

UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

ESCOLA TÈCNICA SUPERIOR D'ENGINYERIA
AGRONÒMICA I DEL MEDI NATURAL



CARACTERIZACIÓN DE AGREGADOS PROTEICOS MEDIANTE TÉCNICAS MOLECULARES

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

ALUMNA: ALBA RUBERT ALBIOL

TUTOR: MIGUEL ÁNGEL GONZÁLEZ MARTÍNEZ

COTUTOR: JOSÉ LUIS LÓPEZ PAZ

Curso Académico: 2014/2015

VALENCIA, 07 de Julio de 2015



RESUMEN

En el presente trabajo se van a caracterizar agregados proteicos, en particular se estudiará la unión de inmunoglobulinas a proteínas de membrana, empleando métodos moleculares label-free como el DPI. Las proteínas receptoras se inmovilizarán covalentemente sobre la superficie del sensor, utilizando diferentes procedimientos de anclaje, y las proteínas ligando (IgGs humanas) se unirán a la superficie derivatizada, registrándose en continuo y a tiempo real, para ambos procesos, el incremento en el espesor, la masa y la densidad sobre la superficie del elemento sensor. Estos parámetros permiten cuantificar las afinidades de la interacción y su cinética, así como observar cambios conformacionales inducidos en las proteínas y/o moléculas participantes. Los resultados permitirán obtener información que ayude a comprender mejor el comportamiento de las proteínas en la interfase sólido-líquido y la dinámica conformacional de las interacciones proteína-proteína, y así conocer mejor su función.

Palabras clave: Inmunoglobulinas Polivalentes Intravenosas, Interferometría de Polarización Dual, proteínas de captura, interacción proteína-proteína.

Alumna: ALBA RUBERT ALBIOL

Valencia, 7 de Julio de 2015

Prof. Miguel Ángel González Martínez

Prof. José Luis López Paz

ABSTRACT

This work aims to characterize protein aggregates, in particular the binding of immunoglobulins to membrane proteins using label-free molecular methods such as DPI. Receptor proteins were immobilized covalently on the surface of the sensor, using different anchoring procedures, and ligand proteins (human IgGs) will bind to the derivatized surface, displaying continuously and in real time the increase in thickness, mass and density on the surface of the sensing element. These parameters allow quantifying the interaction affinities and kinetics, as well as observing induced conformational changes in proteins and / or participant molecules. The results will allow obtaining information to better understand the behaviour of proteins at the solid-liquid interface and the conformational dynamics of protein-protein interactions, and thus better comprehend their function.

Key words: Intravenous Polyvalent Immunoglobulins, Dual Polarization Interferometry, capture proteins, protein-protein interaction.

Student: ALBA RUBERT ALBIOL

Valencia, 7th July 2015

Dr. Miguel Ángel González Martínez

Dr. José Luis López Paz

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutor Miguel Ángel González Martínez por la oportunidad de realizar este trabajo fin de grado en este departamento, por su apoyo, comprensión e implicación en todo. También quiero agradecer a mi co-tutor, José Luis López Paz, por su ayuda en el manejo de un equipo con el que no siempre es fácil lidiar.

En segundo lugar, quiero dar las gracias a David Giménez Romero, profesor e investigador especialista en química física porque sin su inestimable colaboración este trabajo fin de grado no se podría haber llevado a término.

Sin ninguna duda, doy las gracias a mi familia, sin ellos todo esto nunca hubiese sido posible. Agradezco a mis padres todo su esfuerzo, que me ha permitido estudiar estos años, su apoyo incondicional y la motivación que me han transmitido desde siempre. Quiero dar las gracias también a mi hermana por escucharme e intentar comprenderme, que sé que no es siempre fácil.

Finalmente, quiero agradecer a mis amigos y compañeros de estudios por todos los momentos vividos desde que empezamos esta aventura con la Biotecnología y todos los que todavía nos quedan por vivir.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	INMUNOGLOBULINAS POLIVALENTES INTRAVENOSAS	1
1.2	INTERFEROMETRÍA DE POLARIZACIÓN DUAL	4
1.3	MÉTODOS DE INMOVILIZACIÓN	7
1.3.1	<i>Inmovilización física o pasiva</i>	7
1.3.2	<i>Inmovilización química por enlace covalente</i>	8
1.3.3	<i>Inmovilización por bioafinidad</i>	9
1.4	PROTEÍNAS DE CAPTURA: PROTEÍNA A Y G	9
2	OBJETIVOS	10
3	MATERIALES Y MÉTODOS	11
3.1	REACTIVOS	11
3.2	INSTRUMENTACIÓN	12
3.2.1	<i>Interferómetro</i>	12
3.2.2	<i>Software</i>	13
3.3	MÉTODOS	13
3.3.1	<i>Estabilización y calibrado</i>	13
3.3.2	<i>Inmovilización vía ICPTS</i>	14
3.3.2.1	<i>Funcionalización de la superficie con grupos isocianato</i>	14
3.3.2.2	<i>Anclaje covalente de la proteína de captura e interacción con el anticuerpo</i>	15
3.3.3	<i>Inmovilización vía Sulfo-GMBS</i>	15
3.3.3.1	<i>Funcionalización de la superficie con grupos tiol</i>	15
3.3.3.2	<i>Anclaje covalente de la proteína de captura e interacción con el anticuerpo</i>	16
3.4	TRATAMIENTO DE DATOS	17
3.5	REGENERACIÓN DEL CHIP	17
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
4.1	INMOVILIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE CAPTURA	18
4.1.1	<i>Vía ICPTS</i>	18
4.1.2	<i>Vía Sulfo-GMBS</i>	19
4.1.3	<i>Comparación de ambos métodos de inmovilización</i>	19
4.2	BLOQUEO DE CENTROS DE UNIÓN INESPECÍFICA: GELATINA Y ETANOLAMINA	20
4.3	ESTUDIO DEL MECANISMO DE UNIÓN PROTEÍNA DE CAPTURA – INMUNOGLOBULINA G	21
4.3.1	<i>Transiciones de fase estructurales: gráficos MATHIS</i>	21
4.3.2	<i>Ajuste final: Parámetros cinéticos y dinámica conformacional</i>	28
4.3.2.1	<i>Mecanismo propuesto para la interacción del dímero de hIgG</i>	28
4.3.2.2	<i>Comparación con la unión de hIgG monómero a la Proteína A</i>	31
5	CONCLUSIONES	34
6	BIBLIOGRAFÍA	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura esquemática de una inmunoglobulina G.	2
Figura 2. Aspectos clave en la detección de los patrones de interferencia.....	6
Figura 3. Estimación del índice de refracción (IR) y del espesor	7
Figura 4. Estructura química del Sulfo-GMBS.....	8
Figura 5. Equipo de Interferometría de Polarización Dual.....	12
Figura 6. Esquema de la funcionalización con el organosilano ICPTS.	15
Figura 7. Esquema de los pasos de inmovilización sobre la superficie sensora vía ICPTS	15
Figura 8. Esquema de los pasos de inmovilización sobre la superficie sensora vía Sulfo-GMBS.	16
Figura 9. Puntos clave seleccionados durante el procesado de las medidas.....	17
Figura 10. Registro del espesor y masa de la gelatina frente al tiempo.....	20
Figura 11. Registro del espesor y masa de la etanolamina (ETA) frente al tiempo	21
Figura 12. Gráfico MATHIS obtenido para la interacción entre el monómero y Proteína A inmovilizada vía ICPTS (arriba) y Sulfo-GMBS (abajo).....	23
Figura 13. Gráfico MATHIS obtenido para la interacción entre el dímero y Proteína A inmovilizada vía ICPTS (arriba) y Sulfo-GMBS (abajo).....	24
Figura 14. Gráfico MATHIS obtenido para la interacción entre el monómero y Proteína G inmovilizada vía ICPTS (arriba) y Sulfo-GMBS (abajo).....	26
Figura 15. Gráfico MATHIS obtenido para la interacción entre el dímero y Proteína G inmovilizada vía ICPTS (arriba) y Sulfo-GMBS (abajo).....	27
Figura 16. Evolución de la masa de dímero de hlgG depositada sobre la capa de Proteína G inmovilizada vía Sulfo-GMBS y ajuste del modelo.	30
Figura 17. Estructura de los agregados formados entre el dímero de hlgG y la Proteína G.	31
Figura 18. Estructuras de los agregados formados entre el monómero de hlgG y la Proteína A.	32

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparativa del espesor, masa y porcentaje de ocupación obtenidos para la inmovilización vía ICPTS y vía Sulfo-GMBS.....	19
Tabla 2. Parámetros del ajuste de la interacción del dímero de hlgG con la Proteína G inmovilizada vía Sulfo-GMBS.....	30
Tabla 3. Parámetros del ajuste de la interacción del monómero de hlgGs con la Proteína A inmovilizada vía ICPTS.	32

ABREVIATURAS

AFM	Microscopía de Fuerza Atómica
C1	Canal 1
C2	Canal 2
C3	Canal 3
CB	Carbonate Buffer o tampón carbonato
DPI	Interferometría de Polarización Dual
ETA	Etanolamina
Gly	Glicina
hIgG	Inmunoglobulina G humana
ICPTS	3-(trietoxisili)propil isocianato
IgG	Inmunoglobulina G
IgV	Inmunoglobulina intravenosa polivalente
IR	Índice de Refracción
MATHIS	Gráfico de la variación de masa frente a la variación del espesor (<i>Mass vs. Thickness</i>)
MPTS	Mercaptopropil trimetoxisilano
NR	Reflectometría de Neutrones
PBS	Phosphate buffered saline o tampón fosfato salino
QCM	Microbalanza de cristal de cuarzo
QCM-D	Microbalanza de Cristal de Cuarzo con factor de Disipación
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
SPR	Surface Plasmon Resonance o Resonancia de superficie de plasmón
Sulfo-GMBS	Éster de N-(γ -maleimidobutiriloxi)sulfosuccinimida
T _E	Modo Transversal Eléctrico
T _M	Modo Transversal Magnético
WHO	Organización Mundial de la Salud

1 INTRODUCCIÓN

El conocimiento detallado de las interacciones biomoleculares y los efectos que éstas ejercen sobre la función de las proteínas es vital para caracterizar y comprender los numerosos procesos biológicos globales en que participan, especialmente aquellos que tienen relación con fenómenos patológicos.

Las inmunoglobulinas polivalentes intravenosas (IgIVs) son productos de gran valor obtenidos a partir del fraccionamiento del plasma humano. Estas glicoproteínas son esenciales para el tratamiento de muchas patologías, especialmente las inmunodeficiencias. Para evitar cualquier efecto secundario, estos productos del plasma deben conservar intactas las características estructurales y funcionales propias de una inmunoglobulina G (IgG) (Radosevich, Burnouf 2010). Sin embargo, estos preparados contienen un bajo pero relevante porcentaje de agregados que puede influir en sus actividades inmunomodulatorias de las IgGs (Durandy et al. 2009). Esto es de gran trascendencia, pues aunque el mecanismo de acción de las IgGs como terapia sustitutiva en inmunodeficiencias es bien conocido, los mecanismos inmunomodulatorios que intervienen son más complicados de esclarecer. En cualquier caso, su uso clínico experimenta un constante incremento para enfermedades autoinmunes e inflamatorias (Radosevich, Burnouf 2010, Seite et al. 2008, Durandy et al. 2009). Por esta razón existe la necesidad de caracterizar y comprender en profundidad los mecanismos en los que intervienen las IgIVs.

Con el presente trabajo se pretende caracterizar los agregados de IgGs presentes en los preparados de IgIV. En particular, se estudiará la unión de las inmunoglobulinas (libres monoméricas y agregadas en dímeros) a proteínas de membrana, utilizando técnicas moleculares que no precisan marcaje. A través de distintos procedimientos de anclaje, se inmovilizarán covalentemente las proteínas receptoras sobre la superficie sensora, y las proteínas ligando, las inmunoglobulinas G humanas (hIgGs) libres o agregadas, se unirán a la superficie bioactivada.

Con este propósito, se registrará el cambio de diversos parámetros optogeométricos (incrementos del índice de refracción, espesor, la masa y la densidad), a tiempo real y en continuo, para diferentes procesos de interacción entre proteínas de captura y proteínas ligando. La variación de estos parámetros permitirá deducir los cambios conformacionales inducidos en las proteínas participantes así como cuantificar las afinidades de la interacción y su cinética.

1.1 Inmunoglobulinas Polivalentes Intravenosas

A partir del plasma humano se pueden obtener diversos productos de elevada relevancia para la industria farmacéutica por su valor terapéutico, dentro de los cuales se encuentran distintas proteínas *e.g.* factores de coagulación, albúmina y las IgGs. Entre estas últimas, las IgIVs son los medicamentos derivados del plasma sanguíneo más importantes, de mayor consumo y

demanda. El componente principal de este medicamento biológico son las proteínas plasmáticas de la fracción II obtenida durante el proceso de purificación del plasma de un grupo de donantes de sangre sanos (Radosevich, Burnouf 2010). El principio activo de estas preparaciones, que se administran por vía intravenosa, son las IgGs polivalentes procedentes de más de un millar de donantes, y por tanto contienen un amplio espectro de IgGs, siendo uno de los productos derivados del plasma más complejos en su modo de acción.

Las IgGs son glicoproteínas en forma de Y de unos 150 kDa (Figura 1) sintetizadas por las células B plasmáticas humanas en respuesta a estímulos inmunológicos, y tienen un papel fundamental en el sistema inmune, donde desempeñan funciones de neutralización de las sustancias extrañas que se encuentran en el organismo.

