

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

**Funciones efectoras de inmunoglobulinas : activación del
complemento y unión a receptores celulares**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Cándido Juárez Rubio

Madrid, 2015

TP
1982
028

Cándido Juárez Rubio



X-53-044234-4

FUNCIONES EFECTORAS DE INMUNOGLOBULINAS: ACTIVACION
DEL COMPLEMENTO Y UNION A RECEPTORES CELULARES

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense de Madrid
1982



BIBLIOTECA

© Cándido Juárez Rubio
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-36678-1981

Autor: CANDIDO JUAREZ RUBIO

FUNCIONES EFECTORAS DE INMUNOGLOBULINAS:

ACTIVACION DEL COMPLEMENTO Y

UNION A RECEPTORES CELULARES

Director: Fernando Ortiz Masllorens

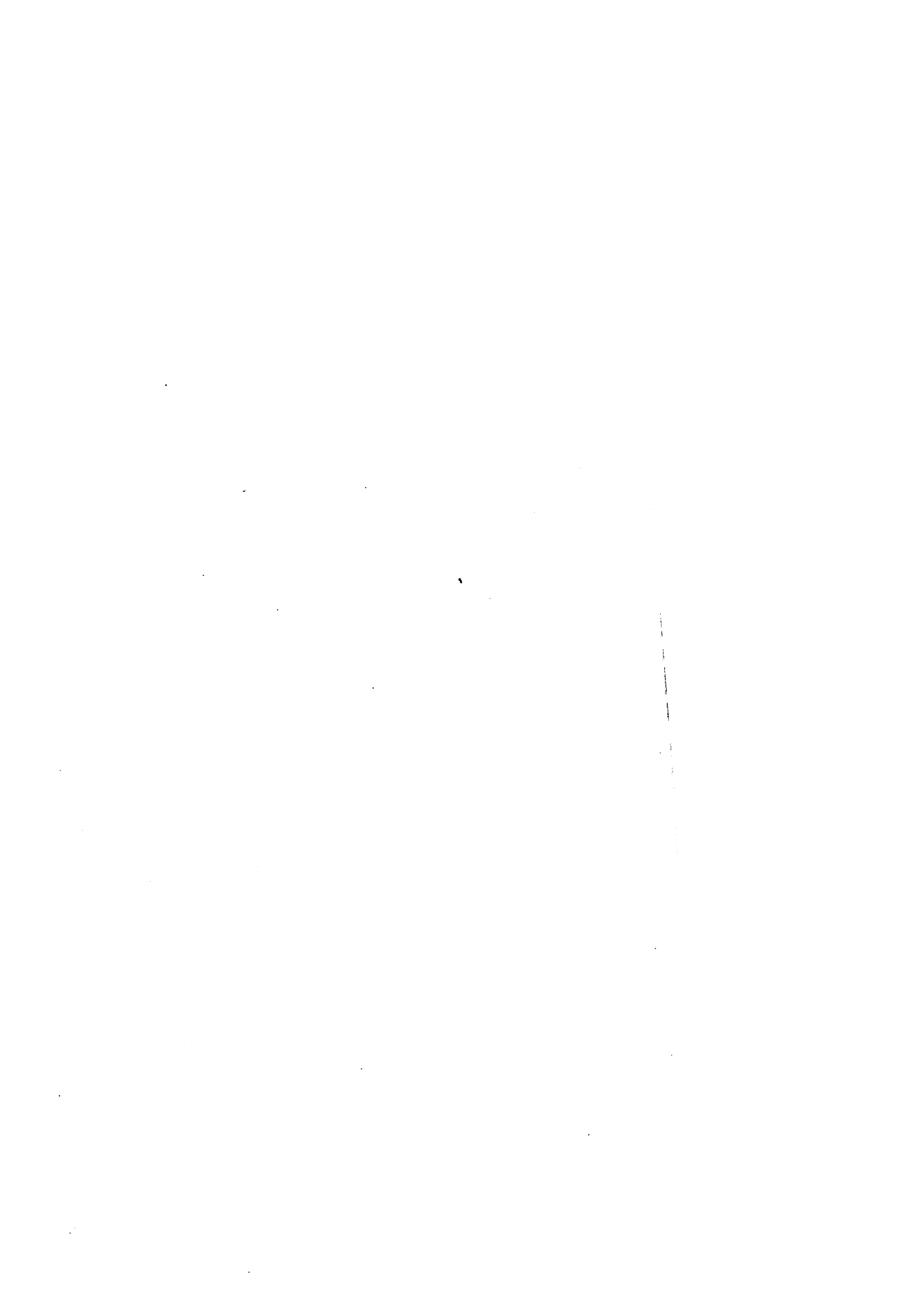
Dr. en Medicina, Jefe del Departamento de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Químicas

Departamento de Bioquímica

1980



I

El presente trabajo ha sido realizado en el Departamento de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz bajo la dirección del Dr. Fernando Ortiz Masllorens, a quien expreso mi agradecimiento tanto por su valiosa ayuda como por el ejemplo que con su dedicación constante a la investigación nos ofrece a todos.

Igualmente agradezco al Prof. Dr. Angel Martín Municio tanto el haber aceptado la ponencia de esta tesis como su importante papel en mi formación en el campo de la Bioquímica.

Agradezco la colaboración de mis compañeros del Laboratorio, muy especialmente la de Juan Pablo Albar Ramirez, que han posibilitado la realización de esta tesis. Mi agradecimiento también a José Cavilanes y Gonzalo Buitrago por su colaboración en distintos aspectos de la misma.

Quiero expresar también mi agradecimiento a la Fundación Conchita Rábago por la Beca que he disfrutado durante estos años.

II

INDICE

	<u>Página</u>
1.- INTRODUCCION	1 1
1.1.- Generalidades	2 2
1.2.- Subunidades y estructura primaria de las inmunoglobulinas	3 3
1.2.1.- Estructura general	3 3
1.2.2.- Cadenas ligeras	3 3
1.2.3.- Cadenas pesadas	6 6
1.2.4.- Otras subunidades	9 9
1.3.- Estructura tridimensional de la Inmunoglobulina G	10 10
1.3.1.- Modelo general	10 10
1.3.2.- Interacción entre subunidades	12 12
1.3.3.- Susceptibilidad de las inmunoglobulinas a la acción proteolíticaa....	
.....	12 12
1.3.4.- Estructura del Fab	13 13
1.3.5.- Estructura del Fc	13 13
1.3.6.- Estructura de la IgG	16 16
1.4.- Flexibilidad de la Inmunoglobulina G	19 19
1.5.- Cambios conformacionales como consecuencia de la unión del antígeno	
no	22 22
1.6.- Bases estructurales de las propiedades biológicas de las inmunoglobulinas	
bulinas	24 24
1.6.1.- Sitios efectores de las inmunoglobulinas	24 24
1.7.- Activación del Complemento	27 27
1.7.1 Vía Clásica	27 27
1.7.2.- Vía Alternativa	31 31

III

1.8.- Unión a receptores celulares	35
1.8.1.- Unión a Mastocitos y Basófilos	35
1.8.2.- Unión a Monocitos y Macrófagos	36
1.8.3.- Unión a Neutrófilos	37
1.8.4.- Unión a Linfocitos	38
1.8.5.- Paso a través de la Placenta	38
1.8.6.- Interacción con la Proteína A del Staphylococcus aureus	39
2.- OBJETIVOS Y PLAN DE TRABAJO	41
3.- MATERIALES Y METODOS	45
3.1.- Obtención de suero de conejo	46
3.1.1.- Obtención de suero de conejo anti-eritrocito de carnero	46
3.1.2.- Obtención de suero de conejo anti-albúmina humana	47
3.2.- Obtención de la IgG de conejo	47
3.2.1.- Inmunodifusión doble bidimensional	48
3.2.2.- Inmunoelectroforesis	48
3.2.3.- Filtración en gel	49
3.2.4.- Electroforesis en gel de poliacrilamida	49
3.3.- Obtención del fragmento F _{ab}	50
3.3.1.- Cromatografía a través de un inmunoabsorbente anti-pFc'	50
3.3.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS ...	51
3.4.- Obtención del fragmento F(ab') ₂	51
3.5.- Obtención del fragmento pFc'	52
3.6.- Obtención de la IgG reducida	52
3.7.- Modificación de los grupos carboxilo	53
3.7.1.- Modificación de los grupos carboxilo de la IgG	53
3.7.1.1.- Reacción de modificación	53

IV

3.7.1.2.- Cuantificación del número de grupos carboxilo modificados ...	55
3.7.2.- Modificación de los grupos carboxilo del $F(ab')_2$	56
3.7.2.1.- Reacción de modificación	56
3.7.2.2.- Cuantificación del número de grupos carboxilo modificados ...	56
3.8.- Modificación de los grupos amino	56
3.8.1.- Modificación de los grupos amino de la IgG	56
3.8.1.1.- Reacción de modificación	56
3.8.1.2.- Cuantificación del número de grupos amino modificados	56
3.8.2.- Modificación de los grupos amino del $F(ab')_2$	57
3.8.2.1.- Reacción de modificación	57
3.8.2.2.- Cuantificación del número de grupos modificados	57
3.9.- Modificación de los restos de triptófano del $F(ab')_2$	57
3.9.1.- Reacción de modificación	57
3.9.2.- Cuantificación del número de restos de triptófano modificados .	58
3.10.- Control estructural de las modificaciones químicas	58
3.10.1.- Espectro de dicroísmo circular	58
3.10.2.- Inmunodifusión doble bidimensional	59
3.10.3.- Filtración en gel	59
3.10.4.- Electroforesis en agarosa	59
3.11.- Actividad anticuerpo	59
3.11.1.- Título de hemaglutinación	59
3.11.2.- Incorporación radioactiva	60
3.11.2.1.- Marcaje del $F(ab')_2$	60
3.11.2.2.- Incorporación radioactiva sobre la superficie del eritrocito	60
3.12.- Medida de la actividad anticomplementaria del $F(ab')_2$ por la vía alternativa	61

3.13.- Medida de la actividad citoflica	63
3.13.1.- Obtención de Neutrófilos de conejo	63
3.13.2.- Formación de rosetas	63
3.13.3.- Inhibición de rosetas	65
4.- RESULTADOS	66
4.1.- Obtención del suero de conejo	67
4.2.- Obtención de la IgG de conejo	67
4.2.1.- Criterios de pureza	67
4.2.1.1.- Inmunodifusión doble bidimensional	67
4.2.1.2.- Inmunoelectroforesis	67
4.2.1.3.- Filtración en gel	67
4.2.1.4.- Electroforesis en gel de poliacrilamida	70
4.3.- Obtención del fragmento Facb	70
4.3.1.- Criterios de pureza	76
4.3.1.1.- Inmunodifusión doble bidimensional	76
4.3.1.2.- Inmunoelectroforesis	76
4.3.1.3.- Filtración en gel	76
4.3.1.4.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS .	76
4.4.- Obtención del fragmento F(ab') ₂	79
4.4.1.- Criterios de pureza	79
4.4.1.1.- Inmunodifusión doble bidimensional	79
4.4.1.2.- Inmunoelectroforesis	79
4.4.1.3.- Filtración en gel	79
4.4.1.4.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS..	79
4.5.- Obtención del fragmento pFc'.....	83
4.5.1.- Criterios de pureza	83

VI

4.5.1.1.- Inmunodifusión doble bidimensional	83
4.5.1.2.- Inmunoelectroforesis	83
4.5.1.3.- Filtración en gel	83
4.5.1.4.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS .	83
4.6.- Obtención de la IgG reducida	87
4.7.- Modificación de grupos carboxilo	87
4.7.1.- Modificación de grupos carboxilo de la IgG	87
4.7.2.- Modificación de grupos carboxilo del $F(ab')_2$	90
4.8.- Modificación de grupos amino	90
4.8.1.- Modificación de grupos amino de la IgG	90
4.8.2.- Modificación de grupos amino del $F(ab')_2$	90
4.9.- Modificación química de restos triptófano del $F(ab')_2$	90
4.10.- Controles de las modificaciones	94
4.10.1.- Espectro de dicroísmo circular	94
4.10.2.- Inmunodifusión doble bidimensional	94
4.10.3.- Volumen de elución	101
4.10.4.- Electroforesis en agarosa	107
4.11.- Actividad anticuerpo	107
4.11.1.- Título de hemaglutinación	107
4.11.2.- Incorporación radioactiva	107
4.12.- Medida de la actividad anticomplementaria del $F(ab')_2$ por la vía alternativa	112
4.12.1.- Actividad del $F(ab')_2$ modificado en los grupos carboxilo	112
4.12.2.- Actividad del $F(ab')_2$ modificado en los grupos amino	112
4.12.3.- Actividad del $F(ab')_2$ modificado en los restos triptófano ...	119
4.13.- Unión a receptores celulares	119

VII

4.13.1.- Formación de rosetas	119
4.13.2.- Inhibición de rosetas	119
4.13.2.1.- Facb-aA y pFe'.....	119
4.13.2.2.- IgG-aA reducida	125
4.13.2.3.- IgG-aA modificada en los grupos carboxilo	125
4.13.2.4.- IgG-aA modificada en los grupos amino.....	125
5.- DISCUSION	134
6.- CONCLUSIONES	148
7.- BIBLIOGRAFIA	152

INTRODUCCION

1.1.- GENERALIDADES.-

Los anticuerpos son moléculas polifuncionales que juegan un papel fundamental en la respuesta inmune. Previa unión del antígeno, los anticuerpos son capaces de iniciar un conjunto de funciones efectoras, de naturaleza variada, entre las que se incluyen:

- 1.- Reconocimiento del antígeno por células específicas, permitiendo la diferenciación del linfocito B a célula plasmática secretora de anticuerpos.
- 2.- Activación del complemento, lo cual llevará a una serie de resultados tales como lisis celular, liberación de factores quimiotácticos e inflamatorios, etc.
- 3.- Fenómenos de hipersensibilidad, los cuales incluyen la liberación de histamina de mastocitos y basófilos.
- 4.- Modulación de la actividad de los linfocitos T.
- 5.- Inmunidad mediada por células.

La molécula de anticuerpo, por tanto, actúa como un transductor que transmite una señal desde los sitios combinantes con el antígeno, en el extremo amino-terminal de la molécula, a la parte donde residen los sitios efectores, en el extremo carboxi-terminal. La transmisión de esta información ocurre generalmente sobre distancias superiores a los 80 Å y a través de varios dominios conformacionales.

Para realizar estas funciones, las moléculas de anticuerpo exhiben un conjunto de estructuras con conformaciones bastante inusuales y con propiedades dinámicas apropiadas. Todas las inmunoglobulinas son oligoméricas con un gran número de similitudes en su estructura básica.

1.2.- SUBUNIDADES Y ESTRUCTURA PRIMARIA DE LAS INMUNOGLOBULINAS .-

1.2.1.- Estructura general .-

Las inmunoglobulinas son glicoproteínas que presentan una estructura básica con cuatro cadenas polipeptídicas iguales dos a dos. Las dos de menor tamaño (PM \sim 25000 Dalton) se conocen como cadenas ligeras (L) y las dos de mayor tamaño (PM de 52000 a 70000 Dalton) se conocen como cadenas pesadas (H). Las cadenas pesadas se mantienen unidas entre sí por puentes disulfuro e interacciones no covalentes. Las cadenas ligeras se mantienen unidas a las pesadas por interacciones no covalentes y, en general, por puentes disulfuro (figura n° 1).

La molécula de inmunoglobulina se presenta bien con esta estructura básica o bien puede polimerizar dando estructuras de orden superior (figura n° 2).

1.2.2.- Cadenas ligeras .-

Las cadenas ligeras pueden ser divididas en dos regiones: una que comprende la mitad amino-terminal de la cadena polipeptídica y que presenta una gran variabilidad de secuencia al comparar las distintas cadenas ligeras (V_L), y otra región que comprende la mitad carboxi-terminal y que presenta mucha menos variabilidad en secuencia (C_L). El conjunto de regiones C_L se agrupan bajo dos tipos fundamentales en base a la estructura primaria que determinará que la cadena ligera sea κ o λ .

Tanto la región C_L como la región V_L contienen un puente disulfuro intracatenario que cierra un segmento de unos 60 residuos.

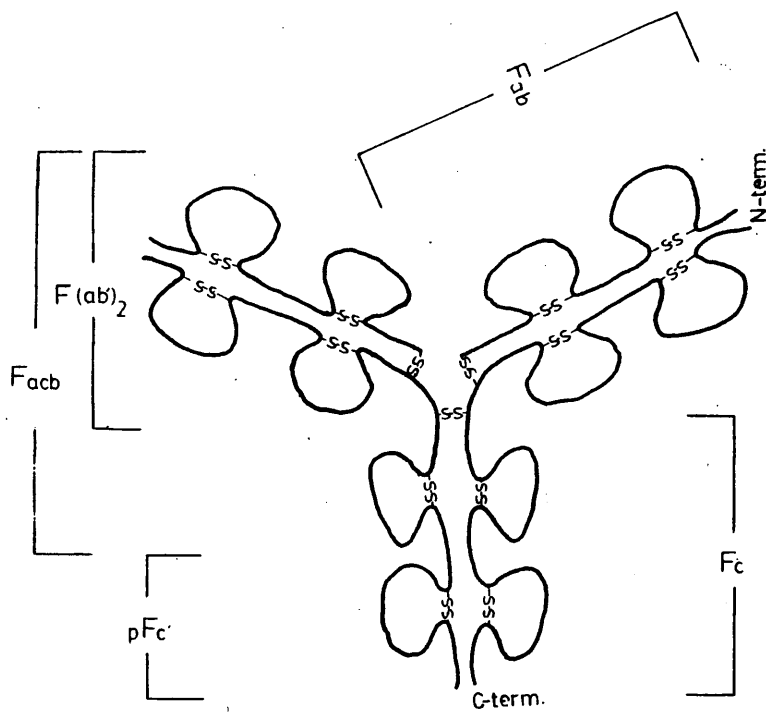


Figura nº 1.- Molécula de inmunoglobulina G.

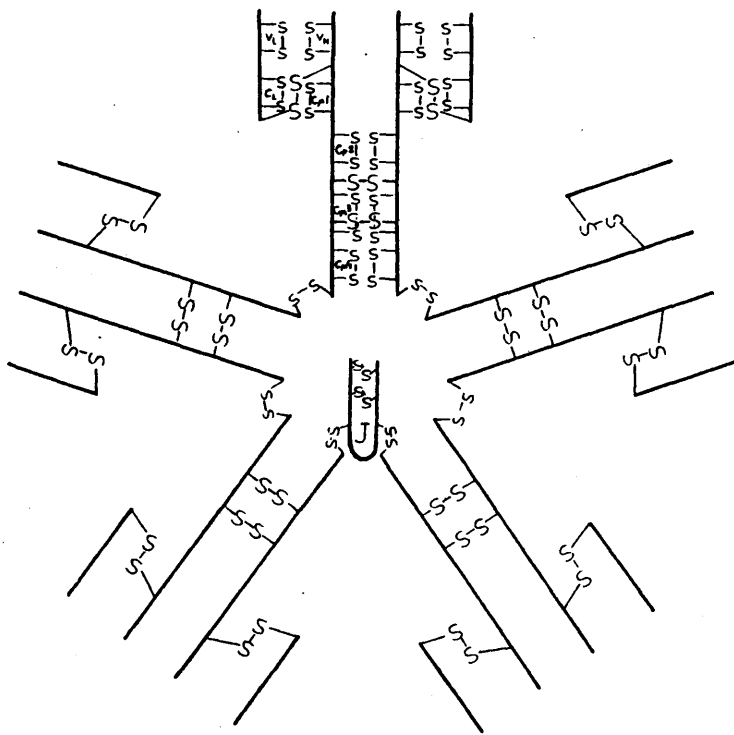


Figura nº 2.- Pentámero de inmunoglobulina M.

Dentro de la región variable se distinguen tres pequeños segmentos hipervariables, alrededor de las posiciones 30, 50 y 90 (desde el extremo amino-terminal) (figura nº 3) (1). En estas posiciones la diversidad secuencial entre las distintas cadenas ligeras es muy elevada. El resto de la región variable se conoce como región armazón y presenta menor variabilidad de secuencia, determinando al subgrupo al que pertenece la cadena ligera. Las regiones hipervariables contienen los residuos que hacen contacto directo con el antígeno o determinan la conformación del centro de unión del antígeno, siendo, por tanto, los que determinan la especificidad del anticuerpo.

1.2.3.- Cadenas pesadas .-

La cadena pesada puede ser dividida en cuatro regiones (cinco en algunas clases) cada una de las cuales contiene un puente disulfuro intracatenario que cierra un segmento de unos 60 residuos. La región variable (V_H) abarca los 110 aminoácidos amino-terminales (similar a V_L). Las tres cuartas partes restantes de la cadena se pueden agrupar bajo un pequeño número de secuencias polipeptídicas fundamentales que definen la clase a la que pertenece la inmunoglobulina. A su vez, dentro de una determinada clase se observan pequeñas diferencias que definen la subclase (tabla nº 1).

La parte constante comprende tres regiones: C_H^1 , C_H^2 y C_H^3 (en el caso de las inmunoglobulinas M y E existe una región adicional: C_H^4), las cuales muestran una homología de secuencia muy elevada, tanto entre sí como con la región C_L .

En la región variable se han definido cuatro segmentos hipervaria-

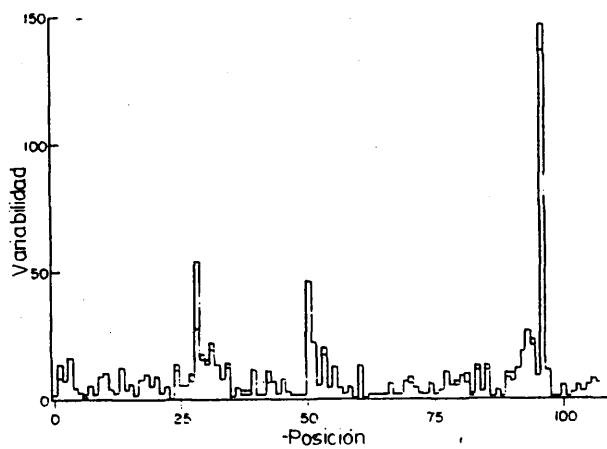


Figura nº 3.- Variabilidad de los restos de aminoácido en las distintas posiciones de la región variable de las cadenas ligeras.

INMUNOGLOBULINA	CADENA PESADA DE LA MOLECULA	PESO MOLECULAR DE LA CADENA PESADA	PESO MOLECULAR DE LA CADENA PESADA	Nº DE DOMINIOS DE LA CADENA PESADA	CONTENIDO EN CARBOHIDRATO (%)
IgG1	Y ₁	146000	51000	4	2 - 3
IgG2	Y ₂	146000	51000	4	2 - 3
IgG3	Y ₃	170000	60000	4	2 - 3
IgG4	Y ₄	146000	51000	4	2 - 3
IgM	μ	970000	65000	5	12
IgA1	α ₁	160000	56000	4	7 - 11
IgA2	α ₂	160000	52000	4	7 - 11
IgD	δ	184000	69700	4	9 - 14
IgE	ε	188000	72500	5	12

Tabla nº 1. - Propiedades físico-químicas de las inmunoglobulinas humanas.

bles, alrededor de las posiciones 33, 57, 83 y 98 (2). Los residuos localizados en estas posiciones contribuyen, junto con los de la cadena ligera, a determinar la especificidad de la molécula de anticuerpo. El resto de la región variable, región armazón, define los distintos subgrupos de la cadena pesada.

Los puentes disulfuro entre las cadenas pesadas se suelen situar en un segmento de unos 20 aminoácidos que se extiende entre C_{H1} y C_{H2} . Esta sección se conoce como región gozne y no muestra homología con ninguna otra región de la cadena pesada o ligera. Se caracteriza por un elevado contenido en prolina.

1.2.4.- Otras subunidades .-

Cuando las inmunoglobulinas se presentan como polímeros de la unidad fundamental vista (dímeros o polímeros de mayor tamaño de inmunoglobulina A, pentámeros de inmunoglobulina M) aparte del correspondiente número de cadenas pesadas y ligeras, se presenta una cadena polipeptídica adicional: la cadena J (PM~15000 Dalton) que es necesaria para la formación de estas inmunoglobulinas poliméricas (figura nº 2).

El componente secretor (PM~72000 Dalton) es otra cadena polipeptídica adicional que se encuentra asociada a los polímeros de IgA e IgM cuando se presentan en las secreciones externas.

1.3.- ESTRUCTURA TRIDIMENSIONAL DE LA INMUNOGLOBULINA G .-

1.3.1.- Modelo general .-

Los estudios de difracción de Rayos X han mostrado que las distintas subunidades de homología de las inmunoglobulinas comparten un modelo común de plegamiento polipeptídico (3,4). Cada dominio de homología de las regiones constantes está constituido por dos hojas de estructura β , una con cuatro cadenas polipeptídicas antiparalelas y la otra con tres. Los dominios de las regiones variables presentan el mismo modelo básico, aunque exhiben un segmento adicional de cadena polipeptídica en forma de asa (figura nº 4).

Las dos hojas β contienen alrededor del 50 % de los residuos presentes en cada región de homología. Restos polares y apolares se van alternando, especialmente en las zonas que no están implicadas en interacciones con otros dominios. Treonina y serina son los aminoácidos que con más frecuencia se encuentran expuestos al disolvente en la superficie de las regiones variables. En el caso de las regiones constantes se observa una mayor variabilidad en cuanto a los aminoácidos que se exponen a la superficie (5). Las dos hojas β , que se encuentran en una disposición casi paralela, acoplan en su interior un núcleo constituido por las cadenas laterales de los restos hidrofóbicos y que incluye el puente disulfuro intracatenario que une las dos hojas.

Este modelo de plegamiento es altamente conservativo en las diferentes regiones de homología (6,7), observándose que la mayoría de las diferencias estructurales ocurren en los segmentos que no participan en la es-

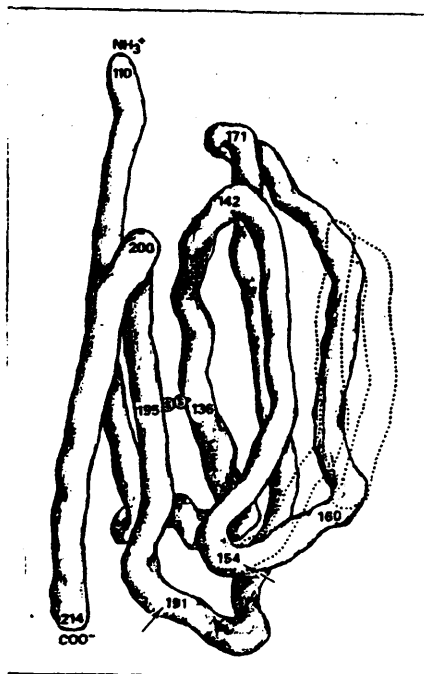


Figura nº 4.- Esquema del plegamiento de la cadena polipeptídica de los dominios de inmunoglobulina. El trazado continuo corresponde al plegamiento de las regiones constantes (C_L y C_H). El segmento punteado representa el polipéptido adicional de las regiones variables (V_L y V_H). La numeración corresponde a la región C de la cadena L (λ).

estructura β . Los segmentos hipervariables de las regiones variables no forman parte de la estructura β y, alejados en lo que se refiere a la estructura primaria, se presentan próximos en cuanto a su localización espacial y determinan la conformación del centro combinante con el antígeno.

1.3.2.- Interacción entre subunidades .-

Las moléculas de inmunoglobulinas presentan un gran número de interacciones no covalentes que estabilizan la disposición relativa de los distintos dominios de homología. Las interacciones pueden darse entre dominios adyacentes pertenecientes a la misma cadena (interacciones longitudinales) o entre dominios de distintas cadenas (interacciones transversales).

Los dominios de homología de las inmunoglobulinas se encuentran asociados por pares (8, 9) a través de interacciones transversales. Exceptuando los dominios C_H2 , la asociación entre dominios es fuerte e incluye un gran área de contacto. Por el contrario, las interacciones longitudinales implican un pequeño número de residuos de contacto y, en general, posiblemente permiten una cierta flexibilidad entre dominios.

1.3.3.- Susceptibilidad de las inmunoglobulinas a la acción proteolítica .-

La diferente susceptibilidad de las regiones de la inmunoglobulina a la acción proteolítica de diversas enzimas (especial susceptibilidad de la región gozne y, aunque en menor extensión, de los segmentos polipeptídicos que conectan los dominios de homología), ha permitido la obtención de un gran número de fragmentos de la inmunoglobulina completa, fragmentos que han jugado un papel muy importante en la asignación de funciones efectoras

a distintas regiones de la molécula.

El conjunto de fragmentos obtenidos de la IgG por digestión enzimática figuran en la tabla nº 2.

1.3.4.- Estructura del Fab .-

Los estudios iniciales realizados con el Fab de la IgG New (IgG1 humana procedente de un mieloma) mostraron que el fragmento Fab puede ser dividido en dos dominios estructurales, V y C, de unas dimensiones aproximadas de $40 \times 50 \times 40 \text{ \AA}$ cada uno. Cada dominio estructural contiene dos dominios de homología (V_H y V_L en un caso y C_H^1 y C_L en el otro) que presentan un eje de simetría binario. Las regiones V y C del Fab New no son colineales y sus pseudoejes de simetría binarios forman un ángulo de 137° .

La cadena L es más extendida que la H y como consecuencia de esto el ángulo formado por los dos ejes principales de las regiones C_L y V_L es aproximadamente de unos 110° , mientras que entre V_H y C_H es de unos 80° .

Los segmentos hipervariables de las cadenas H y L se presentan próximos en el espacio, rodeando una pequeña cavidad que se ha definido como el sitio combinante del fragmento Fab (figura nº 5) (22).

1.3.5.- Estructura del Fc .-

La disposición de los dominios globulares del fragmento Fc de la IgG humana le confiere a éste una forma peculiar, con los dominios C_H^3 formando un conjunto central globular del que salen otras dos regiones globulares que son los dominios C_H^2 (figura nº 6). La estructura del C_H^2 y C_H^3 es la ya descrita para el conjunto de los dominios. C_H^2 y C_H^3 están conectados

FRAGMENTO	DOMINIOS QUE LO		
	CONSTITUYEN	ENZIMA	REFERENCIA
Fab	V_L, C_L, V_H, C_H^1	Papaína	(10)
$F(ab')_2$	$(V_L, C_L, V_H, C_H^1)_2$	Pepsina	(11)
Fd	V_H, C_H^1	Papaína	(12)
V_L y C_L		Pepsina	(13)
		Tripsina	(14)
		Papaína	(15)
V_H		Papaína	(16)
F_V	V_L, V_H	Pepsina	(17)
Fb	C_L, C_H^1	Subtilisina	(18)
Facb	$(V_L, C_L, V_H, C_H^1, C_H^2)_2$	Plasmina	(19)
Fc	$(C_H^2, C_H^3)_2$	Papaína	(10)
C_H^2		Tripsina	(20)
pFc'	C_H^3	Pepsina	(21)

Tabla n° 2.- Fragmentos producidos por la acción proteolítica de distintas enzimas sobre la molécula de IgG.

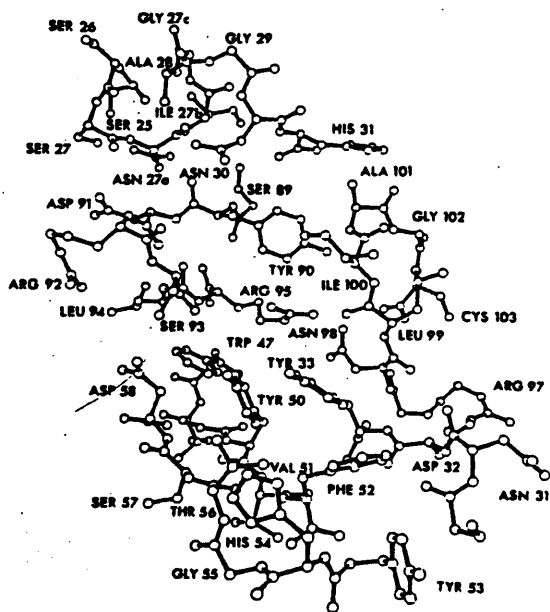


Figura nº 5.- Esquema de algunos de los residuos aminoácidos del sitio combinante de la IgG New.

por un segmento de cadena polipeptídica que va desde la Ser 337 hasta la Gln 342. Este segmento está expuesto al disolvente y de aquí su elevada susceptibilidad al ataque proteolítico.

