



Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea



ZTF-FCT
Zientzia eta Teknologia Fakultatea
Facultad de Ciencia y Tecnología



ZIENTZIA ETA TEKNOLOGIA FAKULTATEA. LEIOA

GRADU AMAIERAKO LANA BIOTEKNOLOGIA

4E10 ANTI-MPER ANTIGORPUTZAREN
OPTIMIZAZIOA:
CDR-H3 BEGIZTAREN ALDAKETEN EBALUAZIOA

Ikaslea: Insausti Gonzalez, Sara
Data: 2015-eko ekaina

Zuzendaria:
Jose Luis Nieva Escandón

Ikasturtea:
2014/15

1. AURKIBIDEA

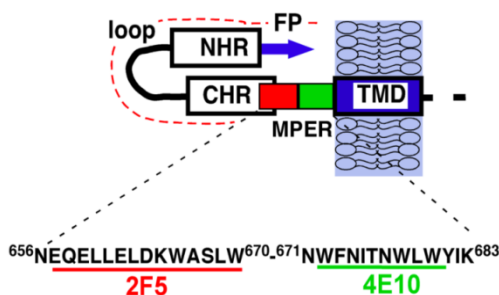
2. SARRERA ETA HELBURUA.....	1
2.1. AURREKARIAK	2
2.2. HELBURUA	3
3. GARAPENA.....	4
3.1. MATERIALAK ETA METODOAK.....	4
3.1.1 Materialak	4
3.1.2. Mutagenesia	4
3.1.3. Fab adierazpena eta purifikazioa	5
3.1.4. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).....	6
3.1.5. Neutralizazio saioa.....	7
3.1.6. Fab-peptido lotura soluzioan (ITC)	7
3.1.7. Fab-peptido lotura mintzean	8
3.2. EMAITZAK	9
3.2.1. Fab mutanteen diseinua eta purifikazioa	9
3.2.2. ELISA	13
3.2.3. Neutralizazio saioa.....	13
3.2.4. Fab-peptido lotura soluzioan (ITC)	15
3.2.5. Fab-peptido lotura mintzean	18
3.3 EZTABAIDA	20
4. ONDORIOAK	22
5. BIBLIOGRAFIA	23

2. SARRERA ETA HELBURUA:

2.1 AURREKARIAK:

HIES-a Giza Immunoeskasiaren Birusak (GIB) eragindako gaixotasuna da. *Lentivirus* generokoa den *Retroviridae* familiako birus hau, mintz lipidiko batez estalita dago. Birioiak, proteinazko kapsida batez inguraturik eta kate bakarreko bi RNA molekula identikoz osaturik dagoen genoma garraiatzen du. Hiru gene nagusik osatzen dute GIB-en genoma: *Gag* genea, birusaren matrizea, kapsida eta nukleokapsida osatuko dituzten proteinen aitzindaria; *Pol*, proteasa, alderantzizko transkriptasa eta integrasa proteolisiaren produktu dituen eta azkenik, *Env* genea, birusaren gainazalean aurkitzen den gp160 glikoproteina kodetzen duena. Azken aitzindari honen proteolisiak konplexu ez-kobalentea osatzen duten gp120 eta gp41 azpiunitateak banatuko dira, birioia estaltzen duen bigeruz lipidikoan homotrimeroko modura antolatuko direlarik. Gp120-k itu zelula ezagutzen du honen CD4 hartzaileari eta CCR5 edo CXCR4 kohartzaileei lotuz. Elkarrekintzaren ondoko konformazio aldaketa baten bidez, gp41 azpiunitatearen ektodomeinuak bi mintzen arteko fusioa eragingo du, birusaren genoma zelula ostalari txertatuz (Chan eta lag., 1997).

Gp41 fusio proteina 344 aminoazidoz osatutako glikoproteina da, hiru domeinutan zatitu daitekeena: domeinu zitoplasmatikoa (CT, Cytoplasmatic Tail), transmintz domeinua (TM, Transmembrane) eta ektodomeinua. Azkenaren sekuentzia **1. irudian** definituta dauden hainbat eskualde funtzionaletan banatzen da: itu zelularen mintzean txertatuko den eta fusio peptido deritzon eskualde hidrofoboa N-muturrean (FP, Fusion Peptide), bi heptada α helikoide errepikakor (NHR eta CHR), hauek lotzen dituen bira hidrofilikoa (loop) eta transmintz domeinua hasi aurretik kokatzen den sekuentzia (MPER, Membrane Proximal External Region). Azken domeinu honetan 2F5 eta 4E10 antigorputz monoklonalen epitopo edo itu sekuentziak kokatzen dira. (Apellaniz eta lag., 2014).



1. Irudia. gp41-en eskema orokorra. Fusio proteinaren transmintz domeinua (TMD) eta ektodomeinua irudikatu dira, azken honetan MPER domeinua nabarmentzen delarik, bertan baitaude 2F5 eta 4E10 antigorputz neutralizatzaileen ezagumendu guneak (sekuentziak azpian).

4E10 eta 2F5 giza antigorputz monoklonalak, kutsatutako indibiduen portzentaje oso baxu batek ekoizten dituzten GIB-1-en aurkako ahalmen zabaleko antigorputz neutralizatzaile modukoak dira, eta birusaren mintzetik gertu aurkitzen diren (MPER domeinuan) oso kontserbatutako elkarren ondoko bi epitopo ezagutzen dituzte, hain zuzen, ELDKWAS (2F5, a.a. 662–668) eta NWF(D/N)IT (4E10, a.a. 671–676) sekuentziak (Julien eta lag., 2008; Apellaniz eta lag., 2014) (**1.irudia**).

Bi antigorputz hauen eta beren epitopo minimoaren arteko loturari buruz ikerketa ugari egin dira. 2F5 eta 4E10 Fab (fragment antigen-binding)-peptido konplexu kristalizatuek, disolbatzailerekin kontaktuan gelditzen diren hondar aromatikoak (hidrofoboak) aurkezten dituzte CDR-H3 begiztan, biek ere birusaren mintzaren ertzean duten epitopoa ezagutzeko ezaugarri edo mekanismo bera jarraitzen dutela aditzera emanez (Huarte eta lag., 2008). Gainera, 4E10 eta 2F5en CDR-H3 begiztek antigenoarekin kontaktuan ez dagoen gainazal zabala aurkezten dute, birusaren mintzarekin edota gp41 edo gp120-ko hondarrekin kontaktu gehiago egin ditzazketela iradokitzen duena (Huarte eta lag., 2008).

Idea hau indartu duten zenbait analisi burutu dira, bai 4E10 eta baita 2F5-en lotura mintz lipidiko baten presentzian areagotu egiten dela ikusi delarik (Cardoso eta lag., 2008). Horrez gain, kasu bietan, begiztaren erpineko hondarrak ezabatuz (glizina-serina hondarrez ordezkaturik) antigorputzen neutralizazio gaitasuna galtzen dela ikusi da (Julien eta lag., 2010; Apellaniz eta lag., 2014).

Birusaren eta zelula ostalarien mintzen arteko fusioa inhibitzeko CDR-H3 begiztaren erpin hau ezinbesteko elementua dela baieztatzen duten argitalpenak ugariak dira

(Julien eta lag., 2010; Alam eta lag., 2009), hala ere, bere funtzio zehatza oraindik argitzeke dago. Lortutako egituren arabera, aminoazido hauek epitopoarekin kontaktu zuzenik egiten ez dutela dirudi, beraz, ezagumendu zuzenean ez dutela parte hartzen (Julien eta lag., 2008; Cardoso eta lag., 2005). Antigorputzaren hidrofobizitatean oinarrituz eta MPER-ek mintzetik duen hurbiltasuna kontuan hartuz, elkarrekintza hidrofobo ez espezifikoak ematen direla proposatu da (Apellaniz eta lag., 2014).

MPER domeinua guztiz kontserbakorra izanik, GIB-1-en aurkako txertoaren itu bezala sortutako interesa handia izan da. Aitzitik, ez dago informazio ugari infektatutako gaixoekin zein helburu profilaktikoekin egindako sekuentzia honen aurkako antigorputzen erabilera antierretrobiralaren inguruan. Immunoterapiaren bidez, erretrovirusaren eta itu zelulen arteko lotura eragotzi eta erreplikazioa inhibitzeaz gain, antigorputzen menpeko zitotoxizitate zelularra eta konplementuaren menpeko zitotoxizitatea bultzatuz GIB-1-en eraistea bultzatuko litzateke (Mehandru eta lag., 2007).

Immunoterapian erabiliko diren antigorputzen eraginkortasuna bermatzeko ezinbestekoa da hauen afinitatea oso altua izatea (≈ 1 pM). Naturan oso zaila da afinitate hain altua duten antigorputzak topatzea, zentro germinalean ematen den afinitate altuko immunoglobulinen heltze prozesua afinitate muga baten menpe baitago (Klein eta lag., 2013). Gizakiaren esku-hartzea, molekulen ingeniartzaren bidez, muga hori gainditu eta afinitatea hobetzeko bidea izan daiteke. Berriki, itu sekuentzia GIB-1-en gp120 azpiunitatean duen antigorputz baten (PG9) inguruan argitaratutako ikerketek (Willis eta lag., 2015) ideia hau indartzen dute: Ordenagailu bidezko diseinua erabiliz, Fab-aren CDR-H3 begiztan eragindako aminoazido bakarreko mutazioak afinitatearen eta aktibitate neutralizatzailearen emendioa eragin du. Ordezkatutako aminoazidoak, gainera, ez du birusarekin kontaktu zuzenik, ez da paratopoaren zati; Fab-aren egonkortasuna handitzearekin soilik lortu da hobekuntza.