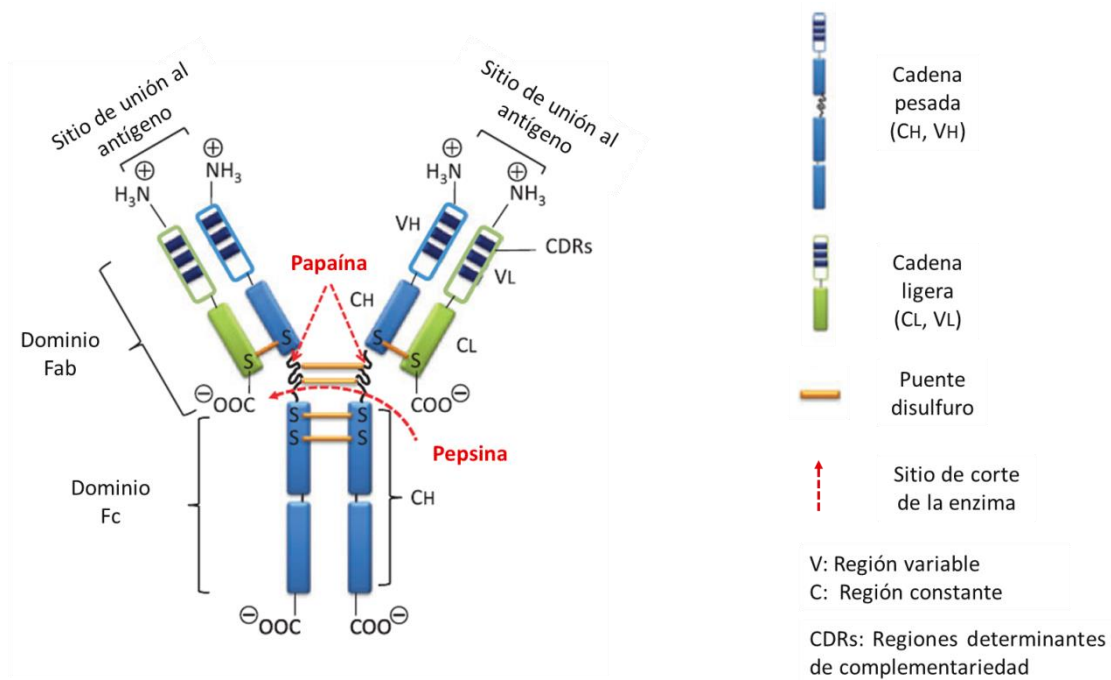


Figura 1. Estructura esquemática de una inmunoglobulina G, formada por una región variable (los dos fragmentos Fab) que se encargan de la unión al antígeno y de la región constante (Fc o región cristalizable), que incluye las funciones efectoras específicas. Los fragmentos Fab se componen de una cadena ligera (región constante C_L y región variable V_L) y parte de una pesada (región constante C_H y región variable V_H), mientras que los Fc tienen distintos dominios que exhiben diversas funciones como la interacción con macrófagos o neutrófilos. Como se muestra en la figura, el tratamiento con pepsina origina un fragmento F(ab')₂ y un dominio Fc. El corte con la enzima papaina divide la IgG en dos fragmentos Fab idénticos y un fragmento Fc. (Adaptado de Radosevich, Burnouf 2010).

Las IgIVs se emplean clínicamente como terapia de reemplazo para inmunodeficiencias primarias y secundarias, donde su mecanismo de actuación es bien conocido. Los anticuerpos que reconocen antígenos extraños, o bien anticuerpos IgG específicos contra patógenos comunes, son sustituidos por aquellos originados por el grupo de donantes. Las IgIVs se utilizan también para el tratamiento de síndromes autoinmunes, e incluso más recientemente se han encontrado indicaciones neurológicas. El mecanismo inmunomodulatorio de las IgGs administradas en estos casos es mucho más complejo e incluso, dependiendo de la concentración administrada, puede desempeñar funciones pro o antiinflamatorias (Durandy et al. 2009).

En la actualidad existen un gran número de preparados en los que el principio activo son las IgGs. Por ejemplo, tan solo en España hay aprobados hasta 9 preparados de este tipo (Guía clínica para el uso de inmunoglobulinas, 2011). Las IgIVs representan actualmente una opción terapéutica de elevado coste económico, gran demanda y limitada disponibilidad, ya que dependen de la disponibilidad del plasma y por tanto de las donaciones de sangre. Su demanda ha ido experimentado un incremento a lo largo de los últimos años y las previsiones demuestran una consolidación en dicha tendencia, principalmente debido a que se han demostrado beneficios clínicos más allá de la terapia sustitutiva de anticuerpos.

Las indicaciones no aprobadas por las agencias (*off-label*), donde se prescriben estos medicamentos a pacientes de grupos de edades o patologías distintas a las autorizadas, están ganando cada vez más peso en la industria. Sin embargo, algunas de ellas siguen siendo controvertidas, como el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer (Relkin 2014, Puli et al. 2014). Tanto es así, que para gestionar la demanda se ha elaborado una guía clínica para el uso óptimo de las mismas (Guía clínica para el uso de inmunoglobulinas, 2011) no solo para intentar paliar los problemas de suministro, sino también para evaluar los potenciales riesgos de su administración. En esta guía se pretende priorizar aquellas indicaciones para las cuales no existe una alternativa terapéutica efectiva (como las inmunodeficiencias primarias) o bien en los casos muy graves, y para la población pediátrica, el sector más vulnerable de la población. Estas limitaciones pretenden gestionar la demanda de estos productos, racionalizando su utilización y priorizando las indicaciones.

Las empresas farmacéuticas que producen las IgIVs están sometidas a estrictas medidas de control dictadas por los organismos reguladores como la Organización Mundial de la Salud (WHO) para asegurar la calidad del producto, la seguridad y la eficacia en el proceso de purificación (WHO, 2007), así como para minimizar el riesgo de presencia de patógenos, mantener su efectividad, etc. Estos criterios rígidos dan lugar a rendimientos bajos a pesar de que en los últimos años el proceso de obtención del producto ha experimentado un gran desarrollo para mejorar estos parámetros (Hooper 2008). Sin embargo, todavía existen algunos problemas que disminuyen el rendimiento *e.g.* la composición en estas preparaciones terapéuticas es variable, pues además de proceder de un grupo de donantes en contacto con distintos ambientes, el propio proceso de preparación también introduce variabilidad (Gürcan et al. 2010). Esto se traduce en que entre las distintas preparaciones que se encuentran en el mercado hay diferencias en cuanto al porcentaje total de IgGs y los subtipos de IgGs presentes (Seite et al. 2008, Radosevich, Burnouf 2010).

Durante los procesos de purificación, tratamiento para reducir la presencia de agentes patógenos como virus y preparación del producto final, se pueden formar complejos de anticuerpos. Se ha descrito que la formulación de IgIVs contiene unas estructuras no deseadas como son los agregados diméricos y multiméricos de inmunoglobulinas, además de los monómeros de interés. A pesar de que la forma monomérica es predominante, se pueden encontrar cantidades variables de dímeros (entre un 5 y un 15%), además de pequeñas cantidades de otros agregados de IgGs (Seite et al. 2008). Aunque estos precipitados no se encuentran presentes en un elevado porcentaje, pues la mayoría de las inmunoglobulinas se encuentran en forma monomérica, pueden ser la causa de reacciones adversas frente al medicamento en algunos pacientes (Spaeth et al. 2015, Gürcan et al. 2010).

La necesidad de mejorar el rendimiento de producción de las IglVs para satisfacer la creciente demanda de producto, al mismo tiempo que se garantice la seguridad del medicamento, plantea un reto para las empresas farmacéuticas. La caracterización completa de estos productos es fundamental no solo para asegurar el abastecimiento sino también para conocer en profundidad el mecanismo de acción de las IgGs, especialmente para comprender los mecanismos inmunomodulatorios que intervienen en su actividad terapéutica.

1.2 Interferometría de Polarización Dual

Para profundizar en nuestro conocimiento en cuanto a la función, comportamiento e interacción precisa de biomoléculas relevantes, especialmente las proteínas, es necesario caracterizarlas para entender mejor tanto su complejidad estructural como la naturaleza de sus interacciones en el ambiente en que se encuentran. Los estudios de interacción a nivel molecular ayudan a esclarecer las reacciones en las que éstas participan en los distintos sistemas biológicos.

Debido a los grandes avances experimentados en biotecnología se han desarrollado multitud de dispositivos biosensores, con una gran variedad de mecanismos fisicoquímicos de transducción, que interpretan la interacción biológica que tiene lugar entre las biomoléculas. Dentro de este marco, se buscan técnicas que proporcionen información detallada acerca de la función de biomoléculas teniendo en cuenta un sistema dinámico donde se relacionen su estructura, organización molecular y ambiente.

En la actualidad encontramos distintas estrategias para el estudio de la estructura e interacción de las proteínas, como la cristalografía de Rayos-X, espectroscopia RMN o Microscopía Crioelectrónica (Escorihuela et al. 2015). Si bien la cristalografía con Rayos-X proporciona las estructuras más detalladas, se requiere de un paso limitante: la cristalización proteica. La Microscopía Crioelectrónica es muy útil para el caso de los grandes complejos proteicos, que son más difíciles de cristalizar. Por otra parte, solo las proteínas relativamente pequeñas son susceptibles de ser analizadas mediante RMN. Otras técnicas que se han empleado para investigar las características de las proteínas son la Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM) o la Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR), métodos que han aportado información de gran utilidad en este campo si bien ofrecen estimaciones de las variaciones de masa o el espesor por separado y no de las dos conjuntamente (Escorihuela et al. 2015, Cross et al. 2003).

Todas estas técnicas pueden clasificarse en dos grandes grupos: aquellas capaces de proporcionar información detallada de la estructura de estas moléculas en un momento determinado (imagen estática), como son la cristalografía de Rayos X, Microscopía de Fuerza Atómica (AFM) o la Reflectometría de Neutrones (NR); y aquellas que aportan medidas dinámicas del sistema, donde se encuentran diversas técnicas ópticas y electroquímicas como la QCM, SPR y la interferometría de polarización dual (DPI) (Cross et al. 2003, Escorihuela et al. 2015). Las técnicas que permiten la medida de la dinámica conformacional de procesos bioquímicos, pero que además miden a tiempo real y con detección directa, son los más interesantes.

La DPI se encuentra dentro de las técnicas que emplean una guía de ondas como elemento sensor y en los últimos años su uso ha experimentado un auge, posicionándose como herramienta clave en el estudio de interacciones biomoleculares y en la caracterización de superficies, pero también en estudios acerca de dinámicas conformacionales (Cross et al. 2003, Giménez-Romero et al. 2012, Escorihuela et al. 2015).

Esta técnica proporciona información detallada acerca de la función de las biomoléculas, aportando medidas dinámicas de datos estructurales, en contexto con el entorno en que se encuentran y a tiempo real. Es por ello que la DPI es una técnica de gran utilidad en el estudio de la inmovilización y la orientación de moléculas. Este instrumento representa una técnica analítica cuantitativa de elevado potencial ya que proporciona valores de variación de la masa y el espesor de la capa durante la interacción de las moléculas con la superficie sensora, permitiendo estudiar en detalle los eventos fisicoquímicos a nivel molecular y relacionarlos con la actividad biológica (Cross et al. 2007, Escorihuela et al. 2015).

Entre las ventajas más destacadas de la técnica DPI se encuentra el corto tiempo de respuesta, que permite realizar mediciones cada 20 ms, proporcionando datos cuantitativos *in situ* del sistema estudiado de la variación en sus dimensiones, índice de refracción y densidad. La posibilidad de emplear reactivos sin necesidad de marcaje (*label-free*) es uno de sus puntos fuertes, ya que permite simplificar notablemente el proceso experimental. Por último, su elevada precisión permite alcanzar resoluciones inferiores a $0,1 \text{ \AA}$, 10^{-7} unidades de índice de refracción e incluso 0.1 pg/mm^2 en la densidad. Las medidas que se obtienen son estables y precisas, pues los datos provienen de lecturas interferométricas y el elemento sensor o guía de ondas es relativamente largo. Estas medidas están a la altura de otras técnicas conocidas como RMN, cristalografía de Rayos-X y NR, y por tanto otorga mayor precisión y sensibilidad que, por ejemplo, la QCM o la SPR (Giménez-Romero et al. 2012).

Debido a las particularidades que ofrece, esta técnica permite aportar un punto de vista distinto del sistema en estudio respecto a otras técnicas disponibles. En primer lugar, posibilita una amplia caracterización estructural (proporciona datos de espesor, índice de refracción, concentración superficial, densidad, área ocupada por cada molécula y porcentaje de ocupación) a tiempo real. Este elevado grado de caracterización cuantitativa permite relacionar las variaciones registradas en la estructura de las capas con los procesos biomoleculares que tienen lugar en las mismas. En segundo lugar, y no por ello menos importante, posibilita el análisis cinético de los procesos de interacción biomolecular. El resultado de la interacción del sistema en estudio, es decir, los cambios estructurales de las biomoléculas, son monitorizados a tiempo real, lo que proporciona un valioso enfoque acerca del mecanismo de unión (Escorihuela et al. 2015).

La DPI se basa en el efecto interferométrico que tiene lugar en una doble guía de ondas. Las guías de ondas son dispositivos basados en el confinamiento de la radiación, resultado de la difracción que se genera al incorporar dos medios con índices de refracción distintos. En estas estructuras, el medio con índice de refracción menor o núcleo se encuentra incrustado entre medios con un índice de refracción mayor, uno de los cuales actúa como cubierta o revestimiento. La luz originada por un láser incide sobre una estructura guía de ondas se propaga a través de la misma provocando un patrón de interferencias que es detectado por una cámara de alta resolución.

La interferometría de polarización dual es un método óptico de campo evanescente que se emplea para la detección del cambio de fase inducida en la propagación de la luz. El equipo, es un interferómetro de doble trayectoria de acceso o doble ruta de láser donde el haz de referencia y el haz de la muestra se desplazan a lo largo de sendas guías de onda y salen de estas generando las figuras de difracción (Figura 2). Después de que el haz de medida haya sido perturbado por la interacción con la muestra depositada sobre la superficie sensora, se recombina con el haz de referencia originando un patrón de interferencias que puede interpretarse. Cualquier cambio en el índice de refracción en la superficie sensora, se traduce en una diferencia de camino óptico o cambio de fase que se ve reflejado en el patrón de interferencias (Cross et al. 2003, Cross et al. 2007).

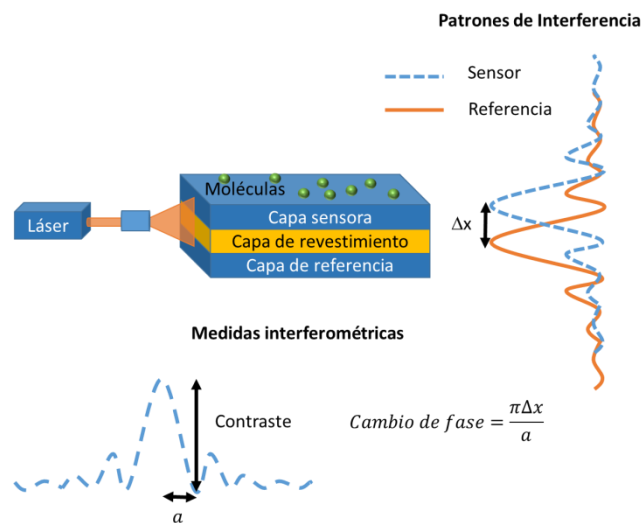


Figura 2. Aspectos clave en la detección de los patrones de interferencia (Escorihuela et al. 2015).

El cambio de fase de los patrones de interferencia, o diferencias en el modo de dispersión de la guía de ondas entre los modos transversal magnético (T_M) y transversal eléctrico (T_E), se registra a tiempo real y permiten calcular, mediante las ecuaciones de Maxwell del electromagnetismo, los parámetros estructurales en cada polarización (Figura 3). Para cada tiempo t se obtienen soluciones únicas de espesor e índice de refracción (IR) absolutos de una capa determinada y a partir de estos datos se obtienen los valores de densidad y factor de recubrimiento de la película (Cross et al. 2003, Swann et al. 2004).