Los dominios C_H3 interactúan fuertemente entre sí al contrario de lo que ocurre con los dominios C_H2 que no muestran interacción entre sí. El extremo amino-terminal, incluyendo la secuencia -Cys-Pro-Pro-Cys- parece ser altamente desordenado ya que no se puede trazar en el mapa de densidad electrónica. El segmento que sigue en esta región amino-terminal, hasta prolina 238, parece estar en estrecho contacto con parte del carbohidrato que se encuentra unido a la Asn 297. Esta secuencia y la cadena del carbohidrato se localizan entre los dominios C_H2 (23).

1.3.6.- Estructura de la IgG .-

Entre las inmunoglobulinas de las que se tienen datos de difracción de Rayos X cabe resaltar los obtenidos con la IgG Kol (IgG1 humana procedente de un mieloma), especialmente por la presencia en esta molécula de una región gozne normal, a diferencia de otras IgG sometidas a estudio (24, 25).

El análisis estructural de la IgG Kol revela que no es posible asignar a la región F_c un mapa de densidad electrónica. La región F_c aparece como desordenada en el cristal, probablemente debido a la presencia de una región gozne flexible que es capaz de desplazamiento incluso en la malla cristalina. (23,26).

Los estudios realizados con otras inmunoglobulinas que presentan deleciones en la región gozne han permitido obtener un modelo tridimensio-

nal de la molécula completa, como es el caso de la IgG Dob (IgG1 humana pro-
cedente de un mieloma que presenta una delección de 15 residuos en la re-
gión gozne) cuya representación aparece en la figura nº 6 (24). La estructu-
ra tridimensional de las distintas regiones es la misma que la que se ha
visto para los fragmentos Fab y Fc por separado.

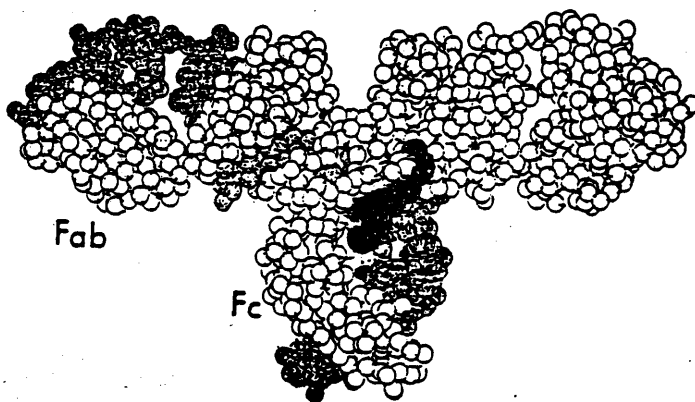


Figura nº 6.- Esquema de la estructura tridimensional de la IgG Dob. Una de las cadenas H tiene sus esferas en tono gris. Las unidades de carbohidrato se representan por las esferas de mayor tamaño en negro.

1.4.- FLEXIBILIDAD DE LA INMUNOGLOBULINA G .-

Los estudios realizados con la IgG de conejo demuestran la existencia de flexibilidad en la molécula. Ybguerabide y col. (27) mostraron que la región Fab puede moverse con respecto al Fc. La flexibilidad de la región gozne permite a las regiones Fab, relativamente compactas, moverse una con respecto a la otra. El ángulo entre los brazos Fab puede variar entre 0 y 180° (28).

La reducción de los puentes disulfuro intercadena pesada de la IgG interfiere con su capacidad de activación del complemento (29,30), capacidad de aglutinación (31) y con su unión a receptores celulares (32,33). No obstante, los estudios estructurales realizados con la molécula de anticuerpo no aclaran suficientemente los efectos de tal rotura en la molécula. Estudios hidrodinámicos han sido incapaces de detectar cambios conformacionales importantes tras la reducción (34,35,36). Sin embargo, medidas de depolarización de fluorescencia indican que el puente disulfuro juega un papel importante en la restricción de la flexibilidad de la molécula de anticuerpo (37).

Como ya se ha visto al tratar los estudios de difracción de Rayos X, no existe contacto entre los dominios C_H2 , que se mantienen separados por el resto de carbohidrato. Los estudios de intercambio isotópico de Venyamicow y col. (38) sugieren que la región C_H2 es una estructura relativamente abierta que sufre una desestabilización tras la reducción del puente disulfuro.

Los estudios realizados con inmunocomplejos sí muestran cambios im

portantes en la molécula de anticuerpo tras la reducción de los puentes disulfuro intercadena pesada. Tras la reducción, los dominios C_H2 se separan con lo cual los brazos de la molécula de anticuerpo se incrementan en 23 \AA (figura nº 7), como correspondería a la formación de un nuevo gozne en la zona de interacción C_H2-C_H3 (36), ya que los dominios C_H3 se mantienen fuertemente asociados por interacciones no covalentes.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear llevados a cabo con los fragmentos Fc y pFc de conejo aparecen especialmente bien resueltos en comparación con los espectros de otras moléculas de similar tamaño (39). Esto se ha interpretado como posible prueba de una importante flexibilidad segmental en la molécula de anticuerpo. La rotura del puente disulfuro intercadena pesada del Fc no tiene prácticamente efecto en el espectro de Resonancia Magnética Nuclear y, por tanto, apoya la ausencia de cambios conformacionales importantes en la molécula tras la rotura de este enlace.

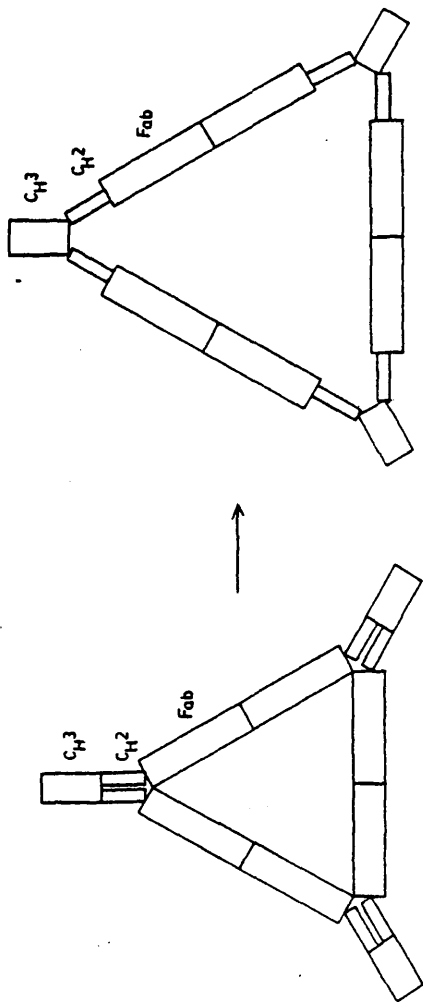


Figura nº 7.- Aumento del brazo de la IgG en inmunocomplejos como consecuencia de la reducción de los puentes disulfuro intercatenarios.

1.5.- CAMBIOS CONFORMACIONALES COMO CONSECUENCIA DE LA UNION DEL ANTIGENO.-

Ya que la unión del antígeno al anticuerpo se correlaciona con la iniciación de una serie de funciones efectoras, tales como la activación del complemento o actividad opsonizante, se ha postulado que un cambio conformacional en la molécula de anticuerpo, tras la unión del antígeno, puede jugar un papel central. Se han realizado un gran número de intentos a fin de detectar estos posibles cambios conformacionales, pero los resultados son contradictorios hasta el momento.

Actualmente se intenta apoyar la teoría de que un cambio conformacional ocurre tras la unión del antígeno al anticuerpo, no obstante, este cambio parece ser pequeño y se manifiesta fundamentalmente como un cambio en la estructura cuaternaria.

Basándose en los datos obtenidos hasta el momento, se han intentado extrapolar ciertas conclusiones. En primer lugar, para la detección de cambios conformacionales parece necesario que la zona de interacción entre el antígeno y el anticuerpo tenga al menos un cierto tamaño (40,41). En segundo lugar, los cambios conformacionales detectados se observan como una contracción de volumen del anticuerpo, pero no como un cambio en la forma básica (42,43) y con cambios relativamente pequeños en el entorno de uno o más restos de tirosina y triptófano (44,45). Medidas de Resonancia de Espin Electrónico también sugieren una rigidez más elevada del anticuerpo (46). En algunos casos los cambios pueden ser asignados a la región Fab o Fc (44,45). La integridad del puente disulfuro intercadena pesada parece ser necesaria para que estos cambios conformacionales se detecten a nivel de Fc (45). Finalmente, los cambios de volumen observados por Dispersión de Rayos X de ba

jo angulo tambien requieren la presencia del Fc, no observandose cambios en el caso del Fab o $F(ab')_2$ (43).

Varios mecanismos moleculares se pueden suponer a la hora de dar cuenta de estos resultados. El mecanismo más simple, consistente con estos datos, postula que la unión del antígeno causa un pequeño cambio en la orientación espacial de los dominios V_L-V_H y C_L-C_H1 . La transmisión puede ocurrir a través de los péptidos de conexión y/o los segmentos de contacto entre V_L y C_L y V_H y C_H1 . Existe realmente contacto entre estas regiones y en el caso de las cadenas K de conejo, V_L y C_L se encuentran unidas por un puente disulfuro (47).

Los cambios en la orientación espacial pueden llevar a: a) cambios en la estructura cuaternaria del Fab (48) y b) pequeños cambios en el entorno de uno o más residuos de tirosina en el C_L (49) y uno o más residuos de triptófano de localización desconocida (45,49).

La mayoría de los cambios en el entorno de las cadenas laterales de los residuos aromáticos fueron observados en los fragmentos Fab aislados (45). Por otro lado, los cambios de estructura cuaternaria se han documentado únicamente en el caso de anticuerpos completos, no habiéndose encontrado en el Fab o $F(ab')_2$ (43) a pesar de ciertos datos sugestivos de Resonancia de Espin Electrónico (46). Puesto que la cadena pesada en la región gozne es parcialmente flexible, la mayor rigidez puede producirse mediante la formación de contactos entre Fab y Fc. Este contacto podría entonces transmitir un cambio conformacional al dominio C_H2 . Un cambio en el entorno de uno o más residuos de triptófano en la región Fc ha sido comunicado por Schlesling (45).

1.6.- BASES ESTRUCTURALES DE LAS PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE LAS INMUNOGLOBULINAS .-

Las inmunoglobulinas son moléculas polifuncionales. La molécula de anticuerpo no solo va a unir su correspondiente antígeno, si no que va a ser capaz de mediar otro conjunto de funciones que se conocen genéricamente con el nombre de "Funciones Efectoras". Estas funciones son mediadas por la región constante de las cadenas de la inmunoglobulina, especialmente por la región Fc de la molécula.

Las funciones efectoras, algunas de las cuales se muestran en la tabla nº 3, juegan dos tipos de papeles fundamentales:

a) Independientemente de la unión del antígeno, la función efectora puede posibilitar la presencia del anticuerpo en una localización determinada donde se producirá la interacción con el posible antígeno. Por tanto para la manifestación de estas propiedades no es necesaria la presencia del antígeno.

b) Tras la unión del antígeno, se expresan una serie de funciones que tendran como resultado la eliminación de dicho antígeno.

1.6.1.- Sitios efectores de las inmunoglobulinas .-

Desde que en 1959 Porter (10) demostró que la molécula de inmunoglobulina podía ser escindida con papaína en dos fragmentos funcionalmente activos, han sido muchos los intentos encaminados a identificar fragmentos de menor tamaño que exhiban unas u otras de las funciones efectoras que expresa el conjunto de la molécula.

Edelman, en 1970 (50), postuló la "hipótesis de los dominios", teo

FUNCIONES EFECTORAS DE INMUNOGLOBULINAS	ANTIGENO INDEPENDIENTES	UNION A MACROGRAFOS Y MONOCITOS		
		UNION A MASTOCITOS Y BASOFILOS		
		UNION A NEUTROFILOS		
		UNION A LINFOCITOS		
		PASO A TRAVES DE LA PLACENTA		
		UNION A LA PROTEINA A DEL S. AUREUS		
	ANTIGENO DEPENDIENTES	ACTIVACION DEL COMPLEMENTO	VIA CLASICA	VIA ALTERNATIVA
		ACTIVIDAD OPSONIZANTE	NEUTROFILOS	MONOCITOS

Tabla nº 3.- Funciones efectoras de inmunoglobulinas.

ria que supone que cada función de las que exhibe el conjunto de la molécula de anticuerpo puede ser más precisamente localizada en diversos fragmentos, cada uno de los cuales comprende una de las regiones de homología características de las inmunoglobulinas.

De acuerdo con esta hipótesis, los sitios activos de cada propiedad biológica que exhibe el fragmento Fc deben residir bien en el dominio C_{H2} , o bien en el dominio C_{H3} . La zona conectante no debe contribuir a ninguna función, a no ser que sea necesaria para la estabilización de los dominios.

Aunque esta hipótesis ha sido ampliamente corroborada en el caso de la unión al antígeno y activación del complemento por la vía clásica, no ocurre lo mismo con otras funciones, como es el caso de la interacción con receptores celulares, en que los experimentos realizados hasta el momento son bastante contradictorios. Así, en general, fragmentos conteniendo el C_{H2} o el C_{H3} de la IgG por sí solos se han mostrado incapaces de mediar la interacción con los correspondientes receptores celulares. Esto llevó a algunos autores a postular que las estructuras responsables de estas funciones abarcarían ambos dominios, necesitándose por tanto ambos para mediar dicha función (51). No obstante, los datos estructurales indican que existe interacción entre los dominios C_{H2} y C_{H3} (52) lo cual posibilita el que se produzcan cambios conformacionales al separar ambos dominios. Por tanto, la incapacidad mostrada por un determinado fragmento para mediar ciertas funciones puede no ser representativa de la situación en la molécula completa, ya que cambios conformacionales que hayan afectado al sitio efector pueden ser la auténtica razón de esta incapacidad.

1.7.- ACTIVACION DEL COMPLEMENTO .-

1.7.1.- Vía Clásica .-

El primer componente del complemento consta de tres subcomponentes Clq, C1r y C1s. Clq es capaz de unirse a complejos antígeno-anticuerpo e inmunoglobulina agregada por calor o mediante reactivos químicos; Clq se une también a inmunoglobulina no agregada aunque con mucha menos afinidad (53). Como consecuencia de esta unión se produce una alteración en el Clq con lo que C1r y C1s se unen más fuertemente convirtiéndose C1s en C1s activado que tiene actividad peptidasa, lo cual desencadena la activación de los restantes componentes del complemento. Como consecuencia de esta activación se producen distintos fragmentos polipeptídicos con actividad biológica (anafilatoxinas, factores quimiotácticos, etc.) y el complejo lítico final característico (figura nº 8) (54).

Clq es una glicoproteína con un peso molecular de 400000 Dalton. Es tá constituido por dos tipos de subunidades de tamaño similar que dan lugar, tras la reducción de puentes disulfuro y resolución en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, a tres tipos de glicoproteínas: I, II y III (55, 56).

Mediante microscopía electrónica se ha observado que Clq tiene una forma que recuerda a un ramillete de seis tulipanes en el que las zonas que corresponderían a los tallos tienen una estructura similar al colágeno (figura 9) (57,58). La interacción de Clq con IgG ocurre por las partes globulares (59). La digestión pepsínica destruye las cabezas dejando los tallos que son capaces de interactuar con C1r y C1s y que dan un espectro de difracción típico de estructuras colagenosas (60,61). La interacción de Clq

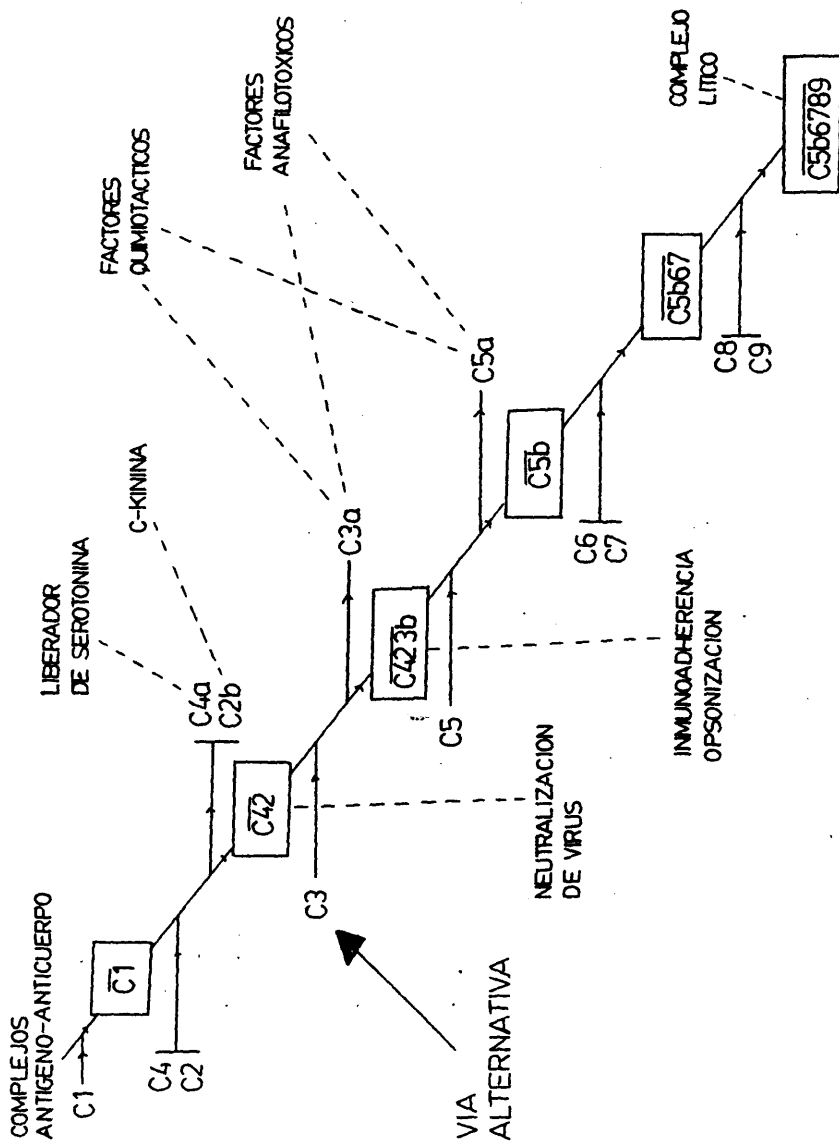


Figura nº 8.- Esquema de la activación del complemento por la vía clásica.

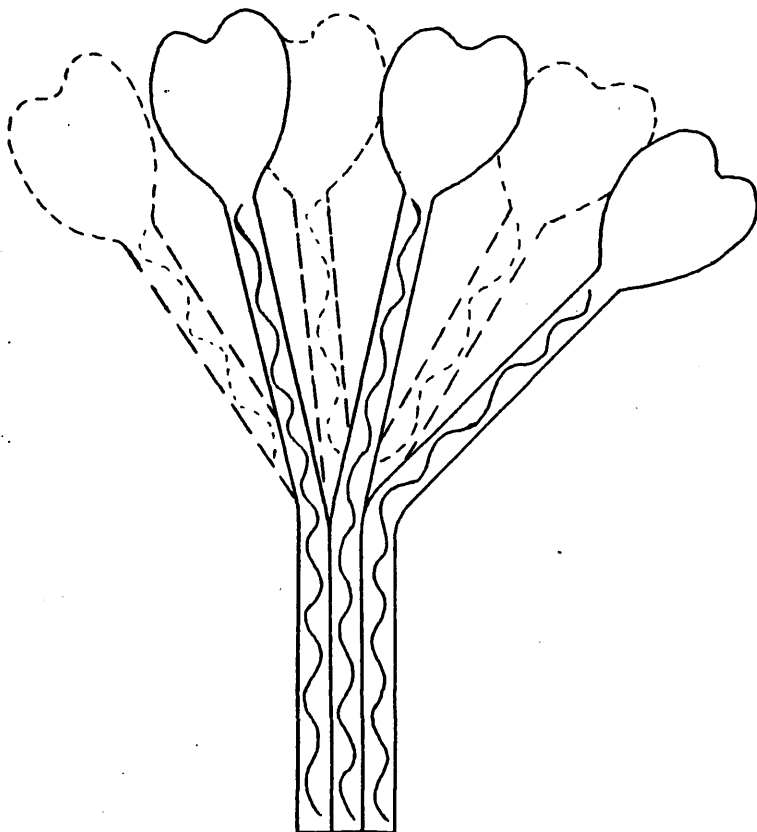


Figura nº 9.- Esquema de la molécula de Clq.

con IgG agregada ocurre con una constante de asociación del orden de 10^8 M^{-1} (62).

Ya que la interacción de C1r-C1s con Clq es más fuerte cuando éste se encuentra previamente unido a IgG agregada (63) se ha postulado la existencia de un cambio conformacional en la región colagénica cuando las regiones globulares se unen a estructuras del Fc (64,65). La posibilidad de que ocurra este cambio es bastante factible teniendo en cuenta que Clq puede tener de 12 a 18 sitios de unión para IgG (66).

No todas las inmunoglobulinas son capaces de activar el complemento por la vía clásica, sino que existen restricciones de clase y subclase (67).

Las estructuras responsables de la unión de Clq a la inmunoglobulina se han definido en el C_{H2} en el caso de la IgG (68) y en el C_{H4} en el caso de la IgM (69).

El C_{H2} de la IgG se muestra tan eficiente, en base molar, como el Fc en su capacidad de activación del complemento por la vía clásica (70). A pesar de no haberse detectado cambios conformacionales importantes, la reducción de los puentes disulfuro intercatenarios de la molécula de IgG elimina su capacidad de activar el complemento por esta vía (30). Capacidad que también se ve eliminada tras la modificación química de los restos de triptófano de la molécula o de su fragmento Fc (71,72).

Estos datos, junto con los cristalográficos (9) y de secuencia polipeptídica (73) de la región C_{H2} de la IgG1 humana apoyan la posibilidad de que el residuo de Trp de la posición 277 esté en el sitio implicado en la interacción con Clq o muy próximo a él. Por otro lado, dado que la β_2 microglobulina reducida es tan eficiente como la β_2 nativa para mediar

la activación del complemento, y dado que la β_2 pierde casi totalmente la estructura típica de hoja β para pasar a cadena estadística (74), se piensa que sea una secuencia lineal, mas que un núcleo conformacional, el responsable de esta activación.

En base a esto, se han realizado una serie de pruebas con péptidos sintéticos que poseen secuencias similares a la IgG1 alrededor del Trp 277. Estos péptidos, que son capaces de activar el complemento, muestran la importancia del resto de Trp, ya que se observa una importante pérdida de actividad si se elimina de la secuencia, así como la de un resto de Lys y otro de Asp (75). La importancia de los restos de lisina y de los grupos ácidos en la activación del complemento por la vía clásica ha sido puesto de manifiesto por otros autores (76,77).

1.7.2.- Vía Alternativa .-

La vía alternativa difiere de la clásica en cuanto a los componentes iniciales capaces de mediar la interacción con los activadores (figura nº 10). Los componentes son comunes a partir de C3 y, por tanto, ambas vías van a producir los mismos efectos finales (figura nº 8).

La vía alternativa, filogenéticamente más antigua que la clásica, tiene como posible sustrato activador algunas clases de inmunoglobulinas, aunque también puede ser activada por otras muchas sustancias de diferente estructura. Entre los activadores se encuentran polianiones de alto peso molecular (78), polisacáridos (79), eritrocitos de conejo (80) y estroma de eritrocitos humanos (81). La activación con los distintos elementos puede inhibirse mediante polianiones de bajo peso molecular (82).

Los experimentos más recientes (83,84) muestran que los distintos

activadores, mas que activar un factor inicial que desencadene la cascada de reacciones, lo que probablemente hacen es alterar las condiciones de regulación a que están sometidos los componentes iniciales de la vía alternativa, especialmente el C3b, producto de degradación del C3.

En el suero existe una degradación continua, de bajo nivel, de C3, produciéndose como consecuencia de ello C3b. A éste se pueden unir el factor B, el D y en su caso la Properdina (P), con lo cual se genera una C3-convertasa que al actuar sobre C3 genera nuevas moléculas de C3b. El fenómeno sería así amplificado llevando a la metabolización de todo el C3b accesible en el suero, si no fuese por la presencia de proteínas reguladoras, en este caso C3b Inactivador y su modulador β 1H, que inactivan el C3b y, por tanto, su capacidad de formar la C3 Convertasa inicial.

La característica que parecen tener en común la larga lista de activadores descritos es la capacidad para alterar este esquema regulador. Si el C3b, que se está generando en el suero a bajo nivel, se deposita en una superficie determinada, pueden ocurrir, en principio, dos cosas:

a) Que la superficie no sea activadora. El C3b va a ser fácilmente inactivado por la acción de C3b Inactivador y β 1H y, por tanto no se producirá una C3 Convertasa eficiente.

b) Que la superficie sea activadora. En este caso la acción de C3b Inactivador y β 1H sobre C3b se ve impedida, no afectándose la unión de los factores B, D y P que darán lugar a la C3 Convertasa y, por tanto, a nuevas moléculas de C3b que al volverse a unir a la superficie darán nuevas C3 convertasas o C5 convertasas si las moléculas de C3b se unen a C3 convertasas ya formadas. Así queda desencadenado el proceso que lleva a la activación de los restantes componentes del complemento (figura nº 10).

Por tanto, la activación del complemento por la vía alternativa implica la disminución de la velocidad de inactivación del C3b sobre la superficie de los activadores como consecuencia de la incapacidad de las proteínas reguladoras para mediar su acción eficientemente.

Algunas inmunoglobulinas son capaces de actuar como activadores cuando están formando inmunocomplejos, agregados por calor o unidas a superficies celulares que previamente no se comportaban como activadores (85,86, 87). Aunque ciertas inmunoglobulinas se han definido claramente como activadores (IgG de conejo, IgA), en algunos casos la capacidad de activar la vía alternativa no parece ser una propiedad intrínseca de las distintas clases de inmunoglobulinas, sino que puede depender del antígeno a que se unan, en cuanto que este antígeno posibilite la disposición relativa apropiada de las moléculas de inmunoglobulina y/o la disposición en un entorno determinado que coopere en esta activación (88).

En el caso de la IgG de conejo, que se muestra claramente como activante en distintos tipos de sistemas, las estructuras responsables de esta activación se han localizado a nivel de $F(ab')_2$ (85), sin que se conozcan por ahora sus bases moleculares. Fragmentos monovalentes (Fab') son capaces de mediar la activación siempre que se unan a estructuras que permitan mantenerlos en una disposición espacial próxima (88,89). La modificación de los restos de triptófano del $F(ab')_2$ no elimina su capacidad de activación del complemento por esta vía (90).

1.8.- UNIÓN A RECEPTORES CELULARES .-

1.8.1.- Unión a Mastocitos y Basófilos .-

Basófilos y mastocitos poseen receptores específicos para IgE. El número de receptores por célula del orden de 10^5 con una constante de asociación de 10^9 M^{-1} (91,92).

La unión a los correspondientes receptores esta mediada por el Fc. Actualmente no está dilucidada la región del Fc responsable de esta unión. Takatsu y col. (93) demostraron la dependencia de tal unión de la presencia de puentes disulfuro intercatenarios intactos. Los cambios asociados con el calentamiento de la IgE a 56 °C, que destruyen su capacidad de unión a los basófilos, apuntan a una posible implicación de los dominios $C_{H3}-C_{H4}$ (94).

Pese a que la IgE monomérica, no asociada al antígeno, se une fuertemente a su correspondiente receptor en la superficie de los basófilos, esta unión no va a ser suficiente para causar la desgranulación de las células a que se une. Bastará la reticulación de la IgE unida a la superficie celular, bien por el propio antígeno o bien por anticuerpos frente a la IgE, para que se produzca la desgranulación de las células a que está unida. El fragmento Fc reticulado mediante anticuerpos o reactivos químicos llevará también a la desgranulación celular (95).

A la vista de estos resultados se postuló que la polimerización de la IgE unida a la superficie celular podría activar enzimas asociadas a la membrana las cuales desencadenarían la liberación de mediadores. No obstante, y puesto que anticuerpos frente al receptor, o sus fragmentos $F(ab')_2$, pueden inducir la liberación de histamina de los mastocitos, facultad que no es capaz de mediar el Fab' , se ha postulado que es el reticulado de los

receptores celulares, y no el de la IgE en sí, el responsable de la liberación de histamina de los mastocitos (96).

1.8.2.- Unión a Monocitos y Macrófagos .-

La IgG es capaz de interaccionar con receptores específicos localizados en la superficie de monocitos y macrófagos. La interacción está mediada por el Fc como se ha puesto de manifiesto con los experimentos de inhibición con fragmentos Fc (97).

No todas las IgG son capaces de unirse a la superficie celular. En el caso de la IgG humana, IgG1 e IgG3 se unen con mayor afinidad que IgG2 e IgG4 (98,32). IgG de diferentes subclases e incluso de diferentes especies son capaces de inhibir cruzadamente, indicando que el receptor no es específico de subclase (32).

Los valores de la constante de interacción entre IgG y receptor varía según la especie de que se trate. La constante de interacción para las IgG a las que se les reconoce una clara actividad citofílica oscila entre 10^6 y 10^7 M^{-1} (99,100,101). El número de receptores oscila entre 10^5 y 10^6 por célula (99,100,101).

La zona del Fc responsable de la unión al receptor celular no está dilucidada. Existen datos apoyando (102,103 y 104) y negando (105,51) la capacidad de los dominios C_{H3} para mediar dicha función. También se encuentran autores que apoyan (51) o niegan (102) la capacidad del dominio C_{H2} para mediar esta función. Recientemente se ha comunicado una disminución en la capacidad de unión de la IgG humana reducida a su receptor así como que es necesaria una concentración de $pFc'(C_{H3})$ 10 veces superior a la de IgG, en base molar, para lograr el mismo grado de inhibición en el % de rosetas

formadas con eritrocitos recubiertos de IgG y monocitos (106).

La IgG no unida al antígeno, en forma monomérica, tiene por tanto capacidad de unión a la superficie celular, pero con una constante de asociación baja ($\sim 10^6 \text{ M}^{-1}$). La reticulación de la IgG por el antígeno posibilita, independientemente de la existencia de posibles cambios conformacionales, el aumento de avidéz del complejo antígeno-anticuerpo por la superficie celular al poder interaccionar varias regiones Fc con sus respectivos receptores en la superficie celular. Pero la reticulación de la IgG por parte del antígeno no sólo va a ser fundamental para posibilitar una mayor avidéz del complejo antígeno-anticuerpo por la superficie celular, sino que va a ser la reticulación de los receptores celulares, consecuencia de la reticulación de la IgG unida, la que va a provocar una alteración de las propiedades de membrana que conduce a la fagocitosis del complejo antígeno-anticuerpo por un mecanismo que requiere energía (107,108).

1.8.3.- Unión a Neutrófilos .-

La IgG es capaz de interaccionar con receptores específicos localizados en la superficie celular de los neutrófilos, interacción que es mediada por su región Fc (109). La interacción es también dependiente de subclase, observándose en el caso de la IgG humana la misma graduación que en monocitos (32).

IgA1 e IgA2 (humanas) así como la IgA-secretora tienen capacidad de unión a neutrófilos, siendo mayor la interacción del conjunto de la IgA que el de su fragmento Fc solo (32). También se observa inhibición cruzada en la interacción del receptor con IgA de distinta subclase o especie. No se ha observado inhibición entre IgG e IgA lo cual indica la existencia

de distintos receptores para ámbas clases (32).

Los valores de la constante de asociación entre la IgG y el receptor son del mismo orden de magnitud que en el caso de monocitos, observándose un mayor número de receptores por célula (101).

La localización de las estructuras responsables de la unión al receptor, dentro del Fc, no está dilucidada. Fc humano reducido, C_{H2} o C_{H3} son incapaces de inhibir la interacción IgG-receptor (110).