2.2 HELBURUAK:

Honi begira, 4E10 antigorputz monoklonalaren gaitasun neutralizatzailearen emendioa lortu nahi izan da lan honetan. 4E10 antigorputzaren neutralizazio

ahalmena zabala izan arren, polierreaktiboa da, eta lipidoekin zuzenki batzeko ahalmena erakusten du. Azken prozesu hau CDR-H3 begizta hidrofoboaren menpe dagoela uste da. Immunoterapian erabilgarria izateko bere polierreaktibitatea murriztea ezinbestekoa izango da, bere potentziaren emendioa ere lortzen ahaleginduz. 4E10-ak 2F5 antigorputzarekin dituen antzekotasunez eta azken honen polierreaktibitate baxuagoaz eta potentzia altuagoaz baliatu nahi izan da immunogeno eraginkorra diseinatu ahal izateko.

Helburu orokorra, beraz, 4E10-az baliatuz, neutralizazio gaitasun zabala, polierreaktibitate baxua eta potentzia altua dituen agente immunoterapeutikoa garatzea izango da. Lehen urrats modura, polierreaktibitate baxuagoa eta potentzia altuagoa dituen 2F5-en CDR-H3 begiztaren erpinaren transplantea burutu zen.

3. GARAPENA

3.1. MATERIALAK ETA METODOAK

3.1.1 Materialak. GIB-1 HXB2 anduiaren gp41-eko MPER domeinuan oinarritutako CpreTM peptidoa (KKK⁶⁷¹NWFDITNWLWYIKLFIMIVGGLV⁶⁹³KK), CpreTM 17,18A mutantea (KKK⁶⁷¹NAADITNWLWYIKLFIMIVGGLV⁶⁹³KK), MPER peptidoa (KK⁶⁶⁴DKWASLWNWFDITNWLWYIKLFIMIVG⁶⁹¹KKK) eta NpreTM peptidoa (⁶⁵⁶NEQELLELDKWASLWNWFNITNWLWYIK⁶⁸³), fase solidoko sintesi bidez sintetizatu ziren Fmoc kimika erabiliz eta HPLC-z purifikatu ziren Pompeu-Fabra Unibertsitateko Proteomika Unitatean (Bartzelona). 1-palmitoil-2-oleil-3-fosfatidilkolina (POPC edo PC) eta kolesterola (CHOL) Avanti Polar Lipids-etik, eta *E.coli* K12 anduiaren ingeniariatzatik lortutako *T7SHuffle* zelulak eta pETColaDUET plasmidoa New England Biolabs-etik eskuratuak izan ziren. Zuzendutako mutagenesirako hasleak Sigma-Aldrich-etik, proteasa inhibitzailea (EDTA-free) Roche-tik, eta Liozima Hampton-etik eskuratu ziren. TzM-bl zelulak, azkenik, AIDS Research and Reference Reagent Program-etik lortu ziren.

3.1.2. Mutagenesia. Fab 4E10 mutanteak lortzeko, zuzendutako mutagenesi bidez CDR-H3 begiztako erpina (W₁₀₀-G_{100A}-W_{100B}-L_{100C} hondarrak) ezabatu eta G₉₉ eta G_{100D} artean eratutako hutsunea LFGV (4E10-2F5 loop) eta VGFL (4E10-2F5 loop (rev)) hondarrekin bete zen kasu bakoitzerako. Hasleen diseinua burutu zen lehenik

(Forward: 5'-CTGTTTGGCGTGGGCAAACCGATTGGCGCGTTTGCGCATTG-3' eta Reverse: 5'-GCCGGTGGTGCCTTCACGCGCGC-3'), ondoren, mutagenesi kit bat erabiliz (Toyobo, Osaka, Japon) eta PCR bidez sekuentziak luzatu, ligasa batek katea linealak itxi eta azkenik Dnp I entzimarekin digeritu zen lagina, katea originala degradatuz mutantearekin soilik geratzeko. Lortutako sekuentziak egokiak zirela ziurtatzeko Secugen-era sekuentziaziazera bidaliak izan ziren.

3.1.3. Fab adierazpena eta purifikazioa. Mutanteak kantitate handitan eta purutasun altuarekin ekoiztea ezinbestekoa zen esperimenduarekin hasteko. Proteina errekonbinante hauen gene kodetzaileak sintetizatu ondoren (TOP Gene Technologies, Saint-Laurent, Quebec, Canada) *E. coli* bakterioaren *T7 SHuffle* anduian (New England BioLabs, Bartzelona) sintetizatu ziren: pETColaDUET plasmidoan (Novagen, Madril) Fab 4E10 WT-ren eta mutante bakoitzaren sekuentzia txertatu zen. Plasmido honek T7 promotore bakar baten menpe dauden bi Klonaziorako Gune Anizkoitz (MCS, Multiple Cloning Site) ditu, kanamizinarekiko erresistentzia azaltzen duelarik. MCS₁-an antigorputzaren kate astunaren sekuentzia txertatu zen, N muturrean histidina isatsarekin, eta MCS₂-an antigorputzaren kate arina kodetu zen. Fab-en adierazpenerako *T7 SHuffle* zelula kompetenteak elektroporazioz pETColaDUET plasmidoarekin transformatu ziren. Kanamizina antibiotikodun plakan erein eta hazitako kolonia baten overnight-a (O/N) jarri zen antibiotiko berdinarekin (1:1000 diluzioa). O/N-ren 1:50 diluzioa egin ondoren zelulak 37 °C-tan utzi ziren hazten 0,8-ko dentsitate optikoa lortu arte (bakterioak hazkuntza fase exponentzian egon arte). Orduan T7 promotorea 0,4 mM IPTG-rekin induzitu eta 24 orduz 18 °C-tan inkubatu ziren Fab-a adierazi zezaten. Purifikazioari dagokionez, zelulak jaso eta 20 minutuz 8000x g-tara zentrifugatu ziren. Jalkina 25 mL “Lisi tanpoi”-tan (50mM HEPES pH 7.5, iodoazetamida, 500mM NaCl, proteasa inhibitzaile pastila bat (EDTA-free), 25mM imidazol, 1mg/mL liozima, DNasa eta %5 glizerol) birsuspenditu eta 4 °C-tan irabiatzen utzi zen 1h, liozimak bakterioen pareta apurtu zezan, eta ondoren, French-Press teknika erabili zen zelulak hobeto apurtzeko. Zentrifugazioz apurtu gabeko zelulak eta horma zelularrak jalki (15 min, 8000xg, 4°C) eta gero, histidina isatsean oinarrituta, Nikel bidezko afinitate purifikazioa egin zen nikel-azido nitrilotriazetiko (Ni-NTA) erretxina erabiliz (GE Healthcare). Gainjalkin filtratua HisTrap HP (1 mL) zutabetik

zehar pasarazi zen, ondoren zutabea 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl eta 35 mM Imidazol pH 8-ra zuen indargetzailearekin garbitu (metalekiko afinitatea duten eta inespezifikoki itsatsi diren proteinak kentzeko) eta jarraian, 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl eta 500 mM Imidazol pH 8-ra dituen indargetzailearen bidez eluitu zen. Imidazolak histidina isatsarekin lehiatzen du nikelagatik, beraz, imidazol kontzentrazio altuetan oreka Imidazol-Ni²⁺ konplexura desplazatuko da, His etiketa duen proteina askatuko delarik. 280 nm-tan absorbantzia balio altuenak erakutsi zituzten frakzioak pH 5.6-ra dagoen AcNa 10mM (%10 glizerol) indargetzailearekin gau osoz dializatzen utzi ziren, imidazol arrastoak kendu eta lagina hurrengo urratserako tanpoi egokitan egongo zedin. Ioi-trukezko kromatografia (IEC, ion exchange chromatography) erabili zen purifikazioko azken pausuan. Fab-en puntu isoelektrikoa (PI) 9.03-ekoa izanik, hori baino pH baxuagotan (kasu honetan pH 7.4) positiboki kargaturik zegoen, eta gai zen sulfatoen ondorioz negatiboki kargaturiko erretxinari lotzeko. Proteinadun lagina zutabea zehar pasarazi zen, lotura ez espezifikoak eragozteko hau garbitu (AcNa 10mM pH 5.6, %10 glizerol) eta gatz kontzentrazio altuko indargetzaileaz (AcNa 10mM pH 5.6, %10 glizerol 250 mM KCl gradiantea) eluitu zen Fab-a. SDS-PAGE elektroforesi bitartez pisu molekularren arabera banatu eta intereseko proteinaren purutasuna aztertu zen.

3.1.4. ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay). ELISA, sustantzia desberdinen detekzio eta kuantifikaziorako diseinatutako metodoa da, eta antigorputzek epitopoak ezagutzeko duten gaitasunean oinarrituta dago. Proiektu honetan, lortutako Fab-en ezagumendu gaitasuna testatzeko erabili zen. Hasteko, 96 putzuko plakak MPER domeinuan oinarritutako peptidoekin (CpreTM eta CpreTM mutantea) inkubatu ziren (1,37 μM) gau osoan zehar giro tenperaturan. Garbiketa indargetzailearekin (PBS+%0,05 Tween 20) itsatsi gabeko peptidoa kendu ondoren, batuketa inespezifikoak ekiditeko, putzuak %3-ra behi-seroko albumina (BSA, Bovine Serum Albumin) zuen PBS (Phosphate Buffered Saline) 300 μl-z blokeatu ziren giro tenperaturan bi orduz inkubatuz. Gero, purifikatutako Fab-aren diluzio seriatuak (100 μL) erantsi ziren (PBS-n %1 BSA, %0,02 Tween-20) eta 4 orduz inkubatu giro tenperaturan. Ondoren, peroxidasa 100 μl anti-human antigorputz sekundarioa (1:1000) gaineratu eta 50 minutuko inkubazioa bukatuta, 4-nitrofenil fosfato disodio gatz hexahidratoa gehitu zitzaion, fosfatasa alkalinoarekin

erreakzionatuz produktu kromogeniko bat ematen duena. 30 minuturen ondoren, erreakzioa NaOH 3M erabiliz geldiarazi eta erreakzioaren produktua 405 nm-ko absorbantzia neurtuz kuantifikatu zen Bio-Tek Sinergy HT plaka irakurgailu batean.

