



Universidad del País Vasco
Euskal Herriko Unibertsitatea



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



ZIENTZIA ETA TEKNOLOGIA FAKULTATEA. LEIOA

GRADU AMAIERAKO LANA BIOTEKNOLOGIA

10E8 ANTIGORPUTZAREN POTENTZIAREN
OPTIMIZAZIOA MINTZAREKIKO
ELKARREKINTZA HIDROFOBIKOAK ETA
ELEKTROSTATIKOAK SUSTATZEN DITUZTEN
MUTAZIOEN KONBINAZIOAREN BIDEZ

Ikaslea: Ramos Caballero, Ander

Data: 2022ko Ekaina

Zuzendaria

Prof. José Luis Nieva Escandón

Kurtso akademikoa

2021/2022

Zuzendariordea

Dra. Sara Insausti Gonzalez

AURKIBIDEA

1. SARRERA	1
1.1. HELBURUA	6
2. MATERIALAK ETA METODOAK	6
2.1. MATERIALAK.....	6
2.2. FAB MUTANTEEN DISEINUA, EKOIZPENA ETA PURIFIKAZIOA.....	6
2.3. ELISA.....	8
2.4. KALORIMETRIA ISOTERMOZKO TITULAZIOA (ITC).....	9
2.5. GUV PRESTAKETA ETA MIKROSKOPIO KONFOKALA	9
2.6. NEUTRALIZAZIO SAIOA	10
3. EMAITZAK ETA EZTABAIDA	10
3.1. FAB-EN FUNTZIONALITASUNAREN ETA ESPEZIFIKOTASUNAREN AZTERKETA ELISA BIDEZ.....	10
3.2. LOTURA-AFINITATEAREN AZTERKETA DISOLUZIOAN ITC BIDEZ	12
3.3. LOTURAREN HOBEKUNTZA MINTZ MIKROINGURUNEAN...14	
3.4. INFEKZIOAREN NEUTRALIZAZIOAREN HOBEKUNTZA <i>IN VITRO</i>	17
4. ONDORIOAK	20
5. BIBLIOGRAFIA.....	23

1. SARRERA

Giza immunoeskasiaren birusa (GIB) jatorri zoonosikoa (txinpanzeetatik) duen *Lentivirus* generoko eta *Retroviridae* familiako patogenoa da. Infekzio kronikoa eragiten du, zeinak hainbat urte ostean sistema immunearen defentsak kaltetu eta Hartutako Immuno Eskasiaren Sindromea (HIES) garatzea eragiten duen, gaixotasun oportunistak azaltzea baimenduz eta heriotza eraginez. 1981an isolatu zenetik 2020ren amaieraraino, UNAIDSen arabera, GIBak 56-110 milioi pertsona inguru infektatu dituela estimatzen da. Gaur egun, mundu osoan zabalduko pandemia bat dela kontsideratzen da, eta orain arte ez da sendatzeko behin betiko metodorik garatzea lortu. Nahiz eta transmisioa saihesteko esfortzu nabarmenak egin diren, oraindik ere 30-45 milioi pertsona GIBarekin bizi direla estimatzen da, eta 1-2 milioi infekzio berri egon ziren 2020. urtean, batez ere Sahara azpiko herrialde afrikarretan. Beraz, gaur egun ere milioika pertsonen bizitzan eragiten duen gaixotasuna izanik, berebiziko garrantzia du pandemiari aurre egiteko tratamendu berrietan ikertzea, infektatutako pertsonen bizitza kalitatea hobetzeko eta behin betiko sendagai bat aurkitzeko. GIB-1 eta GIB-2 existitzen dira, baina GIB-1 da mundu osora zabalduko pandemiaren eragile nagusia. Orokorrean eta lan honetan, GIB esaterakoan GIB-1eri egiten zaio erreferentzia.

Birioia gutxi gorabehera esferikoa da eta 110 nanometrotako diametroa du, infektatzen dituen zelulak baino 60 aldiz txikiagoa. Birus bildua da, zelula ostalaritik eratorritako mintz lipidiko bikoitza du bildukin gisa. Mintza biralean gutxi gorabehera 15 Env konplexu trimeriko daude, ez-kobalenteke lotutako heterodimeroz osatuta, ostalariaren zelulen gainazaleko proteinak ezagutzen dituztenak barneraketa gidatuz eta ahalbidetuz. Env, birusaren mintzean eta infektatutako zelulen mintzean adierazten den birusaren proteina bakarra da. (Zhu et al., 2016)

Gp120 (gainazaleko proteina) eta gp41 (transmintz proteina) glukoproteinek osatzen dute Env, modu ez kobalentean asoziatzen direnak. Gp120 azpiunitateak zelulen gainazaleko CD4 molekulara afinitate handiarekin batzen dira, T zelula laguntzaileetan, makrofagoetan eta zelula dendritikoetan adierazten dena. Lotzerakoan, eraldaketa konformazionala pairatzen du eta afinitate altuko eskualde bat azaltzen du, zeina kohartzaile bati lotuko zaion. Kohartzailea CCR5 edo CXCR4 izan

daitezke. Behin lotura emanda, gp41 azpiunitatea zabaltzen da eta haren egituraren zati bat (fusio peptidoa) txertatzen du itu zelularen mintz plasmatikoa, birusa zelularen mintzarekin fusionatzea induzituz. (Montero et al., 2008)

Erretrovirus bat izanik hurrengo genomaren erreplikaketa prozesua jarraitzen du zelula bat infektatu ondoren: (1) Birusaren material genetikoaren (ssRNA) alderantzizko transkripzioa ematen da DNARA; (2) DNA kopia zelula ostalariaren genomatik txertatzen da; eta (3) Integratutako DNAtik transkribatu genomiko berrien adierazpena ematen da. Zenbait zelula egoera ez-aktibo batetara igarotzen dira, birusaren adierazpena mugatuz, eta latente geratzen den erreserba birala eratuz. GIBaren alderantzizko transkriptasa *proof-reading* aktibitate gabeko RNA menpeko DNA polimerasa bat da. Hori dela eta, GIBak (eta beste erretrovirusek) erreplikazio zikloko mutazio tasa handia dute beste birus familiekin alderatuta. GIBaren infekzioan zehar, ostalariaren sistema immuneak presioa eragiten du birusaren gainean, eta erantzun immunearen parte diren T eta B zelulek etengabe aldatzen den birusaren profil antigenikoa moldatzen dute. Esan dezakegu sistema immunearen eta birusaren arteko koeboluzioa dagoela. Denboran zehar, birusaren populazioa asko dibertsifikatzen da, banako bakoitzean ezberdina izanik. (Fischer et al., 2021)

Env konplexua, antigorputz neutralizatzaileen itu bakarra da. Nahiz eta bere osotasunean nahiko aldakorra izan, Env konplexuaren zenbait eskualde kontserbazio maila altuagoa erakusten dute. Hauen kontra, birusaren andui desberdin ugari neutralizatzeko gai diren espektro zabaleko antigorputzak (bnAb) sortzen dira. Gehien kontserbatuta ageri diren eskualdeak irisgarritasun txikiko tokietan daude, gluzidoek edo egitura aldagarriek babestuta. Horregatik, GIBarekin infektaturiko banakoetan ematen den birusaren eta bnAb-en arteko koeboluzioaren jarraipena egin duten ikerketek, bnAb-en agerpena soilik gaixo gutxitan, birusa asko dibertsifikatzerakoan eta urte asko igarota baino ez zela ematen frogatu zuten. Azken hamarkadan, bnAb berriak isolatu izan dira aurrerapen teknikoek esker, zenbaitek potentzia bereziki handia izanik. (Burton & Hangartner, 2016)

GIBaren aurkako txertoaren garapenerako ahaleginak bnAb-ak indultzeko gaitasuna duten immunogenoen garapenera bideratuta daude. Hurbilketa honetan, badira ostalariaren garapen eta kontrol mekanismoetatik eta Env konplexuaren egitura

aldakor eta ezegonkorretik eratorritako erronkak, Env txertaketaren bidez bnAb-ak ekoizten dituen B zelulen leinuen agerpena indutzea mugatzen dutenak. Hori dela eta, gaur egungo estrategia ugari bnAb-en erabileran eta hauen optimizazioan zentratu dira, GIB birusaren aurkako terapia pasiboan bai prebentzio zein tratamendu gisa erabiltzeko. (Burton & Hangartner, 2016)

Gaur egun arte isolatu diren bnAb garrantzitsuenak haien itu eskualdearen arabera sailkatu ditzakegu: gp120ko CD4 lotura gunearekiko espezifikoak, gp120ko V3 glikanoarekiko espezifikoak, gp 120ko V1/V2 glikanoekiko espezifikoak eta gp41ko MPER (ingelesetik *Membrane Proximal External Region*) espezifikoak. Hauetako batzuekin gizakietan egindako entsegu klinikoetan, bnAb bakar baten administrazioek biremia 10-15 aldiz murriztu dezaketela frogatu da, baina antigorputzarekiko erresistenteak diren birus barianteak agertzen dira. Espektrorik handiko antigorputzen koktelak eraginkorragoak dira antigorputzekiko erresistenteak diren birusen agerpena ekiditen, eta gizakietan seguruak direla frogatu da (Bar-On et al., 2018; Mendoza et al., 2018). Gainera, infekzioaren lehen momentuetan honelako koktelak erabiliz behin betiko birusaren garbiketa lortu daiteke. Horrekin erlazionatuta, bnAb-en administrazio pasiboak makakoetan infekzioaren aurkako prebentzio estrategia gisa funtzionatzen zuela frogatu izan da (Burton & Hangartner, 2016).

Azken urteetan gp41eko ektodomeinuaren MPER eskualdearekiko bnAb neutralizatzaileek arreta erakarri dute, duten espektrorik zabalaren ondorioz. Gp41a, orokorrean, gp120a baino kontserbatuago dago. Bertan aurkitzen den MPER domeinua bereziki kontserbatuta dago, birusaren eta zelula ostalariaren mintzen fusiorako kritikoa delako, eta zenbait antigorputzek dute itu gisa, eskualde honen interes terapeutikoa bermatzen duena. MPER sekuentzia gp41eko ektodomeinuaren azken 24 aminoazido C-terminalek osatzen dute (660-683) eta triptofanoetan aberatsa da. Nahiz eta egitura malgua izan, eskualdea α -helize konformazioa hartzen duela ikusi da, fusio prozesuan zehar aldatu daitekeena. Eskualde jakin hau birusaren mintzetik oso gertu dago eta berarekin elkarrekiten duela ikusi da (Montero et al., 2008).