Al igual que en el caso de monocitos, la formación de complejos inmunes entre el antígeno y la inmunoglobulina por un lado, aumenta la avidéz del complejo por la superficie celular y, por otro lado, la reticulación de estructuras de la superficie celular da lugar a la liberación de mediadores y fagocitosis del complejo por un mecanismo que requiere energía.

1.8.4.- Unión a Linfocitos .-

Los linfocitos, tanto los B como los T, presentan receptores para IgG, así como para IgM, IgA e IgE (111-117). La interacción se media a través del Fc de la correspondiente inmunoglobulina. La región del Fc implicada en la unión no está claramente definida, los dominios C_{H3} aislados (pFc') se muestran incapaces de inhibir la interacción IgG-receptor (118).

El papel que juega la unión de la inmunoglobulina al receptor no está claramente dilucidado, aunque se piensa que puede estar implicado en procesos de regulación de la respuesta inmune.

1.8.5.- Paso a través de la Placenta .-

En especies tales como conejos, ratas o humanos, la madre es capaz de transferir inmunidad pasiva a sus hijos prenatalmente mediante la trans-

ferencia de IgG a través de la placenta. La transferencia es muy selectiva y esta mediada por receptores específicos para el Fc presentes en la superficie de las células encargadas de la absorción (119).

Estudios sobre la especificidad de la transferencia de IgG a través de la placenta llevaron a Brambell (120) a proponer un mecanismo de transporte mediado por el receptor. Según esta hipótesis, el receptor para la región Fc de la IgG se localizaría en la zona apical de la célula transportadora y una condición necesaria para el movimiento del anticuerpo a través de la barrera celular es que la IgG se una al receptor Fc.

Inmunoglobulinas G de diferentes especies son capaces de interactuar y ser transferidas por un mismo receptor, aunque existe preferencia por la IgG del sistema homólogo, (121). La IgG1 y la IgG3 humanas interactúan preferentemente a la IgG2 e IgG4 (119).

La rotura de los puentes disulfuro intercatenarios reduce en gran medida la interacción de la IgG con el receptor. La proteína Dob (IgG1 sin apenas región gozne) también tiene disminuida su capacidad de unión al receptor (122). C_{H2} o C_{H3} por sí solos también se muestran incapaces de mediar esta acción (122).

1.8.6.- Interacción con la Proteína A del Staphylococcus aureus.-

La interacción de la Proteína A del S. aureus con la región Fc de la IgG de diferentes especies provoca una reticulación de los Fc y los complejos formados pueden activar complemento (123,124,125). A pesar de que IgG de diferentes especies pueden interactuar con la Proteína A del S. aureus, hay una marcada especificidad respecto a subclase. Así en el caso de la IgG humana, IgG3 no se une a pesar de que IgG1, IgG2 e IgG4 lo hacen

fuertemente (126,127). La zona del Fc responsable de la interacción se ha localizado en la zona de contacto $C_{H^2}-C_{H^3}$ (128).

La significación biológica de la actividad de la Proteína A del *S. aureus* y su posible efecto en las relaciones huésped-parasito no están totalmente aclaradas. Cepas de *S. aureus* con un elevado contenido en Proteína A son fácilmente aglutinadas en suero normal. No obstante, también se ha descrito un efecto que sería desfavorable para el huésped ya que la Proteína A parece tener un efecto inhibitor sobre las opsoninas termolábiles (129). Otra serie de estudios realizados "in vitro" indican que la Proteína A del *S. aureus* se comporta como un mitógeno inespecífico de células B (130,131).

OBJETIVOS Y

PLAN DE TRABAJO

Mientras que las moléculas de anticuerpo son capaces de reconocer un número muy elevado de estructuras antigénicas distintas, los procesos de eliminación de estos antígenos se median por un pequeño número de mecanismos efectores que son activados por los complejos antígeno-anticuerpo. En este sentido, los dos mecanismos fundamentales de eliminación son la activación del complemento y la unión a receptores celulares.

Durante los últimos años se ha trabajado intensamente a fin de localizar el dominio - o dominios - de homología responsable de cada una de las funciones efectoras que exhibe la molécula de anticuerpo y, en su caso, localizarlas más precisamente dentro del dominio o dominios que correspondan.

Así, la activación del complemento por la vía clásica ha sido localizada en una región comprendida en el dominio C_{H2} . No ocurre lo mismo con la activación del complemento por la vía alternativa en que únicamente en algunos casos se ha conseguido asignar dicha funcionalidad a la región Fab de la IgG.

Igualmente, la zona del Fc responsable de la interacción con receptores celulares continúa prácticamente desconocida, no habiéndose dilucidado aún si esta función es mediada por uno u otro dominio de la región Fc o si son necesarios ambos dominios.

En el presente estudio se trata, por un lado, de dilucidar el papel de los grupos amino y carboxilo en la activación del complemento por la vía alternativa y en la unión a receptores celulares de neutrófilos. Para ello se procedió a la modificación de estos grupos en la molécula de IgG con el fin de abordar la interacción con receptores celulares, y a la modificación de estos mismos grupos en el fragmento $F(ab')_2$ de la IgG cuando se

aborda el estudio de la activación del complemento. Así mismo, se modifican los restos de triptófano del $F(ab')_2$ con objeto de estudiar su papel en la activación del complemento por la vía alternativa.

Por otro lado, se midió la capacidad de unión a los receptores celulares de neutrófilos de los fragmentos F_{ab} y pFc' , cada uno de los cuales contiene una de las dos regiones de homología del Fc. Los estudios sobre interacción con receptores celulares se completan con el estudio de la capacidad de la IgG reducida a nivel de puentes disulfuro intercatenarios para mediar la unión a receptores celulares de neutrófilos. Con estos estudios se pretende obtener más información sobre la capacidad de los dominios C_{H2} y C_{H3} , por separado, para mediar la unión a receptores celulares de neutrófilos y comprobar hasta que punto es necesaria la integridad conformacional del Fc para mediar esta función.

Con este fin se ha seguido la siguiente metodología:

- 1º.- Obtención de la IgG de conejo y a partir de ella los distintos fragmentos utilizados (F_{ab} , $F(ab')_2$ y pFc').
- 2º.- Modificación selectiva de los distintos grupos:
 - a) Modificación de los grupos carboxilo de la IgG y del $F(ab')_2$ con el éster etílico de la glicocola previa activación con carbodiimidas solubles.
 - b) Modificación de los grupos amino de la IgG y $F(ab')_2$ con cianato potásico.
 - c) Modificación de los restos de triptófano del $F(ab')_2$ con bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobencilo.
 - d) Reducción de los puentes disulfuro intercatenarios de la IgG con ditioeritritol y posterior alquilación con iodoace

tamida.

3º.- Controles conformacionales para cada una de las modificaciones introducidas:

- a) Dicroísmo circular.
- b) Inmunodifusión doble bidimensional.
- c) Filtración en gel.

4º.- Utilización de un sistema hemolítico en fase soluble para medir la variación de la actividad anticomplementaria del fragmento $F(ab')_2$ con las distintas modificaciones.

5º.- Puesta a punto de un sistema de formación e inhibición de rosetas para medir la capacidad de interacción de la IgG, IgG modificada (carboxilo, amino o puentes disulfuro), $F(ab)$ y pFc' con los receptores celulares de neutrófilos.

MATERIALES
Y METODOS

3.1.- OBTENCION DE SUERO DE CONEJO .-

3.1.1.- Obtención de suero de conejo anti-eritrocito de carnero .-

A conejos de la raza New Zealand procedentes del animalario de la Fundación Jiménez Díaz se les inyecta por vía intravenosa 1 ml de eritrocitos de carnero al 5 % en solución salina (NaCl 0.15 M tamponada con fosfato 0.01 M a pH 7.2). La pauta seguida consiste en inyectar esta dosis cada 48 horas durante las dos primeras semanas, se deja de inyectar durante dos semanas y se vuelve a inyectar la dosis una vez por semana durante cuatro semanas. A los diez días de la última inyección se extrae la sangre (50 ml) de la vena marginal de la oreja y se deja retraer el coágulo durante unas 6 horas a temperatura ambiente. Se recoge la fase líquida, se centrifuga a 500 g durante 5 minutos y se recoge el sobrenadante que es el suero de conejo.

Las sucesivas extracciones del suero de estos conejos se realizan aproximadamente cada mes, previa inyección intravenosa, unos diez días antes de la extracción, de 1 ml de eritrocitos de carnero al 5 %.

El título de anticuerpos del suero procedente de cada conejo se comprueba por aglutinación según el siguiente protocolo:

A 450 µl de una solución de eritrocitos de carnero al 0.2 % en solución salina que contiene suero de conejo normal a una dilución 1/200, se le añaden 50 µl de diluciones crecientes del suero de conejo inmunizado con eritrocitos. El título del suero se da como la última dilución final del suero que es capaz de aglutinar los eritrocitos.

Los sueros con un título de hemaglutinación superior a 1/300 se descartan y con los restantes se procede a la obtención de la IgG anti-eri-

trocito de carnero.

3.1.2.- Obtención del suero de conejo anti-albúmina humana .-

A conejos de la raza New Zealand se les inyecta por vía intramuscular 100 μ g de albúmina humana en 0.5 ml (0.25 ml de solución salina con 0.25 ml de adyuvante completo de Freund). Esta dosis se inyecta una vez por semana durante 6 semanas. Pasados 10 días desde la última inyección se extrae el suero como se ha descrito en el apartado 3.1.1.

La presencia de anticuerpos frente a albúmina humana se detecta por inmunodifusión doble bidimensional (ver apartado 3.2.1) frente a una dilución apropiada de albúmina humana. Aquellos conejos que dan una banda de precipitación adecuada se siguen sangrando cada treinta días aproximadamente, previa inyección diez días antes, de una dosis de albúmina humana en las condiciones descritas.

3.2.- OBTENCIÓN DE LA IgG DE CONEJO .-

Se procede según una modificación del método de Peterson y Sober (132).

Una vez obtenido el suero de partida (bien anti-eritrocito o bien anti-albúmina humana) se precipita con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.33 M (concentración final). El sobrenadante se descarta y el precipitado se redisuelve y dializa frente a un tampón Na_2HPO_4 0.01 M, pH 7.6.

El dializado se cromatografía a través de una resina de intercambio iónico, DEAE-celulosa (diethyl-aminoethyl-celulosa) DE-11 Whatman, en columnas de 4x40 cm, siendo el eluyente el mismo tampón de la diálisis.

Del eluido se recogen las fracciones con absorbancia superior a 0.3, se reunen y concentran por ultrafiltración a través de bolsas de celofán Visking 8/32 (2.4 nm de diámetro de poro) a presión negativa. La solución de IgG se centrifuga a 3800 g durante 15 minutos a fin de eliminar agregados insolubles.

La pureza de las preparaciones se verifica por las siguientes técnicas:

3.2.1.- Inmunodifusión doble bidimensional .-

Se lleva a cabo en agar (Agar Noble Difco al 1 % en NaCl 0.15 M) según una modificación del método de Ouchterlony (133) frente a un antisuero anti-proteínas séricas de conejo, procedente de agnos (Behring) o antisuero anti- γ -globulinas de conejo, procedente de carnero, obtenido en nuestro laboratorio.

3.2.2.- Inmunoelectroforesis .-

Se lleva a cabo en placas de agar (Agar Noble Difco) al 1.25 % en tampón veronal (ácido 5.5'-dietil barbiturico/5.5'-dietil-barbiturato sódico, 0.06 M, pH 8.6). La muestra se introduce en orificios de 1 mm de diámetro practicados en el gel mediante una pipeta Pasteur calibrada, equidistantes 6 mm del eje longitudinal de la placa y la electroforesis se lleva a cabo en el tampón mencionado, aplicando una caída de tensión de 5 V/cm durante 70 minutos.

Tras la electroforesis, se practica una trinchera de 2 mm de anchura en el eje longitudinal de la placa, se rellena con el antisuero correspondiente y se deja en una cámara húmeda, observando el desarrollo de las

bandas de precipitación a las 24 y 48 horas.

3.2.3.- Filtración en gel .-

Se realiza en Sephadex G-200 en una columna de Pharmacia de 2.5x75 cm que previamente ha sido calibrada, siguiendo la metodología de Andrews (134), para la estimación de pesos moleculares utilizando las siguientes proteínas patrón: IgA humana sérica (160000 Dalton), albúmina bovina (66000 Dalton), ovoalbúmina (43500 Dalton), quimotripsinógeno de páncreas de ternera (23800 Dalton) y mioglobina de cachalote (17800 Dalton). Como eluyente se utiliza tampón fosfato 0.01 M, pH 7.2, que contiene NaCl 0.5 M y azida sodica (0.02 % p/v).

3.2.4.- Electroforesis en gel de poliacrilamida .-

Se sigue el método descrito por Davis para geles al 7.5 % (135).

Se depositan 25 µl de proteína disueltos en 10 µl de tampón superior de la electroforesis (TRIS/Gly, pH 8.9) en la parte superior del gel junto con otros 10 µl de una solución de azul de bromofenol al 0.01 % que sirve como marcador. Se aplica una tensión que de una intensidad de 1.5 mA por tubo mientras el marcador se encuentra en el gel de concentración, y de 4 mA por tubo cuando éste se encuentra en el gel de resolución.

Los geles se tifen con amido Schwarz al 0.1 % en ácido acético al 7 % durante 6 horas y se destifen por cambios sucesivos en ácido acético al 7 %.

La concentración de la disolución de IgG, una vez comprobada su pureza, se calcula en base a un coeficiente de extinción $E_{280}^{0.1\%}$ de 1.4 (calcu-

lado por peso seco de proteína según el procedimiento previamente descrito (89)).

3.3.- OBTENCION DEL FRAGMENTO Facb .-

Se sigue básicamente el método descrito por Connell y Porter (19).

Una solución de IgG en solución salina (10 mg/ml) se lleva a pH 2.7 con HCl 0.5 M. Se mantiene 1 hora a 37°C, se neutraliza y se añade plasmína (Kabi), 3 U.C. por cada 100 mg de IgG. Se incuba 4 horas a 37°C, y se cromatografía a través de una columna de Pharmacia de 2.6×60 cm, utilizando como eluyente una solución de urea 6 M, tamponada con HAc/NaAc 0.1 M a pH 4.6. Se recogen fracciones de 2 ml y se lee la absorbancia a 280 nm.

El primer pico del eluido se dializa frente a un tampón carbonato sódico 0.1 M pH 8, que contiene NaCl 0.5 M, y tras la diálisis se cromatografía a través de un inmunoadsorbente anti-pFc' (ver apartado 3.3.1).

El eluido procedente de la cromatografía en la columna de inmunoadsorbente (fracción no retenida) contiene Facb cuya pureza se comprueba por inmunodifusión, inmunolectroforesis, filtración en gel y electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (apartado 3.2.3).

La concentración de la proteína se calcula utilizando el mismo coeficiente de extinción que para la IgG.

3.3.1.- Cromatografía a través de un inmunoadsorbente anti-pFc'.-

La columna de inmunoadsorbente se prepara según el siguiente protocolo:

Se inmunizan cobayos con el fragmento pFc' de la IgG de conejo, obtenido según se detalla en el apartado 3.5, siguiéndose el mismo protocolo

de inmunización que el descrito en el apartado 3.1.2 para la obtención de antisuero de conejo anti-albúmina humana. La sangre se extrae por punción cardiaca y los sueros que por inmunodifusión doble bidimensional dan banda de precipitación con pFc['] se reúnen y precipitan con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.33 M. El precipitado se redissuelve y acopla a una Sepharosa 4B activada con bromuro de cianógeno (Pharmacia) siguiendo el protocolo descrito por la casa comercial excepto que la cantidad de proteína utilizada fue de 30 mg por g de Sepharosa.

Como eluyente de la cromatografía se utiliza una solución de NaCl 0.5 M, NaHCO_3 0.1 M, pH 8. Lo que queda retenido en estas condiciones se eluye con una solución de Gly/HCl 0.5 M, NaCl 0.15 M, pH 3.

3.3.2.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS .-

Se sigue la técnica descrita por Weber y Osborn (136) en placas de 12x15 cm. De 30 a 60 μg de muestra disueltos en 60 μl del tampón de aplicación se depositan en cada pocillo. La electroforesis se realiza a 50 V mientras el marcador (azul de bromofenol) se encuentra en el gel de concentración y a 100 V cuando se encuentra en el gel de resolución.

Los geles se tifican con azul Coomassie al 0.05 % en alcohol metílico al 47 % y ácido acético al 6 % durante una noche. Los geles se destifican en la misma solución sin el azul Coomassie.

3.4.- OBTENCION DEL FRAGMENTO F(ab')₂ .-

Una solución de IgG (antieritrocito o antialbúmina) en un tampón HAc/NaAc 0.1 M, pH 4.6, y a una concentración de 15 mg/ml, se digiere con pepsina (relación enzima sustrato de 1:100) durante 24 horas a 37°C, según

el método descrito por Nisonoff (137). La reacción se para por adición de TRIS sólido hasta llevar la solución a pH 8. El digerido se filtra a través de Ultrogel Aca 44 en una columna Pharmacia de 2.6×100 cm, utilizando como eluyente el tampón descrito en el apartado 3.2.3. Se recogen fracciones de 3 ml y se lee su absorbancia a 280 nm.

El primer pico del eluido contiene $F(ab')_2$ que se concentra y procede a comprobar su pureza por las mismas técnicas descritas para el caso del Facb. La concentración del $F(ab')_2$ se calcula en base a un coeficiente de extinción $E_{280 \text{ nm}}^{0.1\%}$ de 1.34 (89).

3.5.- OBTENCION DEL FRAGMENTO pFc'.

Como consecuencia de la digestión pepsínica de la IgG (apartado anterior), aparte del fragmento $F(ab')_2$ en el primer pico del eluido procedente de la cromatografía en Ultrogel Aca 44, se obtiene el fragmento pFc' en el segundo pico del mismo eluido. Este pico se concentra y se somete a las pruebas correspondientes para comprobar su pureza. La concentración de pFc' se calcula en base a un coeficiente de extinción $E_{280 \text{ nm}}^{0.1\%}$ de 1.6 (138).

3.6 .- OBTENCION DE LA IgG REDUCIDA .-

A una disolución de IgG (anti-eritrocito o anti-albúmina) a una concentración de 2mg/ml en un tampón NaCl 0.15 M, EDTA 2 mM, TRIS 10 mM, pH 7.8, se le adiciona un volumen igual de una solución de ditioeritritol 20 mM en el mismo tampón y se incuba durante dos horas a temperatura ambiente y atmósfera de nitrógeno.

Pasadas las 2 horas, se añade sobre la disolución resultante un volumen igual de ICH_2CONH_2 40 mM en el tampón descrito anteriormente y se in-

cuba a temperatura ambiente, oscuridad y atmósfera de nitrógeno durante 20 minutos. Realizada la alquilación, la disolución se dializa frente a solución salina y la ausencia de IgG intacta se comprueba por geles de poliacrilamida en presencia de SDS.

La figura nº 11 muestra el conjunto de moléculas y fragmentos cuya obtención se ha descrito en los apartados anteriores.

3.7.- MODIFICACION DE LOS GRUPOS CARBOXILO .-

3.7.1.- Modificación de los grupos carboxilo de la IgG .-

3.7.1.1.- Reacción de modificación .-

Los grupos carboxilo de la IgG de conejo se modifican de acuerdo con el procedimiento descrito por Hoare y Koshland (139). A una disolución de IgG (1 mg/ml) en ester etílico de glicocola 1 M, pH 4.75, se le añade EDC (1-etil-3(3-dimetil-aminopropil)-carbodiimida) sólida hasta que la concentración es 0.1 M en EDC. El pH se mantiene constante a pH 4.75 con HCl 1 M. La reacción se lleva a cabo durante 30 minutos sacándose alícuotas a intervalos de 5, 10, 20 y 30 minutos. A cada alícuota se le añade un volumen igual de HAc/NaAc 1 M, pH 4.75, con el fin de parar la reacción. La disolución resultante se dializa frente a solución salina, se concentra y se cromatografía a través de Ultrogel ACA 44. El pico correspondiente a IgG se concentra y dializa frente a solución salina.

Como control se utiliza una IgG sometida al mismo tratamiento excepto que no se añade EDC.

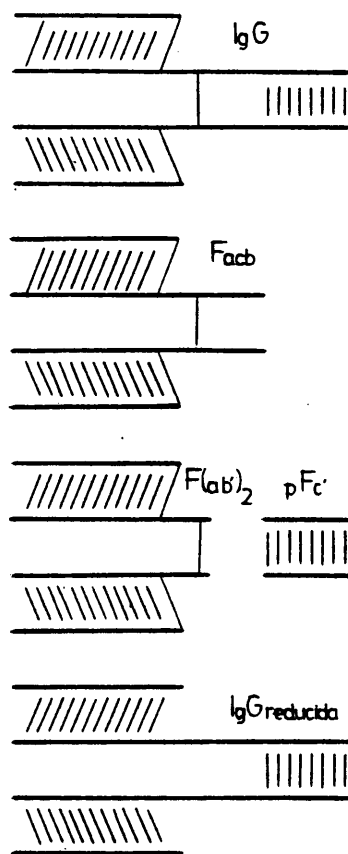


Figura n° 11.- Esquema de las moléculas de IgG, Facb, F(ab')₂, pFc' e IgG reducida.

3.7.1.2.- Cuantificación del número de grupos carboxilo modificados .-

El número de grupos carboxilo modificados se cuantifica por el incremento del % de glicocola en los análisis de aminoácidos de las moléculas modificadas con respecto a la IgG control.

Alícuotas procedentes de la IgG control, o modificada a distintos tiempos, se dializan frente a H₂O y se liofilizan. A cada liofilizado se le adiciona 0.5 ml de HCl 6 N conteniendo 0.1 % de fenol, se cierra el vial a vacío y se mantiene a 110 °C durante 24, 48, 72 y 96 horas. A continuación se abren los viales, se llevan a sequedad a vacío se lavan dos veces con H₂O destilada llevándolos en ambos casos a sequedad a vacío y se disuelven en el disolvente del analizador. El análisis de aminoácidos se lleva a cabo en un analizador Durrum D-500 utilizando tampones de citrato de litio.

Los porcentajes de Thr y Ser se obtienen por extrapolación a tiempo cero de los valores obtenidos a los distintos tiempos de hidrólisis. De Ile y Val se toman los valores del último tiempo de hidrólisis.

El contenido en Trp se determina espectrofotométricamente utilizando el método descrito por Beaven y Holiday (140). Se prepara una solución de IgG en NaOH que a 290 nm exhiba una absorbancia comprendida entre 0.2 y 0.5. Se lee la absorbancia de esta solución a 280 y 294.4 nm. El contenido en Trp de la proteína se obtiene de la siguiente expresión:

$$\frac{M_{\text{Trp}}}{M_{\text{Tyr}}} = \frac{0.592 A_{294.4} - 0.263 A_{280}}{0.263 A_{280} - 0.170 A_{294.4}}$$

El contenido en cisteína se deduce del número de puentes disulfuro de la molécula de IgG (141, 89).

A partir del incremento en el porcentaje de Gly, se obtiene el número de grupos modificados por cada 100 restos de la proteína. Tomando como

1320 el número de residuos de la molécula de IgG, se deduce el número de grupos carboxilo modificados por molécula.

3.7.2.- Modificación de los grupos carboxilo del F(ab')₂.-

3.7.2.1.- Reacción de modificación .-

Se realiza según lo descrito en el apartado 3.7.1.1 para la IgG.

3.7.2.2.- Cuantificación del número de grupos carboxilo modificados .-

Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 3.7.1.2 considerando un número de 890 restos para la molécula de F(ab')₂.

3.8.- MODIFICACION DE LOS GRUPOS AMINO .-

3.8.1.- Modificación de los grupos amino de la IgG .-

3.8.1.1.- Reacción de modificación .-

Los grupos amino de la IgG se modifican con cianato potásico de acuerdo con el procedimiento descrito por Nakagawa y col. (142). A una solución de IgG (5 mg/ml) en un tampón de fosfato sódico 0.1 M, pH 7.7, se le añade cianato potásico cristalizado hasta dar una concentración final de cianato de 0.5 M. La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente con agitación manteniéndose el pH a 7.7 por adición de ácido acético 1M.

Se toman alícuotas a las 12, 24, 48 y 72 horas, se dializan frente a solución salina, se centrifugan a 3800 g durante 5 minutos y se cromatografía a través de una columna de Ultrogel AcA 44.

3.8.1.2.- Cuantificación del número de grupos amino modificados .-

Se deduce a partir del número de grupos amino libres que desapare-

cen como consecuencia de la modificación. El número de grupos amino libres se determina según el método descrito por Fields (143). A 1 ml de una disolución de IgG o IgG carbamylada a distintos tiempos en $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 0.1 M, NaOH 0.1 M, se le añaden 10 mg de ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico en 0.02 ml de H_2O . Pasados 10 minutos, la reacción se para por adición de 2 ml de NaH_2PO_4 0.1 M, Na_2SO_3 1.5 mM y se determina la absorción óptica a 420 nm. El coeficiente de extinción utilizado para el grupo amino modificado con ácido 2,4,6-trinitrobencenosulfónico (TNBS) es de $19200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a esta longitud de onda.

3.8.2.- Modificación de los grupos amino del $\text{F(ab}')_2$.-

3.8.2.1.- Reacción de modificación .-

Se realiza según lo descrito en el apartado 3.8.1.1 para la IgG.

3.8.2.2.- Cuantificación del número de grupos amino modificados .-

Se sigue el procedimiento descrito en el apartado 3.7.1.2.

3.9.- MODIFICACION DE LOS RESTOS DE TRIPTOFANO DEL $\text{F(ab}')_2$.-

3.9.1.- Reacción de modificación .-

La modificación química de los restos de Trp del $\text{F(ab}')_2$ se lleva a cabo de acuerdo con el método descrito por Horton y Koshland (144). A la proteína (7 mg/ml) en HAc/NaAc 0.1 M, pH 4.5 distribuida en distintos viales se le añaden cantidades crecientes de bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobencilo (NBB) de modo que la concentración de reactivo (NBB) con respecto a la proteína sea 100, 300 ó 600 veces superior en base molar. El NBB se añade a la disolución de proteína disuelto en dioxano y a una concentración tal que

la relación volumen dioxano/volumen disolución proteica no supere el 5 %. La disolución resultante se mantiene en agitación durante 1 hora y a continuación se dializa frente a solución salina. Se centrifuga y se cromatografía a través de Ultrogel ACA 44.

3.9.2.- Cuantificación del número de restos de triptófano modificados .-

El número de restos de Trp modificados se deduce del valor de absorbancia de la proteína modificada a 410 nm, considerando un coeficiente de extinción para el grupo indol modificado de $18000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a un pH superior a 12 (145).

3.10.- CONTROL ESTRUCTURAL DE LAS MODIFICACIONES QUIMICAS .-

3.10.1.- Espectro de dicroísmo circular .-

Los espectros de dicroísmo circular de las proteínas nativas y modificadas se realizan entre 210 y 320 nm en un dicrógrafo Jobin Yvon, Mack III, provisto con lámpara Xenon de 250 W, a una velocidad de barrido de 0.5 nm/sg. Todas las muestras son previamente filtradas a través de un filtro Millipore de 0.45 micras de diámetro y están disueltas en un tampón de fosfato 0.004 M, NaCl 0.85 %, EGTA 10 mM y MgCl_2 4.5 mM, pH 7.21 para el F(ab)_2 y en solución salina para la IgG. La temperatura a la que se obtienen los espectros es de 20°C y las concentraciones de proteína utilizadas son 200 µg/ml en el ultravioleta lejano (210-240 nm) y de 1 mg/ml en el ultravioleta próximo (250-320 nm). Los resultados se expresan en términos de $[\theta]$ elipticidad media por residuo en unidades de grado $\times \text{cm}^2/\text{decimol}$, para un peso medio por residuo de 110 Dalton.

3.10.2.- Inmunodifusión doble bidimensional .-

Se lleva a cabo según lo descrito en el apartado 3.2.1 excepto que en vez de agar se utiliza agarosa (BDH) como lecho de gel. Aparte del antisuero anti- γ -globulinas de conejo se utiliza un antisuero anti-pFc' obtenido tal como se indica en el apartado 3.3.1.

3.10.3.- Filtración en gel .-

Se realiza según se describe en el apartado 3.2.3.

3.10.4.- Electroforesis en agarosa .-

Se lleva a cabo en placas de agarosa al 1% en el tampón descrito para inmunoelectroforesis en el apartado 3.2.2. La muestra se introduce en orificios de 1 mm de diámetro practicados en el gel mediante una pipeta Pasteur calibrada y la electroforesis se lleva a cabo en el tampón mencionado aplicando una caída de tensión de 5 V/cm durante 3 horas 30 minutos.

Tras la electroforesis, el gel de agarosa se tinte en la solución de tinte descrita en el apartado 3.3.2 durante 3 horas y se destinte con la solución de desteñido descrita en el mismo apartado.

3.11.- ACTIVIDAD ANTICUERPO .-

3.11.1.- Título de hemaglutinación .-

El título de hemaglutinación de la IgG y del $F(ab')_2$, nativo o modificado, se calcula de acuerdo con el procedimiento descrito en el apartado 3.1.1. El título de hemaglutinación se da como la mínima cantidad de anticuerpo que es capaz de aglutinar los hematíes en estas condiciones.

3.11.2.- Incorporación radioactiva .-

3.11.2.1.- Marcaje del $F(ab')_2$.-

Se procede al marcaje del $F(ab')_2$, nativo o modificado, con ^{125}I por el método de la cloramina T (146).

A 100 μ g de proteína en 100 μ l de solución salina se añaden 50 μ l de ^{125}I (1 mCi) en un tampón fosfato 0.5 M, pH 7.5, e inmediatamente se añaden 100 μ l de cloramina T (sal sódica de N-monocloro-p-toluensulfonamida) a una concentración de 1 mg/ml en H_2O . Transcurrido 1 minuto, se adicionan 100 μ l de metabisulfito sódico (1 mg/ml en H_2O). Después de tres minutos se adicionan 0.5 ml de solución salina y se dializa frente a solución salina fría. Transcurridos 60 minutos se adiciona 1 ml de albúmina de huevo (1 mg/ml) y se continúa la diálisis en frío con cambios frecuentes hasta obtener fondo en los líquidos de diálisis.

3.11.2.2.- Incorporación radioactiva sobre la superficie del eritrocito .-

Eritrocitos de carnero, al 0.75 % de concentración final, se incuban con los $F(ab')_2$ marcados radioactivamente durante 1 hora a 37°C , en una solución salina que contiene suero de conejo no inmunizado a una dilución 1/200. Transcurrida la hora de incubación, se toman 200 μ l de cada tubo y se depositan sobre 50 μ l de aceite de inmersión (Immersionol, densidad = 1.02, de Merck) en tubos de poliestireno (400 μ l de capacidad), y se centrifugan durante 3 minutos a 10000 g en una microfuga Beckman TM B. Tras la centrifugación se cortan los tubos por la mitad de la capa de aceite y se cuenta la radioactividad del fondo y de la parte superior del tubo.

3.12 .- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTICOMPLEMENTARIA DEL $F(ab')_2$ POR LA VIA ALTERNATIVA .-

Se sigue el procedimiento descrito por Albar (89).

A 0.25 ml de eritrocitos al 0.3 % en solución salina para la vía alternativa ($NaCl$ 0.15 M, Na_2HPO_4 0.004 M, EGTA 10 mM y $MgCl_2$ 4.5 mM, pH 7.21) se le adicionan cantidades crecientes de $F(ab')_2$ anti-eritrocito ($F(ab')_2$ -aE), control o modificado, en un volumen de 0.25 ml de la solución mencionada anteriormente. Se incuba 1 hora a $37^\circ C$ y se añade 1 ml de una dilución de suero de conejo no inmunizado de modo que la dilución final del suero sea 1/20. Tras 1 hora de incubación a $37^\circ C$ se centrifuga a 500 g y se lee la absorbancia del sobrenadante a 414 nm.

El 100 % de lisis se obtiene adicionando H_2O en vez de suero a la suspensión de eritrocitos. Los controles de lisis inespecífica se obtienen incubando el suero con eritrocitos sin $F(ab')_2$ o con $F(ab')_2$ anti-albúmina ($F(ab')_2$ -aA).