3.1.5. Neutralizazio saioa. GIB-JRCSF-Env proteinadun eta HXB2-Env proteinadun pseudobirusak erabili ziren TZM-bl zelulak infektatzeko. Zelula hauek HeLa zelula lerrotik deribatutako zelula eukariotoak dira eta modu egonkor batean CD4+ errezeptore eta CCR5 koerrezeptore kantitate altuak adierazten dituzte, beraz, GIB-1 isolatu desberdinen infekzioekiko oso sentikorrek dira. 37 °C-tan eta %5 CO₂-tan mantendu ziren M medioan (Dulbecco-k aldatutako Eagle medioa (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), % 10 txahal suero fetala (FBS, *Fetal Bovine Serum*), aminoazido ez esentzialak (1:100), sodio pirubatoa eta penizilina eta estreptomizina antibiotikoak (1:100)). Zelula horiek infektatzeko pseudobirusak HEK293T zelulak erabiliz ekoiztu ziren; *gag/pol* eta *env* akastuneko GIB-1 genoma kodetzen duten bektoreekin kotransfektatu ziren, beraz, partikula biriko berriak eratzeko egiturazko proteina guztiak kodetzeko gai izango ziren, baina mutazio konkretuek birus infektiboen sorrera ekiditen zuten. Bestetik, GFP proteina kodetzen duen bektore batekin kotransfektatu ziren, horrela, hau adieraziko zuten infektatutako zelulek gainerako proteina biralak beharrean (pseudobirusak behin bakarrik izango ziren gai infektatzeko). Neutralizazio saioan, aurrez infektibitate saio baten bidez determinatutako eta %10-%15-eko infekzioa eragiteko beharrezko zen pseudobirus kantitatea jarri zen 96-ko plaka batean (50 µL/putzu), horretarako antibiotiko gabeko M medioa erabiliz (M*). Jarraian, PBS-tan disolbatutako Fab desberdinen diluzio seriatuak gehitu ziren plakara (50 µL/putzu), 1 h eta 30 minutuz inkubatzen utziz. TZM-bl zelulak jaso ziren ondoren, zentrifugatu eta %20 antibiotiko eta 30 µg/mL DEAE-dextrano (birusa eta zelularen arteko lotura faboratzeko) zituen M* medioan birsuspenditu, 11.000 zelula/putzu gehitu ziren plakara (100 µL) eta 48h inkubatzen utzi zen. Azkenik, M* medioa aldatu eta 24h igaro ondoren, zelulak jaso ziren, fluxu zitometria (BD FACScalibur) bidez infektatutako zelula kantitatea neurtzeko (GFP proteina fluoreszenteari esker).

3.1.6. Fab-peptido batuketa soluzioan. Isothermal titration calorimetry (ITC) edo kalorimetria titulaketa isotermaok erreakzio kimiko edo biokimiko batean ematen

den bero trukea modu zuzenean neurtzen du, eta makromolekula biologikoen eta beren ligandoen lotura energetikaren ikerketarako erreminta baliotsua da. Kasu honetan, Fab-en eta lotzen duten peptidoaren arteko elkarrekintzaren karakterizazio termodinamiko orokor bat ahalbidetu zuen, bai elkarrekintzaren estequiometria (L:M), lotura afinitatea, bai eta prozesuan zehar ematen diren entalpia eta entropia aldaketei buruzko informazioa eskainiz. Elkarrekintza gidatzen duten indarraren natura (entalpikoa edo entropikoa den) eta hauen magnitudeak ezagutzea, ezaugarri bereziak dituen ligandoaren diseinu arrazionalerako ezinbestekoak dira. Esperimentua VP-ITC mikrokalorimetro batean (MicroCal, Northampton, MA) burutu zen 25 °C-tan. Fab-ak O/N dializatu egin ziren 4°C-tan (10 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl eta %10 glizerol, pH 7.5) dialisi indargetzailearen aurrean, eta saioa hasi aurretik 5 mM DPC gehitu eta gasgabetu ziren. Fab-ak (3 µM) MPER domeinuan oinarritutako eta dialisi indargetzailean disolbatutako 40 µM peptidorekin titulatu ziren, txertaketa bakoitzaren bolumena 10 µL-koa izanik. Amaitzeko, peptidoari dagokion diluzio beroa kendua izan zen, eta lotura isotermak lotura gune bakarreko modelora moldatu ziren ORIGIN 7.0 programa erabiliz.

3.1.7. Fab-peptido batuketa mintzetan.

Besikulen ekoizpena. Mintzaren modelo bezala erabilitako bigeruzak bakarreko besikula handiak (LUV, Large Unilamellar Vesicles) ekoizteko estrusio metodoa erabili zen. Kloroformoan disolbatutako POPC eta kloresterola N₂ fluxu bitartez lehortu ondoren, lipidoa 1.5 orduz hutsean inkubatuz ezabatu ziren disolbatzaile organikoaren hondakinak. Lehortutako lipido geruzak disoluzio indargetzaile isosmotikoan (5mM HEPES, 100mM NaCl, pH 7.4) disolbatu, eta jarraian 10 izozte-desizozte ziklo aplikatu zitzaizkien. Besikulen tamaina egokia, LUV-ak estrusorean hamar bidez 100 nm-ko polikarbonatozko bi mintzetatik pasaraziz lortu eta azkenik, hauen kontzentrazioa fosfolipidoen kuantifikazio bidez determinatu zen, fosforo inorganikoaren kuantifikazioan oinarritzen den metodo ez-zuzen bat erabiliz (Bartlett, 1959; Böttcher, 1961; Fiske & Subbarow, 1925).

Besikulen Sakarosa Gradiente Bidezko Flotazioa. Antigorputzen lotura, bai zuzenean mintzari, baita peptidoa duen mintzari aztertzeke sakarosa gradienteak erabili ziren. Gradiente hauek abiadura handietan zentrifugatuz, partikulak haien

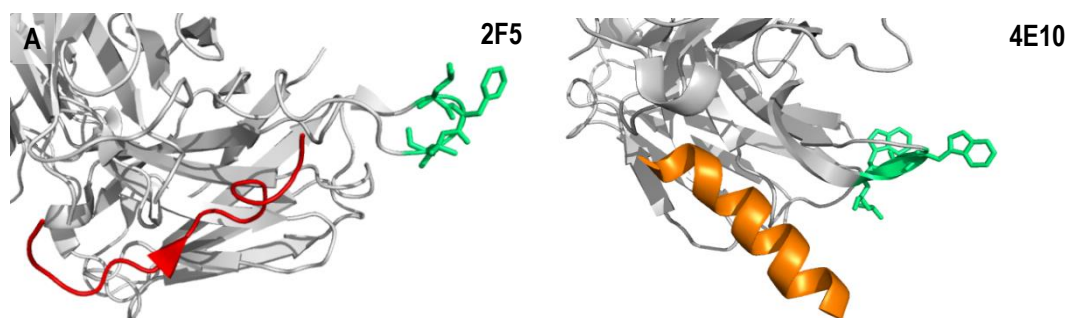
dentsitatearekin bat egiten duen zonaldera mugitzen dira. Modu honetan mintzari lotuta eta soluzioan aske geratu diren partikulak banatu daitezke. Disoluzio indargetzaile isosmotiko 200 µl-tan %0,5 Rhodamine-DHPE fluoroforoa zeramaten liposomak eta peptidoa 15 minutuz inkubatu ziren 1:100 erlazioan. Ondoren antigorputzak gehitu eta beste 15 minutuz inkubatu zen nahasketa (lipido:Ab 1:1000). Lagin honen bukaerako bolumena 300 µl-takoa izanik, sakarosa kontzentrazioa 1,4 M-era doitu zen. Gradienteak eratzeko honi 400 µl sakarosa 0,8 M frakzioa gaineratu zitzaion goialdean eta bukatzeko beste 300 µl sakarosa 0,5 M. Gradienteak 436.000 x g-tan zentrifugatu ziren 3 orduz TLA 120.2 errotore batean. Zentrifugatu ondoren laginak 250 µl-ko lau frakziotan banatu eta agregatutako, prezipitatutako edota hodiaren hornei itsatsitako proteina/peptidoak berreskuratzeko polikarbonatozko saiodiak 250 µl SDS %1 beroarekin (100° C) garbitu ziren. Peptido/antigorputzen banaketa Western plapaketa bitartez aztertu zen.

Western plapaketa. Laginak SDS-PAGE elektroforesi bitartez haien pisu molekularren arabera banatu, eta poliakridamidazko gel honen edukia nitrozelulosazko mintz batera transferitu zen elektropapaketa erdilehorreko protokoloa jarraituz %20 metanola zuen %1 SDS-an. Mintzak PBST disolbatzaile indargetzailean (PBS + %0,05 Tween 20) disolbatutako gantz gabeko esnearekin (%5eko proportzioan) ordu batez blokeatu ondoren %2,5 esnea zuen PBST-tan disolbatutako antigorputz primarioarekin (Goat Anti Human Fab specific 1:1000 Fab-en kasuan eta Mab 4E10 0,1 µg/ml-ko kontzentrazioan Cpre™ peptidoaren kasuan) inkubatu ziren gau osoz 4°C-an. Hurrengo egunean mintzak PBST-n disolbatutako (1:2000) HRP deituriko entzima (Horseradish peroxidase) batuta zeraman antigorputz sekundarioarekin (Anti Goat IgG-HRP Fab-en kasurako eta Anti Human IgG-HRP Mab 4E10-aren kasurako) inkubatu ziren. Entzimaren aktibitatearen ondorioz kemolumineszentea zen sustratu bat gehitu (SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate), mintzak X-izpiko filmen aurrean jarri eta AGFA Curix 60 batean errebelatu zen.