Antigorputzek eskualde jakin hau ezagutzeko arazo nagusienetarikoa birusaren mintzaren gertutasuna da. Oro har, MPER bnAb-ek izaera hidrofobikoko CDRH3 luzeak dituzte, mintzarekin kontaktuan dagoen beren epitopoarekin elkarrekiteko.

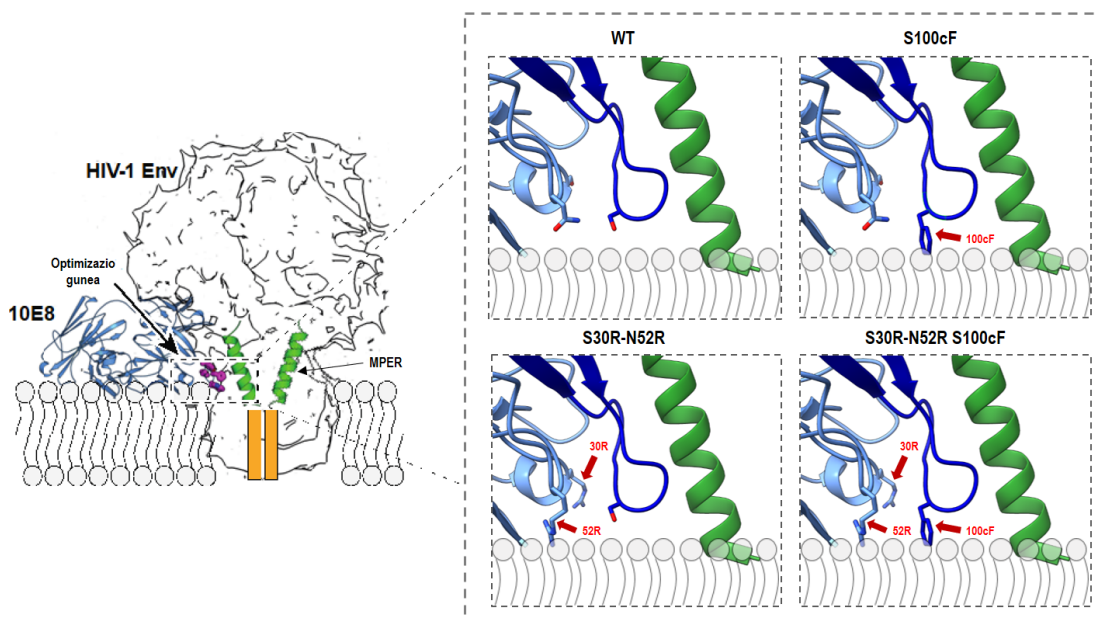
Horrez gain, lipidoak MPER antigorputz batzuen epitopoaren parte dira. Hori dela eta, mota honetako antigorputzek polierreaktibitate maila ezberdinak aurkezten dituzte (Cerutti et al., 2017).

Lan honen oinarria den 10E8 antigorputz monoklonala MPER domeinuarekiko espezifikoa da, eta infektatutako pertsona baten serumetik isolatu zen (Huang et al., 2012). Zehazki, MPER domeinuko ⁶⁷¹NWFDITNWLWYIKLFIM⁶⁸⁷ epitopo helikoidalari batzen zaio (Rujas et al., 2016). Beste MPER antigorputzekin alderatuta intereseko ezaugarriak ditu: (1) ez da autoerreaktiboa, fosfolipidoak ez baititu espontaneoki batzen; (2) potentzia nahiko altua du (batezbesteko IC₅₀ balioa 1 µg/ml baino baxuagoa); (3) espektro zabalenetariko bnAb-a da (testatutako GIB-1 azpitaldeen %98a neutralizatzeko gaitasuna zuela ikusi zen). Anti-MPER familiako besteak bezala, CDRH3 begizta luzea du, mintzean sartzea eta gp41eko TMDarekin (ingelesetik, *Transmembrane Domain*) elkarrekintzak ezartzea ahalbidetzen dituena. Aipatzekoa da CDRH2 eta CDRH3 begiztek hipermutazio somatiko sakona jasan dutela. Beste alde batetik, paratopotik hurbil duen gainazal lauak mintz interfasearekin elkarrekintzak ezartzea baimentzen du, paratopoko hondar basikoen eta birusaren mintzeko fosfolipido anionikoen artean ematen den elkarrekintza elektrostatiakoak gidatuta. Izan ere, GIB birusaren mintzeko lipidoen %8,4a POPS fosfolipido anionikoari dagokio (Brügger et al., 2006). (Burton & Hangartner, 2016)

10E8ren espektroa oso zabala izanik, bere potentzia hobetzera bideratutako garapen arrazionala burutu dute zenbait lanetan. Horien artean, antigorputzaren abidezia hobetzeko antigorputz biespezifikoak ekoiztu dira, 10E8 bnAb-a CD4 edo CCR5 hartzaileak lotzen dituzten antigorputzekin konbinatuz (Huang et al., 2016). Bestetik, 10E8aren gainazalean egindako aldaketen bidez ere (besteak beste kate astuneko S100cF ordezkapena) bere potentzia 5 aldiz emendatzea lortu da (Kwon et al., 2018). Azkenik, mintz biraletik gertu dagoen gainazalean positiboki kargatutako aminoazidoak gehituz eta indar elektrostatiakoez gidatutako 10E8aren mintzarekiko elkarrekintza emendatuz bnAb-aren neutralizazio potentzia handitzen dela ikusi da (Rujas et al., 2018; Hua & Ackerman, 2016).

Estrategia horiek oinarri hartuz, lan honetan, 10E8 antigorputzaren neutralizazio gaitasuna hobetzea bilatu da bere espektro oso zabalak eta potentzia nahiko altuak,

optimizaziorako hautagai egokia bilakatzen dutelako. Antigorputzaren funtzio biologikoa hobetzeko, mintzarekiko afinitatea elkarrekintza hidrofobikoen zein elektrostatikoen bidez emendatzen saiatu gara, Ab-Env konplexua eratzerakoan mintzetik gertu geratzen diren aminoazidoak, karga positiboko edo albo kate hidrofobikoko aminoazidoekin mutatu. Horretarako, proteinaren egitura eta epitopoaren batuketa gunean eragin mespretxagarria izango luketen eta aurretik aipatutako lanetan deskribatuak izan diren mutazioak aukeratu dira, dagoeneko 10E8ak dituen ezaugarri funtzionalak ez kaltetzeko. Ikerketa honetarako eraikitako mutanteak (**1. Irudia**) kate astuneko CDRH3 begiztan fenilalanina hondar bat gehitu izan zaion 10E8 S100cF antigorputza (F), kate arinean karga positibodun arginina aminoazidoak erantsi zaizkion 10E8 S30R-N52R antigorputza (2R), eta aurreko bien mutazioak konbinatzen dituen 10E8 S30R-N52R S100cF antigorputza (2RF) izan dira.



1. Irudia: 10E8 antigorputzaren eta bere epitopoaren elkarrekintzaren diagrama, eta eraikitako 10E8 Fab-ak. Ezkerrean, 10E8 antigorputzak Env-en gp41 azpiunitatean eta mintzean murgilduta aurkitzen den MPER epitopoaren ezagumenduan hartzen duen orientazioaren diagrama. 10E8 Fab-aren (ingelesez, *fragment antigen binding*) kate astuna urdin ilunez eta kate arina urdin argiz, MPER berdez eta TMD laranja. Eskuinean, lan honetan egindako mutanteen egiturak (UCSF ChimeraX erabiliz eraikiak) (PDB: 5GHW). Mintzaren kokapena hurbilketa bat da. Gezi gorriekin kasu bakoitzean mutaturako aminoazidoen hondarrak adierazita daude. (Irudia Ruja et al. (2016) artikulutik moldatua.)

1.1. HELBURUA

S100cF eta S30R-N52R jada deskribatuta egonik, lan hau haien konbinazioaren (S30R-N52R S100cF) eraginaren karakterizaziora bideratuta dago. Helburua konbinazioen bidez 10E8 antigorputzaren potentzia emendatzea posiblea den aztertzea da, prozesuan mutazioen konbinazioak dituen eraginak zehaztuz, eragin horien baturaren elkarrekite fisikoa ulertuz eta atzetik dagoen elkarrekintza mekanismoa proposatuz. Horrela, jarraipen-lanetan elkarrekintza ezberdinak sustatzen dituzten mutazioak era egokian uztartzea ahalbidetzea bilatzen da, antigorputzen optimizazio estrategia arrazionalen bideragarritasuna hobetzeko.