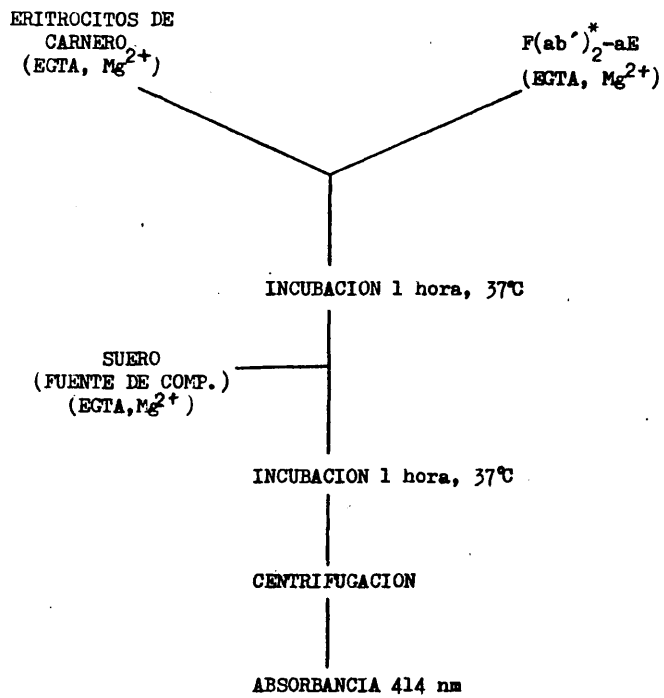
La figura número 12 muestra un esquema del procedimiento utilizado.

La actividad hemolítica relativa de los fragmentos modificados con respecto al control se calcula según la siguiente expresión:

% Actividad hemolítica relativa =

$$= \frac{\mu g \text{ de } F(ab')_2 \text{ nativo necesarios para producir el } 50 \% \text{ de lisis}}{\mu g \text{ de } F(ab')_2 \text{ modificado necesarios para producir el } 50 \% \text{ de lisis}} \times$$

$$\times \frac{\text{Actividad anticuerpo del } F(ab')_2 \text{ nativo}}{\text{Actividad anticuerpo del } F(ab')_2 \text{ modificado}} \times 100$$



* F(ab')₂ nativo o modificado.

Figura n° 12.- Ensayo hemolítico por la vía alternativa del complemento.

3.13.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD CITOFILICA .-

3.13.1.- Obtención de Neutrófilos de conejo .-

Se obtienen neutrófilos peritoneales de conejo siguiendo la metodología descrita por Cohn y Morse (147).

A conejos de la raza New Zealand se les inyecta intraperitonealmente 200 ml de una solución de glúcogeno al 0.1 % en solución salina. Transcurridos 7 días se repite la inyección en la cavidad peritoneal y, cuatro horas después de esta segunda inyección, se inyectan intraperitonealmente 100 ml de solución salina con heparina (5 unidades por ml). A continuación se extrae líquido peritoneal mediante punción con una aguja, se centrifuga a 400 g durante 5 minutos y el sedimento celular se lava un par de veces con solución salina. Tras el segundo lavado, las células se resuspenden en una solución de NH_4Cl al 0.83 %, se dejan 5 minutos a 37°C ., con lo cual se lisan los eritrocitos, y se centrifuga a 400 g durante 5 minutos. Las células se resuspenden en solución salina y se lavan tres veces en este medio en el que quedan finalmente resuspendidas.

De la suspensión celular se toman 10 μl y se añaden sobre 90 μl de una disolución de azul de toluidina al 0.1 % en solución salina. Las células se cuentan en este medio a la vez que se comprueba el % de células que no son neutrófilos. Finalmente, las células se dejan a una concentración de 4×10^6 células/ml en solución salina.

3.13.2.- Formación de rosetas .-

A una suspensión de eritrocitos de carnero se le añaden cantidades decrecientes de anticuerpo con actividad anti-eritrocito de modo que la concentración final sea 0.5 % en eritrocitos contenidos en un volumen de 1 ml

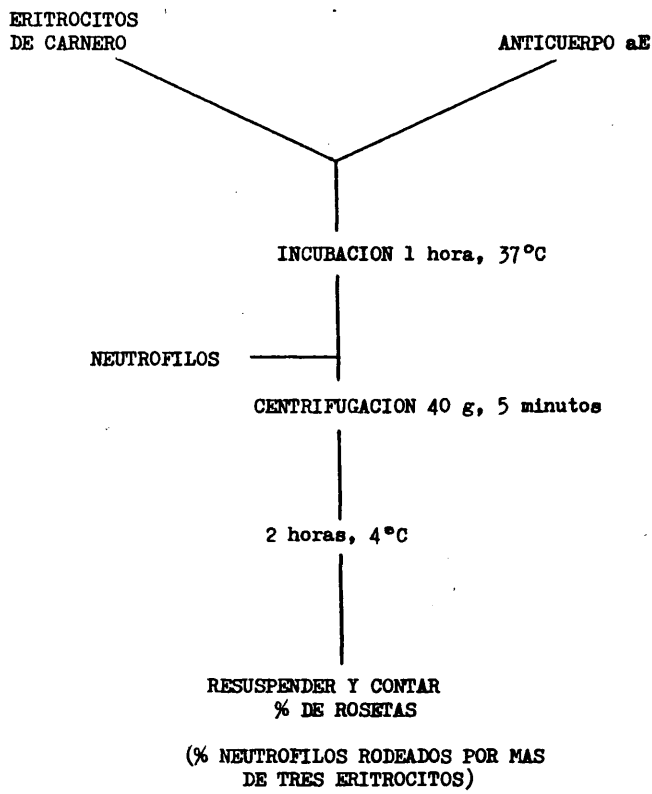


Figura n° 13.- Ensayo de formación de rosetas.

de solución salina que contiene ovoalbúmina al 0.2 %. Se incuban 1 hora a 37 °C y 200 µl de cada una de estas suspensiones se adicionan sobre distintos tubos que contienen 200 µl de la suspensión de neutrófilos (4×10^6 células/ml).

La suspensión de neutrófilos con eritrocitos activados con inmunoglobulina se centrifuga a 40 g durante 5 minutos y se lleva a 4°C durante 2 horas. Pasado este tiempo se resuspende cuidadosamente el sedimento celular y se ve el porcentaje de células rodeadas por más de tres eritrocitos (solo en este caso se consideran positivas las rosetas).

La figura número 13 muestra un esquema del procedimiento seguido.

3.13.3.- Inhibición de rosetas .-

A partir de los datos del apartado anterior se puede conocer la cantidad de IgG-aE con que es necesario sensibilizar los eritrocitos para obtener el 50 % de rosetas. Se toman 200 µl de eritrocitos sensibilizados con esta cantidad de IgG y se adicionan sobre 200 µl de neutrófilos a los que previamente se han adicionado cantidades decrecientes de IgG, control o modificada, o sus respectivos fragmentos (Fab, $F(ab')_2$ y pFc') con actividad anti-albúmina humana. Se centrifuga a 40 g y se mantiene a 4°C durante 2 horas. El tanto por ciento de inhibición de las distintas moléculas se calcula con respecto a un control en el que se ha adicionado $F(ab')_2$ -aA a la suspensión de neutrófilos. El tanto por ciento de inhibición se obtiene según la siguiente expresión:

$$\begin{aligned} & \% \text{ de inhibición} = \\ & = 100 - \left(\frac{\% \text{ de rosetas en presencia de la proteína correspondiente}}{\% \text{ de rosetas en presencia de } F(ab')_2\text{-aA}} \times 100 \right) \end{aligned}$$

64

RESULTADOS

4.1.- OBTENCION DEL SUERO DE CONEJO .-

La inmunolectroforesis del suero de conejo, revelado frente a un antisuero anti-proteínas séricas totales de conejo, se muestra en la figura número 14.

4.2.- OBTENCION DE LA IgG DE CONEJO .-

Como consecuencia de la cromatografía de intercambio iónico se obtiene un único pico de absorción a 280 nm (figura nº 16). Del pico, bastante extendido en su parte posterior, se reúnen las fracciones con absorban—
cia superior a 0.3. La solución resultante se concentra y se procede a some—
terla a los ensayos de pureza correspondientes.

4.2.1.- Criterios de pureza .-

4.2.1.1.- Inmunodifusión doble bidimensional .-

La preparación de IgG se enfrenta tanto a un antisuero anti-prote—
ínas séricas totales de conejo como a un antisuero anti- γ -globulinas de co—
nejo. Por este criterio se consideran puras las preparaciones que dan una
única banda de precipitación (figura nº 15).

4.2.1.2.- Inmunolectroforesis .-

Por este criterio se consideran puras aquellas preparaciones en
que sólo se aprecia un único arco de precipitación (figura nº 14).

4.2.1.3.- Filtración en gel .-

Por este criterio se consideran puras las preparaciones de IgG que
en el eluido dan un solo pico de absorción a 280 nm. El volumen de elución

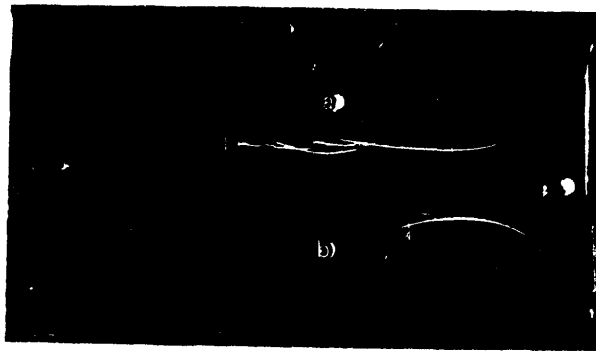


Figura nº 14.- Inmunoelectroforesis frente a un antisuero antiproteínas séricas de conejo de a) suero de conejo y b) preparación de IgG.

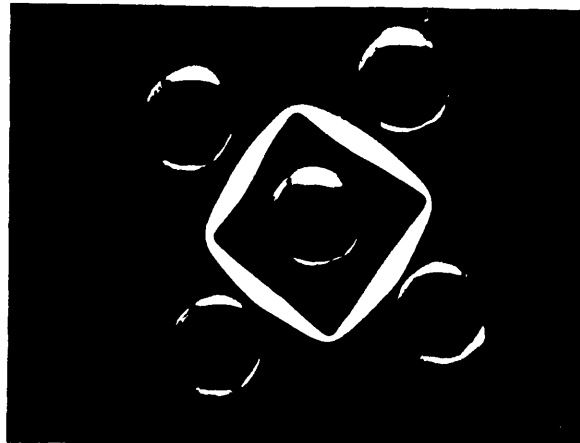


Figura nº 15.- Inmunodifusión de 4 preparaciones de IgG frente a un antisuero antiproteínas séricas de conejo. El pocillo central contiene el antisuero y los externos contienen distintas preparaciones de IgG.

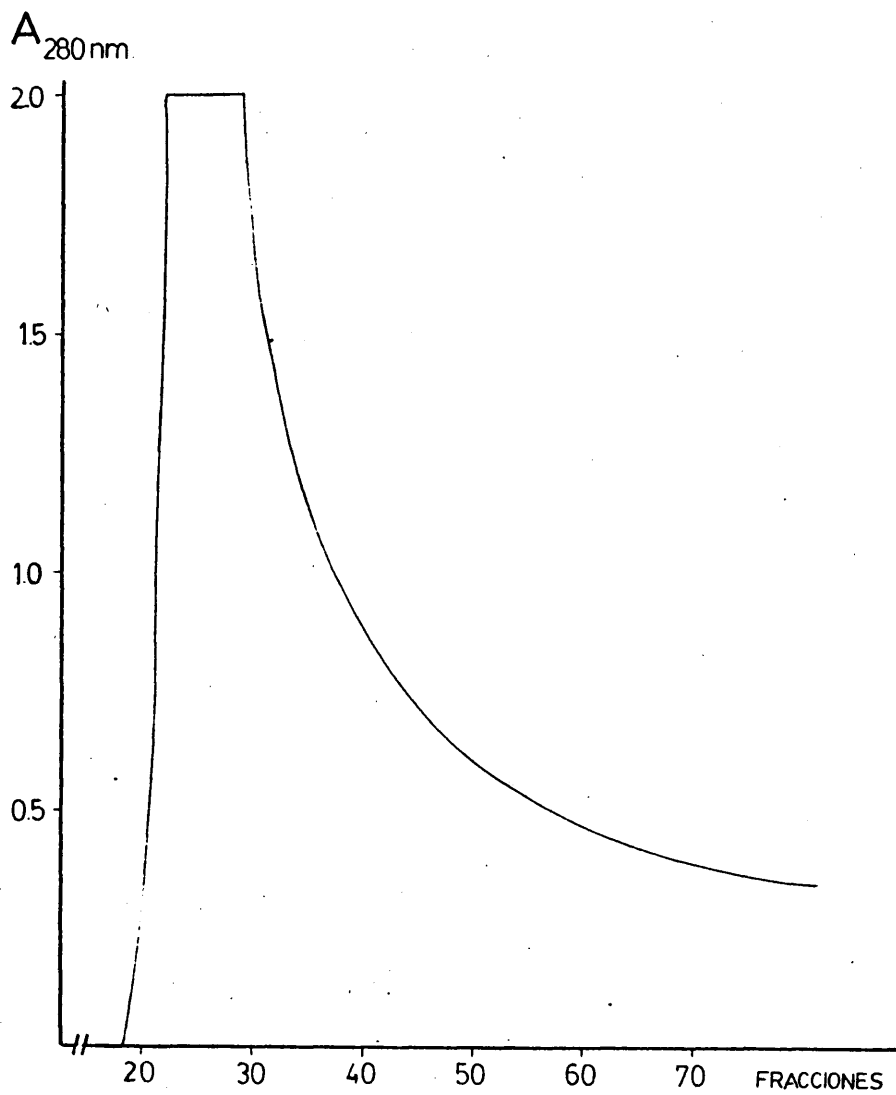


Figura nº 16.- Eluido de la cromatografía de la fracción sérica insoluble en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.33 M a través de una resina de celulosa DEAE-11.

(Ve) de este pico se corresponde con una especie molecular de 150000 Dalton (figuras 17 y 18)

4.2.1.4.- Electroforesis en gel de poliacrilamida .-

Dada la heterogeneidad molecular de la IgG de conejo no se observa una banda nítida por electroforesis, sino algo difusa (figura nº 19). Por este criterio se considera puras aquellas preparaciones en que sólo se aprecia esta banda difusa.

Superados todos estos criterios de pureza se procede a la obtención de los diversos fragmentos o al análisis funcional correspondiente.

4.3.- OBTENCION DEL FRAGMENTO Facb .-

La inmunodifusión del digerido plasmínico de la IgG se muestra en la figura nº 20. Puede apreciarse la presencia de dos especies moleculares distintas, una que da identidad parcial con la IgG de partida y otra, más alejada del pocillo central del antisuero, que da identidad total con el espaldón de la IgG. La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (figura nº 21) muestra una banda a un peso molecular ligeramente inferior al de la IgG y otra que migra con el frente (PM \approx 25000 Dalton).

El perfil de elución de este digerido a través de una columna de Aca 44, equilibrada con urea 6 M, se muestra en la figura nº 23). El primer pico del eluido se dializa frente a solución salina y se concentra. La electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS y agentes reductores (figura nº 22) muestra la presencia de IgG no digerida contaminando el fragmento Facb contenido en este pico.

Dado que el fragmento Facb carece de la región correspondiente al

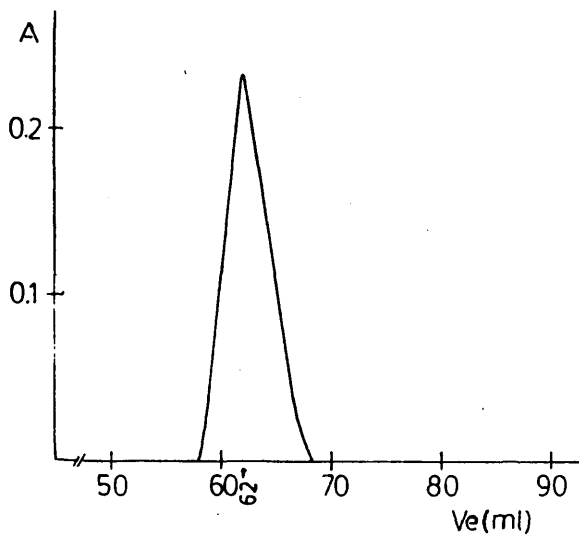


Figura n° 17.- Eluido de la preparación de IgG a través de Sephadex G-200.

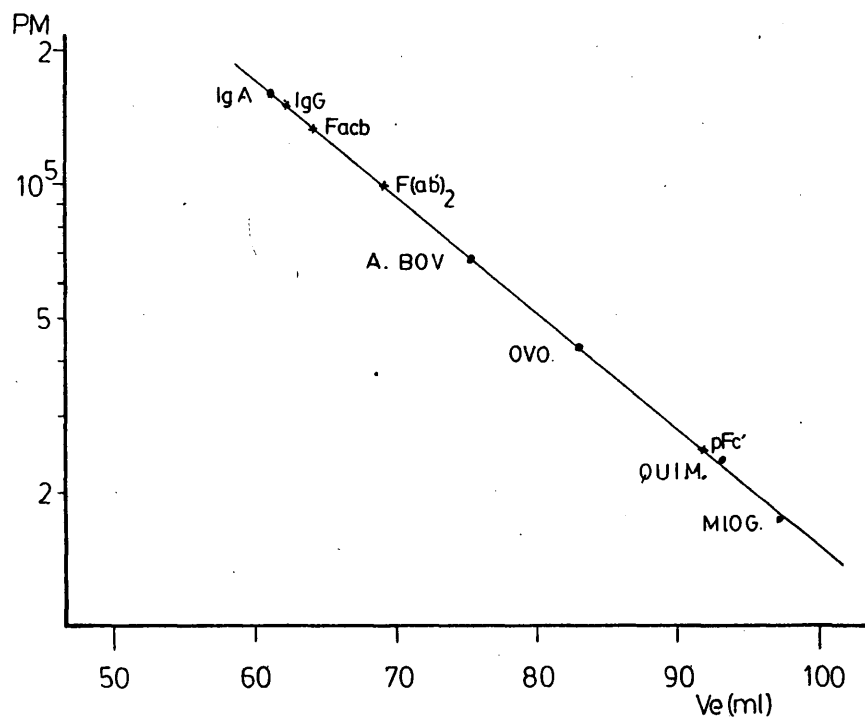


Figura n° 18.- Representación de los volúmenes de elución (Ve) de las proteínas patrones y de la IgG y sus correspondientes fragmentos frente al logaritmo de sus pesos moleculares.



Figura nº 19.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5 % de la preparación de IgG.

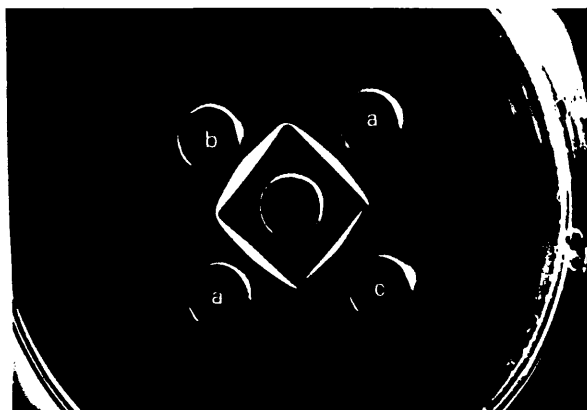


Figura nº 20.- Inmunodifusión del digerido plasmínico de IgG frente a un antisuero anti- γ -globulinas. Los pocillos contienen a) IgG, b) control del digerido plasmínico (IgG+ ácido+ urea) y c) digerido plasmínico de IgG.

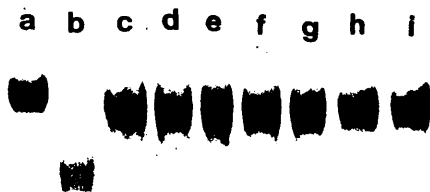


Figura n° 21.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5 % en presencia de SDS de a) IgG, b) $F(ab')_2$, y c-i) IgG digerida con plasmina durante 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 24 horas.

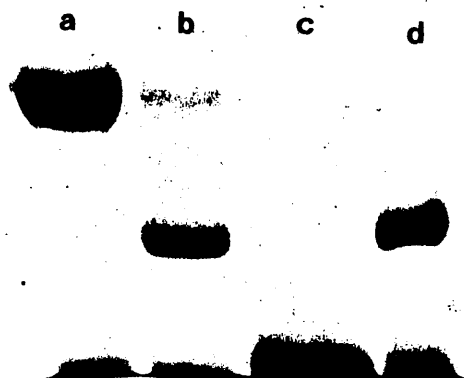


Figura n° 22.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5 % en presencia de SDS y agentes reductores de a) IgG, b) primer pico de la cromatografía en presencia de urea del digerido plasmínico, c) $F(ab')_2$ y d) primer pico de la cromatografía del digerido plasmínico tras su paso por un inmuoadsorbente anti-pFc.

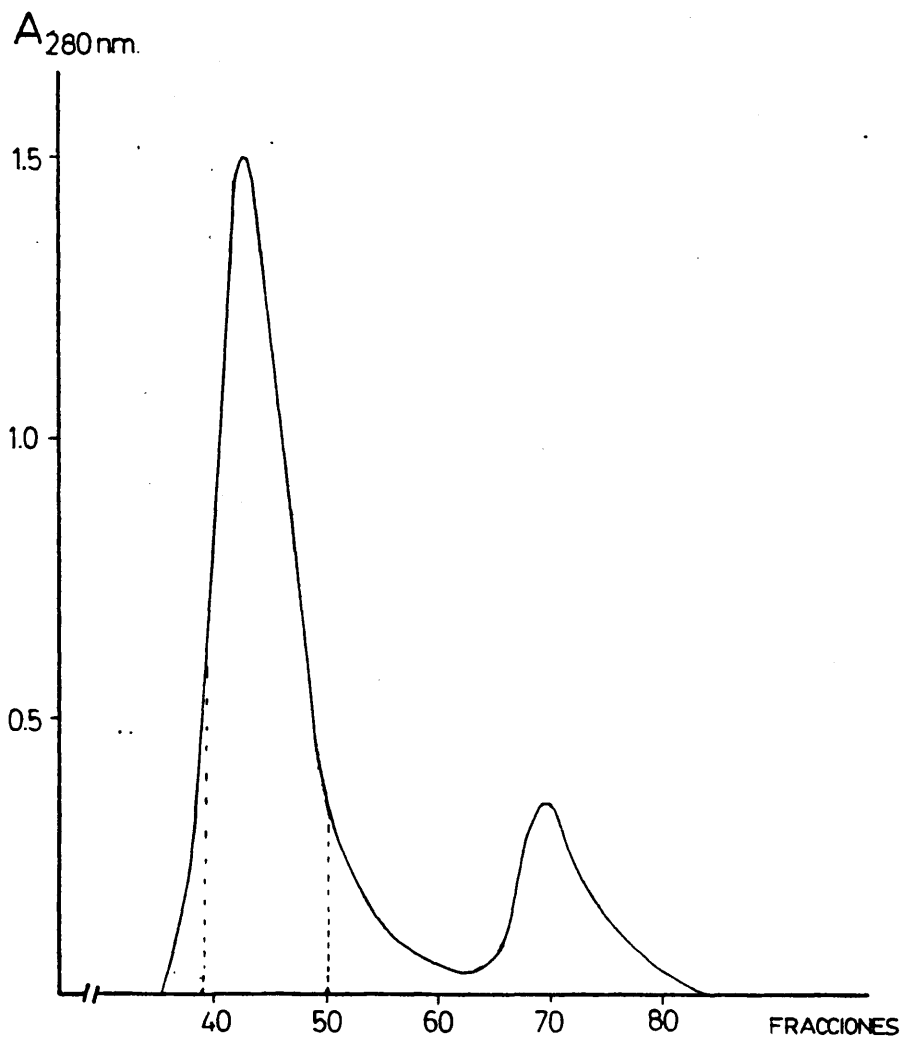


Figura nº 23.- Perfil de elución del digerido plasminico de IgG a través de Ultragel Aca 44 en condiciones desnaturalizantes.

pFc' de la IgG, la preparación correspondiente al primer pico del eluido se cromatógrafa a través de un inmunoabsorbente anti-pFc' a fin de eliminar la IgG no digerida. La parte no retenida es el Facb que se somete a los correspondientes criterios de pureza.

4.3.1.- Criterios de pureza .-

4.3.1.1.- Inmunodifusión doble bidimensional .-

La inmunodifusión de la preparación de Facb frente a un antisuero anti- γ -globulinas se muestra en la figura nº 24. La identidad parcial del $F(ab')_2$ con el Facb, y de éste con la IgG está de acuerdo con las características estructurales del fragmento.

4.3.1.2.- Inmunolectroforesis .-

Las preparaciones de Facb muestran una única banda de precipitación frente a un antisuero anti- γ -globulinas. El fragmento muestra una movilidad más anódica que la IgG de partida (figura nº 25).

4.3.1.3.- Filtración en gel .-

El perfil de elución de la preparación de Facb a través de Sephadex G-200 se muestra en la figura nº 26. El volumen de elución del pico se corresponde con el de una especie molecular de 133000 Dalton (figura nº 18)

4.3.1.4.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS .-

La electroforesis de la preparación de Facb en presencia de SDS y agentes reductores muestra la ausencia de cadena pesada así como la presencia de una especie molecular a un peso molecular intermedio entre cadena pe

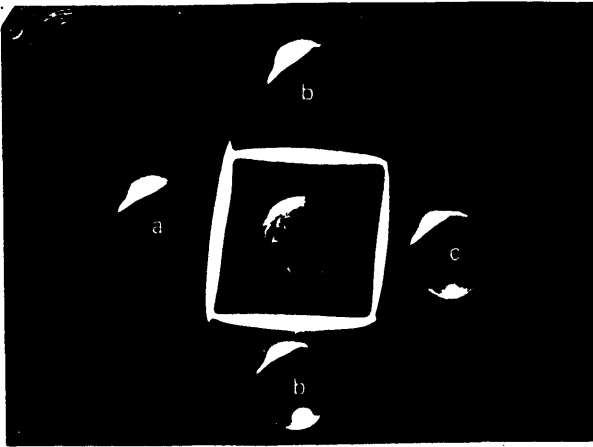


Figura n° 24.- Inmunodifusión frente a un antisuero anti- γ -globulinas de
a) IgG, b) Facb y c) $F(ab')_2$.

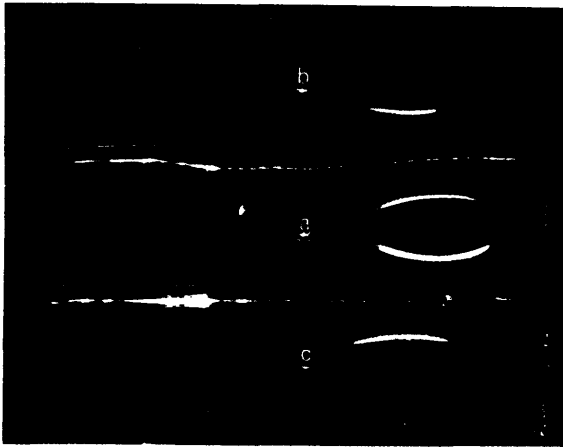


Figura n° 25.- Inmunolectroforesis frente a un antisuero anti- γ -globulinas
de a) IgG, b) Facb y c) $F(ab')_2$.

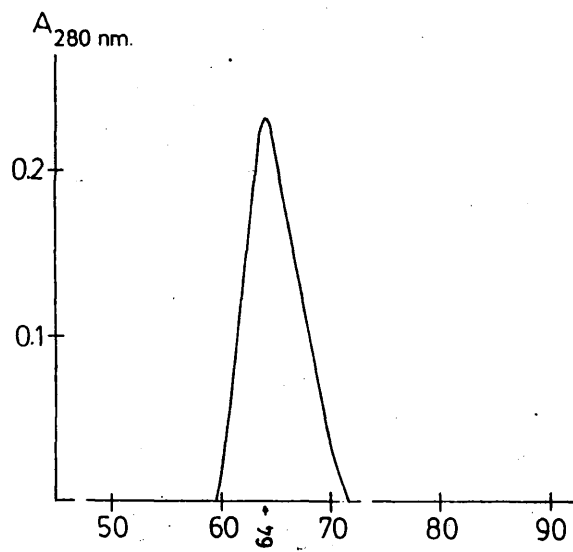


Figura nº 26.- Perfil de elución de la preparación de Facb a través de Sephadex G-200.

sada y ligera que corresponde a la porción de cadena pesada del Facb (figura nº 22).

4.4.- OBTENCION DEL FRAGMENTO $F(ab')_2$.-

El perfil de elución del digerido pepsínico de la IgG a través de Ultrogel Aca 44 se muestra en la figura nº 27. El primer pico es $F(ab')_2$ que se concentra y se comprueba su pureza.

4.4.1.- Criterios de pureza .-

4.4.1.1.- Inmunodifusión doble bidimensional.-

La fig. nº 28 muestra el comportamiento del $F(ab')_2$. Se observa una única banda de precipitación que da identidad parcial con IgG y no identidad con una preparación de pFc'. La figura nº 24 muestra la identidad parcial de $F(ab')_2$ con Facb.

4.4.1.2.- Inmunolectroforesis .-

La preparación de $F(ab')_2$ da una única banda de precipitación como puede observarse en la figura nº 25.

4.4.1.3.- Filtración en gel .-

La preparación de $F(ab')_2$ da un único pico por filtración en gel (figura nº 29) a un volumen de elución que se corresponde con un peso molecular de 98000 Dalton (figura nº 18).

4.4.1.4.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS .-

La figura nº 30 muestra la única banda que exhiben las prepara-

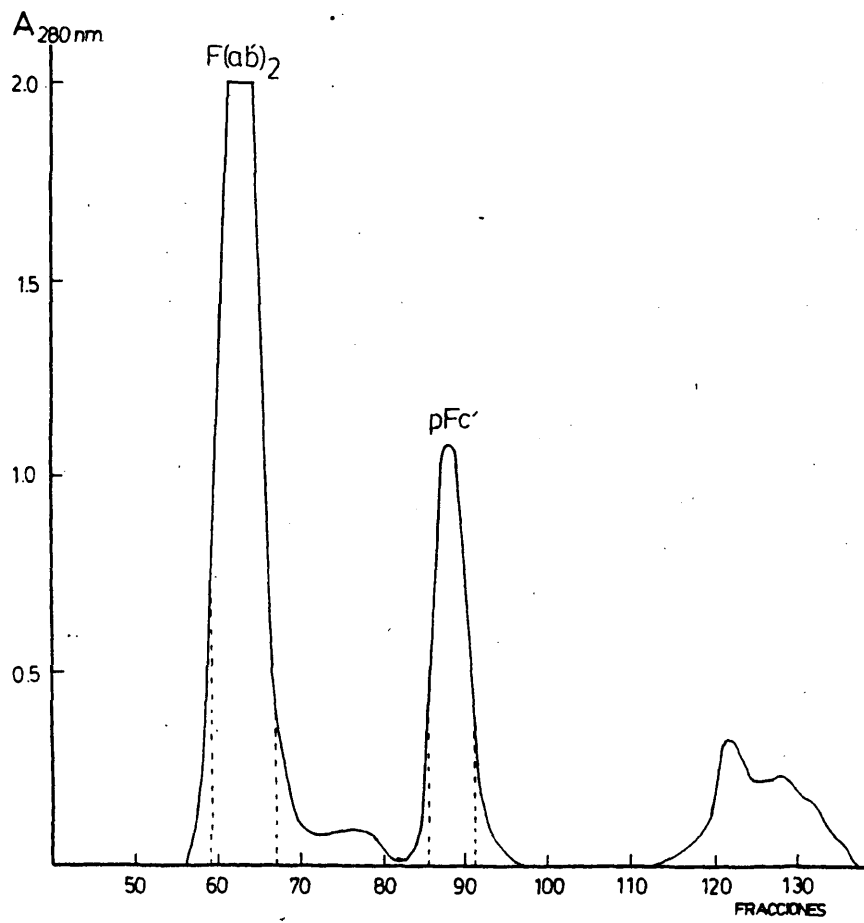


Figura n° 27.- Perfil de elución del digerido pepsínico de IgG a través de Ultrogel .AcA 44.

