

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA

Facultad de Ciencias Biológicas

Departamento de Bioquímica y Biología

Molecular



Hacia la caracterización del
epítipo del autoantígeno en
el Síndrome de Goodpasture

Tesis Doctoral Roberto Vicente Gozalbo Rovira

Valencia 2014

Tesis Doctoral

Roberto Vicente Gozalbo Rovira

Hacia la caracterización del epítipo del autoantígeno en el Síndrome de Goodpasture.



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA



PRINCIPE FELIPE
CENTRO DE INVESTIGACION

Memoria presentada por
Roberto Vicente Gozalbo Rovira.

Programa de Doctorado:
030G Señalización celular y patologías asociadas.
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular.

Director:

Javier Cervera Miralles

Codirector:

Jesús Rodríguez Díaz

Tutor:

Juan Saus Mas

Javier Cervera Miralles y Jesús Rodríguez Díaz, Doctores en Biología

CERTIFICAN

Que Roberto Vicente Gozalbo Rovira, licenciado en Biología por la Universidad de Valencia, ha realizado, bajo su dirección, el trabajo de Tesis Doctoral que lleva por título **“Hacia la caracterización del epítipo del autoantígeno en el Síndrome de Goodpasture”**.

Revisado el trabajo, expresan su conformidad para que éste sea sometido a discusión ante el Tribunal correspondiente, al considerar que la presentación del mismo reúne los requisitos necesarios para optar al grado de Doctor.

En Valencia, 22 de Julio de 2014.

Fdo. Javier Cervera Miralles

Jesús Rodríguez Díaz

Para la realización de la presente Tesis Doctoral, Roberto Vicente Gozalbo Rovira ha disfrutado de una Beca de Formación de Profesorado Universitario (FPU) (AP2006-03366) del Ministerio de Educación Cultura y Deporte.

El trabajo se ha enmarcado en la línea de trabajo del laboratorio de reconocimiento molecular del Centro de Investigación Príncipe Felipe de Valencia sobre la caracterización del antígeno de Goodpasture, dentro del proyecto “Caracterización del epítipo del autoantígeno en el síndrome Goodpasture mediante el uso de la técnica de phage display” financiado por la Fundación Ramón Areces (XV Concurso Nacional).

Desde el 01 de junio de 2011 hasta el 21 de marzo de 2012, Roberto Vicente Gozalbo Rovira, estuvo contratado por el Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) a través de un contrato asociado al proyecto “Caracterización del epítipo del autoantígeno en el síndrome Goodpasture mediante el uso de la técnica de phage display” en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, financiado por la Fundación Ramón Areces.

AGRADECIMIENTOS.

Agradezco a Javier, mi director, su dedicación, esfuerzo y perseverancia en transmitir sus conocimientos, así como por enseñarme a trabajar de acuerdo con el rigor científico; además, más importante si cabe, agradezco su amabilidad, comprensión, su entusiasmo y haber tenido su apoyo siempre que lo he necesitado.

Agradezco a Jesús, mi codirector, su motivación, su acertado criterio, su capacidad de síntesis y sus sabios consejos, que han sido claves para el desarrollo de esta Tesis Doctoral.

Agradezco al Dr. Juan Saus y a su laboratorio, el Laboratorio de Patología Autoinmune, su colaboración en la presente Tesis Doctoral mediante la cesión de los autoanticuerpos Goodpasture y lo más importante, el extenso conocimiento sobre el Síndrome de Goodpasture, sin los que esta Tesis Doctoral no hubiera podido ser llevada a cabo.

Agradezco a los Drs. Karlen y Tatiana Gazarian de la Universidad Autónoma de Méjico sus consejos en el uso de las librerías phage display.

Agradezco a la Dra. Patricia Casino y al Dr. Alberto Marina su enorme implicación en la presente Tesis Doctoral, así como haberme introducido en el mundo de la cristalografía.

Quiero mostrar mi agradecimiento a todas las personas con las que me he formado durante todos estos años y de las que tanto he aprendido, con quienes el camino ha resultado más fácil, interesante y divertido; a todos vosotros os debo encontrarme en este punto.

Quiero agradecer a mis padres haberme permitido realizar todo aquello que me propusiese. Agradezco la dedicación y cariño recibido de mi madre; a mi padre, mostrarme la satisfacción de las cosas bien hechas y a mi hermana, el apoyo y complicidad con el que me ha obsequiado todo este tiempo.

Especialmente, doy las gracias a mi mujer, Ampa, por la enorme ayuda prestada durante todos estos años; sin su apoyo y empuje, la finalización de esta Tesis Doctoral hubiera sido imposible.

Quiero agradecer también a Lucas, el último en llegar, su alegría y ganas de vivir, capaces de hacer que cualquier problema se desvanezca.

“El secreto de la felicidad no está en hacer siempre lo que se quiere, sino en querer siempre lo que se hace”.

León Tolstói.

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
1 El sistema renal.	5
1.2 La barrera de filtración glomerular (BFG).	7
1.2.1 Los podocitos.	8
1.2.2 Las células mesangiales.	9
1.2.3 Las células endoteliales.	10
1.2.4 Membrana basal glomerular.	11
- Colágeno tipo IV.	13
· Diversificación estructural del colágeno IV humano mediado por ensamblaje alternativo de exones.	19
· Patología asociada a defectos genéticos relativos al colágeno IV.....	20
· El síndrome de Goodpasture.	21
2 Determinación y naturaleza del epítipo del síndrome de Goodpasture.	22
2.1 Establecimiento del epítipo Goodpasture.	24
3 Implicación de factores alternativos en la patología del síndrome de Goodpasture.	30
4 La proteína Goodpasture-antigen binding protein (GPBP).....	32
OBJETIVOS.....	37
1 Caracterización mediante tecnología phage display y bioinformática del epítipo de los autoanticuerpos GPc ya localizado en el dominio $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ del colágeno tipo IV.	39
2 Establecer las bases estructurales de los dominios NC1 del colágeno IV para comprender la biología y patología asociadas al colágeno IV en las membranas basales.	40
3 Implicación de GPBP-1 en el ensamblaje del colágeno tipo IV y consecuencias inmunopatogénicas.	40
METODOLOGÍA.....	41
1 Técnicas de biología molecular.	43
1.1 Construcción de librerías de cDNA.	43
1.2 Clonado de genes.	43
1.3 Inserción de BM40 y etiquetado con FLAG.	44
1.4 Construcción de los vectores.	44
1.5 Mutagénesis dirigida.	46

2 Obtención y caracterización de los anticuerpos utilizados.	47
2.1 Anticuerpos circulantes Goodpasture (GPc).	47
2.2 Anticuerpo monoclonal murino mAb 3.	49
3 Métodos generales para el estudio de proteínas.	49
3.1 Técnicas cromatográficas para la purificación y análisis de proteínas.	49
3.2 Electroforesis SDS-PAGE.	50
3.3 Western-blotting e inmunodetección.	51
3.4 Análisis por huella peptídica.	51
4 Métodos para la cuantificación de la proteína.	52
5 Expresión y purificación de proteínas.	52
5.1 Expresión en células de mamífero.	52
5.2 Expresión en células de insecto.	53
6 Phage display.	56
6.1 Librerías peptídicas para la determinación de epítomos.	57
6.2 ELISA de fagos mono y policlonales.	58
7 Modelado de proteínas.	59
8 Predicción de epítomos.	60
9 Resonancia de plasmón de superficie (SPR).	61
9.1 Análisis cinético de la interacción antígeno-anticuerpo.	63
9.2 Análisis termodinámico de la interacción antígeno-anticuerpo.	64
9.3 Análisis cinético de la interacción α (IV)NC1- α (IV)NC1.	64
10 Ensayos de cristalización y resolución de las estructuras cristalinas mediante difracción de rayos X.	65
10.1 Cristalización de proteínas.	65
10.2 Solución crioprotectora.	66
10.3 Difracción de rayos X de los cristales α (IV)NC1.	66
10.4 Determinación de la estructura y refinamiento.	67
RESULTADOS Y DESARROLLO ARGUMENTAL.	69
1 Caracterización del epítopo.	71
1.1 Epítopo mAb 3.	71
1.1.1 Péptidos obtenidos.	72

1.1.2 Determinación de la afinidad de mAb 3 por los péptidos.	73
1.1.3 Predicción de epítomos mediante pepsurf.....	74
1.2 Epítomo anticuerpos GP circulantes.....	78
1.2.1 Péptidos obtenidos.	78
1.2.2 Determinación de la afinidad de los anticuerpos GPc por los péptidos.....	80
1.2.3 Predicción de epítomos mediante pepsurf.....	81
1.2.4 Selección de los residuos candidatos a mutagénesis.....	83
1.2.5 Análisis de las quimeras generadas. ELISA, Western Blotting y SPR.....	86
1.3 Conclusiones objetivo 1.	88
2 Integración del epítomo Goodpasture en el hexámero α (IV)NC1.	92
2.1 Estructuras de los dominios no colagenosos del colágeno IV.	93
2.1.1 Heterohexámero $(\alpha_3, \alpha_4, \alpha_5)_2$ (IV)NC1.	93
- Expresión y caracterización de cada uno de los dominios no colagenosos que integran el heterohexámero $(\alpha_3, \alpha_4, \alpha_5)_2$ (IV)NC1.....	93
- Formación de oligómeros.	95
- Intentos de cristalización del heterohexámero $(\alpha_3, 4, 5)_2$ (IV)NC1.....	96
2.1.2 Estructura de los restantes α (IV)NC1.	105
- Expresión, asociación y estado de oligomerización de las diferentes proteínas α (IV)NC1 y de mezclas de pares de las mismas.....	106
2.2 Relación entre los α (IV)NC1 en base a la interacciones entre residuos.....	113
2.2.1 Interacciones entre subunidades que mantienen los dominios C4 juntos.	113
2.2.2 Interacciones que mantienen la estructura del trímero.	114
2.2.3 Interacciones que mantienen la estructura hexamérica.....	115
2.3 Ensamblado monómero-hexámero.	118
2.4 Selección de cadena en el colágeno tipo IV.	123
2.4.1 Cinética de plegado de las proteínas.....	124
2.4.2 Afinidades entre las diferentes proteínas α (IV)NC1.....	125
2.5 Conclusiones objetivo 2.	139
3 Implicación de la proteína Goodpasture-antigen binding protein-1 (GPBP-1) en el ensamblaje del colágeno IV y consecuencias inmunopatogénicas.....	142
3.1 La co-expresión de GPBP-1 y α_3 (IV)NC1 condiciona la conformación de α_3 (IV)NC1 como revela su reactividad inmunológica y su estructura atómica.....	142

3.1.1 Análisis mediante resonancia de plasmón de superficie.	144
3.1.2 Determinación de la estructura atómica de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ co- expresada con GPBP-1.	148
3.1.3 Caracterización inmunológica de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ expresada junto a GPBP-1.	156
3.1.4 Aproximación mediante mutagénesis dirigida en $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y en GPBP-1 a la abolición del efecto de la cinasa sobre $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$	157
3.2 Conclusiones objetivo 3.	161
CONCLUSIONES FINALES.....	165
BIBLIOGRAFÍA.....	171
ANEXOS.....	183
Anexo I. Cebadores utilizados.	185
Anexo II. Construcción del modelo del heterohexámero $(\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5)_2(\text{IV})\text{NC1}$	188
Anexo III. Abreviaturas.	190
Anexo IV. Publicaciones.	192

Introducción general.

