptido E7Ep.</i>	76
III.2.2. <i>Determinación de las constante de isomerización cis - trans de los residuos de prolina presentes en E7Ep.</i>	79



<i>III.3. Análisis comparativo entre el proceso isomerización cis-trans de las prolina presentes en E7Ep y la reacción de pre-equilibrio</i>	82
<i>Conclusiones</i>	85
<b>Capítulo IV. Identificación de la prolina involucrada en la interacción con el Ac M1 y tendencias conformacionales de E7Ep.</b>	87
<i>IV.1. Cálculo de la afinidad del AcMo M1 por los péptidos de E7Ep variantes de prolina.</i>	89
<i>IV.2. Identificación del residuo de prolina involucrado en la reacción de pre-equilibrio descripta en E7Ep:FabM1.</i>	91
<i>IV.3. Determinación del epítoto mínimo de reconocimiento del anticuerpo M1.</i>	93
<i>IV.4. Tendencias conformacionales de E7Ep y sus variantes de prolina en solución.</i>	94
<i>IV.4.1. Trifluoetanos como estabilizador de estructura tipo hélice-<math>\alpha</math>.</i>	95
<i>IV.4.2. SDS como estabilizador de estructura secundaria.</i>	96
<i>IV.4.3. Análisis de estructura tipo poliprolina por variación de temperatura.</i>	98
<i>Conclusiones</i>	100
<b>Discusión General</b>	101
<b>Materiales y Métodos</b>	115
<b>Bibliografía</b>	127





# **INTRODUCCIÓN**



El reconocimiento específico de antígenos por medio de anticuerpos es un evento fundamental en la respuesta inmune que limita el crecimiento de un patógeno ante una infección. Los anticuerpos (Ac) son el centro de la respuesta inmune humoral, y a su vez participan en la respuesta inmune celular e innata. Dada su importancia, los anticuerpos y las interacciones con sus antígenos (Ag) han sido ampliamente estudiados desde diversos enfoques. Los estudios estructurales, termodinámicos y cinéticos han aportado valiosa información contribuyendo a la comprensión de las bases moleculares de los complejos antígeno:anticuerpo (Ag:Ac).

## **Las inmunoglobulinas**

### *Fuentes de diversidad y maduración de la afinidad en las inmunoglobulinas.*

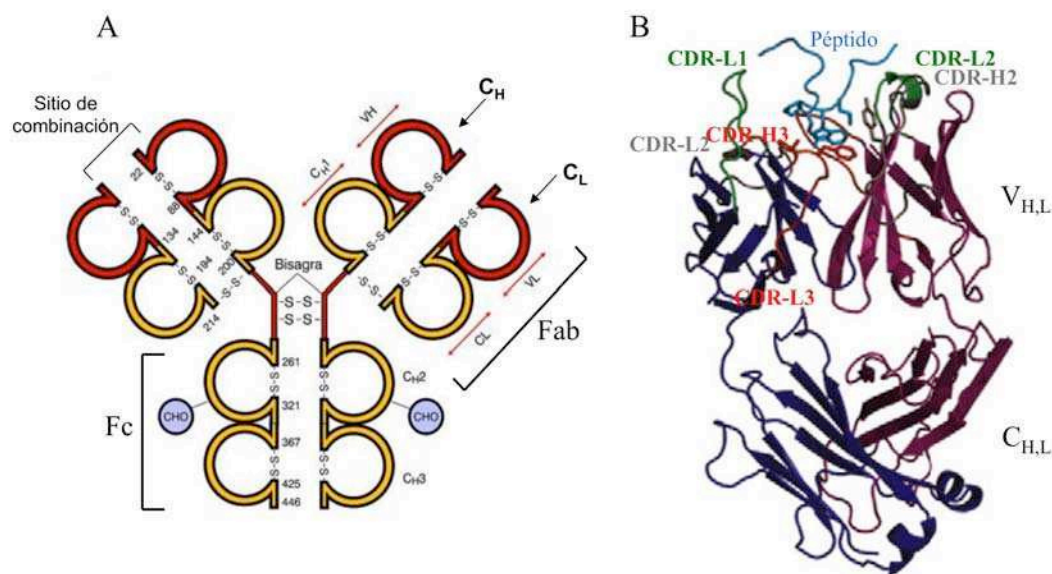
Si bien la estructura general de las inmunoglobulinas (Ig) es similar (Figura 1), su sitio de combinación con el antígeno presenta una altísima diversidad. La principal fuente de diversidad de los anticuerpos es generada por reordenamientos en el ADN de los genes que codifican para los dominios variables de las Inmunoglobulinas tipo G (IgG). El proceso se denomina "recombinación somática", y permite generar distintas porciones variables gracias a la combinación al azar de alguna de las múltiples copias de los genes que codifican para la porción variable de las inmunoglobulinas. Otras fuentes adicionales de diversidad son: la unión imprecisa de los diferentes fragmentos recombinados, la asociación de las cadenas livianas y pesada de las inmunoglobulinas y el mecanismo denominado "hipermutación somática" que sufren los linfocitos B maduros luego del reconocimiento antigénico [1]. A continuación de este último mecanismo ocurre un proceso denominado "selección clonal", en el cual se seleccionan los anticuerpos que presentan mayor afinidad por los antígenos. Frente a repetidas exposiciones al antígeno, el hospedador produce anticuerpos de afinidades sucesivamente mayores mediante un proceso denominado "maduración de la afinidad", el cual involucra los mecanismos de "hipermutación somática" y "selección clonal" descritos anteriormente [1].

### *Características estructurales de las Inmunoglobulinas.*

Todas las inmunoglobulinas poseen la misma estructura básica, la cual consta de 2 cadenas proteicas pesadas (H) de alrededor de 50-60 kDa y dos cadenas livianas (L) de aproximadamente 23 kDa unidas entre sí por puentes disulfuro (Figura 1A). La cadena L posee dos dominios, uno variable ( $V_L$ ) y uno constante ( $C_L$ ), mientras que la cadena H posee cuatro dominios, un dominio variable  $V_H$  y tres dominios constantes:  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$ ,  $C_{H3}$  [1] (Figura 1A). Dentro de los dominios variables (V), se conocen tres regiones que presentan mayor

variabilidad que el resto del dominio, las cuales se denominan regiones hipervariables o regiones determinantes de complementariedad (CDR). Dichas regiones son las que comprenden el sitio de reconocimiento al antígeno, siendo la secuencia y el tamaño que presentan las mismas las que les confieren especificidad a las Ig por un antígeno dado. [1]. Cada Ig contiene seis CDR, tres correspondientes a la cadena L y tres correspondiente a la cadena H (Figura 1A). La región CDR3 H3 es el que posee mayor hiper-variabilidad en la longitud y composición de secuencia, y es extremadamente importante para la especificidad hacia los antígenos, encontrándose presente en la superficie de unión de la mayoría de los complejos Ag:Ac.

Los dominios variables  $V_H$  y  $V_L$  junto con uno de los dominios constantes  $C_{H1}$  y  $C_L$  forman la región Fab de los anticuerpos, mientras que los dominios  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$  forman la región Fc de los mismos. Es posible, mediante la digestión con la enzima papaína separar las regiones Fab y Fc de las IgG y, en general, se utiliza para llevar a cabo los estudios de interacción Ag:Ac la porción Fab de los mismos.



**Figura 1. Estructura de las inmunoglobulinas.** (A) Esquema representativo de una IgG. En amarillo se muestran los dominios constantes y en rojo los dominios variables. S-S puentes disulfuro intradominio e intercatenario.  $V_H, V_L$  dominios variables de la cadena liviana y pesada, respectivamente.  $C_L$  dominio constante de la cadena liviana.  $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  y  $C_{H3}$ : dominios constantes de la cadena pesada. Los círculos celestes representan las moléculas de hidrato de carbono. La degradación con la enzima proteolítica papaína produce los fragmentos Fab y Fc. (B) Estructura tridimensional de un complejo formado entre un anticuerpo monoclonal y un péptido correspondiente a la región N-terminal de la proteína TAT perteneciente al virus HIV-1. En azul se muestra el péptido antígeno, en violeta y rojo los dominios variables y constantes de las cadenas pesadas y livianas del I fragmento Fab del anticuerpo. Los giros correspondientes a los CDR-L1 y CDR-H1, CDR-L2 y CDR-H2, y CDR-L3 y CDR-H3 son representados en verde, gris y rojo, respectivamente. Extraído de Serriere y col. [2]

Desde los trabajos pioneros de cristalografía [3,4] hasta la fecha, se han resuelto numerosas estructuras de anticuerpos libres o unidos a sus antígenos. En 1986 se resolvió la primer estructura tridimensional Ag:Fab con el complejo Lisozima:Fab y a la actualidad

alrededor de 800 estructuras de complejos Ag:Ac se han resuelto [5]. En todas las estructuras resueltas se observó que los dominios constantes y variables de las Ig presentan características estructurales semejantes [3,4,6]. Ambos dominios se encuentran asociados por numerosas interacciones no covalentes, principalmente hidrofóbicas, formando una estructura globular. Cada dominio constante se encuentra formado por 7 láminas  $\beta$  antiparalelas, mientras que los dominios variables por 9 láminas  $\beta$  antiparalelas, en ambos casos éstas forman dos hojas  $\beta$  solapadas (Figura 1B). Todas las hebras que forman las láminas  $\beta$  se encuentran unidas entre sí por giros o *loops*, que son de mayor tamaño en los dominios variables donde representan las regiones hipervariables CDR (Figura 1B) [7]

Por otra parte, mediante el análisis de las estructuras de los anticuerpos unidos a sus antígenos, pudo determinarse que los sitios de combinación del anticuerpo pueden formar distintos arreglos y formas, existiendo una correlación entre la forma del sitio de combinación y el antígeno reconocido [8]. Los sitios de combinación de los anticuerpos anti-péptidos son generalmente descriptos como bolsillos cóncavos de distinto tamaño, formados por casi o por todos los CDRs [9] (Figura 1B). Por otro lado, los sitios de unión de fragmentos más grandes presentan en general superficies más extendidas y planas. En general, las superficie de interacción de los Ac son altamente complementarias en cuanto a conformación y carga con la superficie de interacción de los antígenos, y las protuberancias de uno de ellos coinciden con depresiones en el otro [10].

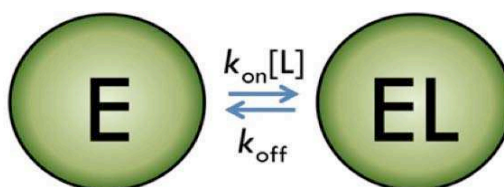
### **Interacción Antígeno:Anticuerpo**

El acoplamiento estructural en los complejos Ag:Ac se realiza gracias a varias fuerzas débiles que son altamente dependientes de la distancia, como los puentes de hidrógeno, las fuerzas de Van Der Waals, las interacciones electrostáticas y las hidrofóbicas. El reconocimiento Ag:Ac es una reacción de complementariedad, por lo que se efectúa a través de múltiples enlaces no covalentes entre una parte del antígeno, la cual se denomina epítotope, y el sitio de unión del anticuerpo formado por sus CDRs [1].

#### *Mecanismos de unión presentes en los complejos Ag:Ac.*

A partir del estudio cinético de la formación de los complejos Ag:Ac es posible conocer la velocidad con las que los complejos se asocian, el tiempo de vida media de los mismos y, por último, determinar el mecanismo de interacción que gobierna la formación de los complejos.

El modelo de interacción más simple que describe la unión entre Ag:Ac es denominado llave-cerradura (Figura 2). El mismo fue propuesto por Emil Fischer en el año 1894 y postula que en el proceso de interacción entre dos moléculas ninguna de ellas sufre cambios conformacionales, y que la formación del complejo se basa principalmente en la complementariedad entre las superficies de interacción de ambas proteínas, las cuales presentan la geometría adecuada para la unión [11]. Por ejemplo, este modelo se ha asumido que se encuentra presente en los complejos formados por la proteína lisozima y un anticuerpo monoclonal específico [12] y también en el complejo formado entre un anticuerpo y la proteína neuraminidasa del virus de la influenza [13]. La presencia de estos mecanismo se dedujo a partir de las estructuras cristalográficas en las cuales no se observaron diferencias estructurales entre las macromoléculas en su estado libre o unidas formando el complejo.



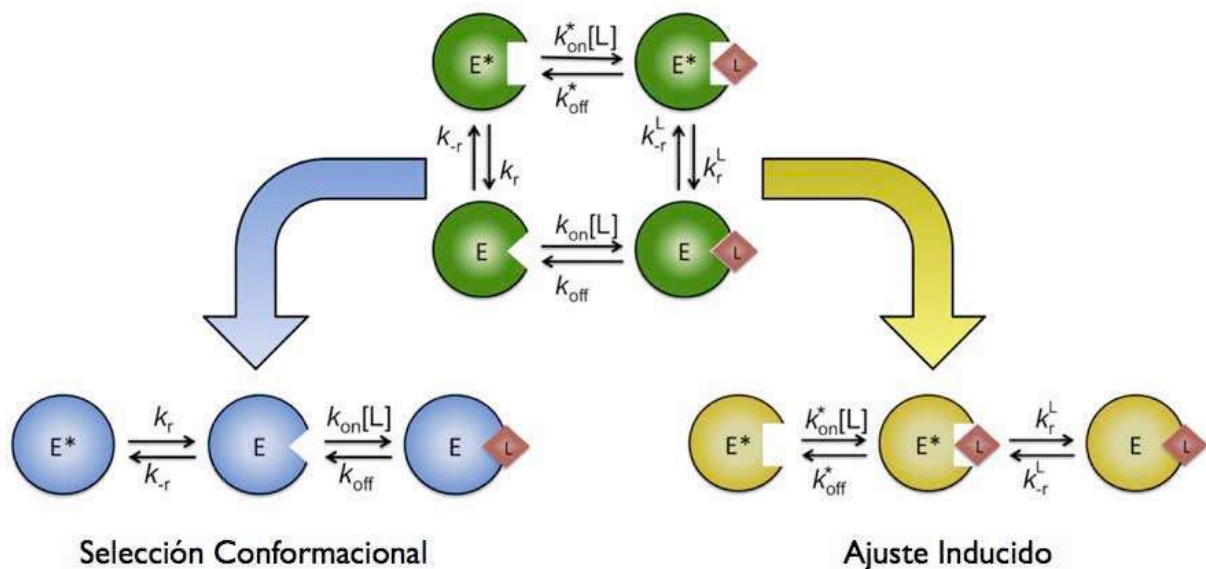
**Figura 2. Modelo de interacción llave-cerradura.** En este modelo la  $k_{on}$  representa la constante de asociación bimolecular de segundo orden, y la  $k_{off}$  la constante de disociación de primer orden. La afinidad de la interacción se encuentra determinada por la constante de disociación de equilibrio ( $K_D$ ) que en este caso es igual a  $k_{off}/k_{on}$ . E: macromolécula. L: ligando.

Un escenario más complejo de interacción entre macromoléculas propone que además del evento de unión, pueden ocurrir cambios conformacionales en el antígeno y/o el anticuerpo antes o después del evento de unión. Este esquema general se encuentra representado en la Figura 3, y a partir de él derivan dos mecanismos especiales de unión conocidos como: ajuste inducido (AI) y selección conformacional (SC).

El modelo de AI fue propuesto por Koshland en el año 1958 [14] y postula que en el mecanismo de formación del complejo, luego del evento de unión, las moléculas sufren pequeños cambios conformacionales aumentando la complementariedad entre ambas superficies de unión (rama amarilla, Figura 3). En los complejos Ag:Ac el modelo de AI se utilizó durante mucho tiempo para explicar diferencias estructurales observadas entre el estado libre o unido de las moléculas de Ag o Ac [15,16].

El mecanismo denominado SC originalmente fue propuesto por Eigen como pre-equilibrio en el año 1968 [17], y postula que la molécula en su estado libre presenta transiciones conformacionales, constituyendo un ensamble dentro de las cuales la especie que presenta la

conformación adecuada para la unión es seleccionada y unida por el ligando. El concepto de pre-equilibrio conformacional en anticuerpos fue introducido en el año 1940 por Pauling [18]. Él estableció que la heterogeneidad conformacional en anticuerpos sería otro mecanismo, aparte de los procesos de "recombinación somática" e "hipermutación somática", que produciría un aumento en el repertorio de anticuerpos generando una expansión de la respuesta inmune. Esta teoría fue probada por Foote y Milstein en 1994, en un trabajo en el cual demostraron que la heterogeneidad conformacional de anticuerpos no es un evento aislado. En dicho trabajo estimaron que entre el 10-20% de anticuerpos generados contra una molécula de hapteno presentaban isomerismo conformacional [19].



**Figura 3. Modelos de interacción que involucran cambios conformacionales en las moléculas.** Las constantes de primer orden  $k_r$  y  $k_{-r}$  describen la reacción de pre-equilibrio conformacional, los valores de  $k_{on}$  y  $k_{off}$  representan las constantes de asociación y disociación correspondientes al evento de unión. Verde: Esquema general de cuatro estados. Rama azul: Mecanismo de selección conformacional. Rama amarilla: Mecanismo de ajuste inducido. E: macromolécula. L: ligando.

## Los papilomavirus

Los papilomavirus (PV) son un grupo de virus pequeños que carecen de envoltura membranosa y poseen un genoma pequeño 8 Kb formado por un ADN circular doble cadena. El mismo se alberga dentro de la partícula viral, la cual posee un diámetro de 50-55 nm y una simetría icosaédrica T7. Estos virus han sido recientemente clasificados dentro de la familia *Papillomaviridae* y se han encontrado como huéspedes de numerosas especies de vertebrados

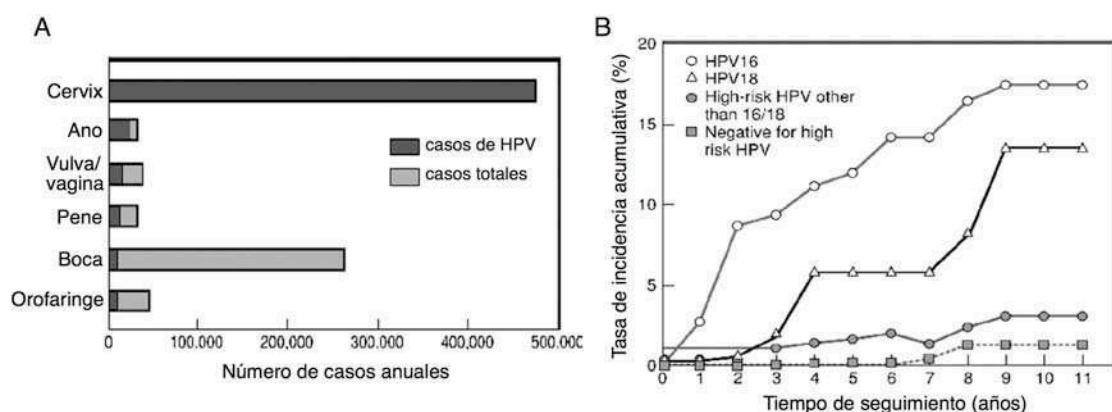


amniotas incluyendo mamíferos, reptiles y aves. No obstante, hasta el momento el virus no ha sido descrito en invertebrados ni en anfibios . Cada tipo de papilomavirus es específico para un huésped y la infección inter-especie no se ha demostrado [20].

En la actualidad se han identificado más de 200 tipos virales diferentes agrupados en 16 géneros designados por letras del abecedario griego . Los papilomavirus humanos (HPV) son los más estudiados, comprendiendo hasta el momento más de 100 tipos virales diferentes distribuidos en los géneros alfa, beta, gamma y mu. El género alfa contiene los tipos virales de mayor importancia médica, incluyendo todos los tipos asociados con cáncer mucoso, mientras que el género beta contiene a la mayoría de los tipos virales que producen lesiones de epitelios no mucosos como la piel [21].

#### *Papilomavirus humano y cáncer.*

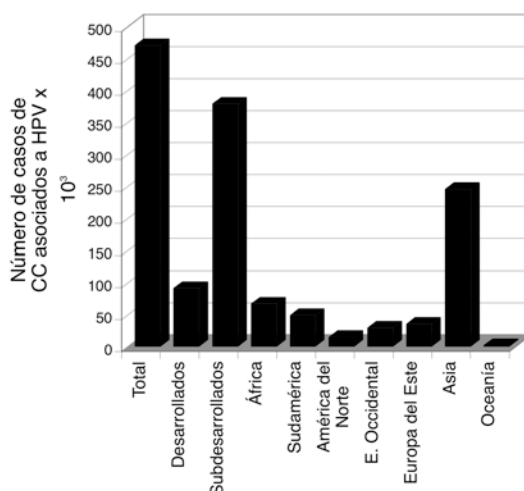
Los tipos que infectan mucosas presentan una alta especificidad de tejido y un subgrupo de éstos se encuentran claramente implicados en el desarrollo de cánceres del tracto genital, dentro de los cuales el de mayor relevancia clínica es el cáncer cervical (CC) (Figura 4A) [22]. Un porcentaje mayor al 95% de los cánceres cervicales se encuentran asociados a la infección por HPV (Figura 4A), causados en más de la mitad de los casos por el genotipo HPV-16, el cual junto con los tipos HPV-18, -31 y -45 representan cerca del 80 % del total de los casos. Estos tipos virales son denominados de "alto riesgo", mientras que tipos virales como HPV-11 y HPV-6 , que se encuentran relacionados principalmente a lesiones benignas, son denominados de "bajo riesgo" [20,22] .



**Figura 4. Relación entre cáncer del tracto genital y orofaríngeo y la infección con el virus de HPV. A)** Porcentaje de casos de HPV del total de casos de cáncer del tracto genital. **B)** Incidencia acumulativa de cáncer en función del tiempo de seguimiento para individuos infectados con diferentes tipos virales de HPV.

Se considera que casi la totalidad de la población sexualmente activa está o estuvo en

algún momento infectada con algún tipo de HPV. En la mayoría de los casos la infección es asintomática y se resuelve espontáneamente; en otros casos, evoluciona hacia procesos cancerosos. La incidencia de CC relacionado al HPV no presenta una distribución mundial homogénea, siendo ésta más notable en países subdesarrollados (Figura 5). Esto a su vez está relacionado a servicios de salud e información sobre profilaxis, un mejor control sanitario posibilita la detección temprana y tratamientos adecuados para evitar el desarrollo tumoral.



**Figura 5. Distribución mundial de los casos de CC relacionados a HPV.** Localización regional de un total de 469.723 casos observados. Adaptado de Saverio Campo [23].

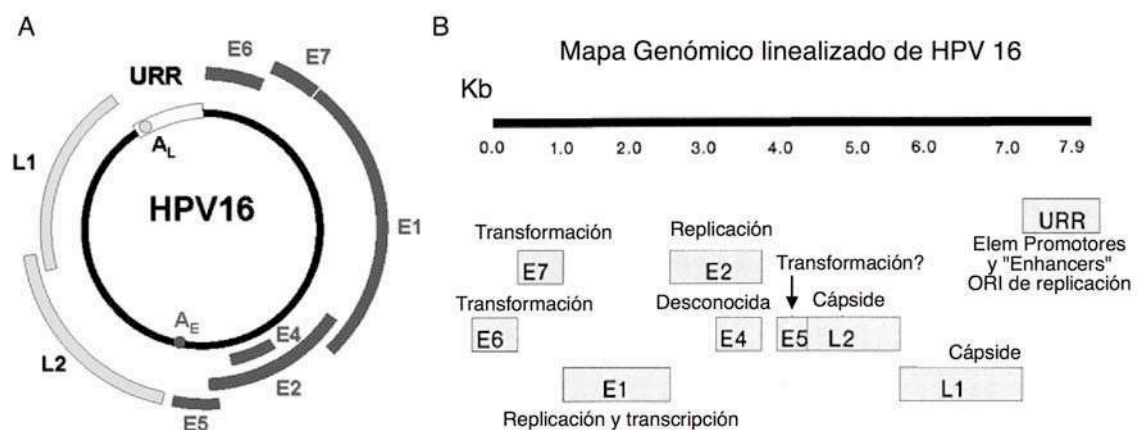
El cáncer cervical surge a través de un espectro de lesiones precursoras muy bien definidas histológicamente: las neoplasias intra-epiteliales cervicales (NIC). Estudios de seguimiento han demostrado que la infección persistente de HPV es pre-requisito para el desarrollo de un NIC de alto grado y que generalmente la infección precede en varios años los síntomas clínicos (Figura 4B) [22]. Por lo tanto, se asume que hay una valiosa y extendida ventana temporal para el diagnóstico y el tratamiento del cáncer cervical. Hoy en día, en la clínica, este tipo de lesiones es detectada rutinariamente durante programas de exploración citológica (tinción con Papanicolau) y una vez detectadas alteraciones celulares en las células epiteliales, el diagnóstico de infección por papilomavirus de tipos de alto riesgo se realiza por las técnicas de hibridización *in situ* [24,25] o por PCR [26].

Desde el año 2007 se encuentran disponibles en el mercado las vacunas profilácticas Gardasil® (Merck) que protege contra los tipos HPV-6, -11, -16 y -18 y Cervarix® (GlaxoSmithKline) contra los tipos HPV-16 y -18 [27], aunque su alto costo resulta inaccesible para la mayoría de la población en riesgo [28]. En Argentina, aproximadamente 5000 mujeres son diagnosticadas cada año con cáncer cervical y 2000 mueren a causa de esta enfermedad [29]. Actualmente, el tratamiento contra HPV fue incluido dentro del plan de vacunación

nacional, siendo gratuita la vacunación para niñas de 11 años de edad. Sin embargo, a pesar que la eficacia en la prevención de las infecciones de HPV de las vacunas es alta, estas no poseen efecto terapéutico alguno en procesos neoplásicos pre-existentes, y por lo tanto, no presentan un impacto inmediato sobre la incidencia del cáncer cervical [30]. Las vacunas terapéuticas contra HPV podrían ser utilizadas para tratar lesiones neoplásicas inducidas por el virus, teniendo por lo tanto, un efecto inmediato en la prevalencia poblacional de estas malignidades. En los últimos años, varios trabajos científicos han demostrado la eficacia terapéutica de las vacunas basadas en E7 de HPV-16, ya sea en estadio pre-clínico como clínico [31,32,33,34].

### *Estructura genómica y proteínas virales.*

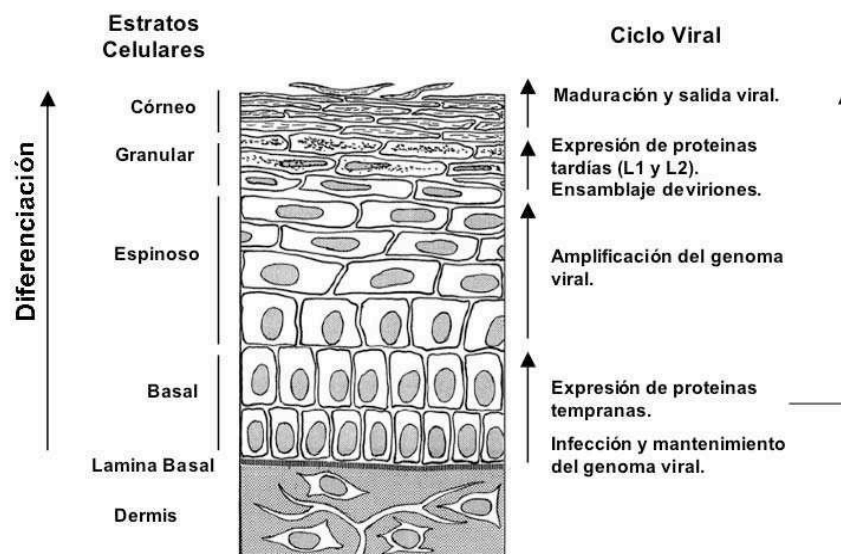
La organización genómica de los PV se encuentra altamente conservada. El genoma circular puede dividirse en tres regiones: una región regulatoria no codificante y dos regiones que codifican para los genes virales tempranos y tardíos (Figura 6). La región regulatoria URR (por *upstream regulatory región*), de aproximadamente 1 Kb, contiene elementos reguladores de la replicación y la transcripción del genoma e incluye el sitio promotor (denominado P97 en HPV-16) que regula la expresión de los genes tempranos. Los genes de expresión temprana codifican para las proteínas E1, E2, E4, E5, E6 y E7 (E por *early*). Estas proteínas intervienen en la replicación y transcripción del genoma viral (E1 y E2) o en el ciclo de vida del virus (E4, E5, E6 y E7). Los genes de expresión tardía corresponden a las proteínas L1 y L2 (L por *late*), que son proteínas de cápside (Figura 6).



**Figura 6. Genoma de HPV16.** A) Arreglo circular del genoma mostrando la región regulatoria URR y los marcos abiertos de lectura. B) Genoma linealizado mostrando la ubicación de los productos de los genes y sus funciones.

### *Ciclo de vida.*

El ciclo de vida del virus se encuentra estrechamente ligado al programa de diferenciación del epitelio que es blanco de la infección viral. La infección por papilomavirus ocurre por una lesión o interrupción de la epidermis que permite la infección de células indiferenciadas que se encuentran en la capa basal del epitelio, y que están en división activa. Sin embargo, la replicación del genoma viral y la producción de proteínas tardías y de viriones ocurren en las capas suprabasales del epitelio, en queratinocitos que se encuentran en diferenciación terminal y que por lo tanto no se encuentran en división. Dado que el virus requiere de la maquinaria celular para replicar su propio material genético, debe estimular el re-ingresso a la fase S (síntesis de ADN) de los queratinocitos suprabasales. Las proteínas tempranas E1 y E2 se expresan en las capas basales, mientras que E4, E5, E6 y E7 y las proteínas tardías se expresan en mayor nivel solamente en las capas espinosas, en queratinocitos diferenciados. Los viriones maduros se ensamblan en la capa granular, y la liberación de viriones ocurre desde el estrato córneo [35] (Figura 7).



**Figura 7. Esquema de diferenciación celular y ciclo viral de los papilomavirus.** Adaptado del Fields Virology, Figura 65-4 [36].

Estudios en modelos organotípicos demostraron que las proteínas E6 y E7 son esenciales para el cumplimiento del ciclo de vida normal del virus, ya que estimulan la re-entrada en fase S de las células suprabasales del epitelio que no se encuentran en división activa [37].

Durante la mayor parte del ciclo de vida del virus el genoma viral se mantiene en forma episomal, en un número moderado de copias, alrededor de 20 por célula. No obstante, frecuentemente en muestras de cáncer cervical se ha observado que el genoma viral se encuentra integrado al genoma del huésped. Dado que en el evento de integración generalmente se pierde

el marco de lectura del gen regulatorio E2, esto lleva a un aumento en los niveles de expresión de E6 y E7 (Figura 8).

Las proteínas E6 y E7 de los tipos de alto riesgo de HPV tienen propiedades transformantes en cultivos celulares y su expresión es requerida para el desarrollo de tumores en modelos transgénicos [38]. Dado que E2 es un regulador negativo de la expresión de E6 y E7, se supone que el evento de integración que lleva a un aumento en los niveles de expresión de E6 y E7 colabora con la progresión tumoral [39] (Figura 8).

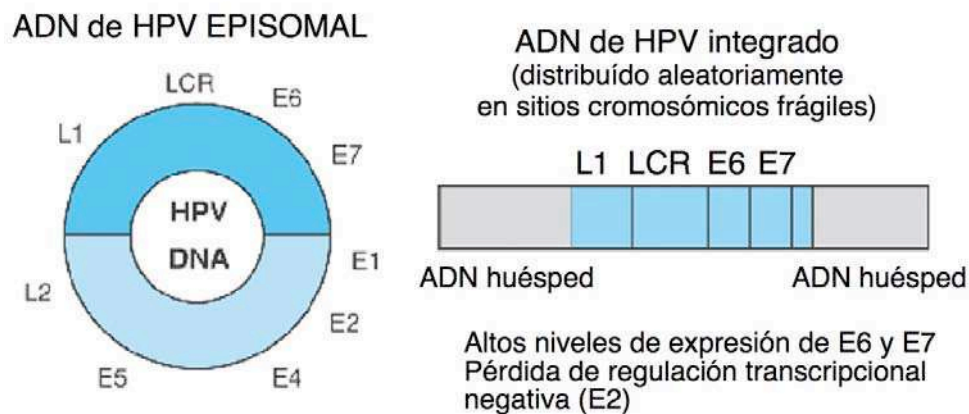


Figura 8. Fenómeno de integración del ADN viral en el genoma huésped.

## La proteína viral E7.

### Función

La proteína E7 es un pequeño polipéptido (alrededor de 100 aminoácidos) que posee la capacidad de interactuar con múltiples blancos celulares y virales (Tabla I). Dado que E7 carece de una función definida, por ejemplo de actividad enzimática, su función biológica se ha determinado a partir de las funciones que poseen las proteínas blanco a las que une (Tabla I).

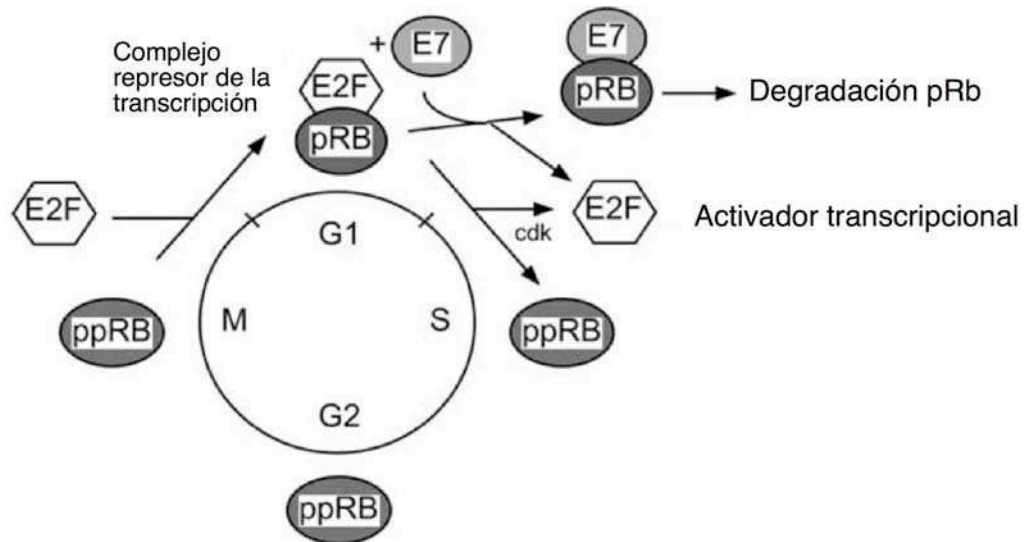
E7 cumple una función en la replicación viral y es requerida para inducir la entrada en fase S de los queratinocitos suprabasales [40]. A su vez, la sobre-expresión de E7 *in vitro* conduce a la transformación celular y se ha establecido que E7 es la oncoproteína viral que posee mayor actividad transformante del virus [41]. Esta actividad de la proteína E7 está mediada principalmente por la interacción entre E7 y la proteína supresora de tumores retinoblastoma (Rb) y también por la unión a las proteínas p107 y p130 [42,43]. La interacción entre E7 y Rb es esencial para el cumplimiento del ciclo de vida del virus en el epitelio infectado, así como para la actividad transformante de E7 en cultivos celulares [44,45].

Tabla I. Algunas de las proteínas blanco con la que interactúa E7 y sus consecuencias.

Proteína	Efecto reportado
<b>Control del ciclo celular</b>	
pRb	Degradación de Rb inducida por proteosoma Disrupción del complejo E2F-Rb
p107,p130	Desregulación del ciclo celular durante la diferenciación epitelial
p21,p27	Abrogación del efecto inhibitorio producidos por p21 y p27 sobre las quinasas dependientes de ciclinas Desregulación del ciclo celular durante la diferenciación epitelial
E2F1	Incremento de la actividad transcripcional de E2F1 independiente de Rb
E2F6	Previene la represión de la entrada a fase S del ciclo celular por E2F6.
Cyclin A/CDK2 Cyclin E/CDK2	Activación del complejo ciclina/cdk
<b>Modificadores de la cromatina</b>	
Mi $\beta$ -HDAC	Modulación de la actividad histona deacetilasa Mantenimiento del genoma viral episomal
NuMA-1	Disrupción de eventos mitóticos
<b>Reguladores de la transcripción</b>	
TBP	Modulación de la maquinaria basal de la transcripción
TAF-110	Modulación de la maquinaria basal de la transcripción
AP-1	Modulación de actividad de factor de transcripción
P300/CBP	Modulación de las actividades de coactivadores transcripcionales y acetiltransferasa.
MPP2	Modulación de actividad de factor de transcripción
<b>Otras Funciones</b>	
HPV E2	Regulación de la estabilidad de E7 HPV
P600	Transformación celular
IRF-1	Evasión de la respuesta inmune
Subunidad S4 proteosoma	Degradación Rb?
M2-PK (piruvato kinasa)	Modulación de la actividad enzimática
Alfa-glucosidasa	Modulación de la actividad enzimática

(Adaptado de Alonso *y col.* [46])

E7 bloquea el efecto inhibitorio que tiene Rb en la progresión del ciclo celular, e induce a la célula a ingresar a fase S mediante dos mecanismos conocidos: Por un lado, cuando Rb se encuentra fosforilado se une e inhibe al factor de transcripción E2F, produciendo que la célula quede retenida en fase S. La interacción entre E7 y Rb produce la disociación del complejo Rb/E2F, y revierte el efecto represor de Rb, induciendo que la célula entre en fase S. Por otro lado, E7 induce la degradación proteasomal de Rb, afectando así las funciones que cumple Rb como regulador del ciclo celular (Figura 9).