3.2. EMAITZAK

3.2.1. Fab mutaziodunen diseinua eta purifikazioa. Bi mutante berri eraikitzea erabaki zen, Fab 4E10-ri kate astuneko CDR-H3 begiztaren erpina kendu eta Fab

2F5-an erpin bera eratzen aurkitzen diren lau aminoazidoekin ordezkatur ($^{H100}WGWL^{H100C}$ ordez LFGV). Transplantea jasotako mutante honi 4E10-2F5 loop deitu zitzaion. Bigarren mutanteak, 4E10-2F5 loop (rev) deitua izan zenak, VGFL aminoazidoak zituen aipaturako posizioan, berriz ere 2F5 antigorputzak erakusten dituen aminoazido sekuentzia imitatuz; kasu honetan, ordea, alderantzizko ordenan antolatuta izan ziren. Horrela, Trp^{H100} eta Trp^{H100B} hondar hidrofoboaren posizioan Valina eta Fenilalanina (hauek ere hidrofoboak) gelditzen ziren, eta Glizina eta Leuzina aminoazidoek antigorputz basatian (WT) zuten ordena mantentzen zuten: ondorioz, Fab 4E10 WT-ren begiztaren ezaugarri antzekoak mantenduko zituen arren, antigorputz mutante honen begiztak mintz lipidikoan txertatzeko joera handiagoa izango zuen, basatiaren begiztak, W-ren ezaugarriak direla eta, interfasean gelditzeko joera izango zuen bitartean (V eta F hondarrek W baina joera handiagoa erakusten dute mintzaren fase hidrofoborantz hurbiltzeko (Nieva eta Suarez, 2000)). Begiztarik gabeko (SG hondarrez ordezkatur) Fab 4E10 Δ loop-a kontrol bezala erabili zen. Jarraitutako estrategia orokorra **2. irudian** deskribatzen da.

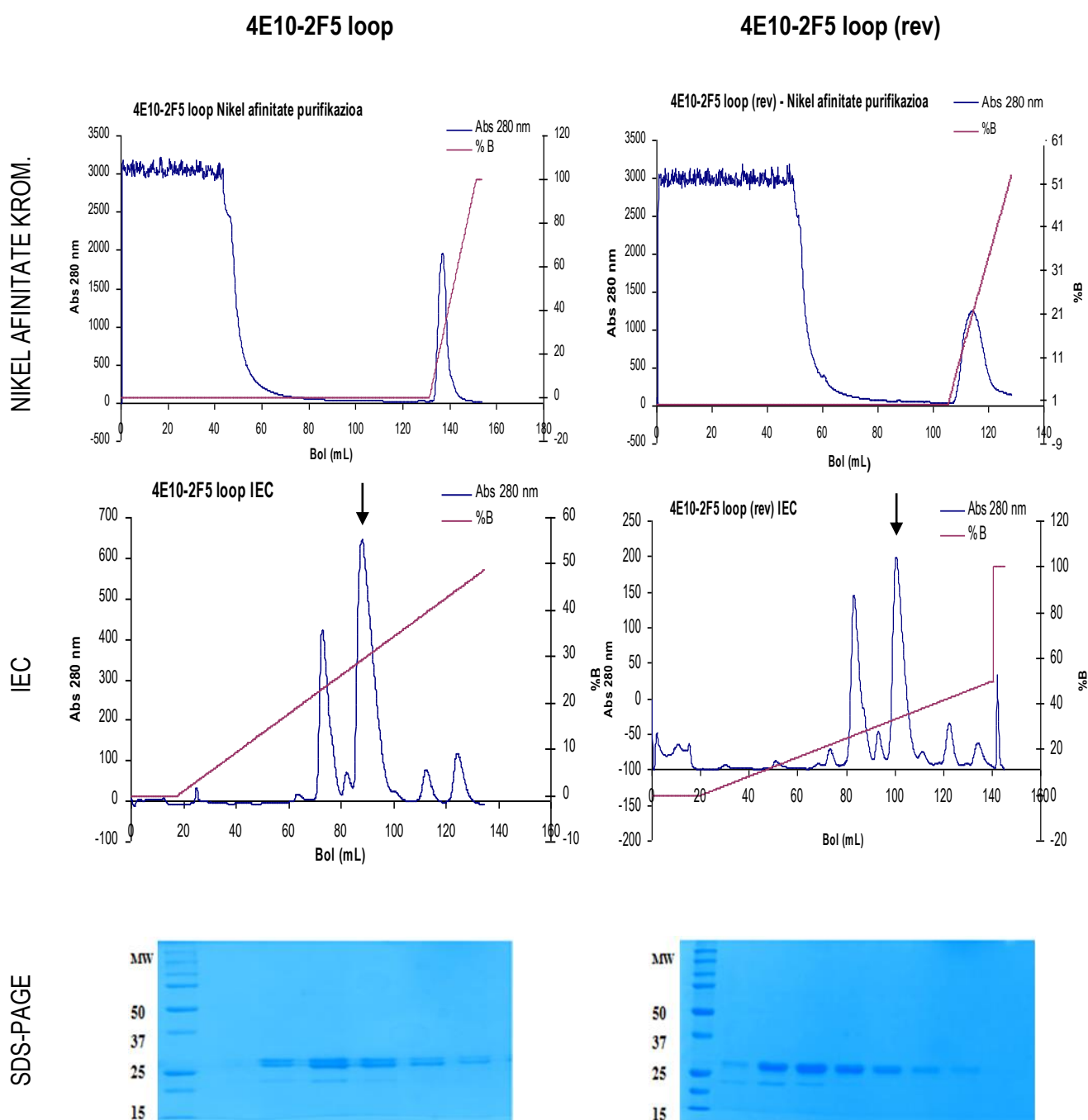


B

<i>Erabilitako Fab-ak</i>	<i>Begiztaren sekuentzia</i>			
Fab 4E10 WT	W	G	W	L
Fab 4E10-2F5 loop (rev)	V	G	F	L
Fab 4E10-2F5 loop	L	F	G	V
Fab 4E10 Δ loop		G	S	

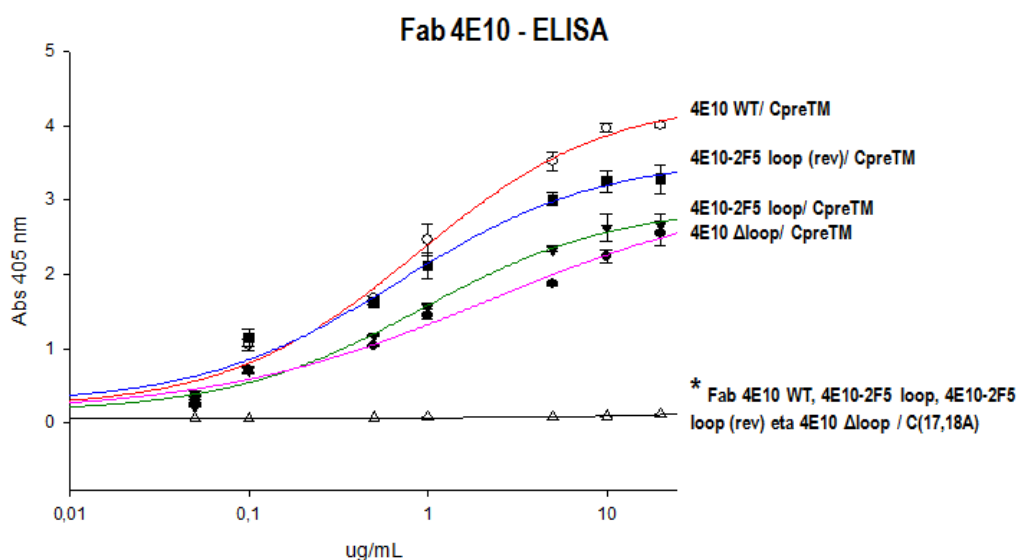
2.irudia. Fab berrien diseinua. Fab 2F5 eta Fab 4E10 bakoitzaren epitopoari loturik. Berdez CDR-H3 begiztaren orientazioa eta hondarrak irudikatu dira (A). Fab 4E10-aren CDR-H3 begiztaren erpina osatzen duten hondar hidrofoboak ($^{H100}WGWL^{H100C}$), Fab 2F5-aren CDR-H3 erpinean aurkitzen diren aminoazidoez ordezkatu ziren (LFGV, eta alderantzizko ordenan, VGFL) (B).

Fab-en purifikazio prozesua **3. irudian** behatu daiteke. Nikel bidezko afinitate zutabeen egindako purifikazioak eta ondoren egindako ioi-trukezko kromatografiak, piko definituak erakutsi zituzten, (goiko panelak). Fab-ak adierazi eta purifikatu ondoren, SDS-PAGE bidez hauen purutasuna aztertu zen: Elektroforesia (beheko panelak) egin ondoren 28 kDa-ko bi banda ikusten ziren, (elektroforesi desnaturatzaileak kobalenteki loturiko katea arina eta astuna bereizi zituen) eta beraz, mutanteak puruak zirela egiaztatu zen. PBS-an (10 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl eta %10 glizerol pH 7,5) gordetzeko, gau osoz dializatu ziren indargetzaile honen aurrean.



3. Irudia. Fab 4E10-2F5 loop eta Fab 4E10-2F5 loop (rev)-en purifikazioa. Nikel bidezko afinitate kromatografia (goiko panelak) eta loi trukezko kromatografia (tarteko panelak) burutu eta kasu bietan Fab purifikatua eskuratu zen. Gezi batez irudikatu dira azken purifikazioaren ondoren jasotako frakzioak. Bi mutanteen (4E10-2F5 loop eta 4E10-2F5 loop (rev)) SDS-PAGE gelek, kate 28 kDa-eko pisu molekularra duten Fab-ak erakusten dizkigute purifikaturik (beheko panelak).