En 1919, Ernest Goodpasture describió por primera vez la coexistencia de una hemorragia pulmonar y una glomerulonefritis rápidamente progresiva en un hombre joven que había sido víctima de una gripe pandémica (Goodpasture, 1919). Posteriormente, el término Síndrome de Goodpasture se acuñó para describir la coexistencia de estas manifestaciones (Stanton y Tange 1958) y, en la actualidad, se utiliza para designar un desorden autoinmune que cursa con glomerulonefritis rápidamente progresiva, hemorragia pulmonar y presencia de anticuerpos patogénicos circulantes antimembrana basal.

La implicación de los autoanticuerpos en la patogénesis de las glomerulonefritis humanas fue inicialmente propuesta con la llegada del desarrollo de las técnicas de inmunofluorescencia al observar la presencia de depósitos lineales de anticuerpos a lo largo de la membrana basal del glomérulo renal (Scheer y Grossman, 1964). El papel causal de los autoanticuerpos en la enfermedad se demostró mediante la elución de estos a partir de riñones humanos de pacientes nefrectomizados que, tras ser transferidos a primates, inducían en estos la enfermedad (Lerner y cols. 1967).

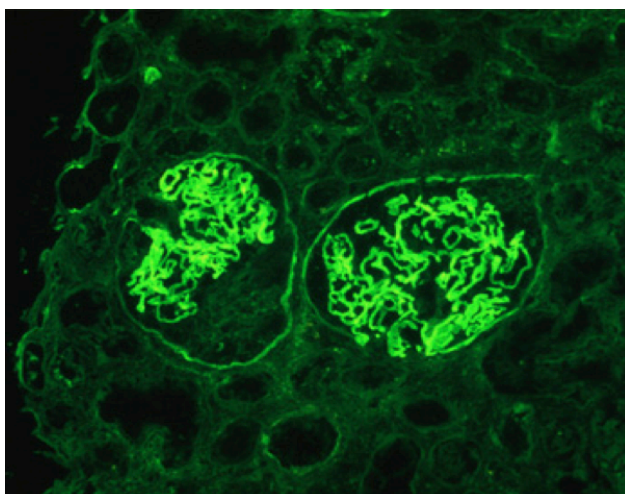


Figura 1. Inmunofluorescencia de una preparación de glomérulo renal.

Se observa la membrana basal glomerular marcada con fluorescencia verde, consecuencia de revelar con anti-Ig humana conjugado con fluoróforo que emite en verde. La fluorescencia revela la presencia de autoanticuerpos específicamente unidos a la membrana basal.

La diana de los autoanticuerpos se localiza en un número limitado de membranas basales especializadas, concretamente en la membrana basal del glomérulo (MBG), en

la membrana basal alveolar y en membranas basales del testículo, oído interno, ojos y plexo coroideo (Kleppel y cols. 1989). La unión de los autoanticuerpos a la membrana basal genera la activación de la vía clásica del complemento que originará una reacción inflamatoria mediada por neutrófilos (Hellmark y Segelmark 2014). La sintomatología clínica resulta evidente cuando se afecta la MBG, ocasionándose una glomerulonefritis rápidamente progresiva, o la membrana basal alveolar, que deriva en insuficiencia pulmonar y que puede venir acompañada de hemorragia pulmonar (Lazor y cols. 2007).

La enfermedad se manifiesta habitualmente como una combinación de una insuficiencia renal y pulmonar, ambas con un grado de afectación variable, aunque en más del 50 % de los pacientes únicamente existe perturbación renal. Todos los pacientes presentan hematuria en distinto grado, desde una ligera hematuria microscópica, a casos graves de hematuria macroscópica que desembocará en una insuficiencia renal rápidamente progresiva. Frecuentemente estos síntomas se acompañan de una ligera proteinuria que, ocasionalmente, puede derivar en un síndrome nefrítico (Hellmark y Segelmark 2014). La sintomatología de la afectación pulmonar es variable e incluye tos, falta de aliento, hemoptisis (que suele derivar en anemia), dolor de pecho e hipoxia, aunque existen también pacientes totalmente asintomáticos (Lazor y cols. 2007). La afectación renal generalmente se manifiesta semanas o incluso meses después de los síntomas pulmonares, aunque se han descrito casos en los que la precede (Cui y cols. 2007). La perturbación renal se puede intuir si se detecta orina con espuma o sangre, así como edema en las extremidades inferiores que puede venir acompañada de hipertensión. La manifestación patológica típica consiste en una glomerulonefritis semilunar necrosante (Salama y cols. 2001, Basford y cols. 2011) que se caracteriza por un glomérulo con infiltración de células inflamatorias, disrupción focalizada de la MBG,

extravasación de fibrina en el espacio de Bowman y necrosis fibroide. Cuando la necrosis semilunar se expande, ésta actúa comprimiendo los túbulos capilares y rellenando el espacio de Bowman. A consecuencia de la glomerulonefritis, se produce un deterioro de la función renal con la aparición de proteinuria y hematuria así como restos de glóbulos rojos. El deterioro de la función renal se acompaña también de un incremento en la concentración de urea y creatinina en sangre, de tal forma que si no se toman las medidas oportunas, se llega a una situación de no retorno en la que se requerirá la realización de trasplante renal.

La función principal del sistema renal consiste en el filtrado del plasma sanguíneo y la consiguiente eliminación de productos de desecho. A su vez, también se encarga de controlar el volumen y composición de los fluidos corporales y de la excreción de sustancias químicas extrañas. El sistema renal regula la volemia y el equilibrio electrolítico, la osmolaridad, la presión arterial y el equilibrio ácido-base. Además, participa en la síntesis, metabolismo y secreción de hormonas y en la gluconeogenia. Por tanto, resulta clave entender la etiología del Síndrome de Goodpasture, así como los mecanismos moleculares implicados, ya que durante el desarrollo de la enfermedad se compromete el funcionamiento de un órgano con un papel trascendental en la regulación de la homeóstasis corporal.

1 El sistema renal.

Los riñones se ubican en la pared posterior del abdomen, fuera de la cavidad peritoneal, presentan morfología de habichuela y tienen el tamaño aproximado de un puño cerrado (Figura 2A).

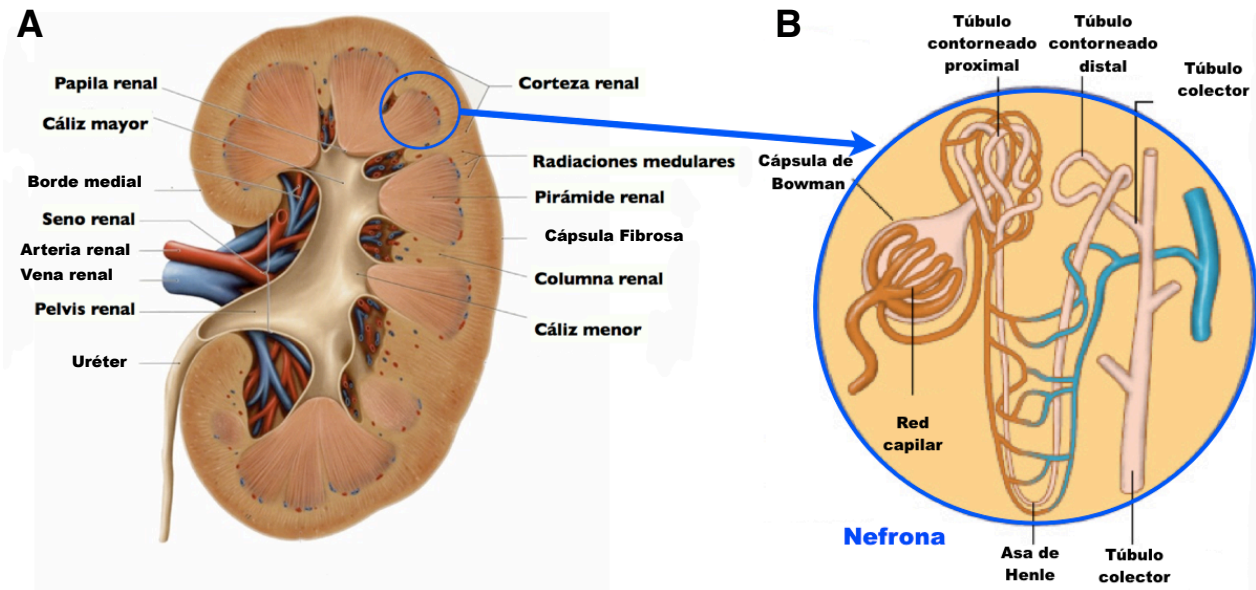


Figura 2. Morfología y organización del riñón.

A) Estructura macroscópica del riñón. **B)** Esquema de la unidad funcional del riñón, la nefrona.

La unidad funcional del riñón es la nefrona. Cada riñón posee entorno a $8 \times 10^5 - 10^6$ nefronas cuyo número se merma con el tiempo al no tener capacidad de regenerarse. La nefrona está compuesta por un ovillo de capilares que se ramifican y anastomosan formando el glomérulo, que se encarga de filtrar el plasma sanguíneo. El glomérulo está envuelto por la cápsula de Bowman, que recoge el filtrado glomerular y lo conduce a un túbulo largo en el que aquel se convierte en orina (Figura 2B). En la zona del túbulo se dan los fenómenos de secreción y reabsorción de solutos, así como la captación de agua. Estos fenómenos son de una elevada complejidad, siendo el resultado final una orina concentrada, de la que se han reabsorbido los solutos de interés y se eliminan sustancias de desecho.

La filtración del plasma sanguíneo en la nefrona se debe a la existencia de una presión neta positiva (~ 10 mmHg) resultante de la suma de la presión hidrostática existente dentro de los capilares glomerulares (a favor), la presión coleidosmótica en el interior del glomérulo (en contra), la presión hidrostática en el interior de la cápsula de

Bowman (en contra) y la presión coleidosmótica en la cápsula de Bowman (a favor). Una vez generada la orina primaria, ésta sufrirá un proceso de concentración y reabsorción de solutos, de tal forma que de un filtrado de unos 200 litros diarios sólo se excretarán unos 2 litros de orina al día. La permeabilidad selectiva que caracteriza este proceso permite libremente el paso de agua y de sustancias disueltas con peso molecular inferior a 15.000 Daltons, resulta totalmente impermeable a solutos con peso molecular superior a 70.000 Daltons y deja pasar, en cantidad variable, los de peso molecular comprendido entre 15.000 y 70.000 Daltons). La capacidad de permeabilidad selectiva de la nefrona se ha atribuido, tradicionalmente, a la carga negativa que posee, lo que ocasiona que moléculas electronegativas como la albúmina que está presente en el plasma sanguíneo a una concentración de ~ 40 gr/L, se encuentre prácticamente ausente en la orina final. Además del papel que juega la carga negativa, existe una diferencia de potencial entre ambos lados de la membrana que contribuye a limitar el paso de determinadas moléculas y que, junto con la reabsorción activa, fundamentalmente de albúmina e inmunoglobulinas, que se da en la región del túbulo, sería la responsable de la permeabilidad selectiva observada (Hausmann y cols. 2010).