**Figura 9. Esquema del mecanismo principal por el cual E7 desregula el ciclo celular [47].**

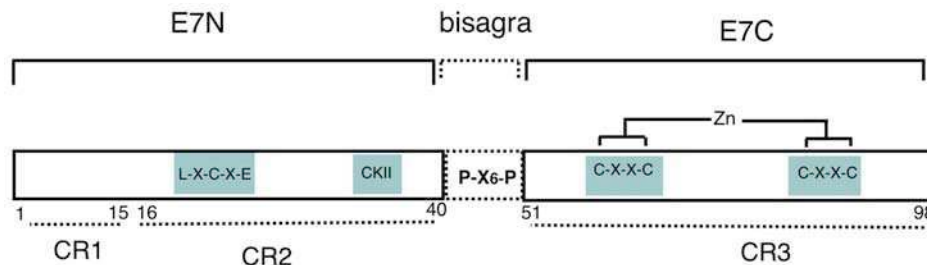
No obstante, se han descrito otros mecanismos por los cuales E7 afecta el ciclo celular independientes de Rb. E7 une otras proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular (Tabla I), y probablemente afecte la fina regulación del mismo. Por debajo del sitio de chequeo G1/S E7 interfiere directamente con los inhibidores de ciclina quinasa p21 y p27, activa cdk2-CiclinaA y E quinazas y modula la actividad HDAC en una manera coordinada. Además, E7 también se ha encontrado asociada a reguladores de la transcripción y proteínas involucradas en la modificación de las histonas (Tabla I).

#### *Arquitectura modular de la proteína E7.*

La arquitectura de la proteína E7 se encuentra conservada entre todos los papilomavirus incluyendo los HPV de alto y bajo riesgo. E7 presenta una estructura modular con dos dominios altamente conservados [48], el dominio N-terminal nativamente desplegado (E7N) (Garcia-Alai et al., 2007), y el dominio C-terminal globular que media la homodimerización y une un átomo de zinc por monómero de E7 (E7C) [49,50,51]. Estos dominios se encuentran unidos entre sí por una región poco conservada a la cual denominamos bisagra, que contiene uno o más residuos de prolina en su secuencia (Figura 10).

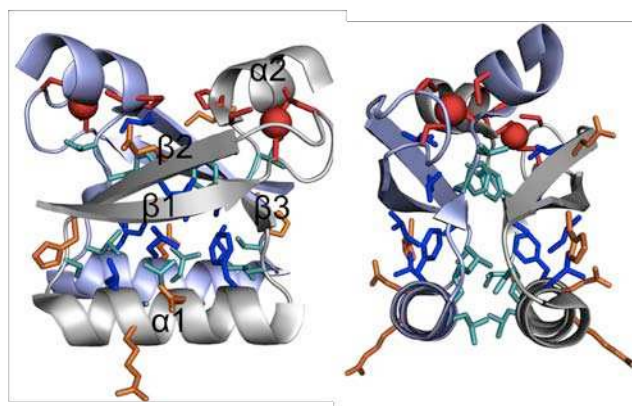
El dominio E7N abarca los primeros 40 aminoácidos de la proteína HPV-16 E7 y comprende a las regiones conservadas CR1 y CR2, quienes median la interacción con múltiples proteínas celulares y virales [52]. La región CR1, comprendida entre los residuos 1-15, guarda alta identidad de secuencia con una región homóloga de la proteína viral AdE1A; y la región CR2, comprendida entre los residuos 16-40, se encuentra conservada en AdE1A y en SV40-LT. La región CR2 incluye el motivo conservado LxCxE y un sitio de fosforilación por caseína

quinasa II (CKII) que incluye dos serinas fosforilables (Figura 10). Se ha postulado que la fosforilación cumple un rol funcional *in vivo*, ya que proteínas E7 en las cuales el sitio de fosforilación se encuentra mutado tienen una menor capacidad de inducir la entrada en fase S de queratinocitos y un menor poder transformante [53,54].



**Figura 10. Esquema de la proteína HPV-16 E7 y sus dominios.** Las regiones conservadas CR1, CR2 y CR3 están indicadas debajo del esquema y las cisteínas responsables de la coordinación del zinc se muestran por encima del esquema.

Estudios bioquímicos han mostrado que el dominio C-terminal de HPV-16 E7, el cual comprende los residuos 51-98 de la molécula, existe como dímero en solución y posee una molécula de zinc por monómero de proteína. La estructura cristalográfica de E7C fue determinada para el tipo de bajo riesgo HPV-1A E7 y la estructura en solución mediante RMN para el tipo de alto riesgo HPV-45 E7 [50,51]. Ambos casos revelaron una estructura globular y altamente conservada con una topología  $\beta_1\beta_2\alpha_1\beta_3\alpha_2$  (Figura 11).



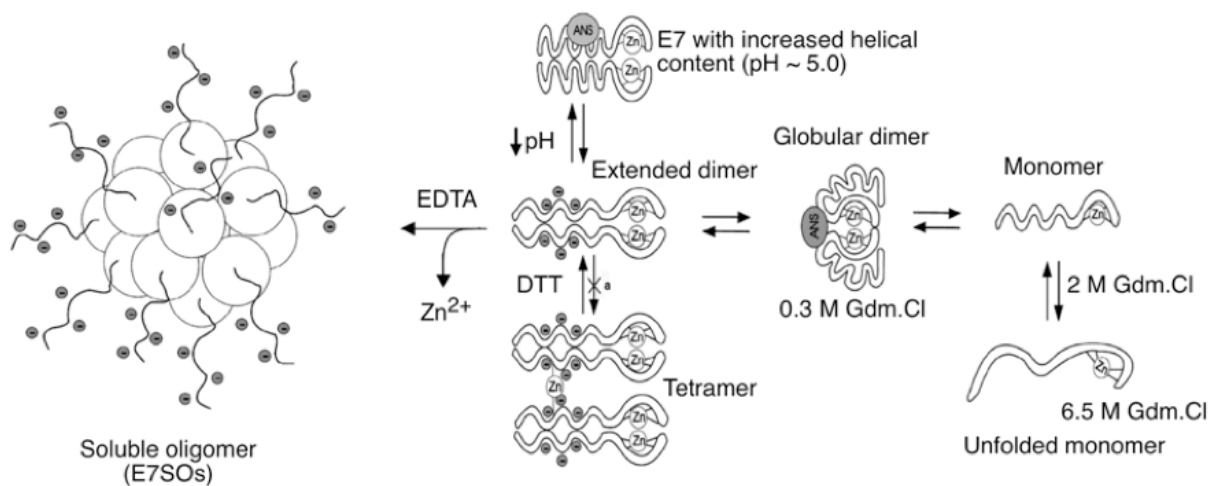
**Figura 11. Estructura del dominio E7C.** Estructura de E7C HPV-45 fue resuelta por RMN, los círculos rojos representan los átomos de zinc. Azul y celeste son los residuos que intervienen en la monomerización y dimerización, respectivamente y naranja son residuos conservados de superficie. Extraído de Chemes y col [48].

El motivo de plegamiento de E7C deriva del motivo *treble cleft* presente en los dominios PHD, LIM y RING celulares. Estos dominios son módulos de interacción proteína-proteína involucrados en la interacción con cromatina y también en la ubiquitinación de proteínas [55].



### Propiedades bioquímicas de HPV-16 E7 en solución.

Estudios de cromatografía y dispersión de luz dinámica mostraron que HPV-16 E7 presenta estructura de dímero extendido en solución y revelaron que la movilidad electroforética anómala reportada para E7 se debe a su conformación plegada pero extendida [49]. El dímero formado es débil, presentando una  $K_D$  de alrededor de 1  $\mu\text{M}$  [56]. Este dímero de E7 puede sufrir múltiples transiciones conformacionales que incluyen un equilibrio con un tetramero y con un monómero plegado [49] (Figura 12). A su vez, también se demostró que E7 es capaz de formar oligómeros solubles que tienen actividad chaperona sobre sustratos modelo, sugiriendo que E7 podría actuar como una chaperona *in vivo* [57] (Figura 12). Se ha propuesto que la gran plasticidad conformacional observada en la proteína E7 estaría relacionado con la capacidad que presenta esta pequeña proteína de unir múltiples blancos celulares y virales .



**Figura 12. Equilibrios conformacionales de la proteína HPV-16 E7.** Representación esquemática de las transiciones conformacionales presentes en la proteína HPV-16 E7. E7 existe como un dímero extendido en solución, el cual puede sufrir compactación y estar en equilibrios con la especie monomérica. El exceso de zinc conduce a la formación de la especie tetramérica, mientras que si se remueve el zinc se forma irreversiblemente la especie oligomérica de E7. Adaptado de Alonso y col. [49,57].

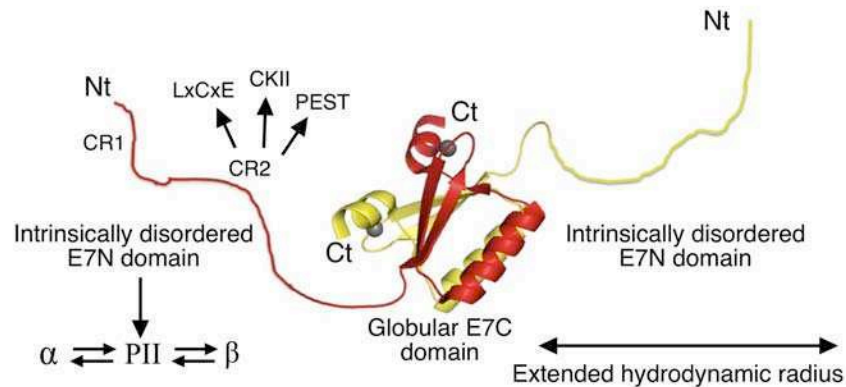
### E7 como paradigma de proteína intrínsecamente desordenada.

Recientemente se ha reconocido que muchas proteínas funcionales o segmentos largos de proteínas carecen de estructura secundaria y/o terciaria estable en solución y existen en un equilibrio dinámico de conformaciones, en oposición a lo observado en las proteínas globulares. Este grupo de proteínas se denominan intrínsecamente desordenadas (IDP) y se ha identificado que forman parte de mecanismos regulatorios claves, como lo es por ejemplo el ciclo celular [58,59]. Además se describió que muchas proteínas virales son intrínsecamente desordenadas [60].

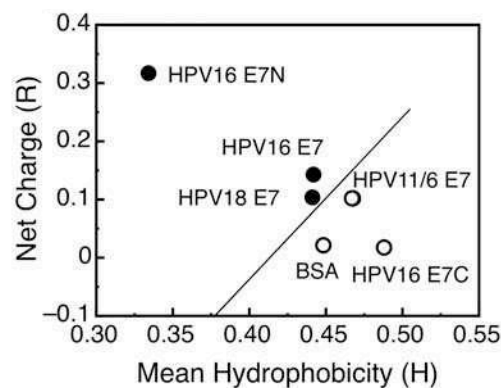
Es posible analizar el carácter "intrínsecamente desordenado" de las proteínas a través de

algoritmos que evalúan la relación entre carga neta e hidrofobicidad neta de la secuencia [58]. A partir de estos algoritmos, en 2006 se clasificó tanto a E7 como a su dominio E7N como una proteína o dominio intrínsecamente desordenado (Figura 13) [58]. Esta clasificación concuerda con el análisis biofísico de este dominio en solución que muestra una alta flexibilidad conformacional de diversas regiones y una conservación de secuencia tan alta como la hallada en dominios globulares [48,61,62].

A



B



**Figura 13. Naturaleza intrínsecamente desordenada de la proteína E7 HPV-16.** A) Representación esquemática de E7 HPV. E7 es presentada como un dímero extendido. Los equilibrios conformacionales reportados para el dominio E7N son indicados. CR1,2: regiones conservadas. LxCxE: sitio de unión a Rb, CKII: sitio de unión CKII y PEST: región de degradación. Ct: región C-terminal de la proteína. B) Algoritmo que predice contenido de IDP en las proteínas. Gráfico de carga-hidrofobicidad de las proteínas E7, separando las proteínas IDP (derecha de la línea negra) de las proteínas globulares (izquierda de la línea negra). Extraído de Alonso y *col.* [46]

Se ha determinado que el dominio E7N es el responsable del carácter no globular observado en la proteína E7 entera. Dependiendo de las condiciones químicas del medio y del estado de fosforilación, se mostró que E7N presenta diferentes equilibrios dinámicos entre una estructura desordenada y estructura secundaria de hélice alfa, lamina beta y hélice poliprolina tipo II [61,62] (Figura 13). Esta propiedad "IDP" diferencia al dominio E7N de una conformación "desordenada", e implica que su secuencia evolucionó [48] para adquirir una estructura extendida y dinámica en solución, contribuyendo a la funcionalidad de la proteína y permitiendo explicar la capacidad de unión de un alto número de blancos por una proteína

pequeña [49,62].

#### *Expresión y localización celular de E7 HPV-16.*

E7 es la proteína viral más abundante detectada en las líneas celulares humanas CaSki y SiHa, las cuales derivan de carcinoma cervical y contienen integradas copias de DNA HPV-16 en su secuencia. [63]. Cabe destacar que E7 también es la proteína viral más abundante en biopsias obtenidas a partir de tejidos cancerosos infectados con HPV-16 [64], relacionando la alta expresión de la proteína E7 con el desarrollo del cáncer.

Por otro lado, estudios realizados en nuestro laboratorio utilizando anticuerpos específicos contra las distintas especies conformacionales que puede adoptar la proteína E7, demostraron que la forma monomérica de la proteína se encuentra preferentemente en el núcleo de células derivadas de cáncer cervical y en líneas celulares transfectadas con E7 HPV-16. Mientras que la forma oligomérica de la proteína se encuentra principalmente en el citoplasma celular, siendo esta especie la más abundante en todos los sistemas celulares ensayados [65].

#### *Respuesta inmune contra E7.*

Los HPV de alto riesgo han desarrollado un complejo mecanismo de evasión de la respuesta inmune que incluye, entre otros procesos, la regulación negativa de la expresión de diversos genes activados por interferón y de genes involucrados en la presentación antigénica por medio del complejo mayor de histocompatibilidad.

No obstante, la expresión constitutiva de E7 en neoplasias ha sido extensivamente demostrada y la aparición de anticuerpos anti-E7 ocurre con alta frecuencia en pacientes con cáncer cervical [66,67,68]. Esto indica que en condiciones de sobre-expresión la oncoproteína es capaz de activar la respuesta inmune. Se ha demostrado que existe una correlación entre el desarrollo de la respuesta inmune contra E7 y el estadio de la enfermedad [69,70].

#### *El Anticuerpo monoclonal anti-E7: M1.*

Basándonos en los antecedentes planteados de la proteína E7, y conociendo la amplia utilización que poseen los anticuerpos monoclonales (AcMo) en la clínica y en la investigación, en nuestro laboratorio se ha obtenido un panel de AcMo dirigidos contra la proteína E7 HPV-16 entera. Entre éstos, el anticuerpo M1 mostró reconocer *in vivo* a la especie monomérica y oligomérica de E7 con alta sensibilidad [65]. Se demostró que el AcMo M1 es capaz de reconocer a E7 en la línea celular derivada de carcinoma cervical infectada con HPV-16 CaSki, y en la línea celular U-2 OS transfectada transientemente con el gen E7 de la cepa HPV-16 [65].

Asimismo, este anticuerpo también reconoció específicamente a E7 en células de biopsias de tejidos de adenocarcinoma positivos para HPV-16 [65] sugiriendo su posible utilización para fines diagnósticos.



**Objetivo general de la tesis**

E7 es la proteína con la mayor actividad transformante del virus y además es paradigma de proteína intrínsecamente desordenada. Dado que hasta el momento no se han efectuado estudios mecanísticos detallados que describan la interacción entre epítopes virales desordenados con anticuerpos específicos, en este trabajo de tesis nos propusimos analizar la interacción de E7 HPV-16 con el anticuerpo monoclonal M1 integrando diversas técnicas que nos permitirán la comprensión detallada del mecanismo de unión. Estos estudios proveerán información para la comprensión general del mecanismo de interacción antígeno:anticuerpo y, además ampliará el conocimiento sobre las estrategias de unión de la proteína E7 y de los epítopes intrínsecamente desordenados, los cuales se encuentran ampliamente representados en la naturaleza.



## **Capítulo I .**

# **Mapeo epitópico y análisis termodinámico de la interacción entre E7 y AcMo M1.**





Como se describió en detalle en la sección introducción, la oncoproteína viral E7 además de ser la proteína con mayor actividad transformante del papilomavirus [52] y de ser modelo de proteína intrínsecamente desordenada [58], posee gran relevancia desde el punto de vista inmunológico. Esto se debe a que anticuerpos Anti-E7 han sido detectados en sueros de pacientes con lesiones cervicales asociadas a HPV-16, confirmando que la proteína E7 es capaz de estimular la respuesta inmune humoral frente a la infección con el virus [67]. También se ha descrito que E7 es capaz de activar la respuesta inmune celular citotóxica mediada por linfocitos T [71].

Por otro lado, se ha descrito que la oncoproteína E7 se expresa constitutivamente en las líneas celulares CaSki y SiHa [65,72], las cuales poseen integrado en su genoma copias del genoma de HPV-16. Además, se ha detectado E7 en biopsias de tejido cervical infectado con HPV específicamente en células tumorales pre-malignas y malignas [73,74].

Como mencionamos, dada la capacidad de inducir respuesta inmune frente a la infección con HPV de la oncoproteína E7 y de activar la respuesta T citotóxica, esta proteína es ampliamente utilizada como blanco para el desarrollo de vacunas terapéuticas [31,32,33,34]. Asimismo, la expresión constitutiva y específica de E7 en displasias pre-malignas y en células tumorales sugiere la utilización de esta proteína como blanco para el desarrollo de pruebas de diagnósticos inmunoquímico específicos contra HPV, los cuales requieren de la utilización de anticuerpos altamente sensibles y específicos.

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un panel de anticuerpos monoclonales contra E7 del virus HPV-16, entre los cuales se mostró que el anticuerpo monoclonal M1 reconoce a la oncoproteína en la líneas celulares derivada de carcinoma cervical y en células pertenecientes a tejido de adenocarcinomas positivos para HPV-16 [65].

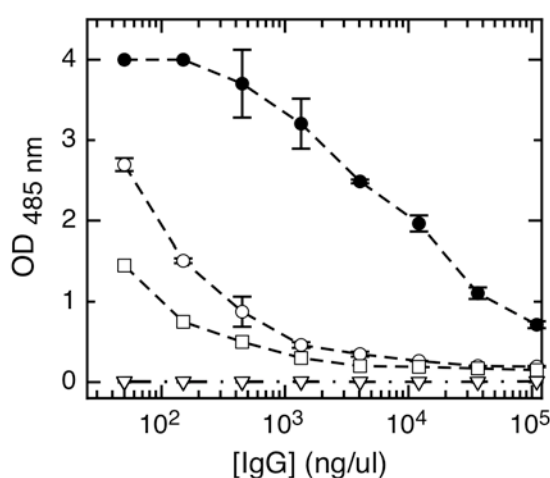
En base a estos antecedentes, en el presente capítulo nos propusimos analizar la especificidad y la afinidad de la interacción entre E7 de HPV-16 y el anticuerpo monoclonal M1, planteando como objetivos específicos:

- Determinar el grado de reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal M1 contra las proteínas E7 de HPV-18 y HPV-11.
- Determinar la estequiometría y la constante de disociación del complejo FabM1:E7.
- Analizar la influencia de la fuerza iónica en la formación del complejo FabM1:E7.
- Realizar un mapeo epitópico del anticuerpo M1 con el fin de determinar el sitio mínimo de reconocimiento antigénico.
- Analizar la especificidad del anticuerpo monoclonal M1 por E7 HPV-16.

### I.1- Reactividad de M1 frente a E7 HPV-16, -18,-11

Los tipos de HPV más relevantes clínicamente que infectan humanos son los -16 y -18, los cuales se encuentran presentes en más del 70% de los cánceres cervicales. Por otro lado, los tipos de bajo riesgo causales de lesiones benignas, como lo son las verrugas, más frecuentes en la población son los HPV -11 y -6. (ver introducción).

Con el fin de evaluar la reactividad cruzada que presenta el anticuerpo M1 por el otro tipo de HPV de mayor incidencia en CC y por el tipo de bajo riesgo HPV-11 analizamos la reactividad del AcMo M1 frente a las proteínas E7 de los distintos tipos de HPV mediante un ensayo de ELISA (figura I.1).



**Figura I.1. Especificidad del AcMo M1.** La reactividad de los AcMo contra las proteínas E7 HPV-16 (círculos llenos), E7 HPV-18 (círculos vacíos) y E7 HPV-11 (cuadrados vacíos) se determinó por medio de un ensayo de ELISA indirecto utilizando IgG M1 o una IgG anti-E2 como control negativo (triángulos). El ensayo se llevó a cabo como se describió en la sección materiales y métodos, excepto el *buffer* que se utilizó el cual fue Tris:HCl 25 mM, NaCl 0.15 M, pH 7.4.

Como puede observarse en la figura I.1, el anticuerpo monoclonal M1 presenta una baja reactividad cruzada contra las proteínas E7 de los tipos HPV-18 y HPV-11. Los títulos que se observaron fueron 1/120.000 para el tipo HPV-16, mientras que para los tipos HPV-18 y HPV-11 fueron 1/250 y 1/100 respectivamente. Estos resultados muestran por un lado que el anticuerpo M1 presenta una alta reactividad por su antígeno E7 HPV-16. Por otro lado, muestran que el anticuerpo M1 es altamente específico para la proteína E7 HPV-16, ya que reconoce a los tipos virales HPV-18 y HPV-11 con una sensibilidad 480 y 1200 veces menor, respectivamente que la que posee por su proteína antígeno.

### I.2. Determinación de la estequiometría y de la afinidad del AcMo M1 por E7 HPV-16.

Si bien los ensayos de ELISA son métodos efectivos para el análisis de la reactividad de

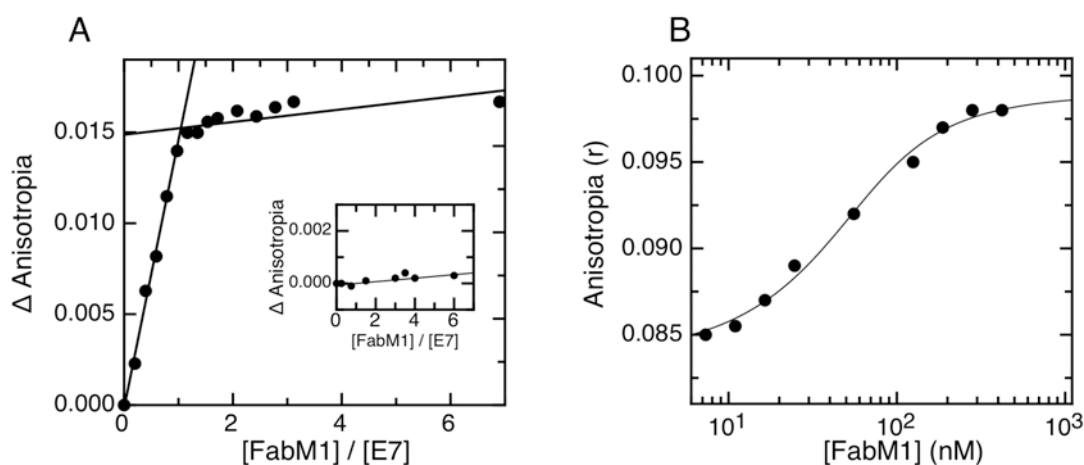
anticuerpos, no permiten una determinación precisa de las afinidades de interacción en solución. Por lo tanto, decidimos analizar la afinidad de la interacción del complejo E7:M1 utilizando métodos de espectroscopía de fluorescencia. Todos los ensayos en solución se realizaron con el fragmento Fab del anticuerpo M1 (FabM1), que posee el sitio de reconocimiento del antígeno (Introducción). El Fab se obtuvo a partir de la digestión de la IgGM1 pura con papaína, luego se purificó y se cuantificó por absorbancia a 280 nm (Materiales y Métodos).

Con el fin de analizar la estequiometría de la interacción realizamos experimentos de titulación al equilibrio utilizando en primer lugar como sonda la fluorescencia intrínseca del triptofano del anticuerpo. Esto fue posible dado que la proteína E7 no presenta residuos de triptofano en su secuencia (Figura I.4). Sin embargo, los cambios en la intensidad de fluorescencia observados en las titulaciones fueron menores al 5 %, dando gráficos con relación señal/ruido baja y resultados difíciles de interpretar (no mostrado). Por lo tanto, llevamos a cabo los ensayos de titulación utilizando como sonda el isotiocianato de fluoresceína (FITC) unido covalentemente al antígeno, determinando el cambio en el valor de la anisotropía de la molécula acoplada a FITC luego de la unión al ligando. En la reacción de marcación el FITC se une covalentemente al extremo amino terminal o a las lisinas de las moléculas según las condiciones de marcación (Materiales y Métodos). En el caso de E7, mediante un análisis de espectrometría de masa, se determinó que el fluoróforo se encontraba conjugado al extremo amino terminal y a la lisina 97 de la molécula (no mostrado).

El experimento se llevó a cabo en tubos separados titulando una cantidad fija de FITC-E7 a altas concentraciones (1  $\mu$ M) con cantidades crecientes de FabM1, incubando los complejos durante media hora. A altas concentraciones de proteína (condiciones estequiométricas), la señal de anisotropía aumenta de manera lineal hasta alcanzar la saturación y, registrando el cruce de dos rectas obtenidas a partir de la pendiente inicial y final de la reacción de unión es posible determinar la estequiometría.

Como puede observarse en la figura I.2A el cambio en la anisotropía alcanzó la saturación cuando se llegó a una relación molar FITC-E7:FabM1 1:1. Para el análisis de la estequiometría de la interacción fue preciso considerar que E7 es una proteína dimérica que se encuentra en equilibrio con la especie monomérica, con una constante de disociación de 1  $\mu$ M [56]. En las curvas de titulación en condiciones estequiométricas se utilizó una concentración de sonda FITC-E7 de 1  $\mu$ M. En esta condición, la proporción del monómero de E7 es de alrededor de el 50%. No obstante, la misma relación estequiométrica se observó en curvas realizadas a concentraciones menores de FITC-E7 (50-500 nM) donde la proporción de la especie monomérica es mayor (no mostrado). Estos resultados indican que una molécula de Fab se una

a un monómero de E7.



**Figura I.2. Estequiometría y constante de disociación al equilibrio del complejo FITC-E7:FabM1** (A) Cambio en la anisotropía de fluorescencia de FITC-E7 (1 $\mu$ M) luego de la adición de cantidades crecientes de FabM1 en condiciones estequiométricas o del anticuerpo no relacionado FabED84 (inserto) (B) Cambio en la anisotropía de fluorescencia de FITC-E7 50 nM frente a la adición de concentraciones crecientes de FabM1, en condiciones sub-estequiométricas.

El cambio de anisotropía de FITC-E7 luego del agregado del anticuerpo no relacionado FabED84 se realizó como control y no se observaron cambios en la anisotropía de fluorescencia, mostrando la especificidad de la unión E7:FabM1 (Figura I.2A , inserto).

Una vez determinada la estequiometría del complejo se procedió a calcular la constante de disociación al equilibrio ( $K_D$ ). Para calcular la constante de disociación es necesario realizar las curvas en condiciones disociantes, esto es, a concentraciones entre 1/5 y 5 veces el valor de la  $K_D$ . Debido a la alta afinidad que presentó el anticuerpo por su antígeno, trabajamos en un rango de 50 nM de proteína marcada con FITC y las curvas se ajustaron aplicando el modelo de interacción 1:1 a través de la siguiente ecuación:

$$r = r_{free} + \frac{\Delta r_{int}}{2} \left\{ (x + [E7] + K_D) - \left[ (x + [E7] + K_D)^2 - 4[E7]x \right]^{0.5} \right\} \quad (I.1)$$

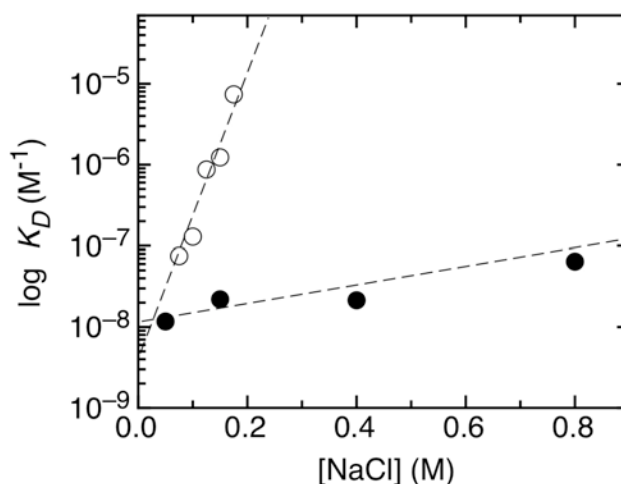
donde  $x$  es la concentración total variable de FabM1,  $\Delta r_{int}$  es la diferencia en la anisotropía de fluorescencia de FITC-E7 libre o unida formando el complejo y  $r_{free}$  es la anisotropía de fluorescencia correspondiente a FITC-E7 libre (ver materiales y métodos).

La constante de disociación del complejo [FITC-E7:FabM1] fue  $20 \pm 3$  nM, valor que corresponde a un  $\Delta G$  de -10.45 kcal/mol (Figura I.3B). Este valor es 50 veces mayor que la constante de dimerización de la proteína E7. Por lo tanto, si bien no pudimos demostrarlo, cabe la posibilidad que la unión del anticuerpo a E7 "capture" la especie monomérica de esta proteína

y desplace el equilibrio de la reacción hacia esta especie. Otro escenario podría ser que el anticuerpo reconozca una región de E7 que no intervenga en la dimerización y que dos moléculas de Fab se unan al dímero de E7 .

### I.3. Efecto de la fuerza iónica en la interacción FITC-E7:FabM1.

Basándonos en el hecho de alrededor del 25% de los residuos de la proteína E7 están cargados (Figura I.4) a PH neutro, principalmente en el dominio E7N el cual posee un punto isoeléctrico teórico de 3.6, nos propusimos estudiar el componente electrostático de la interacción entre esta proteína y el FabM1.



**Figura I.3. Dependencia de la afinidad en función de la fuerza iónica.** Los datos para FITC-E7 con el FabM1 (círculos llenos) se obtuvieron midiendo la constante de afinidad al equilibrio. La concentración de NaCl se varió en el rango 50-800 mM . Los datos para de la interacción entre E2C y el anticuerpo ED15 se obtuvieron a partir del trabajo realizado por Cerutti y *col* [75]. (círculos vacíos).

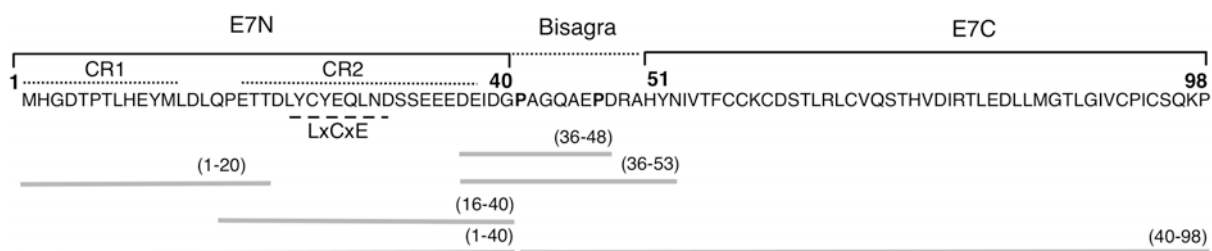
Las interacciones electrostáticas son todas las interacciones coulómbicas que se establecen entre grupos cargados, grupos polares o grupos polarizables Sheinerman [76]. Las mismas pueden perturbarse al variar la fuerza iónica del medio aumentando la concentración de alguna sal en la solución [77]. A alta fuerza iónica se produce un aumento de la constante dieléctrica del medio que atenúa los potenciales electrostáticos, debilitando las interacciones de tipo electrostático. En nuestro caso de estudio se determinó la constante de disociación del complejo variando la concentración de NaCl desde 50 mM a 800 mM. El cálculo de la constante de disociación se realizó utilizando la misma metodología que en las titulaciones al equilibrio realizadas anteriormente en el presente capítulo.

En la figura I.3 se muestran los valores de  $K_D$  del complejo FITC-E7:FabM1 en función de la fuerza iónica. Puede observarse que la  $K_D$  se vio perturbada moderadamente con la sal, observándose un aumento de la misma de aproximadamente 4 veces cuando la concentración de

sal varió de 50 a 800 nM. En el mismo gráfico se muestra comparativamente el alto componente electrostático que presenta la unión de un anticuerpo ED15 con su antígeno específico, la proteína E2 del HPV-16, estudiado en el laboratorio. En el mismo puede observarse que el valor de la constante de disociación varió aproximadamente 20 veces al modificar la fuerza iónica de 0.25 a 0.4 M [75]. Dado que a 1 M NaCl se observa una atenuación en la mayoría de los casos, el resultado presentado estaría sugiriendo que las fuerzas electrostáticas no serían las principales fuerzas mediadoras de la interacción del anticuerpo M1 con la proteína E7.

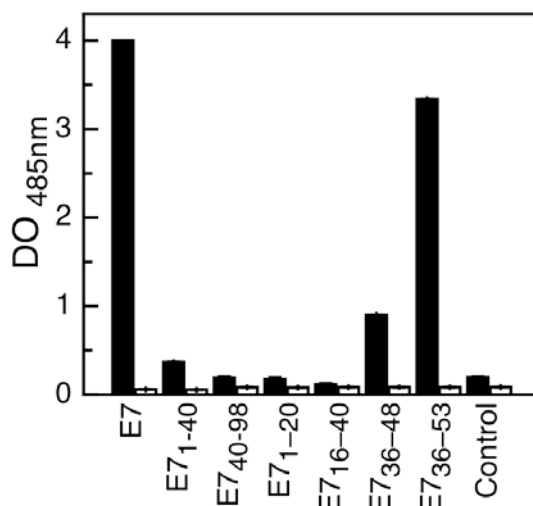
#### I.4. Mapeo epitópico del anticuerpo M1.

Con el fin de mapear la región mínima de reconocimiento del anticuerpo M1, llevamos a cabo un ensayo de ELISA utilizando como antígenos diferentes péptidos y dominios de la proteína E7 HPV-16. En la figura I.4 se muestra un esquema con la secuencia de la proteína E7 y los diferentes fragmentos utilizados para el mapeo. Como puede observarse, los diferentes fragmentos de E7 se encuentran solapados abarcando la totalidad de la secuencia de la proteína.



**Figura I.4. Regiones de E7 HPV-16 utilizadas para el mapeo del sitio de reconocimiento del anticuerpo M1.** Esquema que muestra la secuencia de la proteína E7 HPV-16 y los péptidos y dominios utilizados en el mapeo epitópico. La localización de los dominios de E7 N-terminal (E7N) y C-terminal (E7C) (línea continua) y la región bisagra se muestran sobre la secuencia. Las regiones conservadas CR1 y CR2 y el motivo de unión LxCxE a Rb se indican. Los fragmentos de E7 utilizados como antígeno en el ensayo de ELISA se muestran debajo de la secuencia con líneas continuas grises, indicando entre paréntesis los residuos que abarca cada uno.

El ensayo se llevó a cabo adsorbiendo a las placas los diferentes fragmentos y dominios de E7 HPV-16, luego se incubó con los anticuerpos utilizando una dilución 1/200 y se determinó su reactividad detectando la absorbancia a 480 nm en un lector de placas (materiales y métodos). Como control se utilizó el péptido no relacionado correspondiente a la región 337-348 de la proteína E2 del virus HPV (Control). Como anticuerpos primarios se utilizaron: el líquido ascítico del AcMo M1 y suero de ratones sin inmunizar (control negativo).



**Figura I.5. Mapeo del sitio de reconocimiento de M1.** Reactividad del AcMo M1 contra diferentes regiones de E7 HPV-16. E7: E7 HPV-16 entera (aa 1-98). Los péptidos y los dominios que comprenden las diferentes regiones de la proteína están indicados. Control: Péptido de E2 no relacionado. Barras Negras: líquido ascítico del AcMo M1. Barras Blancas: suero de ratones sin inmunizar.

Como puede observarse en la figura I.5, M1 presentó una alta reactividad por la proteína E7 entera, aunque muy baja por los dominios E7 N-terminal (E7<sub>1-40</sub>) y C-terminal (E7<sub>40-98</sub>) enteros, indicando que el anticuerpo M1 no reconoce a los dominios de E7 HPV-16 aislados como antígenos en ELISA. Según lo esperado, también se observó una baja reactividad del Ac por los péptidos que comprenden las regiones conservadas CR1 (E7<sub>1-20</sub>) y la CR2 (E7<sub>16-40</sub>) del dominio N-terminal. No obstante, el anticuerpo M1 presentó una alta reactividad por el péptido que abarca la región comprendida entre los dominios N-terminal y C-terminal de la proteína, E7<sub>36-53</sub>. Una reactividad menor, pero significativa se observó para el péptido de menor longitud E7<sub>36-48</sub>, el cual también abarca la región de E7 comprendida entre los dominios N-terminal y C-terminal.