2. MATERIALAK ETA METODOAK

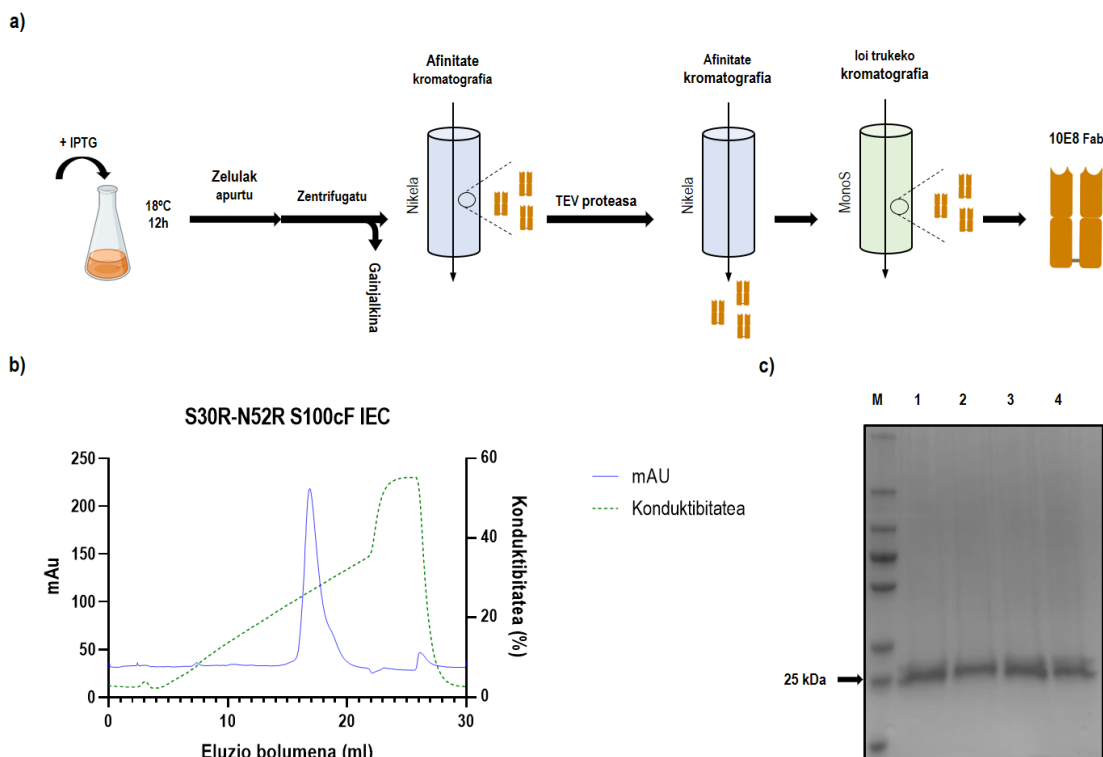
2.1. MATERIALAK

Lan honetan erabilitako peptidoak Proteogenix-ek (Frantzia) sintetizatu zituen: C-terminal karboxamida eran sintetizatu ziren Fmoc kimikako fase solidoko metodoak erabiliz, alderantzizko faseko presio altuko kromatografia likidoaren (RP-HPLC) bitartez purifikatu ziren eta MALDI-TOF bidez karakterizatu ziren (purutasuna > %95). ELISArako fosfatasa alkalinoarekin konbinatutako antigorputz sekundarioa (sigma-aldrich) erabili zen. Mikroskopiaan erabilitako zunda fluoreszentea Abberior Star RED (KK114), Abberior-etik (Göttingen, Alemania) lortu zen. GUVentzako (*Giant Unilamellar Vesicle*) erabilitako lipidoak: 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (POPC) eta 1,2-palmitoyl-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoserine (POPS) izan ziren (Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama)). GUVak markatzeko erabilitako zunda fluoreszentea NBD-PE (Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama)) izan zen. DNA/RNA eta proteina kontzentrazioak Nanodrop bidez neurtu ziren ohiko prozedura gisa, 260 nm-tan eta 280 nm-tan absorbantzia neurtuz hurrenez hurren. PCRentzako erabilitako hasleak Eurofins Genomics (Luxemburgo) enpresak sintetizatu zituen.

2.2. FAB MUTANTEEN DISEINUA, EKOIZPENA ETA PURIFIKAZIOA

Zein posizio mutatuko ziren aukeratzeko 10E8 Fab-a eta MPER domeinuaren arteko kristalizatutako konplexuaren egitura behatu zen. Bibliografian landutako, tamaina txikiko, mintzatik gertu zeuden eta albo kateak disoluziora begira zituzten aminoazidoen posizioak hautatu ziren mutaziorako. 10E8 S30R-N52R, 10E8 S100cF

eta S30R-N52R S100cF Fab-ak (ingelesetik, *fragment antigen binding*) eraiki ziren jada 10E8 antigorputzaren kate astuna eta arina zituen pColaDuet plasmidoan ordezkapenak eginez, PCR bitartezko mutagenesi bideratuaren bidez (Toyobo Mutagenesis Kit). Plasmidoa elektroporazioz transformatu zen SHuffle® T7 *E. coli* zelula elektrokonpetenteetan. 1h inkubatu ziren 37°Ctan antibiotikorik gabe, eta ondoren kanamiznadun plaketan erein eta 24h 37°Ctan inkubatu ziren. Lortutako kolonietatik plasmidoa erauzi (Macherey-Nagel kit) eta sekuenziatzera bidali ziren. Antigorputzen adierazpenerako (**2.a Irudia**), zegokion plasmidorekin transformatutako zelulak LB medioan hazi ziren 37°Ctan, eta adierazpena induzitu zen absorbantzia 600 nm-tan 0.8 zenean 0,4 mM isopropil- β -D-1-tiogalaktopiranosidoa (IPTG) gehituz, eta gau osoz 18°Ctan inkubatu ziren. Hurrengo egunean, zelulak jaso ziren 6000 x g-tan zentrifugatuz, eta lisirako indargetzailean (50 mM HEPES, pH 7,5, 500 nM NaCl, 40 nM imidazol) birsuspenditu ziren DNAsarekin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) eta proteasa inhibitzailearekin (Roche, Madrid, Espainia). Zelulak *French Press* teknika bidez apurtu ziren (5 ziklo) eta 8000 x g-tan zentrifugatu ziren hondarrak baztertzeko. Gainjalkina nikel-azido nitriloazetiko afinitate zutabean (Histrap™, Cytiva) kargatu zen filtratu ostean. Eluzioa 500 mM imidazolekin gauzatu zen, eta histidina isatsdun proteinen frakzioa jaso, batu, kontzentratu eta gau osoz giro tenperaturan dializatu zen ebaketa indargetzailearen kontra (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 0,3 mM EDTA, 1mM DTT, pH 8) TEV proteasaren presentzian. Nikel zutabean sartu zen berriro, eta kasu honetan batu gabeko frakzioa jaso, kontzentratu eta gatzik gabeko indargetzaile batera (20mM NaAc, %10 glizerola, pH 5,6) aldatu zen indargetzailea PD-10 (Cytiva) zutabe bat erabiliz. Ondoren, ioi trukeko MonoS™ (Cytiva) zutabean kargatu zen lagina. Eluzioa gatz gradiente batekin egin zen, 60% eluzio indargetzailearekin (1M KCl, 20 mM NaAz, 10% glizerola, pH 5,6) 50 minututan zehar. Fab-dun frakzioak batu, kontzentratu eta PBS %10 glizerol indargetzailearen kontra dializatu ziren, SDS-PAGE baten bidez purutasuna bermatu ostean. Fab-ak markatzeko, ditiotreitol (DTT) agente erreduzitzailearekin inkubatu ziren 37°Ctan 30 minutuz. DTTa PD-10 zutabe baten bidez kendu zen, KK114 fluoroforoa gehitu zitzaion Fab-arekiko 5 aldiz kontzentratuago eta gau osoz 37°Ctan inkubatu zen. Soberan geratutako fluoroforoa kentzeko, PD-10etik pasatu zen berriro.



2. Irudia: 10E8 Fab-en purifikazioa. (a) Adierazpen eta purifikazio prozeduraren diagrama (BioRender-etik zenbait irudi aterata). (b) 10E8 S30R-N52R S100cF lagina ioi trukeko MonoS zutabetik pasatzerakoan lortutako kromatograma, konduktibitateak eluitzeko erabilitako gradiantea islatzen du, eta mAU-k, aldiz, proteina kantitatea. (c) Purutasuna bermatzeko egindako SDS-PAGEa (homogeneoa, %12,5; M: Thermo Scientific PageRuler markatzailea), 1 kaletik hasita eta eskuinerantz: WT, F, 2R eta 2RF laginak purifikazio prozedura amaitzerakoan.

2.3. ELISA

96 putzuetako plaketan (Corning Inc., Corning, NY) MPER peptidoa (KKK-⁶⁷¹NWFDITNWLWYIKLFIMIVGGLV⁶⁹³-KK) edo MPER peptido mutatua (KKK-⁶⁷¹NAADITNWLWYIKLFIMIVGGLV⁶⁹³-KK) gehitu ziren (1,37 μ M), PBSean birsuspendituta. Gau osoz giro tenperaturan inkubatu ziren. Putzuak %3 BSAdun PBS erabiliz blokeatu ziren 2 orduz. Plaka PBS-Trekin (PBS + %0,1 Tween-20) garbitu zen. Fab-aren diluzio seriatuak gehitu ziren, ordu batez inkubatu zen eta PBS-Trekin garbitu zen. PBS-Tn disolbatutako antigorputz sekundarioa gehitu eta ordu batez inkubatu zen. 3 aldiz garbitu zen PBS-Trekin. 4-nitrofenil fosfato disodio gatz hexahidratoa gehitu zen azkenik, fosfatasa alkalinoarekin erreakzionatuz produktu kromogeniko bat ematen duena. 30 minuturen ostean, erreakzioa NaOH 3M erabiliz geldiarazi eta erreakzioaren produktua 405 nm-ko absorbantzia neurtuz kuantifikatu

zen Bio-Tek Sinergy HT plaka irakurgailu batean (Bio-TEK Instruments Inc., VT, USA). 2 erreplika egin ziren bakoitzeko.

2.4. KALORIMETRIA ISOTERMOZKO TITULAZIOA (ITC)

ITC esperimentuak VP-ITC mikrokalorimetro batekin egin ziren (MicroCal, Northampton, MA) 25°Ctan. Aurretik, proteinak ITC indargetzailearen (10mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, %10 (v/v) glizerola, pH 7,5) kontra dializatu ziren 4°Ctan. ITC indargetzailearen solubilizatutako proteina eta peptidoak zituzten laginei 5 mM DPC gehitu zitzairen, eta neurketa bakoitzaren aurretik desgasifikatu ziren. 10E8 Fab ezberdinak (3 μM) MPER peptidoarekin (40 μM) titulatu ziren. Injekzio bakoitzeko bolumena 20 μL-koa izan zen eta 12 injekzio egin ziren (lehenengoa datuen analisirako baztertu zen). Peptidoaren diluzio-beroa datu analisirako kendu zen. Lotura isotermak gune bateko lotura eredura doitu ziren ORIGIN 7.0 (MicroCal, Northampton, MA) programa erabiliz: erreakzioen estekiometria (N), disoziazio oreka konstantea (K_D), entalpia aldaketa (ΔH) eta ekarpen entropikoa ($-T\Delta S$) lortu ziren.