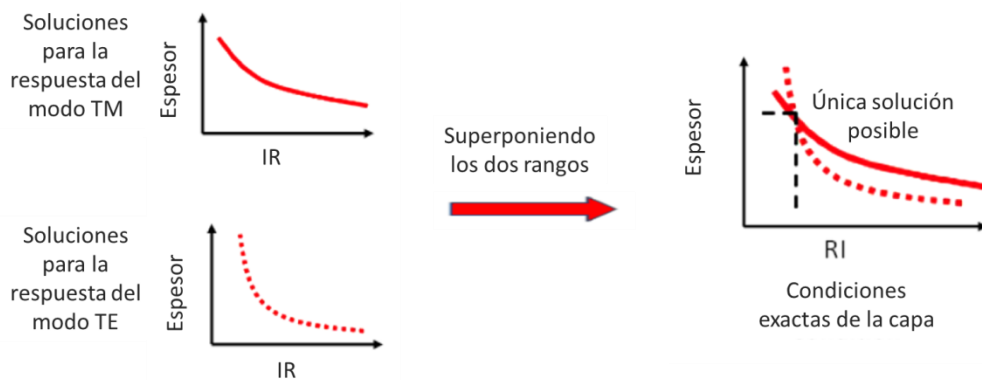


Figura 3. Estimación del índice de refracción (IR) y del espesor usando los modos transversal eléctrico (T_E) y transversal magnético (T_M) de acuerdo con el movimiento de los patrones de interferencia (Escorihuela et al. 2015).

1.3 Métodos de inmovilización

El anclaje de una biomolécula a una superficie se puede llevar a cabo mediante distintas técnicas dependiendo de la biomolécula de interés. De modo general, estos métodos se pueden dividir en inmovilización física o pasiva, inmovilización química e inmovilización por afinidad.

En el primer caso, la inmovilización física, los receptores se anclan sin que tenga lugar una reacción química, por ejemplo mediante adsorción.

En el segundo caso sí que tiene lugar una reacción química entre alguno de los grupos funcionales del receptor y otro grupo de la superficie, de manera que el receptor queda anclado covalentemente a ésta. Por último, en la inmovilización por afinidad tiene lugar una interacción biológica específica entre la molécula anclada en la superficie o receptor y su ligando; el modelo más conocido en bioquímica es el complejo biotina-estreptavidina (o avidina), de muy elevada constante de asociación (González et al. 1997).

Generalmente, para inmovilizar de manera satisfactoria las biomoléculas de interés, las etapas de anclaje vienen precedidas por un primer paso de activación del material de la superficie.

1.3.1 Inmovilización física o pasiva

Este tipo de inmovilización se basa en fenómenos físicos de adsorción. Intervienen fuerzas de van der Waals, puentes de hidrógeno, enlaces iónicos o interacciones hidrofóbicas y electrostáticas, dando lugar a una unión con la superficie de carácter débil. Es el método más simple puesto que normalmente requiere pocos reactivos y pasos de activación. Pero también es el que reporta los peores resultados; la inmovilización es totalmente inespecífica, difícil de controlar, y puede provocar cambios en la proteína o molécula adsorbida (modificación de la carga, cambios conformacionales, desnaturalización), lo que puede alterar las propiedades de la misma hasta el punto de perder la capacidad de reconocimiento. Además, la densidad de inmovilización es difícilmente controlable, lo que puede dar lugar a problemas estéricos que

afecten también a la actividad de la molécula. A pesar de estas desventajas este mecanismo se emplea a menudo para la inmovilización de proteínas sobre superficies (Escorihuela et al. 2015).

1.3.2 Inmovilización química por enlace covalente

La inmovilización de biomoléculas mediante la formación de un enlace covalente ofrece considerables ventajas frente a la inmovilización pasiva. El anclaje es más fuerte y estable, la unión inespecífica de moléculas no deseadas es menor, y un buen control de la inmovilización ayuda a que las proteínas ancladas mantengan su actividad.

Existen varios métodos de formar enlaces covalentes entre el soporte y la superficie. Una opción muy empleada es el entrecruzamiento o *cross-linking*, utilizando reactivos bifuncionales que permiten el reticulado intermolecular, es decir, sendos grupos funcionales originan uniones; uno de ellos con el grupo del soporte y el otro con la biomolécula seleccionada. Estos pueden ser de dos tipos, homobifuncionales, reactivos con dos grupos funcionales iguales en los extremos; o heterobifuncionales, si estos grupos funcionales son de distinta naturaleza. Estos reactivos tienen además un brazo espaciador entre los dos grupos funcionales, lo que puede ayudar a preservar la actividad del reactivo inmovilizado. Un ejemplo de agente heterobifuncional es el Sulfo-GMBS (éster de N-γ-maleimidobutiriloxisulfosuccinimida) (Figura 4). Este entrecruzador reacciona con los grupos amino a través del grupo de N-hidroxisuccinimida (NHS), mientras que el residuo maleimido lo hace con los grupos sulfhidrilo.

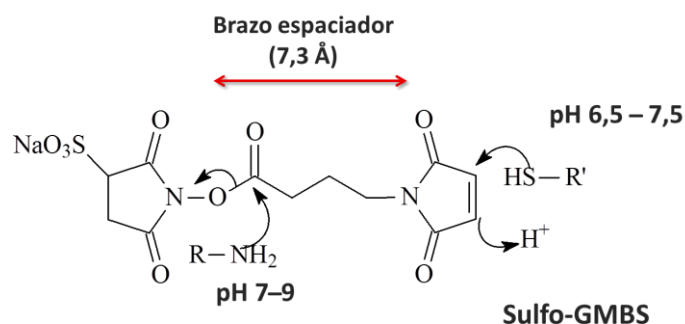


Figura 4. Estructura química del Sulfo-GMBS, (éster de N-γ-maleimidobutiriloxisulfosuccinimida), entrecruzador bifuncional heterobifuncional (Song et al. 2012).

La selección del grupo funcional está relacionada con la naturaleza de las proteínas y su geometría, y hay que elegirlo bien para evitar alterar las características y la capacidad de unión de la proteína de interés. Los grupos reactivos de las cadenas laterales de los aminoácidos más empleados para la formación de enlaces con las superficies son los grupos amino, como es el caso de los residuos de lisina o tirosina; los grupos sulfhidrilo de los residuos de cisteína o los grupos carboxilo de los aminoácidos aspartato y glutamato.

1.3.3 Inmovilización por bioafinidad

Entre todas las técnicas de modificación de superficies, uno de los mecanismos más interesantes es la inmovilización orientada de proteínas empleando un proceso de bioafinidad. Este tipo de orientación es especialmente relevante para los anticuerpos, puesto que sus centros activos de unión a los antígenos están localizados. Entre los métodos más empleados para la inmovilización y las técnicas de purificación se encuentran aquellos que utilizan las Proteínas A y G como proteínas de captura. El anticuerpo se orienta a través de la unión de la región Fc del anticuerpo a la proteína receptora inmovilizada previamente sobre la superficie. Con esto se busca maximizar la disponibilidad de la región Fab del anticuerpo y así incrementar su posibilidad de unión al antígeno y por tanto su reactividad. La proteína de captura se ha de unir covalentemente a la superficie.

1.4 Proteínas de captura: Proteína A y G

Las proteínas receptoras o de captura de anticuerpos han sido empleadas durante muchos años para técnicas inmunoquímicas, tanto para investigación básica (por ejemplo inmunoprecipitación) como para aplicaciones de diagnóstico, donde siguen teniendo una elevada relevancia. En concreto, la Proteína A y la Proteína G han sido las más empleadas durante años (Boström et al. 2012).

La Proteína A se expresa en la bacteria patogénica *Staphylococcus aureus* como factor de virulencia asociado a la membrana, o bien es secretada al medio (Graille et al. 2000). Tiene una forma extendida, no globular (Björk et al. 1972) con dominios flexibles (Deis et al. 2014). Una de sus funciones principales está relacionada con su capacidad de unión a la región Fc de los anticuerpos que sintetiza el hospedador, de modo que tras dicha unión estas IgGs no son capaces de reconocer la bacteria y por ello no desarrollan su función efectora, protegiéndose el *S. aureus* de la fagocitosis y de los macrófagos. Además, la Proteína A es capaz de destruir eficientemente a los linfocitos B, que ejercen una función clave en la respuesta inmune defensa contra las infecciones bacterianas (Goodyear, Silverman 2003). Está involucrada además en diversas funciones biológicas de protección como actividad frente a toxinas (Ray et al. 1999, Ray et al. 2000) y tumores (Shukla et al. 1996), además de tener propiedades antifúngicas y antiparasitarias (Ghose et al. 1999). La Proteína A recombinante expresada en *Escherichia coli* se emplea en multitud de aplicaciones como la purificación de anticuerpos, desarrollo de biosensado, kits de diagnóstico, etc. (Hober et al. 2007). Además de todo esto, dentro de los ensayos con una sola molécula (*single-molecule experiments*) esta proteína funciona como sistema modelo para el estudio de interacciones entre proteínas (Simpson et al. 2004, Touhami et al. 2007).

La Proteína A está constituida por cuatro o cinco, según la cepa, dominios homólogos que se unen al fragmento cristalizante (Fc) de las IgGs con un ratio de 2 moléculas de IgG por molécula de Proteína A. La Proteína A de cuatro dominios tiene una masa molecular de 42 kDa. La afinidad entre la Proteína A y las hIgG es debida a interacciones hidrofóbicas, y da lugar a multitud de aplicaciones biomédicas y bioquímicas. El estudio de esta interacción es clave para la evaluación de la eficacia de la inmovilización de la Proteína A usada en la purificación de

IgGs. Además, facilita el diseño racional de medicamentos y el estudio de las interacciones entre las proteínas R-helicales y receptores de tipo IgG (Graille et al. 2000).

Las proteínas A y G comparten función bioquímica si bien no son proteínas homólogas. De modo similar a la Proteína A, la Proteína G es una proteína asociada a la pared celular de las bacterias del género *Streptococcus*, concretamente de los grupos G y C (Åkerström, Björck 1986). Algunas diferencias notables entre las proteínas A y G se relacionan con su capacidad de unión a los diferentes subtipos de las inmunoglobulinas G. Así, la Proteína G es capaz de unirse a las cuatro subclases de IgG pese a que tiene una menor afinidad global por ellas. Se ha descrito que interacciona con las regiones Fab de estas inmunoglobulinas y también que existe una baja afinidad por el fragmento de la región F(ab')₂, siendo esta es 10 veces menor que la afinidad para la región Fc (Goward et al. 1990).

La Proteína G recombinante de la cepa G148 expresada en *E. coli* se compone por dos o tres dominios homólogos de masa molecular 21 kDa cada uno y, del mismo modo que la Proteína A, se emplea para un elevado número de aplicaciones relacionadas con la purificación de anticuerpos y distintas aplicaciones de biosensado. La proteína producida tiene tres dominios funcionales aunque también se encuentra mezclada con otra proteína de dos dominios que tiene menor afinidad por los hIgG policlonales (Goward et al. 1990). Esta proteína posee al menos dos sitios de unión a las IgGs por molécula de Proteína G (Åkerström, Björck 1986).

2 OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue estudiar las diferencias en la interacción de inmunoglobulinas humanas en su forma monomérica y agregados diméricos, con proteínas de captura de origen bacteriano, bajo distintas condiciones de inmovilización.

Con esta finalidad, se pretendió alcanzar los siguientes objetivos particulares:

- i. Comparar distintos métodos de inmovilización de diferentes proteínas de captura de hIgGs (Proteína A y Proteína G) sobre una superficie de oxinitruro de silicio.
- ii. Comparar la interacción de las distintas proteínas de captura con las hIgGs.
- iii. Estudiar el efecto que tiene el estado de agregación (monómero o dímero) sobre el mecanismo de interacción de las hIgGs con las proteínas de captura estudiadas.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

Para estudiar los distintos mecanismos de inmovilización de las proteínas receptoras y su interacción con ambas formas de IgG humanas, se emplearon los reactivos, instrumentos y programas informáticos descritos a continuación.

3.1 Reactivos

Para la activación de la superficie del chip se emplearon los organosilanos mercaptopropil trimetoxisilano 85% (MPTS) y 3-(trietoxisilil)propil isocianato (ICPTS), ambos de Acros Organics (Barcelona, España). También se usó tolueno de Scharlau (Barcelona, España). Las disoluciones de lavado utilizadas fueron diclorometano e isopropanol, ambas de Scharlau (Barcelona, España). Para el calibrado del equipo se empleó etanol absoluto de calidad HPLC (Scharlau, Barcelona, España).

Respecto a las biomoléculas, la Proteína A de *Staphylococcus aureus* se compró a Sigma Aldrich (Madrid, España) en su forma liofilizada, se disolvió en agua a 1000 µg/mL, fue alicuotada en fracciones de 50 µL y se mantuvo congelada a -20 °C hasta su uso. La Proteína G de *Streptococcus* también se adquirió a Sigma Aldrich (Madrid, España) en su forma liofilizada y se conservó en las mismas condiciones que la Proteína A. Los anticuerpos (monómero y dímero) se purificaron a partir de preparaciones de IgIV. El suero de las IgIV se fraccionó mediante una columna de filtración en gel (Sephacryl S-300 HR) de modo que se partía de fracciones de monómeros y dímeros de hIgG a concentraciones de 365 mg/L y 75 mg/L respectivamente. La gelatina y la glicina (Gly), empleadas como agente bloqueante y agente de elución, respectivamente, se compraron a Sigma Aldrich (Madrid, España).

Otros agentes empleados en la modificación de la superficie fueron la etanolamina (ETA), de Sigma-Aldrich (Madrid, España) y el éster de N-γ-maleimidobutiriloxisulfosuccinimida (Sulfo-GMBS), agente entrecruzador de Thermo Scientific (Madrid, España).

La disolución portadora de trabajo empleada para todos los experimentos fue tampón fosfato salino (PBS, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 2 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, pH 7,4), preparado con agua de calidad MiliQ. Antes de ser introducido en las jeringas de la bomba, el PBS fue microfiltrado con el equipo de filtración a vacío de vidrio de Milipore (Merk Millipore, Madrid, España) con una membrana Durapore (PVDF, hidrófila, 0,45 µm). Seguidamente, el PBS se desgasificó por sonicación a vacío.

Otros de los tampones empleados en los experimentos fueron el tampón carbonato (CB, 100 mM Na₂CO₃, pH 9,12) y también el tampón Gly/HCl (100 mM glicina y HCl hasta un pH 2) utilizado para la regeneración de la superficie.

Todas las muestras y disoluciones inyectadas fueron desgasificadas previamente haciendo el vacío manualmente dentro de la jeringuilla utilizada para la inyección.

Se emplearon chips de oxinitruro de silicio sin modificar (AnaChip™ Plus, Farfield Scientific Ltd., Crewe, UK).

3.2 Instrumentación

3.2.1 Interferómetro

Todas las medidas fueron registradas con el interferómetro de doble guía de ondas AnaLight Bio200[®] (Farfield Scientific Ltd., Crewe, UK) (Figura 5). Las mediciones se tomaron a temperatura ambiente entre el rango 18 – 25 °C y una temperatura interior de trabajo de 20 °C ± 0.002 °C.

El sistema está constituido por tres módulos independientes e interconectados entre sí: el propio instrumento de interferometría de polarización dual, una bomba de doble pistón de alta precisión y un ordenador. Los dos primeros módulos pueden controlarse a través del ordenador, pero también disponen de comandos externos.