#### *I.5. Cálculo de la afinidad del FabM1 por diferentes fragmentos de E7.*

En principio, no se pueden descartar todos los resultados negativos obtenidos en los ensayos de ELISA que utilizan péptidos sintéticos ya que la proporción de la adherencia a la placa puede variar de péptido a péptido en una mayor proporción de lo que ocurre entre proteínas globulares. Por otro lado, como se mencionó, esta técnica no nos permite obtener información cuantitativa sobre la afinidad de los complejos. Por lo tanto, con el fin de validar los resultados obtenidos a partir del ensayo de ELISA y calcular la constante de afinidad de los complejos formados entre el anticuerpo M1 y los distintos fragmentos de E7, llevamos a cabo titulaciones al equilibrio utilizando el mismo procedimiento que el realizado para calcular la afinidad del complejo FITC-E7: FabM1. Los péptidos y el dominio E7N fueron marcados con

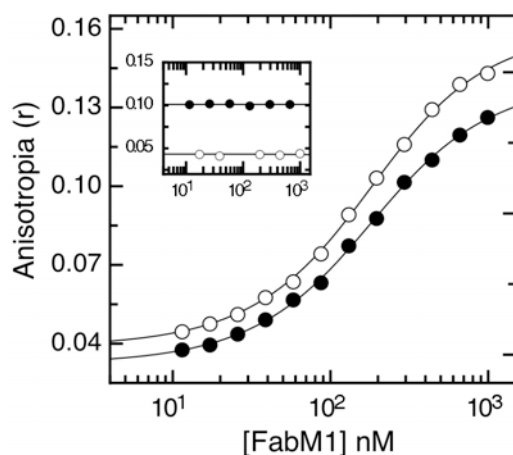


FITC y purificados por HPLC, mientras que el dominio E7C se marcó y se purificó utilizando un protocolo similar que el de la proteína entera (materiales y métodos).

Las diferentes titulaciones se realizaron incubando en tubos separados 100 nM de FITC-E7<sub>1-40</sub>, FITC-E7<sub>40-98</sub>, FITC-E7<sub>36-53</sub> y FITC-E7<sub>36-48</sub> con concentraciones crecientes de FabM1 y se determinó el cambio en la anisotropía de fluorescencia frente al agregado de FabM1 en todos los casos. Dado que ya se conocía que la estequiometría del complejo es 1:1, los datos de las titulaciones en las que se observó un cambio en la anisotropía de fluorescencia se ajustaron al mismo modelo utilizado para calcular la afinidad del complejo FITC-E7: FabM1 a partir de la ecuación I.1.

Al realizar estos ensayos no se observaron cambios en la anisotropía de fluorescencia (Figura I.6, inserto) en los dominios FITC-E7N ni FITC-E7C frente al agregado de concentraciones crecientes de FabM1, confirmando lo observado a través de los ensayos de ELISA. A su vez, estos ensayos se utilizaron como control de especificidad, descartando la posibilidad de que el anticuerpo M1 reconozca inespecíficamente a la molécula de FITC como antígeno en solución.

Las titulaciones confirmaron la asociación entre los fragmentos que comprenden la región bisagra de E7, que mostraron reactividad positiva frente a M1 en los ensayos de ELISA, E7<sub>36-53</sub> y E7<sub>36-48</sub>. El ajuste de los datos permitió calcular las  $K_D$  para los complejos, las cuales fueron de  $122 \pm 2$  y  $129 \pm 2$  nM para E7<sub>36-53</sub> y E7<sub>36-48</sub>, respectivamente (Figura I.6). Estos valores corresponden a un  $\Delta G$  de alrededor de  $-9.4$  kcal.mol<sup>-1</sup> para ambos casos. Dada la similitud en la afinidad que presentó el anticuerpo M1 por los péptidos E7<sub>36-53</sub> y E7<sub>36-48</sub> suponemos que la diferencia en la reactividad que presentó el anticuerpo por ambos fragmentos en el ensayo de ELISA se debió principalmente a una diferente adhesión de los péptidos a las placas.



### I.6 Constante de disociación al equilibrio de los diferentes complejos FITC-Antígeno:FabM1.

Cambio en la anisotropía de fluorescencia de FITC luego de la adición de cantidades crecientes de FabM1 en una cubeta que contiene 100 nM de los péptidos FITC-E7<sub>36-48</sub> (círculos vacíos) y 100 nM FITC-E7<sub>36-53</sub> (círculos llenos). Inserto: experimentos utilizando 100 nM de los dominios FITC-EN (círculos vacíos) y FITC-E7C (círculos llenos).

Al comparar las afinidades de los complejos formados entre los complejos E7: FabM1 ( $\Delta G = -10.4$  kcal/mol) y E7<sub>36-48</sub>: FabM1 ( $\Delta G = -9.4$  kcal/mol) fue posible determinar que el 90% de la energía total de unión entre E7 y M1 proviene de la unión del anticuerpo con la región de E7 comprendida entre los residuos 36-48. Por lo tanto, esta región de la proteína comprende el sitio principal de reconocimiento del anticuerpo M1, si bien podrían intervenir de modo secundario otras regiones de E7.

### I.6. Análisis de la especificidad del anticuerpo M1 por E7 HPV-16.

Una vez que acotamos mediante dos técnicas diferentes la región que comprende el epítipo mínimo de reconocimiento de E7, el cual se encuentra comprendido entre los residuos 36-48 de la proteína, quisimos evaluar la especificidad del anticuerpo M1 por su proteína antígeno. Con tal fin, realizamos un análisis comparativo de secuencia entre E7 HPV-16 y los otros tipos de HPV de mayor prevalencia en la población humana (Figura I.7). Los tipos virales HPV de alto riesgo asociados a cáncer cervical que le siguen en incidencia a los tipos HPV -16 y -18, son los tipos HPV -31, y -45. La prevalencia HPV -16 y-18 es del 70%, mientras que la de los tipos -31 y -45 es del 10%. Por otro lado, los tipos virales de bajo riesgo de mayor prevalencia en la población humana asociados a lesiones benignas son los HPV-6 y -11( 95% de los casos).

Como se mencionó en la sección introducción y puede verse en el alineamiento mostrado en la figura I.7, la región que es reconocida por el anticuerpo M1 es una región poco conservada

en la proteína E7 [78]. Esta región abarca la región final del dominio E7N, y parte de la región bisagra de la proteína.

Familia	Tipo	aa	36	aa	48
$\alpha 7$	HPV 16		<b>D E I D G P A G Q A E - P D</b>		
	HPV 31		D <b>V</b> I D <b>S</b> P A G Q A E - P D		
$\alpha 9$	HPV 18		D E I D G <b>V N H Q H L P A R</b>		
	HPV 45		- <b>G</b> L D <b>R P D</b> G Q A <b>Q</b> - <b>P A</b>		
$\alpha 10$	HPV 6		D E <b>V</b> D <b>E V D</b> G Q <b>D S</b> Q P <b>L</b>		
	HPV 11		D E <b>V</b> D <b>K V D K</b> Q <b>D A</b> Q P <b>L</b>		

**Figura I.7. Alineamiento de la región de E7-HPV16 que comprende el epítipo de reconocimiento del anticuerpo M1 contra los otros tipos virales de mayor incidencia en la población humana.** En negrita se muestran los residuos correspondientes a la secuencia de E7 HPV-16, en amarillo los residuos no conservados de los tipos utilizados en el ensayo de ELISA de reactividad cruzada y en violeta los residuos no conservados de los otros tipos virales de alta incidencia en la población.

Los tipos virales HPV-16 y HPV-31 pertenecen a la misma familia (HPV  $\alpha 7$ ) y presentan una alta identidad de secuencia, siendo la misma en la región que comprende el sitio de reconocimiento de M1 del 85%. Por lo tanto, es de esperarse que el anticuerpo M1 presente un alto grado de reactividad cruzada frente a la proteína E7 de HPV-31.

Por otra parte, la proteína E7 de los tipos virales HPV-18 y HPV-45 pertenecientes a la familia HPV $\alpha 9$  presentan una baja identidad de secuencia con E7 HPV-16. En la región que comprende el sitio de reconocimiento de M1, la identidad de secuencia entre E7 HPV-18 y -16 es del 50%, y entre E7 HPV-16 y HPV-45 es del 57%. Esto explicaría la baja reactividad cruzada que presentó M1 por E7 HPV-18 y sugiere que la reactividad por HPV-45 debería ser baja.

Por último, la proteína E7 de los tipos virales de HPV de bajo riesgo -6 y -11 presenta una identidad de secuencia con E7 HPV-16 del 50% y 57% , respectivamente. Al igual que en caso anterior, este resultado explicaría la baja reactividad cruzada que presentó M1 por E7 HPV-11 y sugiere que la reactividad por HPV-6 también debería ser baja.

Si bien es necesario determinar la reactividad de M1 por los distintos tipos virales de HPV más prevalentes en la población humana a través de, por ejemplo, un ensayo de ELISA, el análisis obtenido a partir del alineamiento nos sugiere que el anticuerpo M1 es altamente específico por E7 HPV-16 ya que sólo podría presentar un alto grado de reactividad cruzada por HPV-31, la cual pertenece a la misma familia. Éste es un resultado alentador, ya que sugiere la

posibilidad de utilizar a M1 con fines diagnósticos donde la utilización de anticuerpos altamente específicos es un requisito fundamental.

## Conclusiones

- La estequiometría del complejo E7:FabM1 fue de 1:1, indicando que una molécula de Fab une a una molécula de E7.
- Mediante dos técnicas diferentes, ELISA y ensayos espectroscópicos, se determinó que la región comprendida entre los residuos 36-48 de la proteína E7 comprende el epítipo mínimo de reconocimiento de M1.
- La constante de disociación del complejo E7:FabM1 fue de 20 nM ( $\Delta G = -10.4$  kcal/mol) mientras que la del complejo E7<sub>36-48</sub>:FabM1 fue de 120 nM ( $\Delta G = -9.4$  kcal/mol). Comparando las afinidades fue posible concluir que la región de la proteína E7 comprendida entre los residuos 36-48 aporta el 90% de la energía total de unión entre E7 y M1, constituyendo éste el sitio principal de reconocimiento del anticuerpo de M1.
- La fuerza iónica perturbó mínimamente la constante de disociación del complejo E7:FabM1, sugiriendo que las fuerzas electrostáticas no serían las principales fuerzas mediadoras de la interacción.
- La región reconocida por M1 en E7 HPV-16 se encuentra poco conservada entre los tipos virales de alto y bajo riesgo más prevalentes en la población humana. A su vez, el anticuerpo presentó una alta reactividad en ELISA por su proteína antígeno, E7 HPV-16, y una baja reactividad cruzada por los tipos virales HPV-18 y HPV-11. Estos resultados sugirieron que M1 es altamente específico por E7 HPV-16.



**Capítulo II**  
**Mecanismo cinético de la interacción entre el anticuerpo FabM1**  
**y E7Ep.**



La mayoría de los procesos biológicos dependen del encuentro específico entre moléculas, que se llevan a cabo a través de un amplio rango de afinidades y escalas temporales. La comprensión de las bases moleculares de las interacciones Ag:Ac requiere la descripción de la termodinámica y la cinética de su asociación, así como de sus estructuras. Por un lado, en el capítulo I de esta tesis analizamos la constante de disociación del complejo E7:FabM1, las cuales se relacionan con la energía libre de la formación de los complejos en un determinado entorno químico. Por otro lado, el estudio cinético de las interacciones es relevante para la comprensión de la dinámica de las interacciones en el contexto del entorno intracelular, dado que nos permiten conocer las velocidades con las cuales los complejos se forman y su tiempo de vida. Además la posibilidad de monitorear una reacción a lo largo del tiempo posibilita determinar la aparición de intermediarios no detectables al equilibrio y de esta manera disectar el mecanismo de dicha reacción. Las propiedades cinéticas de una interacción pueden modular la localización de proteínas [79], las reacciones enzimáticas [80], la respuesta de una vía de transducción de señales [81], la competencia establecida entre diferentes blancos a los que una proteína puede unirse, y la respuesta inmune frente a una infección [82], entre otros procesos.

Como se mencionó en la sección introducción, además del mecanismo clásico de reconocimiento entre moléculas denominado llave-cerradura, el cual establece que el encuentro entre dos moléculas no involucra cambios conformacionales del ligando/receptor, existen dos mecanismos en los cuales la unión específica al ligando se encuentra acoplada a cambios conformacionales, éstos son: selección conformacional (SC) y ajuste inducido (AI). En el primer caso (ver figura II.4), originalmente propuesto por Eigen como pre-equilibrio [17] y más recientemente conocido como selección conformacional (SC) [83], la macromolécula en el estado libre presenta transiciones entre dos o más conformaciones, de las cuales una es seleccionada y unida por el ligando. El segundo caso (ver figura II.4), descrito por Koshland como ajuste inducido (AI) [14], la macromolécula se une al ligando y luego cambia su conformación con el fin de optimizar la complementariedad entre las moléculas que forman el complejo. Los dos mecanismos poseen gran relevancia desde el punto de vista inmunológico. Por un lado, isomerizaciones conformacionales tanto en antígenos como en anticuerpos tiene implicancia directa sobre la expansión del repertorio de la respuesta inmune. Por otro lado, en el mecanismo de ajuste inducido se produce un aumento en la complementariedad de los sitios de interacción de las macromoléculas, aumentando la afinidad de los complejos Ag:Ac [19].

El análisis de las estructuras de las moléculas en su estado libre o unidas al ligando permiten conocer el detalle de los re-arreglos conformacionales que sufren las proteínas en la



formación de los complejos. Sin embargo, los estudios estructurales no proveen información acerca del mecanismo de unión que gobierna la formación de estos complejos. Esto se debe principalmente a que en los distintos mecanismos de interacción existen equilibrios transientes y, los intermediarios parcialmente plegados formados en la ruta de asociación tienen por lo general una vida media corta, por ende no se acumulan y es muy difícil “congelar” su estructura. A diferencia de los estudios estructurales, los estudios cinéticos son la única herramienta para el análisis de los estados de transición [84] permitiendo el estudio de intermediarios en solución. En los casos en que el cambio conformacional que ocurre en las macromoléculas es el paso limitante en la ruta de la formación del complejo, los estudios cinéticos permiten distinguir entre los mecanismos de selección conformacional y ajuste inducidos [85].

En base a estos antecedentes, en el presente capítulo nos propusimos determinar el mecanismo cinético detrás de la formación del complejo E7:FabM1. Los estudios cinéticos realizados con la proteína FITC-E7 entera dieron muy pocos cambios en la señal de anisotropía y fluorescencia durante el proceso de unión con el FabM1, por lo tanto la relación señal/ruido fue muy pequeña dando resultados difíciles de interpretar (no mostrado). Posiblemente, el cambio reducido en la señal se deba a que la sonda (FITC) se encuentra unida covalentemente al extremo N-terminal del dominio intrínsecamente desordenado de E7, a 30 residuos de distancia del sitio de unión del anticuerpo. Por lo tanto, en la presente tesis hemos focalizado nuestros estudios cinéticos en la unión del anticuerpo FabM1 al epítipo mínimo de reconocimiento de E7 mapeado en el capítulo I, E7<sub>36-48</sub> al cual denominamos E7Ep.

Los objetivos específicos planteados en el presente capítulo son:

- Estudiar la reacción de disociación complejo E7Ep:FabM1.
- Estudiar la ruta de asociación del complejo E7Ep:FabM1 determinando la constantes de asociación bimolecular y a su vez la presencia de intermediarios.
- Describir el mecanismo global que gobierna el proceso de unión y calcular las diferentes constantes cinéticas del mismo.
- Analizar si los cambios conformacionales asociados a la formación del complejo.

### II.1 Cinética de disociación del complejo E7Ep:FabM1.

En primer lugar abordamos el estudio cinético analizando la reacción de disociación del complejo FITC-E7Ep:FabM1. El experimento se realizó formando el complejo FITC-E7Ep:FabM1 en relaciones estequiométricas (400 nM) y una vez estabilizado el mismo se desplazó el complejo con un exceso de 20 veces del péptido E7Ep no modificado con FITC (ver materiales y métodos). Se monitoreó el cambio en la anisotropía de fluorescencia (Figura II.1 A) y en la intensidad de fluorescencia (Figura II.1 B) en el tiempo, medido en un equipo de flujo detenido o *stopped-flow*. Para el ajuste de los datos se utilizaron un número mínimo “n” de funciones exponenciales, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$F(t) = F_o + \sum A_n * e^{(k_n t)} \quad (2.1)$$

donde F(t) y F<sub>o</sub> corresponden a las señales observadas a un tiempo definido *t* y a tiempo cero, respectivamente. *A<sub>n</sub>* y *k<sub>n</sub>* son las amplitudes del cambio de señal y las constantes observadas para cada proceso exponencial (materiales y métodos). Para el análisis de los datos, se utilizó un criterio donde el mejor ajuste de los datos fue aquel descrito por el menor número de procesos donde se observó: 1) una dispersión al azar de residuales; 2) una desviación estándar que sea menor o igual a 1/5 del valor del parámetro; 3) una mejora en el valor del Chi cuadrado, en comparación con la función con menos parámetros con la cual se relacione.

Como puede observarse en la Figura III.1, las cinéticas de disociación se ajustaron correctamente a una función exponencial doble a partir de las cuales pudieron obtenerse las constantes observadas (*k<sub>off</sub>*) y las amplitudes (*A*) de las diferentes fases presentes en la reacción de disociación (Tabla II.1).

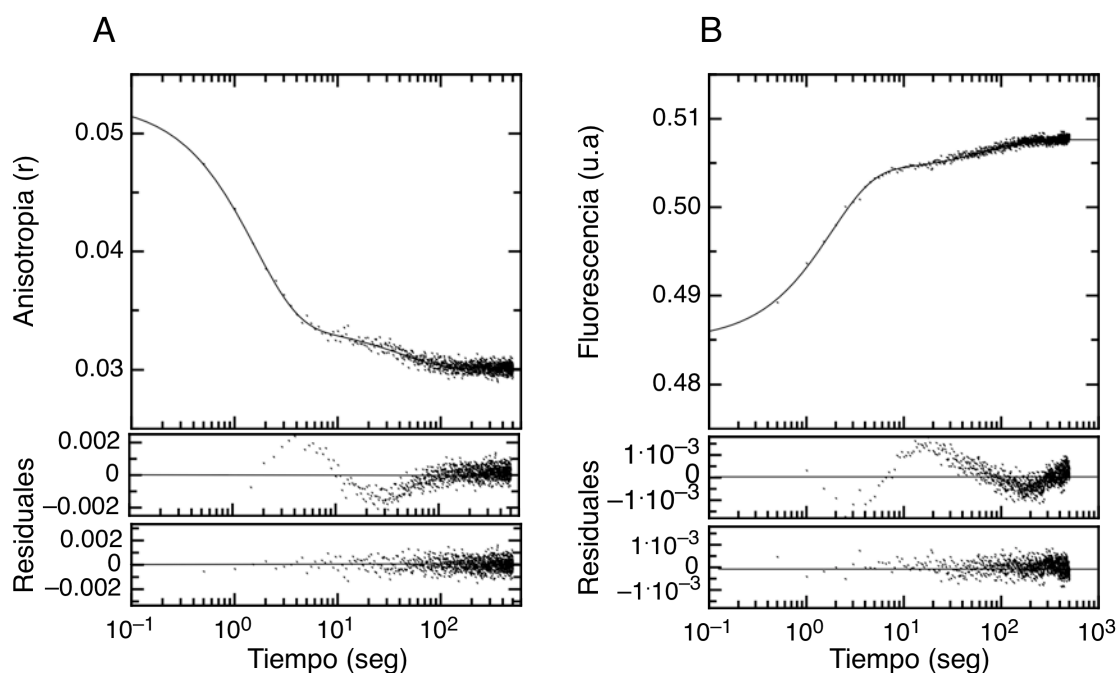
**Tabla II.I. Parámetros cinéticos de la reacción de disociación del complejo E7Ep:FabM1.**

	Intensidad de Fluorescencia	Anisotropía
<i>k<sub>off1</sub></i> s <sup>-1</sup>	0.56 ± 0.02	0.63 ± 0.05
<i>A<sub>1</sub></i> (10 <sup>-2</sup> )	1.92 ± 0.04	1.80 ± 0.20
<i>k<sub>off2</sub></i> (10 <sup>-2</sup> ) s <sup>-1</sup>	0.15 ± 0.01	0.26 ± 0.01
<i>A<sub>2</sub></i> (10 <sup>-3</sup> )	3.40 ± 0.07	3.50 ± 0.10

Los valores correspondiente a las *k<sub>off1,2</sub>* y *A<sub>1,2</sub>* se obtuvieron a partir del ajuste de las cinéticas de disociación mostrados en la Figura II.1 a una función exponencial doble.

Como se muestra en la tabla II.I los valores de las constantes observadas de disociación y de las amplitudes correspondientes a la fase más rápida y a la fase más lenta fueron muy similares por ambas metodologías. Analizando los valores de las amplitudes se observó que

alrededor del 90% del cambio de la señal corresponde a la fase rápida de disociación mientras alrededor del 10% restante corresponde a la fase lenta (Figura II.1 y Tabla II.I).



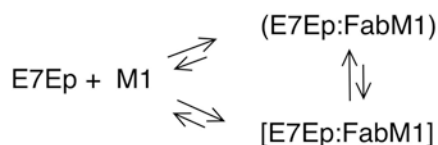
**Figura II.1. Cinética de disociación del complejo [E7Ep:FabM1].** Cambio en la anisotropía de fluorescencia de FITC (A) o en la Intensidad de Fluorescencia de FITC (B) del complejo estequiométrico [FITC-E7Ep: FabM1] luego de la adición de un exceso de 20 veces del péptido E7Ep frío. Línea continua: ajuste de los datos a una función exponencial doble. Los residuales obtenidos luego del ajuste de los datos a una función exponencial simple (paneles superiores) y a una función exponencial doble (paneles inferiores) se muestran debajo del gráfico.

La presencia de más de una fase cinética indica que el mecanismo de disociación entre E7Ep y FabM1 no sigue una ruta de dos estados, sugiriendo la presencia de al menos un intermediario poblado [86]. Dos escenarios diferentes podrían explicar lo observado en la reacción de disociación del complejo E7Ep:FabM1: i) que la ruta de disociación sea secuencial, existiendo al menos un intermediario (Esquema II.I A) ii) que la ruta de disociación sea paralela y que existan al menos dos especies en equilibrio de los complejos E7Ep:FabM1 y que disocien a velocidades diferentes (Esquema II.IB).

(A)



(B)



**Esquema II.I. Modelos preliminares de las posibles rutas de disociación del complejo E7Ep:FabM1.**  
 A) Ruta de disociación secuencial B) Ruta de disociación paralela.

Por último, el valor final de anisotropía obtenido a partir del ajuste de los datos de las cinéticas ( $r = 0.03 \pm 0.002$ ) (Figura II.1A) coincidió perfectamente con el valor inicial de anisotropía correspondiente al péptido E7Ep libre, observado en las titulaciones al equilibrio ( $r = 0.033 \pm 0.005$ , Figura. I.2). Esta concordancia indica por un lado que la disociación del complejo medida en el experimento de *stopped flow* fue completa y por el otro, que la reacción de disociación es totalmente reversible.

## II.2 Cinética de asociación del complejo E7Ep:FabM1.

### II.2.1. Cálculo de la constante de asociación bimolecular del complejo E7Ep:FabM1.

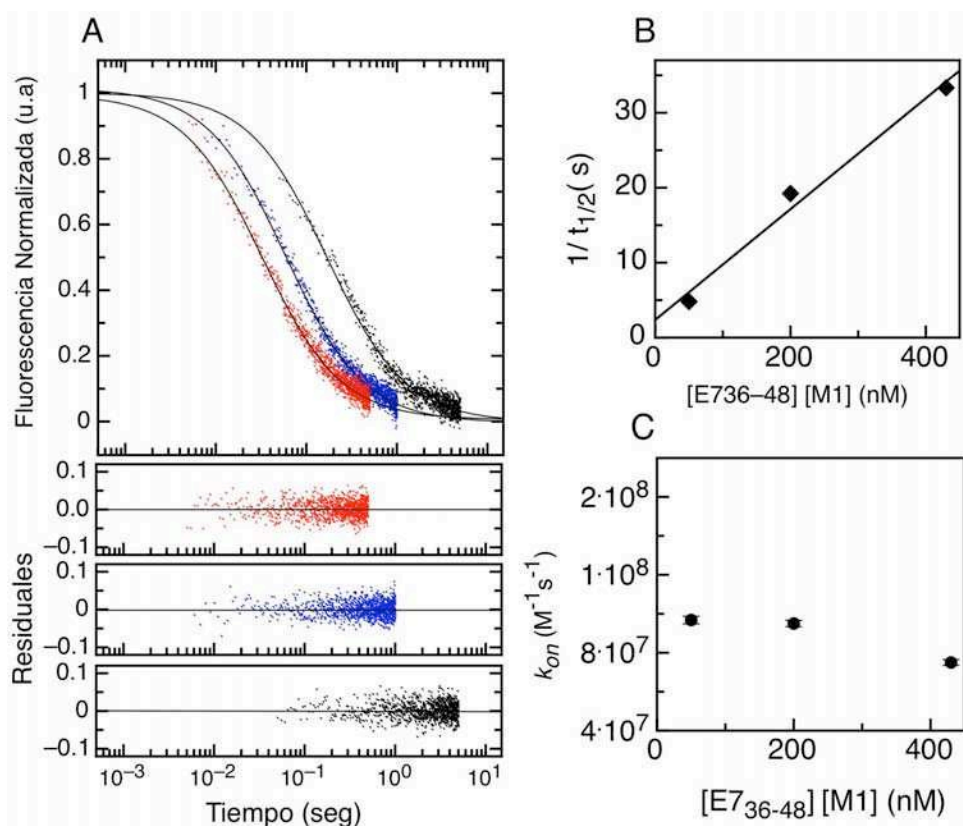
Los estudios de la cinética de asociación fueron realizados en el equipo de *Stopped-Flow*. El cálculo de la constante de asociación bimolecular se determinó en condiciones de segundo orden. Cuando las concentraciones iniciales de las dos macromoléculas son iguales, la fase de asociación puede ser determinada en estas condiciones a partir de la ecuación II.2 [87]. El experimento consistió en seguir el cambio en la intensidad de fluorescencia de FITC-E7Ep luego de la mezcla con cantidades equimolares de FabM1. Las concentraciones ensayadas fueron: 50, 200, y 430 nM. Como puede observarse en la Figura II.2, la velocidad de la reacción aumentó con la concentración, indicando la presencia del proceso de unión bimolecular. Por lo tanto, los datos cinéticos fueron ajustados a un modelo de segundo orden de acuerdo con la siguiente ecuación [87], a partir del cual se obtuvo la constante de asociación bimolecular ( $k_{on}$ ):

$$F(t) = F_0 + \left\{ \Delta F [FabM1]_0^2 k_{on} t \left( 1 + [FabM1]_0 k_{on} t \right) + c_1 t \right\} \quad (II.2)$$

donde  $Ft$  y  $F_0$  es la señal observada a tiempo  $t$  e inicial, respectivamente.  $\Delta F$  es el señal de fluorescencia durante la unión,  $[FabM1]_0$  corresponde a la concentración de anticuerpo inicial,  $k_{on}$  corresponde a la constante de asociación bimolecular y la constante  $c_1$  corresponde a un desvío lineal de la señal (materiales y métodos).

A partir del ajuste de los datos observados en la Figura II.2A se obtuvieron los valores de la  $k_{on}$  para todas las concentraciones equimolares de FITC-E7Ep y FabM1 ensayadas, los cuales resultaron ser similares en todos los casos (Figura II.2C). El valor de la  $k_{on}$  del complejo se obtuvo a partir de promediar las diferentes mediciones, dando un valor de:  $6.4 \pm 1.8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Este valor se encuentra en el orden de las reacciones limitadas por el coeficiente de difusión de

los reactantes [88], enfocándose entre las más rápidas de lo descrito para las interacciones Ag:Ac [82].

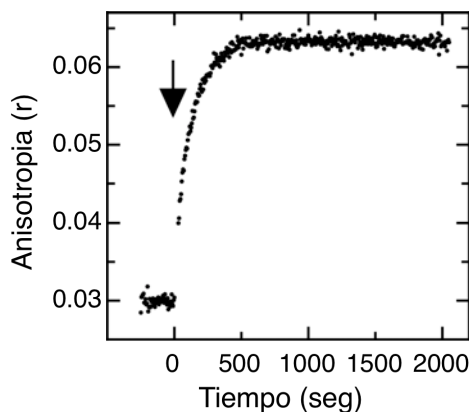


**Figura II.2. Fase de asociación bimolecular del complejo FITC-E7Ep:FabM1.** Se midió el cambio en la intensidad de fluorescencia de FITC en equipo de *Stopped-Flow* luego de mezclar FITC-E7Ep y FabM1 en concentraciones equimolares. Rojo, 430nm; Azul, 200nM; y negro, 50 nM. Los datos se ajustaron a un modelo de asociación de segundo orden y se obtuvo el valor de la  $k_{on}$ . Los residuos de los ajustes se muestran debajo del gráfico. B) Dependencia del tiempo medio de la reacción de asociación con la concentración de E7<sub>36-48</sub> y de M1. C) Valor de  $k_{on}$  obtenida a partir del ajuste de los datos a un modelo de segundo orden para cada concentración ensayada.

### II.2.2 Fase lenta de asociación del complejo FITC-E7Ep:FabM1.

Un proceso lento se observó en la reacción de asociación medida a bajas concentraciones de E7Ep y FabM1 (50 nM), donde el tiempo de medición en el equipo de *stopped flow* fue de 5 seg (Figura II.2 A). Este proceso indica la presencia de un evento adicional en la reacción de asociación y se ajustó agregándole una fase exponencial al modelo de asociación de segundo orden. Dada la lentitud de esta fase adicional, con el fin de explorar este proceso más lento en detalle, llevamos a cabo experimentos cinéticos de asociación medidos en el fluorímetro.

El experimento consistió en agregar 600 nM de FabM1 a una cubeta que contenía 100 nM de FITC-E7Ep, realizando la mezcla manualmente con un tiempo muerto de 10 seg y se monitoreó el cambio de la anisotropía de fluorescencia en el tiempo. En la figura II.3 puede observarse un incremento lento de la anisotropía de fluorescencia, el cual alcanza el equilibrio aproximadamente 10 minutos luego de la adición del anticuerpo.



**Figura II.3. Fase lenta de asociación del complejo E7Ep:FabM1.** Cambio en la anisotropía de fluorescencia en FITC luego de la adición de 600 nM de FabM1 en una cubeta que contenía 100 nM FITC-E7Ep. La adición del FabM1 (flecha negra) se estableció como tiempo cero.

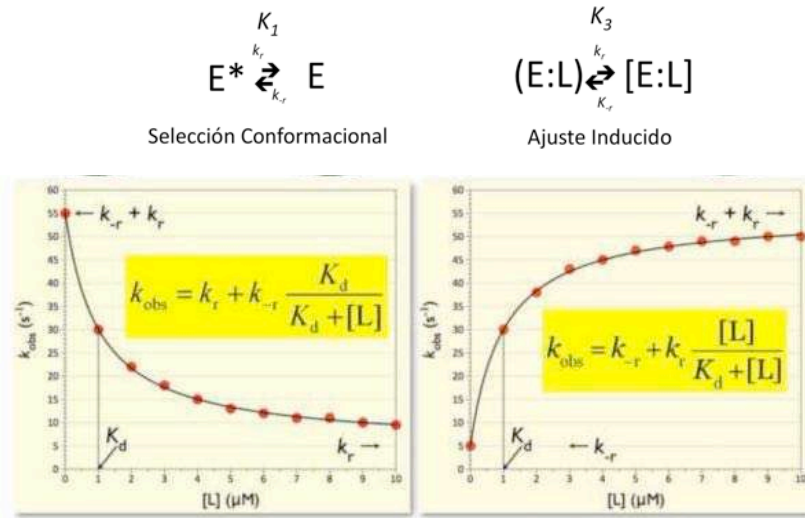
Este resultado confirma lo observado en las mediciones de asociación realizadas en el equipo de *stopped-flow* a bajas concentraciones de proteína indicando, al igual que lo observado en la ruta de disociación del complejo, la presencia de al menos un intermediario en la reacción de asociación. A partir de estos resultados fue posible establecer que el mecanismo de interacción entre el anticuerpo monoclonal M1 y E7Ep no sigue una ruta de dos estados, existiendo en el mismo eventos adicionales al de unión bimolecular.

### II.3 Mecanismo de interacción de E7Ep:FabM1.

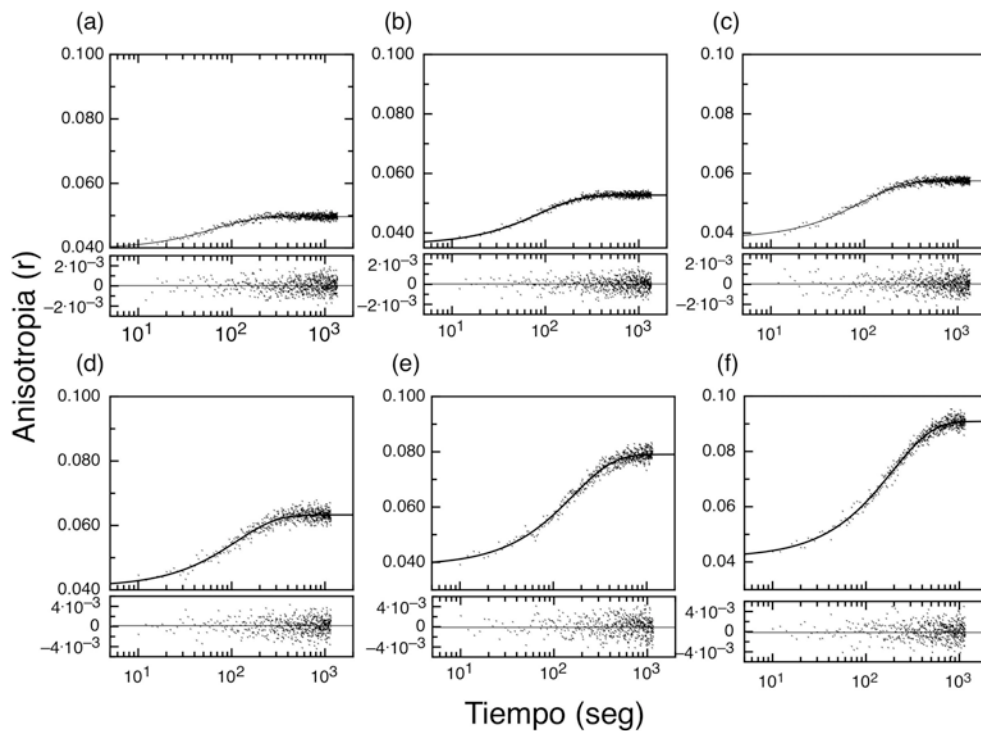
Estudiando la dependencia que presenta la constante observada de asociación lenta ( $k_{obs}$ ) con la concentración de ligando es posible, cuando el evento de unión ocurre a una velocidad mayor que el cambio conformacional, distinguir entre los mecanismos de unión denominados selección conformacional o ajuste inducido descritos anteriormente [89]. En la figura II.4 se muestra, a modo de ejemplo, las tendencias que presenta la  $k_{obs}$  en función de la concentración de ligando según qué mecanismo esté presente en la formación de los complejos y las ecuaciones de ajuste de los datos que permiten obtener las constantes microscópicas en cada caso.

Por lo tanto, con el fin de determinar el mecanismo involucrado en la formación del complejo E7Ep:FabM1 llevamos a cabo el estudio de la dependencia de la fase lenta de unión con la concentración de ligando. El experimento se realizó agregando concentraciones crecientes de FabM1 a una cubeta que contenía 50 nM de FITC-E7Ep y se monitoreó el cambio de la anisotropía de fluorescencia en el tiempo en el fluorímetro (materiales y métodos). Los datos de cada cinética individual se ajustaron a una función exponencial simple, siguiendo el

mismo criterio de ajuste utilizado en los experimentos de disociación, y se obtuvo en cada caso el valor de la amplitud y la  $k_{obs}$  (Figura II.5).

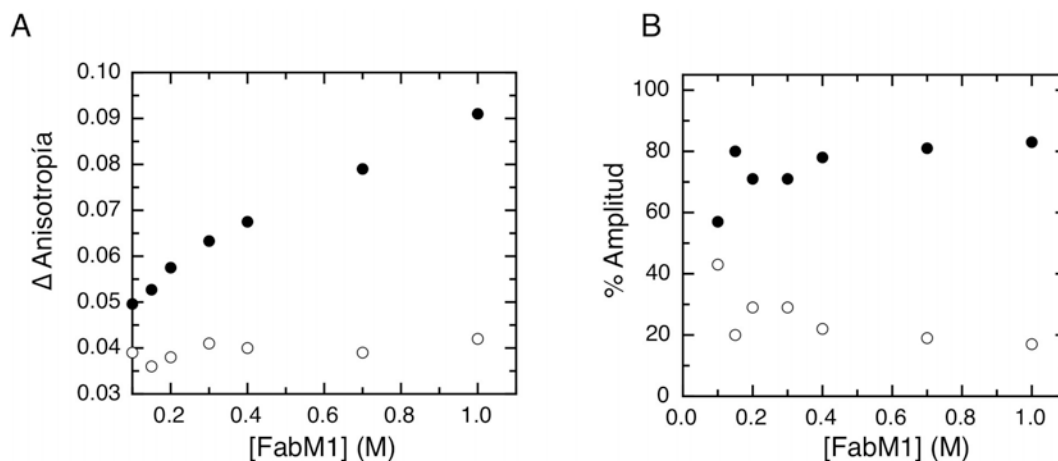


**Figura II.4. Modelos de selección Conformacional y ajuste Inducido.** Cuando el paso limitante en la ruta de unión entre dos macromoléculas es el cambio conformacional, la dependencia de la constante observada de asociación ( $k_{obs}$ ) con la concentración de ligando es diagnóstico sobre cual mecanismo esta presente. El modelo de selección conformacional (arriba a la izquierda) postula que existe un pre-equilibrio entre las conformaciones E y E\*, de los cuales solo la conformación E une el ligando. La  $k_{obs}$  forma una hipérbola inversa en función de la concentración de ligando (abajo izquierda) de la cual el valor de  $k_r$  y  $k_{-r}$  para el pre-equilibrio E-E\* puede derivarse directamente, junto con el valor de la  $K_d$  para la unión de ligando. El modelo de ajuste inducido (arriba a la derecha) postula una transición conformacional entre (E:L) y [E:L] optimizando la complementariedad del complejo. El valor de la  $k_{obs}$  es una hipérbola creciente en función de la concentración de ligando (abajo a la derecha, inserto) de la cual el valor de  $k_r$  y  $k_{-r}$  para la interconversión (E:L) [E:L], y el valor de la  $K_d$  de la unión al ligando pueden derivarse directamente. Adaptado de Vogt y col [89].