3.2.2. ELISA. Diseinatutako bi mutanteek beren epitopoarekiko duten afinitatea neurtzeko ELISA zuzenak burutu ziren (**4. irudia**). Horretarako Fab kontzentrazio desberdinen aurrean egin ziren saiakerak MPER domeinuan oinarritutako CpreTM peptidoarekin estalitako ELISA plaken bidez, baita CpreTM mutantez (C(17,18A)) estalitako plakekin ere, elkarrekintza espezifikoa zen frogatzeko asmoz.

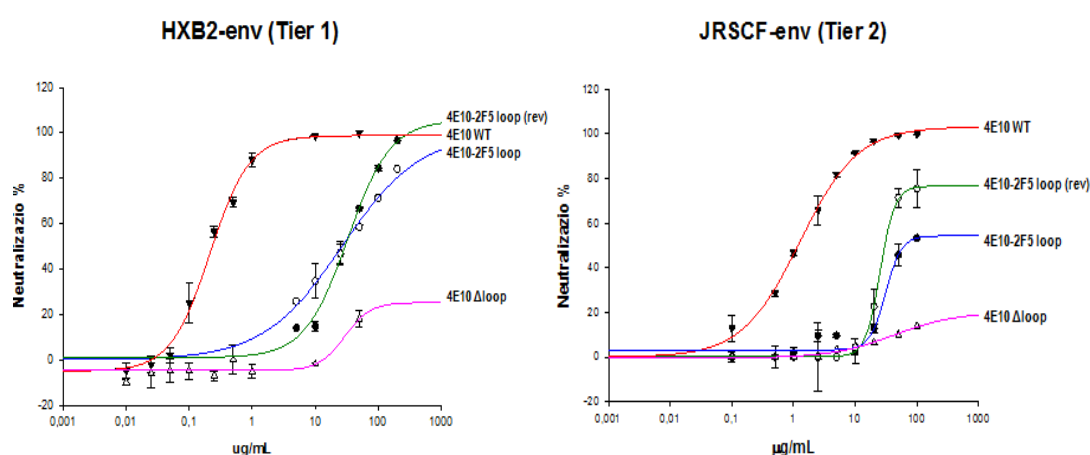


4. Irudia. ELISA saioa: Fab-en eta 4E10 epitopoaren arteko elkarrekintza espezifikoa. Fab 4E10 basatiaren lez, mutante guztiak gai izan ziren espezifikoki epitopoari lotzeko, 17 eta 18 posizioetan alanina mutazioa duen peptidoari lotzen ez ziren bitartean. Beraz, batuketari begira, funtzionalak eta espezifikoak direla ondoriozta daiteke.

Bai Fab 4E10-2F5 loop, eta baita loop (rev) mutanteak espezifikoki epitopora lotu zirela ikus daiteke (CpreTM-ri lotzen zaizkie, baina ez peptido mutanteari), ez ordea Fab 4E10 WT-aren afinitate berdinarekin. Saio honen arabera, aminoazido hidrofoboak 4E10 Fab basatian agertzen diren ordenaz mantendu dituen 4E10-2F5 loop (rev) mutanteak ia afinitate bera erakutsi zuen, baxuena begiztarik gabekoak erakutsi zuen bitartean. Hala ere, ziurtatu zen mutanteak funtzionalak zirela, hau da, modu egokian tolestu eta epitopoa ezagutzeko gaitasuna mantendu zutela.

3.2.3. Neutralizazio saioa. Ezaguna da Fab 4E10 WT gai dela GIB-1-ren andui ugari neutralizatzeko, hots, zelulak infektatzeko birusak duen gaitasuna inhibitzeko. Gainera, Fab 4E10 Δloop-ak gaitasun hori galtzen du (Apellaniz eta lag., 2014). Mutante berriek birusa neutralizatzeko duten ahalmena neutralizazio saio baten bidez testatu zen, JRCSF-Env proteinadun eta HXB2-Env proteinadun birusen aurrean.

GIB-1-aren antigorputz-bidezko neutralizazio sentikortasuna kuantifikatua izan da (Seaman eta lag., 2010), ezaugarri honen arabera birusaren lau azpitalde osatuz: sentikortasun altua (tier 1A edo 1A maila), batz bestekoa baina altuagoa (tier 1B), tarteko sentikortasuna (tier 2) eta azkenik sentikortasun baxua (tier 3). Sailkapen honen arabera, JRCSF-Env proteinadun anduia tier 2 motakoa litzateke, HXB2-Env proteinadun birusa tier 1A taldekkoa den bitartean, eta desberdintasun hori egindako bi neutralizazio saioetan igarri daiteke (**5. irudia**).



5.Irudia. Neutralizazio saioa: Fab 4E10 WT, Δ oop, eta diseinatutako mutanteen neutralizazio gaitasuna HXB2-env eta JRSCF-env birusen aurrean. GIB-JRCSF-Env proteinadun eta GIB-HXB2-Env proteinadun pseudobirusak erabili ziren TZM-bl zelulak infektatzeko, eta hau eragozteko Fab-ek duten gaitasuna testatzeko kontzentrazio desberdinak gehitu ziren. 2F5 antigorputzaren begiztarekin mutatuak izan ziren Fab-ek neutralizazio gaitasuna mantentzen zuten, 4E10 WT-arena baina askoz ahulagoa bazen ere. Espero bezala, Fab 4E10 Δ oop ez zen gai birusaren eta zelula ostalariaren arteko fusioa inhibitzeko.

Emaitzek Fab 4E10 WT-aren neutralizazio gaitasuna berretsi zuten, 5 μ g/mL-ko kontzentraziotan jada birusen %80-aren infekzio gaitasuna inhibitu zuelarik JRSCF-env-en kasuan, eta are gehiago (%80-tik gora 1 μ g/mL kontzentraziotan) HXB2-env birusa erabilitako saioan. Fab 4E10 Δ oop-ren kasurako berriz, WGWL begiztaren galerak birus hau neutralizatzeke gaitasuna ezabatzen duela agerian gelditu zen berriro ere (%20-tik beherako neutralizazio gaitasuna 0 kontsidera daiteke). Emaitza interesgarrienak diseinatu berri ziren mutanteek eman zituzten, izan ere, badirudi mutagenesi bidez txertatu zitzaizen begizta hidrofoboari esker neutralizazio ahalmena partzialki berreskuratu zutela, Fab 4E10 WT-ak neutralizatzaile hobea izaten jarraitzen duen arren.

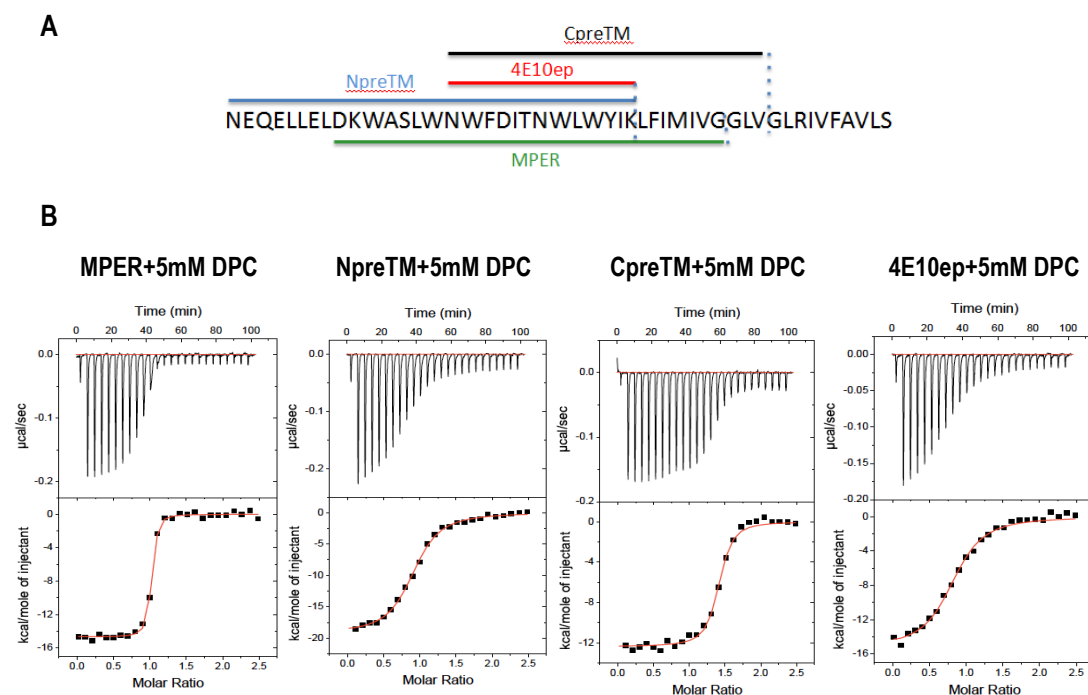
$$y = y_0 + \frac{a}{1 + (x/x_0)^b} \quad (1)$$

Aurreko ekuazioak (1) neutralizazioan lortutako balioak kurba sigmoidal gisa moldatzen ditu, x_0 -ren baliotik neutralizazio gaitasuna deskribatzeko oso egokia den IC_{50} parametroa eskuratzen delarik. IC_{50} edo inhibizio maximoa lortzeko kontzentrazio balioaren erdiak, funtzio biologiko edo biokimiko bat inhibitzeko sustantzia batek duen gaitasunaren eraginkortasuna deskribatzen du. Neutralizazioaren kasuan, $IC_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ denean, antigorputzak aktibitate esanguratsurik ez duela onartzen da. **1. taulan** ikus daitekeen bezala, Fab basatiak eta mutanteek aktibitate neutralizatzaile egokia erakusten dute, baina eragindako mutazioek neutralizazioa nabarmenki murriztu dute.