La bomba de doble pistón (Harvard Apparatus PHD 2000 infusion, Kent, UK) se encuentra acoplada externamente y cada uno de los pistones impulsa el fluido que alimenta sendos canales. La bomba puede controlarse manualmente para cambiar los modos y parámetros de trabajo (ajustar el volumen y el caudal bombeado, programar el volumen total, cambiar el diámetro de la jeringa, etc.) o iniciar y detener la inyección.

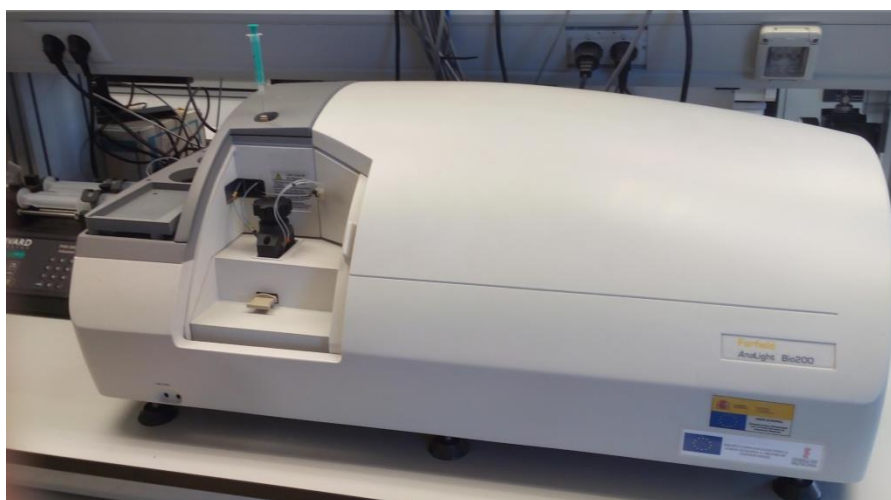


Figura 5. Equipo de Interferometría de Polarización Dual.

El módulo que forma el interferómetro es muy compacto y por ello prácticamente no permite ningún control externo. Está formado por el sistema óptico y el sistema fluídico. Contiene un receptáculo donde se aloja el chip o guía de ondas. En la parte superior de este se encuentra el inyector, a través del cual las muestras son cargadas en los bucles de la válvula. Cada uno de estos bucles tiene una capacidad de 250 µL.

El instrumento utiliza un chip sensor de oxinitruro de silicio (FB 100, Farfield Scientific Ltd., Crewe, UK) de dimensiones 24 x 5,8 mm que se compone de un interferómetro de Young de doble guía de onda con dos canales de medida y uno de referencia integrados. Este se fija

dentro de un bloque termostataado que permite adquirir un control de temperatura de 1 mK (Cross et al. 2003).

Este sistema tiene dos interfases fluídicas en la superficie sensora, cada una de ellas con una capacidad de 2 μ L de volumen. Estos son los llamados “Canal 1” (C1) y “Canal 3” (C3). Consta además de un área adicional de referencia, el “Canal 2” (C2). Este canal de referencia contiene un material dieléctrico del índice de refracción constante y se emplea para controlar la estabilidad del equipo (Cross et al. 2003).

La fuente de radiación, láser de helio-neón ($\lambda = 632,8$ nm) ilumina uno de los extremos del chip. El estado de polarización del haz entrante se intercambia (50 Hz) entre la T_M y T_E mediante un cristal líquido ferroeléctrico. Las figuras de difracción originadas iluminan un dispositivo que reconoce imágenes 1024 x 1024 (cámara CCD) y la salida resultante se transfiere a la unidad DPI (Cross et al. 2003, Escorihuela et al. 2015).

3.2.2 Software

Las aplicaciones informáticas básicas que permiten la adquisición y manejo de datos del DPI son dos programas independientes que pueden ejecutarse simultáneamente. El AnaLight® DAQ *Data Acquisition* está enfocado en la operación con el instrumento y ejecución de las medidas, así como la monitorización y registro de datos. Este programa permite también el control de la bomba y del sistema de válvulas de inyección. Por otro lado, el AnaLight® *Explorer Software Suite* permite procesar los datos registrados por el AnaLight® DAQ *Data Acquisition* y exportarlos en formato de hoja de cálculo.

Para el análisis de los datos obtenidos se empleó el paquete SigmaPlot (Jandel Scientific, Erkrath, Alemania) y GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, USA).

3.3 Métodos

3.3.1 Estabilización y calibrado

Una vez introducido el chip en el equipo y ajustados los parámetros necesarios para realizar las mediciones, se deja un tiempo de estabilización dejando fluir sobre la superficie la misma disolución portadora a un caudal de 50 μ L/min por cada canal. Cuando la línea base se estabiliza para los tres canales, normalmente transcurridos unos 15-20 minutos, se empieza el experimento, registrándose los valores de T_E y T_M para cada uno de los canales desde el inicio del experimento y de forma continua.

Realizar un proceso de calibrado es esencial para optimizar el rendimiento del instrumento en cada experimento e incrementar la precisión de las medidas (alrededor de un 10%) mediante la sustracción del ruido de fondo (Escorihuela et al. 2015). Durante el calibrado del chip se determina la posición de la interfase sólido-líquido, el punto de partida para resolver las subsiguientes capas que van a formarse sobre esta.

Los patrones que se emplearon para el calibrado fueron los estándares de calibrado 1 y 2, ambos con índices de refracción conocidos. El estándar 1, etanol 80% en agua, posee el índice de refracción máximo en el diagrama de fase etanol/agua y por tanto se ve menos afectado por los errores de preparación. El estándar de calibrado 2 empleado fue agua pura (calidad MiliQ). De igual modo, el índice de refracción del tampón se midió a partir de la transición del agua al tampón de migración (Escorihuela et al. 2015).

La calibración del chip consta de tres etapas. Una primera etapa de linearización, inyectando 200 μL de una mezcla de etanol/agua al 80% (v/v) a 100 $\mu\text{L}/\text{min}$, seguido de una estabilización de la línea base volviendo a circular PBS (15 $\mu\text{L}/\text{min}$). Una segunda fase donde se calibra el chip registrándose la señal absoluta de la mezcla etanol/agua inyectada y, finalmente, la calibración de la disolución de trabajo enjuagando la superficie con agua pura y la disolución usada como portadora (Giménez-Romero et al. 2012).

Normalmente el calibrado se realiza al principio del experimento pero también puede ejecutarse al final del mismo, como es el caso del procedimiento que emplea ICPTS para la activación de la superficie.

3.3.2 Inmovilización vía ICPTS

3.3.2.1 Funcionalización de la superficie con grupos isocianato

La silanización de la superficie del chip vía ICPTS tuvo lugar mediante un proceso de deposición química de vapor. La funcionalización consistió en exponer la superficie sensora a una atmósfera de ICPTS a temperatura ambiente. El chip se depositó boca abajo sobre un vial que contenía 100 μL de ICPTS sin entrar en contacto con él; encima se colocó un vaso de precipitados y todo ello dentro del desecador, dejándolo en esa posición durante toda la noche. A continuación se curó la superficie manteniendo el chip durante al menos una hora a 160 $^{\circ}\text{C}$ en una estufa y protegiendo el chip con un recipiente. Seguidamente, se utilizó aire comprimido para eliminar cualquier suciedad depositada en la superficie.

Los grupos isocianato del organosilano ICPTS que quedan libres después de su anclaje sobre la superficie sensora de oxinitruro de silicio son capaces de reaccionar con los residuos de lisina de la proteína de captura que se desea inmovilizar, generando enlaces covalentes urea entre la superficie y la proteína que se desea inmovilizar (Figura 6).

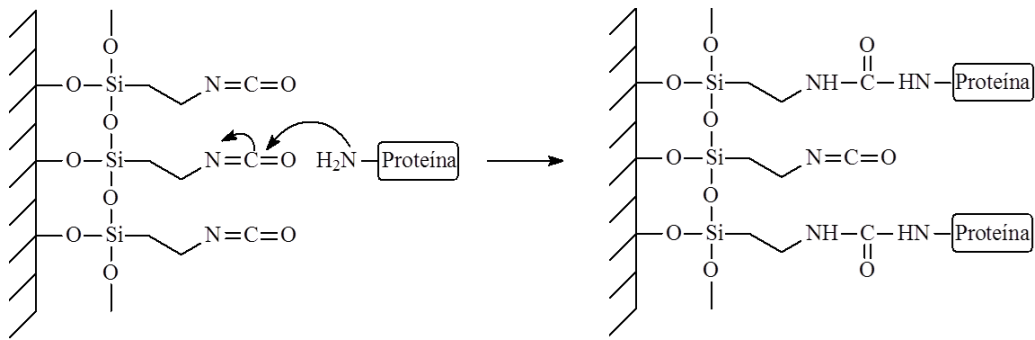


Figura 6. Esquema de la funcionalización con el organosilano ICPTS.

3.3.2.2 Anclaje covalente de la proteína de captura e interacción con el anticuerpo

Seguidamente a la silanización de la superficie, el chip se introdujo en el receptáculo del DPI. Después del tiempo de estabilización necesario, se empezó a registrar los valores medidos. En primer lugar, se inyectó la proteína de captura (Proteína A o Proteína G) a una concentración de 25 mg/L en CB (250 μ L a 10 μ L/min) (Figura 7). Se dejó estabilizar durante 5 minutos y se inyectaron dos cargas sucesivas de gelatina a una concentración de 50 mg/L en PBS (100 μ L a 10 μ L/min). Después de lavar durante 45 minutos ambos canales, se inyectó la inmunoglobulina G (monómero o dímero) a una concentración de 0,1 mg/L (250 μ L a un caudal de 10 μ L/min). Después de su estabilización (30 minutos), se inyectó el tampón Gly/HCl 0,1 M a pH 2 (50 μ L a 50 L/min) para regenerar la superficie, rompiendo la unión entre la proteína de captura y el anticuerpo. Estos ciclos de unión-disociación entre la proteína de captura y la inmunoglobulina se repitieron antes del ensayo de las distintas concentraciones de hIgG (de 0,1 mg/L a 5,0 mg/L).

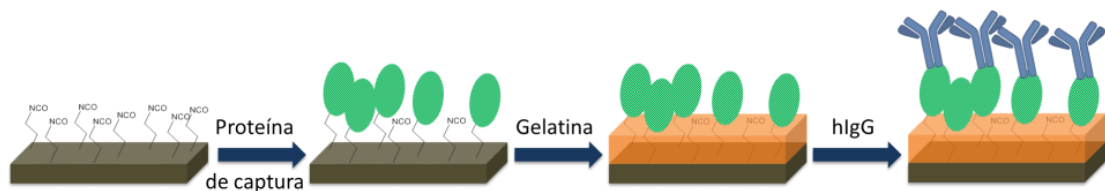


Figura 7. Esquema de los pasos de inmovilización sobre la superficie sensora vía ICPTS (las moléculas participantes no están representadas a escala).

3.3.3 Inmovilización vía Sulfo-GMBS

3.3.3.1 Funcionalización de la superficie con grupos tiol

Para la inmovilización vía Sulfo-GMBS, la superficie sensora se funcionalizó con grupos tiol mediante la inmersión del chip en una disolución de MPTS al 2% en tolueno durante 2 h lavando a continuación con diclorometano. Seguidamente, el chip debidamente protegido se

dejó durante al menos una hora en la estufa a 160 °C. Posteriormente, con aire comprimido se eliminó cualquier suciedad depositada sobre la superficie.

Mediante este procedimiento se generó una superficie tiolada que reaccionaba con los residuos maleimido del agente bifuncional Sulfo-GMBS, quedando los grupos NHS libres para la posterior interacción con las proteínas de captura (ver Figura 4, sección 1.3.2).

3.3.3.2 Anclaje covalente de la proteína e interacción con el anticuerpo

Primeramente, se introdujo el chip en el receptáculo del equipo DPI y se calibró tal y como se describe en la sección 3.3.1.

Después de unos minutos de estabilización y manteniendo un flujo de 15 $\mu\text{L}/\text{min}$, se inyectaron 180 μL de Sulfo-GMBS (3000 mg/L). Los grupos maleimido reaccionaban con los sulfhidrilos de la superficie mientras que los residuos de NHS (N-hidroxisuccinimida) reaccionaban con los grupos amino de las proteínas de captura (Figura 8).

Después de lavar durante 10 minutos la superficie, se inyectó por uno de los canales 180 μL de Proteína A o Proteína G disuelta en PBS según el experimento, a un caudal de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$. A continuación, los residuos NHS libres de ambos canales se bloquearon con etanolamina (ETA) a 1 M a pH 8,5 (250 μL a un caudal de 50 $\mu\text{L}/\text{min}$). Se dejó estabilizar lavando la superficie con PBS durante aproximadamente 30 minutos. Posteriormente, se inyectaron ciclos de anticuerpo a distintas concentraciones y glicina dejando tiempo a su estabilización, tal y como se ha explicado anteriormente, manteniendo el volumen y caudal en cada caso.

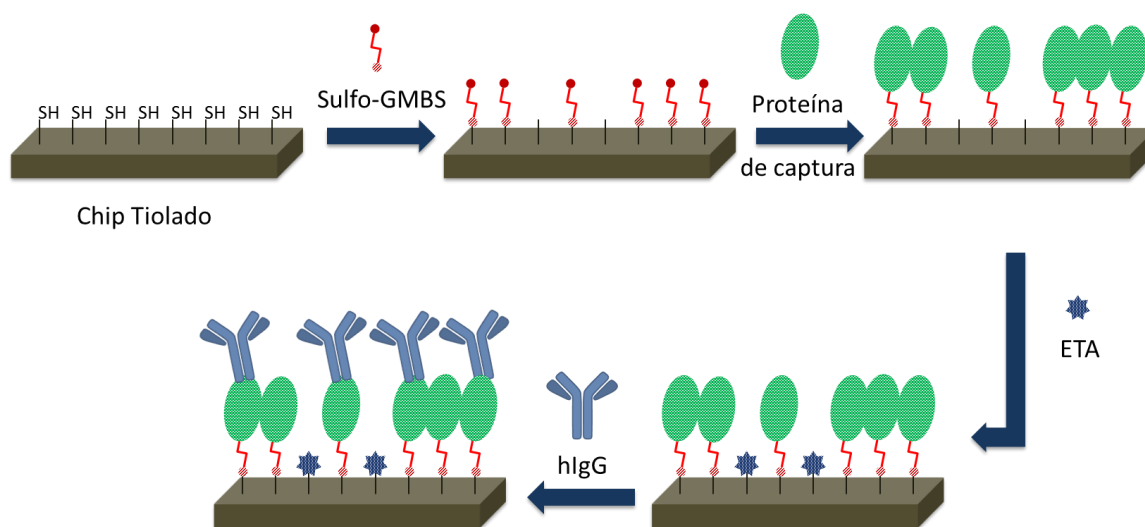


Figura 8. Esquema de los pasos de inmovilización sobre la superficie sensora vía Sulfo-GMBS. Moléculas participantes: Sulfo-GMBS, la proteína de captura (Proteína A o Proteína G), etanolamina (ETA) y la inmunoglobulina G (hIgG) (las moléculas representadas en la figura no están a escala).