2.5. GUV PRESTAKETA ETA MIKROSKOPIO KONFOKALA

GUVak (lamela bakarreko besikula erraldoiak) prestatzeko jada deskribatuta dagoen elektroformazio prozedura jarraitu zen (Apellániz et al., 2010) (barne indargetzailearen konposizioa: 250mM sakarosa, 10 mM KAz, pH 7,5; kanpo indargetzailearen konposizioa: 150mM KCl, 10mM KAz, pH 7,5). Lipidoen (POPC edo POPC:POPS [9:1]) 2 mM CHCl₃:CH₃OHren 200 μl-tan disolbatu zen, NBD-PE zunda fluoreszentearekin (%0,5). Beharrezkoa izan zenean, MPER-TMD ⁶⁷¹NWFNITNWLWYIKLFIMIVGGLVGLRIVFAVL-SLVNRVR⁷⁰⁹ peptidoa (1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanolean disolbatuta) fase organikoan nahastu zen 1:250 peptido-lipido ratioan. GUVak BSArekin blokeatutako mikroskopia ganbera batera gehitu ziren, jada C216HC posizioan KK114 zundarekin konjugatutako 10E8 Fab-en 250nM zituela, eta 15 minutuz inkubatu ziren. Argazkiak Leica TCS SP5 II mikroskopiaarekin (Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemania) egin ziren. NBDz markatutako GUVak 476 nm-tan kitzikatu ziren, eta emisioa neurtu zen 530 ± 20 nm-ko uhin luzeran uretan murgildutako 63x objektibo bat erabiliz (zenbakizko zabalera [NA] = 1,2). KK114 zundaz markatutako Fab-ak 633 nm-tan kitzikatu ziren HeNe laser bat erabiliz, eta emisioa neurtu zen 775 ± 125 nm-tara. GUVaren plano

ekuatorialean zehar KK114 fluoreszentszia intentsitatea neurtuz (Fiji ImageJ erabiliz) eta GUVeko mintzeko intentsitatearen balioa fondoaren zarataren balioarekiko normalizatuz, Fab-GUV lotura erlatiboaren balioak lortu ziren. Erabilitako analisi estatistikoa bariantzaren noranzko bakarreko analisi anizkoitzentzako Kruskal-Wallis testa izan zen GraphPad Prism erabiliz.

2.6. NEUTRALIZAZIO SAIOA

Neutralizazioa ziklo bakuneko infekzio saio baten bitartez determinatu zen. CD4+ CXCR4+ CCR5+ TZM-bl zelulak erabili ziren itu gisa. Neutralizazio saioetan erabilitako pseudobirusak laborategian prestatzen eta titulatzen dira, lan honetarako JRCSF (*Clade B, Tier 2*) eta PV0.4 (*Clade B, Tier 3*) erabili zirelarik. Fab-en titulazio bati GFP plasmidodun pseudobirusak gehitu zitzaizkion zelula hazkuntza medioan (“Dulbecco’s modified Eagle’s medium” [DMEM], inaktibatutako 10% *fetal bovine* serumarekin [FBS] osatuta, 2 mM L-glutamina, 100 U/ml penizilina eta 100 µg/ml estreptomizina), eta nahastea 1h inkubatu zen 37°Ctan zelulak gehitu baino lehen. Zelulekin 37°Ctan 48h inkubatu eta gero fluxu zitometria erabiliz infektatutako zelulen ehunekoak neurtu zen, GFP adierazpena kuantifikatuz. Fab bakoitzaren infekzioaren %50a blokeatzeko beharrezkoa den kontzentrazioa (IC₅₀ balioa) zehazteko, infekzioaren inhibizioaren ehunekoak eta antigorputzen kontzentrazioaren arteko erlazioa aztertu zen, datuen doiketa ez-zuzenak eginez GraphPad Prism erabiliz. 2 erreplika egin ziren bakoitzeko.

3. EMAITZAK ETA EZTABAIDA

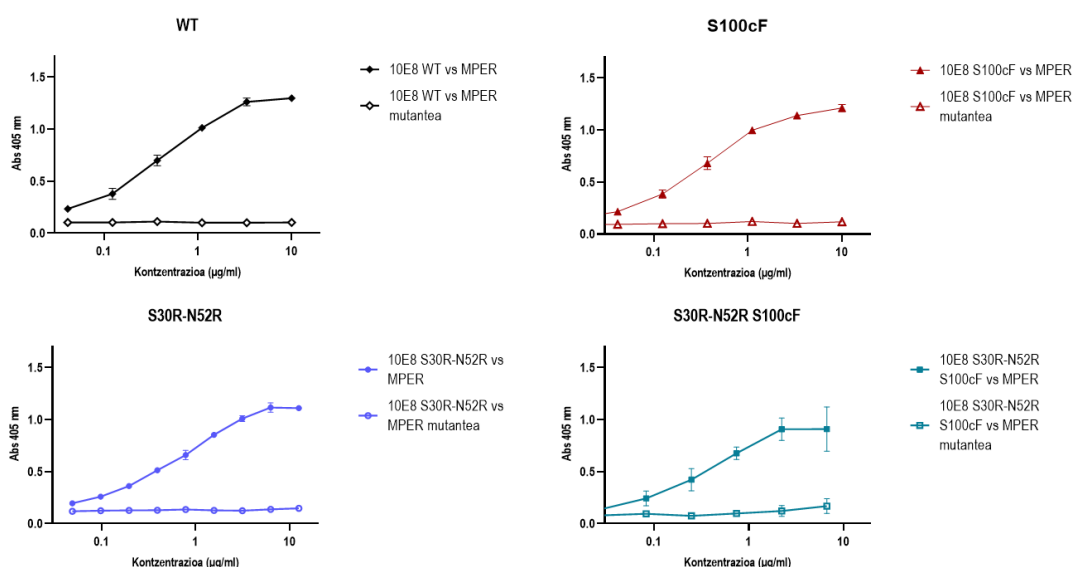
3.1. FAB-EN FUNTZIONALITASUNAREN ETA ESPEZIFIKOTASUNAREN AZTERKETA ELISA BIDEZ

Adierazpen eta purifikazio prozeduraren azken urratsean laginak ioi trukeko zutabetik pasatu ziren, eta piko bakarra lortu zen kasu bakoitzean (**2.b Irudia**). SDS-PAGE bidez purutasuna bermatzerakoan, 2 banda bereiztu ziren lagin bakoitzaren kalean (**2.c Irudia**). Bandak 25 kDa markatzaile-bandaren parean zeuden.

Beraz, Fab-ak adieraztea eta purifikatzea lortu zela ondorioztatu zen, ez baitzegoen kontaminatzailearik. SDS-PAGEko kale bakoitzean 2 banda agertu ziren PAGEa

baldintza desnaturalizatzaileetan egin zelako, beraz Fab-en kate astuna eta kate arina banandu ziren (bakoitzak gutxi gorabehera 25 kDa-etako masa du).

Purifikatutako Fab-en funtzionaltasuna eta espezifikotasuna aztertzeko, MPER peptido bat erabiliz, ELISA bat burutu zen, horrela ere mutazioek batuketa-gunea aldatu ez zutela bermatuz (**3. Irudia**). Gainera, lotura espezifikoa zela demostratzeko, loturarako beharrezkoak diren WF aminoazidoak, AA-z ordezkaturik zeramatzan MPER peptido mutante batez errepikatu ziren esperimentuak (Zwick et al., 2005)).



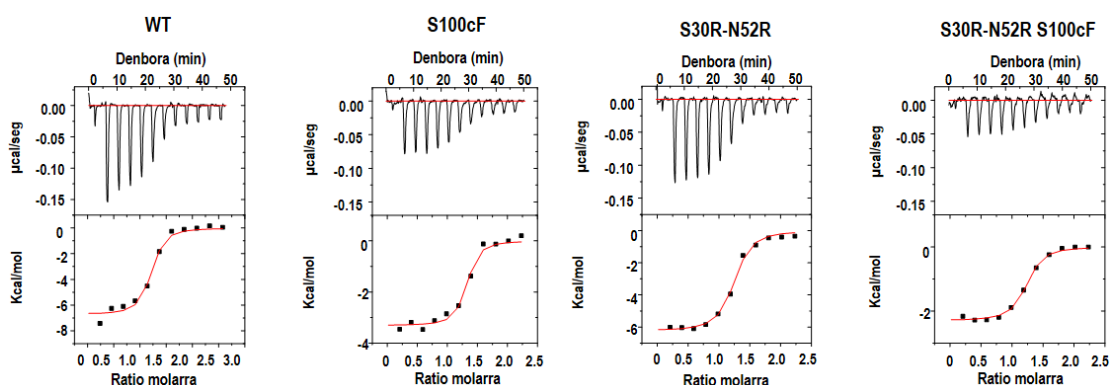
3. Irudia: 10E8 Fab-en funtzionalitatearen eta espezifikotasunaren azterketa ELISA bidez. Fab-en lotura aztertu zen MPER peptido ibilgetuaren eta MPER peptido mutatu ibilgetuaren kontra. Puntuak bi erreplikaren batez bestekoak dira.

3. Irudian ikusi daitekeen moduan, lotura efektiboaren profil eta joera antzekoak erakusten dituzte 10E8 Fab basatiak eta eraikitako S100cF, S30R-N52R eta S30R-N52R S100cF mutanteek peptido ibilgetuekiko, ez da ezberdintasun esanguratsurik nabaritzen haien artean. Gainera, argi dago 10E8aren epitopoa era egoki eta espezifikoan batzen dutela eraikitako mutante guztiek, peptido mutatuaren kasuan ez delako loturarik nabaritzen.

Ondorioz, diseinatu eta adierazi diren Fab mutanteak ohiko purifikazio prozedura bat jarraituz purifikatu daitezke homogeneousaraino. Gainera, funtzionalak eta egonkorak dira laborategi baldintzetan, eta haien epitoporekiko espezifikotasuna mantentzen dute.

3.2. LOTURA-AFINITATEAREN AZTERKETA DISOLUZIOAN ITC BIDEZ

Nahiz eta ELISAko datuek mutazioek batuketa-gunean eraginik ez zutela iradoki, disoluzio baldintzetan mutante ezberdinen afinitatea eta loturaren energetika aztertzeko kalorimetria isotermozko titulazioa (ITC) egin zen. Lortutako datuak tratatu ostean **4. Irudiko** titulazioa lortu zen, loturari buruzko zenbakizko emaitzak **1. Taulan** aurkezten dira.



4. Irudia. Fab-en lotura-afinitatearen azterketa disoluzioan titulaketa kalorimetrikoaren bidez. 10E8 Fab (3 μM), MPER peptidoa (40 μM), injekzio bolumena 20 μL , 12 injekzio, $T = 298\text{K}$. ORIGIN 7.0 (MicroCal, Northampton, MA) programa erabiliz lortu ziren.

Fab guztien disoziazio oreka konstantea nanomolarren magnitudean mugitzen da, beraz, afinitate altuko lotura ematen da Fab-en eta MPER peptidoaren artean disoluzioan. Gainera, balio hain txikiak direnez, berdintsuak direla esan dezakegu, magnitudezko ordena berberetan mugitzen baitira. Lortutako datuak esanguratsuak dira, izan ere 4 kasuetarako estekiometria, N , batetik hurbil dago, esperotako Fab-peptido (1:1) estekiometriara egokituz.