1.2 La barrera de filtración glomerular (BFG).

El plasma sanguíneo en su paso del capilar glomerular al espacio existente en la cápsula de Bowman, tiene que atravesar una capa de células endoteliales, la membrana basal glomerular (MBG) y los podocitos que envuelven el ovillo capilar. El conjunto de estos tres componentes constituye la barrera de filtración glomerular (BFG), (Figura 3).

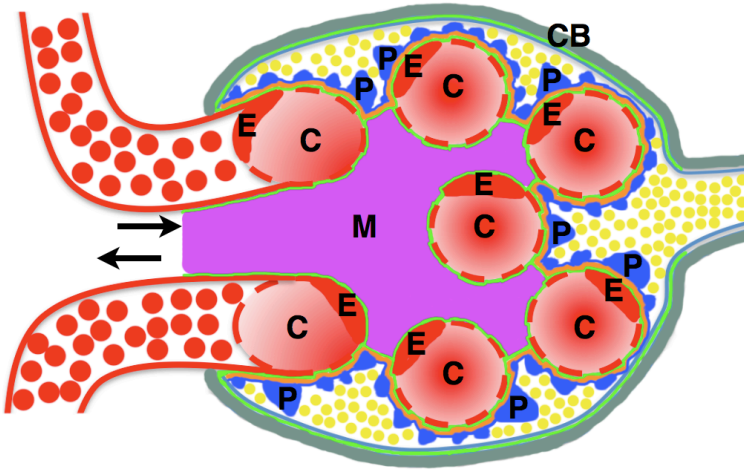


Figura 3. Esquema de un corte de un glomérulo renal.

Se aprecia la composición de la barrera de filtración glomerular formada a partir de las células endoteliales (E) que delimitan el capilar glomerular (C), junto con los podocitos (P) y la membrana basal glomerular (conjunto verde + naranja). Se detalla también la ubicación de la cápsula de Bowman (CB) y el mesangio (M).

1.2.1 Los podocitos.

Representan el componente epitelial de la barrera de filtración glomerular, son células altamente especializadas situadas en la cara externa del ovillo vascular que se orientan hacia la cápsula de Bowman, por lo que se encuentran en contacto directo con la orina primaria. Son los encargados de sintetizar de forma exclusiva la red de colágeno $\alpha3\alpha4\alpha5(\text{IV})$ (Abrahamson y cols. 2009) a la que se unen selectivamente a través de la secuencia KRGDS presente en el protómero $\alpha3\alpha4\alpha5(\text{IV})$ (Borza y cols. 2008) (ver más adelante). Presentan una serie de prolongaciones, denominadas pies citoplásmicos, originadas a partir del cuerpo central, que se van dividiendo hasta formar los pedicelos, que recubren por completo la pared vascular. De la interacción surgida entre los pedicelos de podocitos contiguos se origina un diafragma que junto con los propios pedicelos, recubre por completo el ovillo vascular (Figura 4A).

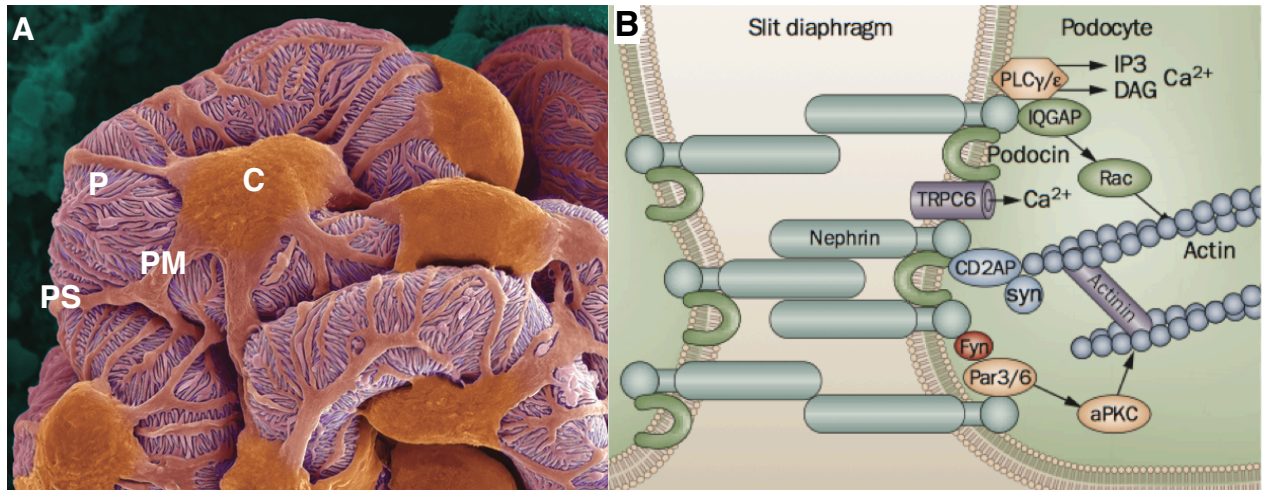


Figura 4. Características de los podocitos.

A) Micrografía electrónica de barrido de un glómerulo renal en donde se puede observar el cuerpo del podocito (C), los procesos mayores (PM), los procesos secundarios (PS) y los pedicelos (P). Tomado de (Welsh y Saleem 2012). **B)** Esquema de las proteínas que forman el diafragma slit. Tomado de Chiang y Inagi 2010.

En la formación del diafragma participan fundamentalmente cuatro proteínas (Figura 4B), la nefrina, encargada de la transmisión de señales entre el propio diafragma y los podocitos (Lahdenpera y cols. 2003); la podocina, que interviene en la polimerización del citoesqueleto de actina del podocito junto con la nefrina, y las proteínas CD2AP y TRPC6 que intervienen también en la polimerización del citoesqueleto (Boute y cols. 2000).

1.2.2 Las células mesangiales.

Tienen como función principal mantener la estructura y propiedades de la MBG. Las células mesangiales presentan propiedades contráctiles, y secretan la matriz mesangial extracelular que actúa a modo de cemento entre los capilares, manteniendo la integridad del ovillo (Kreisberg y cols. 1985). Su participación en la filtración es escasa, aunque tiene un papel importante en la regulación de la presión en el interior de glomérulo, modulando, gracias a sus propiedades contráctiles, la entrada y salida de sangre a través de las arteriolas.

Por otra parte, las células mesangiales sintetizan componentes de la matriz extracelular, tales como colágeno (I, III, IV, V, incluyendo la red de colágeno tipo IV

$\alpha 1\alpha 2(IV)$), laminina, fibronectina y proteoglicanos (Mene y cols. 1989) y, en diversas patologías como la nefritis dependiente de IgA (Julian y Novak 2004) y la nefropatía diabética (Jeansson y cols. 2006), se ha detectado su proliferación. La expansión de la matriz mesangial trae consigo una reducción de la superficie de filtración y se asocia con la aparición de glomeruloesclerosis.

1.2.3 Las células endoteliales.

Las células endoteliales forman los capilares glomerulares y poseen una morfología aplanada y abundantes fenestraciones. Estas, que se extienden sobre el 20-50 % de su superficie, facilitan la permeabilidad del capilar glomerular al agua y a pequeños solutos mientras lo mantienen impermeable a proteínas tales como la albúmina (Bulger y cols. 1983). La capa superficial del endotelio se encuentra cargada debido a la presencia de glicosaminoglicanos (GAGs) y proteoglicanos de su glicocaliz, lo que le proporciona aquella permeabilidad selectiva (Jeansson y Haraldsson 2006) (Figura 5).

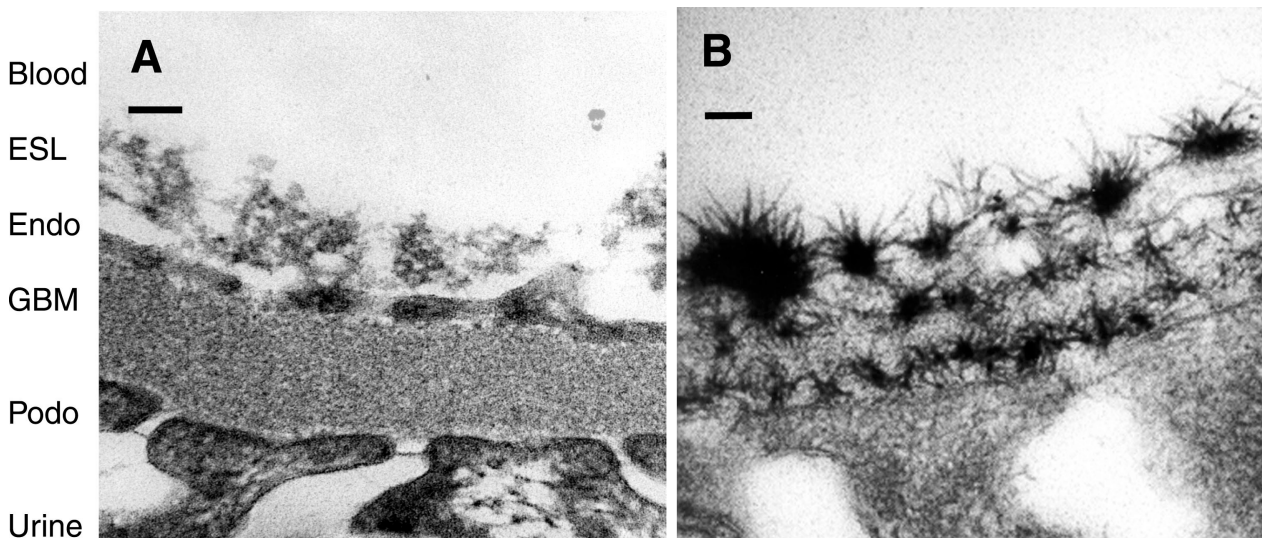


Figura 5. Barrera de Filtración Glomerular.

Barrera visualizada mediante microscopia electrónica, con la luz capilar arriba y el espacio urinario en la parte inferior. La capa superficial del endotelio (ESL) o glicocaliz aparece teñida (A) con azul cupromerónico revelando estructuras cargadas, mientras la MBG presenta un aspecto homogéneo y (B) con lantano, que proporciona mayor contraste y pone de manifiesto estructuras arborescentes que se extienden por las fenestraciones y el lumen capilar. Barra de escala: 100 nm. Blood, sangre; Endo, endotelio; GBM, membrana basal glomerular; Podo, podocito; Urine, orina. Tomado de Haraldsson y cols. 2008.

1.2.4 Membrana basal glomerular.

En términos generales, las membranas basales son organizaciones especializadas de la matriz extracelular con forma laminar, ubicadas allí donde las células de un tejido se unen al tejido conectivo. Las membranas basales presentan componentes intrínsecos como el colágeno tipo IV, la laminina, la agrina o heparán sulfato y nidógeno o entactina, procedentes de una síntesis adyacente a la membrana basal y componentes extrínsecos como la fibronectina y el colágeno V que varían en función del tipo de membrana basal y cuya síntesis sucede a distancia.