**Figura II.5. Dependencia de la concentración de la fase lenta de asociación del complejo [E7Ep:M1Fab]. (a-f)** Cambio en la anisotropía de fluorescencia de FITC luego de la adición de concentraciones crecientes de FabM1 (0.1; 0.15; 0.2 ; 0.3 ; 0.7; y 1 $\mu$ M, respectivamente) en una cubeta que contenía 50 nM FITC-E7Ep. Los datos fueron ajustados a una función mono-exponencial y los residuales se muestran debajo de cada gráfico.

El valor de anisotropía calculado a partir de extrapolar a tiempo cero las funciones exponenciales mostradas en la Figura II.5 se mantuvieron constante a todas las concentraciones ensayadas y dieron un valor promedio de  $r = 0.039$  (Figura II.6). Por otro lado, el valor de anisotropía obtenido para el péptido E7Ep libre fue de  $r = 0.031$ . A partir de estos dos valores se pudo asignar el cambio de anisotropía de la fase rápida de asociación, la cual se corresponde a la reacción de asociación bimolecular ( $R = 0.008$ ). Este valor es muy pequeño, y por este motivo en los experimentos de cinética rápida se optó por medir la intensidad de fluorescencia en condiciones de segundo orden para determinar la constante de asociación bimolecular del complejo (Figura II.2A). A diferencia de lo observado para la fase rápida, la amplitud relativa de la fase lenta de asociación fue mayor y aumentó con la concentración de FabM1, y por ejemplo para  $\text{FabM1} = 1 \text{ uM}$ , el 83% del cambio total de la anisotropía se correspondió con la fase lenta de la asociación (Figura II.6B).

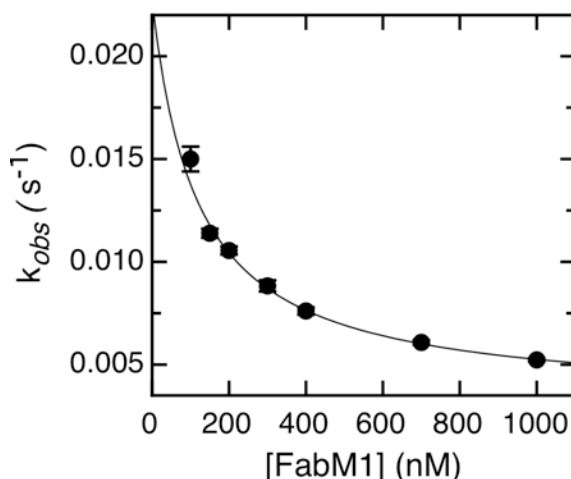


**Figura II.6. Amplitudes de la fase rápida y lenta correspondientes a la reacción de asociación del complejo E7Ep:FabM1.** A) Valores de las amplitudes obtenidas a partir del ajuste de los datos cinéticos mostrados en la Figura II.5. B) Amplitud relativa de la fase rápida y lenta de asociación.

Por otro lado, los valores de la  $k_{obs}$  obtenidas a partir de los ajustes de la Figura II.5 se graficaron en función de la concentración de FabM1. Puede observarse en la figura II.7 que existe un marcado decaimiento del valor de la  $k_{obs}$  a medida que aumenta la concentración de FabM1, indicativo de la presencia del mecanismo de SC (Figura II.7) [89]. La clara dependencia de la fase lenta de asociación con la concentración de anticuerpo nos permitió realizar un ajuste preciso de los datos para obtener las constantes microscópicas del proceso, utilizando la ecuación de ajuste detallada en la figura II.4. Asimismo, dado que el ensayo se realizó agregando concentraciones crecientes del anticuerpo, es de esperarse que la reacción de pre-equilibrio ocurra en la molécula de antígeno. No obstante experimentos adicionales hacen falta para estudiar dicha reacción, los cuales serán presentados en el siguiente capítulo de esta tesis.



Los parámetros que se obtuvieron a partir del ajuste de los datos al modelo de pre-equilibrio fueron: las constantes cinéticas de la reacción de pre-equilibrio,  $k_1 = 3.2 \pm 0.3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{-1} = 2.0 \pm 0.3 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  y la constante de disociación correspondiente al evento de unión  $K_{D2} = 1.2 \pm 0.3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  (Esquema I). A partir de estos valores se pudieron calcular las constantes de equilibrio correspondiente a la reacción de pre-equilibrio ( $K_1 = k_1/k_{-1}$ ) y al evento de unión ( $K_2 = 1/k_{D2}$ ),  $K_1 = 1.64 \pm 0.18 \cdot 10^{-1}$  y  $K_2 = 8.5 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$  (Esquema I).



**Figura II.7. Dependencia de la concentración de la fase lenta de asociación.** Los valores de la  $k_{obs}$  se obtuvieron a partir de los ajustes de las curvas mostradas en la figura III.5. Estos valores fueron ajustados a un modelo de pre-equilibrio utilizando la ecuación mostrada en la Figura II.4 [89].

Por otro lado, utilizando el valor de la  $k_{on}$  obtenida a partir de las mediciones realizadas en el equipo de *Stopped-Flow* ( $k_{on} = 6.4 \pm 1.8 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ , Figura II.2) y la  $K_{D2}$  obtenida del ajuste al modelo de pre-equilibrio, fue posible estimar la constante  $k_{-2} = K_{D2} * k_{on}$ , dando un valor de  $k_{-2} = 7.5 \pm 2 \text{ s}^{-1}$  (Esquema I).

Por último, utilizando los valores de las constantes  $K_1$  y  $K_2$ , fue posible calcular la constante global de disociación al equilibrio a partir de la siguiente ecuación:

$$K_{D(\text{global})} = (1 + K_1) / (K_1 * K_2) \quad (\text{II.3})$$

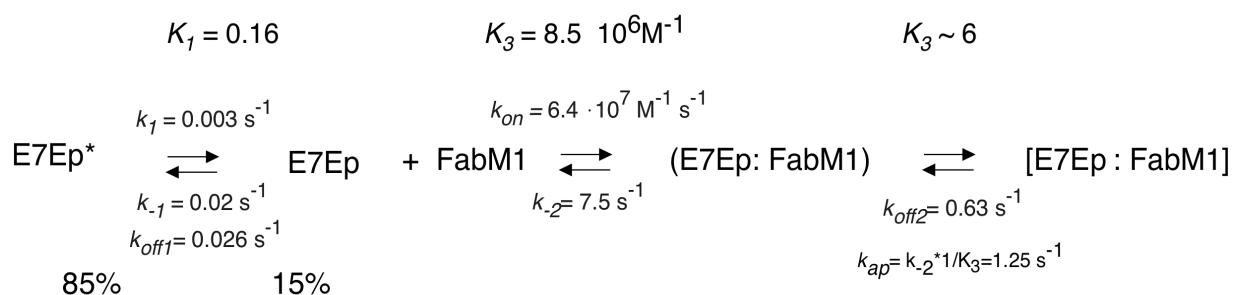
El valor de la  $K_{D(\text{global})}$  fue de  $8.3 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ , siendo el mismo alrededor de seis veces mayor que el valor de  $K_D$  obtenido independientemente a partir de las titulaciones al equilibrio,  $K_D = 1.29 \cdot 10^{-7} \text{ M}$  (Capítulo I, Figura I.2). La discrepancia observada entre ambos sugiere la presencia de un evento adicional al de selección conformacional en el proceso de reconocimiento del complejo E7Ep:FabM1.

A partir de los valores de  $K_{D\ global}$ ,  $K_1$  y  $K_2$ , pudimos estimar el valor de la constante de equilibrio para la reacción adicional propuesta,  $K_3$ , mediante la ecuación:

$$K_D = \frac{1 + K_1}{K_1 * K_2 + K_1 * K_2 * K_3} \quad (II.4)$$

Este valor fue de  $6 \pm 1.5$ . Existen otras evidencias adicionales apoyan la hipótesis acerca de la presencia de un tercer evento en el mecanismo de unión del anticuerpo M1 a E7Ep. Las mismas surgen de los estudios de la cinética de disociación del complejo en donde se observa: Por un lado, una coincidencia entre la fase lenta de disociación medida en el *Stopped-Flow*,  $k_{off1} = 0.026 \pm 0.001 \text{ s}^{-1}$  (Tabla II.1) y el valor  $k_{-1}$  obtenido a partir del modelo de pre-equilibrio,  $0.020 \text{ s}^{-1}$ . Por el otro, la fase rápida de la reacción de disociación,  $k_{off2} = 0.63 \pm 0.05 \text{ s}^{-1}$  (Tabla II.1), coincide razonablemente bien dentro del error con el modelo planteado en el esquema I, ya que, en caso que el último equilibrio del modelo sea rápido, el valor de la constante aparente debe coincidir con el producto de  $k_{-2}$  y la fracción del intermediario (E7Ep:FabM1),  $k_{-2} * 1/K_3 = 1.25 \pm 0.46 \text{ s}^{-1}$ .

En conjunto, con los resultados presentados hasta el momento utilizando una variedad de técnicas experimentales y herramientas de análisis cinéticos, fue posible construir un modelo cuantitativo del mecanismo de asociación de E7 al anticuerpo FabM1, el cual mostramos en el siguiente esquema:



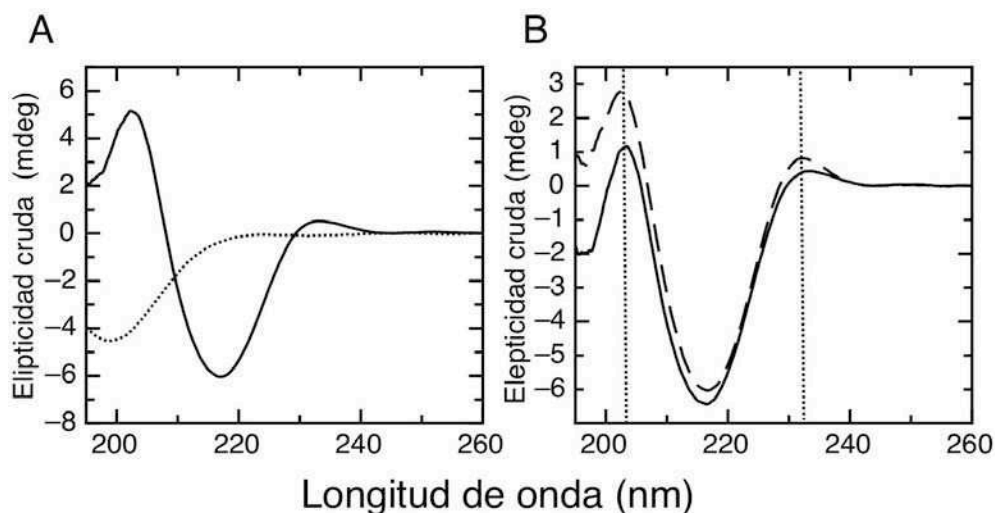
**Esquema I: Modelo mínimo que representa la formación del complejo E7Ep: FabM1.** Los valores correspondiente a  $k_1, k_{-1}, K_2$  y  $K_1$  se obtuvieron a partir del modelo de pre-equilibrio. Los valores de  $k_{off1,2}$  representan las fases de disociación obtenidas en los experimentos de *stopped-flow*. El valor de  $k_2$  se corresponde al valor de la  $k_{on}$  correspondiente a la fase rápida de asociación. Los porcentajes indican la población de cada conformero al equilibrio obtenidas a partir de las relación de las constantes cinéticas.

#### II.4 Cambios conformacionales asociados a la formación del complejo E7Ep:FabM1.

Con el fin de determinar la presencia de cambios conformacionales en la ruta de asociación del complejo llevamos a cabo experimentos cinéticos de dicroísmo circular (CD). Esta técnica espectroscópica se basa en la absorción diferencial de la luz circularmente polarizada por parte de las proteínas. Según la región del espectro que se analice, se obtendrá información de estructura secundaria en el UV cercano (180 a 260 nm) o de la estructura terciaria cuando se analice el UV lejano (260 a 340 nm). El cromóforo que absorbe en el UV lejano es el enlace peptídico (amida) y su absorptividad molar depende del tipo de estructura secundaria de la cual se encuentra formando parte. El cambio en el entorno de una proteína, como es el caso de la unión a otra proteína, puede alterar la estructura secundaria de la misma, y por lo tanto su absorptividad molar [90].

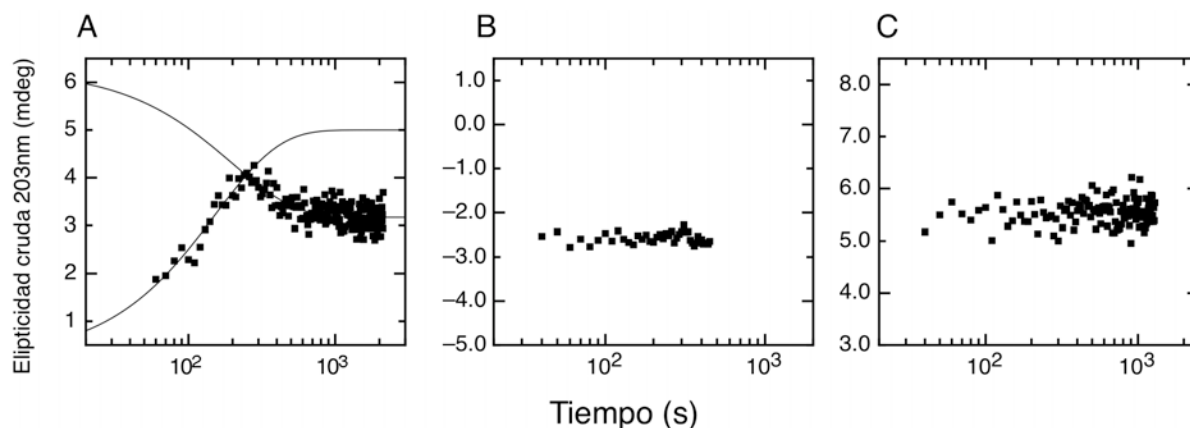
Para determinar la presencia de diferencias estructurales asociadas a la formación del complejo, medimos un espectro de CD en el UV lejano del fragmento FabM1 (Figura II.8A, línea continua) y del péptido E7Ep (Figura II.8 A, línea punteada) en su estado libre, y del complejo estequiométrico E7Ep:FabM1 luego de ser incubado por una hora (FIGURA II.8B, línea punteada). Se comparó el espectro del complejo E7Ep:FabM1 (Figura II.8B, línea rayada) con el espectro SUMA (Figura II.8B, línea continua), el cual corresponde a la suma de los espectros del E7Ep y del FabM1 en sus estados libres. En todos los casos, para minimizar la señal correspondiente al *buffer*, se utilizó: 10 mM Tris-HCl (PH 7.4) y 5 mM NaCl. Este cambio de *buffer* no afecta los parámetros a medir ya que se observó una baja dependencia de la constante de disociación del complejo E7:FabM1 con la fuerza iónica (Figura I.4).

En la figura II.8 A puede observarse que el péptido E7Ep (línea punteada) presenta un espectro típico de estructura desordenada con un mínimo a 198 nm. Por otro lado, en la misma figura se ve que el anticuerpo M1 (línea continua) presenta un espectro típico de estructura lámina-beta, estructura general de los anticuerpos (ver introducción), con un mínimo a 218 nm y un máximo a 208 nm. Al comparar el espectro del complejo E7Ep:FabM1 con el espectro suma (Figura II.7 B), pueden observarse diferencias entre los espectros a los 238 nm, y en la región comprendida entre los 218 nm y 200 nm, siendo a 203 nm la longitud de onda en donde se observó mayor diferencia.



**Figura II.8. Cambios conformacionales asociados a la formación del complejo [E7Ep:FabM1].** (A) Espectro de CD de 5  $\mu\text{M}$  FabM1 (línea continua) y 5  $\mu\text{M}$  de E7Ep (línea punteada). (B) Espectro de CD correspondiente al complejo estequiométrico [E7Ep:FabM1] incubado por una hora y espectro de CD correspondiente a la suma de los espectros individuales de E7Ep y FabM1 (línea continua). Las líneas transversales indican las longitud de onda en las cuales se observaron diferencia entre el espectro SUMA y el medido.

A continuación, analizamos los cambios observados en el espectro de CD en el tiempo durante la reacción de asociación. El experimento se llevo a cabo agregando el péptido E7Ep (5  $\mu\text{M}$ ) a una cubeta que contenía el fragmento FabM1 (5  $\mu\text{M}$ ), y monitoreando el cambio de la señal de CD en el tiempo a 203 nm. Cabe destacar que en las concentraciones  $\mu\text{M}$  utilizadas en los experimentos de CD, se espera que la fase de asociación bimolecular ocurra durante el tiempo de mezclado, el cual fue de 20 seg.



**Figura II.9. Cambios conformacionales correspondientes a la formación del complejo E7Ep:M1Fab medidos en el tiempo.** (A) Cambios en la elipticidad cruda medidos a 203 nm luego de mezclar 5  $\mu\text{M}$  E7EP con 5  $\mu\text{M}$  FabM1. La cinética muestra dos fases con amplitudes de diferentes signos las cuales se ajustaron por separados a funciones exponenciales simples. (B y C) Experimentos control correspondientes en los cuales se agregó E7Ep en la cubeta que contenía *buffer*, y *buffer* a una cubeta que contenía FabM1, respectivamente.

En la Figura II.9 se observan dos fases con amplitud opuesta en la reacción de asociación del complejo E7Ep:FabM1. Ambas fases se ajustaron a una reacción exponencial, a partir de las cuales se obtuvieron los valores de las constantes de asociación observadas. Los mismos

fueron:  $k_{obs1}$ :  $6.5 \pm 0.4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  para la fase con amplitud positiva, y  $k_{obs2}$   $5.1 \pm 0.8 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  para la fase con amplitud negativa (Figura II.8 A). Los valores de las constantes observadas obtenidas a partir del ajuste de los datos coinciden con el valor límite de  $k_{obs} = 3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  esperado para fase de pre-equilibrio a altas concentraciones de proteínas (Figura II.7).

No se observaron cambios conformacionales en los experimentos control, en los cuales se agregó E7Ep en la cubeta que contenía *buffer* (figura II.8.B), y *buffer* a una cubeta que contenía FabM1 (Figura II.8C). Estos resultados confirman que las fases observadas se deben a la formación del complejo y no al mezclado de las proteínas en la cubeta.

Los resultados cinéticos realizados en el CD sugieren que al menos una de las fases observadas en la ruta de la formación del complejo E7Ep:FabM1 corresponde a la reacción lenta de pre-equilibrio que ocurre en una de las moléculas previa a la unión al ligando. Por lo tanto, este resultado indica que la reacción de pre-equilibrio presente en la formación del complejo se encuentra acompañada de cambios en la estructura secundaria de la molécula.

## Conclusiones

- En la reacción de disociación del complejo E7Ep:FabM1 se observó la presencia de dos fases cinéticas. Este resultado indica la presencia de al menos un intermediario en la ruta de disociación.
- La velocidad de asociación bimolecular entre E7Ep y FabM1 fue de  $6 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ , este valor se encuentra entre los más rápidos para los complejos Ag:Ac.
- En la ruta de asociación del complejo se observó la presencia de una fase lenta, del orden de los minutos, adicional a la reacción de asociación bimolecular. Esto sugirió, al igual que los resultados de la cinética de disociación, que el mecanismo de reconocimiento del anticuerpo M1 a E7Ep es un mecanismo complejo que involucra más de dos estados.
- La constante de asociación lenta mostró un claro decaimiento con la concentración de FabM1 permitiendo realizar un ajuste preciso de los datos al modelo de SC, a partir del cual se obtuvieron las constantes microscópicas del proceso (esquema I).
- Los experimentos de CD indicaron que el mecanismo de selección conformacional presente en la formación del complejo se encuentra acompañado de cambios en la estructura secundaria.
- La discrepancia observada entre las constantes de equilibrio deducidas a partir del modelo cinético y aquellas medidas al equilibrio indicaron la presencia de un tercer evento en el mecanismo de unión del complejo. Nosotros hipotetizamos que este evento corresponde a un mecanismo de AI que aumenta la afinidad del complejo alrededor de 6 veces.
- La concordancia observada entre los valores de las constantes de disociación medidas en el *stopped-flow* y las constantes determinadas a partir del modelo cinético planteado en el esquema I apoyan la hipótesis que establece de la presencia del mecanismo de ajuste inducido en la formación del complejo.



### **Capítulo III**

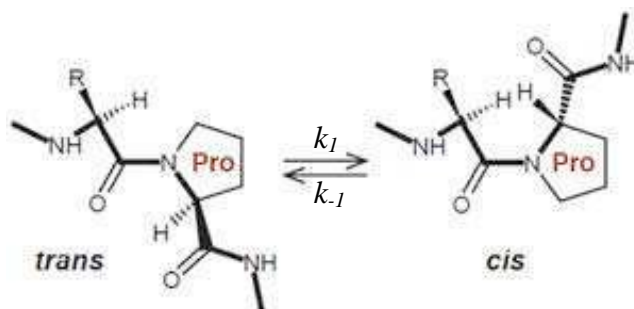
## **Rol de las Prolinas en el mecanismo de selección conformacional.**





Una vez que determinamos la presencia de un mecanismo de selección conformacional en la formación del complejo E7Ep:FabM1, nuestro siguiente objetivo consistió en caracterizar dicha reacción de pre-equilibrio.

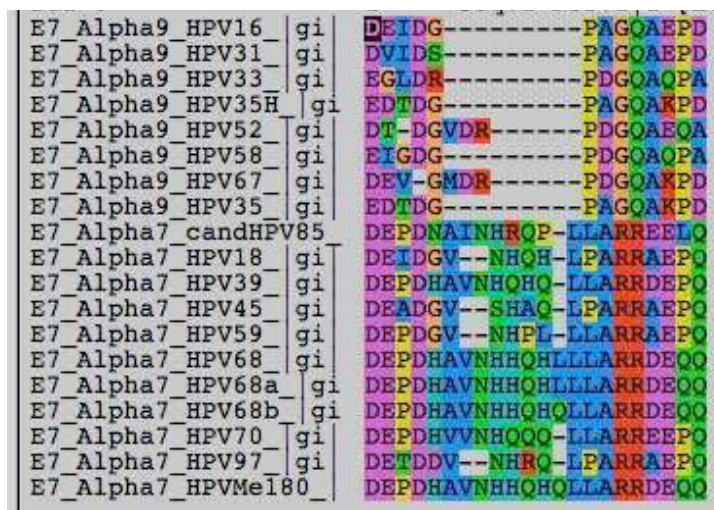
Los valores de las constantes cinéticas correspondientes a la reacción de pre-equilibrio determinadas en el capítulo anterior mostraron una reacción extremadamente lenta de alrededor de  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , encontrándose en el rango de los valores esperados para las isomerizaciones de los residuos de prolina (P). Los residuos de prolina son aminoácidos que, al ser N-sustituídos pueden presentar dos conformaciones, *cis* o *trans* (Figura III.1). Usualmente, la configuración *trans* es la más poblada en regiones desordenadas de las proteínas, con una fracción de este isómero del 90 a 60% [91]. Además, las prolinas pueden interconvertirse entre ambos isómeros, produciendo un cambio conformacional en las proteínas en el orden de los minutos.



**Figura III.1** Reacción de isomerización *trans-cis* del residuo de Prolina.  $k_1$  y  $k_{-1}$  representan las constantes de la reacción de isomerización.

Las isomerizaciones de prolina son eventos frecuentes tanto en dominios globulares como desordenados. Estas isomerizaciones se encuentran regulando procesos muy diversos, como por ejemplo: infecciones de fagos [92], señalización del receptor de estrógenos [93], plegamiento de anticuerpos [94], auto-inhibición de proteínas de señalización [95] y agregación de la proteína intrínsecamente desordenada Tau [96].

Analizando la secuencia del fragmento de E7Ep, DEIDGPAGQAEPD, se observa que posee dos residuos de prolina (subrayados en la secuencia) (P41 y P47 en la secuencia de E7 HPV-16). Con el fin de analizar la conservación en la secuencia del sitio reconocido por M1, realizamos un alineamiento de esta región de la proteína entre las familias de HPV  $\alpha$  9 y  $\alpha$  7 (Figura III.2) que comprenden los principales tipos de HPV de alto riesgo (Introducción).



**Figura III.2. Alineamiento de las familias de HPV  $\alpha$  9 y  $\alpha$  7.** La familia  $\alpha$  9 comprende los tipos de alto riesgo HPV -16, -31, -33,-35 y los de bajo riesgo -35H, -52, -58 y -67, mientras que la familia  $\alpha$  7, posee a los tipos HPV-18, 39, 45,79, y 60.

Puede observarse en el alineamiento de la figura III.2 que, si bien la región E7Ep se encuentra poco conservada en comparación a la conservación de secuencia que presentan los dominios E7N y E7C (introducción) [97], en todos los HPVs alineados existe al menos una prolina en la región correspondiente al epítipo E7Ep en HPV-16 (marcadas de color amarillo en la Figura III.2). Asimismo, se observó que las mismas se encuentran altamente conservadas en la familia HPV  $\alpha$ 9 y en los tipos virales de alto riesgo HPV -18 y -45 pertenecientes a la familia HPV  $\alpha$ 7.

Basándonos en los antecedentes mostrados, planteamos como hipótesis que la reacción de pre-equilibrio descrita en la formación del complejo E7Ep:FabM1 podría estar gobernada por un proceso de isomerización de los residuos de prolina presentes en el fragmento E7Ep. Con el fin de validar la hipótesis planteada, nos propusimos como objetivos específicos:

- Determinar en qué conformación se encuentran las prolinas presentes en el fragmento E7Ep y determinar si las mismas se encuentran como un equilibrio entre isómeros *cis* y *trans*.
- Caracterizar, en caso de que ocurra, la reacción de isomerización.
- Distinguir si la reacción de pre-equilibrio descrita en el capítulo anterior puede estar limitada a un evento de isomerización *cis-trans* de los residuos de prolina presentes en E7Ep.

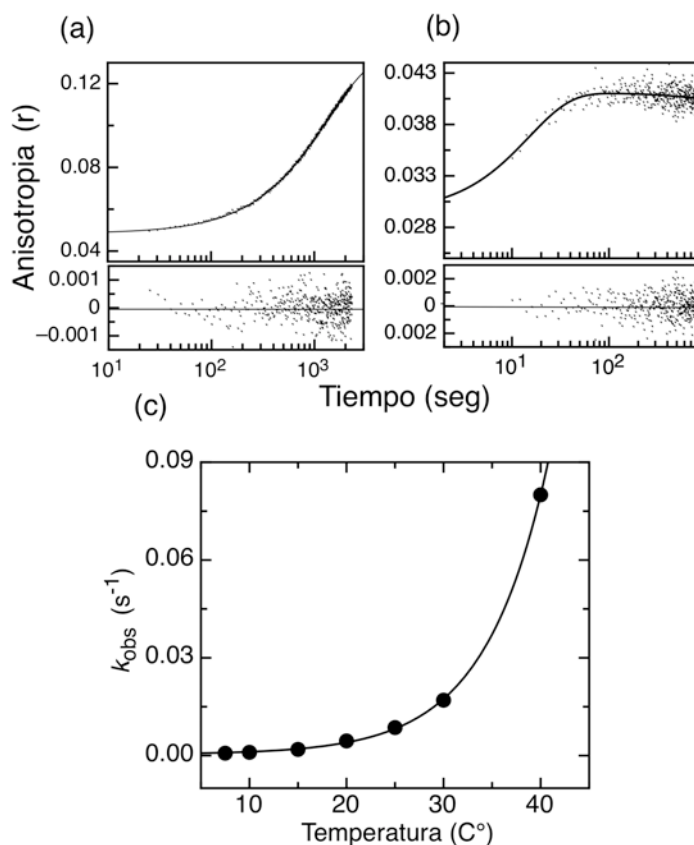
### III.1 Dependencia de la reacción de pre-equilibrio con la temperatura.

La teoría del estado de transición se utiliza para analizar la velocidad de las reacciones químicas. En ésta, las únicas entidades físicas consideradas son los reactivos, o estado basal, y las especies más inestables en la coordenada de reacción, los estados de transición (TSE<sup>‡</sup>). En el estado de transición las interacciones intermoleculares están en proceso de formación y ruptura. Este estado representa la barrera energética que tienen que superar los reactantes para proceder hacia los productos. Por lo tanto, cuanto más grande es, más lenta es la reacción y viceversa .

La dependencia de los eventos cinéticos con la temperatura es una herramienta fundamental para obtener información acerca de los intermediarios y de las barreras energéticas que los separan [98] ya que nos permiten obtener los parámetros termodinámicos del TSE<sup>‡</sup>.

Cuando las prolina presentes en péptidos o expuestas en regiones flexibles dentro de las proteínas isomerizan dicha reacción presenta una dependencia característica con la temperatura. La misma se encuentra determinada por una entalpía de activación ( $\Delta H^\ddagger$ ) cercana a las 22 kcal/mol y un cambio en la capacidad calorífica ( $\Delta C_p^\ddagger$ ) nulo. [99]. El valor de  $\Delta H^\ddagger$ , también denominado energía de activación, se relaciona con la cantidad mínima de energía interna que requieren las moléculas para iniciar la reacción.

Por lo tanto, para determinar si los residuos de prolina se encontraban involucrados en la reacción de pre-equilibrio analizamos la dependencia de la fase lenta de asociación con la temperatura (III.3). El experimento se llevó a cabo midiendo el cambio en la anisotropía de fluorescencia luego de mezclar 600 nM de FabM1 en una cubeta que contenía 100 nM de FITC-E7Ep a diferentes temperaturas. Todos los datos se pudieron ajustar a una función exponencial simple, siguiendo el mismo criterio de ajuste planteado en el capítulo anterior, obteniéndose un valor de  $k_{obs}$  en cada caso. De modo representativo en la Figura III.3 a y b se muestran las cinéticas medidas a las temperaturas extremas, 7.5 °C y 40 °C. En la Figura III.3 c se muestra el valor de la  $k_{obs}$  en función de la temperatura donde se observó un aumento exponencial.



**Figura III.3. Dependencia de la fase lenta de asociación del complejo E7Ep:FabM1 con la temperatura.** Cambio en la anisotropía de fluorescencia de FITC medido luego de adicionar 600 nM FabM1 a una cubeta que contenía 100 nM FITC-E7Ep medido a 7.5 °C (a) y a 40 °C (b). Los datos fueron ajustados a una función mono-exponencial y los residuales se muestran debajo de los gráficos. (c) Valores de la  $k_{obs}$  obtenidos a partir del ajuste de los datos de las cinéticas medidas a distintas temperaturas.

La ecuación de Eyring, la cual parte de la teoría del estado de transición y deriva de la ecuación de Arrhenius, relaciona la temperatura con la constante cinética a partir de la siguiente

$$\text{ecuación: } k_{obs} = \frac{k_B T}{h} e^{\frac{-\Delta G^\ddagger}{RT}} \quad (\text{III.1})$$

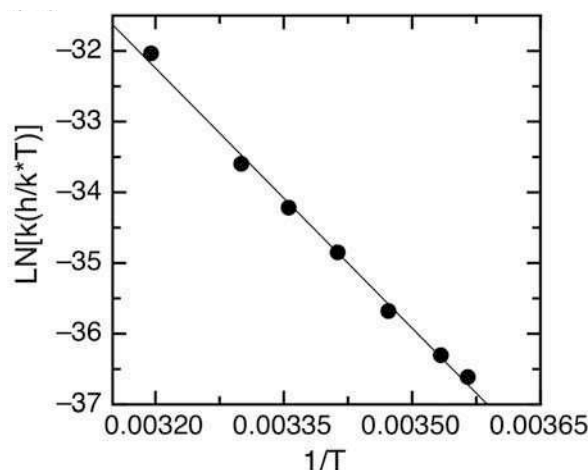
donde  $h$  es la constante de Planck,  $k_B$  es la constante de Boltzmann,  $R$  es la constante de los gases y  $T$  es la temperatura expresada en Kelvin. La misma ecuación puede re-escribirse para obtener su forma lineal teniendo en cuenta la relación  $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger$  como:

$$\ln \frac{k_{obs}}{T} = -\frac{\Delta H^\ddagger}{R} \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\ddagger}{R} + \ln \frac{k_B}{h}. \quad (\text{III.2})$$

De esta última ecuación deriva el gráfico de Eyring,  $\ln(k_{obs}h)/(k_B T)$  en función de  $1/T$ , a partir del cual puede obtenerse de la pendiente del gráfico el valor de  $\Delta H^\ddagger$  y de la ordenada al origen el valor de entropía del estado de transición  $\Delta S^\ddagger$ .

En la Figura III.4 puede observarse que el valor de la  $k_{obs}$  correspondiente a la fase lenta de asociación en función de  $1/T$  en el del gráfico de Eyring presentó una relación lineal, la cual es

compatible con reacciones que presentan  $C_p^\ddagger$  es nulo. A partir de la pendiente de la recta obtuvimos el valor de  $\Delta H^\ddagger = 24.2 \pm 0.7$  kcal/mol, y de la ordenada al origen el de  $\Delta S^\ddagger = 13.8$  cal/mol (Figura III.4). La tendencia lineal observada junto con el valor de  $\Delta H^\ddagger$  fueron compatibles con lo observado para la reacción de isomerización de los residuos de prolina [100].



**Figura III.4. Eyring Plot determinado para la fase lenta de asociación del complejo FITC-E7Ep:FabM1.** Las  $k_{obs}$  calculadas a diferentes temperaturas (Figura III.4) se graficaron en función de la temperatura y los datos fueron ajustados a una función lineal.

Por lo tanto, estos resultados apoyan la hipótesis que hemos planteado anteriormente, la cual establece que la reacción de pre-equilibrio observada en el complejo E7Ep:FabM1 podría estar gobernada por un proceso de isomerización de una o ambas prolinas presentes en el péptido E7Ep. Sin embargo, mediante este resultado no se puede descartar que la isomerización ocurra en alguna región expuesta del anticuerpo. Es por esta razón llevamos a cabo experimentos de Resonancia Magnético Nuclear (RMN) del péptido E7Ep en su estado libre.

### III.2 Análisis del péptido E7Ep por Resonancia Magnética Nuclear.

La técnica de RMN se basa en la capacidad que presentan algunos núcleos atómicos, cuando son sometidos a un campo magnético externo, de absorber radiación electromagnética en la región de las frecuencias de radio. Como la frecuencia exacta de esta absorción depende del entorno químico de estos núcleos, esta técnica se puede emplear para determinar la estructura de la molécula en donde se encuentran éstos. Asimismo, la espectroscopía de RMN se puede utilizar con fines cinéticos o termodinámicos, como presentaremos en la presente sección de la tesis.

Todos los experimentos de espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear se realizaron utilizando el péptido E7Ep en abundancia natural de  $^{13}\text{C}$ , el cual es un isótopo activo

para realizar mediciones de RMN. Sólo aproximadamente el 1% de los C presente en las proteínas son  $^{13}\text{C}$ , mientras que el  $^{12}\text{C}$ , más abundante (99%), es magnéticamente inactivo. Por esta razón, se utilizó el péptido a altas concentraciones (3 mM).

### III.2.1 Asignación de los desplazamientos químicos del péptido E7Ep.

En primer lugar para poder analizar la conformación de los residuos de prolina presentes en el fragmento E7Ep, asignamos las resonancias de todos los carbonos e hidrógenos del péptido. Los experimentos que realizamos para llevar a cabo la asignación del péptido fueron:  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC (correlación heteronuclear cuántica múltiple, de sus siglas en inglés) y  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC –TOCSY (espectroscopía de correlación total, de sus siglas en inglés),  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY y  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  NOESY (espectroscopía de efecto nuclear Overhauser). En los experimentos HMQC y TOCSY la magnetización se transfiere entre núcleos acoplados escalarmente (a través de enlaces), permitiendo por consiguiente ver las correlaciones escalares (spin-spin). En el caso del  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC se obtiene un pico de correlación entre el desplazamiento químico del  $^{13}\text{C}$  y el de los  $^1\text{H}$  directamente unido. La magnetización se transfiere del protón al carbono unido covalentemente a través de la constante de acoplamiento heteronuclear a un enlace,  $J_{\text{HC}}$ . En los espectros TOCSY la magnetización se transfiere, después de un período isotrópico de mezcla, de un protón a todos los protones que forman parte del mismo sistema de spins. Así, cada protón presenta un pico de correlación con otros protones que pertenecen al mismo sistema de spins. El grado de transferencia de la magnetización a lo largo del sistema de spins depende de la duración del tiempo de mezcla ( $t_{\text{m}}$ ) o *mixing time*. Para la asignación del péptido E7Ep realizamos la versión heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  y la versión homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ .

Por otro lado, en los espectros NOESY se pueden observar las interacciones entre protones debidas a acoplamiento dipolar (a través del espacio). Por lo tanto, la correlación entre dos señales indica que los hidrógenos, responsables de esta correlación, están cercanos en la estructura tridimensional sin importar el número de uniones químicas que los separan. La magnetización se transfiere durante un período de mezcla de un núcleo a otro cercano en el espacio; cuanto más largo es este período más largo alcance tiene la transferencia de la magnetización, correlacionando núcleos más lejanos.

A partir del análisis de los datos obtenidos en los espectros 2D pudieron asignarse todos los residuos del fragmento E7Ep (Tablas III.I y III.II). Las prolinas en *cis* y en *trans* se identificaron a partir de los desplazamientos químicos de los  $^{13}\text{C}_{\beta}$  y  $^{13}\text{C}_{\alpha}$ , los cuales difieren significativamente en ambas configuraciones [101].

**Tabla III.I. Asignación de los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para E7<sub>(36-48)</sub> (E7Ep) de los residuos asociados a las prolinas en configuración *trans* a 20°C y pH 7.5.<sup>a</sup>**

Residuo	NH	$^{13}\text{C}_\alpha$	$^1\text{H}_\alpha$	$^{13}\text{C}_\beta$	$^1\text{H}_\beta$	Otros <sup>b</sup>
<b>D36</b>		57.7	4.04	40.5	2.52/2.65	
<b>E37</b>		56.4	4.23	30.0	1.81/1.94	$\gamma$ 35.9 (2.14/2.18)
<b>I38</b>	8.20	61.1	4.04	38.6	1.76	$\gamma_1$ 27.0 (1.32/1.05), $\delta_1$ 17.2 (0.7), $\gamma_2$ 17.2 (0.77)
<b>D39</b>	8.28	54.1	4.53	41.1	2.51/2.59	
<b>G40</b>	7.97	44.5	3.91/4.01			
<b>P41</b>		63.1	4.29	31.9	2.16/1.81	$\gamma$ 26.9 (1.82/1.88), $\delta$ 49.5 (3.50/3.50)
<b>A42</b>	8.37	52.4	4.21	18.9	1.29	
<b>G43</b>	8.25	45.0	3.79/3.84			
<b>Q44</b>	8.08	55.2	4.23	29.5	1.85/1.98	$\gamma$ 33.5 (2.22/2.22), $\epsilon_2$ (6.76)
<b>A45</b>	8.29	52.1	4.20	19.2	1.25	
<b>E46</b>	8.33	54.1	4.45	29.5	1.76/1.95	$\gamma$ 35.8 (2.18/2.22)
<b>P47</b>		63.0	4.29	31.8	2.16/1.88	$\gamma$ 27.0 (1.86/1.92), $\delta$ 50.4 (3.66/3.59)
<b>D48</b>	7.87	55.8	4.22	41.9	2.42/2.52	

<sup>a</sup> Los desplazamientos químicos del  $^1\text{H}$  son reportados en ppm con una precisión de  $\pm 0.02$  ppm. Los desplazamientos químicos del  $^{13}\text{C}$  son reportados en ppm con una precisión de  $\pm 0.1$  ppm.

<sup>b</sup> Primero se muestran los desplazamientos químicos del Carbono, entre paréntesis se muestran los desplazamientos químicos del protón.

**Tabla III.II. Asignación de los desplazamientos químicos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para todos los residuos del péptido E7Ep asociados a ambas prolinas en *cis* a 20°C y pH 7.5.<sup>a</sup>**

Residuo	NH	$^{13}\text{C}_\alpha$	$^1\text{H}_\alpha$	$^{13}\text{C}_\beta$	$^1\text{H}_\beta$	Otros <sup>b</sup>
<b>G40</b>	7.94	44.1	3.61/3.89			
<b>P41</b>		62.2	4.49	34.4	2.02/2.26	$\gamma$ 24.6 (1.82/1.74), $\delta$ 50.0 (3.43/3.41)
<b>A42</b>	8.54	52.4	4.26	19.0	1.29	
<b>G43</b>	8.37	45.0	3.79/3.84			
<b>Q44</b>	8.13	55.2	4.22	29.5	1.98/1.85	$\gamma$ 33.5 (2.22/2.22)
<b>E46</b>	7.97	53.8	4.34	30.7	1.74/1.83	$\gamma$ 35.6 (2.08/2.08)
<b>P47</b>		63.0	4.57	34.0	2.15/2.18	$\gamma$ 24.2 (1.83/1.74), $\delta$ 49.7 (3.48/3.38)
<b>D48</b>	7.98	55.8	4.34	41.9	2.53/2.41	

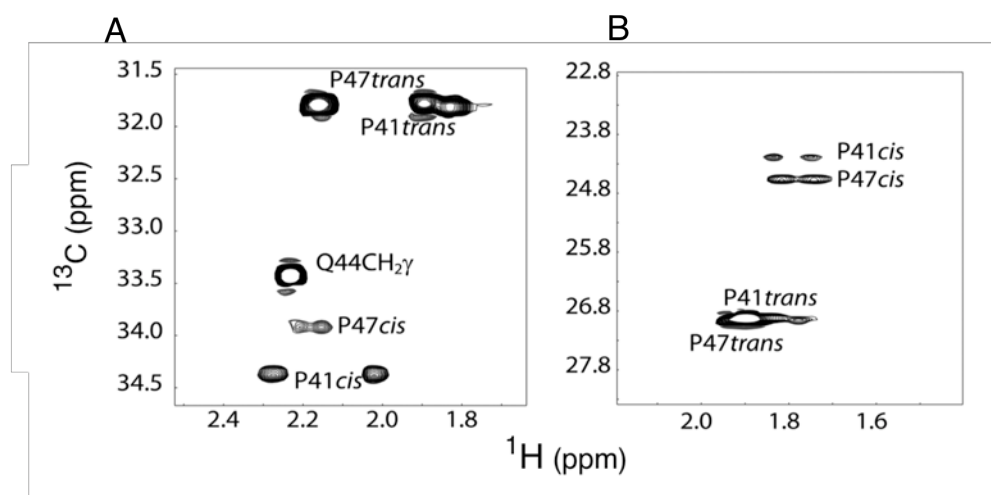
<sup>a</sup> Los desplazamientos químicos del  $^1\text{H}$  son reportados en ppm con una precisión de  $\pm 0.02$  ppm. Los desplazamientos químicos del  $^{13}\text{C}$  son reportados en ppm con una precisión de  $\pm 0.1$  ppm.

<sup>b</sup> Primero se muestran los desplazamientos químicos del carbono entre paréntesis, los desplazamientos químicos del protón.



Como se muestra en las Tablas III.I y III.II, dos grupos de señales se observaron en las regiones comprendidas entre los aminoácidos Gly-40 hasta Gln-44 y Glu-46 hasta Asp-48 de la secuencia de E7 HPV-16.

En la figura III.6 se muestra una región seleccionada del espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC correspondiente a los grupos  $\text{CH}_2$  de las posiciones  $\beta$  y  $\delta$  de las prolinas, donde pueden observarse los desplazamientos químicos de los  $^{13}\text{C}_\beta$  y  $^{13}\text{C}_\delta$ . En el caso de los isómeros *cis*, para la P41 se observa un desplazamiento químico de 34.4 y 24.6 ppm para el  $^{13}\text{C}_\beta$  y el  $^{13}\text{C}_\delta$ , respectivamente. Por otro lado, para la P47 se observó un desplazamiento químico de 34.0 y 24.2 ppm, para las mismas posiciones. En el caso de los isómeros en *trans*, los desplazamientos químicos de los mismos núcleos fueron 31.9 y 26.9 ppm para la P41 y 31.8 y 27.0 ppm para la P47 [101].

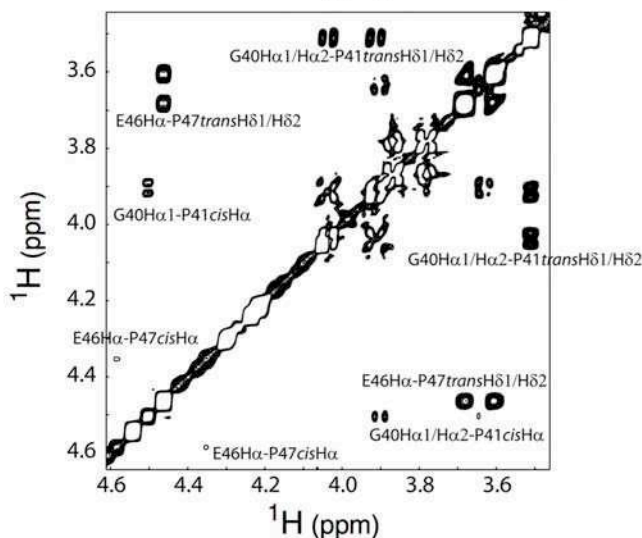


**Figura III.6. Asignación de los desplazamientos químicos del péptido E7Ep.** Región seleccionada del espectro de  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC mostrando la asignación de los desplazamientos químicos de los grupos  $\text{CH}_2$  de las posiciones  $\beta$  (A) y  $\delta$  (B) de las prolinas.

Asimismo, las conformaciones *cis* y *trans* de las prolinas también pudieron asignarse a través de los espectros NOESY. En la Figura III.7 pueden observarse los NOEs  $\text{H}_\alpha\text{-H}_{\alpha-1}$  y  $\text{H}_\alpha\text{-HN}_{i-1}$  de alta intensidad, típicos de las prolina en la conformación *trans* y los NOEs fuertes  $\text{H}_\alpha\text{-H}_{\alpha-1}$  y  $\text{H}_\alpha\text{-HN}_{i-1}$  característicos de las prolina en su conformación *cis*.

En su conjunto, los resultados de RMN indicaron que ambos residuos de prolina del péptido E7Ep se encuentran en un equilibrio conformacional *cis-trans* y que este proceso de isomerización afecta la conformación de sus residuos adyacentes. La última conclusión la determinamos teniendo en cuenta las diferencias en los desplazamientos químicos observados en las regiones comprendidas entre los aa 40-44 y aa 46-48 del fragmento E7Ep según los mismos se encuentren asociados a los residuos de prolina en la configuración *cis* o *trans* (Tablas

III.I y III. II).



**Figura III.7. Asignación de los desplazamientos químicos del péptido E7Ep.** Región seleccionada del espectro NOESY mostrando las correlaciones características de las prolinas en conformación *cis* o *trans*.

Por otro lado, a partir de integrar el volumen de las señales de los picos de correlación o *cross-peaks* presentes en los espectros  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC (Figura III.6) pudimos obtener las fracciones molares de las prolina en las conformaciones *cis* y *trans*,  $x_{cis}$  y  $x_{trans}$ . La fracción molar del isómero *cis*,  $x_{cis}$ , fue de  $0.152 \pm 0.020$  y  $0.049 \pm 0.005$  para la P41 y la P47 en las mediciones realizadas a  $30\text{ }^\circ\text{C}$ . Cabe destacar que en todas las temperaturas ensayadas el isómero *trans* es el más poblado para ambos residuos de prolina (no mostrado).

**III.2.2. Determinación de las constantes de isomerización *cis* - *trans* de los residuos de prolina presentes en E7Ep.**

Con el fin de determinar las constantes cinéticas de intercambio entre las conformaciones *cis-trans* de las prolinas presentes en E7Ep realizamos espectros de NOESY. Como se describió anteriormente, este experimento permite determinar interacciones dipolares entre protones cercanos en el espacio durante un cierto tiempo, que se denomina período de mezcla ( $t_m$ ). Si durante ese  $t_m$  ocurre el intercambio conformacional de los residuos de prolina, o sea, si se encuentran durante una fracción del  $t_m$  en la conformación *cis* y durante otra fracción en la conformación *trans*, se puede observar un pico de intercambio, correlacionando las señales de ambas conformaciones.

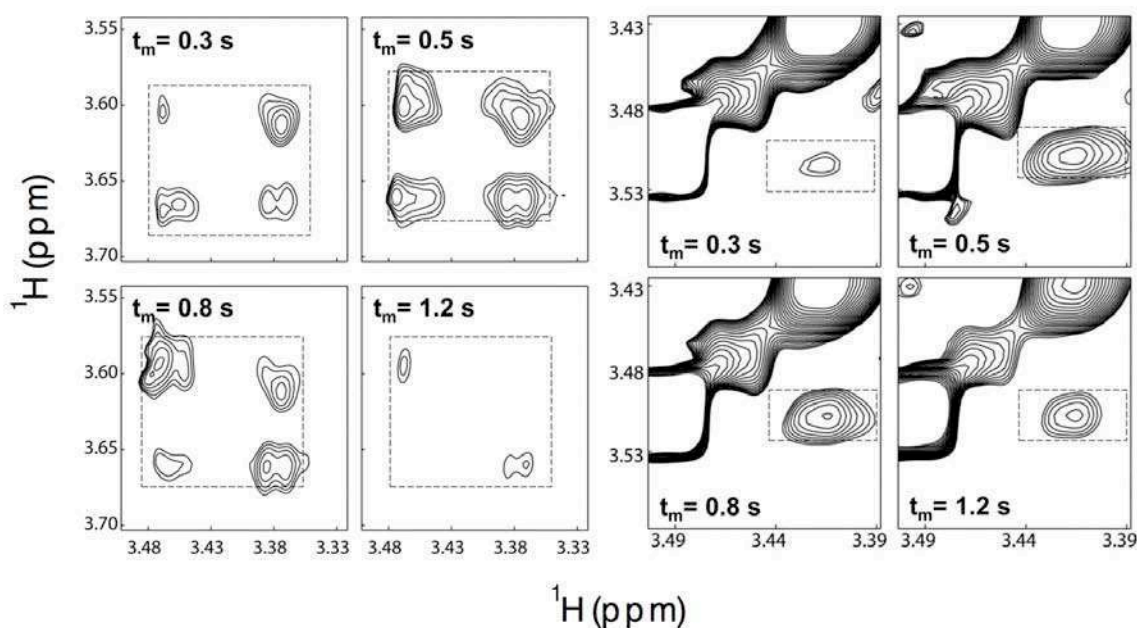
A partir del gráfico de las intensidades de los picos diagonales y de los picos de intercambio medidos a diferentes  $t_m$  puede obtenerse la constante cinética de intercambio

conformacional que para  $t_m$  cortos tienen la expresión:

$$\frac{I_{cross}}{I_{diag}}(t_m) \cong k_{ex} t_m \quad (\text{III.1}).$$

donde  $I_{cross}$  es la intensidad del pico de intercambio,  $I_{diag}$  la intensidad del pico diagonal,  $t_m$  el tiempo de mezcla y  $k_{ex}$  la constante cinética del proceso de isomerización (ver materiales y métodos).

Dado que los picos correspondientes a los  $H_a$  del conformero *trans* de las P se encontraban superpuestos, utilizamos los  $H_b$  para estimar las constantes cinéticas de intercambio. Para el caso de la P47, en donde los protones  $\delta$  presentan diferentes desplazamientos químicos en ambas conformaciones, se usó un promedio de la intensidad de los dos protones  $\delta$  para cada isómero y la media de la intensidad de los correspondientes picos de intercambio. Para P41 cuyos protones  $\delta$  resuenan al mismo desplazamiento químico en ambas conformaciones, se usó directamente esa intensidad para el cálculo. En el caso de P41 también se vieron los picos de intercambio y picos diagonales  $H_{a-i-1}$ , de los dos conformeros bien resueltos, por lo que también se usaron para el cálculo.

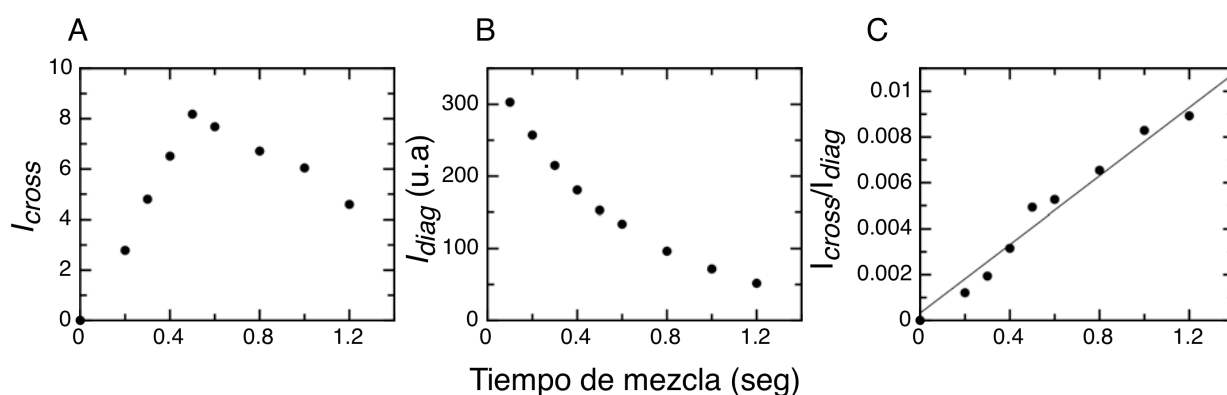


**Figura III.8. Cinética de la isomerización *cis-trans* de las prolinas estimadas por RMN.** Región seleccionada de los espectros de NOESY medidos a distintos tiempos de mezclas ( $t_m$ ) a 30 °C. Puede observarse la variación de las intensidades de los picos de intercambio correspondientes a los  $H_b$  de la P47 (panel izquierdo) y P41 (panel derecho). Los picos de intercambio se encuentran marcados con cuadrados.

En la figura III.8 se muestra una región seleccionada de los espectros NOESY en los cuales puede observarse la variación de las intensidades de los picos de intercambio del  $H_b$  de la prolinea 41 (derecha) y de la prolinea 47 (izquierda) con el  $t_m$ . Cabe destacar que en los espectros

de NOESY medidos a 20 °C no se observaron los picos de intercambio *cis-trans* de los residuos de prolina, indicando que a esta temperatura la constante de isomerización ( $k_{ex}$ ) debería ser menor al límite de detección del equipo. Por lo tanto, los experimentos NOESY se midieron a 30 °C y a 40 °C, realizándose como control espectros HMQC a las temperaturas mencionadas para corroborar la asignación (no mostrado).

Luego de procesar los datos obtenidos en los experimentos NOESY, a partir de las relación  $I_{cross}/I_{diag}$  en función del  $t_m$ , pudieron determinarse las constantes cinéticas de isomerización de las P41 y P47 del fragmento E7Ep (Tabla III.III, Figura III.8). En la Figura III.9 se muestra, utilizando como ejemplo la P41 en la configuración *cis*, como varían las intensidades de los picos diagonales y los picos de intercambio con el  $t_m$ . En el panel izquierdo de la figura puede observarse la dependencia de las intensidades del pico diagonal ( $I_{diag}$ ) en función del  $t_m$ , la cual presenta un decaimiento exponencial, debido al relajamiento transversal ( $T_2$ ) de la magnetización. En el panel del medio se muestran las intensidades de los picos de intercambio ( $I_{cross}$ ) en función del  $t_m$  en la cual se observa un rápido aumento en las intensidades y luego un decaimiento producto de la relajación. Por último, en el panel derecho de la figura se observa que  $I_{cross}/I_{diag}$  en función del  $t_m$  presenta una relación lineal, a partir de la cual se calcularon las constantes cinéticas para la isomerización de los residuos de prolina.



**Figura III.9. Cálculo de la cinética de la isomerización *cis-trans* de las prolinas estimadas por RMN.** Ejemplo de la intensidad del pico de intercambio químico ( $I_{cross}$ ) (A) y de la intensidad del pico diagonal ( $I_{diag}$ ) (B) de la P 41 en su conformación *cis* en función del tiempo de mezcla a 30 °C.. Se muestra la relación  $I_{cross}/I_{diag}$  (C). Los datos fueron ajustados según la ecuación III.I para estimar la velocidad de intercambio *cis-trans* de las prolinas.

La misma tendencia de  $I_{diag}$  y de  $I_{cross}$ , y, por ende, de la relación  $I_{cross}/I_{diag}$  con el  $t_m$  se observó para ambas prolinas del péptido en sus conformaciones *cis* y *trans* (no mostrado).

**Tabla III.III. Cinética de isomerización *cis* - *trans* de las prolinas de E7Ep medidas a diferentes temperaturas.**

T (K)		$k_1$ (s <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>	$k_{-1}$ (s <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup>	$K_{eq}$ ( $k_1/k_{-1}$ )	$K_{eq}$ (HC) <sup>c</sup>
303	<b>P41</b>	0.078 ± 0.006	0.0077 ± 0.0005	10.1 ± 2.0	5.58 ± 0.9
	<b>P47</b>	0.103 ± 0.053	0.005 ± 0.0008	20.6 ± 3.8	19.40 ± 2.1
313	<b>P41</b>	0.195 ± 0.006	0.024 ± 0.0009	8.1 ± 0.6	5.52 ± 0.7
	<b>P47</b>	0.237 ± 0.024	0.0156 ± 0.0008	15.2 ± 2.3	17.02 ± 0.4

<sup>a</sup> Constante cinética estimada para la reacción de isomerización *cis* - *trans* de las prolinas a partir de experimentos NOESY a diferentes *tiempo de mezcla*.

<sup>b</sup> Constante cinética estimada para la reacción de isomerización *trans* - *cis* de las prolinas a partir de experimentos NOESY a diferentes tiempo de mezcla.

<sup>c</sup> Constante de equilibrio obtenida de la integración del volumen de las señales de ambos isómeros en el espectro <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC.

Por otro lado, a partir de integrar el volumen de las señales de los isómeros *cis* y *trans* de las prolinas en el espectro <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC (Figura III.6) se determinó la fracción molar de cada isómero y así el valor de la constante de equilibrio ( $K_{eq}$ ) para la isomerización *cis* - *trans* en cada caso. Estos valores coincidieron ampliamente dentro del error experimental con los valores obtenidos de los experimentos NOESY, a partir de la relación entre las constantes cinéticas  $k_1$  y  $k_{-1}$ . (Tabla III.IV).

Por último, calculamos la entalpía de activación ( $\Delta H^\ddagger$ ) de la reacción de isomerización a partir de las medidas realizadas a 30 °C y 40 °C. El valor de  $\Delta H^\ddagger$  para la isomerización *trans-cis* fue de alrededor de 20.9 kcal/mol para P41 y de alrededor de 20.8 kcal/mol para P47, mientras que el valor de  $\Delta H^\ddagger$  para la reacción de isomerización *cis-trans* fue de alrededor de 16.6 kcal/mol para P41 y de alrededor de 15.1 kcal/mol para P47 (Tabla III.IV).

### III.3 Análisis comparativo entre el proceso de isomerización *cis-trans* de las prolinas presentes en E7Ep y la reacción de pre-equilibrio.

En primera instancia, analizamos comparativamente las poblaciones de cada isómero de los residuos de prolina presentes en el fragmento E7Ep con la población de las especies competentes para la unión al ligando obtenidas a partir de los experimentos cinéticos de fluorescencia (Tabla III.IV). La población del isómeros *cis* para la P41 y la P47 calculada al integrar los picos cruzados en los espectros <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C y a partir del valor de la constante equilibrio de isomerización  $K_{eq}$ , fue de alrededor del 3 a 15%. Este resultado indica que la conformación mayoritaria que poseen las P41 y P47 del fragmento E7Ep es el isómero *trans*, presentando una población de aproximadamente el 85-97%. Por otro lado, tanto el valor promedio de las amplitudes, como el de las constantes cinéticas  $k_1$  y  $k_{-1}$  obtenidas a partir del ajuste de los datos cinéticos de anisotropía (Esquema II.1) revelaron que sólo alrededor del 15% de las moléculas presentan la conformación competente para la unión, mientras que el 85% restante debe

isomerizar previo a unir el ligando (Tabla III.III) . Al comparar estos resultados se puede concluir que el porcentaje de E7Ep que poseen sus prolinas en la configuración *cis* coincide con el de la especie competentes para la unión. Esto nos permitió establecer que el evento de pre-equilibrio presente en el proceso de formación del complejo FabM1:EpE7 se debe un proceso de isomerización *trans-cis* presente un alguno de los residuos de prolina del fragmento E7Ep.

La coincidencia de los valores de las constantes cinéticas y del  $\Delta H^\ddagger$  correspondientes a la reacción de isomerización de las prolinas de E7Ep y los correspondientes a la reacción de pre-equilibrio refuerzan nuestra hipótesis. Por un lado, la reacción de pre-equilibrio presenta una  $k_f=0.003 \text{ s}^{-1}$  y un  $\Delta H^\ddagger$  de  $24 \text{ kcal.mol}^{-1}$  para la reacción de ida. Estos valores coinciden sorprendentemente con las constantes de isomerización *trans-cis* las cuales fueron de  $0.002$  y  $0.0015 \text{ s}^{-1}$  para las P41 y P47, y el  $\Delta H^\ddagger$  fue de alrededor de  $21 \text{ kcal/mol}$  para ambas prolinas (Tabla III.III). Esta concordancia indica que la reacción de pre-equilibrio se encuentra limitada por la isomerización *trans-cis* de la P41 y/o P47 presentes en el fragmento E7Ep.

**Tabla III.IV. Valores comparativos del mecanismo pre-equilibrio presente en la formación del complejo E7Ep:M1Fab y la isomerización de las prolinas en el fragmento E7Ep libre.**

Fase lenta de asociación estudiada por anisotropía					
Población de la especie competente para la unión		proceso de ida		Proceso inverso	
constantes $k_f$ y $k_r$ <sup>a</sup>	Amplitudes de la anisotropía <sup>a</sup>	$k_f$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$\Delta H^\ddagger$ (kcal/mol)	$k_r$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$\Delta H^\ddagger$ (kcal.mol <sup>-1</sup> )
14%	17%	0.003	24	0.02	N.D.
Isomerización <i>cis/trans</i> de Pro-41 / Pro-47 estudiada por RMN					
Población del isomero <i>cis</i>		isomerización <i>trans a cis</i>		isomerización <i>cis a trans</i>	
constantes $k_f$ y $k_r$ <sup>b</sup>	volumen los picos <sup>c</sup>	$k_f$ ( $\text{s}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	$\Delta H^\ddagger$ (kcal/mol)	$k_r$ ( $\text{s}^{-1}$ ) <sup>b</sup>	$\Delta H^\ddagger$ (kcal/mol)
7% / 3%	15% / 5%	0.0023 / 0.0015	~20.9/~20.8	0.029/0.042	~16.6/~15.1

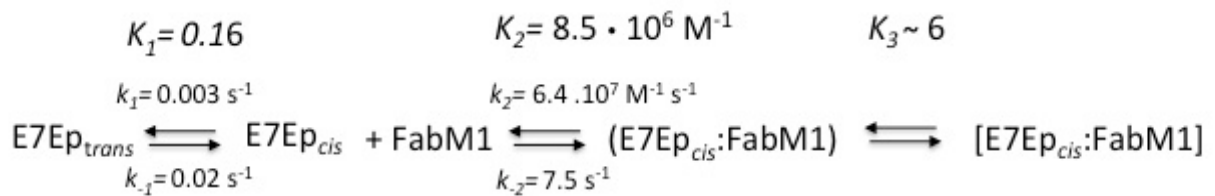
<sup>a</sup> Amplitudes y constantes cinéticas de la fase lenta de asociación obtenidas a partir de experimentos de anisotropía medidos en el fluorímetro realizados a  $20^\circ\text{C}$  .

<sup>b</sup> Población de isómeros y constantes cinéticas obtenidos de experimentos de RMN realizados a  $30$  y  $40^\circ\text{C}$  y extrapolados a  $20^\circ\text{C}$  de las Pro 41 y Pro47, respectivamente .

Por otro lado, el proceso inverso de la reacción de pre-equilibrio posee una constante de  $0.02 \text{ s}^{-1}$ , en concordancia con la velocidad de isomerización *cis-trans* obtenidas para las P41 y P47, cuyos valores fueron de  $0.03$  y  $0.04 \text{ s}^{-1}$ , respectivamente. Estas similitudes nos permitieron concluir que la reacción inversa de pre-equilibrio se corresponde a un proceso de isomerización *cis-trans* de la/las Pro-41 y/o Pro-47 presentes en el fragmento E7Ep.

El conjunto de los resultados presentados en esta sección nos permitieron concluir que la reacción de pre-equilibrio conformacional descrita en el capítulo anterior corresponde a la

isomerización *trans-cis* de uno o ambos residuos de prolina presentes en el fragmento E7Ep, y que el anticuerpo M1 mediante un mecanismo de selección conformacional reconoce a su antígeno E7Ep con sus prolinas en la conformación menos estable: la *cis*. Por lo tanto, el evento rápido correspondiente a la unión bimolecular descrito en el capítulo II se pudo asociar al evento de unión del anticuerpo M1 con E7Ep presentando sus prolinas en el conformero *cis* (E7Ep<sub>cis</sub>). Mientras que la fase lenta de asociación se pudo adjudicar a la isomerización *trans-cis* de las prolinas presentes en el fragmento E7Ep en su estado libre, siendo la reacción de isomerización el paso limitante en la formación del complejo E7Ep:FabM1 (esquema II).



**Esquema II. Modelo mínimo que representa la formación del complejo FabM1:E7Ep.**

## Conclusiones

- El fragmento E7Ep presenta dos residuos de prolina (P41 y P47) altamente conservados entre las familias HPV  $\alpha 7$  y HPV  $\alpha 9$ , las cuales incluyen los tipos de alto riesgo más prevalentes en la población humana. Esta conservación sugiere un posible rol funcional de las mismas en la proteína E7.
- El gráfico de Eyring mostró un comportamiento lineal y a partir de la pendiente del mismo se determinó un valor de  $\Delta H^\ddagger = 24.2 \pm 0.7$  kcal/mol. Este valor coincide con lo establecido para las isomerizaciones de los residuos de prolina.
- Mediante la asignación del péptido por RMN se observó la presencia de un equilibrio conformacional *cis-trans* de ambos residuos de prolina presentes en E7Ep, siendo la conformación *cis* la conformación menos estable (~10%).
- Mediante espectros NOESY a diferentes tiempos de mezcla calculamos los valores de las constantes cinéticas correspondientes a la isomerización de los residuos de prolina. Estos valores coincidieron sorprendentemente bien con las constantes cinéticas correspondientes al evento de selección conformacional descrito en la formación del complejo E7Ep:FabM1.
- Las poblaciones del isómero *cis* de las prolinas presentes en E7Ep determinadas por RMN coincidieron ampliamente con el porcentaje inicial de moléculas que presentaban la conformación competente para la unión en el modelo de selección conformacional.
- El valor de  $\Delta H^\ddagger$  para la isomerización *trans-cis* de las prolinas de E7Ep coincidió relativamente bien con el valor de  $\Delta H^\ddagger$  correspondiente a la reacción de pre-equilibrio.
- La amplia concordancia observada entre valores termodinámicos y cinéticos de la reacción de pre-equilibrio y la isomerización de los residuos de prolina en E7Ep nos permitieron concluir que ambos se tratan del mismo proceso. (Esquema II).





## **Capítulo IV**

### **Identificación de la prolina de E7Ep involucrada en la interacción con el Ac M1 y tendencias conformacionales de E7Ep.**



El conjunto de los resultados presentados en los capítulos II y III nos permitieron asignar la reacción de pre-equilibrio descrita en la formación del complejo E7Ep:FabM1 a un evento de isomerización *trans-cis* de las prolinas presentes en el fragmento E7Ep. No obstante, dado que los valores de las constantes  $k_1$ ,  $k_{-1}$  y el de  $\Delta H^\ddagger$  obtenidos mediante RMN para el evento de isomerización fueron muy similares entre sí para ambas prolinas (Tabla III.IV), no fue posible discernir a partir estos resultados cual/es de los residuos de prolina de E7Ep se encontraban involucradas en mecanismo de reconocimiento del anticuerpo. Por lo tanto, en el presente capítulo nos propusimos identificar cuál de los residuos de prolina de E7Ep participa en la interacción con el anticuerpo M1.

Por otro lado, se ha determinado a partir de ensayos de RMN y cristalografía que la región estructurada de E7 HPV-16 comienza en el residuo 51 de la proteína [50,51]. Por lo tanto, la región bisagra de E7, la cual comprende el sitio de reconocimiento de M1, se encuentra en la región desordenada de la proteína. Por otra parte, se identificó que ésta región de E7 comprende una región inmunodominante en el reconocimiento de linfocitos B. Dado que se ha propuesto que existe una relación entre las tendencias conformacionales que adoptan los epítopes y su inmunogenisidad [102], en el presente capítulo nos propusimos estudiar las tendencias conformacionales en solución de E7Ep y de sus variantes de prolina.

#### IV.1. Cálculo de la afinidad del AcMo M1 por los péptidos de E7Ep variantes de prolina.

Basándonos en el hecho de que el péptido E7Ep posee dos residuos de prolina, nos propusimos determinar cual residuo se encontraba involucrado en la unión con M1. Con tal fin, realizamos ensayos al equilibrio entre el anticuerpo M1 y el epítipo E7Ep con una o ambos de sus residuos de prolina sustituidos por alanina, y analizamos la afinidad de los distintos complejos. Las secuencias de los diferentes péptidos se muestran a continuación indicando los residuos sustituidos subrayados y en negrita:

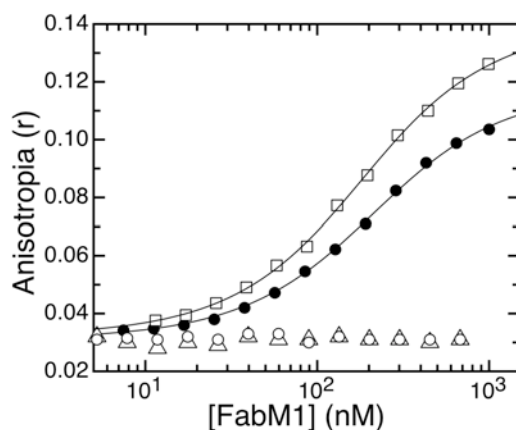
E7Ep: DEIDGPAGQAEPD

P41A: DEIDGAAGQAEPD

P47A: DEIDGPAGQAEAD

P41A+P47A: DEIDGAAGQAEAD

La metodología utilizada para calcular la constante de disociación de los complejos fue la misma que en el caso del péptido E7Ep (capítulo I). Los protocolos de purificación y de marcación de los péptidos mutantes con FITC también fueron los mismos que para E7Ep (ver materiales y métodos).



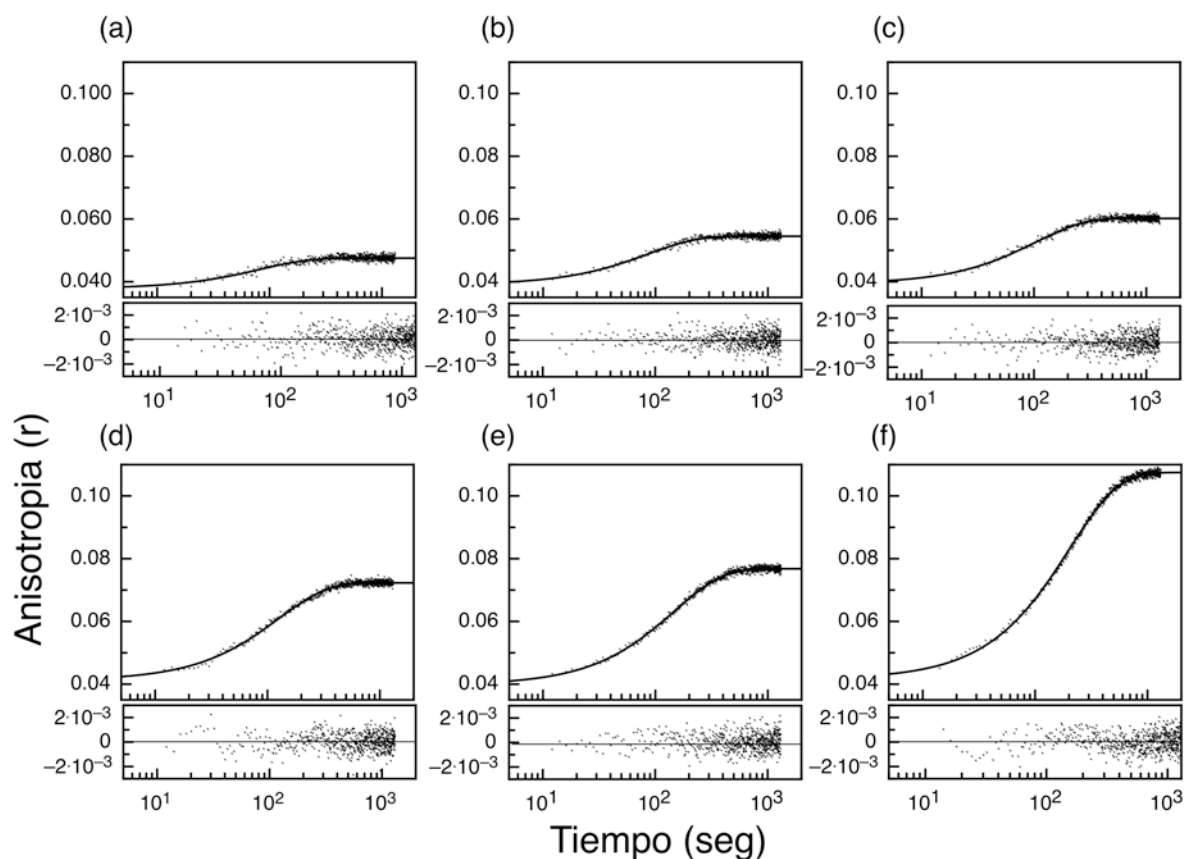
**Figura IV.1. Constante de disociación de los complejos formados entre FITC-E7Ep mutantes de prolina y el FabM1.** Cambio en la anisotropía de fluorescencia de 100nM FITC-P47A (círculos negros), FITC-P41A (círculos vacíos) y FITC-P41A+P47A (triángulos vacíos) y de FITC-E7Ep (cuadrados vacíos) como control, luego de la adición de cantidades crecientes de FabM1. Los diferentes complejos antígeno:FabM1 se incubaron en tubos separados 30 min antes de la medición. La línea muestra el ajuste a un modelo 1:1 a partir del cual se obtuvo la constante de disociación al equilibrio del complejo [FITC-P47A: FabM1]:  $K_D = 160 \pm 8$  nM. [FITC-E7Ep: FabM1]:  $K_D = 122$  nM (extraído de Figura I.6)

Como puede verse en la figura IV.1, no se observaron cambios en la anisotropía de fluorescencia en las titulaciones realizadas entre los péptidos P41A y P41A+P47A con el anticuerpo M1. Tampoco se observaron cambios en titulaciones realizadas a concentraciones  $\mu$ M (no mostrado), sugiriendo que en caso de que hubiese interacción entre M1 y estos

fragmentos, la afinidad se encontraría en el orden mM o más. En cambio, sí se observaron cambios en la anisotropía de fluorescencia de 100 nM FITC-P47A al ser titulado con el FabM1. Los mismos se ajustaron al modelo de estequiometría 1:1 utilizado en el capítulo I de esta tesis (ver ecuación I.I y materiales y métodos) a partir del cual se obtuvo la  $K_D$  del complejo P47A:FabM1 ( $K_D = 160 \pm 8$  nM). Este valor fue muy similar a la afinidad que presentó M1 por el péptido E7Ep ( $K_D = 122$  nM), indicando que la P41 de E7 HPV-16 es reconocida por el anticuerpo M1 mientras que la P47 no participa de la interacción.