Afinitatea, lotura prozesuaren termodinamikarekin erlazionatuta dago, Fab-peptido konplexua espontaneoki eratu dadin, Gibbsen energia askearen balioaren aldaketa negatiboa izan behar da. Hau da, konplexuan egoteak libre egotea baino energetikoki favoragarriagoa izan behar da. Gibbsen energia askearen aldaketa, ekarpen termodinamikoak eta oreka konstantea erlazionatuta daude.

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_a \quad (1)$$

1. Ekuazioaren arabera, konplexu baten eraketa faboratzen da ΔH terminoa txikituz edo $T\Delta S$ terminoa handituz. 10E8 basatiaren kasuan lotura entalpikoki zuzenduta dago eta bi terminoen ekarpenak, entropikoarenak eta entalpikoarenak, faboragarriak dira. Gauza bera gertatzen da mutanteen kasuan, ekarpen entalpikoa zein entropikoa faboragarriak dira. Dena den, 10E8 S100cF eta 10E8 S30R-N52R S100cF Fab-en kasuan, entropikoki zuzenduta dago lotura. Basatiarekiko alderatuz, ekarpen entalpikoa murriztu eta entropikoa handitzen da bi mutante horietan. Konbinazioan, S100cF mutazioaren eragina nabariagoa da energetikoki.

1. Taula. Fab-en titulazio kalorimetrikoa. Lortutako balio numerikoak: erreakzioen estekiometria (N), disoziazio oreka konstantea (K_D), entalpia aldaketa (ΔH), ekarpen entropikoa ($-T\Delta S$) eta Gibbsen energia askearen aldaketa (ΔG). ORIGIN 7.0 (MicroCal, Northampton, MA) programa erabiliz lortu ziren.

Fab	K_D (nM)	N	ΔH (kcal/mol)	$-T\Delta S$ (kcal/mol)	ΔG (kcal/mol)
WT	32,4	1,12	-6,73	-3,49	-10,22
S100cF	21,5	1,24	-3,31	-7,15	-10,46
S30R-N52R	46,3	1,17	-6,24	-3,73	-9,97
S30R-N52R S100cF	41,3	1,16	-2,30	-7,77	-10,07

S30R-N52R mutazioan kargarik gabeko aminoazido polarrak positiboki kargatutako aminoazido polar bilakatzen dira. Honek ez du ez entropia ez entalpia aldaketa nabarmenik eragiten nahiko antzekoak baitira, eta ziur aski konformazioa ez da gehiegi aldatzen eta ez da berrantolaketa berririk eman behar.

S100cF mutazioaren kasuan, aldiz, aldaketa nabaria dago bai entalpian zein entropian, mutante konbinatuan ere nabaritzen dena. Kasu honetan aminoazido polarra (kargarik gabekoa) albo kate hidrofobikoa duen aminoazido ez-polar batez aldatzen da. Konplexua eratzerakoan antigorputz basatiaren jatorrizko aminoazidoak gainazaleko ur molekulak egokitzeko gaitasuna izango luke, edo hidrogeno zubi inter- edo intramolekularrak sortzeko, fenilalaninarekin mutaterakoan gertatu ezingo litzatekena. Baina “Entalpia-Entropia konpentsazio” termodinamikoa behatzen da, ekarpen entropikoaren faboragarritasunaren emendioak gidatuta, azkenean ΔG balio parekoa lortuz. Ekarpen entropikoaren emendia ulertzeko azalpen posible bat

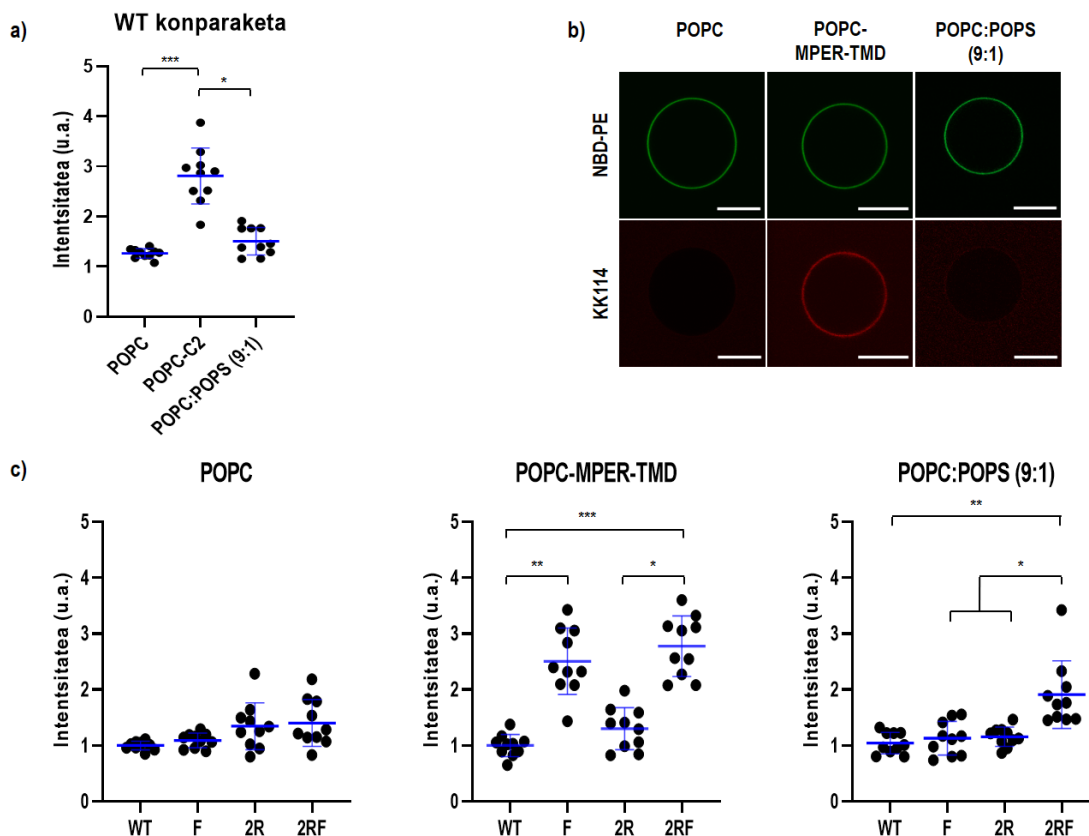
galdutako askatasun graduakin erlazionatuta dago: 100c posizioa mugikorra den begizta batean kokatuta dago, jatorrizko aminoazidoak mugikortasun hori bermatzen du, eta konplexua eratzerakoan begiztaren mugikortasuna galtzen da, askatasun graduak galduz. Mutatzerakoan, ordea, Fab-aren oinarrizko egitura jada nolabait begizta ezagumenduan hartzen duen konformazioan finkatzen da (beharbada elkarrekintza hidrofobiko intramolekularren ondorioz begiztaren gogordura gertatzen da) eta peptidoa lotzerakoan ez dira askatasun graduak galtzen. Honek, entropia konformazionalaren ekarpena faboratuko luke, horrela ekarpen entropiko globala handituz jatorrizko egiturarekin alderatuta.

3.3. LOTURAREN HOBEEKUNTZA MINTZ MIKROINGURUNEAN

ITC bidez Fab-en afinitateen artean desberdintasun esanguratsurik ikusten ari ez bagara ere, kontuan izan behar da entsegu hau peptidoa disoluzioan egonda egin zela, eta errealitatean epitopoa mintz mikroingurunean dagoela, beraz ez gara ikusten ari egitura natiboan dagoen epitopoa entsegu honekin. Gainera, lan honetan diseinatutako 10E8 mutanteek dituzten aldaketak mintzarekiko elkarrekintza emendatzeko bideratuta daude, ez peptidoarekiko lotura zuzenean indartzera. Hori dela eta, proposatzen dugu Fab guztiek afinitate berdintsua izatearen arrazoia mintz mikroingurunearen falta dela.

Birusean aurkitzen den mintz mikroingurunearen testuinguruan Fab ezberdinen lotura aztertzeke, GUV ereduak prestatu ziren. 3 populazio ezberdinen kontra testatu ziren Fab-ak: POPC (kontrol negatiboa, mintzarekiko lotura inespezifikoa gertatzen den aztertzeke), POPC-MPER-TMD (kontrol positiboa eta epitopoa mintzean egonda lotura aztertzeke) eta POPC:POPS (9:1) (bereziki S30R-N52R mutazioaren eragina aztertzeke fosfolipido anionikodun mintzen testuinguruan) (**5. Irudia**).

5.a Irudian eta **5.b Irudian** ikusi daitekeen moduan, 10E8 Fab basatia ez da POPC GUVetara batzen espontaneoki, ezta POPC:POPS (9:1) GUVetara ere. Aldiz, berrosatutako MPER-TMD peptidoa daramaten POPC-MPER-TMD GUVekin inkubatzean, antigorputzaren intentsitatea 3 aldiz handiagoa da besikularen inguruan. Beraz, mintzak fosfolipido anionikoak izateak ez du ia eraginik antigorputzaren loturan 10E8 WT Fab-aren kasuan. Izan ere, lotura nabarmena GUVak Fab-aren epitopoa duen MPER-TMD peptidoaren presentzian bakarrik detektatzen da.



5. Irudia. Fab-en batuketaren azterketa mintz mikroingurunean. Mintzaren eragina aztertzeko eredu gisa GUVen 3 populazio prestatu ziren: POPC, POPC-MPER-TMD (10E8 Fab-aren epitopoa duen peptidoa) eta POPC:POPS (9:1). Intentsitate erlatiboa unitate arbitrarioetan. (a) 10E8 Fab basatiarenaren emaitzak 3 GUV populazioen kontra, puntu bakoitza GUV batetatik eratorritako datua da (datu absolutuak irudikatuta), urdinez batazbestekoa. (b) Fab 10E8 WT-aren fluoreszentiako mikroskopia konfokaleko argazkiak 3 GUV populazioen kontra, berdez GUVen mintza markatzen duen NBD-PE eta gorri antigorputza markatzen duen KK114, eskala-barra 10 μm . (c) Aztertutako 4 Fab-en emaitzak 3 GUV populazioen kontra, puntu bakoitza GUV batetatik eratorritako datua da (datuak populazio bakoitzaren WT batezbestekoarekiko normalizatuta), urdinez batazbestekoa. Adierazgarritasun estatistikoa bariantzaren noranzko bakarrekiko analisi anizkoitzentzako Kruskal-Wallis testa bidez zehaztu zen. Markatuta ageri ez bada, ezberdintasunak ez ziren adierazgarriak: $p > 0,01$; bestela: * $p < 0,01$; ** $p < 0,001$; *** $p < 0,0001$.