La membrana basal glomerular (MBG), que está constituida fundamentalmente por lamininas, nidógenos, agrina y colágeno tipo IV, es la encargada de proporcionar soporte físico y flexibilidad, proporcionar sustrato para la adhesión y migración celular, actuar como barrera celular selectiva y como tamiz molecular y posibilitando la ultrafiltración.

- Laminina.

La Laminina es un componente ubicuo de la membrana basal que se secreta como $\alpha\beta\gamma$ heterotrímeros y que tiene su estructura estabilizada mediante puentes disulfuro intercatenarios. Existen cinco tipos de cadenas α , cuatro β , y tres cadenas γ que se ensamblan de manera no aleatoria para formar al menos 15 heterotrímeros diferentes (Aumailley y cols. 2005).

El heterotrímero típico presenta una estructura en forma de cruz, en la que las tres cadenas se enrollan formando una espiral central que da lugar al brazo más largo, ubicado en la posición inferior de la cruz. Este brazo, presenta en su extremo terminal un dominio globular responsable de la mediación de las interacciones trímero-trímero que

conducen a la formación del polímero de laminina en la matriz extracelular y la iniciación de ensamblaje de la membrana basal (McKee y cols. 2007).

En la MBG madura se encuentra la laminina denominada LM-521. Sin embargo, durante el proceso de formación de la MBG y la glomerulogénesis, se presentan diferentes variantes (Miner y Sanes 1994, Miner y cols. 1997, Miner 1998).

- Nidógeno.

Existen dos variantes denominadas 1 y 2 (anteriormente nombrados entactina-1 y entactina-2). Ambas son ubicuas entre las proteínas de la membrana basal uniéndose tanto a la laminina como al colágeno tipo IV por lo que, originalmente, se propusieron como nexos entre la laminina y las redes de colágeno IV (Fox y cols. 1991). Aunque resultan cruciales en la formación y el sustentamiento de la membrana basal, experimentos con ratones knockout mostraron que las membranas basales se podían formar en ausencia de ambos, llegándose a completar la mayoría de la organogénesis de forma satisfactoria con excepción de las últimas etapas del desarrollo pulmonar y de la integridad del músculo cardíaco (Bader y cols. 2005).

- Agrina.

Es el principal proteoglicano de heparán sulfato de la MBG (Groffen y cols. 1998) y su electronegatividad, debida a las cadenas laterales de glicosaminoglicanos sulfatados, representa la principal contribución a la carga negativa en las membranas basales (Kanwar y cols. 2007). Funcionalmente es un componente crucial en el efecto barrera que ejerce la MBG en la filtración de la albúmina plasmática (Bohrer y cols. 1978).

- Colágeno tipo IV.

Es una proteína exclusiva de las membranas basales. La familia del colágeno IV consta de seis cadenas α genéticamente distintas, $\alpha 1(\text{IV})$ - $\alpha 6(\text{IV})$. Sus genes se organizan en tres pares orientados cabeza con cabeza y sometidos a la acción de promotores bi-direccionales, COL4A1-COL4A2 en el cromosoma 13q34, COL4A3-COL4A4 en el cromosoma 2q35-37 y COL4A5-COL4A6 en el cromosoma Xq22 (Khoshnoodi y cols. 2008).

Estudios comparativos de secuencia sugieren la existencia de un gen ancestral común que, tras una temprana duplicación, generó dos genes estructurales primitivos: proto- $\alpha 1$ y proto- $\alpha 2$. Del gen proto- $\alpha 1$ procederían los actuales $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 3(\text{IV})$ y $\alpha 5(\text{IV})$, mientras que $\alpha 2(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$ y $\alpha 6(\text{IV})$ procederían de proto- $\alpha 2$ (Quinones y cols. 1992, Hudson y cols. 1993, Zhou y cols. 1994). Consistente con este modelo evolutivo, la estructura exónica/intrónica de $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 3(\text{IV})$, y $\alpha 5(\text{IV})$ son prácticamente idénticas y distintas de las de $\alpha 2(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$ y $\alpha 6(\text{IV})$, también semejantes entre sí (Quinones y cols. 1992).

La longitud de una molécula de colágeno IV es de unos 400 nm y su masa molecular es de ~ 180 kDa. El uso combinado de proteasas en la digestión del colágeno IV permitió identificar tres dominios principales: un dominio triple hélice central (Timpl y cols. 1979), un dominio amino-terminal también con estructura en triple hélice denominado 7S (Risteli y cols. 1980) y un dominio carboxi terminal no colagenoso, globular, denominado NC1 (Timpl y cols. 1979) (Figura 6).

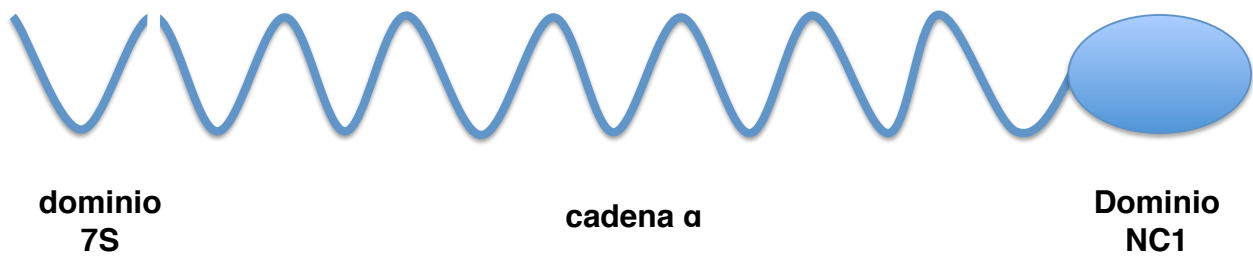


Figura 6. Representación esquemática de los dominios de una molécula de colágeno tipo IV.

Las cadenas α del colágeno son glicoproteínas extremadamente ricas en prolina y glicina, aminoácidos que desempeñan un papel muy importante en su estructura. Los anillos de pirrolidina de la prolina favorecen el ensamblado de cada hélice individual y proporcionan la estructura molecular rígida de la triple hélice, de modo que tres hélices levógiras forman una triple hélice dextrógira con un paso de hélice de 9 Å. Para el mantenimiento del dominio triple hélice, la ocupación por glicina en la tercera posición de la secuencia X-Y-G es obligada, ya que es el único aminoácido con una cadena lateral lo suficientemente pequeña para permitir su ubicación en el centro de la α -hélice, de tal forma que la sustitución de esta por cualquier otro aminoácido resulta en una región no triple helicoidal o imperfección. Estas imperfecciones ocurren en un número que oscila entre 21-26 (en función de la cadena α (IV) de la que se trate) y además de dar lugar a una α -hélice más flexible, algunas de ellas sirven como puntos de unión a células y zonas de interacción intracatenarias (Vandenberg y cols. 1991).

El dominio carboxi-terminal NC1 de una cadena α (IV) se pliega generando una estructura globular estabilizada por 6 puentes disulfuro (Timpl y cols. 1979) en la que se distinguen dos subdominios estructuralmente homólogos. El plegamiento de estos dos

subdominios es similar proporcionando al NC1 una simetría estructural (Kurkinen y cols. 1987, Myers y cols. 1987, Siebold y cols. 1988) (Figura 7).

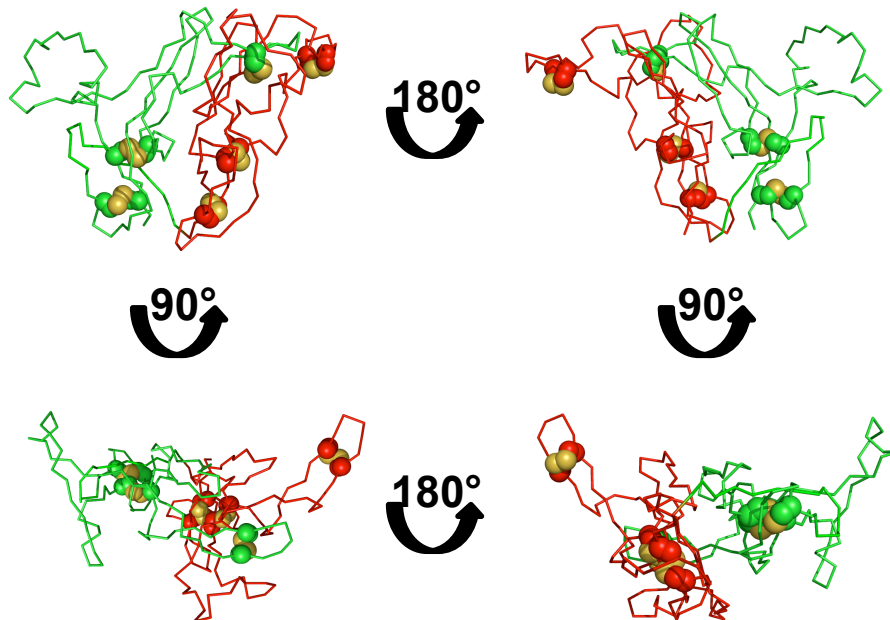


Figura 7. Representación del esqueleto peptídico (backbone) de un dominio carboxi-terminal NC1.

Se representan en rojo y verde los dos subdominios homólogos y mediante esferas los puentes disulfuro.

En el otro extremo de la molécula, el dominio colagenoso lineal 7S está estructuralmente separado del dominio central triple hélice a través de un acodamiento que origina la primera imperfección de la molécula de colágeno IV (Saus y cols. 1988).

La unidad funcional del colágeno tipo IV está constituida por tres hélices levóginas (cadenas α) que se entrelazan para formar una triple hélice dextrógira que recibe el nombre de protómero (Figura 8A). El propio NC1 es el encargado de dirigir la formación del protómero y por tanto de su composición (Khoshnoodi y cols. 2006) (Figura 8B).

Las moléculas de colágeno IV se organizan formando una red que se entrelaza con otra red de laminina sobre la que se asientan los restantes componentes para construir una membrana basal. Estudios de microscopía electrónica de membrana basal digerida muestran que los dominios 7S y NC1, son los dominios de la molécula que más interaccionan (Timpl y cols. 1981). Cuatro moléculas de colágeno interaccionan a través de sus dominios 7S (Figura 8C) (Kuhn y cols. 1981). Este tetrámero se forma inicialmente mediante interacciones hidrofóbicas, que posteriormente se estabilizan mediante puentes disulfuro y enlaces covalentes lisina-hidroxilisina (Glanville y cols. 1985, Siebold y cols. 1987) para, finalmente, reforzarse mediante glicosilaciones en el extremo carboxi-terminal del dominio 7S, siendo éstas responsables de la elevada resistencia a la acción de proteasas (Langeveld y cols. 1991).

En el extremo carboxi terminal, dos dominios no colagenosos (NC1) interaccionan dando lugar a una estructura hexamérica (Figura 8C) (Siebold y cols. 1988) que, inicialmente, se creía estabilizada mediante puentes disulfuro (Timpl y cols. 1981). Estudios cristalográficos posteriores revelaron que en la estabilización del hexámero participan tanto interacciones hidrofóbicas, como interacciones hidrofílicas (Sundaramoorthy y cols. 2002, Than y cols. 2002) que junto con enlaces covalentes tipo sulfilimina entre protómeros opuestos (Vanacore y cols. 2009, Pedchenko y cols. 2010) sellan el hexámero (ver más adelante).