1.Taula. Fab bakoitzaren IC_{50} balioa ($\mu\text{g/mL}$). Erakutsitako baloreak 5. irudian agertzen diren datu esperimentalak eta 1. ekuazioa erabiliz lortu ziren.

<i>Fab 4E10</i>	<i>HXB2</i>	<i>JRSCF</i>
WT	0.2133 ± 0.0235	1.2590 ± 0.0938
2F5 loop	34.5866 ± 10.0859	33.5792 ± 7.7072
2F5 loop (rev)	26.5973 ± 14,0161	22.7812 ± 4.6647

3.2.4. Fab-peptido batuketa soluzioan (ITC). Fab 4E10 errekonbinanteek soluzioan epitopoari lotzeko duten gaitasuna testatzeko ITC neurketak burutu ziren. Lehenik eta behin Fab 4E10 WT erabili zen peptido desberdinen aurrean, guztiak ere MPER domeinuan oinarrituak. Horrela, lau esperimentu burutu ziren, 4E10ep ($^{671}\text{NWFDITNWLWYIK}^{683}\text{KKK}$) epitopo nominala, CpreTM peptidoa ($\text{KKK}^{671}\text{NWFDITNWLWYIKL FIMIVGGLV}^{693}\text{KK}$), NpreTM peptidoa ($^{656}\text{NEQELLELDKWASLWNWFNITNWLWYIK}^{683}$), eta MPER ($\text{KK}^{664}\text{DKWASLWNWFDITNWLWYIKL FIMIVG}^{691}\text{KKK}$) sekuentziak erabiliz (**6A irudia**). 5mM DPC erabili ziren saio hauek aurrera eramateko, soluzioan MPER peptido hidrofoboaren agregazioa eragozten baitu (birusean duen egitura, hau da paratopoak lotzen duena, modu egokiagoan imitatzen du era berean). Peptidoaren txertaketa bakoitzean sortutako beroa kalkulatu loturaren parametro termodinamikoak determinatu ahal izan ziren (**6B irudia**).



6.Irudia. Fab 4E10 WT-en kalorimetria titulazte isoterma (25°C-tan) peptido desberdinak erabiliz. Fab-aren eta biruseko 4E10 epitopoaren arteko elkarrekintzaren termodinamika aztertzeko MPER domeinuan oinarritutako peptido desberdinak erabili ziren (A). Fab 4E10 peptido desberdinez titulatu izanako isotermak (B). Goiko paneletan, 10 µL-ko peptidoaren injektzio bakoitzaren ondorioz kalorimetria gelaxkan askatutako beroa ikus daiteke. Azpiko irudiek, berriz, integratutako beroak eta datuen 1:1 lotura estekiometriara moldatutako lerro ez-linealak erakusten dituzte.

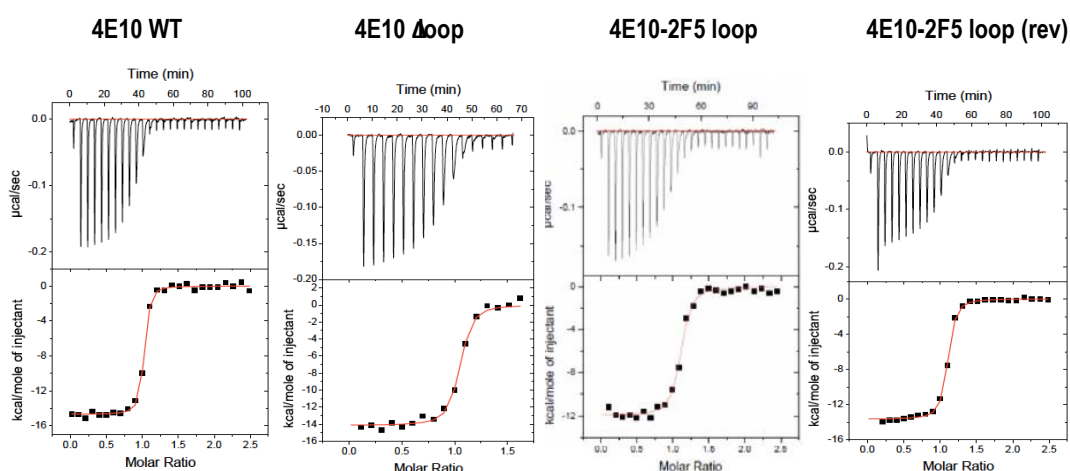
Parametro termodinamikoak **2. taulan** bildu dira. Afinitate altuko elkarrekintza (nM) ikusi zen 4E10 antigorputzaren epitopoa erakusten duten peptido eta erabilitako Fab-aren artean, baina MPER sekuentziarekin egindako saioan esanguratsuki emendatzen zen, bestela esanda, peptidoaren sekuentzia luzatuz 50 aldiz handitzen zen Fab-aren afinitatea, CDR-H3 begiztak kontaktu gehiago egiten ez dituen arren.

2.Taula. Fab 4E10 WT eta peptido desberdinen loturaren termodinamika. Datuak 293 K-tan egindako saiotik eskuratu ziren.

Fab 4E10 + 5mM DPC	K_D (nM)^a	ΔH (kcal/mol⁻¹)	ΔS (cal mol⁻¹ · K⁻¹)	n^b
NpreTM	119	-19	-32,8	0.9
4E10ep	168	-15	-20,2	0.8
CpreTM	18,4	-12	-6	1.37
MPER	3,7	-15	-3,6	0.98

- K_D parametroa bero aldaketaren doikuntzaz lortu zen.
- n-k peptido/proteina ratioari egiten dio erreferentzia.

Fab basatiarekin egindako saioek, afinitate altuena (K_d baxuena) MPER peptidoarekin lortzen dela erakutsi zuten. Fab mutanteek soluzioan peptidoari lotzeko zuten gaitasuna, beraz, MPER peptidoarekin testatzea erabaki zen. MPER erabiliz lortutako emaitzak 7. irudian eta 3. taulan erakutsi dira. ELISA saioak bestelakorik iradokitzen bazuen ere, ITC-aren bidez lortutako balioek mutante guztiak peptidoa antzeko afinitateaz lotzen zutela erakutsi zuten (ikusten diren bariazioak ez dira esanguratsuak).



7.Irudia. MPER peptidoaren eta Fab 4E10 eta honen mutanteen kalorimetria titulazte isoterma.

Peptidoaren (MPER + 5mM DPC) 10 μ L-ko injekzioa bakoitzean sortutako beroa neurtu zen, soluzioan Fab 4E10 WT, Δ oop, 4E10-2F5 loop eta 4E10-2F5 loop (rev) (hurrenez hurren) mutanteen lotura aztertzeko. Goiko panelean, peptidoaren injekzio bakoitzaren ondorioz kalorimetria gelaxkan askatutako beroa ikus daiteke. Azpiko irudiek, berriz, integratutako beroak eta datuen 1:1 lotura estekiometriara moldatutako lerro ez-linealak erakusten dituzte.

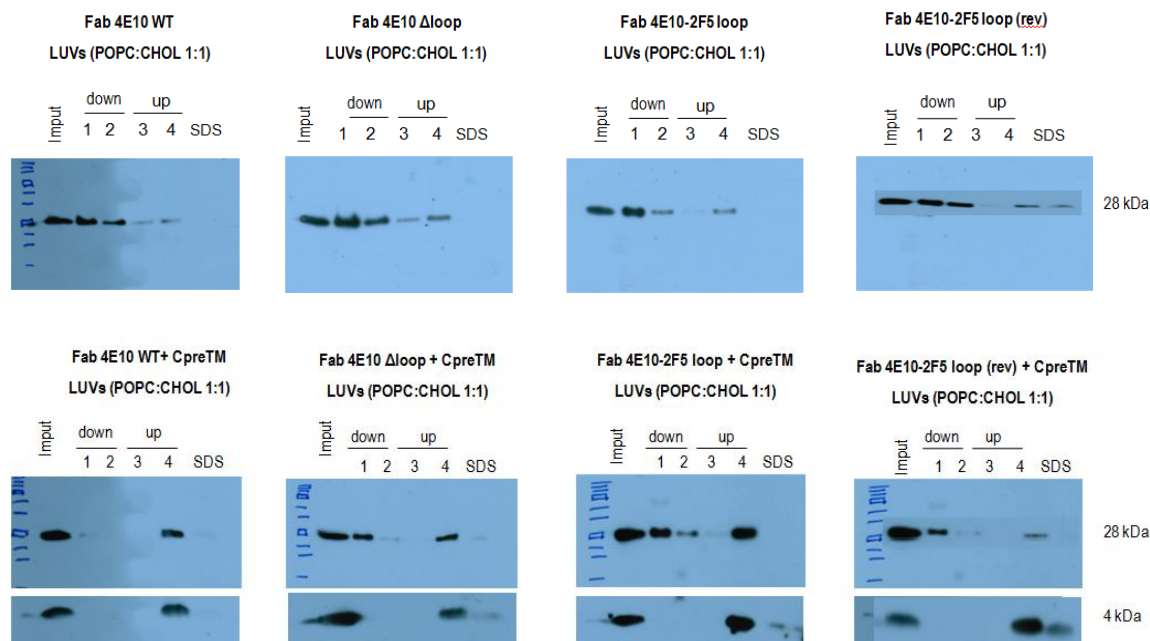
3.Taula. MPER+5mM DPC eta aztertutako Fab basati eta mutanteen loturaren termodinamika. Berriz ere, 273 K-tan burutu zen saioa.

MPER + 5mM DPC	K_D (nM) ^a	ΔH (kcal/mol)	ΔS (cal/mol·K)	n^b
Fab 4E10 WT	3,7	-15	-3,6	0,98
Fab 4E10 Δ oop	8,8	-14	-3,4	1,01
4E10-2F5 loop	12,6	-11,9	-1,58	1.07
4E10-2F5 loop (rev)	7,2	-13,7	-3.9	1,06

- K_d parametroa bero aldaketaren doikuntzaz lortu zen.
- n -k peptido/proteina ratioari egiten dio erreferentzia.