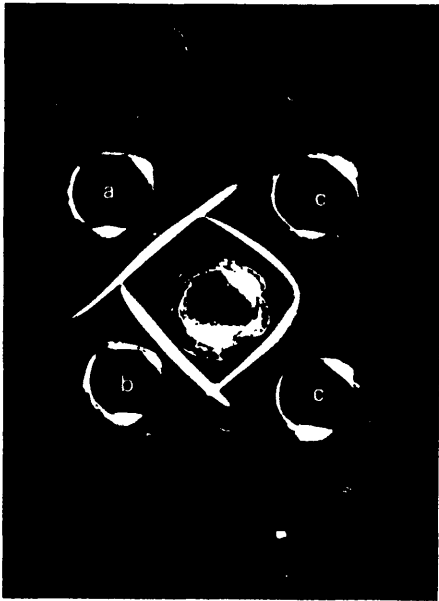


Figura n° 28.- Inmunodifusión frente a un antisuero anti- γ -globulinas de
a) IgG, b) $F(ab')_2$ y c) pFc.

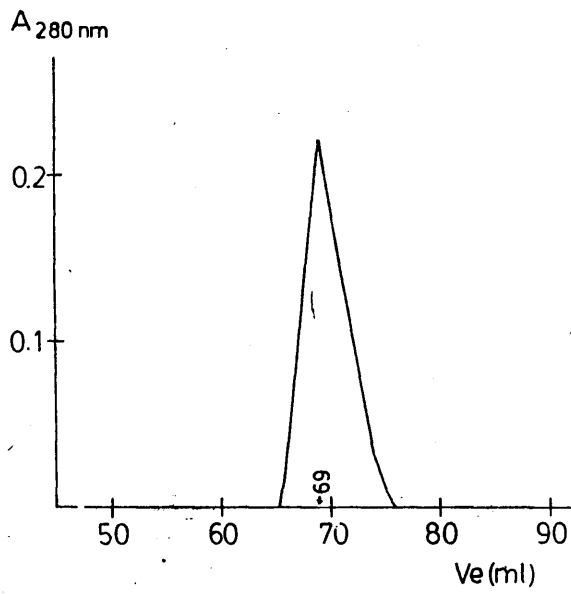


Figura n° 29.- Perfil de elución de la preparación de $F(ab')_2$ a través de Sephadex G-200.

ciones de $F(ab')_2$ por esta técnica.

4.5.- OBTENCION DEL FRAGMENTO pFc' .-

De la cromatografía de la digestión pepsínica de la IgG en Ultragel ACA 44 se reúnen y concentran las fracciones correspondientes al segundo pico del eluido (figura nº 27). Este pico, que corresponde a pFc' , se somete a los distintos criterios de pureza.

4.5.1.- Criterios de pureza .-

4.5.1.1.- Inmunodifusión doble bidimensional .-

La preparación de pFc' muestra una única banda de precipitación que da identidad parcial con IgG y no identidad con $F(ab')_2$ (figura nº 28).

4.5.1.2.- Inmunolectroforesis .-

Aparece un único arco de precipitación de movilidad más anódica que la IgG (figura nº 31).

4.5.1.3.- Filtración en gel .-

La figura nº 32 muestra el perfil de elución de la preparación de pFc' . El volumen de elución corresponde a una especie molecular de 25000 Dalton (figura nº 18).

4.5.1.4.- Electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS .-

Aparece una única banda a un peso molecular de 11500 Dalton (figura nº 33) en geles al 15 %.

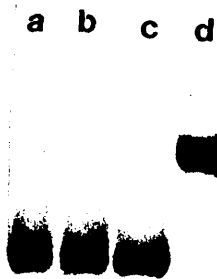


Figura n° 30.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5 % en presencia de SDS de a, b, c) tres preparaciones de $F(ab')_2$ y d) IgG.

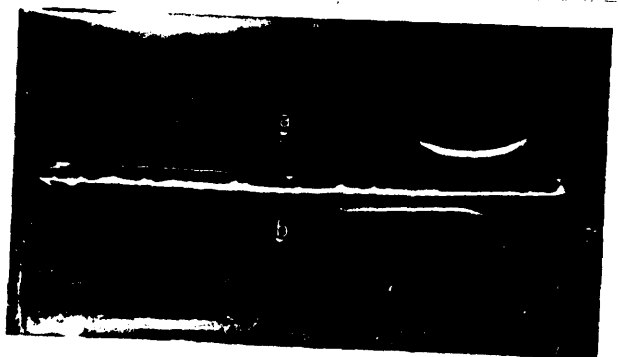


Figura n° 31.- Inmunoelectroforesis frente a un antisuero anti- γ -globulinas de a) IgG y b) pFc'.

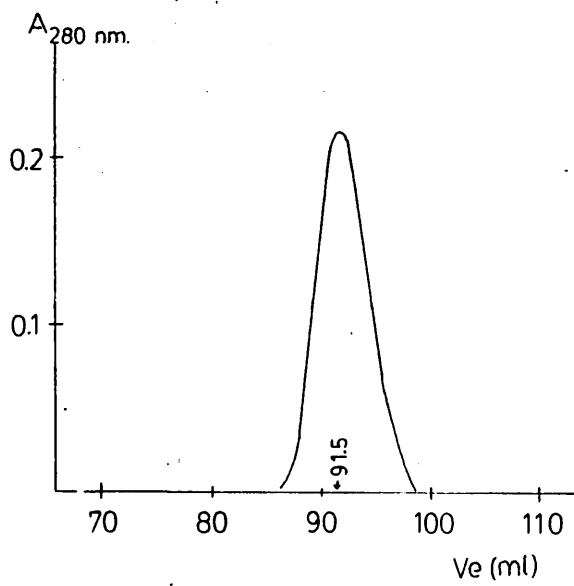


Figura n° 32.- Perfil de elución de la preparación de pFc'a través de Sephadex G-200.

a b



Figura n° 33.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15 % en presencia de SDS y agentes reductores de a) Ovoalbúmina, (45000 Dalton), cadena ligera (25000 Dalton), citocromo C (11500 Dalton) e insulina (55000 Dalton), y b) pFc'.

a b c d



Figura n° 34.- Electroforesis en gel de poliacrilamida al 7.5 % en presencia de SDS de a y d) IgG reducida, b y c) IgG.



4.6.- OBTENCION DE LA IgG REDUCIDA .-

La reducción y alquilación de la IgG escinde los puentes disulfuro intercatenarios de la molécula como muestra la electroforesis en gel de poli-acrilamida en presencia de SDS (figura nº 34). No se aprecia la presencia de IgG no reducida y las únicas especies moleculares observables corresponden a cadena pesada y ligera.

4.7.- MODIFICACION DE GRUPOS CARBOXILO .-

4.7.1.- Modificación de grupos carboxilo de la IgG .-

La tabla nº 4 recoge los tanto por ciento molares de los distintos aminoácidos con respecto al tiempo de hidrólisis de la IgG. Para el cálculo final de los % molares de los aminoácidos (columna de la derecha) se han considerado los valores de Leu y Val que se obtienen al máximo tiempo de hidrólisis y los valores de Ser y Thr que se obtienen por extrapolación a tiempo cero. También se consideran el % de Trp que se obtiene por el método de Beaven y Holiday y el % de Cys que se obtiene a partir del número de puentes disulfuro de la molécula.

La tabla nº 5 muestra el % de glicocola a distintos tiempos de modificación (el número de moles en que se incrementa la Gly se corresponde con el número de moles de grupos carboxilo que se han modificado) así como el % de los aminoácidos que son susceptibles de sufrir reacciones secundarias. El que no se observe variación en el % de estos aminoácidos (His y Tyr) indica que no se han producido reacciones secundarias importantes por el procedimiento empleado.

Tomando como 1320 el número de residuos de la IgG, se obtiene el número de grupos carboxilo que se modifican en la molécula a los distintos

TIEMPO DE HIDROLISIS (HORAS)						
AMINOACIDO	24	48	72	96	X'	X
Asx	12.4	12.4	12.5	12.4	12.4	7.1
Glx	15.1	14.7	15.0	15.3	15.0	8.6
Pro	8.1	8.0	7.8	7.8	8.1	4.6
Gly	13.4	13.3	12.8	13.3	13.2	7.5
Ala	9.8	10.1	10.1	10.2	10.0	5.7
Met	1.7	1.6	1.8	1.9	1.8	1.0
Leu	10.9	10.8	10.5	10.3	10.6	6.1
Tyr	6.8	6.8	6.8	6.7	6.8	3.9
Phe	5.2	5.4	5.1	5.3	5.2	3.0
Lys	8.6	8.8	8.9	8.9	8.8	5.0
His	2.5	2.7	2.3	2.4	2.5	1.4
Arg	5.5	5.4	5.9	5.5	5.6	3.2
Thr*	18.3	16.0	12.4	10.2	21.2	12.1
Ser*	16.9	12.0	9.4	5.2	20.4	11.7
Val				20.0	20.0	11.5
Ile**				7.0	7.0	4.0
Cys***						2.5
Trp					2.0	1.1

* Obtenidos por extrapolación a tiempo de hidrólisis cero.

** Obtenido a partir del número de puentes disulfuro de la molécula.

*** Obtenido por el método de Beaven y Holiday.

X' - Media de los valores del % molar de los aminoácidos invariantes y la de los variantes referida a los invariantes.

X - % molar de los aminoácidos de la molécula de IgG.

Tabla nº 4.- Análisis de aminoácidos de la IgG de conejo.

AMINOACIDO	TIEMPO DE MODIFICACION (MINUTOS)				
	Control	5	10	20	30
His	1.4	1.5	1.5	1.3	1.4
Tyr	3.9	3.7	3.7	3.8	3.8
Gly	7.5	10.2	11.0	11.7	12.0
Δ Gly	—	2.7	3.5	4.2	4.5

Tabla n° 5.- Contenido en % molar de histidina, tirosina y glicocola de la IgG control y modificada en sus grupos carboxilo a distintos tiempos.

AMINOACIDO	TIEMPO DE MODIFICACION (MINUTOS)				
	Control	5	10	20	30
His	0.9	1.0	1.0	0.9	1.0
Tyr	4.0	4.2	4.1	4.0	4.1
Gly	8.0	10.1	10.7	11.4	11.8
Δ Gly	—	2.1	2.7	3.4	3.8

Tabla n° 6.- Contenido en % molar de histidina, tirosina y glicocola del F(ab')₂ control y modificado en sus grupos carboxilo a distintos tiempos.

tiempos de modificación (tabla nº 7).

4.7.2.- Modificación de grupos carboxilo del F(ab')₂.-

La tabla nº 6 muestra la variación de los % de Gly, His y Tyr con respecto al tiempo de modificación. Asignando 890 residuos a la molécula de F(ab')₂ se obtiene el número de grupos carboxilo por molécula (tabla nº 7). Al no observarse variaciones en los % de His y Tyr a los distintos tiempos de modificación se descarta la existencia de reacciones secundarias en magnitud apreciable.

4.8.- MODIFICACION DE GRUPOS AMINO .-

4.8.1.- Modificación de grupos amino de la IgG .-

La tabla nº 8 muestra el % de los grupos amino accesibles al TNBS a los distintos tiempos de modificación. Tomando como 100 el control, se llega a sólo un 9 % de grupos accesibles al máximo tiempo de modificación. A partir de estos datos se deduce el número de grupos amino modificados por reacción con el KCNO que figura en la tabla nº 10. Un máximo de 46 grupos modificados por molécula se obtiene a las 72 horas de modificación.

4.8.2.- Modificación de grupos amino del F(ab')₂.-

El % de grupos amino accesibles al TNBS a los distintos tiempos de modificación se muestra en la tabla nº 9. Un máximo de 27 grupos amino se modifican a las 72 horas de reacción con el KCNO (tabla nº 10).

4.9.- MODIFICACION QUIMICA DE RESTOS TRIPTOFANO DEL F(ab')₂ .-

El número de restos modificados aparece en la tabla nº 11. Un máxi

<u>TIEMPO DE MODIFICACION (MINUTOS)</u>	<u>IgG</u>	<u>F(ab')₂</u>
5	35.6	18.7
10	46.2	24.0
20	55.4	30.2
30	59.4	33.8

Tabla n° 7.- Número de grupos carboxilo modificados por molécula de IgG y de F(ab')₂.

<u>TIEMPO DE MODIFICACION (HORAS)</u>	<u>A*_{414 nm}</u>	<u>% DE GRUPOS AMINO ACCESIBLES AL TNBS</u>
0	1.41 (±0.03)	100
12	0.54 (±0.05)	38
24	0.34 (±0.02)	24
48	0.16 (±0.02)	11
72	0.13 (±0.01)	9

* Valores medios correspondientes a tres determinaciones para una concentración de IgG de 0.22 mg/ml.

Tabla nº 8.- Valoración del número de grupos amino de la IgG accesibles al TNBS tras la modificación con cianato potásico.

<u>TIEMPO DE MODIFICACION (HORAS)</u>	<u>A*_{414 nm}</u>	<u>% DE GRUPOS AMINO ACCESIBLES AL TNBS</u>
0	1.22 (±0.02)	100
12	0.46 (±0.02)	38
24	0.29 (±0.01)	24
48	0.12 (±0.01)	10
72	0.08 (±0.01)	7

* Valores medios correspondientes a tres determinaciones para una concentración de F(ab')₂ de 0.22 mg/ml.

Tabla nº 9.- Valoración del número de grupos amino del F(ab')₂ accesibles al TNBS tras la modificación con cianato potásico.

<u>TIEMPO DE MODIFICACION (HORAS)</u>	<u>IgG</u>	<u>F(ab')₂</u>
12	31	18
24	38	22
48	45	26
72	46	27

Tabla n° 10.- Número de grupos amino modificados por molécula de IgG y F(ab')₂ mediante el tratamiento con cianato potásico.

<u>CONCENTRACION DE NBB</u> (<u>MOL. NBB/MOL. F(ab')₂</u>)	<u>A_{410 nm}[*]</u>	<u>NUMERO DE GRUPOS</u> <u>MODIFICADOS POR MOLECULA</u>
100	0.06 (±0.006)	0.33
300	0.22 (±0.03)	1.1
600	0.30 (±0.02)	1.6

* Valores medios correspondientes a tres determinaciones para una concentración de F(ab')₂ de 1 mg/ml.

Tabla n° 11.- Número de restos Trp modificados por molécula de F(ab')₂ mediante el tratamiento con bromuro de 2-hidroxi-5-nitrobencilo

mo de 1.6 restos se modifican en las condiciones más extremas utilizadas.

4.10.- CONTROLES DE LAS MODIFICACIONES .-

4.10.1.- Espectro de dicroísmo circular .-

En la figura nº 35 se muestra el espectro de dicroísmo de la IgG reducida junto al de la IgG utilizada como control. No se observan cambios significativos como consecuencia de la reducción.

La figura nº 36 muestra los espectros de dicroísmo de la IgG y de las IgG modificadas en los restos carboxilo a distintos tiempos. En el UV lejano se observa la pérdida del hombro a 225 nm así como la del hombro que podía apreciarse a 232 nm apareciendo un pico de elipticidad negativa a 238 nm. En el UV próximo no se observan cambios como consecuencia de la modificación.

La figura nº 37 muestra los espectros de dicroísmo de las IgG modificadas en los grupos amino. No se muestran cambios importantes con respecto al control.

Respecto a las modificaciones inferidas en el $F(ab')_2$ ni la modificación de grupos carboxilo (figura nº 38), ni la de grupos amino (figura nº 39), ni la de grupos indol (figura nº 40) produce cambios significativos en los espectros de dicroísmo.

4.10.2.- Inmunodifusión doble bidimensional .-

En la figura nº 41 se muestra una inmunodifusión en la que se han enfrentado IgG e IgG reducida a un antisuero anti- γ -globulinas. No se obser

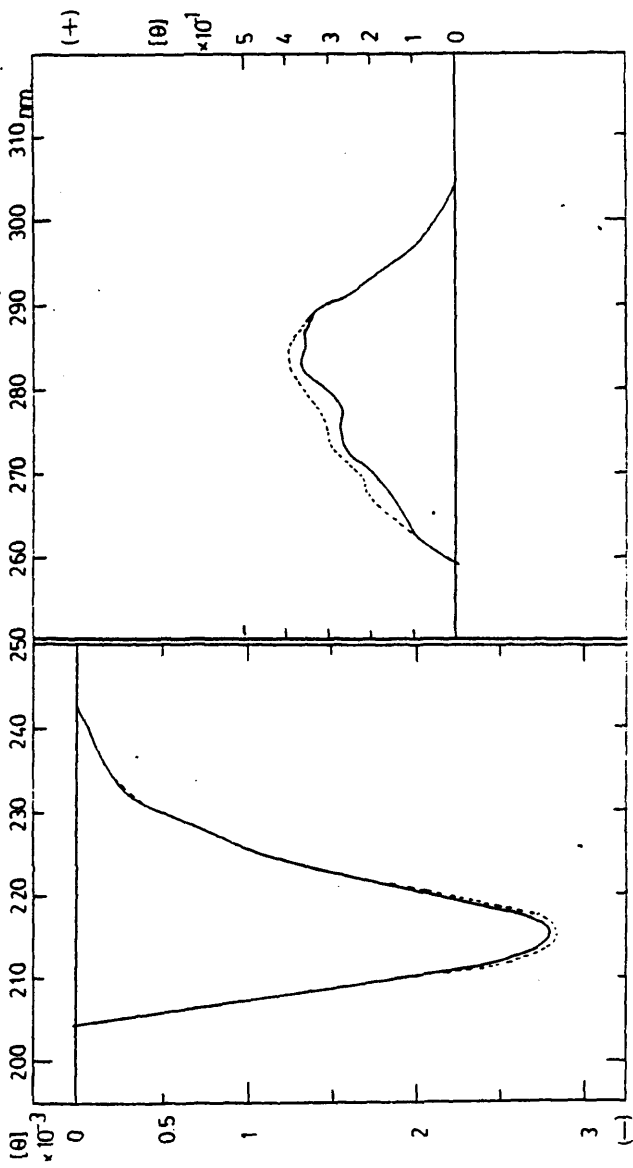


Figura nº 35.- Espectro de dicroísmo circular de IgG (—) e IgG reducida (----).

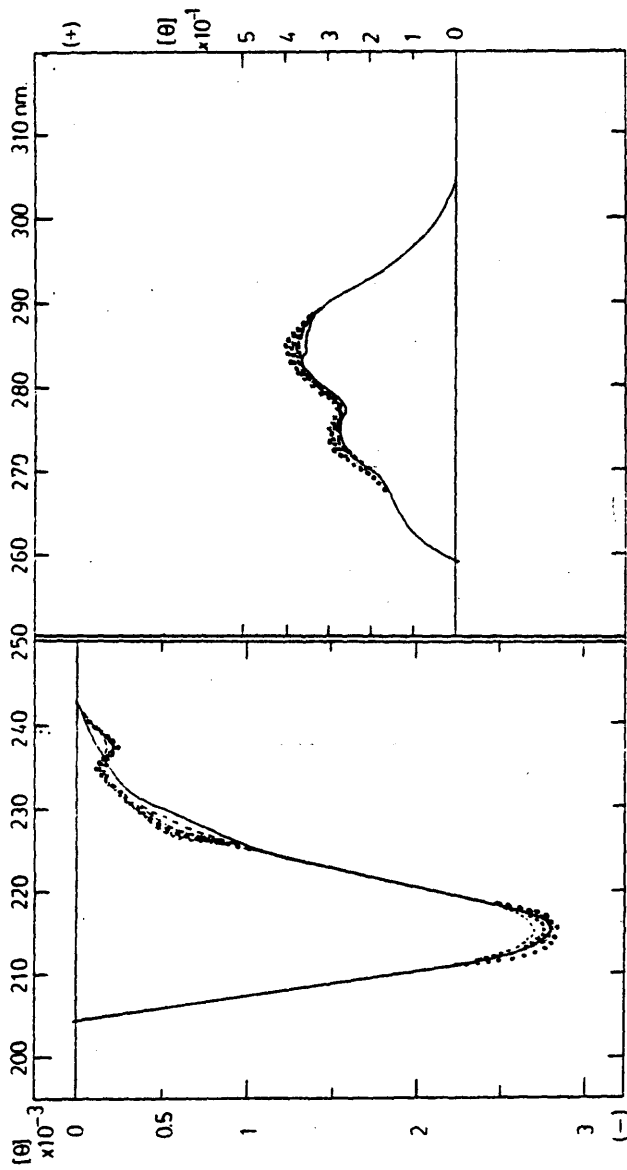


Figura no 36.- Espectro de dicroísmo circular de IgG (—) e IgG modificada en los grupos carboxilo a 5 (---), 10 (-.-.-), 20 (.....) y 30 (.....) minutos respectivamente.

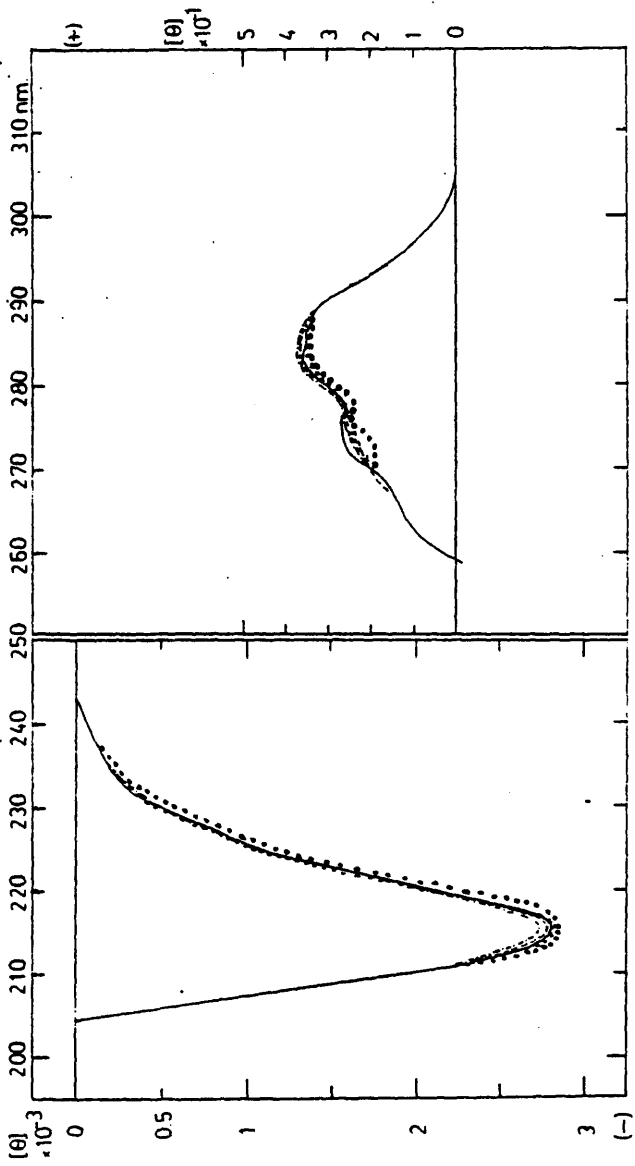


Figura nº 37.- Espectro de dicroísmo circular de IgG (—) e IgG modificada en los grupos amino a 12 (----), 24 (-·-·-), 48 (·-·-·) y 72 (·-·-·) horas respectivamente.

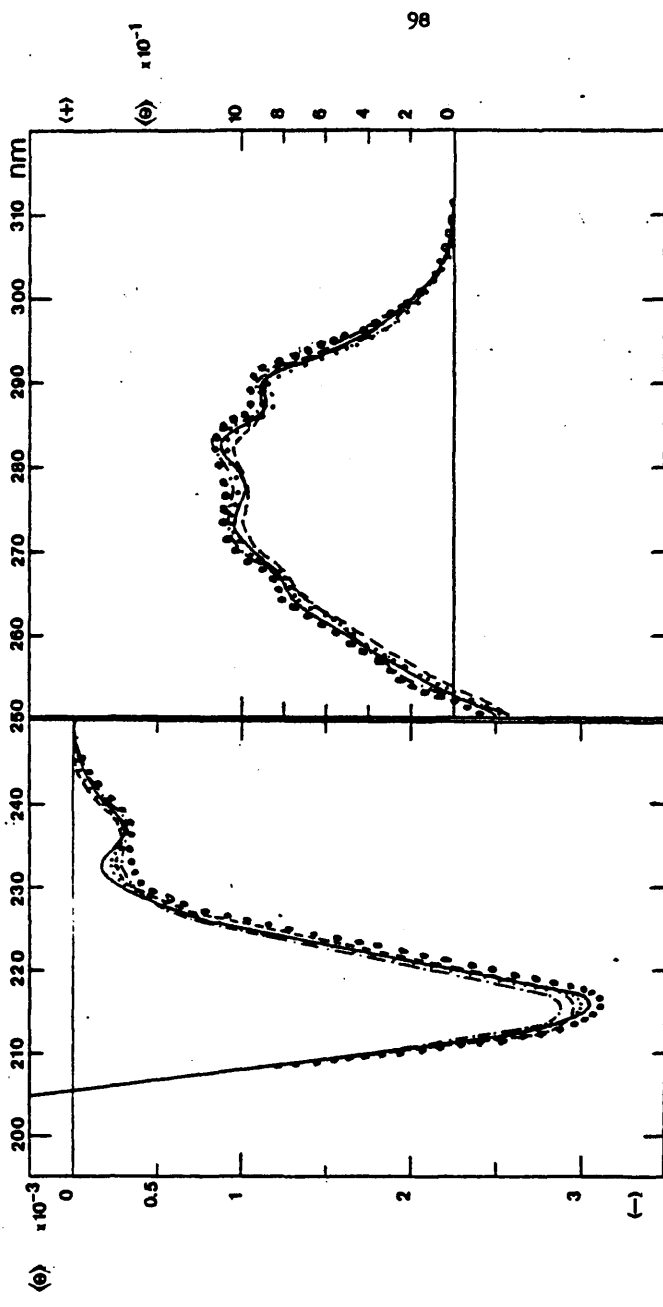


Figura nº 38.- Espectro de dicroísmo circular de $F(ab')_2$ (—) y $F(ab')_2$ modificado en los grupos carboxilo a 5 (.....), 10 (-----), 20 (-·-·-·-) y 30 (---) minutos respectivamente.

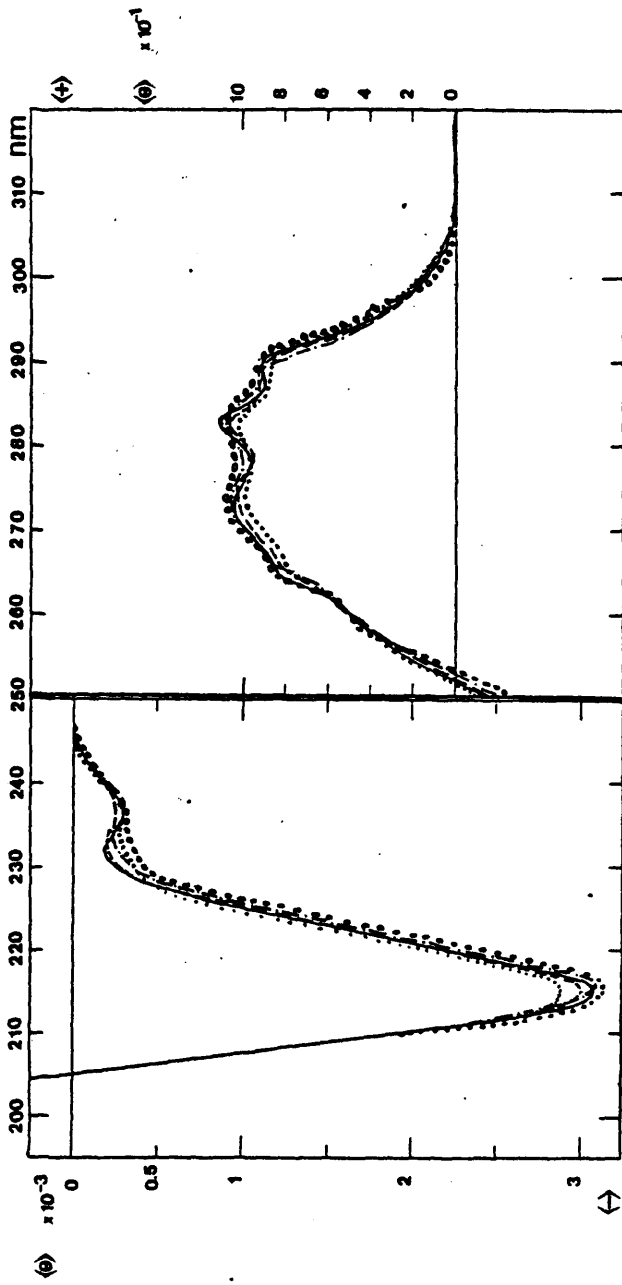


Figura nº 39.- Espectro de dicroísmo circular de $F(ab')_2$ (—) y $F(ab')_2$ modificado en los grupos amino a. 12 (.....), 24 (----), 48 (-·-·-) y 72 (.....) horas respectivamente.

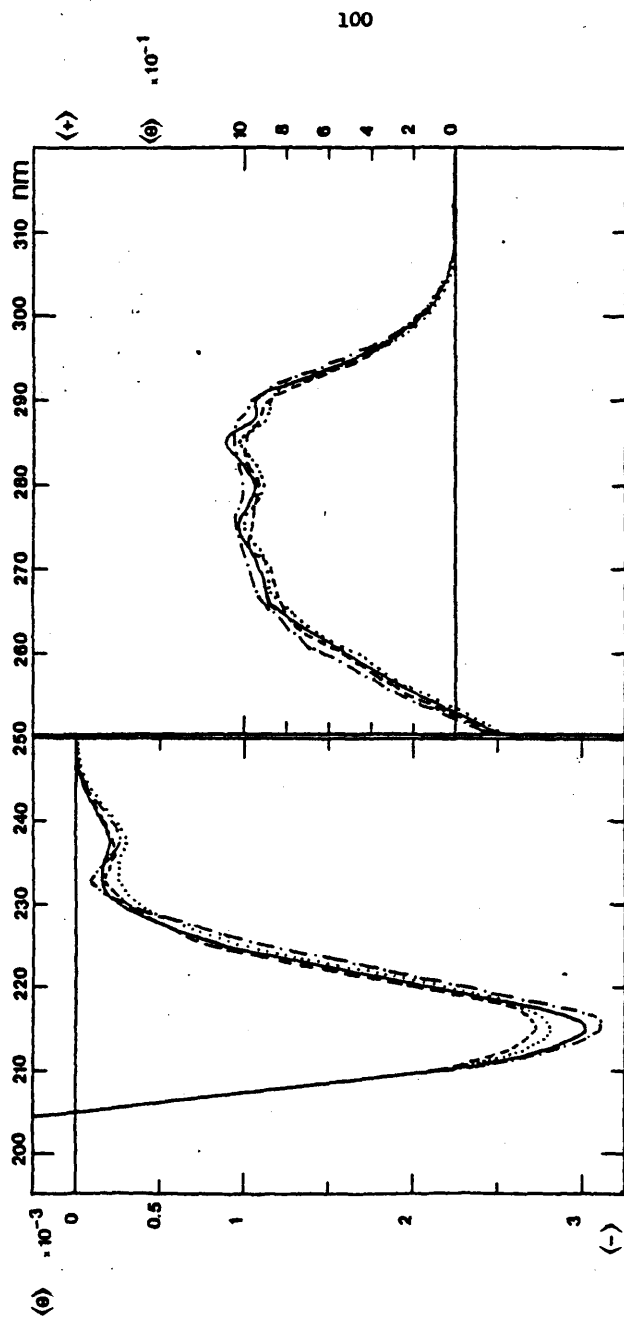


Figura nº 40.- Espectro de dicroísmo circular de $f(ab')_2$ (—) y $f(ab')_2$ modificado en los grupos indol a una concentración molar de NBB de 100 (.....), 300 (-----) y 600 (---) veces la concentración de proteína.

van cambios en el comportamiento antigénico como consecuencia de la modificación.