3.4 Tratamiento de datos

Utilizando el programa AnaLight® Explorer, se marcan manualmente los puntos clave: los valores de referencia del calibrado, un punto de referencia antes de la inyección de las moléculas y otro al final de ésta, así como el punto final de la desorción de cada analito (Figura 9). El programa procesa los datos registrados y los transforma en valores determinados de masa, espesor, índice de refracción y densidad para cada uno de los puntos medidos. Esta herramienta también permite exportar los datos procesados a un formato de hoja de cálculo, tanto aquellos valores medidos en continuo como los valores discretos marcados manualmente por el usuario.

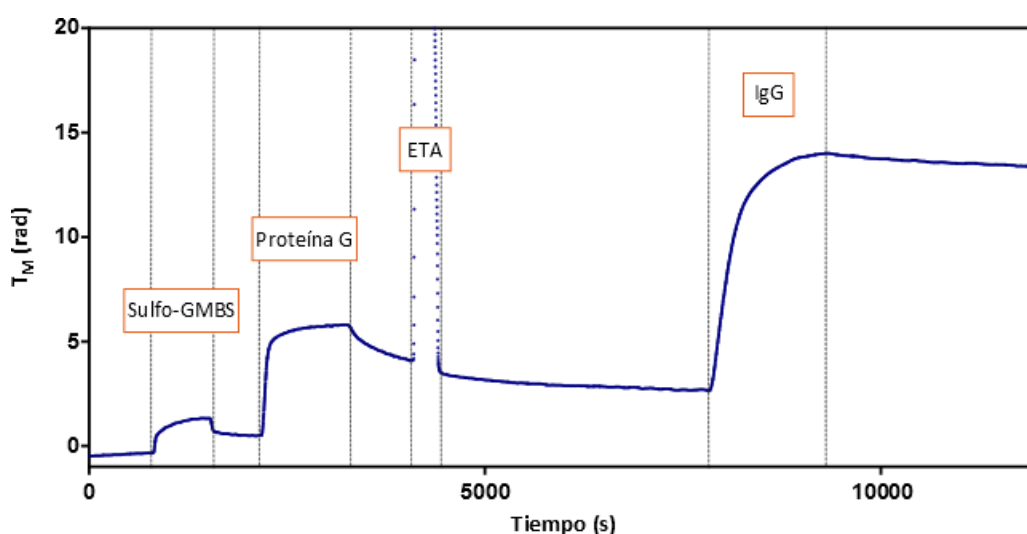


Figura 9. Puntos clave seleccionados durante el procesado de las medidas en un experimento que utiliza anclaje de Proteína G mediante Sulfo-GMBS: inicio y fin de la inyección del Sulfo-GMBS, Proteína G, etanolamina (ETA) e inmunoglobulina G (IgG).

3.5 Regeneración del chip

Después de cada uno de los experimentos, se llevó a cabo un proceso de limpieza y regeneración de la superficie de los chips con el fin de alargar la vida de cada uno de ellos a más de un solo experimento.

El protocolo de regeneración constó de un primer paso que corresponde a la inmersión del chip en mezcla crómica (100 g/L $K_2Cr_2O_7$ en 98% H_2SO_4) durante más de 12 h, seguido de un enjuagado con agua y un posterior lavado de la superficie con un papel impregnado de isopropanol. A continuación, el chip se sumergió de nuevo en la mezcla crómica durante más de 12 h. Finalmente, se enjuagó con isopropanol y agua, y se secó bien con aire comprimido.

De este modo, el protocolo permitió la consecución de al menos 5 experimentos, en la mayoría de los chips, sin una pérdida apreciable de las propiedades ópticas o de unión.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Inmovilización de las proteínas de captura

4.1.1 Vía ICPTS

La inmovilización vía ICPTS se empleó para funcionalizar el chip con las dos proteínas de captura estudiadas (Proteína A y Proteína G) (Figura 7). La cantidad de Proteína G inmovilizada utilizando el ICPTS se monitorizó en tres experimentos, resultando en una capa de $1,30 \pm 0,43$ nm de espesor y $0,74 \pm 0,14$ ng mm⁻² de masa. Para el caso de la Proteína A los valores medios obtenidos fueron de $2,8 \pm 0,8$ nm de espesor y $0,69 \pm 0,08$ ng mm⁻² de masa (n = 3).

A partir de los datos de masa, se puede estimar el porcentaje de recubrimiento, empleando un método simplificado que utiliza los valores del incremento de masa cuando se añade la proteína de captura y el valor teórico de las dimensiones de la misma. Este parámetro depende de la eficiencia alcanzada en la derivatización de la superficie con ICPTS. De acuerdo con esto, la eficacia de la inmovilización de la Proteína G corresponde con un 36 ± 7 %, siendo el rendimiento de la inmovilización algo menor al obtenido con la Proteína A, cuya eficiencia de inmovilización es de 40 ± 5 %. Esto evidencia que la capa de Proteína G formada se encuentra menos densamente empaquetada que la capa de Proteína A.

La Proteína A (42 kDa) está constituida por cuatro dominios globulares unidos entre sí mediante conectores flexibles que proporcionan a la molécula una forma variable (Björk et al. 1972). El tamaño de la proteína en su conformación extendida es de aproximadamente 2 nm de ancho y 20 nm de largo y 2 nm de grosor (Starovasnik et al. 1996). Por tanto, un incremento en el espesor de unos 2 nm indicaría que la Proteína A se queda extendida sobre la superficie unida por varios puntos mediante los residuos de lisina de los dominios que conforman la proteína, mientras que valores más grandes de espesor apuntarían a una disposición más vertical, orientada hacia la interfase.

De acuerdo con los valores de espesor obtenidos, mayores a los teóricos que cabría esperar para una disposición estirada sobre la superficie, la proteína se encuentra en más de una conformación distinta sobre la superficie derivatizada.

De manera similar, la Proteína G está formada por tres dominios globulares unidos entre sí formando una estructura alargada (Goward et al. 1990) cuyo peso molecular es de 21 kDa para cada uno. El tamaño de cada uno de estos dominios es de aproximadamente 4,2 nm x 4,0 nm x 3,5 nm (Derrick, Wigley 1994). Comparando con los valores medios de espesor obtenidos, menores a esas dimensiones, se puede decir que la proteína yace tumbada sobre la superficie de manera que los distintos dominios se encuentran anclados a la superficie a través de los residuos de lisina.

Una posible explicación para que se den valores de espesor más bajos de lo esperado es que la proteína cambie su conformación al anclarse sobre la superficie cambie sus dimensiones y por tanto el porcentaje de recubrimiento sea menor al estimado. Además, cabe mencionar que la

producción de la proteína recombinante resulta en una mezcla de dos proteínas, principalmente una de tres dominios y otra proteína similar formada por solo dos dominios y por tanto con un peso molecular menor (Goward et al. 1990).

4.1.2 Vía Sulfo-GMBS

La inmovilización de la proteína de captura mediante Sulfo-GMBS consta de un paso adicional en el que se incluye un espaciador entre los grupos tiol libres de la superficie y la proteína receptora. Después de la funcionalización de la superficie con el organosilano MPTS, se activa el chip con el agente bifuncional Sulfo-GMBS. Por un lado, esto supone una desventaja puesto que se trata de un paso más en el proceso de derivatización, aunque por otro lado este agente bifuncional permite alejar más de la superficie a las moléculas de proteína gracias a su brazo espaciador lo que posibilita reducir la probabilidad de que la proteína se desnaturalice.

La cantidad de Proteína G inmovilizada mediante Sulfo-GMBS se monitorizó en diferentes experimentos, resultando en una capa media de $1,37 \pm 0,40$ nm de espesor y $0,66 \pm 0,19$ ng mm^{-2} de masa ($n = 7$), mientras que para la Proteína A, los valores medios obtenidos fueron de $1,81 \pm 0,31$ nm de espesor y $0,85 \pm 0,03$ ng mm^{-2} de masa ($n = 4$).

A partir de estos datos registrados de masa es posible estimar el porcentaje de recubrimiento, del mismo modo que se ha calculado anteriormente. Para la Proteína A, la eficacia de la inmovilización se corresponde con un 49 ± 2 %, un factor de ocupación que indica un rendimiento de la inmovilización aceptable.

Por otro lado, los valores de masa registrados para la Proteína G sugieren una eficiencia de la inmovilización menor, obteniéndose un factor de recubrimiento del 32 ± 9 % también con más variabilidad entre los distintos ensayos llevados a cabo.

4.1.3 Comparación de ambos métodos de inmovilización

Para comparar la eficiencia de inmovilización de ambos métodos nos fijamos en la cantidad de proteína de captura anclada a la superficie activada en cada caso (Tabla 1).

Tabla 1. Comparativa del espesor, masa y porcentaje de ocupación obtenidos para la inmovilización vía ICPTS y vía Sulfo-GMBS.

	Inmovilización vía ICPTS		Inmovilización vía Sulfo-GMBS	
	Proteína A	Proteína G	Proteína A	Proteína G
Espesor (nm)	$2,80 \pm 0,80$	$1,30 \pm 0,43$	$1,81 \pm 0,31$	$1,37 \pm 0,40$
Masa (ng mm^{-2})	$0,69 \pm 0,08$	$0,74 \pm 0,14$	$0,85 \pm 0,03$	$0,66 \pm 0,19$
% Recubrimiento	40 ± 5	36 ± 7	49 ± 2	32 ± 9

Para ambos casos no se observan grandes diferencias en la eficiencia de inmovilización de las proteínas de captura. La inmovilización de la Proteína A vía Sulfo-GMBS proporciona los mejores resultados de recubrimiento de la superficie. Sin embargo, un alto grado de empaquetamiento podría dificultar el acceso al receptor, por tanto la eficiencia de esta inmovilización debe evaluarse a partir de los resultados obtenidos tras la interacción de la proteína de captura con la hIgG.

El espesor de la capa resultante es también semejante, exceptuando el caso de la Proteína A inmovilizada vía ICPTS, que en lugar de adoptar una conformación completamente recostada sobre la superficie como en el resto de casos, se encuentra orientada hacia la interfase sin todos los dominios anclados al soporte.

Mediante la vía Sulfo-GMBS, la masa de Proteína A inmovilizada es mayor, pero el incremento observado para el espesor es menor. Esto podría deberse a un posible cambio conformacional al anclarse sobre la superficie sensora quedando más empaquetada con esta inmovilización, lo que podría dificultar la interacción con la inmunoglobulina de interés.

Cabe destacar que el uso de la Proteína A genera resultados más reproducibles entre experimentos respecto a la Proteína G, pues las desviaciones son menores en todos los casos.

4.2 Bloqueo de centros de unión inespecífica: gelatina y etanolamina

La inmovilización vía ICPTS requiere un paso de bloqueo con un exceso de gelatina (Figura 10) según los resultados obtenidos previamente (López-Paz et al. 2014), pues la gelatina satura los grupos isocianato libres y además los centros activos de adsorción física, ya que la superficie final queda cargada positivamente ($-\text{NH}_3^+$).

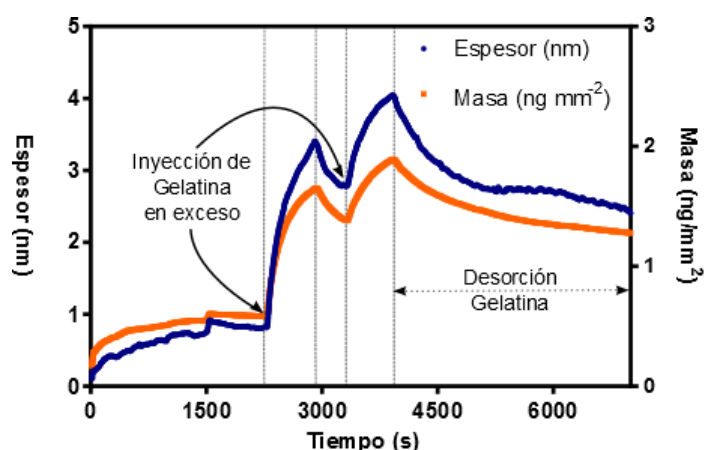


Figura 10. Registro del espesor y masa de la gelatina frente al tiempo donde se muestra su comportamiento en las etapas de inyección y desorción.

La aplicación de gelatina supone un aumento considerable de la masa y el espesor de la capa sobre el chip. No obstante, en los ensayos subsiguientes de unión de las hlgGs a la proteína de captura se asegura la total eliminación de las uniones inespecíficas.

La inmovilización vía Sulfo-GMBS solo requiere la saturación de los centros de unión covalente, pues la superficie final es neutra (-SH). La unión de la etanolamina a los sitios activos NHS restantes resultó en un ligero aumento no solo de la masa y densidad, sino también en el espesor de la capa depositada, mucho menor que en el caso de la gelatina (Figura 11).

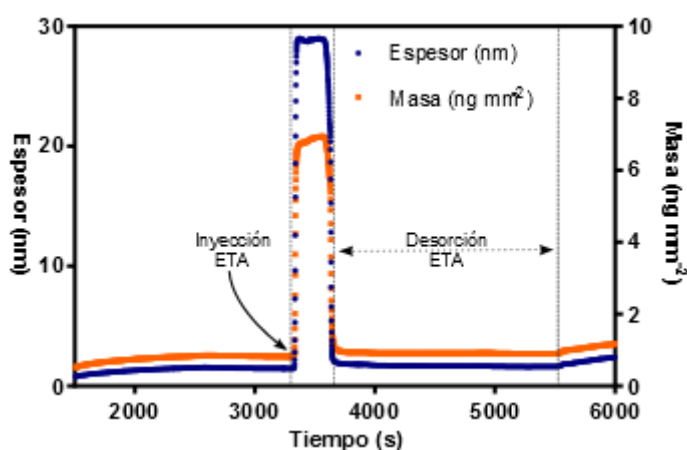


Figura 11. Registro del espesor y masa de la etanolamina (ETA) frente al tiempo donde se muestra su comportamiento en las etapas de inyección y desorción.

Este incremento en el espesor puede atribuirse a que la etanolamina se inserta entre los huecos libres que no tienen la proteína unida, o a que los grupos hidroxilo de la etanolamina empujan a la proteína a extenderse sobre la superficie formada.

4.3 Estudio del mecanismo de unión proteína de captura – inmunoglobulina G

4.3.1 Transiciones de fase estructurales: gráficos MATHIS

Como ya se ha mencionado, la técnica DPI proporciona medidas de espesor y masa de la capa registradas en continuo, lo que permite dilucidar las características de la interacción entre la proteína receptora y la hlgG.

Para estudiar el mecanismo de interacción entre las proteínas participantes se propone un método en el que a partir de las señales registradas en estado transitorio se puede elucidar de manera experimental el número de etapas que participan en el proceso de interacción global entre la proteína de captura y la hlgG estudiadas.