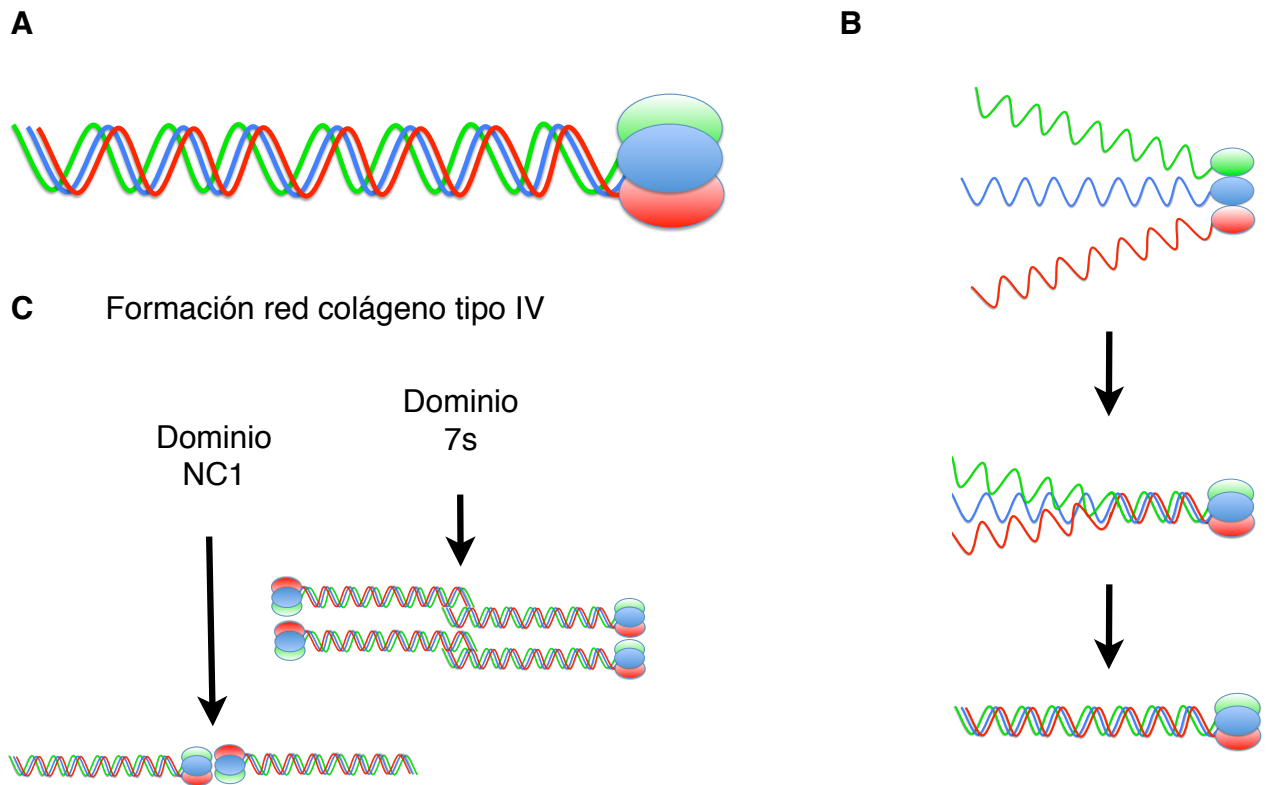


Figura 8. Formación de la red de colágeno tipo IV.

A) La unidad funcional del colágeno tipo VI es el protómero que se forma por la asociación de tres cadenas α . **B)** La formación de los protómeros se orquesta a través del dominio NC1. **C)** Los protómeros forman redes a partir de la interacción de sus extremos amino- y carboxi-terminal (dominios 7S y NC1 respectivamente).

Las seis cadenas α trimerizan con una estequiometría específica, dando lugar a tres tipos diferentes de protómeros: los protómeros $(\alpha 1)_2\alpha 2(\text{IV})$, $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(\text{IV})$, y $(\alpha 5)_2\alpha 6(\text{IV})$, que muestran la siguiente disposición en el glomérulo renal, (Figura 9):

- $\alpha 1\cdot\alpha 2(\text{IV})$: compuesta por protómeros $(\alpha 1)_2\alpha 2(\text{IV})$ está presente en la matriz mesangial y membranas basales del glomérulo y de la cápsula de Bowman.

- $\alpha 1\cdot\alpha 2\cdot\alpha 5\cdot\alpha 6(\text{IV})$: compuesta por una interacción de protómeros $(\alpha 1)_2\alpha 2(\text{IV})$ y $(\alpha 5)_2\alpha 6(\text{IV})$ se encuentra en la cápsula de Bowman.

- $\alpha 3\cdot\alpha 4\cdot\alpha 5(\text{IV})$: compuesta por protómeros $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(\text{IV})$, se presenta en la membrana del glomérulo basal.

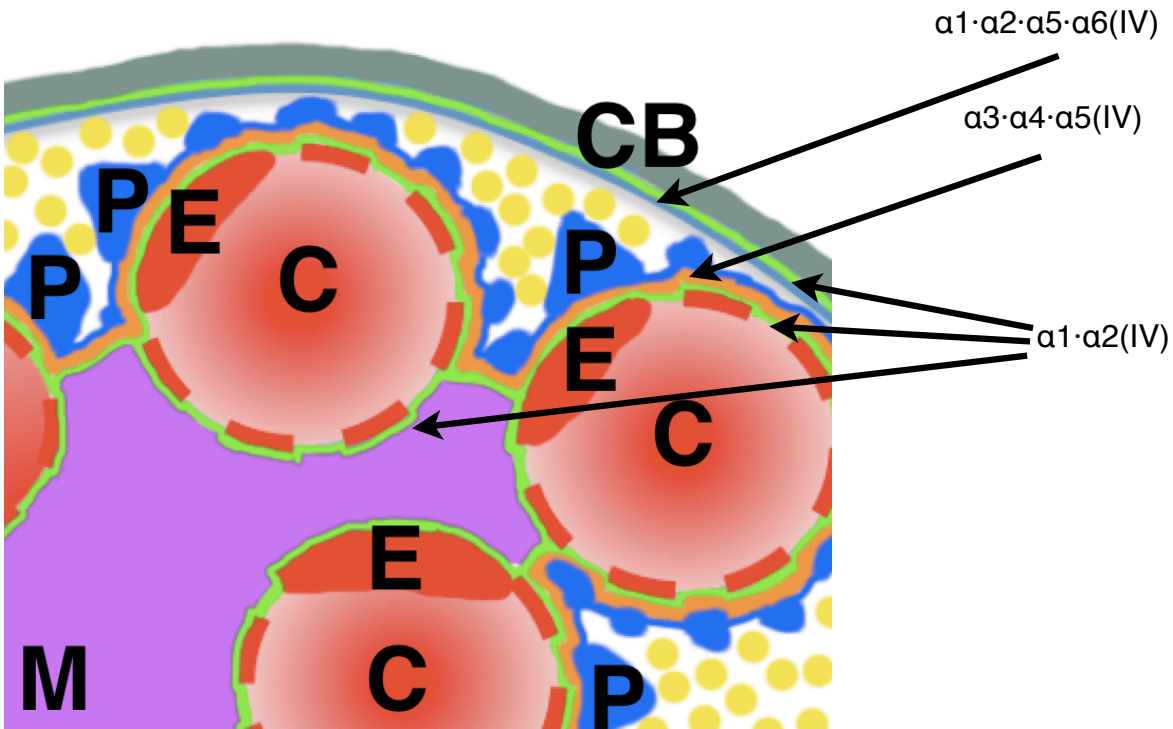


Figura 9. Distribución de las redes de Colágeno IV en el glomérulo renal.

(E) Células endoteliales, (C) capilar glomerular, (P) podocitos y la membrana basal glomerular (conjunto verde + naranja), (CB) Cápsula de Bowman y (M) mesangio.

La MBG resulta del contacto de la membrana basal del glomérulo con la membrana basal de la pared capilar, fusionándose la red $\alpha_3\alpha_4\alpha_5(\text{IV})$ que proviene del componente epitelial con la red $(\alpha_1)_2\alpha_2(\text{IV})$ que proviene del componente endotelial. Así, se origina una membrana basal trilaminar que resulta clave en la BFG (Hudson y cols. 2003).

La constitución de estas redes no permanece constante durante todo el desarrollo sino que durante la glomerulogénesis se producen transiciones en el tipo de colágeno IV que forma las redes. Inicialmente, la MBG del recién nacido contiene la red $(\alpha_1)_2\alpha_2(\text{IV})$, pero conforme los capilares glomerulares comienzan a formarse, los podocitos se vuelven activos y secretan protómeros $\alpha_3\alpha_4\alpha_5(\text{IV})$ que polimerizan formándose la red madura de colágeno IV de la MBG. De este modo, la red $(\alpha_1)_2\alpha_2(\text{IV})$ pasa a ser un componente minoritario (Abrahamson y cols. 2009).

· **Diversificación estructural del colágeno IV humano mediado por ensamblaje alternativo de exones.**

El dominio $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ humano presenta la peculiaridad de sufrir reordenamiento exónico generando seis diferentes ARNm a partir de su pre-ARNm (Bernal y cols. 1993, Penades y cols. 1995) (Figura 10). Este proceso de diversificación en $\alpha 3(\text{IV})$ es singular entre las seis cadenas $\alpha(\text{IV})$ y exclusivo de nuestra especie al no haberse detectado en el resto de mamíferos superiores analizados. Como mencionaremos más adelante, este fenómeno podría tener importancia en la patología de la enfermedad Goodpasture. Mientras la forma más abundante de ARNm en todos los tejidos examinados codifica para el producto primario $\alpha 3(\text{IV})$, el nivel de expresión de cada ARNm alternativo varía según el tejido (Bernal y cols. 1993). Tres de los productos alternativos difieren entre sí en su región C-terminal pero comparten la región N-terminal que es diana de modificación postraduccional por fosforilación (Revert y cols. 1995) (ver Figura 12), posiblemente involucrada en la patogenia. Se ha observado niveles de expresión elevados de ciertos productos alternativos en los riñones de pacientes Goodpasture (Bernal y cols. 1993, Saus 2002).

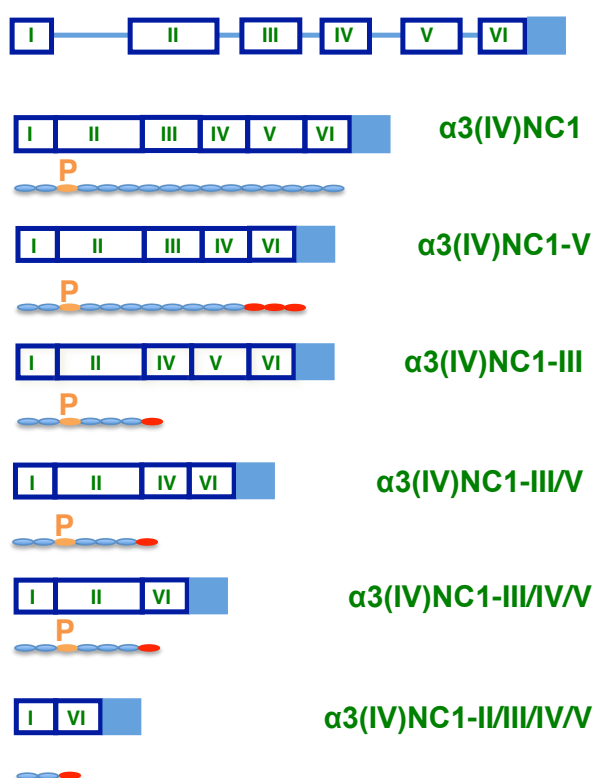


Figura 10. Representación esquemática de la estructura de los múltiples transcritos de mRNA del antígeno de Goodpasture.