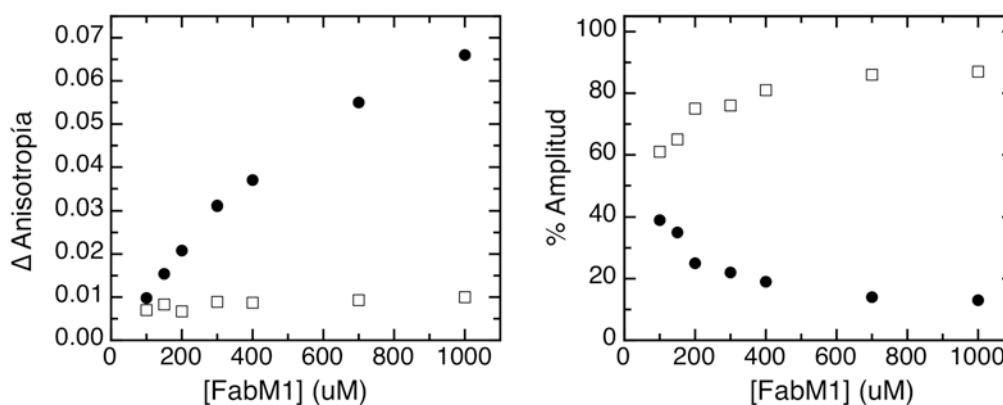
#### IV.2. Identificación del residuo de prolina involucrado en la reacción de pre-equilibrio descrita en E7Ep:FabM1.

Una vez identificada que la P41 de la proteína E7 era reconocida por el anticuerpo M1, nos propusimos determinar si la misma se encontraba involucrada en la reacción de pre-equilibrio observada en la formación del complejo E7Ep:FabM1. Con tal fin se analizó la presencia de la fase lenta de asociación monitoreando el cambio anisotropía de FITC-P47A luego de la adición de FabM1 en el tiempo.



**Figura IV.2. Dependencia de la concentración de la fase lenta de asociación del complejo [FITC-P47A:M1Fab]. (a-f)** Cambio en la anisotropía de fluorescencia en FITC luego de la adición de concentraciones crecientes de FabM1 (0.1; 0.15; 0.2 ; 0.3 ;0.4 y 1  $\mu$ M, respectivamente) en una cubeta que contenía 50 nM FITC-P47A. Los datos fueron ajustados a una función mono-exponencial y los residuales se muestran debajo de cada gráfico.

Como puede observarse en la Figura IV.2, la cinética de asociación del complejo P47A:FabM1 presentó una fase lenta en la reacción asociación, por lo tanto se estudió la dependencia de la misma con la concentración de FabM1 utilizando el mismo procedimiento que el realizado para caracterizar la fase lenta de asociación del complejo E7Ep:FabM1 (Capítulo II). Las cinéticas medidas a distintas concentraciones de FabM1 se ajustaron a una función exponencial simple y se obtuvieron los valores de la  $k_{obs}$  y las amplitudes en cada caso.

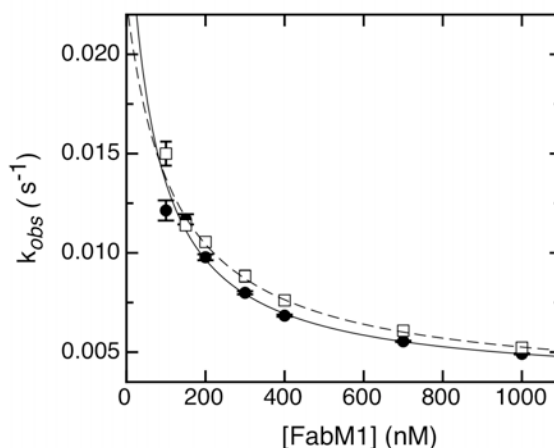


**Figura IV.3. Valores de las amplitudes correspondientes a la fase rápida y lenta de la reacción de asociación.** a) Valor de la amplitud de la fase lenta de asociación (círculos llenos) obtenidas a partir del ajuste de las cinéticas mostradas en la Figura IV.2 y valor de la amplitud de la fase rápida de asociación (cuadrados blancos) obtenida a partir de sustraer al valor inicial de anisotropía extrapolado de cada ajuste el valor de anisotropía del fragmento E7Ep libre. b) Valor relativo de la amplitud correspondiente a la fase lenta (círculos llenos) y a la fase rápida (cuadrados vacíos) de asociación.

El valor de anisotropía extrapolado a  $t=0$ , obtenido de sustraer el valor de la amplitud de la fase exponencial al valor de anisotropía final de los ajustes de cada cinética, se mantuvo constante para todas las concentraciones ensayadas dando un valor promedio de  $r = 0.040$ . Considerando el valor de anisotropía del fragmento E7Ep P47A libre,  $r_{free} = 0.032$ , obtuvimos el cambio de anisotropía correspondiente a la reacción de asociación bimolecular  $\Delta r = 0.008$  (Figura IV.3 A), el cual se mantuvo constante y coincidió perfectamente con el valor obtenido para el péptido E7Ep (Figura II.6). La amplitud de la fase lenta de asociación, obtenida a partir del ajuste de los datos mostrados en la figura IV.2, varió con la concentración de FabM1 (Figura IV.3A) y mostró los mismos valores que lo observado para el fragmento E7Ep (Figura II.6). Por lo tanto, la amplitud relativa de la fase rápida y lenta de asociación del complejo E7Ep P47A:FabM1 coincidieron con los obtenidos para E7Ep, y para 1 uM de FabM1 el 90 % del cambio total de la anisotropía se correspondió a la fase lenta de asociación (Figura IV.3 B).

Los valores y la tendencia que presentó la  $k_{obs}$  con la concentración de Fab M1 también coincidió ampliamente con las obtenidas para el complejo E7Ep:FabM1, permitiendo en este

caso un ajuste de los datos al modelo de selección conformacional descrito en el capítulo II de esta tesis (Figura IV.4). Los valores obtenidos a partir del ajuste de los datos fueron los mismos que los obtenidos para el complejo E7Ep:FabM1:  $k_1=3.2 \pm 0.3 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_{-1}= 2.0 \pm 0.2 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  y  $K= 117 \pm 31 \text{ nM}$ .



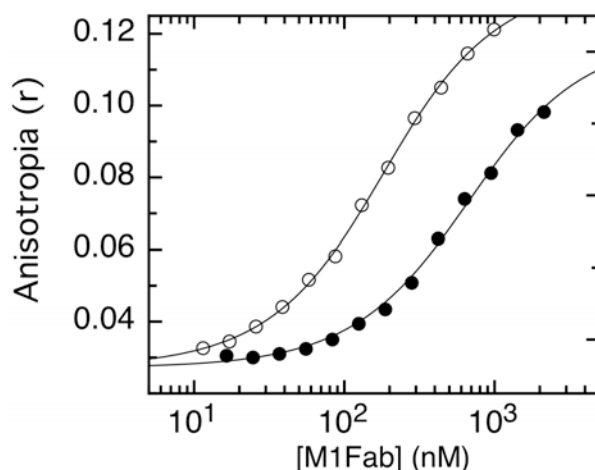
**Figura VI.4. Dependencia de la concentración de la fase lenta de asociación.** Las  $k_{obs}$  se obtuvieron a partir de los ajustes de los datos de la figura IV.2 (línea continua) y de la figura II.5 (línea punteada, control positivo) para los complejos E7Ep P47A:FabM1 y E7Ep:FabM1, respectivamente. Los valores fueron ajustados al modelo de pre-equilibrio descrito en la Figura II.4.

Los resultados mostrados previamente, en los cuales se observó una amplia coincidencia entre los valores determinados al equilibrio,  $K_D$ , y los valores cinéticos  $k_1$ ,  $k_{-1}$  y  $K$ , obtenidos para los complejos formados por M1 y los péptidos E7Ep y E7EpP47A, indicaron que el anticuerpo M1 reconoce mediante mecanismo de selección conformacional a E7Ep con su P41 en la configuración *cis*, mientras que la P47 no participa de esta reacción.

#### IV.3. Determinación del epítipo mínimo de reconocimiento del anticuerpo M1.

Como mencionamos, el fragmento E7Ep comprende dos regiones inmunodominantes descritas en E7 [103], las cuales se indican subrayados sobre la secuencia de E7Ep: DEIDGPAGQAEPD. Por lo tanto, una vez identificado que la P41 de E7 es la reconocida por el anticuerpo, nos propusimos analizar la afinidad de M1 por el fragmento E7<sub>36-42</sub>, que abarca uno de los epítipes inmunodominantes descrito en E7. La metodología ensayada fue la misma que la utilizada para calcular la afinidad de los diferentes complejos analizados en esta tesis (Capítulo I y Materiales y Métodos). Los datos de la titulación mostrada en la figura IV.5 se ajustaron al modelo estequiométrico 1:1 (ver ecuación I.1, y materiales y métodos) a partir del cual se determinó la afinidad de la de la interacción [FITC-E7<sub>36-42</sub>:FabM1],  $K_D = 520 \pm 50 \text{ nM}$ . Este valor corresponde a un  $\Delta G = -8.43 \text{ kcal. mol}^{-1}$ .





**Figura IV.5. Constante de disociación del complejo FITC-E7<sub>36-42</sub>:FabM1.** Cambio en la anisotropía de fluorescencia de 300 nM FITC- E7<sub>36-42</sub> luego de ser incubado con concentraciones crecientes de FabM1. Cada concentración testada se incubó en tubos separados durante 30 min previo a la medición. La línea muestra el ajuste a un modelo 1:1 a partir del cual se obtuvo la constante de disociación al equilibrio del complejo FITC-E7<sub>36-42</sub>:FabM1  $K_D = 520 \pm 50$  nM. Se muestra comparativamente la titulación del complejo FITC-E7Ep:FabM1 cuya  $K_D = 122$  nM (Figura I.6)

El valor de la  $K_D$  del complejo FITC-E7<sub>36-42</sub>:FabM1 fue aproximadamente 5 veces mayor que la calculada para el complejo FITC-E7<sub>36-48</sub>: FabM1 ( $K_D$  120 nM, Figura I.6) y alrededor de 25 mayor que la observada para la proteína entera ( $K_D$  20nM, Figura I.3B). La diferencia en la afinidad podría deberse a dos motivos posibles: a que el péptido E7<sub>36-42</sub> no comprenda el epítoto completo reconocido por el anticuerpo, o que el epítoto en el contexto de la proteína o en el péptido de mayor tamaño E7<sub>36-48</sub> adopten en solución una determinada conformación que favorezca la asociación del fragmento mínimo a FabM1.

#### IV.4 Tendencias conformacionales de E7Ep y sus variantes de prolina en solución.

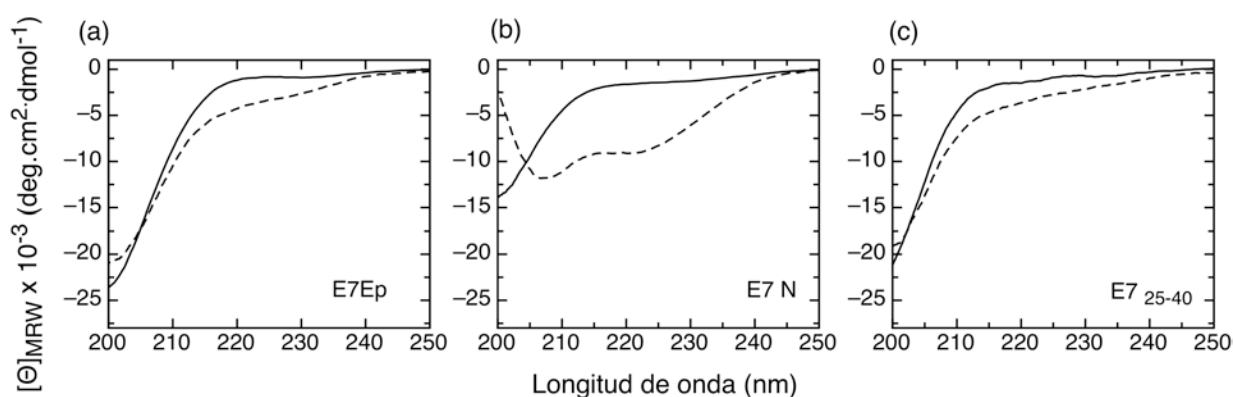
En general, los péptidos pequeños suelen mostrar un contenido marginal de estructura, o diversos equilibrios de estructuras nacientes. Esta estructura mayoritariamente es secundaria, con bajo número de interacciones a largo alcance y estabilizada localmente [104].

En el laboratorio se ha realizado un análisis detallado sobre las tendencias conformacionales que posee el dominio intrínsecamente desordenado de la proteína E7 [62]. En la presente tesis nos propusimos extender el estudio a la región bisagra de la proteína, que comprende el epítoto de reconocimiento del anticuerpo M1. Por otra parte, dado que E7Ep posee dos residuos de prolina y estos residuos pueden encontrarse iniciando o interrumpiendo estructuras secundarias, también nos propusimos estudiar las tendencias conformacionales del péptido E7Ep con sus residuos de prolina sustituidos por alanina.

Como se mencionó previamente, la técnica espectroscópica que permite obtener información del tipo y la cantidad de estructura secundaria presente en una proteína o en este caso en un péptido, es el dicroísmo circular [90]. Por lo tanto, realizamos mediciones de CD en el UV lejano utilizando como buffer 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 5 mM NaCl y diferentes aditivos estabilizadores de estructura secundaria.

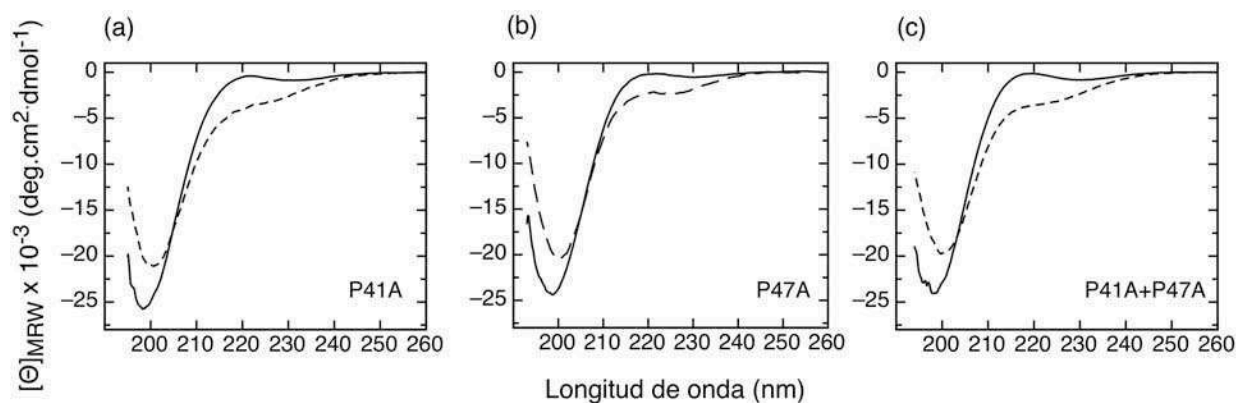
#### IV.4.1 Trifluoroetanol como estabilizador de estructura hélice- $\alpha$

Con el objetivo de analizar la tendencia a formar estructura hélice- $\alpha$  del péptido E7Ep y de sus variantes de prolina, se midió el espectro de CD de los diferentes péptidos frente al agregado del solvente 2,2,2 trifluoroetanol (TFE) (50% v/v), el cual estabiliza elementos preexistentes de estructura hélice- $\alpha$  en péptidos.



**Figura IV.6. Tendencias conformacionales de E7Ep frente al agregado de TFE.** La línea continua muestra el espectro de CD de los péptidos en buffer Tris pH7.5 10 mM, y la línea puntuada muestra los espectros de CD de los péptidos luego del agregado de TFE 50% v/v. Los espectros correspondientes a E7N y E7<sub>25-40</sub> fueron adaptados del trabajo realizado por Noval et al. [62]

En la figura IV.6.A se muestra el espectro de CD de E7Ep frente al agregado de TFE donde puede observarse una despreciable estabilización de estructura hélice-alfa. Este resultado fue muy similar a lo observado para el fragmento comprendido entre los residuos 25-40 de la proteína E7 HPV-16 (E7<sub>25-40</sub>) estudiado en nuestro laboratorio, en el cual además se demostró mediante estudios de RMN la ausencia de estabilización de hélice alfa inducida por TFE [62]. Por otro lado, en ese mismo trabajo, se observó la estabilización de estructura hélice-alfa que presentó el dominio N-terminal de E7 frente al agregado de TFE, en cuyo espectro de CD se observó un incremento en el mínimo a 208 nm y una banda negativa a 222 nm característicos de este tipo de estructura ([62], figura IV.6.B).



**Figura IV.7 Tendencias conformacionales de los fragmentos mutantes de prolina de E7Ep frente al agregado de TFE.** La línea continua muestra el espectro de CD de los péptidos en buffer tris pH 7.5 10 mM, y la línea puntuada muestra los espectros de CD de los péptidos luego del agregado de TFE 50% v/v.

Al igual que en E7Ep, tampoco se observó estabilización de estructuras hélice alfa pre-existentes en ninguno de los péptidos E7Ep con sus prolinas sustituidas (Figura IV.7). Estos resultados sugieren que el fragmento E7Ep no posee tendencia a formar estructura hélice- $\alpha$  en solución, y que las prolinas presentes en esta región no alteran este comportamiento.

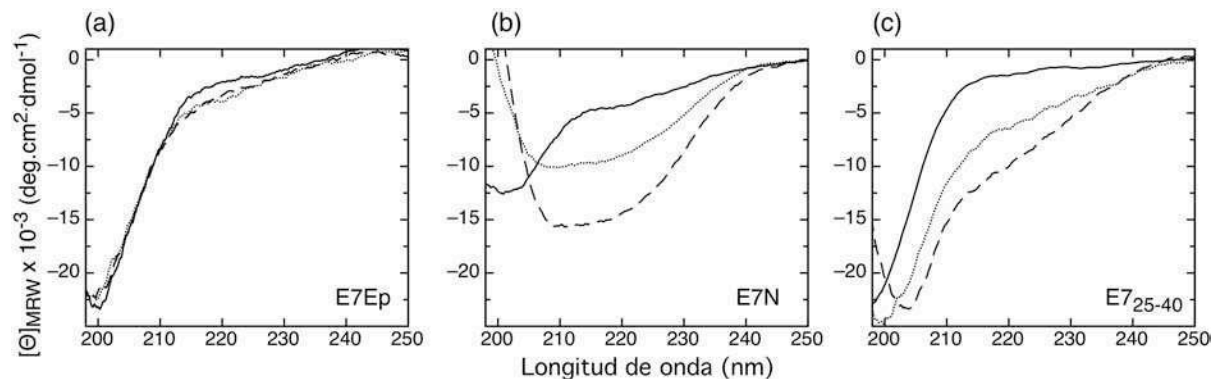
#### IV.4.2 SDS como estabilizador de estructura secundaria.

Otro estabilizador de estructura secundaria marginal pre-existente muy utilizado para analizar tendencias conformacionales en polipéptidos es el detergente sodio dodecil sulfato (SDS). El tipo y la cantidad de estructura inducida por este detergente dependen del potencial del péptido a formar hélice- $\alpha$  o lámina- $\beta$  y de la concentración de detergente utilizada.

El efecto del SDS es menos predecible que el del TFE en cuanto al tipo de estructura estabilizada. En general, a bajas relaciones molares de péptido/SDS (concentraciones debajo de la concentración micelar crítica –CMC-) puede predominar una estructura tipo lámina- $\beta$  si la secuencia tiene el potencial para formar esta estructura, aunque en exceso del surfactante (por arriba de la CMC) en general se interrumpe la hoja beta dando origen a una hélice- $\alpha$ , si el fragmento tiene la potencialidad para formarla. Péptidos sin ningún potencial para formar algún elemento de estructura secundaria permanecen desestructurados independientemente de la concentración de SDS [105].

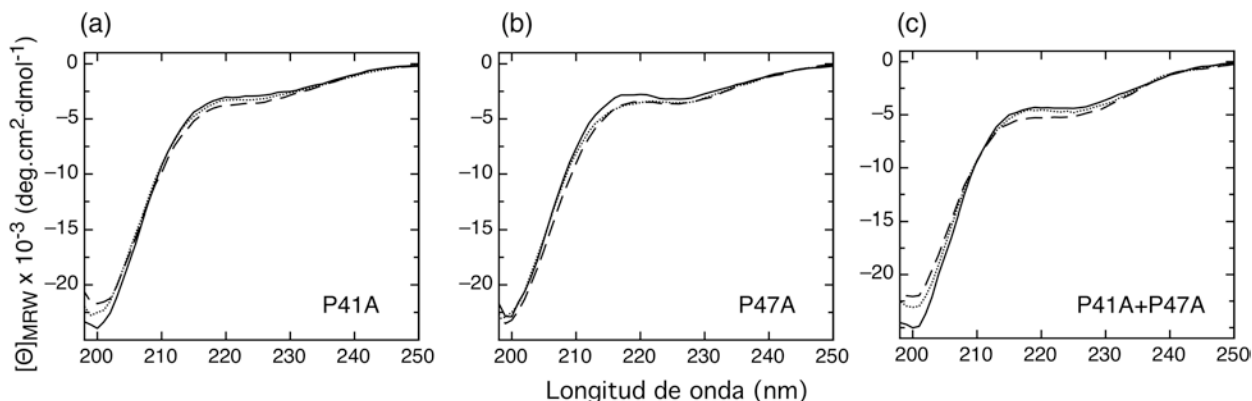
En la figura IV.8A se muestra el espectro de CD del fragmento E7Ep en presencia de concentraciones sub-micelares (1mM) y supra-micelares (25mM) de SDS. En la misma puede observarse que en ninguno de los dos casos hubo estabilización de estructura secundaria. Este resultado coincidió con lo descrito para el fragmento E7<sub>25-40</sub> estudiado en nuestro laboratorio, donde no se observó estabilización de estructuras secundarias pre-existentes frente al agregado de SDS analizado por las técnicas de CD (Figura IV.8B) y de RMN [62]. A diferencia de lo

descripto para E7<sub>25-40</sub> y para E7Ep, se determinó que el dominio N-terminal de la proteína E7 (E7N) presentó estabilización de estructuras hélice-alfa en concentraciones supra-micelares y de estructura lamina-beta en concentraciones sub-micelares de SDS (Figura IV.8C) [62].



**Figura IV.8. Tendencias conformacionales de E7Ep frente al agregado de SDS.** La línea continua muestra el espectro de CD de los péptidos en *buffer* formiato pH 4 10 mM, la línea puntuada muestra los espectros de CD de los péptidos luego del agregado de SDS 1mM, y la línea con rayas luego del agregado de SDS 25 mM. Los espectros correspondientes a E7N y E7<sub>25-40</sub> fueron adaptados del trabajo realizado por Noval et al. [62]

Por otra parte, no se observó estabilización local de ningún tipo de estructura secundaria en los péptidos de E7Ep con los residuos de prolina sustituidos, ya que los espectros de CD medidos en condiciones sub-micelares y supra-micelares de SDS mostraron el mismo perfil que el espectro medido sin detergente (Figura IV.9).

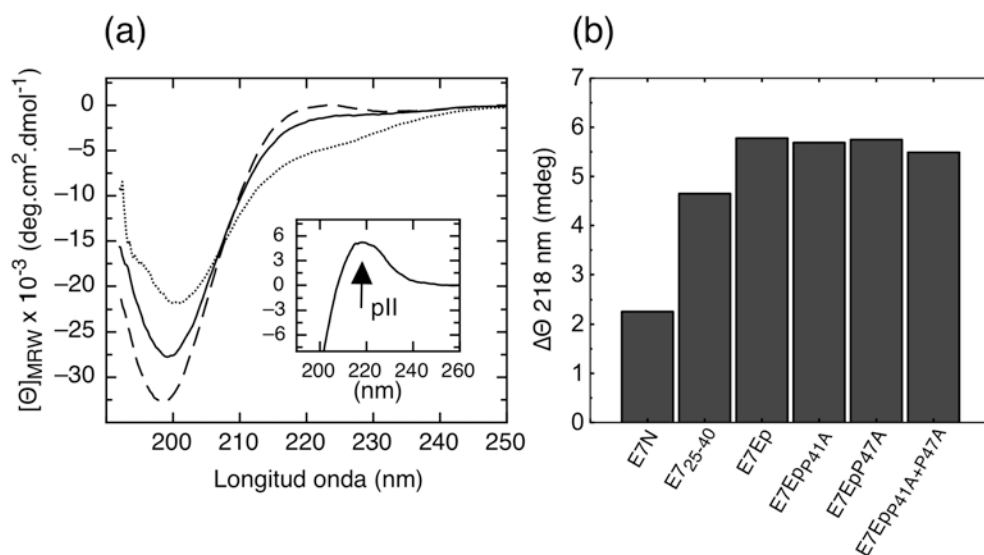


**figura IV.8 Tendencias conformacionales del fragmento E7Ep con sus prolinas sustituidas frente al agregado de SDS.** La línea continua muestra el espectro de CD de los péptidos en *buffer* tris 10 mM, la línea puntuada muestra los espectros de CD de los péptidos luego del agregado de SDS 1mM, y la línea con rayas muestra los espectro de CD luego del agregado de SDS 25mM.

Estos resultados indican que la región que comprende el epítipo de reconocimiento de E7 no presenta tendencia a formar estructura hélice- $\alpha$  ni lámina- $\beta$ . Por otro lado, también indican que las P41 y P47 presentes en dicha región no afectan la tendencia observada en E7Ep.

#### IV.4.3 Análisis de estructura tipo poliprolina II por variación de temperatura.

La estructura hélice tipo poliprolina II (PII) es la conformación prevalente en regiones intrínsecamente desordenadas y en péptidos desestructurados [106,107]. Las bajas temperaturas son condiciones que estabilizan la estructura PII. Por lo tanto, realizamos ensayos de barrido térmico en el CD, con el fin de determinar la presencia de PII en E7Ep y en sus versiones variantes de prolina. Los espectros de CD característicos de estructura PII presentan una banda positiva alrededor de 218 nm de baja intensidad, y un mínimo intenso alrededor de 198 nm. Una forma de determinar la estabilización de estructura PII es graficando el espectro diferencia, 5-75 °C. La región del espectro diferencia que refleja la cantidad de estabilización de estructura PII es la que comprende el máximo (218 nm) ya que en la región del mínimo (198 nm) también hay aporte de señal correspondiente a regiones desordenadas.



**Figura IV.9. Estructura PII en E7Ep y sus variantes de prolina.** (a) Espectro de CD de E7Ep medido a: 75 °C (línea continua), 20 °C (línea puntuada) y 5 °C (líneas cortadas). Inserto: espectro diferencia 5-75 °C. (b) Valor del cambio en la elipticidad molar a 218 nm (delta 218 nm) obtenido de los espectros diferencia 5-75 °C de cada péptido. Los valores correspondientes a E7N y E7<sub>25-40</sub> fueron extraídos del trabajo realizado por Noval et al. [62].

En la figura IV.9A se muestra la variación del espectro de CD de E7Ep con la temperatura donde se observa un incremento del mínimo a 198 nm y un aumento de la banda positiva a 218 nm a medida que disminuye la misma. Este comportamiento indicativo de la presencia de estructura PII y puede observarse en mayor detalle en el espectro diferencia (IV.9A, Inserto). La misma tendencia se observó en los espectros de CD de los diferentes péptidos de E7Ep con sus prolina mutadas (no mostrado). En la figura IV.9B se muestra en un gráfico de barras el valor del cambio en la intensidad a 218 nm de los espectros diferencia de: E7Ep, los péptidos mutantes de prolina, E7N y E7<sub>25-40</sub>. En el mismo pudo observarse que E7Ep posee mayor tendencia a formar estructura PII que los fragmentos de E7<sub>25-40</sub> y E7N estudiados

en el laboratorio [62] y por otro lado, que la tendencia a formar este tipo de estructura no varía entre E7Ep y los péptidos variantes de prolina.

## Conclusiones

- Las titulaciones realizadas al equilibrio con los diferentes péptidos mutantes permitieron concluir que la P41 de E7 es reconocida por el anticuerpo M1. Por otro lado, nos permitieron inferir que la P47 de la proteína no interviene directa ni indirectamente en la unión con M1, ya que las titulaciones realizadas con el péptido mutante P47A presentó una afinidad muy similar por M1 que la que presentó el péptido E7Ep.
- Los estudios cinéticos mostraron que la P41 se encuentra involucrada en la reacción de pre-equilibrio descrita en la formación del complejo E7Ep:FabM1 mientras que la P47 no participa de esta reacción. Por lo tanto, se pudo concluir que el anticuerpo M1 reconoce específicamente a la P41 de E7 en su conformación *cis* mediante un mecanismo de selección conformacional.
- El 80% de la energía total de unión proviene del reconocimiento del anticuerpo M1 a la región comprendida entre los residuos 36-42 de E7.
- El fragmento E7Ep no mostró tendencia a formar estructura hélice- $\alpha$  en presencia de los estabilizadores de este tipo de estructura, TFE y SDS supra-micelar. Por otro lado, tampoco mostró tendencia a formar estructura lámina- $\beta$  frente al inductor SDS en condiciones sub-micelares.
- Los péptidos de E7Ep con sus residuos de prolina mutadas mostraron el mismo comportamiento que E7Ep frente al agregado de TFE y SDS, sugiriendo que las prolinas presentes en esta región no estarían iniciando ni interrumpiendo ningún tipo de estructura secundaria.
- A bajas temperaturas se observó estabilización de estructura tipo PII en el péptido E7Ep y en los péptidos variantes de prolina. La magnitud de la estabilización determinada por  $\Delta$  218 nm para el fragmento E7Ep y las versiones mutanetes de prolina se mantuvo constante.
- El fragmento E7Ep presentó las mismas tendencias conformacionales descritas para la región 25-40 de la proteína E7.

## **Discusión General**





En este trabajo de tesis abordamos un estudio integrado sobre la interacción entre la oncoproteína viral E7 del tipo de alto riesgo HPV-16 y el anticuerpo monoclonal específico M1. En una primera etapa, identificamos el epítipo de reconocimiento del anticuerpo M1 mediante una aproximación de disección de dominios. Luego, en una segunda etapa, realizamos un estudio detallado de la interacción entre el epítipo viral y el anticuerpo que nos permitió describir mecanísticamente la formación del complejo.

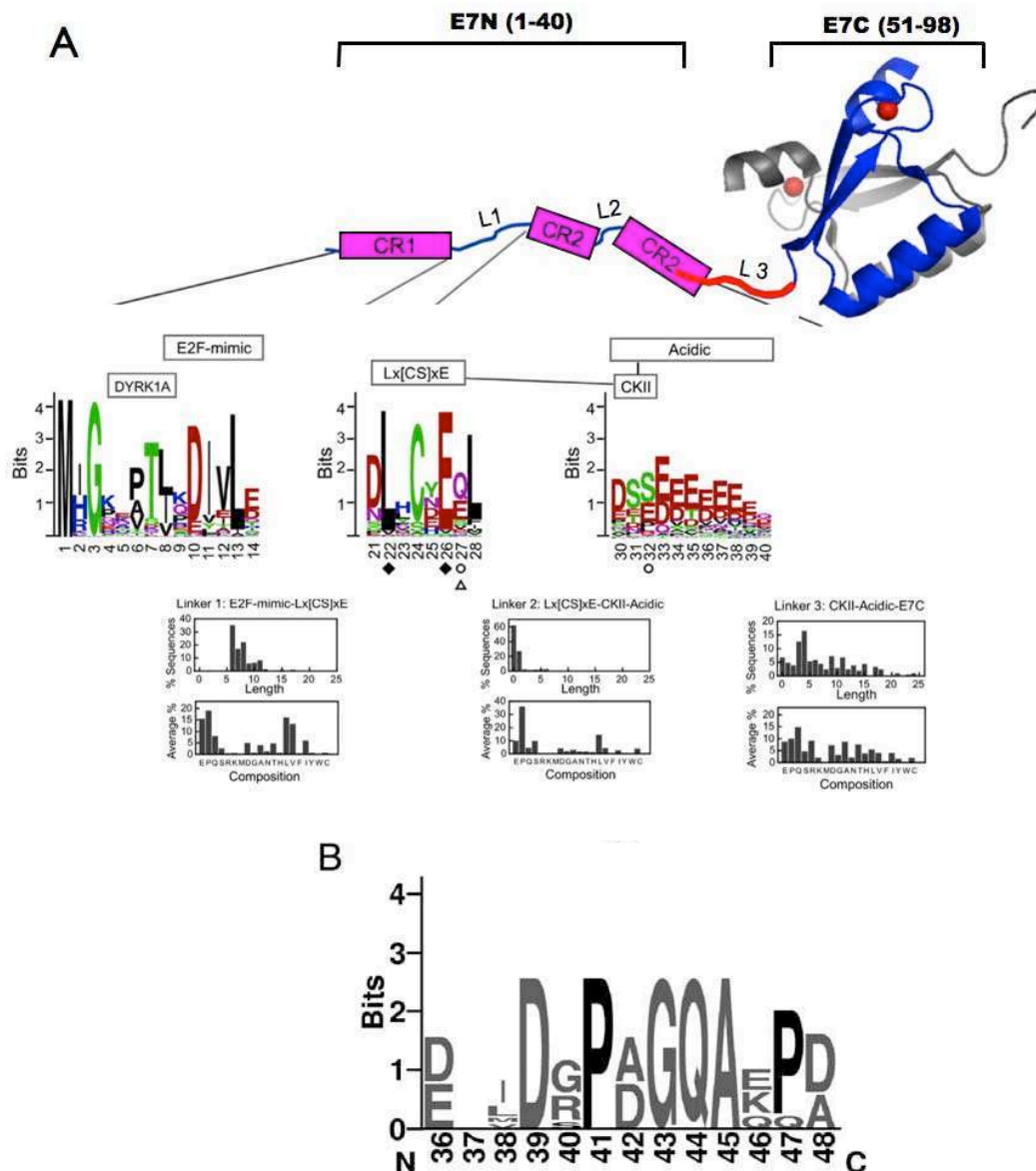
*El anticuerpo M1 reconoce una región inmunodominante, poco conservada y desordenada de la proteína E7.*

El mapeo epitópico ensayado mediante ELISA y las titulaciones realizadas al equilibrio con distintos fragmentos de E7 nos permitieron concluir que el fragmento comprendido entre los residuos 36-48 de la proteína E7 HPV-16 constituye el sitio principal de reconocimiento del anticuerpo M1. Este resultado coincidió con la localización de los epítipes B anti-E7 descritos en bibliografía que se han identificado mediante ensayos de ELISA utilizando un panel de anticuerpos monoclonales y policlonales [71,103]. En estos trabajos se identificaron tres epítipes inmunodominantes en E7 de HPV-16 (aa 10-14, aa 38-41 y aa 44-48), dentro de los cuales dos se encuentran en la región reconocida por el anticuerpo M1. A su vez, esta región también resultó ser inmunodominante en humanos [108].

En el trabajo realizado por Chemes y *col.* se ha determinado el grado de conservación y la evolución de secuencia en la proteína E7 mediante el análisis de 217 tipos de PVs de diferentes especies de vertebrados [48]. En dicho trabajo se estableció que las regiones de E7N que presentan mayor conservación de secuencia corresponden a los motivos lineales que median funciones importantes de la proteína, como lo son: el sitio de ubiquitinación y el motivo “E2F-mimic” ubicados en la región conservada CR1, y el motivo de unión a Rb LxCxE, el sitio de fosforilación por casein kinasa II (CKII) y la región ácida ubicados en la región conservada CR2 (Figura 1A). Estos motivos lineales están unidos por regiones poco conservadas de longitud y secuencia variables denominados “conectores” o *linkers*. El sitio de reconocimiento del anticuerpo M1 de la proteína E7 abarca parte de la región conservada CR2 (aa 36-40), parte de la región conectora que une la región ácida con el dominio C-terminal (aa 41-48) y no comprende ningún residuo de la región globular (Figura I A). Como mencionamos, se ha determinado mediante estudios estructurales [50,51] y de alineamientos de secuencia [48,78] que la región estructurada de E7 HPV-16 comienza en el residuo 51 de la proteína.