Para ello, se emplean los gráficos MATHIS, acrónimo del del inglés *Mass vs. Thickness*. Éstos son representaciones gráficas análogas a aquellas construidas a partir de las señales generadas

con la técnica, la microbalanza de cristal de cuarzo con control de la disipación (QCM-D). Esta técnica permite medir además de la variación de la frecuencia, la pérdida de energía o factor de disipación. Estas medidas son independientes y conjuntamente permiten analizar la interacción entre una molécula y la superficie mediante la construcción de las gráficas de frecuencia (Δf) frente a factor de disipación (ΔD) o gráficas $\Delta f - \Delta D$, introducidos por primera vez por (Rodahl et al. 1997).

De manera análoga a estas representaciones gráficas, los MATHIS representan la variación de la señal de masa depositada frente a la variación en el espesor de la capa y se emplean para estudiar la orientación con la que son inmovilizadas las moléculas participantes.

Los gráficos MATHIS permiten deducir el número de procesos elementales que tienen lugar durante la interacción entre las dos proteínas. Cada proceso elemental implica un ratio de masa/espesor distinto que el gráfico MATHIS muestra como una recta con una determinada pendiente. Son gráficos con un número discreto de puntos, muestran el cambio de masa y espesor desde el inicio de la inyección de la hlgG hasta que deja de inyectarse. Cada punto del gráfico representa el valor de un incremento en la masa y el espesor de la capa en un punto determinado de tiempo. El incremento de masa se representa en el eje Y mientras que el espesor registrado se representa en el eje X.

Los gráficos MATHIS son muy útiles ya que de manera rápida muestran cómo interacciona la proteína o molécula de interés con la superficie, donde una pendiente elevada de la recta indica que la capa formada es de densidad elevada (mucho masa y poco espesor) mientras que una pendiente baja sugiere una unión menos compacta. Además, indican el mecanismo del proceso, pues cada proceso elemental implica un ratio de masa/espesor distinto. Así pues, permiten el análisis de los cambios en la superficie ya que aportan información acerca de los cambios conformacionales de las moléculas adsorbidas.

Por consiguiente, los gráficos MATHIS proporcionan una huella dactilar del mecanismo de interacción entre la proteína y la superficie, son firmas únicas de la interacción entre las moléculas participantes. Dichas representaciones permiten descubrir las relaciones entre diferentes proteínas, pues aquellas que tengan huellas similares de $\Delta \text{Masa} - \Delta \text{Espesor}$ tendrán también mecanismos de acción similares. En definitiva, estos gráficos permiten hacer un barrido o *screening* de los mecanismos de reacción de cada una de las interacciones estudiadas, que permitirán diseñar un modelo de cada una de estas interacciones globales.

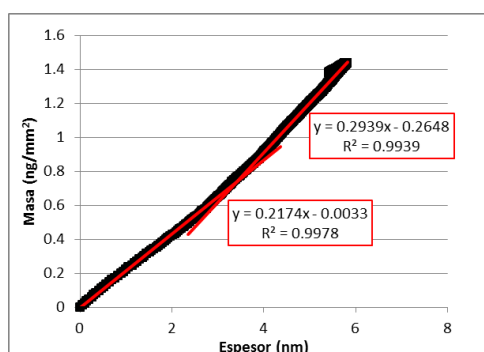
El empleo de estos gráficos MATHIS para el estudio de la orientación molecular es muy novedoso, pues todavía no ha sido publicado ningún artículo científico con esta información, siendo este trabajo final de grado el primer documento donde se reporta.

Así, dependiendo de las etapas que tengan lugar durante la unión proteína receptora – hlgG habrá un número menor o mayor de rectas. Por otra parte, el mecanismo de interacción entre la proteína de captura y la hlgG puede ser distinto atendiendo las concentraciones de las mismas.

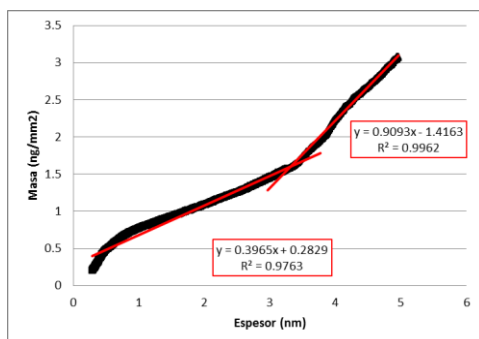
Una vez se completaron los experimentos con el DPI, se construyeron gráficos MATHIS a partir de todos los resultados obtenidos tras inmovilizar ambas proteínas de captura vía ICPTS y Sulfo-GMBS. Para cada una de las cuatro combinaciones se ensayaron cuatro concentraciones distintas de monómero y dímero de hlgG (0,1; 0,5; 1,0 y 5,0 mg/L).

Las Figuras 12, 13, 14 y 15 presentan, para cada combinación ensayada un gráfico MATHIS de muestra, correspondiente a la concentración de 5,0 mg/L, y para mostrar la dinámica conformacional global, una tabla con el número de rectas que se obtienen en cada una de las concentraciones de proteína ligando, del mismo modo que las pendientes y los coeficientes de correlación (R^2) de las mismas.

Los experimentos realizados demostraron que dependiendo de la concentración y el tipo de inmunoglobulina, el proceso global de unión tiene lugar en una o varias etapas mostradas a través de los MATHIS en forma de diferentes intervalos lineales con sendos ratios entre masa/ espesor.



Inmovilización vía ICPTS			
[hlgG] _M (mg/mL)	nº rectas	Pendientes (µg/mm ³)	R ²
0,1	2	245	0,9626
		500	0,6810
0,5	1	247	0,9944
1	1	241	0,9990
5	2	217	0,9978
		294	0,9939



Inmovilización vía Sulfo-GMBS			
[hlgG] _M (mg/L)	nº rectas	Pendientes (µg/mm ³)	R ²
0,1	1	293	0,9613
0,5	1	428	0,9907
1	1	689	0,9652
5	2	397	0,9763
		909	0,9962

Figura 12. Gráfico MATHIS obtenido para la interacción entre 5 mg/L de monómero y Proteína A inmovilizada vía ICPTS (arriba) y Sulfo-GMBS (abajo), además de los resultados obtenidos a partir de los gráficos MATHIS correspondientes a las cuatro concentraciones de monómero ensayadas.

Como se muestra en la Figura 12, atendiendo al número de pendientes obtenidas se obtiene un total de cuatro rectas distintas para la interacción de la Proteína A con el monómero de hlgG inmovilizados vía ICPTS para todas las concentraciones ensayadas. Para extraer tal conclusión no se ha considerado significativa la diferencia entre los valores de 241, 245 y 247 µg/mm³ y por tanto se considera que muestran la misma transición de fase.

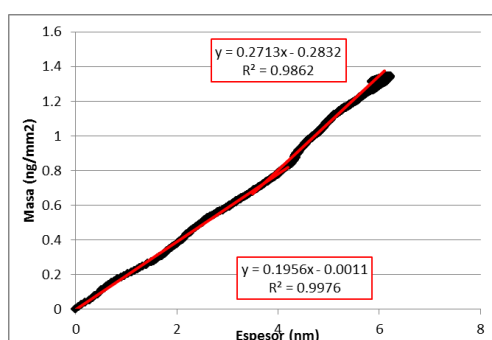
Con toda la información de la Figura 12 se puede afirmar que en total se han detectado cuatro intervalos lineales distintos durante la interacción Proteína A – Monómero de hlgGs en el rango de concentraciones estudiado. Así, el mecanismo postulado para la reacción debe

contener al menos cuatro procesos elementales distintos que expliquen la presencia de las cuatro pendientes observadas. Como resultado final se obtiene una capa de monómero relativamente poco densa.

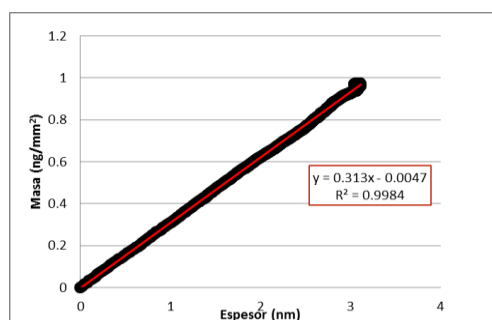
Del mismo modo, para la inmovilización vía Sulfo-GMBS se han obtenido un total de cuatro pendientes, pues consideramos que los valores de las pendientes $397 \mu\text{g}/\text{mm}^3$ y $428 \mu\text{g}/\text{mm}^3$ no son significativamente distintos y por tanto corresponden a un mismo proceso de interacción. Para este tipo de inmovilización se observan ratios de masa/espesor más elevados indicando una densidad mayor de la capa depositada especialmente para concentraciones altas de anticuerpo. Concretamente, una de las pendientes alcanza los $909 \mu\text{g}/\text{mm}^3$, una pendiente elevada que sugiere un elevado grado de empaquetamiento del complejo formado donde el monómero se queda muy unido.

De los gráficos MATHIS se puede extraer mucha más información acerca del proceso de interacción, como se observa en el MATHIS del monómero inmovilizado vía ICPTS (arriba de la Figura 12). En dicho gráfico se observa desorción en los últimos segundos de la interacción, pues la masa y el espesor disminuyen simultáneamente siguiendo la misma pendiente que para el proceso de adsorción.

Los resultados obtenidos para la interacción del dímero de hIgGs con la Proteína A inmovilizada se muestran en la Figura 13.



Inmovilización vía ICPTS			
[hIgG] _D (mg/mL)	nº rectas	Pendientes ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)	R ²
0,1	1	246	0,9872
0,5	1	173	0,9890
1	1	207	0,9863
5	2	196	0,9976
		271	0,9862



Inmovilización vía Sulfo-GMBS			
[hIgG] _D (mg/mL)	nº rectas	Pendientes ($\mu\text{g}/\text{mm}^3$)	R ²
0,1	1	320	0,9984
0,5	1	290	0,9994
1	1	327	0,9996
5	1	313	0,9984

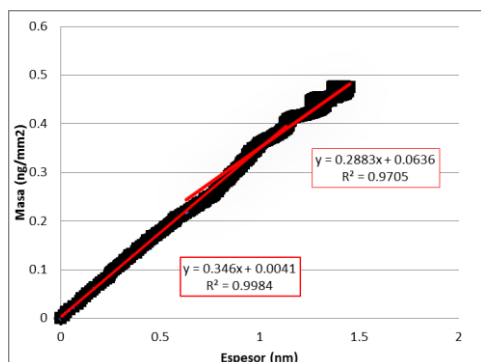
Figura 13. Gráfico MATHIS obtenido para la interacción entre 5 mg/L de dímero y Proteína A inmovilizada vía ICPTS (arriba) y Sulfo-GMBS (abajo), además de los resultados obtenidos a partir de los gráficos MATHIS correspondientes a las cuatro concentraciones de dímero ensayadas.

Los gráficos MATHIS muestran dos intervalos lineales para el caso de la inmovilización vía ICPTS. El mecanismo postulado para esta interacción con el dímero consta por tanto de un total de dos procesos de interacción diferentes, indicando que el monómero y el dímero de hlgGs se comportan de manera distinta ya que se observan distintas huellas dactilares del mecanismo de interacción. Por otro lado, los ratios de masa/espesor son relativamente bajos, indicando una baja densidad de la capa depositada y por consiguiente el predominio de una disposición perpendicular a la superficie, ya que aumenta más rápido el espesor que la masa depositada. Si comparamos con el monómero inmovilizado vía ICPTS, a pesar de que siguen mecanismos distintos, podemos decir que la conformación no es igual, puesto que en ese caso se esperarían unos ratios de masa/espesor muy similares ya que el dímero tiene el doble de masa y espesor que un monómero de hlgGs.

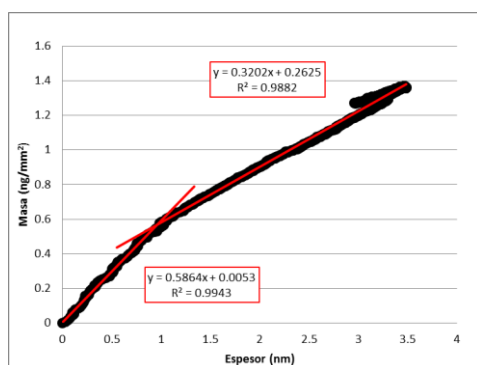
En cambio, durante la interacción del dímero con la Proteína A inmovilizada vía Sulfo-GMBS, se obtiene tan solo un valor de pendiente para todas las concentraciones de dímero estudiadas. Esto indica que el mecanismo de interacción consta solo de una etapa, esto es, no se observa una reorganización de los complejos formados cuando interviene el dímero y la Proteína A anclada vía Sulfo-GMBS. Atendiendo al valor de las pendientes, aunque relativamente bajas, son ligeramente superiores a las obtenidas con la inmovilización vía ICPTS. Este mecanismo sugiere que el dímero de hlgG se queda recostado sobre la superficie en mayor medida con la inmovilización vía Sulfo-GMBS. Además se debe tener en cuenta el impedimento estérico que implica la unión del dímero, lo que no favorece la reorganización de los complejos formados durante la misma.

Comparando estos resultados con la inmovilización del monómero, se puede afirmar que éste último se queda en una disposición en la que predomina una conformación inclinada hacia la superficie ya que la masa aumenta mucho más rápidamente que el espesor.

En el gráfico MATHIS de la Figura 13 para el dímero anclado vía ICPTS también se puede advertir la presencia de desorción siguiendo la misma pendiente que el proceso de adsorción para el último tramo de la interacción. Sin embargo, esto no ocurre para el anclaje vía Sulfo-GMBS, donde lo que se observa es una bola de puntos indicando la saturación de la capa.



Inmovilización vía ICPTS			
[hlgG] _M (mg/mL)	nº rectas	Pendientes (µg/mm ³)	R ²
0,1	1	288	0,9939
0,5	1	270	0,9971
1	1	302	0,995
5	2	346	0,9984
		288	0,9705



Inmovilización vía Sulfo-GMBS			
[hlgG] _M (mg/mL)	nº rectas	Pendientes (µg/mm ³)	R ²
0,1	2	584	0,9871
		141	0,9849
0,5	2	246	0,9997
		414	0,9961
1	1	362	0,9962
5	2	586	0,9943
		320	0,9882

Figura 14. Gráfico MATHIS obtenido para la interacción entre 5 mg/L de monómero y Proteína G inmovilizada vía ICPTS (arriba) y Sulfo-GMBS (abajo), además de los resultados obtenidos a partir de los gráficos MATHIS correspondientes a las cuatro concentraciones ensayadas.

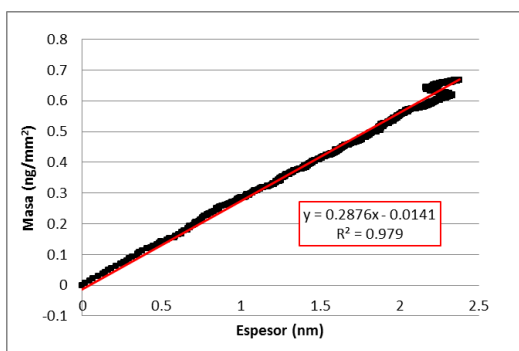
Para la interacción del monómero con la Proteína G, los gráficos MATHIS muestran dos segmentos lineales para proceso global de unión entre el monómero y la Proteína G inmovilizada vía ICPTS (Figura 14). Por tanto, el mecanismo propuesto para esta unión corresponde con un procedimiento compuesto por dos procesos elementales.