La figura nº 42 muestra la inmunodifusión de las IgG modificadas en los grupos carboxilo frente a un antisuero anti- γ -globulinas. Ya a cinco minutos se observa una pérdida de antigenicidad que se va acentuando conforme aumenta el tiempo de modificación. La pérdida de antigenicidad parece afectar ligeramente a los dominios C_H3 como puede observarse cuando el antisuero empleado en la inmunodifusión es anti-pFc' (figura nº 43)

En la modificación de los grupos amino de la IgG no se detectan cambios en el comportamiento antigénico hasta las 48 horas de modificación. Esta pérdida de antigenicidad no se detecta cuando el antisuero utilizado es anti-pFc' en vez de anti- γ -globulinas (figuras nº 44 y 45).

En el caso del F(ab')₂ ni la modificación de grupos carboxilo (figura nº 46) ni la modificación de grupos amino (figura nº 47), ni la de grupos indol (figura nº 48) produce cambios detectables en el comportamiento antigénico.

4.10.3.- Volumen de elución .-

No se detectan cambios importantes con ninguna de las modificaciones utilizadas (tabla nº 12).

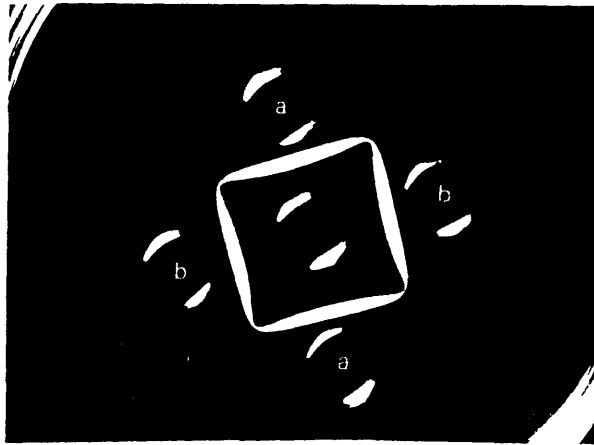


Figura nº 41.- Inmunodifusión frente a un antisuero anti- γ -globulinas de
a) IgG y b) IgG reducida

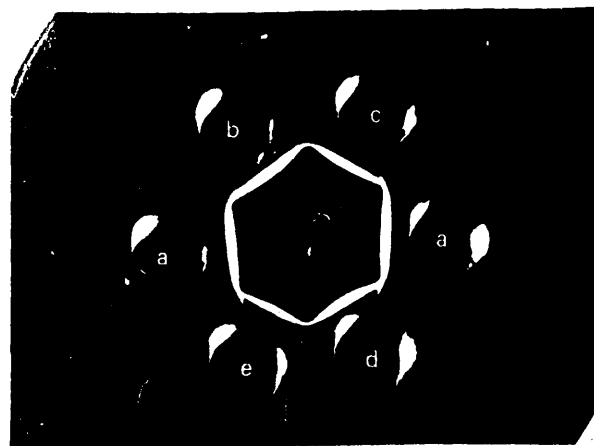


Fig nº 42.- Inmunodifusión frente a un antisuero anti- γ -globulinas de a)
IgG, b, c, d, y e) IgG modificada en los grupos carboxilo a 5,
10, 20 y 30 minutos respectivamente.

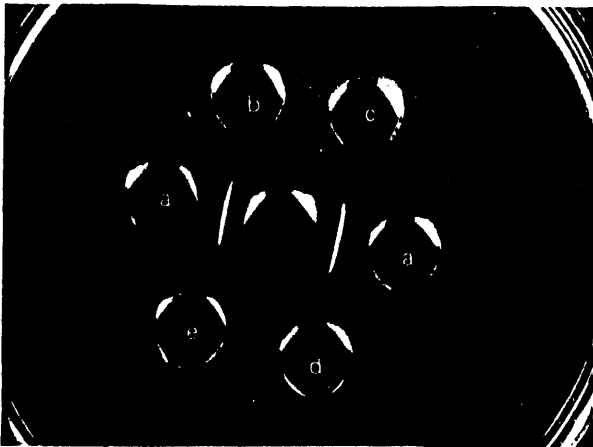


Figura nº 43.- Inmunodifusión frente a un antisuero anti-pFc' de a) IgG, b, c, d, y e) IgG modificada en los grupos carboxilo a 5, 10, 20 y 30 minutos respectivamente.

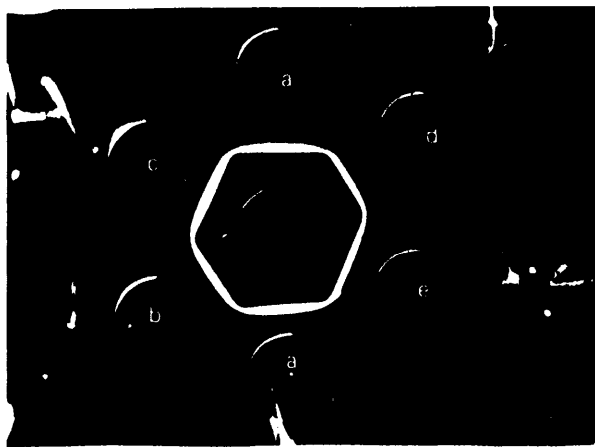


Figura nº 44.- Inmunodifusión frente a un antisuero anti- γ -globulinas de a) IgG, b, c, d, y e) IgG modificada en los grupos amino a 12, 24, 48 y 72 horas respectivamente.

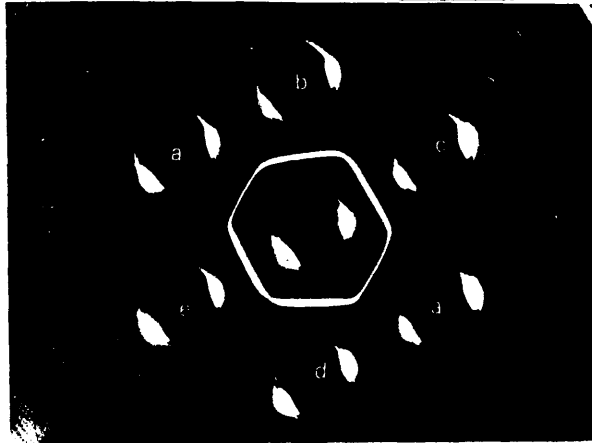


Figura nº 45.- Inmunodifusión frente a un antisuero anti-pFc' de a) IgG,
b, c, d, y e IgG modificada en los grupos amino a 12, 24,
48 y 72 horas respectivamente

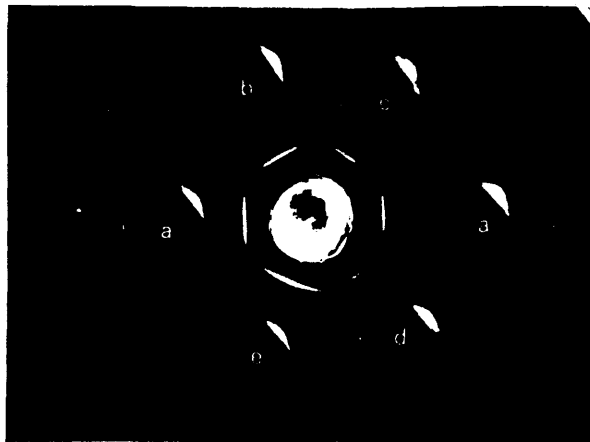


Figura nº 46.- Inmunodifusión frente a un antisuero anti- γ -globulinas de
a) $F(ab')_2$, b, c, d, y e) $F(ab')_2$ modificado en los grupos
carboxilo a 5, 10, 20 y 30 minutos respectivamente.

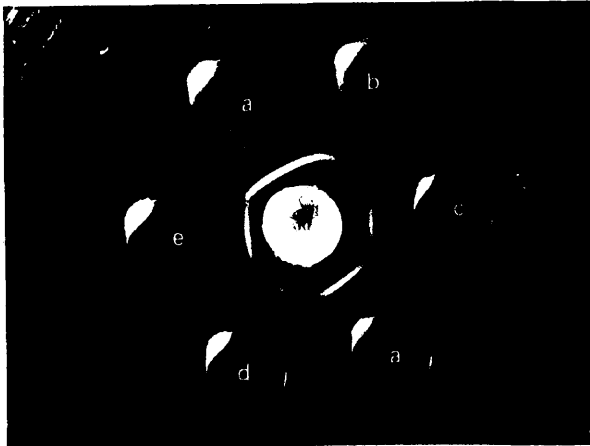


Figura nº 47.- Inmunodifusión frente a un antisuero anti- γ -globulinas de
 a) $F(ab')_2$, b, c, d, y e) $F(ab')_2$ modificado en los grupos
 amino a 12, 24, 48 y 72 horas respectivamente.

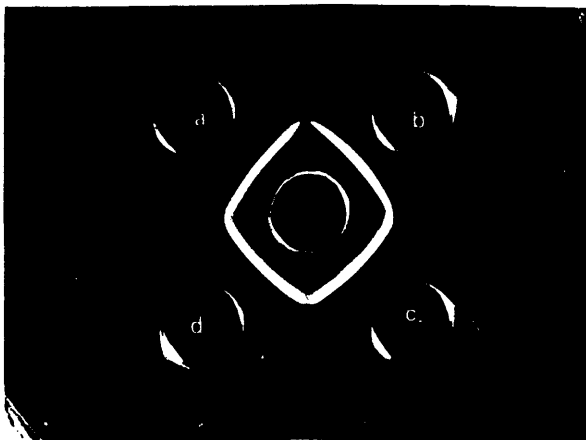


Figura nº 48.- Inmunodifusión frente a un antisuero anti- γ -globulinas de
 a) $F(ab')_2$, b, c, y d) $F(ab')_2$ modificado en los restos Trp
 a una concentración de NBB de 100, 300 y 600 veces la con-
 centración de $F(ab')_2$ (relación molar) respectivamente.

IgG	Ve (ml)	F(ab') ₂	Ve (ml)
Control	62	Control	69
Reducida	62	Mod. carbox. - 5'	70
Mod. carbox. - 5'	63	Mod. carbox. - 10'	70
Mod. carbox. - 10'	63	Mod. carbox. - 20'	70
Mod. carbox. - 20'	63	Mod. carbox. - 30'	70
Mod. carbox. - 30'	63	Mod. amino. - 12 h	69
Mod. amino. - 12 h	62	Mod. amino. - 24 h	69
Mod. amino. - 24 h	62	Mod. amino. - 48 h	69
Mod. amino. - 48 h	62	Mod. amino. - 72 h	69
Mod. amino. - 72 h	62	Mod. Trp-100	69
		Mod. Trp-300	69
		Mod. Trp-600	69 ^h

Tabla nº 12: Volúmenes de elución (Ve) de IgG, F(ab')₂ y sus respectivos productos de modificación.

4.10.4.- Electroforesis en agarosa .-

La figura n° 49 muestra el cambio de movilidad electroforética de la molécula de IgG con las distintas modificaciones. Al pH a que se realiza la electroforesis (8.6), la molécula de IgG nativa se encuentra practicamente en su punto isoelectrico y, puesto que en el lecho de agarosa no se presenta flujo electroendosmótico apreciable, no migra de su punto de aplicación. La IgG modificada en los grupos carboxilo se desplaza hacia el cátodo, como corresponde al exceso de cargas positivas. Análogamente la IgG modificada en grupos amino se desplaza hacia el ánodo, debido al exceso de cargas negativas.

En el caso del $F(ab')_2$ se observa el mismo fenómeno (figura n° 50) no observandose variación en la movilidad electroforética de la IgG modificada en los restos de triptófano.

4.11.- ACTIVIDAD ANTICUERPO .-

4.11.1.- Título de hemaglutinación .-

El título de hemaglutinación del $F(ab')_2$ modificado en sus grupos carboxilo, amino o indol con respecto a los correspondientes controles se muestra en las tablas n° 13, 14 y 15 respectivamente. La actividad aglutinante disminuye con la modificación de los grupos amino e indol y se ve incrementada con la modificación de los grupos carboxilo.

4.11.2.- Incorporación radioactiva .-

Los valores de incorporación radioactiva del $F(ab')_2$ control y modificados se muestra en las tablas 13, 14 y 15. Los valores de incorpora--

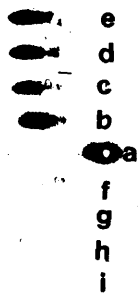


Figura nº 49.- Movilidad electroforética relativa de a) IgG, b, c, d, y e) IgG modificada en los grupos carboxilo a 5, 10, 20 y 30 minutos, f, g, h e i) IgG modificada en los grupos amino a 12, 24, 48 y 72 horas respectivamente.

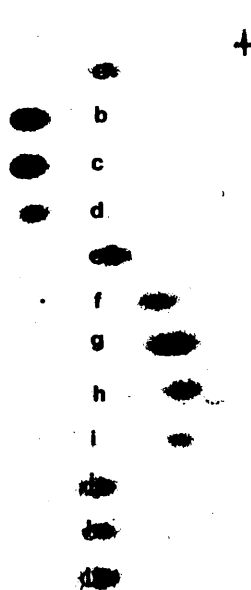


Figura nº 50.- Movilidad electroforética relativa de a) y e) $F(ab')_2$, b, c, y d) $F(ab')_2$ modificado en los grupos carboxilo a 5, 10, 20 y 30 minutos, f, g, h e i) $F(ab')_2$ modificado en los grupos amino a 12, 24, 48 y 72 horas, j, k y l) $F(ab')_2$ modificado en los restos de Trp a una concentración de NBB de 100, 300 y 600 veces la del $F(ab')_2$.

ACTIVIDAD ANTICUERPO

F(ab') ₂	TIEMPO DE MODIFICACION (Minutos)	Hemaglutinación		Incorporación radioactiva ^b				Unión Relativa
		Título ^a (µg)	% hemaglu.	cpm totales		Unión específica (cpm)		
				80 µg	160 µg	80 µg	160 µg	
α-E	0	1,5	100	1480(± 90)	2875(±130)	1360	2637	100 %
α-A	0	-	-	120(± 11)	238(± 23)	-	-	-
α-E	5	0,75	200	2800(± 112)	5593(±217)	2450	4906	183 %
α-A	5	-	-	350(± 20)	687(± 32)	-	-	-
α-E	10	0,75	200	3220(± 145)	6215(±198)	2850	5485	209 %
α-A	10	-	-	370(± 19)	730(± 33)	-	-	-
α-E	20	0,75	200	3110(± 124)	6412(±180)	2730	5689	208 %
α-A	20	-	-	380(± 18)	723(± 30)	-	-	-
α-E	30	0,75	200	3220(± 140)	6408(±172)	2840	5655	212 %
α-A	30	-	-	380(± 20)	753(± 27)	-	-	-

^aCantidad mínima de anticuerpo necesaria para producir la hemaglutinación de 0'5 ml de eritrocitos al 0'2 %.

^bActividad específica de la proteína 'marcada: 650 cpm/µg.

Tabla nº 13: Variación de la actividad anticuerpo del F(ab')₂-αE como consecuencia de la modificación de sus grupos carboxilo.

F(ab') ₂	ACTIVIDAD ANTICUERPO									
	Hemaglutinación					Incorporación radioactiva ^b				
	TIEMPO DE MODIFICACION (Horas)	Título ^a (µg)	% hemaglu.	cpm totales	Unión específica (cpm)	Unión específica 80 µg	Unión específica 160 µg	Unión específica 160 µg	Unión Relativa	Unión Relativa
α-E	0	1,5	100	1650(± 95)	3346(± 123)	1405	2826	2826	100 %	100 %
α-A	0	-	-	245(± 16)	520(± 38)	-	-	-	-	-
α-E	12	3,0	50	1100(± 60)	2220(± 82)	840	1690	1690	60 %	60 %
α-A	12	-	-	260(± 16)	530(± 26)	-	-	-	-	-
α-E	24	3,0	50	1015(± 60)	2020(± 91)	805	1608	1608	57 %	57 %
α-A	24	-	-	210(± 15)	412(± 32)	-	-	-	-	-
α-E	48	3,0	50	1045(± 55)	2040(± 87)	780	1535	1535	55 %	55 %
α-A	48	-	-	265(± 18)	515(± 31)	-	-	-	-	-
α-E	72	3,0	50	1040(± 62)	2093(± 98)	800	1587	1587	57 %	57 %
α-A	72	-	-	240(± 13)	506(± 28)	-	-	-	-	-

^aCantidad mínima de anticuerpo necesaria para producir la hemaglutinación de 0,5 ml de eritrocitos al 0,2 %.

^bActividad específica de la proteína marcada: 650 cpm/µg

Tabla nº 14: Variación de la actividad anticuerpo del F(ab')₂-αE como consecuencia de la modificación de sus grupos amino.

ACTIVIDAD ANTICUERPO

F(ab') ₂	Hemaglutinación		Incorporación radioactiva ^b				Unión Relativa
	CONCENTRACION NBB ^c	Título ^a % hemaglu. (µg)	cpm totales		Unión específica (cpm)		
			80 µg	160 µg	80 µg	160 µg	
α-E	-	1,5	1408(± 85)	2780(±110)	1243	2468	100 %
α-A	-	-	165(± 12)	312(± 35)	-	-	-
α-E	100	1,5	1318(± 80)	2632(± 93)	1120	2246	90 %
α-A	100	-	198(± 15)	386(± 23)	-	-	-
α-E	300	3,0	1024(± 65)	2018(±132)	812	1611	65 %
α-A	300	-	212(± 15)	407(± 32)	-	-	-
α-E	600	3,0	835(± 56)	1712(± 84)	625	1274	50 %
α-A	600	-	210(± 14)	438(± 23)	-	-	-

111

^aCantidad mínima de anticuerpo necesaria para producir la hemaglutinación de 0'5 ml de eritrocitos al 0,2 %.

^bActividad específica proteína marcada: 650 cpm/µg. ^cExceso molar del NBB respecto al F(ab')₂

Tabla nº 15: Variación de la actividad anticuerpo del F(ab')₂-αE como consecuencia de la modificación de sus grupos indol.



ción específica confirman una menor avidéz de los fragmentos modificados en los grupos amino e indol por la superficie del eritrocito y una avidéz mayor en el caso de que la modificación afecte a los grupos carboxilo.

4.12.- MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTICOMPLEMENTARIA DEL $F(ab')_2$ POR LA VIA ALTERNATIVA .-

4.12.1.- Actividad del $F(ab')_2$ modificado en los grupos carboxilo .-

La tabla nº 16 muestra los valores de actividad lítica del $F(ab')_2$ control y modificados en sus grupos carboxilo. La figura nº 51 ilustra graficamente los resultados de esta tabla. Las cantidades de anticuerpo necesarias para producir el 50 % de lisis, obtenidos de esta gráfica, se representan en la tabla nº 17. Estos valores se modifican teniendo en cuenta la variación en la capacidad anticuerpo que sufre el fragmento tras la modificación (tabla nº 13) obteniéndose los valores de actividad lítica relativa que figuran en la tabla nº 17.

Los datos obtenidos ponen de manifiesto una pérdida gradual de actividad hemolítica del $F(ab')_2$ como consecuencia de la modificación, llegando a sólo un 5 % de la actividad inicial al máximo tiempo de modificación.

4.12.2.- Actividad del $F(ab')_2$ modificado en los grupos amino .-

Las curvas de actividad hemolítica de los $F(ab')_2$ modificados en los grupos amino, cuyos valores figuran en la tabla nº 18, se representan en la figura nº 52. A partir de estos datos se obtienen los valores relativos de actividad lítica, corregidos de acuerdo con la pérdida de capacidad anticuerpo que sufre el $F(ab')_2$ como consecuencia de la modificación (tabla nº 14), que se muestran en la tabla nº 19.

% LISIS

CONC. *	TIEMPO DE MODIFICACION (MINUTOS)				
	Control	5	10	20	30
20	20.0 (± 1.2)	12.1 (± 1.1)	7.8 (± 0.6)	3.2 (± 0.8)	—
40	80.8 (± 1.3)	70.1 (± 2.1)	49.8 (± 2.5)	8.2 (± 1.3)	1.8 (± 1.0)
60	92.3 (± 1.2)	88.5 (± 0.9)	83.2 (± 2.3)	14.4 (± 1.3)	2.8 (± 0.8)
80	97.2 (± 0.6)	95.2 (± 0.9)	91.5 (± 1.2)	27.8 (± 2.7)	4.6 (± 0.9)
120	99.2 (± 0.3)	99.2 (± 0.6)	97.1 (± 0.8)	66.6 (± 1.4)	8.8 (± 1.3)
160			99.5 (± 0.3)	80.9 (± 1.8)	14.8 (± 2.1)
240				95.2 (± 1.1)	36.5 (± 2.3)
320					60.0 (± 2.1)
400					76.3 (± 2.2)
500					89.4 (± 1.3)
600					89.8 (± 1.1)

* Microgramos de anticuerpo utilizados para activar 1 ml de eritrocitos al 0.15 %.

Tabla n° 16.- Efecto de la modificación de los grupos carboxilo en la actividad hemolítica del fragmento $F(ab')_2$ -aE.

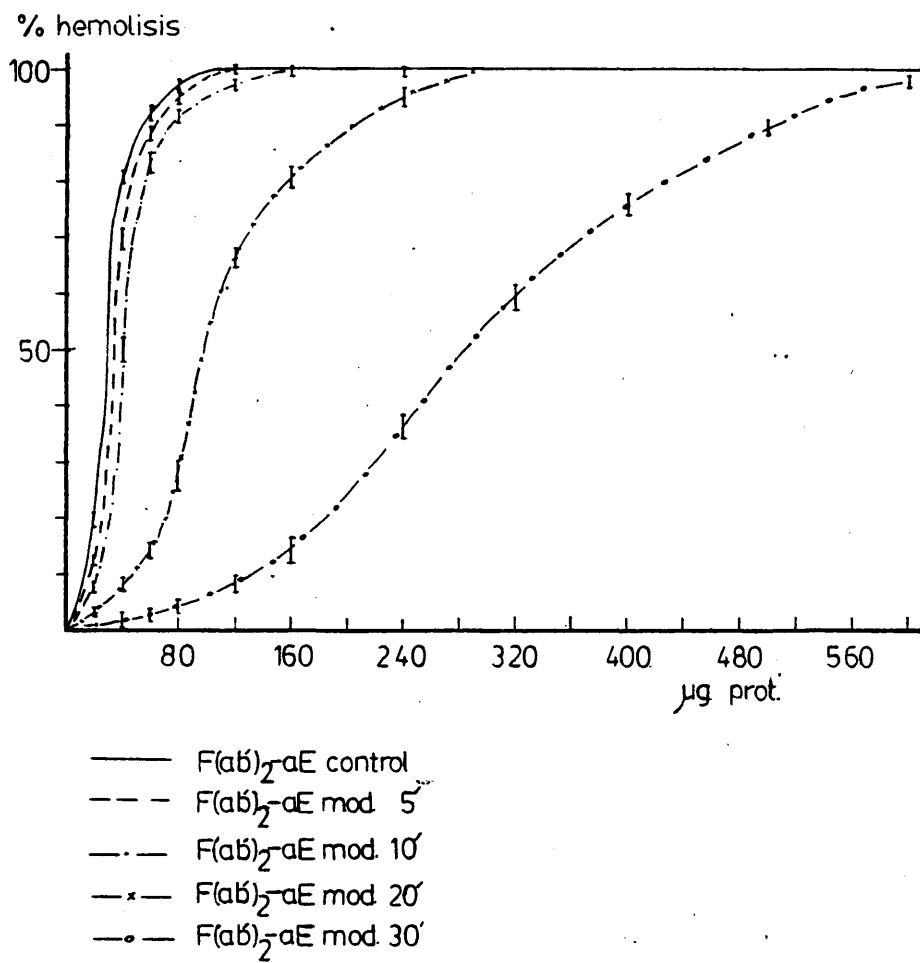


Figura n° 51.- Efecto de la modificación de los grupos carboxilo en la actividad hemolítica del F(ab')₂-aE.

C	TIEMPO DE MODIFICACION (Minutos)					ACTIVIDAD HEMOLITICA APARENTE (µg/50 % lisis)
	5	10	20	30		
30	36	41	100	286		
100	183	209	208	212		ACTIVIDAD ANTICUERPO RELATIVA
100	46	35	14	5		ACTIVIDAD HEMOLITICA RELATIVA

Tabla nº 17: Actividad hemolítica relativa de los F(ab')₂-αE modificados en los grupos carboxilo con respecto al control.

% LISIS

CONC.*	TIEMPO DE MODIFICACION (HORAS)				
	Control	12	24	48	72
20	19.2 (±1.7)	5.6 (±1.6)	2.8 (±0.8)	—	—
40	75.8 (±1.8)	13.2 (±1.7)	6.8 (±0.9)	4.2 (±0.6)	3.4 (±0.8)
80	97.1 (±2.2)	50.0 (±3.1)	25.0 (±1.3)	12.1 (±0.8)	11.6 (±0.7)
100	99.3 (±0.6)	75.3 (±1.8)	42.1 (±3.3)		
120	99.8 (±0.4)	84.7 (±1.3)	60.6 (±1.8)	29.2 (±1.7)	27.1 (±2.1)
160		94.8 (±1.1)	81.5 (±1.5)	55.3 (±2.7)	52.8 (±2.8)
200		99.1 (±0.8)	91.2 (±1.2)	74.0 (±1.9)	71.8 (±1.6)
240			96.6 (±0.3)	84.3 (±1.1)	82.9 (±1.6)
280			99.8 (±0.3)	91.4 (±1.5)	90.3 (±1.2)
320				96.0 (±1.2)	95.2 (±1.4)
360				99.3 (±0.5)	98.2 (±0.6)
400				99.5 (±0.3)	99.7 (±0.3)

* Microgramos de anticuerpo utilizados para sensibilizar 1 ml de eritrocitos al 0.15 %.

Tabla nº 18.- Efecto de la modificación de los grupos amino en la actividad hemolítica del fragmento F(ab')₂-aE.

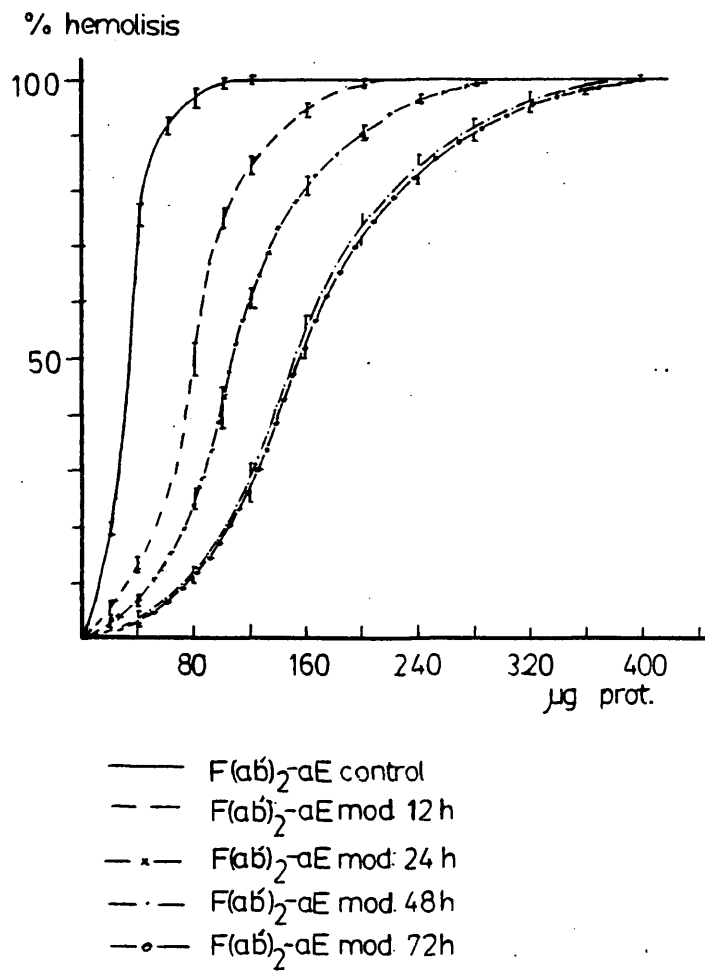


Figura nº 52.- Efecto de la modificación de los grupos amino en la actividad hemolítica del F(ab')₂-aE.

C	TIEMPO DE MODIFICACION (HORAS)			ACTIVIDAD HEMOLITICA APARENTE ($\mu\text{g}/50\%$ lisis)
	12	24	48	
35	80	107	152	154
100	60	57	55	57
100	72	57	40	40

Tabla nº 19: Actividad hemolítica relativa de los $F(ab')_2$ modificados en los grupos amino con respecto al control.

Como consecuencia de la modificación se produce una pérdida de la actividad hemolítica de la molécula que llega a ser del 60 % al máximo tiempo de modificación (40 % de la actividad lítica inicial).

4.12.3.- Actividad del $F(ab')_2$ modificado en los restos triptófano .-

La tabla nº 20 muestra los valores de actividad hemolítica de los $F(ab')_2$ modificados en los grupos indol con respecto al control. La representación gráfica de estos valores se ilustra en la figura nº 53. Las cantidades de anticuerpo necesarias para producir el 50 % de lisis se expresan en la tabla nº 21, teniendo en cuenta la variación en la capacidad anticuerpo que sufre el fragmento tras la modificación (tabla nº 15).

Los datos obtenidos no muestran variación apreciable de la actividad hemolítica del fragmento $F(ab')_2$ como consecuencia de la modificación de sus restos de triptófano.

4.13.- UNION A RECEPTORES CELULARES .-

4.13.1.- Formación de rosetas .-

La tabla nº 22 muestra la capacidad de formación de rosetas de IgG-aE con neutrófilos de conejo. Como controles negativos se utilizan $F(ab')_2$ -aE e IgG-aA. La representación gráfica, en escala semilogarítmica, de estos valores se representa en la figura nº 54.

4.13.2.- Inhibición de rosetas .-

4.13.2.1.- F_{ab} -aA y pFc' .-

Tanto el fragmento F_{ab} como el fragmento pFc' se muestran incapaces de inhibir la formación de rosetas entre eritrocitos recubiertos de

% LISIS

CONG.*	CONCENTRACION NBB (MOL. NBB/MOL. PROT.)			
	Control	100	300	600
20	14.5 (± 2.0)	4.0 (± 1.2)	7.1 (± 1.6)	5.1 (± 1.3)
40	55.0 (± 4.1)	38.8 (± 2.5)	20.0 (± 1.6)	12.8 (± 2.2)
60	86.5 (± 1.8)	78.6 (± 2.1)	48.2 (± 2.9)	24.1 (± 2.6)
80	92.1 (± 1.5)	88.7 (± 1.7)	73.6 (± 1.9)	50.0 (± 3.2)
100	97.3 (± 1.5)	93.2 (± 1.3)	85.6 (± 1.6)	76.8 (± 2.0)
120	99.8 (± 0.8)	96.3 (± 1.0)	90.4 (± 1.2)	82.1 (± 1.7)
140	99.6 (± 0.3)	98.2 (± 1.1)	94.6 (± 1.3)	87.7 (± 1.9)
160		99.6 (± 0.5)	96.6 (± 1.2)	92.2 (± 1.4)
180			99.3 (± 0.3)	95.7 (± 1.3)
200				97.8 (± 1.5)
220				99.6 (± 0.8)

* Microgramos de anticuerpo utilizados para activar 1 ml de eritrocitos al 0.15 %.

Tabla n° 20.- Efecto de la modificación de los grupos indol en la actividad hemolítica del fragmento F(ab')₂-aE.