La región conectora, la cual abarca gran parte del sitio de reconocimiento del anticuerpo y denominamos “bisagra” en este trabajo de tesis, posee una longitud promedio de 7.2 +/- 5.4

residuos y se encuentra enriquecida en aminoácidos que presentan alta prevalencia en regiones desordenadas (M, K, R, S, Q, P y E) [48], constituyendo los mismos el 50% del total de la secuencia de E7Ep.



**Figura I.** A) Conservación de secuencia del dominio desordenado E7N obtenido a partir del alineamiento de 217 tipos virales de vertebrados. CR1 y CR2: regiones conservadas, L1, L2, L3: regiones *linker* poco conservadas. Adaptado de Chemes y col. [48] B) Conservación de secuencia del epítipo de reconocimiento E7Ep entre los tipos virales pertenecientes a la familia HPV  $\alpha 7$ .

En este trabajo de tesis se analizó la conservación de secuencia de la región que comprende al epítipo E7Ep entre las familias de HPV  $\alpha 7$  y  $\alpha 9$ , que comprenden los tipos de alto riesgo más frecuentes en la población humana. En este análisis se observó que a pesar de ser una región poco conservada entre todos los PVs, los residuos de prolina presentes en el epítipo de reconocimiento de M1 se encuentran altamente conservados en la familia  $\alpha 7$  (Figura 1B) y en los tipos virales de alto riesgo -18 y -45 pertenecientes a la familia  $\alpha 9$  (Capítulo III). La

presencia y la conservación de su posición en la secuencia de los residuos de prolina sugirieren un posible rol funcional de las mismas en la proteína E7, como se discutirá en el final de la presente sección.

Debido a que se trata de una región inmunodominante y con baja conservación global de secuencia, esta región de la proteína E7 se utilizó como modelo para el desarrollo de anticuerpos específicos a través del uso de fagos [109]. En esta tesis hemos mostrado que el anticuerpo monoclonal M1 es altamente específico para E7 de la cepa de alto riesgo HPV-16 ya que presentó una baja reactividad cruzada contra la proteína de los tipos virales HPV-18, -11. A su vez, alineamientos de secuencia sugieren que M1 debería presentar baja reactividad cruzada (con excepción de HPV-31) por el resto de los tipos virales más prevalentes en la población humana HPV -45, -33 y -6. Este es un resultado sumamente alentador ya que sugiere, junto con la capacidad que mostró M1 de reconocer a E7 en biopsias de tejidos infectados con HPV-16 [65], la posibilidad de utilizar al anticuerpo M1 para fines diagnósticos.

*Los mecanismos de SC y AI se encuentran presentes en la formación del complejo E7Ep:FabM1.*

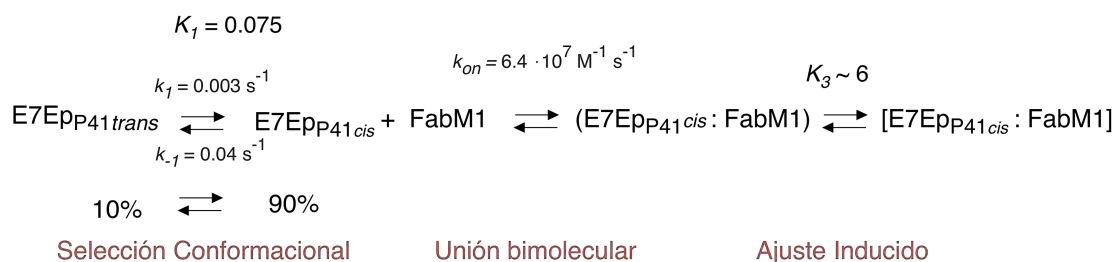
Algunas interacciones Ag:Ac, como la que ocurre entre E7Ep y FabM1 presentan mecanismos de reconocimiento complejos que involucran, además del evento de unión bimolecular, eventos adicionales correspondientes a rearrreglos conformacionales que pueden ocurrir antes (SC) o después (AI) del evento de unión. Distinguir entre ambos escenarios es importante en inmunología ya que ambos mecanismos se encuentran presentes y son relevantes en la formación de los complejos Ag:Ac. Sin embargo, son escasos los estudios que describen el mecanismo presente en la formación de los complejos. Esto se debe en parte a que el equipo utilizado generalmente para calcular las constantes cinéticas de asociación y disociación de estos complejos consiste en el biosensor óptico de resonancia de espejos (SRP). Si bien SRP es una técnica muy eficaz para calcular las constantes de asociación y disociación correspondientes al evento de unión, valiéndose del cambio en el índice de refracción de una superficie donde se ha fijado uno de los ligandos, no brinda información sobre reacciones unimoleculares correspondientes, por ejemplo, a rearrreglos conformacionales.

Por otro lado, como mencionamos en la introducción, se han resuelto a la fecha alrededor de 800 estructuras de complejos Ag:Ac [5] dentro de las cuales se han observado ejemplos que describen que las estructuras de los antígenos o los anticuerpos varían según los mismos se encuentren en su estado libre o unidos formando el complejo. En muchos casos se asume que dichas diferencias estructurales se deben a un mecanismo de ajuste inducido [16]. Un

ejemplo lo constituye el antígeno correspondiente al *loop* V3 de la proteína gp120 del virus del HIV-1, en el cual se ha descrito a partir de la obtención de la estructura de los complejos formados entre este antígeno y tres anticuerpos monoclonales diferentes, que el péptido adopta diferentes conformaciones según a qué anticuerpo se encuentre unido y han adjudicado estas diferencias a un mecanismo de ajuste inducido [110]. Sin embargo, si bien los datos estructurales brindan información detallada sobre los distintos estados conformacionales que pueden adoptar el antígeno o el anticuerpo en el estado unido, no permiten distinguir si los cambios conformacionales ocurren antes o después del evento de unión.

Como mencionamos, los estudios cinéticos son los que permiten identificar y caracterizar los mecanismos involucrados en la formación de los complejos. En la presente tesis, a partir de una amplia variedad de técnicas experimentales que incluyeron: espectroscopia de fluorescencia, dicroísmo circular y resonancia magnética nuclear, junto con la utilización de herramientas de análisis cinético hemos establecido que los mecanismos de SC y AI se encontraron presentes en la formación del complejo E7Ep:FabM1. Por un lado, el valor de la constante cinética correspondiente a la fase lenta de asociación determinada por anisotropía mostró un decaimiento a medida que aumentó la concentración de FabM1, comportamiento característico del mecanismo de selección conformacional (Capítulo II) [89,111]. Por otro lado, la discrepancia observada entre el valor de la constante de disociación obtenida al equilibrio y la obtenida a partir de los valores cinéticos sugirió la presencia de un tercer evento en el mecanismo de unión. Nosotros hipotetizamos que este evento se correspondería con un mecanismo de ajuste inducido presente en el complejo; los valores de las dos constantes observadas en la reacción de disociación del complejo apoyaron nuestra hipótesis. El análisis detallado de los datos nos permitió construir un modelo para la interacción E7Ep:FabM1 y estimar las constantes microscópicas de cada evento (Figura II).

$$E7:FabM1 K_{D\text{ equilibrio}} = 20 \text{ nM}$$



**Figura II. Modelo mínimo de reconocimiento de la formación del complejo E7Ep:FabM1.** Los diferentes eventos presentes en la formación del complejo se indican en rojo. Se muestran en % las poblaciones de E7Ep con sus residuos de prolina en *cis* y *trans* en el equilibrio. El valor de la  $K_D$  correspondiente a E7entera:FabM1 se muestra arriba a la derecha.

Como puede observarse, el evento correspondiente a reacción de pre-equilibrio es lento y ocurre en el orden de los minutos. La reacción de pre-equilibrio fue propuesta en antígenos únicamente en un modelo de “cierre de leucina”, en el cual determinaron que el anticuerpo selecciona específicamente el conformero monomérico del antígeno en lugar del conformero nativo dimerico [112]. En dicho trabajo determinaron el valor de la constante de asociación lenta, el cual fue de  $0.3 \text{ s}^{-1}$ . Este valor es alrededor de dos órdenes de magnitud mayor que el observado en el complejo E7Ep:FabM1, ( $k_{obs} \sim 1.10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ). Por otro lado, también se describió la reacción de pre-equilibrio en un anticuerpo SPE7 IgE, en el cual se demostró a partir de análisis estructurales y cinéticos que el mismo presenta al menos dos conformaciones [83,85]. En dicho trabajo describieron las constantes microscópicas de la reacción de pre-equilibrio, las cuales fueron  $k_I=17 \text{ s}^{-1}$  y  $k_{-I}=58 \text{ s}^{-1}$ . Estos valores son varios órdenes de magnitud mayores que el observado para la reacción de pre-equilibrio del epítotope E7Ep (Figura II). Por lo tanto, puede concluirse que la reacción de pre-equilibrio presente en E7Ep es extremadamente lenta, y no se han descrito hasta el momento ejemplos en los cuales se observe un evento de selección conformacional que ocurra en esta escala temporal.

No obstante, el valor de la constante de asociación bimolecular ( $k_{on} = 7.10^7 \text{ s}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) se encontró en el límite superior de los valores descritos para los complejos Ag:Ac [82]. Este valor fue muy similar al observado en los ejemplos de “cierre de leucina” y del anticuerpo SPE7, sugiriendo que en los tres casos en los anticuerpos ha ocurrido el proceso natural de “maduración de la afinidad”, ya que se ha propuesto que el aumento de la afinidad a lo largo de la respuesta inmune se encuentra estrechamente relacionado al aumento en la  $k_{on}$  de los complejos Ag:Ac [82].

Por último, el tercer evento mostrado en la Figura II corresponde al mecanismo de ajuste inducido que ocurre en el complejo E7Ep:FabM1. Si bien hemos determinado un valor estimativo de  $K \sim 6$  para este paso, serán necesarios experimentos adicionales para terminar de describir el tercer evento de rearrreglo conformacional. No obstante, cabe mencionar que en el ejemplo del anticuerpo SPE7 descrito anteriormente también se ha propuesto un tercer evento correspondiente a un AI y se ha determinado el valor de la constante que describe dicho proceso indirectamente.

Si bien el mecanismo de unión entre macromoléculas es discutido en términos de AI o SC [113], en esta tesis hemos mostrado cómo ambos participan en la formación del complejo E7Ep:FabM1. El modelo presentado apoya la teoría que establece que ambos mecanismos de unión son importantes y participan complementariamente [114].

*La reacción de pre-equilibrio observada en E7Ep corresponde a una isomerización cis-trans en la P41 de la proteína E7.*

Dada la presencia de dos residuos de prolina en el fragmento E7Ep, y la coincidencia en escalas temporales entre el evento de pre-equilibrio descrito en esta tesis y la reacción de isomerización de prolina ( $10^{-2}$ - $10^{-3}$  s<sup>-1</sup>) [91], nos propusimos analizar si las prolinas estarían involucradas en la reacción de pre-equilibrio. Mediante ensayos de RMN determinamos que ambos residuos de prolina presentes en el fragmento E7Ep se encontraban en equilibrio conformacional *cis-trans*, siendo la conformación *cis* la menos estable (10%). Luego, mediante espectros de NOESY a diferentes tiempos de mezcla calculamos las constantes cinéticas correspondientes a la reacción de isomerización. La excelente concordancia obtenida entre los valores de las constantes de isomerización *cis-trans* y de las constantes microscópicas de la reacción de pre-equilibrio determinada a partir de los ensayos de anisotropía (Tabla V, Capítulo III) nos permitieron asignar la reacción de pre-equilibrio presente en la formación del complejo E7Ep:FabM1 a la isomerización *cis-trans* de uno o ambos residuos de prolinas del epítipo. A su vez, la coincidencia observada entre los valores de entalpía de activación de la isomerización *cis-trans* ( $\Delta H^\ddagger \sim 20$  kcal/mol) y de la reacción de pre-equilibrio ( $\Delta H^\ddagger \sim 22$  kcal/mol), junto con la similitud observada de la población del isómero *cis* determinada por RMN ( $\sim 10\%$ ) y las especies competentes para la unión determinadas por los ensayos de anisotropía ( $\sim 15\%$ ) reforzaron nuestra conclusión (Tabla IV, Capítulo III). Finalmente, mediante ensayos de mutagénesis puntual de ambas prolinas, determinamos que la P41 de la proteína E7 es la que se encuentra involucrada en la reacción de pre-equilibrio y en la unión al anticuerpo, mientras que la P47 no participa de la reacción (Capítulo IV).

Se han descrito anticuerpos que reconocen a sus antígenos con sus prolinas en la conformación *cis*. Un ejemplo lo constituye el antígeno correspondiente al *loop* V3 de la proteína gp120 del virus del HIV-1, para el cual se describió mediante RMN que presenta en su estructura una prolina en *cis* en un *turn* que une las dos cadenas de una estructura horquilla-beta, la cual es reconocida específicamente por un anticuerpo neutralizante [115]. Otros ejemplos lo constituye un antígeno peptídico correspondiente a la proteína de envoltura del virus de la encefalitis japonesa y un antígeno relacionado con la trombosis autoinmune [116,117]. No obstante, no se ha descrito mecanísticamente hasta el momento cómo ocurre la formación de estos complejos Ag:Ac. Por lo tanto, el modelo planteado en la presente tesis, el cual establece que el anticuerpo monoclonal M1 reconoce específicamente a su epítipo E7Ep con una de sus prolinas en la conformación minoritaria *cis* mediante un mecanismo de selección conformacional, podría ser el que se encuentre gobernando la formación de estos complejos Ag:Ac. En caso de que esto ocurriese, es interesante destacar que la isomerización *trans-cis* observada en el epítipo E7Ep enlentece notoriamente la reacción global de unión al anticuerpo. Por lo tanto, dado que los ejemplos presentados anteriormente incluyen proteínas virales, este mecanismo podría tratarse de una estrategia viral de evasión para la respuesta inmune.

*Plasticidad conformacional en la región bisagra de E7 HPV-16 y posible comunicación entre dominios.*

Como hemos mencionado, las proteínas o los dominios intrínsecamente desordenados presentan estructura extendida y poseen la capacidad de adoptar diferentes conformaciones según el entorno al que se expongan. En la introducción hemos descrito la alta plasticidad conformacional que presenta la proteína E7 y mencionamos que gran parte de esta plasticidad se la confiere el dominio intrínsecamente desordenado E7N [61].

En este trabajo estudiamos las tendencias conformacionales del fragmento E7Ep, el cual comprende gran parte de la región “bisagra” de la proteína E7, mediante la técnica de CD a PH fisiológico (Capítulo 4). Pudimos determinar, al igual que lo observado al final del dominio E7N (aa 33-40) [118], que esta región presenta estructura extendida tipo poliprolina II en solución. Este resultado sugiere que la región E7Ep extendería o estabilizaría la región PII presente en el final de E7N. Por otra parte, se demostró que los residuos de prolina presentes en E7Ep se encuentran en un equilibrio conformacional *cis-trans*, siendo la conformación *-trans* la más estable representando alrededor del 90% de la población. Por lo tanto, la estructura PII observada en E7Ep se encuentra asociada a la conformación *-trans* de las prolinas presentes en esta región. Este comportamiento es predecible considerando que los residuos de prolina en la



conformación *-trans* favorecen la formación de estructura de tipo hélice PII, mientras que en la conformación *-cis* la estructura PII se encuentra desfavorecida por impedimento estérico [91].

Por otra parte, si bien los ensayos realizados en esta tesis no permiten determinar qué tipo de estructura secundaria forma el fragmento E7Ep cuando presenta sus prolinas en la conformación *-cis*, los experimentos cinéticos de CD (Capítulo II) y los experimentos de RMN (Capítulo III) indicaron que la isomerización de las prolinas provocan un cambio en la estructura secundaria del péptido. Este comportamiento puede ser comprendido tomando en cuenta que la isomerización *cis-trans* de los residuos de prolina produce un cambio de orientación del enlace peptídico de 180 grados (Figura III.1, capítulo III). Como citamos, en los ejemplos de los epítopes que presentan residuos de prolina en la conformación *cis* se ha visto que las prolinas se encuentran formando una estructura tipo giro o *turn*. Por lo tanto, una posibilidad que debería ser comprobada por estudios cristalográficos de alta resolución es que la región E7Ep adopte este tipo de estructura cuando presenta sus prolinas en conformación *-cis*.

Se ha descrito en la bibliografía la existencia de isomerizaciones *cis-trans* en residuos de prolina ubicados en regiones interdominio que median la comunicación entre los dominios de la proteína. La proteína adaptadora Crk, por ejemplo, posee dos dominios SH3 conectados por una región bisagra. En dicho trabajo identificaron un residuo de Pro en equilibrio conformacional *cis-trans* y determinaron que dicha reacción de isomerización media la interacción entre los dominios de la proteína, regulando el mecanismo de autoinhibición de la misma [95]. Cabe destacar que son varias las evidencias que sugieren la comunicación entre los dominios E7N y E7C de la proteína E7. Las mismas surgen de un análisis de evolución de secuencia de E7 en el cual se identificó la co-evolución entre un residuo presente en E7N y un residuo presente en E7C [48]. Otras evidencias surgen de la presencia de blancos celulares que interactúan con ambos dominios de E7 (Figura III) y por último, del efecto protector de la oxidación que presentó un residuo de cisteína ubicado en E7C (aa 59) sobre un residuo de cisteína ubicado en E7N (aa 23), determinado a partir de un estudio redox de la proteína E7 HPV-16 realizado en el laboratorio [119]. Una posibilidad sería que la isomerización de los residuos de prolina presentes en la región bisagra de E7 medien, en caso de existir, la comunicación entre los dominios E7N y E7C de la proteína.

Un resultado curioso que apoya el posible rol funcional de las isomerizaciones de prolina en E7 surge de los experimentos de RMN realizados en el laboratorio los cuales demostraron que sólo la P41 y la P47 ubicadas en la región “bisagra” de la proteína se encuentran en equilibrio conformacional *cis-trans*, mientras que las P6 y la P17 ubicadas en E7N presentan únicamente la conformación *-trans* (resultados no publicados).

*Equilibrios conformacionales e interacciones en E7.*

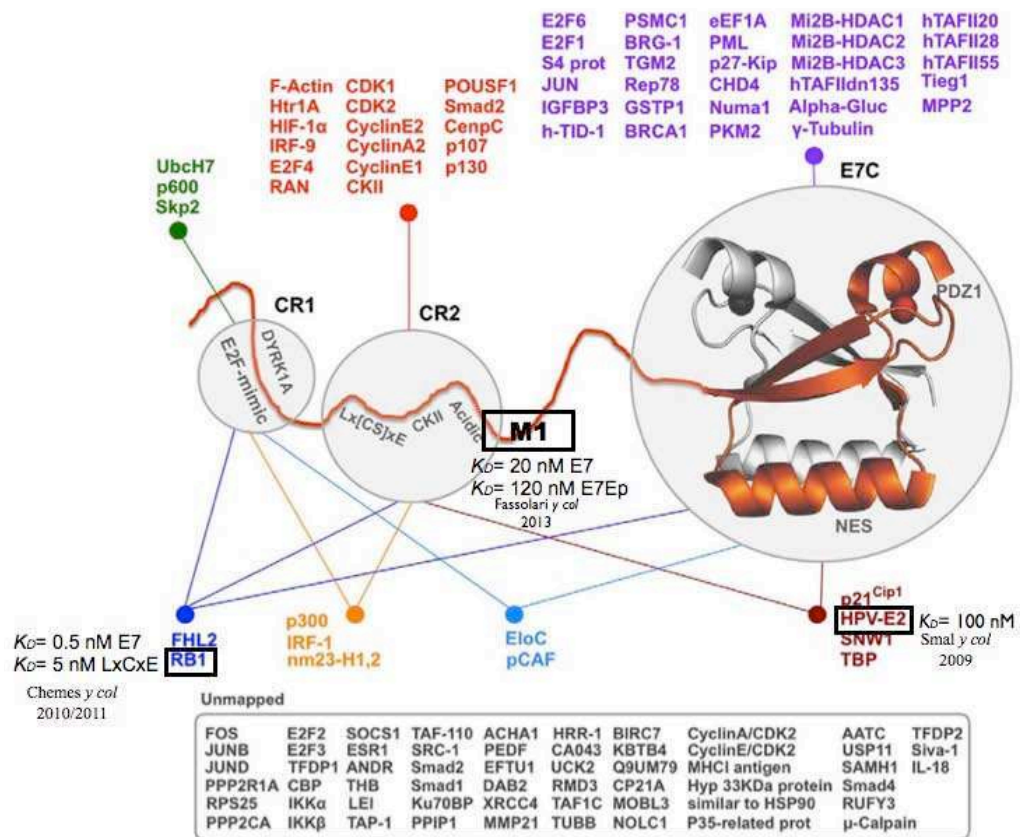
Se ha propuesto que la plasticidad conformacional que presenta la proteína E7 podría explicar como una proteína de tan solo 98 residuos es capaz de interactuar con más de 100 proteínas blanco y como consecuencia de estas interacciones producir la desregulación del ciclo celular, y establecer así las condiciones necesarias para que el virus pueda completar su ciclo de vida.

En la Figura III se muestran dentro de un esquema representativo de E7 los sitios reconocidos por los distintos ligando de la proteína. Como puede observarse las regiones conservadas CR1 y CR2, las cuales comprenden los motivos lineales de unión de E7, y el dominio E7C presentan los sitios principales de unión. Como ya mencionamos, el sitio de reconocimiento de M1 comprende parte la región acídica y gran parte de la región bisagra E7. Si bien la región bisagra representa una región inmunodominante de la proteína, hasta el momento no se han mapeado blancos celulares que interactúen directamente con esta región. No obstante, cabe destacar que para aproximadamente el 50% de los blancos celulares descritos para E7 aún no se conoce la región de interacción con esta proteína. Por lo tanto, podría ocurrir que la región bisagra de E7 una distintos blancos dependiendo de la conformación *cis* o *trans* de sus residuos de prolina.

Se han descrito múltiples blancos celulares que interactúan con E7, no obstante son muy escasos los estudios que describen detalladamente la formación de estos complejos. Uno de ellos es la unión entre el motivo lineal LxCxE y el dominio AB de la proteína supresora de tumores Rb realizada en el laboratorio [120]. En dicho modelo el mecanismo de unión se caracterizó por presentar un evento de unión rápido ( $k_{on} = 3.10 \pm 0.01 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) que se describió por un modelo de dos estados. Se ha determinado que la región LxCxE de E7 se encuentra en equilibrio conformacional entre estructura extendida y estructura hélice-alfa [118]. No obstante, el modelo de dos estados observado en la unión LxCxE:RbAB indica que las transiciones conformacionales en el dominio E7N de la proteína ocurren muy rápido. En contraste a lo descrito en el mecanismo de unión presentado en este trabajo de tesis, en el cual se mostró que la interacción entre el epítipo E7Ep y el anticuerpo M1 se encuentra limitado por un evento de selección conformacional que involucra una reacción de isomerización de residuos de prolina presente en E7Ep, el cual ocurre en el orden de los minutos.

Las diferentes escalas temporales de los equilibrios conformacionales observados en la región extendida de la proteína E7 puede encontrarse asociada a una gran diversidad de mecanismos de unión, una característica sobresaliente del dominio intrínsecamente desordenado

E7N que puede contribuir aún más a su capacidad de unir múltiples ligando.



**Figura III. Representación esquemática de la estructura de la proteína E7 mostrando los sitios de unión de sus proteínas blanco.** La estructura del dominio E7C del tipo viral HPV-45 resuelta por RMN fue utilizada como modelo. El dominio E7N de un monómero de E7 se muestra extendido en naranja. La localización aproximada de las regiones CR1 y CR2 y de los motivos lineales: E2F-mimic, DYRK1A, Lx[CS]xE, CKII, la región ácida, NES y PDZ fueron indicados. Las proteínas blanco fueron agrupadas de acuerdo a la región de la proteína E7 que se ha reportado que unen. Las proteínas que no han sido mapeadas se encuentran agrupadas debajo de la figura. M1: El sitio aproximado reconocido por el anticuerpo M1. Se muestran los estudios detallados que se han realizado indicando los valores de  $K_D$  reportados. Adaptado de Chemes y col [48].

Por otro lado, si bien no lo analizamos en esta tesis, es posible que la unión del anticuerpo M1 a E7 afecte la unión entre la proteína viral y otros ligando, alterando de este modo su función. Por ejemplo, se ha reportado la presencia de anticuerpos anti-E7 que reconocen las regiones comprendidas entre los aa 10-14 y aa 41-45 de la proteína, que mostraron tener actividad antiproliferativa en células que sobre-expresan E7 mediante un mecanismo independiente de Rb [121].

En conclusión, en este trabajo de tesis elucidamos el mecanismo de reconocimiento entre un anticuerpo y un epítipo inmunodominante de una oncoproteína viral. Por un lado, determinamos que el anticuerpo es altamente específico por su proteína antígeno sugiriendo su posible uso potencial para fines diagnósticos o terapéuticos. Por otro lado, identificamos que el anticuerpo reconoce específicamente a una prolina del epítipo en su configuración

minoritaria *cis*, indicando que este epítoto fue presentado por las células presentadoras de antígeno en su conformación no nativa. Luego de este mecanismo de selección conformacional, describimos el evento de unión y determinamos que la constante de asociación bimolecular del complejo se encuentra en el límite superior de las descritas en las interacciones Ag:Ac. No obstante, la reacción global se encuentra limitada cinéticamente por una isomerización *trans-cis* de un residuo de prolina, siendo la misma extremadamente lenta, inusual para interacciones Ag:Ac. Finalmente, identificamos un tercer evento presente en la formación del complejo E7Ep:FabM1, el cual postulamos que es un mecanismo de ajuste inducido que aumenta la afinidad del complejo alrededor de seis veces.

Asimismo, la proteína E7 es modelo de proteína intrínsecamente desordenada, y el presente trabajo sirve de ejemplo de como reconoce el sistema inmune este tipo de antígenos ya que la conformación IDP se encuentra ampliamente representada entre las proteínas virales. A su vez, este trabajo aportó nuevos conocimientos sobre las proteínas intrínsecamente desordenadas en general, indicando cómo elementos estructurales discretos pueden regular la interacción con sus ligandos. Finalmente, el estudio mecanístico detallado llevado a cabo en esta tesis permitió aportar explicaciones a la diversidad de mecanismos de unión presentes en E7 detrás de su inusual capacidad de unir múltiples ligandos celulares.



,

## **Materiales y Métodos**



*Purificación del anticuerpo monoclonal E7M1 y obtención del fragmento Fab*

Para la producción de IgG del AcMo M1 se inyectaron ratones BALB/c con 0,5 ml de pristane (Sigma) intra-peritoneal 15 días previos a la inoculación con las líneas de hibridoma de M1 ( $0,5-1,5 \times 10^6$  células por ratón). A partir de las dos semanas de inoculadas las células, se comenzó con la recolección del líquido ascítico (LAT). Luego de la recolección del LAT, el mismo se centrifugó a 12.000 rpm durante 20 min y se descartó el precipitado. Se calculó la concentración de proteínas totales por el método de Bradford, y se diluyó en buffer TBS (Tris 250 mM, NaCl 1,5 M, pH 7,4) hasta alcanzar una concentración de 10 mg/ml. Se precipitó el LAT agregando una solución saturada de sulfato de amonio al 50% p/v durante 2 horas a 4°C, se centrifugó, se resuspendió en buffer TBS (Tris 25mM, NaCl 0.15 M) y se dializó contra 100 volúmenes del mismo buffer por 12 hs a 4°C. Luego, la muestra se dializó contra 100 volúmenes de buffer formiato 25 mM pH 4 a 4°C durante doce horas, se centrifugó y el sobrenadante fue sembrado en una columna de intercambio catiónico SP- Sepharose (Amersham-Pharmacia) previamente equilibrada en buffer formiato pH 4 25 mM. Se utilizó un gradiente lineal de sal en el cual eluyó la muestra. La fracción correspondiente a la IgG se concentró y se cuantificó por absorbancia a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción 1,5 ml/mg cm<sup>-1</sup>.

El fragmento univalente Fab se obtuvo a partir de la digestión con papaína (Sigma) de la IgG. Se utilizó una relación de masa de papaína/IgG de 1/200 en presencia de 7 mM EDTA y de 7 mM 2-mercaptoetanol incubando a 37° C durante 90 min, agitando cada 15 min. La reacción se detuvo con 25 mM de Iodoacetamida (sigma). El producto de digestión se dializó toda la noche a 4°C contra Tris-HCl 20 mM pH 8,5, se sembró en la columna Q HyperD previamente equilibrada con el buffer A (Tris-HCl 20 mM pH 8,5), y se eluyó utilizando un gradiente de 0-20% B (A+1M NaCl). Se dializó contra el *buffer* TBS la fracción correspondiente al fragmento Fab ON a 4°, luego se concentró y se sembró en una columna de filtración por tamiz molecular Superdex 75 (Amersham-Pharmacia). Finalmente, el fragmento Fab se concentró y se cuantificó por absorbancia a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción 1,5 ml/mg cm<sup>-1</sup>. Para su conservación y almacenamiento, se alicuotó a -80°C en glicerol 10% previo congelamiento en N<sub>2</sub> líquido.

*Expresión y purificación de las proteínas E7.*

Para la proteína de E7 HPV-16 entera se utilizó la construcción pMal-E7 previamente clonada en nuestro laboratorio. Para E7 de HPV-18 se utilizó la construcción pGEX-E718. Las proteínas recombinantes HPV-16, -18, -11 se expresaron y se purificaron a partir de un



protocolo puesto a punto en el laboratorio [49,122].

#### *Control de calidad de proteínas.*

La pureza de todas las preparaciones de proteína fue mayor al 95%, y fue verificada por geles PAGE desnaturalizantes y por análisis de espectrometría de masa (MALDI-TOF). El correcto plegamiento y el estado de oligomerización fueron evaluados mediante espectros de dicroísmo circular en el UV cercano y lejano, espectros de emisión de fluorescencia de triptófano y corridas en columnas de filtración molecular.

#### *Cuantificación de la concentración de proteína.*

Debido a que cada técnica de determinación de la concentración de proteína tiene sus limitaciones inherentes, tanto para las proteínas recombinantes como para los péptidos sintéticos, se determinó la concentración por diferentes metodologías:

- Absortividad de residuos aromáticos a 280 nm: Se determinó la concentración de proteína espectrofotométricamente utilizando el coeficiente de absorción molar de los aminoácidos tirosina y triptófano calculados según [123]:

$$A_{280} (\text{mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}) = 5,5 \#W + 1,49 \#Y [1]$$

donde #W y #Y son el número de residuos de Trp y Tyr, respectivamente.

- Absortividad del enlace peptídico a 220 nm: Se realizaron curvas de calibración de absorción a 220 nm en función del número de enlaces peptídicos utilizando la proteína CI2 o el péptido E2 SEW (ver siguiente sección) como patrón en condiciones de pH ácido. Se midió la absorbancia de las muestras incógnita por duplicado y la concentración fue estimada por interpolación en la curva patrón.

- Método de Bradford: Se determinó la concentración de proteína utilizando una curva patrón de seroalbúmina bovina (BSA) en el rango 0-10 µg/ml. Se midió la absorbancia a 595 nm de las muestras patrón (1 ml) luego de agregar 1ml de reactivo de Bradford (Sigma). Se determinó la absorbancia de las muestras incógnita por triplicado, y estos valores de absorbancia fueron utilizados para estimar la concentración de proteína interpolando en la curva patrón.

#### *Síntesis química y marcación de los péptidos*

Los péptidos fueron sintetizados por síntesis en fase sólida (Keck Facility, Yale

University USA) con sus extremos amino-terminales libres y sus extremos carboxilo-terminales amidados. Los mismos fueron obtenidos como crudos de síntesis y la purificación se realizó por cromatografía de fase reversa (C8) y posterior liofilización. Se siguió el siguiente protocolo para los péptidos que fueron derivatizados con isotiocianato de fluoresceína (FITC): 1-2mg de cada péptido fue incubado en una solución 1.5mg/ml de isotiocianato de fluoresceína en *buffer* bicarbonato de sodio a pH 8 por dos horas a temperatura ambiente (~25°C). El péptido marcado fue separado del reactivo de marcación utilizando una columna de desalado (PD10, GE Healthcare), y del péptido que quedo sin marcar a través de una cromatografía de fase reversa (C8). Utilizando este protocolo, el porcentaje de moléculas de péptido marcado obtenido fue mayor al 70%. La pureza de las preparaciones fue evaluada por espectrometría de masa MALDI-TOF y los péptidos fueron cuantificados utilizando tanto los coeficientes de absorción del enlace peptídico a 220nm como utilizando el coeficiente de extinción molar de la fluoresceína ( $\epsilon_{495\text{nm}}=75,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) [124].

Las secuencias de los péptidos sintéticos son:

E71-20: NH<sub>2</sub>-MHGDTPTLHEYMLDQPETT-COOH

E721-29: NH<sub>2</sub>-DLYCYEQLN-COOH

E716-40: NH<sub>2</sub>-QPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDG-COOH

E71-40: NH<sub>2</sub>-MHGDTPTLHEYMLDQPETTDLYCYEQLNDSSEEEDEIDG-COOH

E2 SEW: NH<sub>2</sub>-SEWQRDQFLSHD-COOH

E736-53: NH<sub>2</sub>-DEIDGPAGQAEPDRAHYN-COOH

E736-48: NH<sub>2</sub>-DEIDGPAGQAEPD-COOH

E736-48P41A: NH<sub>2</sub>-DEIDGAAGQAEPD-COOH

E736-48<sub>P47A</sub>: NH<sub>2</sub>-DEIDGPAGQAEPD-COOH

E736-48<sub>P41AP47A</sub>: NH<sub>2</sub>-DEIDGPAGQAEPD-COOH

#### *Electroforesis en geles desnaturalizantes de poli-acrilamida*

Todos los SDS-PAGE fueron realizados según el método de Laemmli. Previo a la siembra de las muestras en el gel, éstas fueron tratadas con *buffer* Tris-HCl 125 mM, pH 6.8, 4% SDS, 0,02% Azul de Bromofenol, 25% v/v glicerol, 0,2 M DTT. Las proteínas fueron detectadas con *coomansie Blue*.

#### *Ensayos de ELISA*

Los ensayos de ELISA fueron realizados en placas de poliestireno de 96 pocillos

(Maxisorp, Nunc) sensibilizadas con los diferentes antígenos en TBS, salvo especificaciones particulares. Como solución de bloqueo se utilizó seroalbúmina bovina (BSA) 1% en TBS (BSA/TBS). Los sueros de los ratones y el líquido ascítico del AcMo M1 fueron diluidos BSA/TBS y su reactividad fue detectada por incubación con anticuerpos policlonales de ratón conjugados a peroxidasa anti-IgG (Jackson) diluidos en solución de bloqueo. El ensayo se reveló con OPD (2mg OPD/ml buffer fosfato 100 mM citrato pH5/ul H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) y se detuvo la reacción con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N. Luego, el color de la reacción se midió a 492 nm en un lector de ELISA (SLT. spectra). Todas las incubaciones se realizaron a temperatura ambiente durante 60 min y las determinaciones se realizaron por duplicado.

- Reactividad AcMo E7M1 contra E7 HPV-16 y HPV-18: Para la sensibilización de la placa de ELISA se utilizó como antígenos: E7 HPV-16 y E7 HPV-18, 0,2 µg/pocillo, incubándose ON a 4° C.

- ELISA de mapeo epitópico: La placa se sensibilizó con diferentes péptidos que abarcan distintas regiones de E7 HPV-16, con los dominios amino terminal (E7 N) y carboxilo terminal (E7 C) de la proteína, y con la proteína entera (E7). Los antígenos utilizados fueron: E7 0.5 ug/pocillo, E7C 0.5 ug/pocillo, y E7Nt, E71-20, E7 16-40, E7 21-29, E7 36-48, E736-53, E7 49-57 y E2 1 ug/pocillo. Los distintos fragmentos se incubaron en buffer TBS+ 0.45 M NaCl toda la noche a 4° C. El agregado de 0.6 M NaCl se realizó para mejorar la eficiencia de pegado de los péptidos a la placa [125]. Como control y negativo se utilizaron sueros de ratones sin inmunizar. Las diluciones de los sueros y del líquido ascítico del AcMo M1 fueron de 1/200 y se realizaron en TBS/BSA.

#### *Estudios de unión por espectroscopía de Fluorescencia*

Los ensayos de unión se realizaron en un espectrofluorómetro Aminco Bowman Serie 2, arreglado en geometría L (SPectronic Co. Rochester, NY, EEUU). Las titulaciones de fluorescencia de FITC de E7 entera y los diferentes péptidos con el anticuerpo M1 se llevaron a cabo fijando la longitud de onda de excitación en 495 nm y registrando la emisión a 530 nm.