Se muestra la posición de los seis exones del extremo C-terminal de la molécula de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ humana (cajas abiertas) presentes en la secuencia génica (parte superior). Se representan los productos resultantes del proceso del reordenamiento exónico, junto con los polipéptidos a los que dan lugar. Nótese que la desaparición de exones modifica la pauta de lectura induciendo variación en la secuencia proteica y la aparición de codones de parada (círculos rojos). El sitio de fosforilación se representa con una P naranja. Modificado de Penades y cols. 1995.

· **Patología asociada a defectos genéticos relativos al colágeno IV.**

Las mutaciones que afectan a los genes que codifican cualquiera de las cadenas de colágeno tipo IV α_3 , α_4 , o α_5 pueden causar defectos en la MBG. Estos defectos pueden ser leves como en la enfermedad de la membrana basal delgada, o graves, como en el síndrome de Alport. La enfermedad de la membrana basal delgada, también llamada hematuria familiar benigna, se debe a mutaciones heterocigotas en COL4A3 o COL4A4, se hereda de manera autosómica dominante y se encuentra en el 40-50 % de los pacientes. Los individuos afectados presentan adelgazamiento de la membrana basal y sangre en orina, pero su estado no suele progresar a enfermedad renal manifiesta que requiera tratamiento. Sin embargo, las mismas mutaciones homocigotas de COL4A3 y COL4A4, dan lugar al síndrome de Alport. Esta enfermedad de la membrana basal ocasiona insuficiencia renal asociada a anomalías auditivas y oculares. La variante más común del síndrome de Alport es la forma ligada al cromosoma X, originada por mutaciones en COL4A5. Ambas formas (ligada al cromosoma X y autosómica) comparten la misma histopatología, un adelgazamiento de la MBG, junto con un leve aumento de la celularidad del mesangio en fases tempranas y glomerulosclerosis acompañada de atrofia tubular y fibrosis intersticial en estados avanzados (Miner 2013). Estas anomalías probablemente se deban a la mayor composición en protómeros $\alpha_3\alpha_4\alpha_5(\text{IV})$ de la MBG, de tal forma que una reducción en cualquier cadena, disminuiría la cantidad de protómero secretado, como en la hematuria familiar benigna, afectando a la densidad de la red de colágeno IV y en consecuencia a la arquitectura de la MBG. Por otro lado, la ausencia completa de la red de $\alpha_3\alpha_4\alpha_5(\text{IV})$ originada por la falta total de una de las cadenas (síndrome de Alport), provoca anormalidades más severas en la MBG. La ausencia de la red $\alpha_3\alpha_4\alpha_5(\text{IV})$ se acompaña de un aumento de la red $(\alpha_1)_2\alpha_2(\text{IV})$ como

respuesta compensatoria, pero las graves anomalías estructurales debidas a la carencia de la red $\alpha_3\alpha_4\alpha_5(\text{IV})$, así como una eventual cicatrización progresiva de los glomérulos, acaban por deteriorar la función renal. Se ha propuesto que el protómero $\alpha_3\alpha_4\alpha_5(\text{IV})$ es más resistente al ataque de proteasas y puede ser más reticulado en comparación a la red $(\alpha_1)_2\alpha_2(\text{IV})$, lo que genera una mayor estabilidad contribuyendo mejor al mantenimiento de la arquitectura de MBG (Miner 2013).

· **El síndrome de Goodpasture.**

Este síndrome, como ya mencionamos inicialmente, se corresponde con una enfermedad autoinmune que provoca una disfunción de la membrana basal del pulmón y del riñón.

Las enfermedades autoinmunes se originan por un fracaso en la tolerancia inmunológica. Aunque se desconoce el mecanismo por el cual un número limitado y específico de componentes son capaces de desencadenar una respuesta inmune, se cree que obedecen a procesos multifactoriales en los que intervienen factores ambientales y genéticos, que además pueden verse favorecidos por una predisposición del sistema inmune (Ermann y Fathman 2001).

En este sentido, se ha propuesto que algunas enfermedades autoinmunes estarían reflejando la aparición de autoantígenos generados de novo para los cuales no se habría establecido previamente un proceso de tolerancia inmunológica (Hellmark y cols. 1999, Boudaud y cols. 2000).

2 Determinación y naturaleza del epítipo del síndrome de Goodpasture.

De las tres moléculas NC1 presentes en la membrana basal glomerular (correspondientes a cadenas $\alpha 3(\text{IV})$, $\alpha 4(\text{IV})$, $\alpha 5(\text{IV})$), únicamente el fragmento NC1 de la cadena $\alpha 3(\text{IV})$ es diana de los anticuerpos de paciente (Saus y cols. 1988, Neilson y cols. 1993). Aunque se presentan también autoanticuerpos frente al resto de cadenas de colágeno tipo IV (Kalluri y cols. 1995), estos son incapaces de desarrollar por si mismos una glomerulonefritis (Kalluri y cols. 1996, Sado y cols. 1998).

La digestión con colagenasa de la cadena $\alpha 3(\text{IV})$ humana libera el antígeno GP, un polipéptido que contiene una pequeña región de triple hélice no digerida y todo el dominio carboxi-terminal NC1. El fragmento NC1 está formado por 244 aminoácidos y presenta dos subdominios homólogos estabilizados mediante puentes disulfuro, tres por cada región homóloga. Los puentes disulfuro confieren un marcado carácter conformacional al epítipo como se revela por la acción de agentes reductores que destruyen estos puentes perdiéndose con ello la reactividad mostrada por los anticuerpos GP frente a la cadena $\alpha 3(\text{IV})$. También pierde su reactividad el anticuerpo monoclonal murino mAb 3 que compite con los anticuerpos de paciente (Johansson y cols. 1991) y que ha resultado ser un instrumento muy útil en el estudio del autoantígeno. La existencia de puentes disulfuro y la posibilidad de que estos se formen de manera variable con diferentes residuos de cisteína, ocasiona que la estructura terciaria del dominio $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ se encuentre sometida a isomerización conformacional, al igual que ocurre en la molécula de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ bovina (Figura 11). Así, la red de colágeno tipo IV de la membrana basal glomerular presenta diversos conformeros de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$

estabilizados mediante distintos patrones de puentes disulfuro intramoleculares. El reconocimiento diferencial de los conformeros, apunta a la implicación de la isomerización conformacional en la patogénesis de la enfermedad (Calvete y cols. 2006).

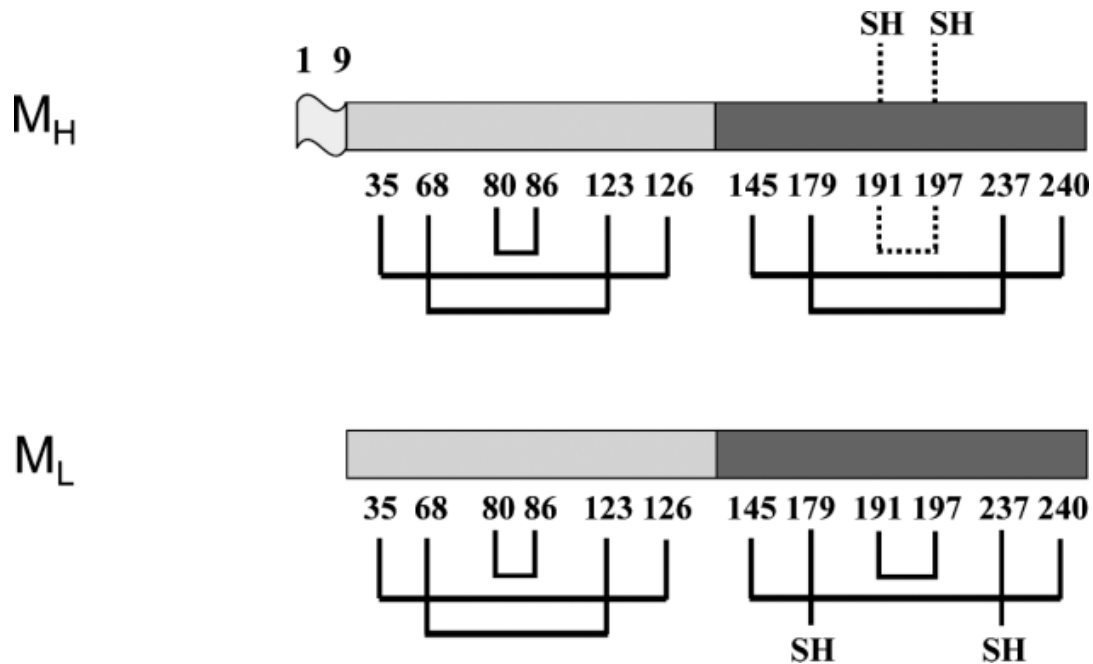


Figura 11. Representación esquemática de los polipéptidos M_H y M_L $\alpha 3(IV)NC1$ bovino.

Representación esquemática de la estructura primaria de los polipéptidos M_H (monómero mayor) y M_L (monómero menor) $\alpha 3(IV)NC1$ bovinos aislados a partir de membrana basal testicular, haciendo hincapié en la presencia de una extensión del polipéptido en posición N-terminal en la molécula M_H , y la presencia de puentes disulfuro y cisteínas libres en los subdominios N- y C-terminal de M_H y M_L . Las líneas sólidas denotan cisteínas encontradas sólo en forma reducida en M_L y la línea de puntos indica cisteínas encontradas tanto en forma oxidada como reducida en M_H . SH, grupo sulfhidrilo. Las cisteínas se numeran en función de su posición en M_H . Tomado de Calvete y cols. 2006.

La cadena $\alpha 3(IV)$ presenta una región en su extremo C-terminal, justo antes del inicio del NC1, altamente divergente en estructura primaria respecto a regiones homólogas de cadenas $\alpha 3(IV)$ de otras especies y del resto de cadenas α del colágeno tipo IV humano. Esta región posee, además, otros rasgos característicos (Figura 12) como es una secuencia RGD de unión a células que permitiría a $\alpha 3(IV)$ unirse a receptores tipo

integrina presentes en la membrana plasmática de células (Quinones y cols. 1992). Además, la secuencia RGD está integrada en el motivo KRGDS que se ajusta a las secuencias consenso KRXXS, un motivo de reconocimiento de la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA), y a RXXS, un motivo de reconocimiento para proteína cinasa II dependiente de calmodulina y para proteína cinasa C (Quinones y cols. 1992). Se ha demostrado, también, que este motivo es crítico para la adhesión de los podocitos a la MBG y para el correcto funcionamiento de la barrera de filtración glomerular (Borza y cols. 2008).