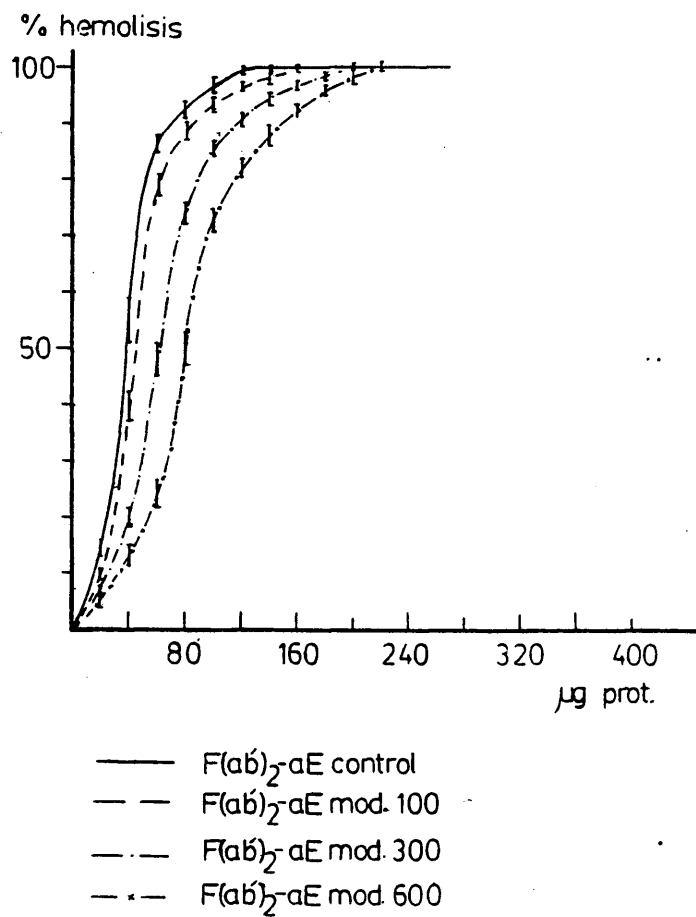


Figura n° 53.- Efecto de la modificación de los grupos indol en la actividad hemolítica del $F(ab')_2$ -aE.

C	100	300	600	NBB
38	43	61	80	ACTIVIDAD HEMOLITICA APARENTE (µg/50 % lisis)
100	90	65	50	ACTIVIDAD ANTICUERPO RELATIVA
100	98	95	95	ACTIVIDAD HEMOLITICA RELATIVA

Tabla nº 21: Actividad hemolítica relativa de los F(ab')₂-αE modificados en los grupos indol con respecto al control.

% ROSETAS

CONC. 10^6 *	PROTEINA		
	IgG-aE	F(ab') ₂ -aE	IgG-aA
6.8	10 (± 3)	2 (± 1)	3 (± 1)
13.6	28 (± 5)	2 (± 1)	2 (± 1)
23.3	50 (± 5)	1 (± 0)	2 (± 1)
35.5	75 (± 4)	3 (± 1)	3 (± 1)
46.0	97 (± 3)	2 (± 1)	2 (± 0)
67.0		1 (± 1)	2 (± 1)
94.0		2 (± 1)	2 (± 1)

* Micromoles de proteína utilizados para activar 1 ml de eritrocitos al 0.5 %.

Tabla nº 22.- Capacidad de formación de rosetas de la IgG-aE.

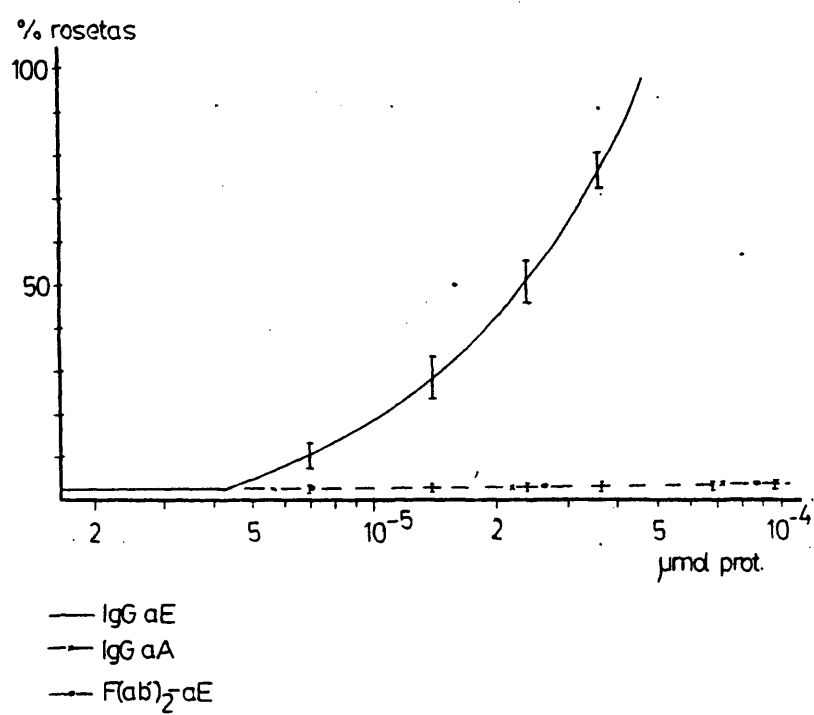


Figura n° 54.- Capacidad de formación de rosetas de la IgG-aE.

IgG-aE y neutrófilos de conejo (tabla nº 23, figura nº 55). El tratamiento con ácido y urea de la molécula de IgG-aA (control de la digestión con plasma) produce un decremento en su capacidad de inhibición de rosetas del orden del 50 %.

4.13.2.2.- IgG-aA reducida .-

Como consecuencia de la reducción de los puentes disulfuro intercatenarios se produce un decremento en la capacidad de inhibición de rosetas de la IgG que es superior al 90 %, tal como puede apreciarse en la tabla nº 24 cuya representación gráfica aparece en la figura nº 56.

4.13.2.3.- IgG-aA modificada en los grupos carboxilo .-

La modificación de los grupos carboxilo elimina la capacidad de inhibición de rosetas de la IgG, fenómeno que ya se observa a los cinco minutos de modificación (tabla nº 25, figura nº 57).

4.13.2.4.- IgG-aA modificada en los grupos amino .-

Como consecuencia de la modificación de los grupos amino de la IgG se produce un decremento progresivo en su capacidad de inhibición de rosetas que llega a ser del 75 % al máximo tiempo de modificación (tabla nº 26, figura nº 58).

CONC. 10^5 *	% INHIBICION				
	PROTEINA				
	IgG-aA	IgG-aA [♠]	Facb-aA	pFc'	F(ab') ₂ -aA
1.55	21 (±5)	6 (±3)	3 (±2)	2 (±1)	3 (±1)
2.50	43 (±6)	16 (±3)	4 (±1)	4 (±3)	5 (±2)
3.50	65 (±6)	24 (±5)	5 (±3)	6 (±4)	4 (±3)
5.00	94 (±4)	44 (±6)	4 (±2)	4 (±3)	3 (±1)
8.00		81 (±4)	4 (±3)	3 (±2)	3 (±2)
12.00		98 (±2)	4 (±3)	3 (±1)	4 (±3)
29.00			3 (±2)	4 (±3)	4 (±2)
98.00			5 (±4)	3 (±2)	3 (±1)

* Micromoles de proteína incubados con 200 μ l de neutrófilos de conejo.

[♠] IgG-aA control de la digestión plasminica.

Tabla n° 23.- Capacidad de inhibición de la formación de rosetas de
IgG-aA, IgG-aA control de la digestión plasminica y de los
fragmentos Facb-aA y pFc'.

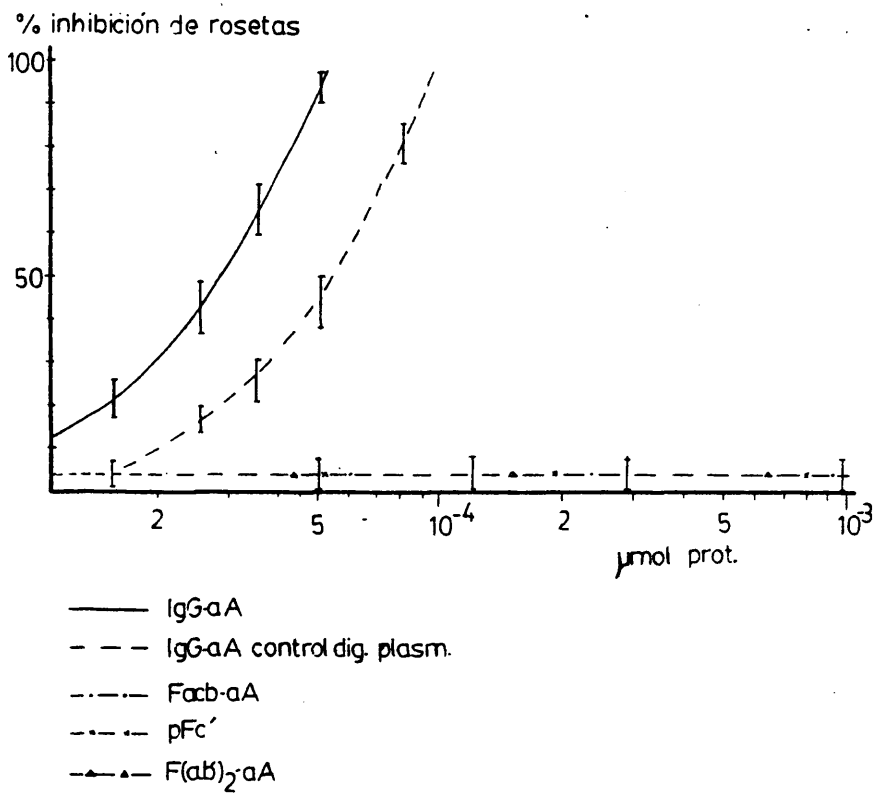


Figura nº 55.- Capacidad de inhibición de la formación de rosetas de IgG-aA
IgG-aA control de la digestión plasminica y de los fragmen--
tos Facb-aA y pFc'.

CONC. $\times 10^5$ *	% INHIBICION		
	PROTEINA		
	IgG-aA	IgG-aA red.	F(ab') ₂ -aA
1.55	21 (± 3)	3 (± 2)	4 (± 2)
2.50	43 (± 5)	4 (± 3)	3 (± 2)
3.50	67 (± 6)	3 (± 1)	2 (± 2)
5.00	95 (± 2)	3 (± 2)	3 (± 1)
25.00		11 (± 4)	3 (± 2)
46.00		33 (± 5)	5 (± 3)
60.00		52 (± 5)	3 (± 2)
80.00		78 (± 6)	4 (± 2)
100.00		97 (± 1)	3 (± 1)

* Micromoles de proteína incubados con 200 μ l de neutrófilos de conejo.

Tabla n° 24.- Capacidad de inhibición de la formación de rosetas de IgG-aA control y modificada en sus puentes disulfuro intercatenarios.

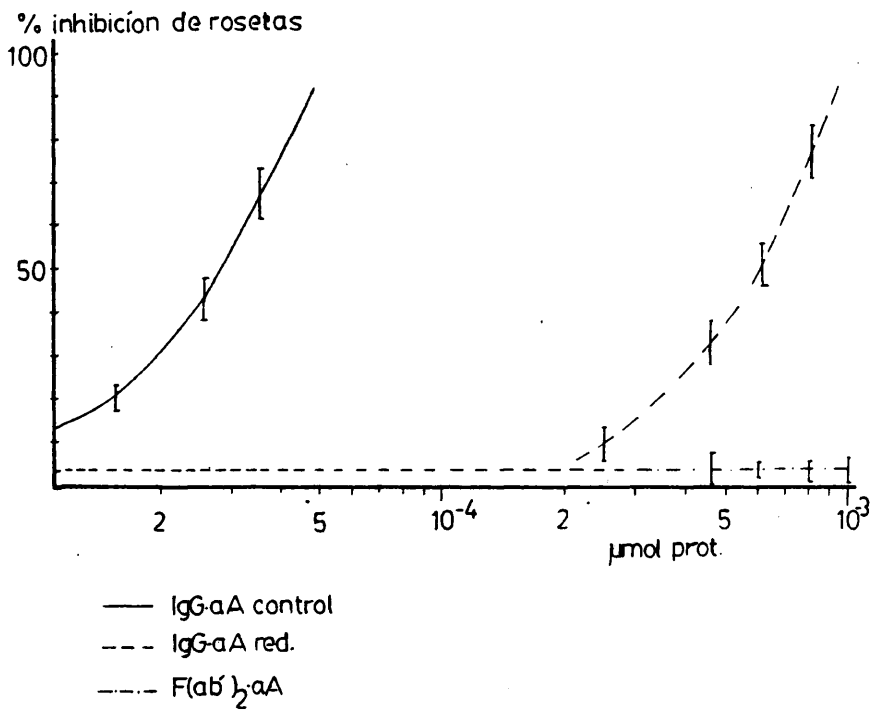


Figura nº 56.- Capacidad de inhibición de la formación de rosetas de IgG-aA control y modificada en los puentes disulfuro intercatenarios.

% INHIBICION

CONC. 10^5 *	PROTEINA					
	IgG-cont.	IgG-5'	IgG-10'	IgG-20'	IgG-30'	F(ab') ₂
1.55	22 (±5)	5 (±4)	4 (±3)	4 (±3)	5 (±4)	4 (±3)
2.50	43 (±6)	5 (±4)	4 (±3)	5 (±3)	4 (±3)	3 (±2)
3.50	68 (±5)	4 (±4)	5 (±4)	3 (±2)	5 (±4)	5 (±4)
5.00	93 (±2)	4 (±3)	5 (±4)	4 (±3)	4 (±3)	3 (±2)
15.00		4 (±2)	3 (±2)	4 (±3)	3 (±2)	3 (±2)
31.00		4 (±3)	5 (±3)	5 (±3)	3 (±2)	5 (±4)
94.00		5 (±3)	5 (±3)	4 (±2)	4 (±3)	3 (±2)

* Micromoles de proteína incubados con 200 μ l de neutrófilos de conejo.

Tabla n° 25.- Capacidad de inhibición de la formación de rosetas de IgG-aA control y modificada en sus grupos carboxilo a distintos tiempos.

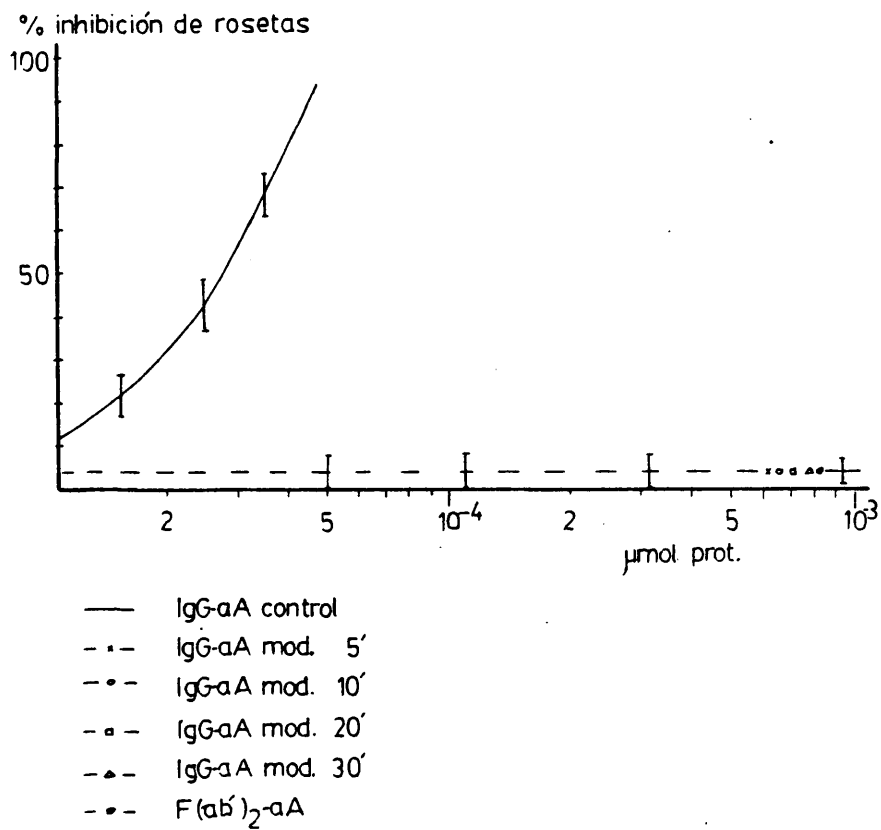


Figura n° 57.- Capacidad de inhibición de la formación de rosetas de IgG-aA control y modificada en los grupos carboxilo a distintos tipos.

% INHIBICION						
PROTEINA						
CONC. 10 ^{5*}	IgG-cont.	IgG-12 h.	IgG-24 h.	IgG-48 h.	IgG-72 h.	F(ab') ₂
1.55	21 (±5)	15 (±5)	3 (2)	3 (±2)	2 (±1)	3 (±2)
2.50	45 (±4)	28 (±5)	12 (6)	4 (±3)	3 (±1)	2 (±2)
3.50	69 (±5)	45 (±4)	24 (3)	7 (±2)	3 (±2)	3 (±2)
5.00	95 (±3)	68 (±4)	38 (6)	14 (±3)	9 (±5)	2 (±1)
8.00	98 (±2)	96 (±2)	70 (5)	34 (±5)	25 (±6)	3 (±2)
12.00		97 (±3)	94 (2)	62 (±4)	50 (±5)	4 (±3)
16.00			97 (3)	85 (±3)	73 (±6)	4 (±3)
29.00				99 (±1)	97 (±2)	3 (±2)
98.00						2 (±1)

* Micromoles de proteína incubados con 200 µl de neutrófilos de conejo.

Tabla nº 26.- Capacidad de inhibición de la formación de rosetas de IgG-aA control y modificada en sus grupos amino a distintos tiempos.

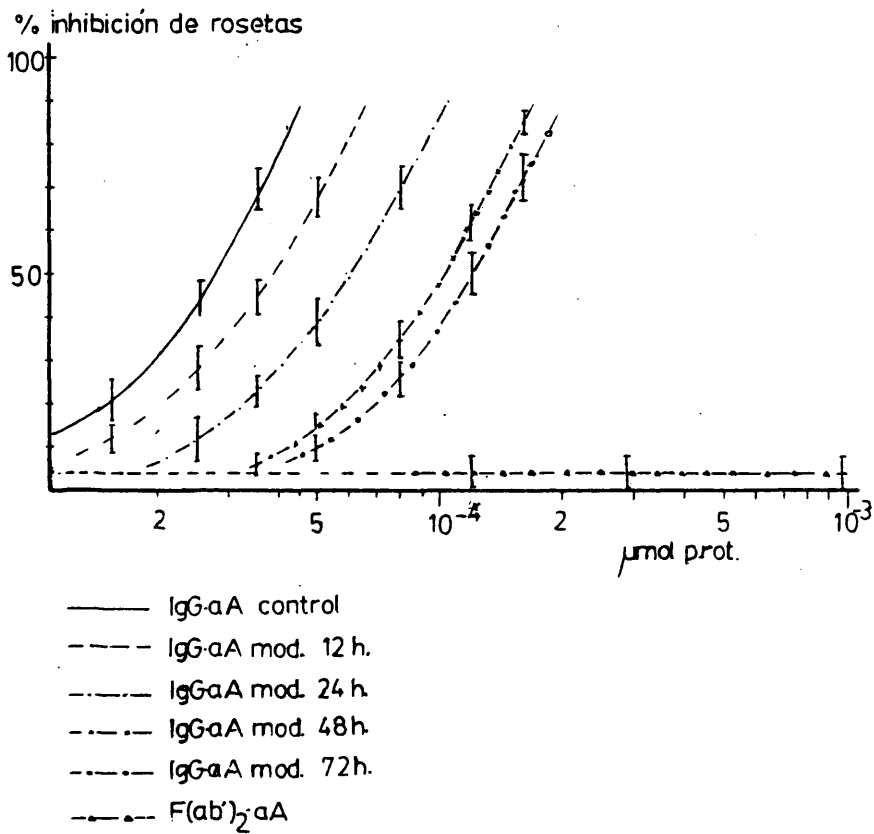


Figura nº 58.- Capacidad de inhibición de la formación de rosetas de IgG-aA control y modificada en los grupos amino a distintos tiempos

134

DISCUSSION

La IgG obtenida por cromatografía en DEAE-celulosa de las proteínas séricas de conejo insolubles en $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.33 M resulta pura en base a los criterios utilizados. Su movilidad en inmunolectroforesis y el peso molecular de 150000 Dalton que se obtiene por filtración en gel están de acuerdo con las características moleculares de la IgG.

La acción de la plasmina sobre la IgG permite obtener el fragmento Fab tras filtración en gel en condiciones desnaturalizantes. No obstante, queda una fracción de IgG sin digerir que resulta difícil eliminar debido a que sus características físico-químicas son muy parecidas a las del Fab . Por ello, y dado que en nuestro caso interesaba una gran pureza en la preparación de Fab , a fin de eliminar posibles interferencias en los estudios funcionales posteriores, se procede a la filtración de esta preparación de Fab impurificada con IgG a través de un inmunoabsorbente anti-pFc' que retiene la fracción IgG pero que es incapaz de retener el fragmento Fab por carecer éste de los dominios $\text{C}_{\text{H}}3$ de la molécula de IgG. El filtrado a través del inmunoabsorbente se muestra puro por los distintos criterios utilizados. La presencia de una banda a un peso molecular intermedio entre cadena pesada y ligera en geles de poliacrilamida en presencia de SDS y agentes reductores, así como su comportamiento por inmunodifusión (indicando que en cuanto a su comportamiento antigénico tenemos una especie intermedia entre IgG y $\text{F}(\text{ab}')_2$) confirman como Fab la especie molecular purificada.

Tanto el fragmento $\text{F}(\text{ab}')_2$ como el fragmento pFc' obtenidos por digestión pepsínica de la IgG, se muestran puros por los criterios utilizados y sus características moleculares están de acuerdo con los datos previamente descritos (89, 138).

La reducción de la IgG en las condiciones descritas (10 mM de ditiocriteritol)) y su posterior alquilación, escinde los puentes disulfuro in tercatenarios, tanto los intercadena pesada-pesada como los intercadena ligera-pesada. Las condiciones en que se trabaja suponen un exceso de reductor (89) pero se prefirió su uso a fin de evitar cualquier posible contaminación de IgG con sus puentes disulfuro intactos que podría invalidar las conclusiones que posteriormente se estableciesen en los estudios funcionales.

La modificación de los grupos carboxilo, tanto de la IgG como del $F(ab')_2$, se muestra altamente selectiva, en concordancia con lo observado por Vivanco y col. (77) para el Fc de la IgG humana. No se detectan reacciones secundarias por análisis de aminoácidos. Tampoco se detecta la presencia de agregados, ni cambios en el espectro de absorción de las moléculas que se habrían observado en caso de que hubiesen ocurrido reacciones secundarias con los restos de tirosina.

A pesar de que el cianato potásico es capaz de reaccionar, además de con grupos amino (148), con grupos sulfhidrilo (149), carboxilo (150), fenol (151) e imidazol (152), puesto que la IgG no contiene grupos sulfhidrilo libres y el resto de las posibles reacciones secundarias no ocurren o solo ligeramente en las condiciones utilizadas (pH 7.7), y además son reversibles a pH ligeramente alcalino, podemos considerar que la reacción transcurre sólo con los grupos amino. No obstante, también se realiza el espectro de absorción de las proteínas modificadas, no observándose cambios en el mismo, lo cual descarta cualquier posible modificación de los grupos fenol de la tirosina que no hubiese revertido con el tiempo.

Igualmente, en la reacción de cuantificación de grupos amino li---

bres, se descarta la posibilidad de que parte de la absorbancia a 414 nm sea debida a la reacción del TNBS con grupos -SH, que se podrían haber generado por la presencia de sulfito en el medio de reacción, ya que no se observa rotura de puentes disulfuro cuando se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS.

En lo que respecta a la modificación de los restos de triptófano con bromuro de 2-hidroxi-5nitro bencilo, en las condiciones ácidas en que se realiza la reacción, los grupos susceptibles a dar reacciones secundarias son los sulfhidrilo (144), los cuales no se presentan en la molécula de $F(ab')_2$. Dado que el número de grupos modificados es relativamente bajo (1.6 en las condiciones más extremas utilizadas) no se han realizado correcciones en el coeficiente de extinción de la proteína, que se tendrían que haber realizado en el caso de que el número de grupos modificados hubiese sido más elevado, dada la variación del coeficiente de extinción a 280 nm del triptófano como consecuencia de la modificación.

La ruptura de los puentes disulfuro intercatenarios de la molécula de IgG no produce cambios conformacionales detectables por las técnicas utilizadas. El comportamiento antigénico y por filtración en gel no muestran ningun cambio en la molécula como consecuencia de la reducción. Los espectros de dicroísmo muestran un espectro similar de la IgG e IgG reducida, observandose el máximo de elipticidad negativa a 217 nm con dos hombros a 225 y 232 nm respectivamente en concordancia con los datos de Stewart (153) para la IgG de conejo. En el UV próximo sólo se observa una ligera variación en el comportamiento de los espectros de IgG e IgG reducida. Todo esto descarta la presencia de cambios importantes en la conformación de la proteína

tras la reducción, lo cual esta de acuerdo con los datos existentes actualmente en la bibliografía (ver apartado 1.4).

La modificación de los grupos carboxilo tiene un efecto diferente según se realice sobre la molécula de IgG o sobre el $F(ab')_2$. En el caso del $F(ab')_2$ no se detectan cambios ni en el comportamiento antigénico ni en el espectro de dicroísmo circular, prácticamente idéntico al del $F(ab')_2$ nativo cuyas características generales estan de acuerdo con las descritas por Albar (89).

Cuando la modificación de grupos carboxilo afecta a la molécula de IgG, tanto el espectro de dicroísmo como el comportamiento antigénico cambian significativamente. En efecto, ya a los 5 minutos de modificación se pueden detectar cambios en el comportamiento antigénico que sugieren un posible cambio conformacional en la región Fc, ya que no se detectan cambios en el $F(ab')_2$ incluso a tiempos superiores de modificación, aunque no podemos descartar que el cambio en el comportamiento antigénico se deba a una implicación de los restos carboxilo en el determinante antigénico correspondiente y no a un cambio conformacional inducido en la molécula como consecuencia de la modificación y que alterase el determinante antigénico. No obstante, los espectros de dicroísmo circular confirman un cambio conformacional que tiene como consecuencia la pérdida del hombro a 225 nm en el espectro característico de la IgG, cambio que tambien se observa cuando se modifica el Fc humano en los grupos carboxilo (77). Dado que la banda a 225 nm no se observa ni en los espectros de dicroísmo del F_{ab} ni en los del pFc' , se ha intentado asignar a la zona de interacción $C_{H2}-C_{H3}$ (153), lo cual apoyaría un cambio conformacional en esta zona como consecuencia de la modificación de los grupos carboxilo. La inmunodifusión de la IgG modificada

frente a un antisuero anti-pFc' está de acuerdo con esta hipótesis ya que, aunque se observan cambios en la intensidad de la banda de precipitación, se observa identidad total entre IgG e IgG modificada incluso al máximo tiempo de modificación.

Los datos de filtración en gel de las moléculas modificadas en sus grupos carboxilo, tanto en el caso de la IgG como del $F(ab')_2$, apuntan, en principio, a que se haya producido una pequeña compactación como consecuencia de la modificación. No obstante, no puede descartarse que este ligero retardo en la elución se deba a una mayor interacción de la proteína con el lecho de Sephadex y no a un compactamiento de la molécula como consecuencia de la modificación. En todo caso, la variación es pequeña e indica un comportamiento similar de las moléculas por esta técnica.

Por tanto, podemos pensar que la modificación de los grupos carboxilo no provoca cambios conformacionales importantes en el $F(ab')_2$ y que en el caso de la IgG se producen cambios conformacionales que afectan a la región Fc y que, probablemente, estén localizados a nivel de la zona de contacto $C_{H2}-C_{H3}$.

La modificación de grupos amino no produce cambios detectables ni en el comportamiento antigénico, ni en el espectro de dicroísmo ni en el volumen de elución del $F(ab')_2$. En lo que se refiere a la IgG, tampoco se observan cambios ni en el espectro de dicroísmo ni en el volumen de elución como consecuencia de la modificación y, en cuanto a su comportamiento antigénico, no se detectan cambios hasta las 48 horas de modificación, cambios que no se detectan en la región C_{H3} cuando se utiliza un antisuero anti-pFc'.

Estos datos concuerdan bastante bien con los de Hunneyball y Stanworth (154) que no encontraban cambios en el coeficiente de sedimentación

ni en el comportamiento antigénico de la IgG de conejo tras la modificación del 95 % de los grupos accesibles al TNBS y con los de Nakagawa y col. (142) que no detectaban cambios en el espectro de dicroísmo de una IgG humana tras la modificación del 88 % de sus grupos amino.

Por tanto, los resultados nos permiten postular que no se han producido cambios conformacionales importantes en la IgG o el $F(ab')_2$ como consecuencia de la modificación de los grupos amino, excepto un posible cambio localizado en el dominio C_H2 o en la región de contacto C_H2-C_H3 que sólo se detecta por el cambio en el comportamiento antigénico, cambio que posiblemente se deba a una implicación directa de los grupos amino en los determinantes antigénicos correspondientes y no a un cambio conformacional generado por la modificación.

Por último, la modificación de los grupos indol no parece tener efectos importantes en la conformación del $F(ab')_2$ como se deduce al no observarse cambios en su antigenicidad, espectro de dicroísmo o volumen de elución.

Los experimentos encaminados a medir la variación de la capacidad anticuerpo del $F(ab')_2$ como consecuencia de la modificación, muestran la pérdida de actividad anticuerpo que sufre la molécula como consecuencia de la modificación de los grupos amino o indol. Los datos de hemaglutinación y de incorporación radioactiva resultan concordantes aunque los experimentos de incorporación radioactiva son más precisos a la hora de detectar pequeñas variaciones.

Si bien la pérdida de capacidad anticuerpo es de esperar cuando se modifican algunos aminoácidos de la molécula de anticuerpo, resulta paradó-

jico el aumento de avidez que se observa en el anticuerpo con la modificación de los grupos carboxilo de la molécula. Este efecto podría cuestionarse en lo que respecta a las pruebas de hemaglutinación en cuanto que la presencia de pequeñas cantidades de agregados o la disposición geométrica relativa diferente de los brazos Fab de la molécula como consecuencia de la modificación pudiesen alterar la capacidad de aglutinación del fragmento (capacidad de unión a dos células diferentes) sin alterar la avidez del anticuerpo (y por tanto sin alterar la cantidad de anticuerpo unida al eritrocito). Sin embargo ninguno de estos efectos daría cuenta de la mayor unión específica que se detecta en los experimentos de incorporación radioactiva, en los que también se observa que la incorporación radioactiva específica es prácticamente el doble cuando se modifican los grupos carboxilo del $F(ab')_2$.

A la hora de buscar una explicación a este aumento de avidez, ya que el aumento de afinidad del centro activo por su determinante antigénico parece poco probable, se puede pensar que puesto que la modificación de grupos carboxilo elimina la carga negativa de la molécula, predominarán las cargas positivas por lo que la interacción con la superficie del eritrocito, sobre el que predominan las cargas negativas (155), estará favorecida. De este modo, la molécula de anticuerpo tendrá menos impedimento -o incluso podría ser favorecida - a la hora de acoplar su centro activo al determinante antigénico correspondiente.

Los datos de actividad hemolítica de los fragmentos $F(ab')_2$ tras los distintos procesos de modificación muestran la importancia de los grupos iónicos, especialmente de los grupos carboxilo, en el proceso de activa

ción del complemento por la vía alternativa. Mientras que la modificación de casi todos los grupos amino accesibles al TNBS no logra reducir la actividad anticomplementaria más allá del 60 %. La modificación de los grupos carboxilo reduce la actividad por encima del 90 %. Esto está de acuerdo con un papel preponderante de las cargas negativas de la molécula de anticuerpo en el proceso de activación del complemento por la vía alternativa, tal como ocurriría en el caso de activación de la vía alternativa por polianiones de alto peso molecular (78).

La posibilidad de que como consecuencia de la modificación el fragmento $F(ab')_2$ en solución (no unido a la superficie del eritrocito) pasase a comportarse como activador o como inhibidor (caso de polianiones de bajo peso molecular (82)) de la activación del complemento por la vía alternativa, lo cual reduciría el nivel de complemento y, por tanto, la capacidad de lisis celular por activación sobre la inmunoglobulina fijada a la superficie del eritrocito, se descarta, ya que experimentos control realizados no mostraban variación en el porcentaje de lisis de eritrocitos activados con $F(ab')_2$ -aE cuando se incubaban con suero (en las condiciones descritas en el apartado 3.12) al que se había añadido distintas cantidades de $F(ab')_2$ -aA modificado en los distintos grupos al medio de incubación.