A pesar de que el dímero de hlgGs también interacciona con la Proteína A anclada vía ICPTS con un mecanismo compuesto por dos procesos, las pendientes no son iguales y por tanto se trata de una interacción distinta (Figura 13). Las pendientes indican que la densidad de la capa formada es ligeramente más elevada cuando el monómero interactúa con la Proteína A anclada vía Sulfo-GMBS (Figura 12). El monómero de hlgGs se queda por tanto menos empaquetado con este tipo de inmovilización.

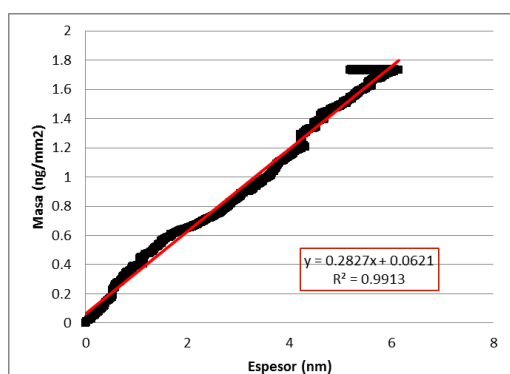
Los gráficos MATHIS correspondientes a la inmovilización vía Sulfo-GMBS evidencian la presencia de seis procesos elementales para el mecanismo global de interacción. Estas diferencias entre el número de procesos observados durante la interacción puede deberse al espaciado adicional que proporciona el agente bifuncional, ya que según indican las gráficas de interacción el monómero se une siguiendo un mecanismo más complicado de unión y reorganización de los complejos formados con la proteína de captura.

La densidad de la capa formada mediante este tipo de inmovilización es muy variable según las reorganizaciones que tienen lugar, indicando que el monómero se queda sobre la superficie adoptando distintas conformaciones.

En la Figura 14 se observa el gráfico MATHIS del monómero anclado vía Sulfo-GMBS con una desorción más acusada en los últimos puntos que en los casos anteriores (Figura 12 y Figura 13). Sin embargo, para el caso de la inmovilización vía ICPTS esto no ocurre a pesar de que la recta representada señala la presencia de ruido en las señales considerado el vaivén de los puntos representado hacia el final de la interacción.



Inmovilización vía ICPTS			
[hlgG] _D (mg/mL)	nº rectas	Pendientes (µg/mm ³)	R ²
0,1	1	330	0,9893
	2	192	0,9947
0,5	2	293	0,9367
	2	200	0,9960
1	2	336	0,9674
	1	288	0,979



Inmovilización vía Sulfo-GMBS			
[hlgG] _D (mg/mL)	nº rectas	Pendientes (µg/mm ³)	R ²
0,1	1	207	0,9931
	2	273	0,9989
0,5	1	421	0,9988
	1	288	0,9613
1	1	283	0,9913
	1	283	0,9913

Figura 15. Gráfico MATHIS obtenido para la interacción entre 5 mg/L de dímero y Proteína G inmovilizada vía ICPTS (arriba) y Sulfo-GMBS (abajo), además de los resultados obtenidos a partir de los gráficos MATHIS correspondientes a las cuatro concentraciones de dímero ensayadas.

Por otra parte, el dímero interactúa con la Proteína G inmovilizada vía Sulfo-GMBS y vía ICPTS de forma distinta al monómero (Figura 15). Teniendo en cuenta todas las pendientes resultado de los gráficos MATHIS correspondientes a la interacción, nos encontramos con tres ratios de masa/espesor distintos que indican una interacción compuesta por tres procesos elementales distintos, para los dos métodos de inmovilización estudiados.

La capa formada con la interacción del dímero y la Proteína G anclada vía ICPTS es más densa que cuando el anclaje tiene lugar vía Proteína A – ICPTS, indicando que este tipo de anclaje orienta el dímero de hlgG de manera menos perpendicular a la superficie. Por tanto, para el

caso del dímero, parece que independientemente del proceso empleado para la inmovilización de la proteína de captura, el mecanismo que rige la unión es similar, aunque sin llegar a ser el mismo, pues la huella dactilar de la interacción es distinta. Para el caso de la inmovilización vía Sulfo-GMBS, existe una tendencia para concentraciones bajas, donde el dímero se queda en una conformación menos tumbada que a mayor concentración de la hIgG.

La influencia del brazo espaciador sobre la interacción de la proteína G con el dímero de hIgG sugerida anteriormente en este caso no actúa favoreciendo la reorganización de los complejos con las proteínas participantes.

Cabe destacar los fenómenos advertidos en estos gráficos MATHIS de la Figura 15, donde el dímero inmovilizado vía ICPTS experimenta en el último tramo de la interacción una disminución del espesor al mismo tiempo que la masa sigue en aumento para después volver las dos señales a aumentar. Estos cambios de densidad apuntan a una reorganización rápida del complejo formado hacia un empaquetamiento y una continuación en el crecimiento de la capa. Para el caso del anclaje vía Sulfo-GMBS, se observa una reorganización hacia el final de la interacción, donde el espesor decrece y la masa se mantiene constante.

4.3.2 Ajuste final: Parámetros cinéticos y dinámica conformacional

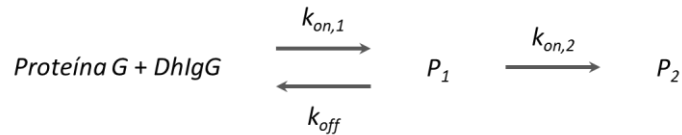
La técnica DPI proporciona medidas muy sensibles tanto de masa como de espesor de las capas depositadas. Utilizando los valores experimentales registrados para esos parámetros durante la interacción de la proteína de captura con la hIgG es posible simular el mecanismo de interacción que tiene lugar entre la proteína y el anticuerpo.

4.3.2.1 Mecanismo propuesto para la interacción del dímero de hIgG

Partiendo de la información extraída de los gráficos MATHIS se ha postulado un mecanismo para la interacción del dímero de hIgGs con la proteína G inmovilizada vía Sulfo-GMBS. La información obtenida resulta de especial interés ya que un trabajo previo similar, en vías de publicación, ha sido realizado para el estudio de la interacción entre el monómero de hIgG y Proteína A inmovilizada vía ICPTS.

Aunque de los datos obtenidos de los gráficos de MATHIS el mecanismo de interacción entre el dímero de hIgGs consta de tres etapas, para facilitar la modelización del proceso se propusieron modelos más simplificados con el objetivo de evaluar si el mecanismo global de interacción del complejo podía ser simplificado con un solo proceso o etapa de reconocimiento y así simplificar también los cálculos. Las medidas experimentales no se ajustaron a un solo proceso y se estableció un modelo compuesto por dos transiciones de fase.

De este modo, el proceso de reacción propuesto para evaluar el proceso de interacción entre la proteína G y el dímero de hIgG sobre la superficie sólido/líquido consta de dos etapas:



Donde la proteína G inmovilizada participa en dos procesos de asociación y uno de disociación con el dímero de hlgG para formar dos aductos P_1 y P_2 .

A partir del mecanismo postulado, se plantearon las ecuaciones cinéticas que explicaran el proceso. Los datos de las variaciones de masa y espesor corregidas para las distintas concentraciones de anticuerpo ensayadas se obtuvieron, a partir del análisis por mínimos cuadrados, los valores de las constantes que rigen el mecanismo. En primer lugar, se ajustaron las variaciones de masa en función del tiempo y una vez obtenidas las constantes, se ajustaron para el incremento de espesor.

Finalmente, tras sustituir los parámetros en las ecuaciones correspondientes se compararon los datos teóricos obtenidos con los datos experimentales para comprobar la bondad del ajuste.

El ajuste realizado permitió determinar las constantes cinéticas del mecanismo, así como también otros parámetros de la dinámica conformacional del mismo, como las dimensiones y la masa de los agregados P_1 y P_2 que se forman durante la interacción de las hlgGs sobre la Proteína G. Estos valores proporcionados por el modelo tienen en cuenta solo la masa depositada y las dimensiones de las hlgGs, ya que previamente al modelado se ha realizado un blanco de la proteína de captura, es decir, se ha restado la cantidad de proteína depositada. En cambio, los parámetros referentes a las variaciones estructurales tienen en cuenta todo el complejo que se establece.

La Figura 16 muestra cómo los valores predichos con el modelo de interacción se ajustaban a los datos experimentales registrados tras ajustar el proceso a una interacción – disociación en dos etapas (95% de intervalo de confianza) usando un modelo de regresión no lineal. En la figura se puede observar cómo los valores del modelo se ajustan a las curvas experimentales, si bien se trata de una simplificación de la interacción global del complejo, pues se observa que al final de la interacción los valores esperados no terminan de ajustarse a las medidas tomadas.

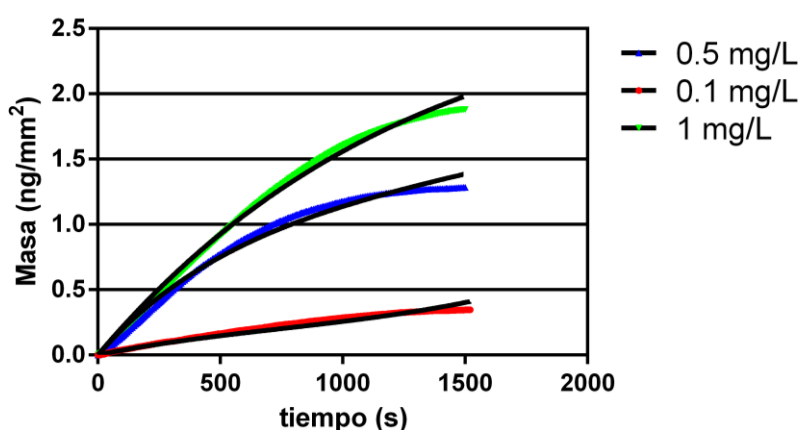


Figura 16. Evolución de la masa de dímero de hIgG depositada sobre la capa de Proteína G inmovilizada vía Sulfo-GMBS y ajuste del modelo. Las curvas de color negro corresponden a los valores teóricos calculados con el modelo mientras que las curvas de colores rojo, verde y azul corresponden a los valores registrados de masa para cada concentración.

Cabe recalcar el elevado número de medidas experimentales tomadas con el DPI, que posibilitan la obtención de ajustes de calidad.

El buen ajuste de los datos experimentales registrados con el equipo DPI con los valores teóricos del modelo propuesto confirma que el esquema de la reacción de unión propuesto es correcto para predecir el comportamiento del sistema Proteína G – hIgG para el rango de concentraciones de hIgG estudiado.

Tabla 2. Parámetros del ajuste de la interacción del dímero de hIgG con la Proteína G inmovilizada vía Sulfo-GMBS.

	Media	Intervalo de Confianza
K_{on1} (L/mg·s)	$2,60 \times 10^{-3}$	$2,28 \times 10^{-5}$
K_{on2} (L/mg·s)	$3,45 \times 10^{-3}$	$4,60 \times 10^{-5}$
K_{off} (L/mg·s)	$6,62 \times 10^{-14}$	$2,56 \times 10^{-14}$
D_1 (nm)	9,58	$2,14 \times 10^{-2}$
D_2 (nm)	3,87	$6,98 \times 10^{-2}$
R^2	0,9825	

Por otro lado, a partir del valor de variación de masa (M_1) estimado con el modelo ($2,7 \times 10^{-3}$ g/m²) y teniendo en cuenta las dimensiones de un anticuerpo típico, 14,5 nm de ancho x 8,0 nm de alto x 4,0 nm de espesor, se podría suponer la formación de un dímero con las dimensiones aproximadas siguientes: 14,5 nm de ancho x 16 nm de alto. El dímero resultó tener una masa de 364 ± 10 kDa, un poco más de lo que cabría esperar para un dímero de hIgG interaccionando de modo similar a un complejo idiota – antiidiotipo, sabiendo que un monómero típico de hIgG tiene una masa de aproximadamente 150 kDa.

El segundo valor de masa molecular (M_2) obtenido a partir de las dimensiones de masa estimadas con el ajuste indica que durante el segundo proceso de interacción no interviene otra molécula, solo participa el complejo formado anteriormente, que se reacondiciona durante la interacción.

Los valores de espesor obtenidos en el modelo (D_1) sugieren que el producto principal (P_1) de la interacción el dímero se orienta en vertical sobre la Proteína G, tal como aparece representado en la Figura 17, mientras que P_2 resulta ser una especie minoritaria producto de un reacondicionamiento de P_1 .

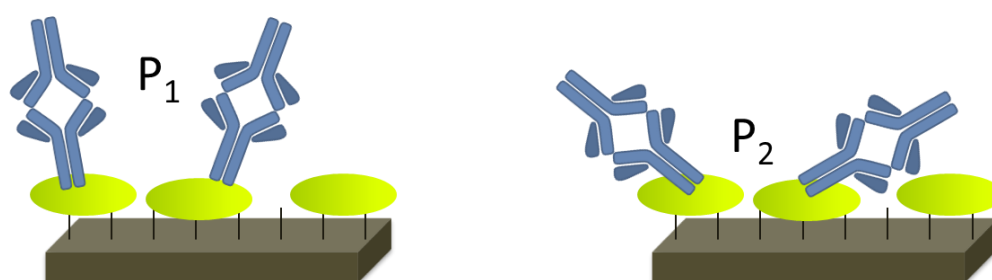
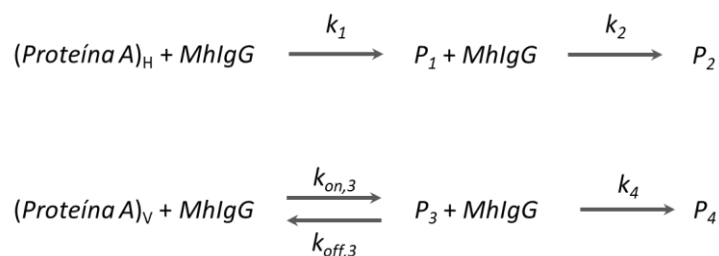


Figura 17. Estructura de los agregados formados entre el dímero de hIgG y la Proteína G.

4.3.2.2 Comparación con la unión de hIgG monómero a la Proteína A

A efectos de comparación, se describe a continuación un resumen del mecanismo que se obtuvo para la interacción entre la proteína A inmovilizada vía ICPTS y la hIgG monómero, cuyo gráfico MATHIS corresponde a la Figura 12, parte superior. Estos resultados no se han publicado, pero sí que se expusieron en el *VII International Workshop on Sensors and Molecular Recognition*, celebrado en la UPV en 2013.