Humano	$\alpha 3$	GLKG KRGDS G	SPA-TWTT-R	GFVFTRHSQT	TAIPSCPEGT
Bovino	$\alpha 3$P..T.	P..-AGAVM.
Ratón	$\alpha 3$NP..R.	T..-G.RM.	..I.....
Humano	$\alpha 1$.PD.LP.SM.	P.G-.PSVDH	..LV.....	IDD.Q..S..
Humano	$\alpha 5$.PD.LQ.PP.	P.G-.SSVAH	..LI.....	.DA.Q..Q..
Humano	$\alpha 2$.RP.SP.LP.	M.G--RSVSI	.YLLVK....	DQE.M..V.M
Humano	$\alpha 4$.PP.PI..P.	PKGFGPGYLG	..LLVL....	DQE.T..L.M
Humano	$\alpha 6$.QQ.PF.MP.	M.G--QSMRV	.YTLVK....S	EQV.P..I.M

Figura 12. Alineamiento de la región N-terminal de $\alpha 3(IV)NC1$ con las cadenas $\alpha(IV)$ indicadas.

Se muestra en negrita el residuo que se fosforila y subrayada la secuencia KRGDS. Los residuos se representan en código de una letra y los puntos indican los residuos idénticos con la secuencia $\alpha 3(IV)$ humana.

2.1 Establecimiento del epítipo Goodpasture.

La primera aproximación para identificar las regiones y residuos involucrados en el epítipo de los autoanticuerpos de pacientes con el Síndrome de Goodpasture utilizó librerías peptídicas de fragmentos lineales solapantes que englobaban la totalidad de secuencia de $\alpha 3(IV)NC1$. No se pudo obtener resultados concluyentes debido a que,

como veremos más adelante, el epítipo es de tipo conformacional y por tanto, no reproducible mediante el uso de fragmentos lineales (Kalluri y cols. 1991, Hellmark y cols. 1996).

Estas limitaciones se salvaron con el uso de quimeras en las que se aprovechó el esqueleto no inmunoreactivo de la proteína $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ para introducir diferentes regiones de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y comprobar entonces la reactividad de los autoanticuerpos frente a las diferentes construcciones quiméricas. Estas se expresaron en células de mamífero para asegurar el correcto plegado de la proteína y la apropiada formación de los puentes disulfuro.

Se identificaron dos regiones como parte del epítipo GP ya que al ser introducidas en el esqueleto de $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ lo sensibilizaban a la reactividad frente de los autoanticuerpos. Estas regiones de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ se nombraron como E_A (residuos 17-31, quimera C2) y E_B (residuos 127-141, quimera C6)(Netzer y cols. 1999) y posibilitaron el fraccionamiento de los sueros GP en función de la región de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ frente a la que iban dirigidos (Figura 13). De este modo se caracterizaron cuatro subpoblaciones de anticuerpos GP que se llamaron: GP_A (frente a la región E_A), GP_B (frente a la región E_B), GP_{AB} (frente a la región E_A y E_B), y GP_X (dirigido contra una región no identificada) (Borza y cols. 2000).

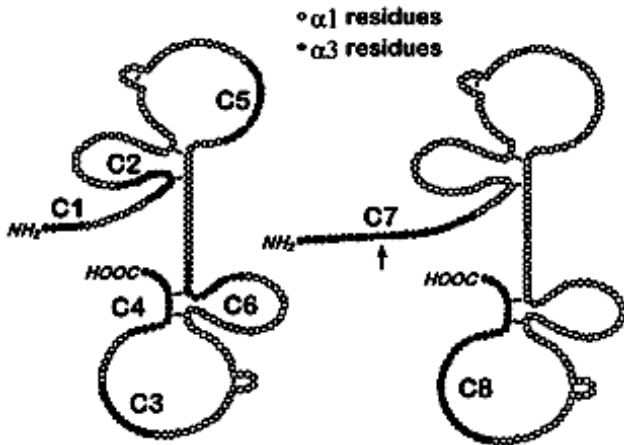


Figura 13. Esquema de las quimeras $\alpha 1/\alpha 3(IV)NC1$ construidas.

En las posiciones indicadas con círculos cerrados, tramos de secuencia de $\alpha 3(VI)NC1$ sustituyeron a los correspondientes residuos de $\alpha 1(IV)NC1$. Los puentes disulfuro se indican con líneas cortas que cierran los bucles. La flecha indica el punto de unión Hélice-NC1. En la parte inferior se comparan las secuencias de $\alpha 3(VI)NC1$ y $\alpha 1(VI)NC1$ sustituidas en cada quimera. Tomado de Netzer KO y cols. 1999.

C1	$\alpha 1$. . SVDH $\alpha 3$ ATWTTR	C2	$\alpha 1$ IDDPQCPSGTKILYH $\alpha 3$ TAIPSCPEGTVPLYS
C3	$\alpha 1$ TIERSEMFKKPT $\alpha 3$ SLNPERMFRKPI	C4	$\alpha 1$ RTHVSRQVCMRRT. $\alpha 3$ EKIIISRCQVCMKKRH
C5	$\alpha 1$ PMPMSMAPITGENIR $\alpha 3$ LMPMNMADITGRALE	C6	$\alpha 1$ IQIPPCPSGWSSSLWI $\alpha 3$ TDIPPCPHGWISLWK
C7	$\alpha 1$ GLPGSMGPPGTP. . SVDHGFLVTRHS $\alpha 3$ GLKGKRGDSGSPATWTTRGFVTRHS		
C8	$\alpha 1$ TIERSEMFKKPTPSTLKAGELRTHVSRQVCMRRT. $\alpha 3$ SLNPERMFRKPIPSTVKAGELEKIISRCQVCMKKRH		

Posteriormente, mediante mutagénesis dirigida, se sustituyeron en la quimera los residuos de $\alpha 3(IV)NC1$ de la región E_A por aquellos que eran diferentes en $\alpha 1(IV)NC1$, comprobándose entonces la disminución de la reactividad de los autoanticuerpos frente a las quimeras retromutadas. De este modo, se identificaron tres residuos hidrofóbicos (Ala₁₈, Ile₁₉, y Val₂₇) junto con la Pro₂₈ como críticos para el epítipo de los GP_A, el epítipo Goodpasture inmunodominante. Más tarde, con ayuda de un modelo 3D del heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(IV)NC1$ elaborado a partir de la estructura cristalina del hexámero natural $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(IV)NC1$ (PDB id: 1T60) (ver más adelante), se han localizado las regiones E_A y E_B en aquel heterohexámero (Borza y cols. 2002). Uno o más de los residuos críticos identificados mediante mutagénesis aparecen inaccesibles al medio por ubicarse en la interfase entre dos NC1 resultando por ello el epítipo crítico e inaccesible para los anticuerpos GP en condiciones nativas (David y cols. 2001).

En contraste, los residuos hidrofílicos Ser₂₁ y Ser₃₁ así como la Pro₂₈ junto con algunos residuos de la región E_B, que son importantes para la unión de mAb 3, son accesibles tanto cuando (α3,4,5)₂(IV)NC1 se encuentran en forma de hexámeros como en forma monomérica (Figura 14).

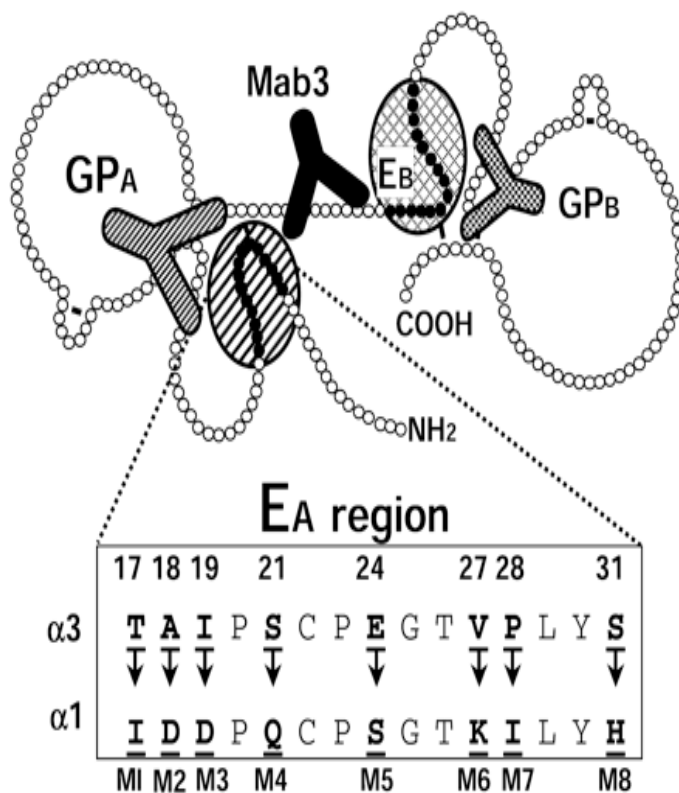


Figura 14. Estrategia de mutagénesis dirigida homóloga.

Las quimeras C2 y C6 son quimeras del dominio α1/α3(IV)NC1 contienen el epítipo conformacional tanto de los autoanticuerpos GP_A y GP_B así como del anticuerpo monoclonal mAb 3. Este epítipo lo albergan dos tramos de secuencia de α3(IV), las regiones E_A y E_B (círculos cerrados) que sustituyen a los tramos equivalentes del dominio α1(IV)NC1 (círculos abiertos) no reconocidos por los autoanticuerpos. Para investigar el papel de los 8 residuos específicos de α3(IV)NC1 en la región E_A, se mutó cada uno de ellos en la quimera al residuo correspondiente de α1. Se determinó el cambio de reactividad de los autoanticuerpos GP_A, GP_B y del anticuerpo monoclonal mAb 3 frente a cada una de las 8 quimeras mutantes. Tomado de David M y cols. 2001.

Por otro lado, estudios paralelos identificaron el primer tercio de la región N-terminal de α3(IV)NC1 como diana inmunodominante de la respuesta de las células B (Hellmark y cols. 1999). Además, mediante mutagénesis dirigida, se sustituyó los residuos de α1(IV)NC1 de esta región por aquellos correspondientes en α3(IV)NC1. La ganancia de reactividad de los anticuerpos GP frente a los mutantes, permitió identificar a los residuos Thr₁₇, Ala₁₈, Ile₁₉, Ser₂₁, Glu₂₄, Val₂₇, Pro₂₈, Ser₃₁ y Gln₅₄ como críticos para el epítipo GP (Gunnarsson y cols. 2000). De capital importancia es la capacidad nefritogénica que adquiere la quimera portadora de estos nueve residuos críticos introducidos en el

esqueleto de $\alpha 1(IV)NC1$, pues induce el desarrollo de la enfermedad en animales inmunizados (Hellmark y cols. 2003).