Las colecciones anisotrópicas se realizaron utilizando polarizadores lineales y colectando las intensidades verticales y horizontales a las mismas longitudes de onda antes mencionadas. Se promediaron al menos 5 mediciones a 0° y a 90° y se calculó la anisotropía (r) según [91]:

$$r = (I_{vv} - G * I_{vh}) / (I_{vv} + 2G * I_{vh}) \quad [1]$$

donde I es la intensidad de fluorescencia, v y h se refieren a vertical y horizontal, el primero de excitación y luego de emisión, y el factor de corrección G está definido como:

$$G = I_{hv} / I_{hh} \quad [2]$$

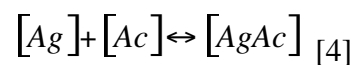
El valor r se puede utilizar para medir la difusión rotacional de las moléculas, que en el caso de proteínas globulares se relaciona con el peso molecular de la proteína mediante la ecuación de Perrin:

$$\theta = \eta M / RT(v + h) \quad [3]$$

donde  $\eta$  es la viscosidad del medio, T es la temperatura en Kelvin, R es la constante de los gases, M es el peso molecular, v es el volumen específico de la proteína y h es la hidratación. En todos los casos, a menos que se indique lo contrario, las mediciones se realizaron en *buffer* TBS, 1mM DTT a 20°C.

#### Titulaciones antígeno-anticuerpo al equilibrio

Todas las titulaciones se realizaron incubando una cantidad fija de FITC- E7 HPV-16, FITC-E7<sub>36-53</sub>, FITC-E7<sub>36-48</sub>, FITC-E7<sub>36-42</sub> o los fragmentos FITC-E7Ep mutantes de prolina con cantidades crecientes de FabM1 en tubos separados. Se dejó incubando por 1h a RT y luego se midió la anisotropía de fluorescencia para las diferentes concentraciones de M1. Para la determinación de la constante de disociación al equilibrio, dada la estequiometría 1:1, se utilizó el siguiente modelo:



donde Ag es [antígeno] y Ac es [anticuerpo], y la concentración total de ambas es:

$$Agt = Ag + AgAc$$

$$Act = Ac + AgAc$$

La constante de disociación ( $K_D$ ) se define como:

$$K_D = [Ag] * [Ac] / [AgAc] \quad [5]$$

de lo cual se deduce que la concentración de complejo [Ag Ac] para cada punto será:

$$[AgAc] = 0.5 * \left\{ \left( [Agt] + [Act] + K_D \right) + \left( [Act] + [Agt] + K_D \right)^2 - \left( 4 * [Agt] + [Act] \right)^{0.5} \right\} [6]$$

sabiendo la concentración de antígeno y anticuerpo en cada punto, dado que la señal medida de fluorescencia es lineal a la concentración del complejo, se puede obtener la  $K_D$  del complejo.

### Estudios cinéticos de asociación

- Dependencia de la fase lenta de asociación con la concentración: La fase lenta de asociación se midió utilizando el fluorímetro. Se analizó el cambio de anisotropía de fluorescencia de 50 nM FITC-E7Ep o 50 nM FITC- P47A E7Ep luego de la adición de cantidades crecientes de M1. Los datos de cada cinética individual se ajustaron a una función simple exponencial obteniéndose una constante de asociación observada para cada reacción. La dependencia de la  $k_{obs}$  en función de la concentración se ajustó a un modelo de pre-equilibrio descrito previamente [85]:

$$k_{obs} = k_1 + k_{-1} * \left( \frac{K_{D2}}{[MIFab] + K_{D2}} \right) \quad [7]$$

donde la  $k_{obs}$  es la constante de asociación observada para cada concentración de FabM1,  $k_1$  y  $k_{-1}$  son las constantes de la reacción de pre-equilibrio y la  $K_{D2}$  es la constante de equilibrio bimolecular. Usando los parámetros obtenidos a partir del modelo de pre-equilibrio, pudimos obtener la constante de  $K_1 = k_1/k_{-1}$  y  $K_2 = 1/K_{D2}$ . A su vez, con estos valores es posible calcular una constante de disociación al equilibrio global a través de la siguiente ecuación,

$$K_{D(global)} = (1+K_1)/(K_1*K_2).$$

Finalmente, usando el valor de la  $K_{D2}$  y la constante de asociación de segundo orden obtenida en los experimentos de *stopped-flow* ( $k_2$ ) fue posible calcular la constante  $k_{-2} = K_{D2}*k_2$ .

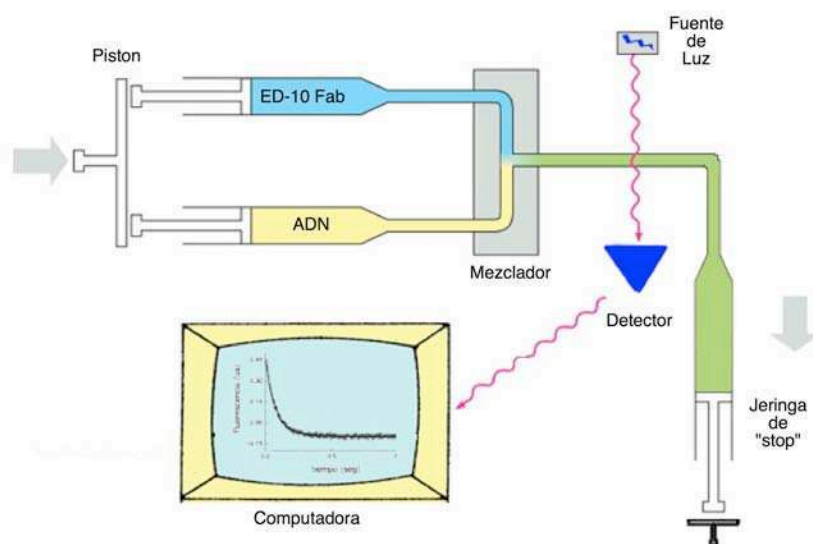
-Dependencia de la fase lenta de asociación con la temperatura: La fase lenta de asociación se midió a diferentes temperaturas en las mismas condiciones descritas en el experimento de la dependencia de esta fase con la concentración. El cambio en la anisotropía de fluorescencia fue medido luego de la adición de 600 nM de FabM1 en una cubeta que contenía 100 nM de FITC-

E7Ep. Los datos fueron ajustados a una función exponencial simple obteniéndose la constante observada para cada reacción. A partir de un gráfico de Eyring se pudieron determinar los parámetros de activación a partir de la relación  $\ln [k (h/k^*T)]$  vs  $1/T$ , donde  $h$  es la constante de Planck,  $k^*$  es la constante de Boltzman,  $T$  es la temperatura expresada en grados Kelvin y  $k$  corresponde a la constante observada determinada a cada temperatura. De la pendiente del gráfico puede obtenerse la entalpía de activación ( $-\Delta H^\ddagger/R$ ), donde  $R$  corresponde a la constante universal de los gases.

### *Estudios cinéticos de asociación y disociación medidos en stopped flow.*

#### - Principios operativos del equipo *stopped-flow*:

El curso cinético de la interacción de FabM1 con E7Ep se midió utilizando un aparato de flujo detenido ó *stopped-flow* Applied Photophysics SX18.MV (Figura A) (Leatherhead, Reino Unido). El mismo permite seguir el cambio de señal (absorbancia o fluorescencia) a partir de la mezcla de dos reactantes en función del tiempo, para tiempos muy cortos. Para este equipo el tiempo muerto de reacción experimental es aproximadamente de 2 ms.



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

El equipo permite la colección de 1000 puntos en intervalos de tiempo variables entre 0-20 ms hasta 0-1000 segundos. Cada una de las muestras se almacena en una jeringa. En el momento deseado, se acciona un pistón que mueve volúmenes equivalentes de cada jeringa

hacia una celda donde se mezclan. El líquido que estaba en ésta se desplaza hacia la jeringa de *stop* cerrando un circuito e iniciando la adquisición de datos.

- Consideraciones experimentales del *stopped-Flow*:

Todas las concentraciones reportadas corresponden a aquellas resultantes de mezcla de volúmenes iguales de ambas jeringas. Las reacciones fueron monitoreadas siguiendo la fluorescencia de FITC, excitando a 495nm. Cada medición reportada corresponde al promedio de entre cinco y diez colecciones de 1000 puntos cada una. En todos los casos la temperatura se mantuvo constante a 25°C utilizando un baño térmico.

- Determinación de las constantes cinéticas: La reacción de asociación bimolecular fue medida en condiciones de segundo orden mezclando cantidades equimolares de FabM1 y FITC-E7Ep. Bajo estas condiciones, los datos pueden ser analizados por la siguiente ecuación de segundo orden [87]:

$$F(t) = F_o + \left\{ \Delta F [M1Fab]_0^2 k_{on} t (1 + [M1Fab]_0 k_{on} t) + c_1 t \right\} \quad [8]$$

donde F es la fluorescencia en el tiempo  $t$ ,  $\Delta F$  es el cambio de fluorescencia durante la unión,  $F_o$  es la fluorescencia a  $t = 0$ ,  $[M1Fab]_0$  es la concentración inicial de M1Fab, y  $k_{on}$  es la velocidad constante de unión de segundo orden. Se tuvo en cuenta el desvío de la señal a través de un término lineal dependiente en el tiempo ( $c_1$ ).

Las cinéticas de disociación se midieron desplazando el complejo estequiométrico [FITC-E7Ep:M1Fab] con un exceso de 20 veces del péptido E7Ep sin marcar. Los datos se ajustaron a una función exponencial doble obteniéndose los valores de las constantes observadas de disociación  $k_{off}$ :

$$F(t) = F_o + A_1 \cdot e^{k_1 t} + A_2 \cdot e^{k_2 t} \quad [9]$$

donde  $A_{1,2}$  son las amplitudes,  $F_o$  es el valor inicial de fluorescencia o de anisotropía de fluorescencia y  $k_{1,2}$  son las constantes de disociación de cada fase.

### *Experimentos de dicroísmo circular*

Las mediciones en el UV lejano se llevaron a cabo en un espectropolarímetro Jasco J-810 usando un controlador de temperatura externo Peltier. Las tendencias conformacionales de E7Ep y los péptidos mutantes de prolinas se determinaron frente a diferentes compuestos que estabilizan diferentes tipos de estructura. Se midieron los espectros de CD en ausencia y presencia de TFE 50%. También se midieron en presencia de SDS 1mM y de SDS 25mM. Por

último se realizó un barrido térmico de los péptidos desde los 5 hasta los 75°C.

### *Experimentos de resonancia magnético nuclear*

Los experimentos de RMN se llevaron a cabo a 600.13 MHz en un espectrómetro Bruker Avance 600 MHz equipado con un magneto UltraShield Plus y una criosonda de triple resonancia. Los datos de RMN fueron procesados en Linux con los softwares NMRView/NMRPipe [126,127]. El péptido E7Ep en una concentración 3 mM fue disuelto en agua pH 7,5 (10% o 100% D<sub>2</sub>O v/v). Se asignaron los desplazamientos químicos de los protones y los carbonos analizando los siguientes experimentos: <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC, <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC-TOCSY (70 ms tiempo de mezcla), <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H TOCSY (70 ms tiempo de mezcla) y <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H NOESY (250 ms tiempo de mezcla). Para obtener las velocidades de isomerización *cis-trans* de las prolinas de E7Ep, se realizaron experimentos de NOESY con tiempo de mezcla variables tanto a 30 como a 40 °C . A 30 °C los tiempos de mezcla fueron: 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1, and 1.2 segundos y a 40 C 0.15, 0.3, 0.5, 0.7 y 0.9. Los espectros fueron tomados con 8K\*800 en las dimensiones t<sub>1</sub>\*t<sub>2</sub> con 24 scans. A cada temperatura se realizó un espectro <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C HMQC para observar cambios en el desplazamiento químico con la temperatura.

En los espectros de NOESY la intensidad del pico diagonal de los *cross-peak* de intercambio químico están relacionados con el tiempos de mezcla, τ<sub>m</sub>, a través de las siguientes ecuaciones:

$$I_{diag}(\tau_m) = \cosh(k\tau_m)e^{\{-(k+T_1^{-1})\tau_m\}} ; I_{cross}(\tau_m) = \sinh(k\tau_m)e^{\{-(k+T_1^{-1})\tau_m\}} \quad [10]$$

donde cosh y sinh es el coseno y el seno hiperbólico, respectivamente, *k* constante cinética del proceso de intercambio, y T<sub>1</sub> es el tiempo de relajación. Asumiendo que las velocidades de relajación T<sub>1</sub> son las mismas para los protones en la conformación *cis o trans* se obtiene que:

$$\frac{I_{cross}}{I_{diag}}(\tau_m) = \frac{\sinh(k\tau_m)}{\cosh(k\tau_m)} = \tanh(k\tau_m) \quad [11]$$

Para tiempos de mezcla cortos, la ecuación 11 puede simplificarse a:

$$\frac{I_{cross}}{I_{diag}}(\tau_m) \cong k\tau_m \quad [12]$$

La ecuación 12 se utiliza para analizar la cinética de isomerización *cis-trans* de las prolinas. Las constantes de isomerización pueden obtenerse ajustando las intensidades de los



picos diagonales y los picos de intercambio de los protones  $\delta$  de las prolinas. De los espectros  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMQC también se pudo calcular el equilibrio termodinámico de la isomerización *cis-trans* obteniendo la fracción molar  $x_{cis}$  y  $x_{trans}$ , la cual se obtuvo integrando los volúmenes de los picos de intercambio correspondientes a los isómeros de las prolinas en *cis* y en *trans*.

## **Bibliografía**



1. Mak T, Saunders M (2004) *The Immune Response Basis and Clinical principles*. 93-146.
2. Serriere J, Dugua JM, Bossus M, Verrier B, Haser R, et al (2010). Fab'-induced folding of antigenic N-terminal peptides from intrinsically disordered HIV-1 Tat revealed by X-ray crystallography. *J Mol Biol* 405: 33-42.
3. Alzari PM, Lascombe MB, Poljak RJ (1988) Three-dimensional structure of antibodies. *Annu Rev Immunol* 6: 555-580.
4. Poljak RJ (1991) Structure of antibodies and their complexes with antigens. *Mol Immunol* 28: 1341-1345.
5. Allcorn LC, Martin AC (2002) SACS--self-maintaining database of antibody crystal structure information. *Bioinformatics* 18: 175-181.
6. Guddat LW, Herron JN, Edmundson AB (1993) Three-dimensional structure of a human immunoglobulin with a hinge deletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 4271-4275.
7. Branden C, Tooze J (1991) *Introduction to protein structure*. New York: Garland Publishing Inc. 299-323 p.
8. MacCallum RM, Martin AC, Thornton JM (1996) Antibody-antigen interactions: contact analysis and binding site topography. *J Mol Biol* 262: 732-745.
9. Stanfield RL, Wilson IA (1993) Antibody-antigen interactions. *Curr Opin Struct Biol* 3: 113-118.
10. Padlan EA (1990) On the nature of antibody combining sites: unusual structural features that may confer on these sites an enhanced capacity for binding ligands. *Proteins* 7: 112-124.
11. Fischer ME (1894) Einfluss der Configuration auf die Wirkung der Enzyme. *Ber DtschChemGes* 27: 2985-2993.
12. Li Y, Li H, Smith-Gill SJ, Mariuzza RA (2000) Three-dimensional structures of the free and antigen-bound Fab from monoclonal antilysozyme antibody HyHEL-63(.). *Biochemistry* 39: 6296-6309.
13. Braden BC, Poljak RJ (1995) Structural features of the reactions between antibodies and protein antigens. *Faseb J* 9: 9-16.
14. Koshland DE (1958) Application of a Theory of Enzyme Specificity to Protein Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 44: 98-104.
15. Rini JM, Schulze-Gahmen U, Wilson IA (1992) Structural evidence for induced fit as a mechanism for antibody-antigen recognition. *Science* 255: 959-965.
16. Wilson IA, Stanfield RL (1994) Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes. *Curr Opin Struct Biol* 4: 857-867.
17. Eigen M (1968) New looks and outlooks on physical enzymology. *Q Rev Biophys* 1: 3-33.

18. Pauling L (1940) A theory of the structure and process formation of antibodies. *J Am Chem Soc* 62: 2643.
19. Foote J, Milstein C (1994) Conformational isomerism and the diversity of antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10370-10374.
20. Howley PM, Lowy DR (2001) Papillomaviridae. In: Knipe DM, Howley PM, editors. *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins. pp. 2197-2231.
21. Doorbar JCSaJ (2001) The biology of human papillomaviruses. In: Tying JCSaSK, editor. *Human Papillomaviruses Clinical and scientific advances*. First ed. London: Arnold. pp. 12.
22. zur Hausen H (1996) Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochim Biophys Acta* 1288: F55-78.
23. Bosch FX, Sanjosé S, Castellsagué X, Moreno V, Muñoz N (2006) Epimediology of Human Papillomavirus Infections and Associations with Cervical Cancer: New Opportunities for Prevention. In: Saveria Campo M, editor. *Papillomavirus Research: From Natural History to Vaccines and Beyond*. Wymondham: Caisreir Academic Press. pp. 19-40.
24. Cuzick J, Szarewski A, Terry G, Ho L, Hanby A, et al. (1995) Human papillomavirus testing in primary cervical screening. *Lancet* 345: 1533-1536.
25. Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, et al. (2001) Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet* 357: 1831-1836.
26. Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, Hack Y, Stubner A, et al. (2004) Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 42: 3176-3184.
27. McNeil C (2006) Who invented the VLP cervical cancer vaccines? *J Natl Cancer Inst* 98: 433.
28. Schiller JT (2006) Chapter 17: Second generation HPV vaccines to prevent cervical cancer. *Vaccine* 24 Suppl 3: S147-153.
29. WHO (2007) HPV and Cervical Cancer in the World World Health Organization. 25 25. 1:241 p.
30. Schiller JT, Castellsague X, Villa LL, Hildesheim A (2008) An update of prophylactic human papillomavirus L1 virus-like particle vaccine clinical trial results. *Vaccine* 26 Suppl 10: K53-61.
31. Frazer IH, Quinn M, Nicklin JL, Tan J, Perrin LC, et al. (2004) Phase 1 study of HPV16-specific immunotherapy with E6E7 fusion protein and ISCOMATRIX adjuvant in women with cervical intraepithelial neoplasia. *Vaccine* 23: 172-181.

32. Garcia-Hernandez E, Gonzalez-Sanchez JL, Andrade-Manzano A, Contreras ML, Padilla S, et al. (2006) Regression of papilloma high-grade lesions (CIN 2 and CIN 3) is stimulated by therapeutic vaccination with MVA E2 recombinant vaccine. *Cancer Gene Ther* 13: 592-597.
33. Welters MJ, Kenter GG, Piersma SJ, Vloon AP, Lowik MJ, et al. (2008) Induction of tumor-specific CD4+ and CD8+ T-cell immunity in cervical cancer patients by a human papillomavirus type 16 E6 and E7 long peptides vaccine. *Clin Cancer Res* 14: 178-187.
34. Zwaveling S, Ferreira Mota SC, Nouta J, Johnson M, Lipford GB, et al. (2002) Established human papillomavirus type 16-expressing tumors are effectively eradicated following vaccination with long peptides. *J Immunol* 169: 350-358.
35. Howley PM (1996) Papillomaviridae: The viruses and their replication. 2045 -2076 p.
36. Howley PM, Lowy R (2001) Papillomaviruses and Their Replication. In: Knipe D, Howley PM, editors. *Fields in Virology*. Philadelphia.: Lippincott Williams and Wilkins. pp. 2197-2229.
37. Banerjee NS, Genovese NJ, Noya F, Chien WM, Broker TR, et al. (2006) Conditionally activated E7 proteins of high-risk and low-risk human papillomaviruses induce S phase in postmitotic, differentiated human keratinocytes. *J Virol* 80: 6517-6524.
38. Herber R, Liem A, Pitot H, Lambert PF (1996) Squamous epithelial hyperplasia and carcinoma in mice transgenic for the human papillomavirus type 16 E7 oncogene. *J Virol* 70: 1873-1881.
39. Howley PM (1996) *Fields Virology*. Philadelphia: Raven Publishers. 2045-2076 p.
40. Chow LT, Broker TR (2006) Mechanisms and Regulation of Papillomavirus DNA Replication. In: Saveria Campo M, editor. *Papillomavirus Research: From Natural History to Vaccines and Beyond*. Wymondham: Caisreir Academic Press. pp. 53-71.
41. Phelps WC, Yee CL, Munger K, Howley PM (1988) The human papillomavirus type 16 E7 gene encodes transactivation and transformation functions similar to those of adenovirus E1A. *Cell* 53: 539-547.
42. Genovese NJ, Banerjee NS, Broker TR, Chow LT (2008) Casein kinase II motif-dependent phosphorylation of human papillomavirus E7 protein promotes p130 degradation and S-phase induction in differentiated human keratinocytes. *J Virol* 82: 4862-4873.
43. Wise-Draper TM, Wells SI (2008) Papillomavirus E6 and E7 proteins and their cellular targets. *Front Biosci* 13: 1003-1017.
44. Brokaw JL, Yee CL, Munger K (1994) A mutational analysis of the amino terminal domain of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Virology* 205: 603-607.
45. Phelps WC, Munger K, Yee CL, Barnes JA, Howley PM (1992) Structure-function analysis of the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *J Virol* 66: 2418-2427.

46. Alonso LG, Chemes LB, Cerutti ML, Dantur KI, Prat-Gay G (2012) Biochemical and Structure-Function Analyses of the HPV E7 Oncoprotein. In: Gaston K, editor. *Small Tumour Viruses*. pp. 125-150.
47. D.R. HPMaL (2001) Papillomaviruses and their Replication. In: P.M. KDMaH, editor. *Fields Virology*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. pp. 2213-2219.
48. Chemes LB., Glavina J., Alonso LG., Marino-Buslje C., de Prat-Gay G., et al. (2012) Sequence Evolution of the Intrinsically Disordered and Globular Domains of a Model Viral Oncoprotein. *PLoSOne*.
49. Alonso LG, Garcia-Alai MM, Nadra AD, Lapena AN, Almeida FL, et al. (2002) High-risk (HPV16) human papillomavirus E7 oncoprotein is highly stable and extended, with conformational transitions that could explain its multiple cellular binding partners. *Biochemistry* 41: 10510-10518.
50. Liu X, Clements A, Zhao K, Marmorstein R (2006) Structure of the human Papillomavirus E7 oncoprotein and its mechanism for inactivation of the retinoblastoma tumor suppressor. *J Biol Chem* 281: 578-586.
51. Ohlenschlager O, Seiboth T, Zengerling H, Briese L, Marchanka A, et al. (2006) Solution structure of the partially folded high-risk human papilloma virus 45 oncoprotein E7. *Oncogene* 25: 5953-5959.
52. McLaughlin-Drubin ME, Munger K (2009) The human papillomavirus E7 oncoprotein. *Virology* 384: 335-344.
53. Barbosa MS, Edmonds C, Fisher C, Schiller JT, Lowy DR, et al. (1990) The region of the HPV E7 oncoprotein homologous to adenovirus E1a and Sv40 large T antigen contains separate domains for Rb binding and casein kinase II phosphorylation. *Embo J* 9: 153-160.
54. Firzlaff JM, Luscher B, Eisenman RN (1991) Negative charge at the casein kinase II phosphorylation site is important for transformation but not for Rb protein binding by the E7 protein of human papillomavirus type 16. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 5187-5191.
55. Matthews JM, Bhati M, Lehtomaki E, Mansfield RE, Cubeddu L, et al. (2009) It takes two to tango: the structure and function of LIM, RING, PHD and MYND domains. *Curr Pharm Des* 15: 3681-3696.
56. Clements A, Johnston K, Mazzarelli JM, Ricciardi RP, Marmorstein R (2000) Oligomerization properties of the viral oncoproteins adenovirus E1A and human papillomavirus E7 and their complexes with the retinoblastoma protein. *Biochemistry* 39: 16033-16045.
57. Alonso LG, Smal C, Garcia-Alai MM, Chemes L, Salame M, et al. (2006) Chaperone holdase activity of human papillomavirus E7 oncoprotein. *Biochemistry* 45: 657-667.

58. Uversky VN, Roman A, Oldfield CJ, Dunker AK (2006) Protein intrinsic disorder and human papillomaviruses: increased amount of disorder in E6 and E7 oncoproteins from high risk HPVs. *J Proteome Res* 5: 1829-1842.
59. Uversky VN Intrinsically disordered proteins from A to Z (2011). *Int J Biochem Cell Biol* 43: 1090-1103.
60. Xue B, Blocquel D, Habchi J, Uversky AV, Kurgan L, et al (2014) Structural disorder in viral proteins. *Chem Rev* 114: 6880-6911.
61. Garcia-Alai MM, Alonso LG, de Prat-Gay G (2007) The N-terminal module of HPV16 E7 is an intrinsically disordered domain that confers conformational and recognition plasticity to the oncoprotein. *Biochemistry* 46: 10405-10412.
62. Noval MG, Gallo M, Perrone S, Salvay AG, Chemes LB, et al. (2013) Conformational dissection of a viral intrinsically disordered domain involved in cellular transformation. *PLoS One* 8: e72760.
63. Seedorf K, Oltersdorf T, Krammer G, Rowekamp W (1987) Identification of early proteins of the human papilloma viruses type 16 (HPV 16) and type 18 (HPV 18) in cervical carcinoma cells. *Embo J* 6: 139-144.
64. Smotkin D, Wettstein FO (1987) The major human papillomavirus protein in cervical cancers is a cytoplasmic phosphoprotein. *J Virol* 61: 1686-1689.
65. Dantur K, Alonso L, Castano E, Morelli L, Centeno-Crowley JM, et al. (2009) Cytosolic accumulation of HPV16 E7 oligomers supports different transformation routes for the prototypic viral oncoprotein: the amyloid-cancer connection. *Int J Cancer* 125: 1902-1911.
66. Jha PK, Beral V, Peto J, Hack S, Hermon C, et al. (1993) Antibodies to human papillomavirus and to other genital infectious agents and invasive cervical cancer risk. *Lancet* 341: 1116-1118.
67. Galloway DA (1992) Serological assays for the detection of HPV antibodies. *IARC Sci Publ*: 147-161.
68. Nindl I, Gissmann L, Fisher SG, Bribiesca LB, Berumen J, et al. (1996) The E7 protein of human papillomavirus (HPV) type 16 expressed by recombinant vaccinia virus can be used for detection of antibodies in sera from cervical cancer patients. *J Virol Methods* 62: 81-85.
69. Meschede W, Zumbach K, Braspenning J, Scheffner M, Benitez-Bribiesca L, et al. (1998) Antibodies against early proteins of human papillomaviruses as diagnostic markers for invasive cervical cancer. *J Clin Microbiol* 36: 475-480.
70. Bolhassani A, Zahedifard F, Taslimi Y, Taghikhani M, Nahavandian B, et al. (2009) Antibody detection against HPV16 E7 & GP96 fragments as biomarkers in cervical cancer patients. *Indian J Med Res* 130: 533-541.



71. Comerford SA, McCance DJ, Dougan G, Tite JP (1991) Identification of T- and B-cell epitopes of the E7 protein of human papillomavirus type 16. *J Virol* 65: 4681-4690.
72. Dreier K, Scheiden R, Lener B, Eehalt D, Pircher H, et al (2011). Subcellular localization of the human papillomavirus 16 E7 oncoprotein in CaSki cells and its detection in cervical adenocarcinoma and adenocarcinoma in situ. *Virology* 409: 54-68.
73. Fiedler M, Muller-Holzner E, Viertler HP, Widschwendter A, Laich A, et al. (2004) High level HPV-16 E7 oncoprotein expression correlates with reduced pRb-levels in cervical biopsies. *FASEB J* 18: 1120-1122.
74. Ressler S, Scheiden R, Dreier K, Laich A, Muller-Holzner E, et al. (2007) High-risk human papillomavirus E7 oncoprotein detection in cervical squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 13: 7067-7072.
75. Cerutti ML, Ferreira DU, Sanguineti S, Goldbaum FA, de Prat-Gay G (2006) Antibody recognition of a flexible epitope at the DNA binding site of the human papillomavirus transcriptional regulator E2. *Biochemistry* 45: 15520-15528.
76. Sheinerman FB, Norel R, Honig B (2000) Electrostatic aspects of protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol* 10: 153-159.
77. Song B, Cho JH, Raleigh DP (2007) Ionic-strength-dependent effects in protein folding: analysis of rate equilibrium free-energy relationships and their interpretation. *Biochemistry* 46: 14206-14214.
78. Chemes LB, Glavina J, Faivovich J, de Prat-Gay G, Sanchez IE (2012) Evolution of Linear Motifs within the Papillomavirus E7 Oncoprotein. *J Mol Biol* 422: 336-346.
79. Mills E, Truong K (2009) Rate and extent of protein localization is controlled by peptide-binding domain association kinetics and morphology. *Protein Sci* 18: 1252-1260.
80. Sydor JR, Engelhard M, Wittinghofer A, Goody RS, Herrmann C (1998) Transient kinetic studies on the interaction of Ras and the Ras-binding domain of c-Raf-1 reveal rapid equilibration of the complex. *Biochemistry* 37: 14292-14299.
81. Kiel C, Serrano L (2009) Cell type-specific importance of ras-c-raf complex association rate constants for MAPK signaling. *Sci Signal* 2: ra38.
82. Foote J, Eisen HN (1995) Kinetic and affinity limits on antibodies produced during immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 1254-1256.
83. James LC, Tawfik DS (2003) Conformational diversity and protein evolution--a 60-year-old hypothesis revisited. *Trends Biochem Sci* 28: 361-368.
84. Fersht Transition state theory. In: Freeman, editor (1998). *Structure and Mechanism in protein science*. New York. pp. 54-59.

85. James LC, Tawfik DS (2005) Structure and kinetics of a transient antibody binding intermediate reveal a kinetic discrimination mechanism in antigen recognition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 12730-12735.
86. Ferreiro DU, de Prat-Gay G (2003) A protein-DNA binding mechanism proceeds through multi-state or two-state parallel pathways. *J Mol Biol* 331: 89-99.
87. de Prat Gay G, Fersht AR (1994) Generation of a family of protein fragments for structure-folding studies. 1. Folding complementation of two fragments of chymotrypsin inhibitor-2 formed by cleavage at its unique methionine residue. *Biochemistry* 33: 7957-7963.
88. Northrup SH, Erickson HP (1992) Kinetics of protein-protein association explained by Brownian dynamics computer simulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 3338-3342.
89. Vogt A, Di Cera E (2012) Conformational Selection or Induced Fit? A Critical Appraisal of Kinetic Mechanism. *Biochemistry*: 8.
90. Fasman GD (1999) *Circular Dichroism And The Conformational Analysis of Biomolecules*. New York.
91. Fersht A (1999) *Structure and mechanism in protein science*. New York: W. H. Freeman & Company.
92. Eckert B, Martin A, Balbach J, Schmid FX (2005) Prolyl isomerization as a molecular timer in phage infection. *Nat Struct Mol Biol* 12: 619-623.
93. Feige MJ, Groscurth S, Marcinowski M, Shimizu Y, Kessler H, et al. (2009) An unfolded CH1 domain controls the assembly and secretion of IgG antibodies. *Mol Cell* 34: 569-579.
94. Rajbhandari P, Finn G, Solodin NM, Singarapu KK, Sahu SC, et al. (2011) Regulation of estrogen receptor alpha N-terminus conformation and function by peptidyl prolyl isomerase Pin1. *Mol Cell Biol* 32: 445-457.
95. Sarkar P, Reichman C, Saleh T, Birge RB, Kalodimos CG (2007) Proline cis-trans isomerization controls autoinhibition of a signaling protein. *Mol Cell* 25: 413-426.
96. Sibille N, Huvent I, Fauquant C, Verdegem D, Amniai L, et al (2011). Structural characterization by nuclear magnetic resonance of the impact of phosphorylation in the proline-rich region of the disordered Tau protein. *Proteins*.
97. Chemes LB, Glavina J, Alonso LG, Marino-Buslje C, de Prat-Gay G, et al. (2012) Sequence evolution of the intrinsically disordered and globular domains of a model viral oncoprotein. *PLoS One* 7: e47661.
98. Fersht AR (1999) *Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. New York: Freeman.
99. Harrison RK, Stein RL (1990) Mechanistic studies of peptidyl prolyl cis-trans isomerase: evidence for catalysis by distortion. *Biochemistry* 29: 1684-1689.

100. Harrison RK, Stein RL (1990) Mechanistic studies of peptidyl prolyl cis-trans isomerase: evidence for catalysis by distortion. *Biochemistry* 29: 1684-1689.
101. Shen Y, Bax A (2010) Prediction of Xaa-Pro peptide bond conformation from sequence and chemical shifts. *J Biomol NMR* 46: 199-204.
102. Dyson HJ, Wright PE (1995) Antigenic peptides. *FASEB J* 9: 37-42.
103. Tindle RW, Smith JA, Geysen HM, Selvey LA, Frazer IH (1990) Identification of B epitopes in human papillomavirus type 16 E7 open reading frame protein. *J Gen Virol* 71 ( Pt 6): 1347-1354.
104. Waterhous DV, Johnson WC, Jr. (1994) Importance of environment in determining secondary structure in proteins. *Biochemistry* 33: 2121-2128.
105. Wu CS, Ikeda K, Yang JT (1981) Ordered conformation of polypeptides and proteins in acidic dodecyl sulfate solution. *Biochemistry* 20: 566-570.
106. Shi Z, Chen K, Liu Z, Kallenbach NR (2006) Conformation of the backbone in unfolded proteins. *Chem Rev* 106: 1877-1897.
107. Shi Z, Woody RW, Kallenbach NR (2002) Is polyproline II a major backbone conformation in unfolded proteins? *Adv Protein Chem* 62: 163-240.
108. Krchnak V, Vagner J, Suchankova A, Krcmar M, Ritterova L, et al. (1990) Synthetic peptides derived from E7 region of human papillomavirus type 16 used as antigens in ELISA. *J Gen Virol* 71 ( Pt 11): 2719-2724.
109. Lidqvist M, Nilsson O, Holmgren J, Hall C, Fermer C (2008) Phage display for site-specific immunization and characterization of high-risk human papillomavirus specific E7 monoclonal antibodies. *J Immunol Methods* 337: 88-96.
110. Rosen O, Chill J, Sharon M, Kessler N, Mester B, et al. (2005) Induced fit in HIV-neutralizing antibody complexes: evidence for alternative conformations of the gp120 V3 loop and the molecular basis for broad neutralization. *Biochemistry* 44: 7250-7258.
111. James LC, Roversi P, Tawfik DS (2003) Antibody multispecificity mediated by conformational diversity. *Science* 299: 1362-1367.
112. Leder L, Berger C, Bornhauser S, Wendt H, Ackermann F, et al. (1995) Spectroscopic, calorimetric, and kinetic demonstration of conformational adaptation in peptide-antibody recognition. *Biochemistry* 34: 16509-16518.
113. Bosshard HR (2001) Molecular recognition by induced fit: how fit is the concept? *News Physiol Sci* 16: 171-173.
114. Espinoza-Fonseca LM (2009) Reconciling binding mechanisms of intrinsically disordered proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 382: 479-482.

115. Tugarinov V, Zvi A, Levy R, Anglister J (1999) A cis proline turn linking two beta-hairpin strands in the solution structure of an antibody-bound HIV-1III<sub>B</sub> V3 peptide. *Nat Struct Biol* 6: 331-335.
116. Wu SC, Lin CW (2001) Neutralizing peptide ligands selected from phage-displayed libraries mimic the conformational epitope on domain III of the Japanese encephalitis virus envelope protein. *Virus Res* 76: 59-69.
117. Sem DS, Baker BL, Victoria EJ, Jones DS, Marquis D, et al. (1998) Structural characterization and optimization of antibody-selected phage library mimotopes of an antigen associated with autoimmune recurrent thrombosis. *Biochemistry* 37: 16069-16081.
118. Noval MG, Gallo M, Perrone S, Salvay AG, Chemes LB, et al. (2013) Conformational dissection of a viral intrinsically disordered domain involved in cellular transformation. *PLoS One* 8: e72760.
119. Chemes LB, Camporeale G, Sanchez IE, de Prat-Gay G, Alonso LG Cysteine-rich positions outside the structural zinc motif of human papillomavirus E7 provide conformational modulation and suggest functional redox roles (2014). *Biochemistry* 53: 1680-1696.
120. Chemes LB, Sanchez IE, de Prat-Gay G (2011) Kinetic recognition of the retinoblastoma tumor suppressor by a specific protein target. *J Mol Biol* 412: 267-284.
121. Accardi L, Dona MG, Mileo AM, Paggi MG, Federico A, et al. (2011) Retinoblastoma-independent antiproliferative activity of novel intracellular antibodies against the E7 oncoprotein in HPV 16-positive cells. *BMC Cancer* 11: 17.
122. Chemes LB, Sanchez IE, Smal C, de Prat-Gay G (2010) Targeting mechanism of the retinoblastoma tumor suppressor by a prototypical viral oncoprotein. Structural modularity, intrinsic disorder and phosphorylation of human papillomavirus E7. *FEBS J* 277: 973-988.
123. Pace CN, Vajdos F, Lanette F, Grimsley G, Gray T (1995) How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein. *Protein Science* 4: 2411-2423.
124. Hermanson GT (1996) *Bioconjugate Techniques*; Technology ES, editor. 785 p.
125. Geerligs HJ, Weijer WJ, Bloemhoff W, Welling GW, Welling-Wester S (1988) The influence of pH and ionic strength on the coating of peptides of herpes simplex virus type 1 in an enzyme-linked immunosorbent assay. *J Immunol Methods* 106: 239-244.
126. Delaglio F, Grzesiek S, Vuister GW, Zhu G, Pfeifer J, et al. (1995) NMRPipe: a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes. *J Biomol NMR* 6: 277-293.
127. Johnson BA (2004) Using NMRView to visualize and analyze the NMR spectra of macromolecules. *Methods Mol Biol* 278: 313-352.