5.c Irudian behatzen den moduan, batetik, POPC GUVetan ez dago ezberdintasun adierazgarririk mutanteen loturan Fab basatiarekin alderatuz, nahiz eta S30R-N52R eta S30R-N52R S100cF mutanteek balio heterogenoagoak izan. Beraz, ezein mutaziok ez du loturaren emendaketarik sustatzen fosfolipido anioniko gabeko eta antigeno gabeko mintzetan.

Beste aldetik, POPC-MPER-TMD GUVetan estatistikoki adierazgarriak diren ezberdintasunak behatzen dira WTrekin alderatuz S100cF ($p < 0,001$) eta S30R-N52R S100cF ($p < 0,0001$) mutanteen kasuan, baita S30R-N52R eta S30R-N52R S100cF-ren artean ere ($p < 0,01$). Fosfolipido anionikorik gabeko baina antigenoa duten mintzetan fenilalaninaren ordezkapenak gutxi gorabehera 2,5 aldiz emendatzen du lotura basatiarekiko, eta mutazioen konbinazioak (S30R-N52R-S100cF) gutxi gorabehera 2,8 aldiz. Beraz, mutaturako hondarrek MPER peptidoa txertatua duten karga netorik gabeko mintzekin nolabaiteko elkarrekintza ezartzen dute, lotura faboratzen duena. Fenilalanina hondarrak arginina hondarrek baino ekarpen handiagoa eragiten du loturaren emendaketan, hidrofobizitateak kargak baino eragin handiagoa duelako karga neutroa duen POPCz osaturako mintzarekiko elkarrekintzan.

Azkenik, POPC:POPS (9:1) GUVetan ezberdintasun estatistiko adierazgarriak behatzen dira S30R-N52R S100cF-rentzat, bai Fab basatiarekiko ($p < 0,001$), S100cF mutantearekiko ($p < 0,01$) zein S30R-N52R mutantearekiko ($p < 0,01$). Aipatzekoa da ez dela ezberdintasun estatistikorik behatzen S30R-N52R eta S100cF Fab basatiarekin alderatzerakoan. Antigenorik gabeko baina fosfolipido anionikoak dituzten mintzetan, S30R-N52R S100cF mutazioak gutxi gorabehera 2 aldiz emendatzen du lotura. Hala ere, mutazio bakoitzaren ekarpena ezezaguna da, eta efektu sinergikoa dutela dirudi, mutazio bakoitzak bere aldetik ez baitu eragin adierazgarririk.

Badirudi S100cF ordezkapenak Fab-aren mintzarekiko elkarrekintzan ekarpen hidrofobikoa emendatzen duela, bereziki jada Fab-ak epitopoa batu duenean. Izan ere, mutazio indibidualaren kasuan, ez da aldaketarik behatzen POPC eta POPC:POPS (9:1) GUVen kasuan, baina emendaketa oso adierazgarria behatzen da POPC-MPER-TMD GUVetan. Beraz, S100cF mutazioak k_{off} abiadura konstantean bereziki eragina duela proposatzen dugu, hau txikituz. Hau da, Fab-a lotu eta F mutazioak mintz inguruan eragiten dituen elkarrekintza hidrofobikoak Fab-a epitopotik askatzea zailtzen du. Kasu honetan nahiz eta elkarrekintza hidrofobikoa izan, Fab-ak bere espezifikotasuna mantentzen du, ez baitu mintzekin elkarrekiten epitoporik ez dagoenean.

S30R-N52R mutantearen kasuan, kontzentrazio lokalaren igoeraren eragina Fab-epitopo loturarekiko independentea dela dirudi. Izan ere, pareko hobekuntza erakusten

du mutante honek 3 GUV populazioen kasuan, nahiko txikia kasu guztietan. Nahiz eta loturaren hobekuntzan eragin adierazgarria ez izan, Fab basatiarekin alderatuta emaitzen heterogeneotasun handiagoa behatzen da. Hala ere, lortutako emaitzak ez dira esanguratsuak, eta beharbada Fab-aren kontzentrazio handiagoak erabili beharko lirateke ezberdintasun adierazgarriak behatzeko.

Bien artean, S100cF-k eragin handiagoa duela dirudi. Gainera, biak konbinatzerakoan oraindik ezaguna ez den mekanismo baten bitartez efektu sinergikoa dutela dirudi. Hala ere, konbinazioak argi uzten du argininen mutazioek nolabaiteko elkarrekintza sorrarazten dutela mintz mikroingurunean bereziki fosfolipido anionikodun mintzen kasuan. Baliteke mutazio hauek Fab-a mintzaren gainazalera zuzentzea (fosfolipidoen buru fosfato taldeen karga negatiboaren eraginez), mintzetik gertuago egotea ahalbidetuz eta bestelako elkarrekintzak gertatzea erraztuz. Behin mintzetik gertu, fenilalaninaren hidrofobizitateak Fab-a mintzarekin elkarrekiten mantentzea ahalbidetuko luke. Edo zuzenean bi elkarrekintza moten, hidrofobikoaren eta elektrostatikoaren baturak Fab-a mintzean mantentzeko indar-ataria gaintzea. Nolanahi ere, argi geratzen da bi mutazioek mintzarekiko elkarrekintza sustatzen dutela, eta Fab-aren lotura emendatzen dutela mintz mikroingurunean.

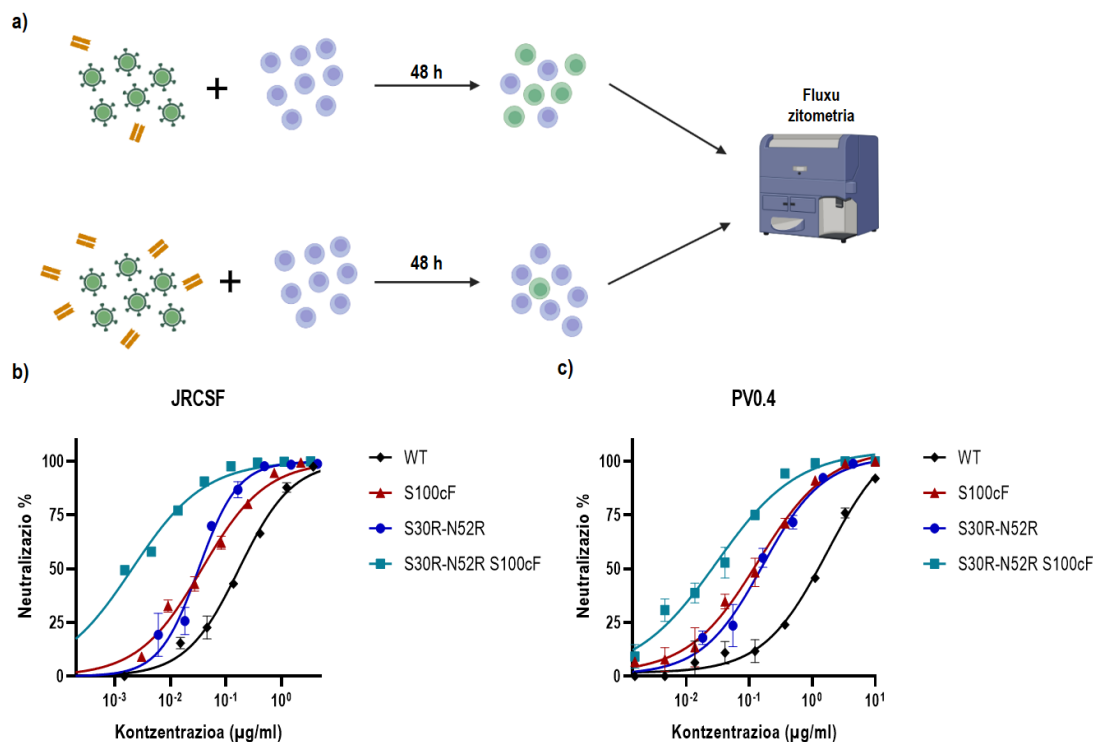
Azkenik, aipatzekoa da ere zenbait populazioek heterogeneotasuna erakusten dutela, eta entseguren emaitzen errorea murrizteko eta ezberdintasun txikienak behatzeko GUV kantitate handiago bat analizatu beharko litzatekela.

3.4. INFEKZIOAREN NEUTRALIZAZIOAREN HOBEKUNTZA *IN VITRO*

Mutazioen eragina antigorputzen funtzio biologikoan aztertzeko, neutralizazio saioak burutu ziren pseudobirusak erabiliz (**6. Irudia**). Entsegurako antigorputzen neutralizaziorako sentikortasun maila desberdina duten JRCSF eta PV0.4 pseudobirusak erabili ziren.

6.b Irudian ikusi daitekeenez, JRCSFekin egindako entseguren kasuan mutante guztiek antigorputzaren potentzia hobetzen dute, hau da, neutralizazio maila berbera behatzeko beharrezko antigorputz kontzentrazio txikiagoa nahikoa da. S100cF mutazioak eta argininen ordezkapenak eragindako potentziaren emendioa bat dator aurrez egindako ikerketekin (Rujas et al., 2018, Kwon et al. 2018). **2. Taulako** IC₅₀ balioak aztertuz, S100cF eta S30R-N52R mutazio indibidualek pareko eragina

erakusten dute, gutxi gorabehera x5 hobekuntza neutralizazioan. Aldiz, bi mutazioen konbinazioak, S30R-N52R S100cF-k, gutxi gorabehera x84,7 hobekuntza eragiten du.



6. Irdia. Mintzaren elkarrekintza emendatzeak infekzioaren neutralizazioaren hobekuntza eragiten du *in vitro*. (a) Neutralizazio saioaren prozeduraren diagrama (BioRender-etik zenbait irudi aterata). (b) 4 Fab-en neutralizazioaren titulaketa JRC5F pseudobirusaren kontra. (c) 4 Fab-en neutralizazioaren titulaketa PV0.4 pseudobirusaren kontra. Neutralizazio kurben puntuak bi errepliken batez bestekoak dira.

6.c Irdian, PV0.4rekin, pareko emaitzak lortzen dira, eta berriro mutante gutziek eragin positiboa dute neutralizazio potentzian. **2. Taulako** IC_{50} balioak aztertuz, S100cF-k eta S30R-N52R-k x12,4 eta x10,6 hobekuntza eragiten dute neutralizazioan hurrenez hurren. Bi mutazioen konbinazioak, S30R-N52R S100cF-k, gutxi gorabehera x59,3 hobekuntza eragiten du neutralizazioan.