La modificación de los restos de triptófano no tiene prácticamente efecto en la actividad anticomplementaria del $F(ab')_2$. Esto concuerda con lo previamente descrito por Rodrick y col. (90) que no encontraban variación en la capacidad de activación del complemento por la vía alternativa por inmunocomplejos formados con ovoalbúmina y $F(ab')_2$ con actividad anti-ovoalbúmina cuando se modificaban hasta dos restos de triptófano por molécula de $F(ab')_2$. Como ya es sabido (71), la modificación del mismo número de

restos de triptófano por molécula de IgG suprime casi totalmente la capacidad de activación por la vía clásica.

Puesto que las sustancias polianiónicas en general activan el complemento por la vía alternativa, cabe pensar que la disminución de la actividad anticomplementaria con la modificación de los grupos carboxilo del $F(ab')_2$ se deba a una pérdida de las estructuras responsables de la activación más que a un efecto secundario producido como consecuencia de la modificación.

Por tanto, los datos aquí obtenidos parecen indicar un papel preponderante de los grupos carboxilo del $F(ab')_2$ en la activación del complemento por la vía alternativa.

En la interacción con receptores celulares de neutrófilos cabe destacar, en primer lugar, cómo la reducción de los puentes disulfuro intercatenarios, que no provoca cambios conformacionales detectables por las técnicas utilizadas, provoca una disminución del orden del 95 % en la capacidad de inhibición de rosetas de la IgG. Estos resultados concuerdan con los recientemente descritos por Barnett Foster y col. (106) que encuentran una pérdida del orden del 85 % en la capacidad de inhibición de rosetas con monocitos de la IgG1 humana como consecuencia de la reducción y una pérdida del 95 % cuando en vez de monocitos utilizan neutrófilos humanos. Cuando estos autores utilizan el Fc reducido en vez de la IgG reducida el efecto no es tan drástico en el caso de que se utilicen monocitos (la disminución es solo del orden del 50 %) pero se mantiene como la IgG reducida cuando las células son neutrófilos. Esto descartaría, al menos en el caso de neutrófilos humanos, que la pérdida se deba a un impedimento estérico por parte de

los brazos Fab tal como se ha postulado en la pérdida de capacidad de activación del complemento por la vía clásica tras la reducción (156).

Por tanto, la conclusión que cabe destacar de todos estos estudios es la elevada susceptibilidad de la interacción con receptores celulares a los pequeños cambios conformacionales que posiblemente se produzcan como consecuencia de la reducción.

La modificación de los grupos carboxilo de la IgG suprime totalmente la capacidad de unión a los receptores celulares de neutrófilos. No obstante, y dada la importancia de los cambios conformacionales detectados tras la modificación, cabe pensar que el efecto sea más bien por una acción indirecta, por el cambio conformacional producido, que por una implicación directa de estos grupos.

La modificación de los grupos amino de la IgG provoca una pérdida gradual de su actividad citofílica que llega a ser del 75 % al máximo tiempo de modificación. Dado que a las 12 horas (en que se han modificado un 62 % de los grupos accesibles al TNBS) la pérdida de actividad es sólo del 30 % y que aún modificando el 91 % de los grupos accesibles al TNBS no se reduce la actividad más allá del 75 %, si bien se puede pensar en una posible implicación de los grupos amino en la unión a receptores celulares de neutrófilos, el hecho de detectar cambios antigénicos en la región Fc, que no afectan a los dominios C_H3, hace pensar en la posibilidad de que se produzcan cambios conformacionales que sean los responsables de la pérdida de actividad observada. No obstante, al máximo tiempo de modificación (72 horas) y con cambios claros en el comportamiento antigénico, la IgG posee una actividad citofílica superior a la de la molécula reducida, hecho que no cabría esperar si se hubiese producido un cambio conformacional importante a

nivel del dominio C_{H2} o de la zona de contacto $C_{H2}-C_{H3}$. Además, recordemos que no se produce variación en el espectro de dicroísmo de la IgG tras la modificación de los grupos amino y especialmente que se mantiene la banda a 225 nm. Todo esto estaría a favor de que el cambio de antigenicidad se debería a una implicación directa de los grupos amino en los determinantes antigénicos y no a un efecto secundario sobre la conformación, y por tanto hace más probable que el efecto observado en la capacidad de unión a los receptores celulares de neutrófilos sea una consecuencia directa de la modificación de los grupos amino y no de un cambio conformacional inducido por la modificación.

En experimentos encaminados a comprobar el efecto de la modificación química en la actividad opsonizante de la IgG, Messner y col. (157) encontraron que la modificación de grupos amino con cianato potásico eliminaba de forma prácticamente total la capacidad opsonizante, tanto de la IgG humana como de la IgG de conejo. No obstante estos autores miden un efecto final (eliminación de *Staphylococcus aureus*) y por tanto sus resultados son más complejos de evaluar.

La posible implicación de los grupos amino en la unión a receptores celulares se intenta también sustentar basándose en los datos de Cicciarra y col. (104) que han encontrado un péptido, cuya composición empírica es: Tyr-Ser₂-Lys₂-Leu-Thr-Val-Asp-Arg, que es capaz de inhibir la formación de rosetas entre eritrocitos recubiertos de IgG humana y monocitos a concentraciones del orden de $0.6 \text{ nM}/8 \times 10^5$ monocitos.

En nuestro sistema, con IgG y neutrófilos de conejo, la importancia de los grupos amino no parece tan crucial, aunque cabe la posibilidad de que los grupos amino implicados en la interacción con receptores no sean

facilmente accesibles en las condiciones de modificación utilizadas y, por tanto, no se modifiquen en su totalidad.

Por último, si bien la incapacidad del fragmento Facb y la del fragmento pFc' para inhibir la formación de rosetas podría inducirnos a pensar en la importancia de la zona de interacción $C_{H2}-C_{H3}$ en la unión con receptores celulares de neutrófilos, los datos son cuestionables en base a los siguientes puntos:

a) El Facb no sólo se diferencia de la IgG en que le faltan los dominios C_{H3} sino que, además, lo más probable es que la disposición relativa de los dominios C_{H2} no sea la misma en el Facb y en la IgG al no haber interacciones covalentes entre los dominios C_{H2} y no existir los dominios C_{H3} que los mantenían relativamente próximos. Por tanto, a fin de dilucidar si la pérdida de actividad citofílica del Facb se debe a la mayor separación de los dominios C_{H2} entre sí o a la pérdida de estructuras presentes en el dominio C_{H3} , sería interesante que en estudios posteriores que se realizasen con el fragmento Facb se estableciese un reticulado de los dominios C_{H2} de modo que se mantuviesen próximos espacialmente tras la eliminación de los dominios C_{H3} de la molécula de IgG.

b) La incapacidad del fragmento pFc' para inhibir la formación de rosetas es un argumento más contundente a la hora de descartar los dominios C_{H3} como estructuras responsables de la acción citofílica. En efecto, los estudios realizados hasta ahora (39,153) indican que la conformación del fragmento pFc' no parece variar apreciablemente con respecto a la que tendría en la molécula de IgG intacta. Esto sitúa en ventaja al fragmento pFc' de la IgG de conejo con respecto a fragmentos pFc' procedentes de otras IgG, tales como la humana en que parecen apreciarse cambios al comparar

las conformaciones del fragmento aislado con la que le correspondería en la molécula de IgG (153), a la hora de abordar estudios funcionales.

No obstante, y puesto que existe contacto entre los dominios C_{H2} y C_{H3} , posiblemente se produzcan ligeros cambios conformacionales en el fragmento pFc' como consecuencia de la digestión y, por tanto, cabe la posibilidad de que sean estos cambios los responsables de la incapacidad del fragmento para mediar la unión a los receptores celulares.

Por tanto, podemos concluir que la interacción de IgG de conejo con receptores celulares de neutrófilos es muy sensible a cambios conformacionales en la región Fc (posiblemente por afectar estos cambios a la zona de contacto C_{H2} - C_{H3} o a la disposición espacial relativa de los dominios C_{H2}) y presenta una dependencia menos acusada de la presencia de grupos amino intactos.

148

CONCLUSIONES

- 1.- La reducción y posterior alquilación de los puentes disulfuro intercatenarios de la molécula de IgG de conejo no produce cambios conformacionales detectables por las técnicas utilizadas.
- 2.- La modificación de los grupos carboxilo no produce cambios conformacionales detectables en el fragmento $F(ab')_2$. Sí se detectan cambios conformacionales en la región Fc de la molécula de IgG como consecuencia de la modificación de sus grupos carboxilo, posiblemente a nivel de la zona de contacto $C_{H2}-C_{H3}$.
- 3.- No se detectan cambios conformacionales en el fragmento $F(ab')_2$ como consecuencia de la modificación de sus grupos amino. Esta misma modificación provoca cambios en el comportamiento antigénico de la región Fc, bien en la zona de contacto $C_{H2}-C_{H3}$ o en los dominios C_{H2} , que posiblemente se deban a una implicación directa de los grupos amino en los determinantes antigénicos y no a un cambio conformacional inducido por la modificación.
- 4.- La modificación de los grupos indol de la molécula de $F(ab')_2$ no provoca cambios conformacionales detectables por las técnicas utilizadas.
- 5.- La modificación de los grupos carboxilo del fragmento $F(ab')_2$ -aE provoca un aumento de avidéz del anticuerpo por la superficie del eritrocito que es del orden del 100 % a 5 minutos de modificación y se mantiene de este orden hasta el máximo tiempo de modificación.
- 6.- Se observa una pérdida de avidéz del $F(ab')_2$ -aE por la superficie del eritrocito con la modificación de los grupos amino que llega a ser del 40 % a las 72 horas de modificación.
- 7.- Cuando la modificación afecta a los grupos indol, la pérdida de avidéz del $F(ab')_2$ -aE por la superficie del eritrocito es del orden del 50 %

al máximo tiempo de modificación.

- 8.- La modificación de los grupos carboxilo provoca una disminución en la capacidad del $F(ab')_2$ para activar el complemento por la vía alternativa que es superior al 90 % al máximo tiempo de modificación.
- 9.- Cuando los grupos objeto de modificación son los amino, la capacidad de activación del complemento por parte del $F(ab')_2$ no se reduce más del 60 %.
- 10.- La modificación de los grupos indol no afecta la capacidad de activación del complemento por el $F(ab')_2$.
- 11.- La rotura de los puentes disulfuro intercatenarios de la IgG disminuye su actividad citoflica del orden del 95 %.
- 12.- La modificación de los grupos carboxilo de la IgG suprime totalmente su actividad citoflica.
- 13.- La modificación de los grupos amino provoca un decremento gradual de la actividad citoflica de la IgG que llega a ser de un 75 % al máximo tiempo de modificación (72 horas).
- 14.- Tanto el fragmento F_{ab} como el fragmento pFc' se muestran incapaces de inhibir la actividad citoflica de la IgG.
- 15.- Los datos obtenidos son compatibles con:
 - a) Un papel preponderante de las cargas negativas del $F(ab')_2$ de la IgG de conejo en la activación del complemento por la vía alternativa.
 - b) Cierta papel de los grupos amino en dicha activación
 - c) Requisitos conformacionales muy fuertes en la unión de la IgG de conejo a receptores celulares de neutrófilos que favorecen la hipótesis de que sea en la zona de contacto $C_{H2}-C_{H3}$ o en estructuras si-

tuadas en ambos dominios C_{H2} donde se localicen los residuos responsables de la actividad citofílica.

- d) Posible papel de los grupos amino de la IgG de conejo en la interacción con receptores celulares de neutrófilos.

152

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Wu, T.T. y Kabat, E.A. (1970). J. Exp. Med. 132, 211-249.
- 2.- Kabat, E.A. y Wu, T.T. (1970). Ann. N.Y. Acad. Sci. 190, 382-393.
- 3.- Schiffer, M., Girling, R.L., Ely, K.R. y Edmundson, A.B. (1973).
Biochemistry 12, 4630-4631.
- 4.- Poljak, R.J., Amzel, L.M., Avey, H.P., Chen, B.L., Phizackerley, R.P.
y Saul, F. (1973). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 3305-3310.
- 5.- Edmundson, A.B., Ely, K.R., Abola, E.E., Schiffer, M. y Panagiotopou
los, N. (1975). Biochemistry 14, 3953-3961.
- 6.- Saul, F., Amzel, L.M. y Poljak, R.J. (1978). J. Biol. Chem. 253,
585-597.
- 7.- Richardson, J.S., Richardson, D.C., Thomas, K.A., Silverton, E.W. y
Davies, D.R. (1976). J. Mol. Biol. 102, 221-235.
- 8.- Poljak, R.J., Amzel, L.M., Avery, H.P., Becka, L.N. y Nisonoff, A.
(1972). Nature 235, 137-140.
- 9.- Deisenhofer, J., Colman, P.M., Epp, O. y Huber, R. (1976). Z. Phy-
siol. Chem. 357, 1421-1434.
- 10.- Porter, R.R. (1959). Biochem. J. 73, 119-126.
- 11.- Palmer, J.L., Nisonoff, A. y Van Holde, K.E. (1963). Proc. Natl.
Acad. Sci. USA 50, 314-321.
- 12.- Bjork, I. y Tanford, C. (1971). Biochemistry 10, 1271-1280.
- 13.- Salomon, A. y McLaughlin, C.L. (1969). J. Biol. Chem. 244, 3393-
3404.
- 14.- Karlsson, F.A., Peterson, P.A. y Berggard, I. (1972). J. Biol. Chem.
247, 1065-1073.
- 15.- Seon, B.K., Roholt, O.A. y Pressman, D. (1972). J. Biol. Chem. 247,
2151-2155.

- 16.- Damasco, F., Franklin, E.C. y Frangione, B. (1972). *J. Immunol.* 119, 565-569.
- 17.- Hochman, J., Inbar, D. y Givol, D. (1973). *Biochemistry* 12, 1135-1135.
- 18.- Gall, W.E. y D'Eustachio, P. (1972). *Biochemistry* 11, 4621-4628.
- 19.- Connell, G.E. y Porter, R.R. (1971). *Biochem. J.* 124, 53 P.
- 20.- Ellerson, J.R., Yasmeen, D., Painter, R.H. y Dorrington, K.J. (1972). *F.E.B.S. Lett.* 24, 318-322.
- 21.- Turner, M.W. y Bennich, H. (1968). *Biochem. J.* 107, 171-178.
- 22.- Amzel, L.M., Poljak, R.J., Saul, F., Varga, J.M. y Richards, F.F. (1974). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1427-1430.
- 23.- Huber, R., Deisenhofer, J., Colman, P.M., Matsushima, M. y Palm, W., (1976). En "The Immune System" 27° Colloquium-Mosbach. (Edit. por P. Melchers y K. Rajewsky). pag. 26-40. Springer-Verlag Heidelberg New York.
- 24.- Silverton, E.W., Navia, M.A. y Davies, D.R. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5140-5144.
- 25.- Deutsch, H.F. y Susuki, T. (1971). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 190, 471 - 485.
- 26.- Matsushima, M., Marquart, M. Jonas, T.A., Colman, P.M., Bartels, K., Huber, R. y Palm W. (1978). *J. Mol. Biol.* 121, 441-459.
- 27.- Iguerabide, J., Epstein, H.F. y Stryer, L. (1970). *J. Mol. Biol.* 51, 573-590.
- 28.- Valentina, R.C. y Green, N.M. (1967). *J. Mol. Biol.* 27, 615-617.
- 29.- Wiederman, G., Miescher, P.A. y Franklin, E.C. (1963). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 113, 609-613.

- 30.- Schur, P.H. y Christian, G.D. (1964). *J. Exp. Med.* 120, 531-545.
- 31.- Romans, D.G., Tilley, C.A., Crookston, M.C., Falk, R.E. y Dorrigton, K.J. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2531-2535.
- 32.- Lawrence, D.A., Wiegler, W.O. y Spiegelberg, H.L. (1975). *J. Clin. Invest.* 55, 368-376.
- 33.- Michaelson, T.E., Wilsloff, F. y Natvig, J.B. (1975). *Scand. J. Immunol.* 4, 71-78.
- 34.- Goers, J.W., Schumaker, V.N., Glovsky, M.M., Rebelx, J. y Muller-Eberhard, H.L. (1975). *J. Biol. Chem.* 250, 4918-4925.
- 35.- Ulins, D.E. y Edelman, G.M. (1964). *J. Exp. Med.* 119, 789-815.
- 36.- Seegan, G.W., Smith, C.A. y Schumaker, V.N. (1979). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 907-911.
- 37.- Chan, L.M. y Cathou, R.E. (1977). *J. Mol. Biol.* 112, 653-656.
- 38.- Venyamicow, S.Y., Rajnavolgyi, E., Medgyesi, G.A., Gergely, J. y Zavadosky, P. (1976). *Eur. J. Biochem.* 67, 81-86.
- 39.- Boyd, J., Easterbrook-Smith, S.B., Zavadosky, P., Mounterford-Wright, C. y Dwek, R.A. (1979). *Molecular Immunol.* 16, 851-858.
- 40.- Cathou, R.E., Kulczycki, A. Jr y Haber, E. (1968). *Biochemistry* 7, 3958-3964.
- 41.- Brown, J.C. y Koshland, M.E. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 5111-5115.
- 42.- Warner, C., Schumaker, V.N. y Karush, F. (1970). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 38, 125-128.
- 43.- Pilz, I., Kratky, O., Licht, A. y Sela, M. (1975). *Biochemistry* 14, 1326-1333.
- 44.- Jatou, J.C., Huser, H., Braun, D.G., Givol, D., Pecht, I y Schlessin

- ger, J. (1975). *Biochemistry* 14, 5312-5315.
- 45.- Schlessinger, J., Steinberg, I.Z., Givol, D., Hochman, J. y Pecht, I. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2775-2779.
- 46.- Kaivarainen, A.I. y Nezlin, R.S. (1976). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 68, 270-276.
- 47.- Appella, E., Roholt, O.A., Chersi, A., Radziminski, G. y Pressman, D. (1973). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 53, 1122-1129.
- 48.- Colman, P.M., Deisenhofer, J., Huber, R. y Palm, W. (1976). *J. Mol. Biol.* 100, 257-282.
- 49.- Holowka, D.A., Strosberg, A.D., Kimball, J.W., Haber, E. y Cathou, R. E. (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69, 3399-3403.
- 50.- Edelman, G.M. (1970). *Biochemistry* 9, 3197-3205.
- 51.- Ovary, Z., Saluk, P.H., Quijada, L. y Lamm, E. (1976). *J. Immunol.* 116, 1265-1271.
- 52.- Ellerson, J.R., Yasmeen, D., Painter, R.H. y Dorrington, K.J. (1976). *J. Immunol.* 116, 510-517.
- 53.- Augener, W., Grey, H.M., Looper, N.R. y Muller-Eberhard, H.J. (1971). *Immunochemistry* 8, 1011-1020.
- 54.- Muller-Eberhard, H.J. (1975). *Ann. Rev. Biochemistry* 44, 697-724.
- 55.- Yoneman, K. y Strond, R.M. (1972). *Immunochemistry* 9, 545-554.
- 56.- Reid, K.B.M. y Porter, R.R. (1976). *Biochem. J.* 155, 19-23.
- 57.- Knobel, H.R., Villiger, W. e Isliker, H. (1975). *Eur. J. Immunol.* 5, 78-82.
- 58.- Reid, K.B.M. (1974). *Biochem. J.* 141, 189-203.
- 59.- Knobel, H.R., Heusser, C., Rodrick, M.L. e Isliker, H. (1974). *J. Immunol.* 112, 2094-2101.

- 60.- Reid, K.B.M. (1976). *Biochem. J.* 155, 5-17.
- 61.- Brodsky-Doyle, B., Leonard, K.R. y Reid, K.B.M. (1976). *Biochem J.* 159, 279-286.
- 62.- Lin, T.Y. y Fletcher, D.S. (1978). *Immunochemistry* 15, 107-117.
- 63.- Dodds, A.W., Sim, R.B., Porter, R.R. y Kerr, M.A. (1978). *Biochem. J.* 175, 383-390.
- 64.- Reid, K.B.M., Sim, R.B. y Faiers, A.P. (1977). *Biochem. J.* 161, 239-245.
- 65.- Porter, R.R. (1977). *Fed. Proc. Fdn. Am. Soc. Exp. Biol.* 36, 2191-2196.
- 66.- Schumaker, V.N., Calcott, M.A., Spiegelberg, H.L. y Muller-Eberhard, H.J. (1976). *Biochemistry* 15, 5175-5181.
- 67.- Ishizaka, T., Ishizaka, K., Salmon, S. y Funderberg, H. (1967). *J. Immunol.* 99, 82-91.
- 68.- Colomb, M. y Porter, R.R. (1975). *Biochem. J.* 145, 177-183.
- 69.- Hurst, M.M., Volanakis, J.E., Stroud, R.M. y Bennet, J.C. (1975). *J. Exp. Med.* 142, 1322-1326.
- 70.- Yasmeen, D., Ellerson, J.R., Dorrington, K.J. y Painter, R.H. (1976). *J. Immunol.* 116, 518-526.
- 71.- Alland, R. e Isliker, H. (1974). *Immunochemistry* 11, 175-180.
- 72.- Alland, R. e Isliker, H. (1974). *Immunochemistry* 11, 243-248.
- 73.- Wang, A.C. y Funderberg, H.H. (1972). *Nature* 240, 24-26.
- 74.- Isenman, D.E., Painter, R.H. y Dorrington, K.J. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 548-552.
- 75.- Boackle, R.J., Johnson, B.J. y Caughman, G.R. (1979). *Nature* 282, 742-743.

- 76.- Cohen, S. y Becker, E.L. (1968). *J. Immunol.* 100, 403-406.
- 77.- Vivanco-Martinez, F., Bragado, R., Albar, J.P., Juarez, C. y Ortiz-Masllorens, F. (1980). *Molecular Immunol.* 17, 327-336.
- 78.- Hadding, U., Dierich, M., Konig, W., Limbert, M., Schorlemmer, H.U. y Bitter-Suerman, D. (1973). *Eur. J. Immunol.* 3, 527-529.
- 79.- Pillemer, L., Blum L., Lepow, I.H., Ross, O.A., Todd, E.W. y Wardlaw, A.C., (1954). *Science* 120, 279-285.
- 80.- Platts-Mills, T.A. e Ishizaka, K. (1974). *J. Immunol.* 113, 349-358.
- 81.- Poskitt, T.R., Fortwengler, H.P. y Lunskis, B.J.J. (1973). *J. Exp. Med.* 138, 715-722.
- 82.- Burger, R., Bitter-Suermann, D. y Hadding, U. (1978). *Immunochemistry* 15, 231-235.
- 83.- Pangburn, M.K., Morrison, D.C., Schreiber, R.D. y Muller-Eberhard, H. J. (1980). *J. Immunol.* 124, 977-982.
- 84.- Fearon, D.T. (1978). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 1971-1975.
- 85.- Reid, K.B.M. (1971). *Immunology* 20, 649-658.
- 86.- Gotze, O. y Muller-Eberhard, H.J. (1971). *J. Exp. Med.* 134, 90 s-108 s.
- 87.- Hicks, J.T., Klutsh, M.J., Albrecht, P. y Frank, M.M. (1976). *J. Immunol.* 117, 208-215.
- 88.- Ernst, A. (1978). *J. Immunol.* 121, 1206-1212.
- 89.- Albar, J.P. (1979). Tesis Doctoral "Papel de los Puentes Disulfuro de Inmunoglobulinas en la Activación del Sistema del Complemento a través de la Vía Alternativa". Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid.
- 90.- Rodrick, M., Alland, R. e Isliker, H., (1978). *J. Immunol. Methods*

- 22, 211-218.
- 91.- Ishizaka, T., Soto, C.S. e Ishizaka, K. (1973). *J. Immunol.* 111, 500-511.
- 92.- Kulczycki, A. Jr. y Metzger, H. (1974). *J. Exp. Med.* 140, 1676-1695.
- 93.- Takatsu, K., Ishizaka, T. e Ishizaka, K. (1975). *J. Immunol.* 114, 1838-1845.
- 94.- Dorrington, K.J. y Bannich, H. (1973). *J. Biol. Chem.* 248, 8378-8384.
- 95.- Segal, D.M., Taurog, J.D. y Metzger, H. (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2992-2997.
- 96.- Conrad, D.H., Froese, A., Ishizaka, T. e Ishizaka, K. (1978). *J. Immunol.* 120, 507-512.
- 97.- Berker, A. y Benacerraf, B. (1966). *J. Exp. Med.* 123, 119-144.
- 98.- Huber, H., Douglas, S.D., Nusbacher, J., Kochwa, S. y Rosenfield, R. E. (1971). *Nature* 229, 419-420.
- 99.- Unkeless, J.C. y Eisen, H.N. (1975). *J. Exp. Med.* 142, 1520-1533.
- 100.- Ganczakowski, M. y Leslie, R.G.Q. (1979). *Immunology* 36, 487-494.
- 101.- Alexander, E.L., Titus, J.A. y Segal, D.M. (1979). *J. Immunol.* 123, 295-302.
- 102.- Yasmeen, D., Ellerson, J.R., Dorrington, K.J. y Painter, R.H. (1973). *J. Immunol.* 110, 1706-1709.
- 103.- Okafor, G.O., Turner, M.W. y Hay, F.C. (1974). *Nature* 248, 228-230.
- 104.- Ciccimarra, F., Rosen, F.S. y Merler, E. (1975). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 2081-2083.
- 105.- Abramson, N.E., Gelfand, E.W., Jandl, J.H. y Rosen, F.S. (1970). *J. Exp. Med.* 132, 1207-1215.

- 106.- Barnett Foster, D.E., Dorrington, K.J. y Painter, R.H. (1980). *J. Immunol.* 124, 2186-2190.
- 107.- Griffin, F.M. Jr., Griffin, J.A., Leider, J.E. y Silverstein, S.C. (1975). *J. Exp. Med.* 142, 1263-1282.
- 108.- Griffin, F.M. Jr., Griffin, J.A. y Silverstein, S.C. (1976). *J. Exp. Med.* 144, 788-809.
- 109.- Messner, R.P. y Jelinek, J. (1970). *J. Clin. Invest.* 49, 2165-2171.
- 110.- Barnett Foster, D.E., Dorrington, K.J. y Painter, R.H. (1978). *J. Immunol.* 120, 1952-1956.
- 111.- Dickler, H.B. y Kunkel, H.G. (1972). *J. Exp. Med.* 136, 191-196.
- 112.- Anderson, C.L. y Grey, H.M. (1974). *J. Exp. Med.* 139, 1175-1188.
- 113.- Ferrarini, M., Hoffman, T., Fu, S.M., Winchester, R. y Kunkel, H.G. (1977). *J. Immunol.* 119, 1525-1529.
- 114.- Moretta, L., Ferrarini, M., Durante, M.L. y Mingari, M.C. (1975). *Eur. J. Immunol.* 5, 565-569.
- 115.- Strober, W., Hague, N.E., Lum, L.G. y Henkart, P.A. (1978). *J. Immunol.* 121, 2440-2445.
- 116.- Gonzalez-Molina, A. y Spiegelberg, H.L. (1977). *J. Clin. Invest.* 59, 616-624.
- 117.- Yodoy, J. e Ishizaka, K. (1979). *J. Immunol.* 122, 2577-2583.
- 118.- Bast, B.J.E.G., Manten-Slingerland, R., Roholl, P., Meyling, F.G. y Ballieux, R.E. (1980). *Eur. J. Immunol.* 10, 192-197.
- 119.- MacNabb, T., Koh, T.Y., Dorrington, K.J. y Painter, R.H. (1976). *J. Immunol.* 117, 882-888.
- 120.- Brambell, F.W.R. (1966). *Lancet* 2, 1087-1093.
- 121.- Hemmings, W.A., Jones, R.E. y Faulk, W.P. (1975). *Immunology* 28,

411-418.

- 122.- Van der Meulen, J.A., Mcnebb, T.C., Haefner-Cavaillon, N., Kein, M. y Dorrington, K.J. (1980). *J. Immunol.* 124, 500-507.
- 123.- Wright, C., Willan, K.J., Sjobahl, J., Burton, D.R. y Dwek, R.A. (1977). *Biochem. J.* 167, 661-668.
- 124.- Stalenheim, G. y Sjoquist, J. (1970). *J. Immunol.* 105, 944-948.
- 125.- Hawiger, J., Marney, S.J. Jr., Colley, D.G. y Des Prez, R.M. (1972). *J. Exp. Med.* 136, 68-80.
- 126.- Kronvall, G. y Williams, R.C. Jr. (1969). *J. Immunol.* 103, 828-833.
- 127.- Kronvall, G., Grey, H.M. y Williams, R.C. Jr. (1970). *J. Immunol.* 105, 1116-1123.
- 128.- Deisenhofer, J., Jones, T.A. y Huber, R. (1978). *Z. Physiol. Chem.* 359, 975-985.
- 129.- Forsgren, A. y Nordstrom, K. (1974). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 236, 252-266.
- 130.- Forsgren, A., Svedjelund, A. y Wigzell, H. (1976). *Eur. J. Immunol.* 6, 207-213.
- 131.- Moller, G. y Landvall, P. (1977). *Scand. J. Immunol.* 6, 357-366.
- 132.- Peterson, E.A. y Sober, H.A. (1962). En "Methods in Enzymology" (Ed. por N.O. Colowick y N.O. Kaplan). Vol. 5, pag. 3-27. Academic Press, New York.
- 133.- Oucherlony, O. (1958). En "Progress in Allergy" (Ed. por Kallos). Vol. 5, pag. 1-78. Karger, Basel.
- 134.- Andrews, P. (1969). *Meth. Biochem. Analysis* 18, 1-53.
- 135.- Davis, B.J. (1964). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
- 136.- Weber, K. y Osborn, M.O. (1975). En "The Proteins" (3ª Edición).

(Edit. por H. Neurath y R.L. Hill) Vol. 1, pag. 179-223. Academic Press, New York.

- 137.- Nisonoff, A., Wissler, F.C., Lipman, L.N. y Woernley, D.L. (1960).
Arch. Biochem. Biophys. 89, 230-244.
- 138.- Juárez Rubio, C. (1978). Tesina "Aislamiento y Caracterización del Fragmento pFc' de la Inmunoglobulina G de Conejo". Facultad de Ciencias Químicas. Universidad Complutense de Madrid.
- 139.- Hoare, D.G. y Koshland, E. (1967). J. Biol. Chem. 242, 2447-2453.
- 140.- Beaven, G.H. y Holiday, E.R. (1952). Adv. Prot. Chem. 7, 319-386.
- 141.- O'Donnell, I.J., Frangione, B. y Porter, R.R. (1970). Biochem. J. 116, 261-268.
- 142.- Nakagawa, Y., Capetillo, S. y Jirgensons, B. (1972). J. Biol. Chem. 247, 5703-5708.
- 143.- Fields, R. (1971). Biochem. J. 124, 581-590.
- 144.- Horton, H.R. y Koshland, D.E. Jr. (1965). J. Amer. Chem. Soc. 87, 1126-1132.
- 145.- Loudon, G.M. y Koshland, D.E. Jr. (1970). J. Biol. Chem. 245, 2247-2254.
- 146.- Kliman, N.R. y Taylor, R.B. (1969). Clin. Exp. Immunol. 4, 473-487.
- 147.- Cohn, Z.A. y Morse, S.I. (1959). J. Exp. Med. 110, 419-443.
- 148.- Stark, G.R., Stein, W.H. y Moore, S. (1960). J. Biol. Chem. 235, 3177-3181.
- 149.- Stark, G.R. (1964). J. Biol. Chem. 239, 1411-1414.
- 150.- Stark, G.R. (1965). Biochemistry 4, 1030-1036.
- 151.- Smyth, D.G. (1967). J. Biol. Chem. 242, 1579-1591.
- 152.- Stark, G.R. (1965). Biochemistry 4, 588-595.

- 153.- Stewart, G.A., Johnson, P.M., Barrett, M.W., Scopes, P.M. y Stanworth, D.R. (1977). *Immunochemistry* 14, 263-268.
- 154.- Hunneyball, I.M. y Stanworth, D.R. (1976). *Immunology* 30, 881-894.
- 155.- Eylar, E.H., Madoff, M.A., Brody, O.V. y Oncley, J.L. (1962). *J. Biol. Chem.* 237, 1992-2000.
- 156.- Isenman, D.E., Dorrington, K.J. y Painter, R.H. (1975). *J. Immunol.* 114, 1726-1729.
- 157.- Messner, R.P., Parker, C.W. y Williams, R.C. Jr. (1970). *J. Immunol.* 104, 238-246.