En este caso, se parte de proteína A inmovilizada de dos modos diferentes simultáneamente, anteriormente mencionado en la sección 4.1.1, la mayor parte (80%) está totalmente horizontal sobre la superficie, mientras que el resto está parcialmente vertical. Del gráfico MATHIS se deduce un mecanismo en cuatro etapas, que son las siguientes:



Los ajustes dieron lugar a los siguientes valores de las constantes cinéticas y las dimensiones de los productos intermedios y finales, para un valor de la masa molecular del monómero que se calculó como 154 ± 4 kDa.

Tabla 3. Parámetros del ajuste de la interacción del monómero de hlgGs con la Proteína A inmovilizada vía ICPTS.

	Media	Intervalo de Confianza
k_1 (L/mg·s)	$5,0 \times 10^{-4}$	$0,9 \times 10^{-4}$
k_2 (L/mg·s)	$1,8 \times 10^{-4}$	$0,3 \times 10^{-4}$
$k_{3,on}$ (L/mg·s)	24×10^{-4}	3×10^{-4}
$k_{3,off}$ (L/mg·s)	186×10^{-4}	7×10^{-4}
k_4 (L/mg·s)	210×10^{-4}	30×10^{-4}
D_1 (nm)	5,1	0,2
D_2 (nm)	4,7	0,2
D_3 (nm)	11,7	0,5
D_4 (nm)	6,2	0,3

Con estos datos, se propuso un esquema (Figura 18) en el que sobre la Proteína A horizontal se unían secuencialmente dos hlgGs que quedaban también recostadas, mientras que la proteína A colocada verticalmente unía primero una hlgG también en posición vertical, acomodando la segunda IgG horizontalmente.

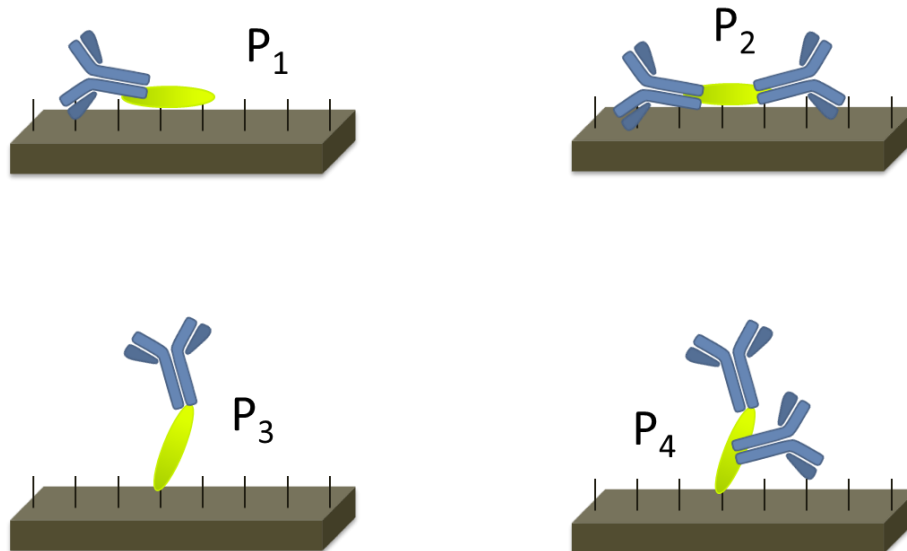


Figura 18. Estructuras de los agregados formados entre el monómero de hlgG y la Proteína A.

Este mecanismo difiere bastante de la unión del dímero a la Proteína G (Figura 17), ya que en primer lugar solamente se une un dímero, que posteriormente se acondiciona, y no dos,

debido a efectos estéricos. Asimismo, al haber solamente proteína receptora en una posición, el mecanismo se simplifica mucho.

En cualquier caso, el mecanismo propuesto para la unión del dímero es todavía un modelo que requiere más ajustes en la función objetivo para que los parámetros propuestos correlacionen mejor con las medidas experimentales.

Este estudio forma parte de un proyecto de mayor envergadura en el que se pretende proponer un modelo para cada mecanismo de interacción plateado con los gráficos MATHIS del presente trabajo. Conocidos con detalle todos los mecanismos, se pretende como objetivo final desarrollar un algoritmo que permita identificar y cuantificar la presencia de dímero en una preparación comercial de IgIVs.

5 CONCLUSIONES

La tecnología DPI resulta adecuada para los estudios de interacciones entre proteínas a nivel molecular, ya que el registro continuo de la masa y el espesor de la capa permite establecer al dinámica conformacional de las uniones.

Los dos métodos de inmovilización de la proteína de captura empleados (ICPTS y Sulfo-GMBS) son ambos adecuados, reportando rendimientos de inmovilización aceptables para ambas proteínas. El Sulfo-GMBS resulta ser más complejo operativamente puesto que consta de un paso más. Sin embargo, los centros de unión inespecífica se bloquean de modo más fácil.

Ambas proteínas de captura reconocen a las hlgGs, tanto los monoméricas como los dímeros. Sin embargo, los mecanismos de las interacciones entre las proteínas de captura y los dos tipos de hlgG resultan ser diferentes. La inmovilización de las propias proteínas de captura también tiene influencia, ya que si la proteína de captura se inmoviliza de modo horizontal tiene un comportamiento distinto a si se inmoviliza de modo vertical.

Los gráficos MATHIS permiten establecer el mecanismo de las uniones en base a datos experimentales, lo que les confiere fiabilidad. La obtención de las constantes cinéticas mediante el ajuste de las mismas y comparación con los datos experimentales resulta de elevada complejidad. En cualquier caso, se pueden deducir diferencias notables en los mecanismos de unión del monómero y del dímero a las proteínas de captura estudiadas en cuanto a número de etapas del mecanismo, estructura y orientación de los complejos formados.

6 BIBLIOGRAFÍA

- ÅKERSTRÖM, B.; BJÖRCK, L. (1986) *A Physicochemical Study of Protein G, a Molecule with Unique Immunoglobulin G-Binding Properties. The Journal of Biological Chemistry*, 261(22): 10240-10247
- BJÖRK, I.; PETERSSON, B.; SJÖQUIST, J. (1972) *Some Physicochemical Properties of Protein A from Staphylococcus Aureus. European Journal of Biochemistry*, 29(3):79-584
- BOSTRÖM, T.; NILVEBRANT, J.; HOBER, S. (2012) *Purification Systems Based on Bacterial Surface Protein. Protein Purification*
- CROSS, G.; FREEMAN, N.; SWANN, M. (2007) *Dual Polarization Interferometry: A Real-Time Optical Technique for Measuring (Bio)Molecular Orientation, Structure and Function at the Solid/Liquid Interface. Handbook of Biosensors and Biochips John Wiley & Sons, Ltd. ISBN 9780470061565*
- CROSS, G; REEVES, A.; BRAND, S.; POPPLEWELL, J.; PEEL, L.; SWANN, M. ; FREEMAN, N. (2003) *A New Quantitative Optical Biosensor for Protein Characterisation. Biosens. Bioelectron.*, 19(4): 383-390
- DEIS, L., PEMBLE, C.; QI, Y.; HAGARMAN, A.; RICHARDSON, D.; RICHARDSON, J.; OAS, T. (2014) *Multiscale Conformational Heterogeneity in Staphylococcal PROTEIN A: Possible Determinant of Functional Plasticity. Structure* 22(10): 1467-1477
- DERRICK, J.; WIGLEY, D. (1994) *The Third IgG-Binding Domain from Streptococcal Protein G. an Analysis by X-Ray Crystallography of the Structure Alone and in a Complex with Fab. Journal of Molecular Biology*, 243(5):906-918
- DURANDY, A.; KAVERI, S.; KUIJPERS, T; BASTA, M.; MIESCHER, S.; RAVETCH, J.; RIEBEN, R. (2009) *Intravenous Immunoglobulins - Understanding Properties and Mechanisms. Clinical & Experimental Immunology*, 158: 2-13
- ESCORIHUELA, J.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, MA.; LÓPEZ-PAZ, JL.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, Á.; GIMENEZ-ROMERO, D. (2015) *Dual-Polarization Interferometry: A Novel Technique to Light Up the Nanomolecular World. Chemical Reviews*, 115(1):265-294
- GHOSE, A. C., MOOKERJEE, A.; SENGUPTA, K.; GHOSH, AK.; DASGUPTA, S.; RAY, PK. (1999) *Therapeutic and Prophylactic Uses of Protein A in the Control of Leishmania Donovanii Infection in Experimental Animals. Immunology Letters*, 65(3):175-181
- GIMÉNEZ-ROMERO, D.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, MA., BAÑULS, MJ., MONZÓ, IS.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, Á. (2012) *Modeling of the Role of Conformational Dynamics in Kinetics of the Antigen - Antibody Interaction in Heterogeneous Phase. The Journal of Physical Chemistry B*, 116(19):5679-5688
- GONZÁLEZ, M.; BAGATOLLI, LA.; ECHABE; I.; ARRONDO, JL.; ARGARAÑA, CE.; CANTOR, CR.; FIDELIO, GD. (1997) *Interaction of Biotin with Streptavidin:*

Thermostability and Conformational Changes upon Binding. Journal of Biological Chemistry, 272(17):11288-11294

- GOODYEAR, CS.; SILVERMAN, GJ. (2003) *Death by a B Cell Superantigen: In Vivo V(H)-Targeted Apoptotic Supraclonal B Cell Deletion by a Staphylococcal Toxin. The Journal of Experimental Medicine*, 197(9):1125-1139
- GOWARD, CR.; MURPHY, J P.; ATKINSON, T.; BARSTOW, DA. (1990) *Expression and Purification of a Truncated Recombinant Streptococcal Protein G. Biochem J*, 267(1):171-177
- GRAILLE, M.; STURA, EA.; CORPER, AL.; SUTTON, BJ.; TAUSSIG, MJ.; CHARBONNIER, JB.; SILVERMAN, GJ. (2000) *Crystal Structure of a Staphylococcus Aureus Protein A Domain Complexed with the Fab Fragment of a Human IgM Antibody: Structural Basis for Recognition of B-Cell Receptors and Superantigen Activity. Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(10):5399-5404
- Guía clínica para el uso de inmunoglobulinas (2011) Grupo Español de Medicamentos Hemoderivados [GEMEH] y Sociedad Española de Farmacia Hospitalaria [SEFH], actualización de la 2ª edición, adaptación para España
- GÜRCAN, HM.; KESKIN, DB.; AHMED, AR. (2010) *Information for Healthcare Providers on General Features of IGIV with Emphasis on Differences between Commercially Available Products. Autoimmunity Reviews*, 9(8):553-559
- HOBBER, S.; NORD, K; LINHULT, M. (2007) *Protein A Chromatography for Antibody Purification. Journal of Chromatography*, 848(1):40-47
- HOOPER, JA. (2008) *Intravenous Immunoglobulins: Evolution of Commercial IVIG Preparations. Immunology and Allergy Clinics of North America*, 28(4): 765-778
- LÓPEZ-PAZ, JL.; GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, MA.; ESCORIHUELA, J.; BAÑULS, MJ.; PUCHADES, R.; MAQUIEIRA, Á. (2014) *Direct and Label-Free Monitoring Oligonucleotide Immobilization, Non-Specific Binding and DNA Biorecognition. Sensors and Actuators B: Chemical*, 192: 221-228
- PULI, L.; TANILA, H.; RELKIN, N. (2014) *Intravenous Immunoglobulins for Alzheimer's Disease. Current Alzheimer Research*, 11(7):626-636
- RADOSEVICH, M.; BURNOUF, T. (2010) *Intravenous Immunoglobulin G: Trends in Production Methods, Quality Control and Quality Assurance. Vox Sanguinis*, 98(1):12-28
- RAY, P. K.; DAS, T.; SA, G.; GHOSH, AK.; CHATTOPADHYAY, S. (2000) *Protection of Apoptotic Cell Death by Protein A. Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, 5(6):509-514
- RAY, PRASANTA, K.; DAS, DIPAK, K., (1999) *Stress Genes and Species Survival*, 196(1-2):117-23
- RELKIN, N. (2014) *Clinical Trials of Intravenous Immunoglobulin for Alzheimer's Disease. Journal of Clinical Immunology*, 34(1): 74-79

- RODAHL, M.; HÖÖK, F.; FREDRIKSSON, C.; KELLER, C.A.; KROZER, A.; BRZEZINSKI, P.; VOINOVA, M.; KASEMO, B. (1997) *Simultaneous Frequency and Dissipation Factor QCM Measurements of Biomolecular Adsorption and Cell Adhesion. Faraday Discussions*, 107: 229-246
- SEITE, JF; SHOENFELD, Y.; YOUINO, P.; HILLION, S. (2008) *What is the Contents of the Magic Draft IVIg? Autoimmunity Reviews*, 7(6): 435-439
- SHUKLA, Y.; VERMA, AS.; MEHROTRA, NK.; RAY, PK. (1996) *Antitumour Activity of Protein A in a Mouse Skin Model of Two-Stage Carcinogenesis. Cancer Letters*, 103(1): 41-47
- SIMPSON, KATHRYN H., BOWDEN, MG.; PEACOCK, SJ.; ARYA, M.; HÖÖK, M.; ANVARI, B. (2004) *Adherence of Staphylococcus Aureus Fibronectin Binding Protein A Mutants: An Investigation using Optical Tweezers. Biomolecular Engineering*, 21(3):105-111
- SONG, HY.; ZHOU X.; HOBLEY, J.; SU, X. (2012) *Comparative Study of Random and Oriented Antibody Immobilization as Measured by Dual Polarization Interferometry and Surface Plasmon Resonance Spectroscopy. Langmuir*, 28(1):997-1004
- SPAETH, PJ.; GRANATA, G.; LA MARRA, F.; KUIJPERS, TW.; QUINTI, I. (2015) *On the Dark Side of Therapies with Immunoglobulin Concentrate, the Adverse Events. Frontiers in Immunology*, 6(11):1-23
- STAROVASNIK, MA.; SKELTON, NJ.; O'CONNELL, MP.; KELLEY, RF.; REILLY, D.; FAIRBROTHER, WJ. (1996) *Solution Structure of the E-Domain of Staphylococcal Protein A. Biochemistry*, 35(48):15558-15569
- SWANN, MJ.; PEEL LL.; CARRINGTON, S.; FREEMAN, NJ. (2004) *Dual-Polarization Interferometry: An Analytical Technique to Measure Changes in Protein Structure in Real Time, to Determine the Stoichiometry of Binding Events, and to Differentiate between Specific and Nonspecific Interactions. Analytical Biochemistry*, 329(2):190-198
- TOUHAMI, A; JERICHO, MH.; BEVERIDGE, TJ. (2007) *Molecular Recognition Forces between Immunoglobulin G and a Surface Protein Adhesin on Living Staphylococcus Aureus. Langmuir*, 23(5): 2755-2760
- World Health Organization (WHO). (2007) Recommendations for the production, control and regulation of human plasma for fractionation. Technical Report Series, No 941, Report, Annexes 4 of WHO Expert Committee on Specifications for Pharmaceutical Preparations. Disponible en: <http://www.who.int/bloodproducts/publications/TRS941Annex4blood.pdf>