Beraz, lortutako emaitzek mintzaren elkarrekintza emendatzeak infekzioaren neutralizazioaren *in vitro* hobekuntza eragiten duela frogatzen dute. Albo kate hidrofobikoa (F) zein positiboki kargatuak (2R) mintzaren mikroingurune errealarekin elkarrekintzak ezartzeko gai dira, neutralizazio potentzia emendatuz.

Mutazioek neutralizazioaren hobekuntzari egiten dioten ekarpenari dagokionez, S100cF ordezkapenak eta S30R-N52R mutazioek pareko eragin indibiduala dute bi pseudobirusen kasuan. Aldiz, konbinazioak efektu sinergikoa erakusten du, mutazioen esperotako efektu gehigarria baino x8,4 eta x2,6 hobekuntza behatzen baita JRCSF eta PV0.4rentzako hurrenez hurren. Hala ere, mintzarekiko elkarrekintzak sustatzearen estrategiak eragin positiboa du bi kasuetan, zabaldu daitekeen estrategia dela iradokiz.

2. taula. 10E8 mutanteek neutralizazioaren emendioa eragiten dute *in vitro*. Testatutako 4 Fab-en IC₅₀ balioak kalkulatu ziren JRCSF eta PV0.4 pseudobirusen titulazioen doikuntzatik. Hobekuntza (aldiak), 10E8 mutantearen IC₅₀ balioa basatiarenarekin alderatuta kalkulatuta dago.

Fab	JRCSF		PV0.4	
	IC ₅₀ (µg/ml)	Hobekuntza (x)	IC ₅₀ (µg/ml)	Hobekuntza (x)
WT	0,173	-	1,72	-
S100cF	0,037	4,66	0,14	12,38
S30R-N52R	0,032	5,34	0,16	10,56
S30R-N52R S100cF	0,002	83,68	0,03	59,29

Sinergia mekanismoa oraindik ezezaguna da, baina (1) edozein orden tenporalean independenteki gertatzen diren eta elkarri laguntzen dioten lotura mekanismoetan eragina izatearen ondoriozko sinergia edo (2) Fab-aren lotura mekanismoaren pausu sekuentzialetan eragina izatearen ondoriozko sinergia izan daiteke.

1. mekanismoa: behin Fab-a lotzerakoan mutanteek sustatutako mintzarekiko elkarrekintzek, bai hidrofobikoak zein elektrostatiakoak, Fab-a askatzea ekiditen dute k_{off} abiadura konstantea txikituz eta ondorioz K_D oreka konstantea txikituz.

2. mekanismoa: argininak gehitzeak Fab-a mintzarekiko hurbiltzea (mintzeko fosfolipido anionikoen negatiboki kargatutuko buruarekin interakzionatuz) eragiten du, Fab-a mintzetik gertuago egotea ahalbidetuz. Gainera, Fab-a epitopoa ezagutzeko orientazioan egotea faboratzen du, mutazioak erakarpena sustatzen duelako jada mintzatik gertu egon behar den Fab-aren gainazalaren eta mintz gainazalaren artean. Honek k_{on} abiadura konstantea handituko luke. Ondoren, lehenengo mekanismoaren

kasuan bezala, Fab-a lotzerakoan fenilalaninak sustatutako mintzarekiko elkarrekintza hidrofobikoek, Fab-a askatzea ekiditen dute k_{off} abiadura konstantea txikituz. Prozesu osoak, K_D oreka konstantea txikitzen du. Mintz ingurunean egindako batuketa saioek mekanismo hau indartzen dute.

Edonola ere, mutazioak haien artean gertu egoteak sinergia efektua bultzatzen du. Alde batetik, eraturako elkarrekintzek sortutako indar bektoreek noranzko bera izanik, indar erresultantea efektu nabaria izateko atari mailaraino ailegatzea ahalbidetu dezakete, Fab-a mintzera elkartzea sustatuz. Bestetik, mutazioek sortutako elkarrekintzek eragindako Fab-aren orientazioak elkarrekite-molekulen arteko distantzia txikitu dezake. Ondorioz, elkarrekintzen indarra elkarrekiten duten molekulen arteko distantziaren menpekua denez, mutazio batek eragiten duen gerturaketa beste mutazioak eragindako elkartze-indarraren moduluan efektua izango du eta alderantziz, efektu sinergikoa eragingo lukeena.

Kontuan izan behar da ere lotura prozesua jarraia dela, beraz proposatutako mekanismoetan baino askoz ere elkarrekintza gehiagoetan eragina izango dutela mutazioek, eta ziur asko hainbat mailetan atzeraelikapen bat emango da sortarazitako elkarrekintzen artean. Hortaz, proposaturiko mekanismoak sinplifikazioak baino ez dira, zeinetan mutazioak eragiten duen aldaketa nagusia (eragin handiena duena prozesuan) baino ez den kontuan hartu.

4. ONDORIOAK

Lan honetan 10E8 Fab mutanteak eraiki ziren mintzarekin elkarrekintzak sustatzeko eta Fab basatiaren afinitatea emendatzeko. Horretarako, bibliografian deskribatutako 10E8 S30R-N52R antigorputza, 10E8 S100cF antigorputza eta bibliografian egin ez den aurreko bien mutazioak konbinatzen dituen 10E8 S30R-N52R S100cF antigorputza eraiki ziren, hauen eragin konbinatua aztertze eta ulertze asmoz.

Eraikitako Fab-mutanteak laborategian adierazi eta ohiko purifikazio prozedura bat jarraituz purifikatu daitezke homogeneitateraino. Gainera, laborategi baldintzetan egonkorrak, funtzionalak eta espezifikoak direla bermatu zen ELISA baten bidez MPER peptido ibilgetuaren kontra.

Kalorimetria isotermozko titulazio bidez, eraikitako mutanteak $10E8$ Fab basatiaren afinitate oso antzekoa zutela frogatu zen peptidoa disoluzioan egonda. Beraz, mutazioek ez diote eragiten peptidoarekiko lotura afinitateari soluzioan. Hala ere, S100cF mutazioak ekarpen termodinamikoen aldaketa bereziki handia sustatzen du, entropia konformazionalarekin lotu izan dena (**7.a Irudia** eta **7.b Irudia**).

GUV ereduaren eta fluoreszentziako mikroskopia konfokalaren bitartez $10E8$ Fab mutanteak mintzaren mikroingurunean egonda loturaren emendio bat behatu zen. Beraz, ITCko eta GUVetako emaitzak kontuan izanda, loturaren emendioaren arrazoia aminoazido mutatuaren eta mintzaren artean ematen diren elkarrekintzen sustaketa da.

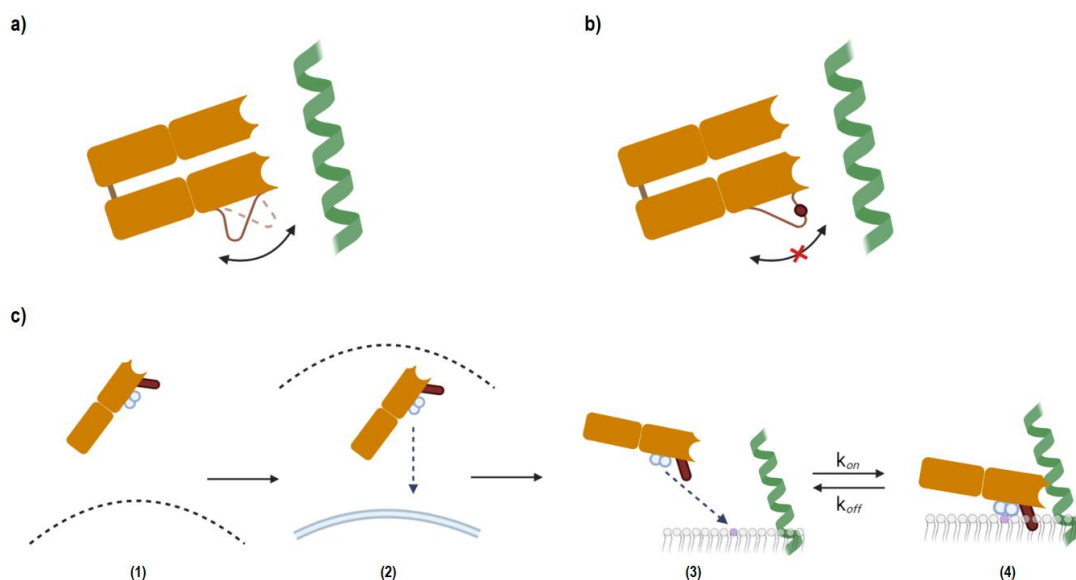
Eraikitako Fab-en funtzio biologikoa (infekzioaren inhibizioa) aztertzeko neutralizazio saiok burutu ziren pseudobirusak erabiliz. Fab mutanteen IC_{50} balioen hobekuntza nabaria behatu zen basatiarekiko alderatuta. Lortutako emaitzek GUVetan, mintz mikroingurunean, behatutako afinitatearen emendioa neutralizazio potentzia handiago batean itzultzen dela in vitro argi uzten dute.

Fluoreszentiako mikroskopia konfokaleko emaitzak eta neutralizazioetako emaitzek, S100cF eta S30R-N52R mutazioen artean afinitatearen emendaketari dagokionez eragin sinergikoa dagoela agerian uzten dute mintz mikroingurunearen presentzian. Sinergiaren azpian dagoen mekanismo molekularra oraindik ezezaguna da, baina eztabaidan oinarri posible bat proposatzen dugu (**7.c Irudia**).

Beraz, lan honetan, $10E8$ antigorputzaren afinitatea emendatzea lortu da mintzarekiko elkarrekintzen sustapenaren bidez, neutralizazio potentzia nabarmenki handituz. Gainera, epitopoarekin zuzenean elkarrekiten ez duten jatorrizko antigorputzaren aminoazido periferikoen mutazio arrazionalak, jatorrizko egituraren intereseko ezaugarriak (e.g. espezifitate, espektro zabala eta egonkortasuna) mantentzea ahalbidetzen du, antigorputzari ezaugarri berriak gehitzen zaizkion bitartean. Albo kate positiboek edo hidrofobikoek mintzarekin intereseko elkarrekintzak sustatzen dituztela behatu dugu, hobekuntza sinergikoa eraginez, nahiz eta elkarrekintza horien natura eta afinitatea emendatzeko mekanismoa ezberdina izan kasu bakoitzean.