Bai Fab 4E10 WT-ren kasuan eta baita mutanteen kasuan ere, makromolekulen lotura erreakzioa entalpiakoki gidatua dago (erreakzio exotermikoa, $\Delta H < 0$), entropiakoki berriz ez dago faboratuta ($\Delta S < 0$). Bi termino hauek epitopoaren eta Fab 4E10 WT-en arteko loturaren energia askean (ΔG) duten kontribuzioa antzekoa da egin ziren saio guztietan. Ondorioz, beren lotura afinitateak (K_d , disoziazio konstantea) ere antzekoak ziren, ≈ 10 nM. CDR-H3 begiztaren erpinaren konposizioak, beraz, ez du zerikusirik Fab-aren eta peptidoaren artean ematen den loturarekin.

3.2.5. Fab-peptido batuketa mintzean. Behin Fab 4E10 WT eta mutante guztiek soluzioan dagoen peptidoaren aurrean duten jokaera berbera dela ikusita, elkarrekintza horren azterketa egin zen mintzari lotutako peptidoak erabiliz. Era berean, antigorputzek mintzarekin zuzenki elkartzeko duten gaitasuna (polierreaktibitatea) konparatzeko, peptido gabeko mintzak ere erabili ziren. Helburu hauek betetzeko saio egokia da sakarosa gradiente bidezko liposoma flotazioa. Sakarosa kontzentrazio gradientearen agertzen duen saiodia abiadura handitan zentrifugatzean, gaineratuak izan diren partikulak beren dentsitatearekin bat egiten duen gunetara banatzen dira, beraz, mintz lipidikoei lotutako partikulak, saiodian goiko aldean gelditzen direlarik, soluzioan aske geratu diren partikuletatik banatzen dira. POPC eta kolesterolez osatutako liposomak (1:1) erabili ziren esperimentuan, GIB-1-aren mintzak kolesterol portzentaje altua erakusten baitu. Erabili zen peptidoak (CpreTM) adierazitako konposaketa duten liposomen fusioa induzitzen du (Apellaniz eta lag., 2014), eta Fab 4E10 WT hau inhibitzeko gai da, CDR-H3 begizta gabeko mutanteak gaitasuna galtzen duen bitartean. Ondorioz, konposaketa lipidiko honetan CpreTM peptidoak fusioaren bitartekaria izango litzatekeen konformazio bat hartzen duela suposa daiteke, eta beraz, saio egokia kontsideratu zen antigorputzaren eta egoera natiboan egon daitekeen peptidoaren arteko lotura aztertzeko.



8.Irudia. Mintzean dagoen peptidoari lotzeko Fab-ek duten gaitasuna aztertzeko flotazio saioaren emaitzak. Goiko Western plapaketan, Fab bakoitza peptidorik gabeko LUV-ekin egindako saioan lortu ziren emaitzak islatzen dira: Fab basatia eta mutanteak (28 kDa) batez ere 1 eta 2 frakzioetan (saiodiaren azpian) atera ziren, ez ziren, beraz, besikuletara ez-espezifiki lotu (hauen dentsitate baxuak saiodiaren goiko aldean mantentzen ditu). Peptidoa duten LUV-ekin egindako saioan, Fab-en portzentaje handiena 4. frakzioan lortu zen, baita CpreTM peptidoaren seinalea ere (4 kDa), ingurune lipidikoan ere lotura ematen dela baieztatuz.

Western plapaketatik lortutako emaitzak antzekoak izan ziren lau Fab-en kasuan. Lehenik eta behin, peptidorik (CpreTM) ez duten liposomak erabili zirenean, Fab-ak soluzioan aske mantendu ziren, saiodiaren beheko frakzioetan nabariki berreskuratu zirelarik (28 kDa-ko bandek hala erakusten dute), eta beraz, ez ziren, hein handi batean, ez-espezifiki LUV-etara lotzen. Emaitza hauen arabera, Fab guztiek polierreaktibitate mugatua eta antzekoa dutela ondoriozta daiteke. Saio bera peptidoa gehituta errepikatuz, emaitza desberdinak lortu ziren: Fab-en proportzio handiena 4. frakzioan (saiodiaren gainaldean) berreskuratu zen, flotatu zuten liposometan kokatu baitzen CpreTM peptido hidrofoboa (4kDa). Fab-peptido elkarrekintza ingurune lipidikoetan mantentzen zen beraz, ez soilik antigorputz basatian, baita CDR-H3 begiztaren erpineko hondar hidrofoborik gabeko mutantean (Fab 4E10 Δ loop) eta 2F5 antigorputzarekin begizta trukaturako Fab-etan ere. Ez da ordea efektu bera ikusten azken hiru kasu hauetan, liposomekin batera flotaturako frakzioaz gain, saiodiaren beheko aldetik ere proportzio handi bat berreskuratu baitzen. Honekin,

ingurune lipidikoan (birusaren natura egokien imitatzen duen ingurunean) Fab mutanteen peptidoarekiko afinitatea txikitzen dela ondoriozta daiteke, begizta hidrofoboa mantentzen badute ere, neutralizazio saioarekin erlazio zuzen bat ikusten delarik.

3.3 EZTABAIDA

Lan honetan, mutagenesi bidez eskuratutako bi Fab aztertu ziren, Fab 4E10-en kate astuneko CDR-H3 begiztaren erpinaren tokian Fab 2F5-aren erpin bera osatzen duten lau aminoazidoz (LFGV eta alderantziz, VGFL) ordezkatuak izan zitzaizkienak. Batetik, begizta hauen erpinek eta antigorputz bakoitzaren paratopoak modu askean lan egiten zuten aztertu nahi zen, hau da, elkarrekiko menpekotasunik ez zutela frogatu, gaur egun funtzio erabat desberdinak atxikitzen baitzaizkie: Bai 2F5 eta baita 4E10-en kasuan, paratopoak epitopoarekiko lotura bermatzen du, begiztaren erpinak berriz, neutralizazioa; eta azken honen ezabapenak (serina-glizina hondarren ordezkapenak) ez du Fab-epitopo batuketan eraginik, neutralizatzeko gaitasuna erabat galtzea dakarren bitartean. Mutante hauek erabiliz, CDR-H3 erpin funtzionala trukatzeko funtzio neutralizatzailea mantentzea suposatzen duen edo bestetik, funtzio hau betetzeko antigorputza bere osotasunean ezinbestekoa den aztertu nahi izan da.

Horrez gain, erpin funtzionalaren trukearen bidez eta 2F5 antigorputzaren polierreaktibitate baxuago eta neutralizazio-potentzia handiagoan oinarrituta, immunoterapian erabili ahal izango den neutralizazio ahalmen zabaleko 4E10 antigorputzaren bilaketari ekin genion. Mutante berrietan antigorputz bien ezaugarriak konbinatzerik balego, pausu erraldoia izango litzateke neutralizazio gaitasun zabal eta potentia immunogeno baten diseinuan.

Lehenik eta behin Fab-en lotura afinitatea ELISA bidez neurtu zen. Saio honekin lortutako emaitzek testatutako makromolekula guztiek (Fab 4E10 WT, 4E10 Δ loop, 4E10-2F5 loop eta 4E10-2F5 loop (rev)) espezifikoki "NWFDIT" epitopoa aurkezten duen CpreTM peptidoari lotzeko gaitasuna zutela frogatu zen, purifikazioaren ondoren Fab-en tolesdura modu egokian eman zela eta beraz, funtzionaltasuna mantentzen zutela erakutsiz. ELISA saioetan lortutako datuak ez dira oso esanguratsuak, eta kasu batzuetan emaitza aldakorrak ematen dituzte; Fab 4E10

Δ loop-a CDR-H3 erpinik gabeko mutantea, adibidez, ez da beti plakan MPER-en oinarritutako bere epitopoa ezagutzeko gai. Plakan egindako entsegu hauek ez dira guztiz zehatzak; Fab-ak soluzioan aurkituko ez lituzken ezintasun esterikoak topa ditzake, edo baliteke erabilitako peptidoak plakari lotzean hartzen duen egitura birusaren mintzean duen egituratik asko urruntzea. Fab 4E10 konstruktio ezberdinen ITC saioek, ordea, argi utzi zuten Fab-epitopo elkarrekintzak ez zuela begiztan emandako mutazioen ondorioz aldaketarik jasan, eta guztiak ere oso afinitate altuarekin (nM mailan) lotzen zirela MPER peptidora. Emaiza hauek bat datoz CDR-H3 begiztaren erpina osatzen duten aminoazidoek 4E10 antigorputzaren espezifitate poltsikoan parte hartzen ez dutela baieztatzen duten egiturazko datuekin (Cardoso eta lag., 2005).

Burututako neutralizazio saioek, diseinatutako mutanteek infekzioa inhibitzeko gaitasuna dutela erakutsi zuten, begiztaren erpina ez duen mutanteak (4E10 Δ loop) erabat galtzen zuen bitartean. Berriz ere, potentzial hidrofoboa duten hondar hauek neutralizazioan duten garrantzia argitara ematen duten emaitzak dira. Fab 2F5-aren begiztako hondarrak dituzten mutanteen potentzial neutralizatzailea, halaber, askoz ere baxuagoa izan zen: birusen portzentaje bera neutralizazeko Fab hauen 10-100 aldiz kontzentrazio altuagoa gehitu behar izan zen soluzioan. Neutralizazioan lortutako emaitzak flotazioan lortu zirenekin bat datoz, izan ere, soluzioan peptidoa lotzeko gaitasuna mantendu bazuten ere, MPER domeinuan oinarritutako CpreTM peptidoa birusaren egitura lipidikoa imitatzen zuten liposometan txertaturik zegoenean, begizta mutatu duten Fab-ek ez zuten Fab basatiaren afinitate berberarekin epitopoa lotzen. Mutante hauek ordea, ez dira oso egokiak ondorio honetara iristeko, 2F5 antigorputzaren eta mintzean txertaturiko peptidoaren arteko elkarrekintza askoz baxuagoa baita 4E10 antigorputzarena baino. Dena dela, paratopoaren eta begizta hidrofoboaren erpin honen artean menpekotasun funtzional bat igarri daiteke, Fab eta birusaren lotura eman ondoren 2F5 antigorputzaren begizta hau ez baita modu askean lan egin eta infekzioa inhibitzeko gai.