Etorkizunean ikerketa honetan egindako optimizazioa erabilgarria dela ziurtatzeko, mutanteen polierreaktibitatea zehaztu beharko litzateke giza zelulen panel baten kontra, espezifikotasuna mantentzen dutela eta seguruak direla bermatzeko. Horrekin batera,

IgG moduan adierazterakoan Fab-en antzeko jokaera dutela bermatu behar da. Ondoren, gainera, antigorputz mutatuen *in vivo* egonkortasuna eta neutralizazio gaitasuna aztertu beharko lirateke, ingurune horretan *in vitro* eragina ez duten eta kontuan hartzen ez diren bestelako aldagaiak baitaude.



7. Irudia. Mutazioek loturan eragindako aldaketek oinarri fisikoa dute. (a) 100c posizioa begizta mugikor batean dago kokatuta, 10E8 Fab-a MPER peptidoa soluzioan batzerakoan begizta immobilizatzen da. (b) 100c posizioko Ser-a, Phe-z ordezkatzek (borobil marroia) begizta finko mantentzen du oinarriko egiturari, eta ez dira askatasun graduak galtzen lotura prozesuan. (c) Mintz mikroingurunean S100cF eta S30R-N52R mutazioek Fab-aren afinitatean duten eraginaren oinarri fisikoa azaltzeko proposaturiko modeloa (Phe-a obalo marroi bidez eta Arg-ak borobil urdinez irudikatuta): (1) Fab-aren (albotik ikusita) difusioa *bulk* fasean (muga geruza aldizkako lerroaz irudikatuta). (2) Muga geruzaren zeharkapena (elkarrekintzen indar erresultantea nabaritzen hasten den distantzia), eta argininek zuzendutako indar elektrostatikoen erakarpina fosfolipidoen buru anionikoekiko (mintza urdinez). (3) Elkarrekintza elektrostatikoak bideratutako Fab-aren orientazioa, k_{on} handituz (fosfolipido anionikoen buruak morez irudikatuta). (4) Fab-epitopo lotura eta fenilalanina hondarraren barneraketa mintzaren fase hidrofobikoan, Fab-a ainguratuz eta k_{off} txikituz. Panel guztietan 10E8 Fab-a laranja eta MPER berdez irudikatu izan dira (BioRender bidez eginda).

Teorikoki, 10E8 antigorputzaren optimizazioarekin jarraitzea posiblea da lan honetako estrategia jarraituz. Horretarako, mintzarekiko elkarrekintzen duen gainazala gehiago optimizatu beharko litzateke: (1) Mutatzerakoan antigorputzaren ezaugarriak kaltetzen ez dituzten posizioak zehaztu. (2) Posizio bakoitzean eragin handiena duen mutazioa

identifikatu. (3) Mutazioen konbinazio egokiak bilatu. Bereziki hirugarren puntuarentzako garrantzitsua da mutazioen eraginaren ekintza mekanismoa ulertzea. Izan ere, mutazio konbinatuek afinitatean eta espezifikotasunean duten eragin bateratua, mutazio indibidualen mekanismoarekin estuki erlazionatuta dago. Beraz, potentzia hobetzen duen mutazio bat deskribatzerakoan, haratago joan behar gara eta hobekuntzaren eragilea den mekanismoa definitzeko esfortzua egin behar dugu, optimizazio arrazionalaren arloan ezinbesteko ezagutza baita.

Beste alde batetik, lan honetan jarraitutako optimizazio estrategia (mintzarekiko elkarrekintzak sustatzea) mintzetik gertu epitopoa duten beste antigorputzen optimizaziorako erabilgarria izan daitekeela proposatzen dugu. Minbiziaren aurkako immunoterapien testuinguruan, adibidez, B lerroko minbiziak tratatzeko erabiltzen den Rituximab (CD20 mintzeko hartzailea ezagutzen duena) antigorputzaren afinitatea emendatzeko erabili daiteke.

Amaitzeko, antigorputzen ingeniarietza etorkizuneko biofarmakoen garapenerako garrantzia irabazten joango dela espero da (eskaintzen duten moldagarritasuna dela medio), proteinen egiturari buruz ezagutza zabalagoa dugun heinean. Beraz, antigorputzen modifikazio arrazionalerako mekanismo berri edo egokiagoak garatzeak berebiziko garrantzia du, bai eta modifikazio horiek intereseko emaitza eragiteko erabiltzen duten mekanismoa zehaztea ere. Lan honek agerian uzten du mintzarekiko elkarrekintzen manipulazioaren potentziala, baita manipulazio ezberdinen konbinazioak haien efektuan duen eragin faboragarria ere.

5. BIBLIOGRAFIA

Apellániz, B., García-Sáez, A. J., Huarte, N., Kunert, R., Vorauer-Uhl, K., Katinger, H., Schwille, P., & Nieva, J. L. (2010). Confocal microscopy of giant vesicles supports the absence of HIV-1 neutralizing 2F5 antibody reactivity to plasma membrane phospholipids. *FEBS letters*, 584(8), 1591–1596.

Bar-On, Y., Gruell, H., Schoofs, T., Pai, J. A., Nogueira, L., Butler, A. L., Millard, K., Lehmann, C., Suárez, I., Oliveira, T. Y., Karagounis, T., Cohen, Y. Z., Wyen, C., Scholten, S., Handl, L., Belblidia, S., Dizon, J. P., Vehreschild, J. J., Witmer-Pack, M., Shimeliovich, I., ... Nussenzweig, M. C. (2018). Safety and antiviral activity of

combination HIV-1 broadly neutralizing antibodies in viremic individuals. *Nature medicine*, 24(11), 1701–1707.

Brügger, B., Glass, B., Haberkant, P., Leibrecht, I., Wieland, F. T., & Kräusslich, H. G. (2006). The HIV lipidome: a raft with an unusual composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(8), 2641–2646.

Burton, D. R., & Hangartner, L. (2016). Broadly Neutralizing Antibodies to HIV and Their Role in Vaccine Design. *Annual review of immunology*, 34, 635–659.

Cerutti, N., Loredó-Varela, J. L., Caillat, C., & Weissenhorn, W. (2017). Antigenic membrane proximal external region antibodies and the art of using the membrane for neutralization. *Current opinion in HIV and AIDS*, 12(3), 250–256.

Fischer, W., Giorgi, E. E., Chakraborty, S., Nguyen, K., Bhattacharya, T., Theiler, J., Goloboff, P. A., Yoon, H., Abfalterer, W., Foley, B. T., Tegally, H., San, J. E., de Oliveira, T., Network for Genomic Surveillance in South Africa (NGS-SA), Gnanakaran, S., & Korber, B. (2021). HIV-1 and SARS-CoV-2: Patterns in the evolution of two pandemic pathogens. *Cell host & microbe*, 29(7), 1093–1110.

Hua, C. K., & Ackerman, M. E. (2016). Engineering broadly neutralizing antibodies for HIV prevention and therapy. *Advanced drug delivery reviews*, 103, 157–173.

Huang, J., Ofek, G., Laub, L., Louder, M. K., Doria-Rose, N. A., Longo, N. S., Imamichi, H., Bailer, R. T., Chakrabarti, B., Sharma, S. K., Alam, S. M., Wang, T., Yang, Y., Zhang, B., Migueles, S. A., Wyatt, R., Haynes, B. F., Kwong, P. D., Mascola, J. R., & Connors, M. (2012). Broad and potent neutralization of HIV-1 by a gp41-specific human antibody. *Nature*, 491(7424), 406–412.

Huang, Y., Yu, J., Lanzi, A., Yao, X., Andrews, C. D., Tsai, L., Gajjar, M. R., Sun, M., Seaman, M. S., Padte, N. N., & Ho, D. D. (2016). Engineered Bispecific Antibodies with Exquisite HIV-1-Neutralizing Activity. *Cell*, 165(7), 1621–1631.

Kwon, Y. D., Chuang, G. Y., Zhang, B., Bailer, R. T., Doria-Rose, N. A., Gindin, T. S., Lin, B., Louder, M. K., McKee, K., O'Dell, S., Pegu, A., Schmidt, S. D., Asokan, M., Chen, X., Choe, M., Georgiev, I. S., Jin, V., Pancera, M., Rawi, R., Wang, K., ... Kwong, P. D. (2018). Surface-Matrix Screening Identifies Semi-specific Interactions

that Improve Potency of a Near Pan-reactive HIV-1-Neutralizing Antibody. *Cell reports*, 22(7), 1798–1809.

Mendoza, P., Gruell, H., Nogueira, L., Pai, J. A., Butler, A. L., Millard, K., Lehmann, C., Suárez, I., Oliveira, T. Y., Lorenzi, J., Cohen, Y. Z., Wyen, C., Kümmerle, T., Karagounis, T., Lu, C. L., Handl, L., Unson-O'Brien, C., Patel, R., Ruping, C., Schlotz, M., ... Nussenzweig, M. C. (2018). Combination therapy with anti-HIV-1 antibodies maintains viral suppression. *Nature*, 561(7724), 479–484.

Montero, M., van Houten, N. E., Wang, X., & Scott, J. K. (2008). The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 72(1), 54–84.

Rujas, E., Caaveiro, J. M., Partida-Hanon, A., Gulzar, N., Morante, K., Apellániz, B., García-Porras, M., Bruix, M., Tsumoto, K., Scott, J. K., Jiménez, M. Á., & Nieva, J. L. (2016). Structural basis for broad neutralization of HIV-1 through the molecular recognition of 10E8 helical epitope at the membrane interface. *Scientific reports*, 6, 38177.

Rujas, E., Leaman, D. P., Insausti, S., Ortigosa-Pascual, L., Zhang, L., Zwick, M. B., & Nieva, J. L. (2018). Functional Optimization of Broadly Neutralizing HIV-1 Antibody 10E8 by Promotion of Membrane Interactions. *Journal of virology*, 92(8), e02249-17.

Zhu, P., Liu, J., Bess, J., Jr, Chertova, E., Lifson, J. D., Grisé, H., Ofek, G. A., Taylor, K. A., & Roux, K. H. (2006). Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature*, 441(7095), 847–852.

Zwick, M. B., Jensen, R., Church, S., Wang, M., Stiegler, G., Kunert, R., Katinger, H., & Burton, D. R. (2005). Anti-human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) antibodies 2F5 and 4E10 require surprisingly few crucial residues in the membrane-proximal external region of glycoprotein gp41 to neutralize HIV-1. *Journal of virology*, 79(2), 1252–1261.