Bai flotazio saioan eta baita neutralizazio saioan betetzen den CDR-H3 begiztaren erpineko aminoazido hidrofoboaren menpeko afinitate galera, Fab 4E10-an ikertu den begizta honen eta gp41-en C-muturreko aminoazido hidrofoboaren edo mintz

plasmaticoaren artean eman daitezkeen bestelako elkarrekintza zuzenen galerak azalduko luke. Erpin honen hidrofobizitatea (eta neutralizatzailea den eta ustez mekanismo bera jarraituko lukeen beste antigorputz baten sekuentzia) mantentzeak ez du erabateko neutralizazio gaitasuna bermatzen; honenbestez, pentsa daiteke aztertzen ari dena ez dela elkarrekintza hidrofobo soila, eta aminoazidoen sekuentzia espezifiko ezinbestekoa dela 2F5 eta 4E10 Fab-ak erabat funtzionalak izan daitezen.

Gainera, flotazio saioek argitara eman dituzten datuek Fab mutanteen eta liposometan dagoen peptidoaren arteko elkarrekintza Fab basatiaren baina askoz ahulagoa dela erakutsi dute. Soluzioan (ITC) egindako saioetan elkarrekintzek balio termodinamiko berdinak erakusten badituzte ere, badirudi neutralizazio gaitasunean ematen den jaitziera hori birusaren egoera natiboa imitatzen duen baldintzetan mutanteek jasandako lotura ahalmenaren galerak azaltzen duela. Honenbestez, antigorputzaren CDR-H3 begiztako paratopoa eta erpinak ez lituzkete funtzio independenteak beteko, eta bien presentzia ezinbestekoa litzateke bai birusaren mintzarekin lotu eta baita neutralizazio egoki bat eragiteko.

4. ONDORIOAK:

Patogenoen azalean agerian dauden gune antigenikoen aurkako afinitate altua erakusten duten antigorputzen ekoizpena ezinbestekoa da hauen aurrean ostalaria babesteko. GIB-1-en infekzioan zehar agertzen diren antigorputz neutralizatzaileen artean daude sakonki aztertuak izan diren 4E10 eta 2F5 bnAb-ak. Beren neutralizazio gaitasun zabalaren mekanismo molekularra ulertuz, txerto bezala erabiliko den immunogeno baten diseinua gidatu nahi da. Antigorputz bakoitzak ezagutzen duen epitopoa eta ezagumendu horretan ematen diren elkarrekintza atomikoak deskribatu badira ere, ez da GIB-1-en neutralizazioa erabat ulertzea lortu, ezta birus honen aurkako txerto egokirik ekoiztea ere.

Izan ere, antigorputzen jarduera mekanismoa ulertzea nahitaezko baldintza da txerto eraginkor baten diseinuan. Sistema immunearen erantzun egokia (antigorputz neutralizatzaileen ekoizpena) aktibatzeke, paratopoa ezagutzen duen sekuentziaz gain, begizta honek birusarekin izan ditzaken bestelako elkarrekintza guneak

deskribatu eta immunogeno gisa erabiltzeko integratu beharko lirateke, elkarrekintza horien itua MPER domeinuko zein mintz lipidikoaren osagaien bat izanik ere.

Halaber, ezagumendu hori erabilgarria izango da agente immunoterapeutikoak garatzeko. Lortutako datuek iradokitzen dutenez, CDR-H3 begiztaren erpinaren osaketa espezifikoa behar-beharrezkoa da antigorputzaren eta bere antigenoaren arteko ezagumendu osoa eman dadin, eta ondorioz, bideratutako transplantea ez litzateke egokia.

Etorkizunera begira, eta espezifikoak diruditen CDR-H3 begiztaren erpinak burutzen dituen elkarrekintza osagarri hauek MPER domeinuko C-muturrean aurkitzen den sekuentzia batekin ematen direla onartzen duen hipotesia jarraituz, Fab mutante berriak diseinatzea interesgarria litzateke, bai neutralizazio mekanismoaren nondik norakoak ulertze aldera, eta baita immunoterapian izan ditzaketen erabilgarritasunari begira ere. 4E10 antigorputzaren ^{H100}WGWL^{H100C} begizta alderantzizko hurrenkeran duen Fab errekombinanteak adibidez, sekuentzia berbera ez izanagatik, zehazki hidrofobotasun bera izango luke; bestetik, triptofano (W) hondarrak tirosina hondarrez (Y) ordezkatzek (^{H100}YGYL^{H100C}) ere espezifikotasun horren azterketan lagunduko luke, bi aminoazido hauek mintzen interfaserantz hurbiltzeko antzeko joera erakusten baitute (Nieva eta Suarez, 2000).

Horrez gain, 4E10 antigorputz basatiarekin egindako neutralizazio saioetan MPER domeinuko C-muturreko sekuentzian mutazioak aurkezten dituzten pseudobirusak erabiliz egindako funtzionaltasun frogak, antigorputzaren CDR-H3 begiztan aztertutako erpin honen eta mutagenesiz eraldatutako birusaren sekuentziaren artean eman litezken elkarrekintza espezifikoaren determinazioan erreminta baliotsua lirateke.

5. BIBLIOGRAFIA

- Alam, SM, Morelli, M, Dennison, SM, Liao, H, Zhang, R, Xia, S, Rits-Volloch, S, Sun, L, Harrison, SC, Haynes, BF, eta Chen, B (2009) “Role of HIV membrane in neutralization by two broadly neutralizing antibodies”. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* **106**, 20234–20239

- Apellaniz, B, Rujas, E, Carravilla, P, Requejo-Isidro, J, Huarte, N, Domene, C, eta Nieva, J L. (2014) “Cholesterol-Dependent Membrane Fusion Induced by the gp41 Membrane-Proximal External Region-Transmembrane Domain Connection Suggests a Mechanism for Broad HIV-1 Neutralization” *J Virol* **88**, 13367-13377.
- Cardoso, RM, Zwick, M, Stanfield, R, Kunert, R, Binley, J, Katinger, M, Burton, D eta Wilson, IA. (2005) “Broadly Neutralizing Anti-HIV Antibody 4E10 Recognizes a Helical Conformation of a Highly Conserved Fusion-Associated Motif in gp41”. *Immunity*, **22**, 163–173.
- Chan, C, Fass, D, Berger, J eta Kim, P. (1997) “Core Structure of gp41 from the HIV Envelope Glycoprotein”. *Cell*, **89**, 263–273.
- Huarte, N, Lorizate, M, Maeso, R, Kunert, R, Arranz, R, Valpuesta, JM, eta Nieva, JL. (2008) “The broadly neutralizing anti-human immunodeficiency virus type 1 4E10 monoclonal antibody is better adapted to membrane-bound epitope recognition and blocking than 2F5”. *J Virol* **82**, 8986-8996.
- Julien, JP, Bryson, S, Nieva, JL eta Pai, EF (2008) “Structural details of HIV-1 recognition by the broadly neutralizing monoclonal antibody 2F5: epitope conformation, antigen-recognition loop mobility, and anion-binding site.” *J Mol Biol* **384**, 377–392.
- Julien, JP, Huarte, N, Maeso, R, Taneva, SG, Cunningham, A, Nieva, JL eta Pai, EF. (2010) “Ablation of the complementarity-determining region H3 apex of the anti-HIV-1 broadly neutralizing antibody 2F5 abrogates neutralizing capacity without affecting core epitope binding”. *J Virol* **84**, 4136–4147.
- Klein, F, Mouquet, H, Dosenovic, P, Scheid, J, Scharf, L, eta Nussenzweig, M. (2013) “Antibodies in HIV-1 Vaccine Development and Therapy”. *Science*, **341**, 1199-1204.

- Mehandru, S, Vcelar B, Wrin T, Stiegler G, Joos B, Mohri H, Boden D, Galovich J, Tenner-Racz K, Racz P, Carrington M, Petropoulos C, Katinger H, eta Markowitz M. (2007) “Adjunctive Passive Immunotherapy in Human Immunodeficiency Virus Type 1-Infected Individuals Treated with Antiviral Therapy during Acute and Early Infection” *Journal of Virology*. **81**, 11016-11031.
- Nieva, JL eta Suarez, T (2000). “Hydrophobic-at-Interface Regions in Viral Fusion Protein Ectodomains” *Bioscience Reports*, **20**, 519-533.
- Seaman, M, Janes, H, Hawkins, N, Grandpre, L, Devoy, C, Giri, A, Coffey, R, Harris, L, Wood, B, Daniels, M, Bhattacharya, T, Lapedes, A, Polonis, McCutchan, F, Gilbert, P, Self, S, Korber, B, Montefiori, D, eta Mascola, J. (2010) “Tiered Categorization of a Diverse Panel of HIV-1 Env Pseudoviruses for Assessment of Neutralizing Antibodies” *J virol*. **84**, 1439–1452.
- Willis JR, Sapparapu G, Murrell S, Julien JP, Singh V, King HG, Xia Y, Pickens JA, LaBranche CC, Slaughter JC, Montefiori DC, Wilson IA, Meiler J, eta Crowe JE Jr (2015) “Redesigned HIV antibodies exhibit enhanced neutralizing potency and breadth”. *JCI*, **125**, 2523-2531.