Si bien el análisis de los residuos identificados justificaba el carácter conformacional del epítipo y la pérdida de reactividad de los autoanticuerpos frente a la proteína en condiciones reductoras como consecuencia de la rotura de los puentes disulfuro y la alteración de la estructura terciaria de la proteína, no podía explicar por qué los autoanticuerpos no eran capaces de reaccionar frente a ciertas poblaciones de hexámeros nativos (estructura cuaternaria) obtenidos mediante digestión con colagenasa de preparaciones de membrana basal. El análisis mediante electroforesis de hexámeros de fuente natural obtenidos a partir de productos de digestión, reveló la existencia de dos tipos de hexámeros, los constituidos por NC1 monoméricos y los constituidos a partir de NC1 diméricos, los cuales ponían de relieve la existencia de nuevas interacciones que mantenían la integridad entre los diferentes NC1, (Figura 15). Estas interacciones actuarían reforzando los hexámeros formados a partir de NC1 diméricos, ocasionando que algunos residuos participantes en el epítipo GP, al estar ubicados en la superficie de contacto entre dos NC1, resultarían inaccesibles para su unión con los autoanticuerpos (David y cols. 2001). En cambio, aquellos hexámeros constituidos por NC1 monoméricos, o bien los diméricos sometidos a condiciones desnaturizantes y posteriormente reasociados para recuperar su estructura nativa previa, presentarían accesible la zona de unión para los autoanticuerpos (Borza y cols. 2005). La identidad de estas interacciones permaneció desconocida, se especuló que podría tratarse de puentes disulfuro intra-NC1, pero no se lograron evidencias de ello.

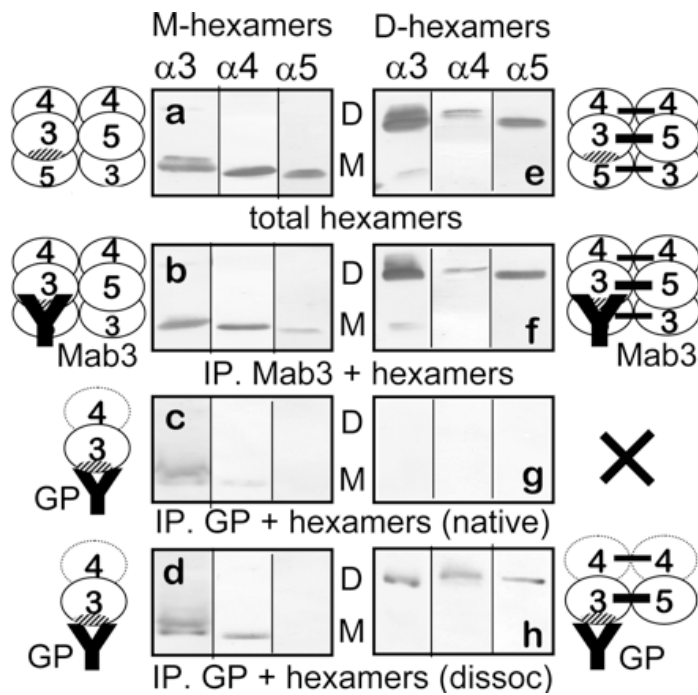


Figura 15. Ensayos de inmunoprecipitación de M-hexámeros y D-hexámeros reasociados.

M-hexámeros (a-d) y D-Hexámeros (e-h) reasociados a partir de GBM NC1 bovinos mono y diméricos se analizaron por inmunoblotting con anticuerpos monoclonales frente a α3, α4 y α5NC1, directamente (a y e) y tras inmunoprecipitación con mAb 3 (b y f) o anticuerpos GP (c y g). Los M- y D- hexámeros disociados con ácido fueron inmunoprecipitados con anticuerpos GP (d y h). La unión de los anticuerpos al antígeno se representa mediante una **Y**. **X** indica no unión. Tomado de Borza DB y cols. 2005.

Cuando se resolvió la estructura 3D del dominio NC1 de la unión C-terminal entre dos protómeros adyacentes de colágeno IV de la placenta humana (Than y cols. 2002), se desveló que esta partícula se componía de dos casquetes triméricos que interaccionan a lo largo de una interfase planar. Esta estructura ha permitido, como mencionamos antes, el modelado 3D del heterohexámero $(\alpha_{3,4,5})_2(\text{IV})\text{NC1}$ y la ubicación de los residuos esenciales identificados como parte del epítipo. Cada casquete en aquella estructura aparecía constituido por dos fragmentos de cadena $\alpha_1(\text{IV})\text{NC1}$ y un fragmento de cadena $\alpha_2(\text{IV})\text{NC1}$ dispuestos segmentalmente alrededor de un socavón axial. Cada cadena monómerica se pliega en dos subdominios estructuralmente muy similares, conteniendo cada uno un lazo en horquilla a modo de dedo que se inserta en una hoja beta, formada por seis hebras, del subdominio vecino perteneciente bien a la misma cadena o a la cadena adyacente. Así, cada trímero forma una especie de hélice séxtupla tipo barco bastante regular (Figura 3D del NC1, 1T60). La interacción entre trímeros se encontraba estabilizada, como se ha mencionado anteriormente, por un tipo de enlace

no-covalente, no caracterizado hasta el momento, que se establece entre las cadenas laterales de un residuo de metionina y de un residuo de lisina pertenecientes a cadenas $\alpha 1(IV)NC1$ y $\alpha 2(IV)NC1$ de trímeros opuestos, que sería el responsable de la existencia de hexámeros constituidos a partir de NC1 diméricos. Más recientemente, este nuevo tipo de enlace no covalente ha sido también identificado, utilizando espectroscopia de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas, como enlace sulfilimina (-S=N-) entre los residuos de hidroxilisina-211 y de metionina-93 de protómeros adyacentes en el heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(IV)NC1$ (Vanacore y cols. 2009). La presencia de estos enlaces en los hexámeros nativos contribuyen a reforzar las interacciones entre NC1 opuestos aumentando la fuerza de cohesión intermoleculares y manteniendo al epítipo en una posición críptica inaccesible a los autoanticuerpos. Se ha propuesto que la desaparición de dichos enlaces provocaría un cambio conformacional que permitiría el acceso de los autoanticuerpos GP a su epítipo y, por tanto, el desarrollo de la enfermedad (Pedchenko y cols. 2010). En este sentido, se podría considerar el Síndrome de Goodpasture como una conformeropatía.

3 Implicación de factores alternativos en la patología del síndrome de Goodpasture.

Al igual que ocurre con la gran mayoría de enfermedades autoinmunes, el síndrome de Goodpasture se asocia preferiblemente con unos antígenos leucocitarios humanos (HLA) determinados. Concretamente, se ha encontrado una correlación positiva con el HLA DRB1*1501, que está presente en el 80 % de los casos, así como una correlación negativa con el HLA DRB1*07 y HLA DRB1*01 (Phelps y Rees 1999). Por otra parte, el 10-38 % de los pacientes con autoanticuerpos presentan a su vez anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA). Estos pacientes reciben el nombre de doble

positivos y aunque no muestran mayor severidad en la afección renal y/o presencia de hemorragia pulmonar, si presentan menor proteinuria y una mayor afección sistémica, en concreto, dolor muscular, erupciones cutáneas y ciertas complicaciones gastrointestinales y nerviosas (Hellmark y cols. 1997, Levy y cols. 2004).

Junto con los autoanticuerpos también pueden aparecer linfocitos T patogénicos que pueden iniciar la enfermedad, en ausencia incluso de los propios autoanticuerpos (Wu y cols. 2001), a través de la interleucina IL-23 (Ooi y cols. 2009).

Como ya mencionamos, el fenómeno de reordenamiento exónico exclusivo de la cadena $\alpha 3(\text{IV})$ humana y que sólo implica los exones de la región génica que codifica el antígeno GP podría ser un factor importante en la patología del síndrome GP (Bernal y cols. 1993). Los productos alternativos (NC13 ΔIII , NC13 ΔV , y NC13 $\Delta\text{III/IV/V}$) comparten la región N-terminal diana de fosforilación (Revert y cols. 1995), una modificación que podría desempeñar un papel central en la diversificación estructural del dominio $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$. La existencia de sitios de fosforilación adicionales a la Ser₉ en el extremo amino terminal (ver Figura 10), junto con la capacidad de procesamiento alternativo del pre-mRNA, que se ha señalado, además, que podría facilitar su fosforilación (Bernal y cols. 1993), representan dos hechos singulares propios de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ humano que lo convierten, comparativamente con otras cadenas $\alpha(\text{IV})$ humanas y con otras $\alpha 3(\text{IV})$ de especies diferentes en un dominio NC1 más susceptible de fosforilarse y de generar una respuesta autoinmune. De acuerdo con esta idea, se ha observado que los riñones de pacientes Goodpasture exhiben niveles de expresión elevados de productos alternativos (Bernal y cols. 1993, Saus 2002). Así, el dominio $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ aislado a partir de estos riñones presenta alteraciones conformacionales que facilitan el ser reconocidos por los autoanticuerpos Goodpasture. Esto ha hecho sugerir que en estos pacientes pueda

existir alteraciones en la estructura terciaria del dominio $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y que la enfermedad de Goodpasture estuviese causada por una respuesta legítima del sistema inmune contra especies aberrantes del autoantígeno (Saus 2002). En similar dirección, pero de naturaleza distinta, es la observación, como ya mencionamos arriba, de isomerización conformacional en el dominio $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ aislado de fuente natural debida a una diferente conectividad de los puentes disulfuro. El reconocimiento diferencial de estas formas por los autoanticuerpos GP apunta a la implicación de esta isomerización en la patogenia de la enfermedad (Calvete y cols. 2006).

4 La proteína Goodpasture-antigen binding protein (GPBP).

Se ha hipotetizado que algún tipo de diversificación conformacional en $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, bien debida a reordenamiento exónico, o a isomerización por conectividad diferencial de puentes disulfuro, o derivada por modificaciones post-traduccionales como la fosforilación, o quizás la conjunción de varios de estos factores, subyace en el desencadenamiento de la enfermedad de Goodpasture. Esta hipótesis resultó fuertemente apoyada tras la identificación de la proteína “Goodpasture-antigen binding protein”, GPBP (Raya y cols. 1999), una proteína capaz de unir y fosforilar específicamente el antígeno de Goodpasture humano. GPBP es una Ser/Thr cinasa no convencional que fosforila $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ humano (Raya y cols. 1999, Raya y cols. 2000) como parte de un proceso catalítico que provoca cambios conformacionales en este dominio y que resulta en el ensamblaje supramolecular de múltiples isómeros conformacionales (confórmeros) en la estructura cuaternaria de la red de colágeno (Saus 2002, Revert y cols. 2007).

GPBP está codificada en el gen COL4A3BP, localizado en el cromosoma 5q13 (Raya y cols. 1999). Presenta varios dominios estructurales, entre los que destacan un dominio PH (Pleckstrin homology) que posibilita la unión de GPBP al aparato de Golgi; una primera región de 19 aminoácidos rica en serinas ubicada en el exón IV, entre las que se incluye el posible residuo catalítico Ser₁₃₂, un dominio con posible función de oligomerización ubicado en el exón VII; un motivo FFAT de unión a retículo codificado en el exón IX, una segunda región rica en serinas de 26 aminoácidos codificada en el exón XI (ausente en GPBP-2, ver más tarde) y finalmente un dominio START (Steroidogenic acute regulatory protein-related) de unión a ceramidas (Figura 16).

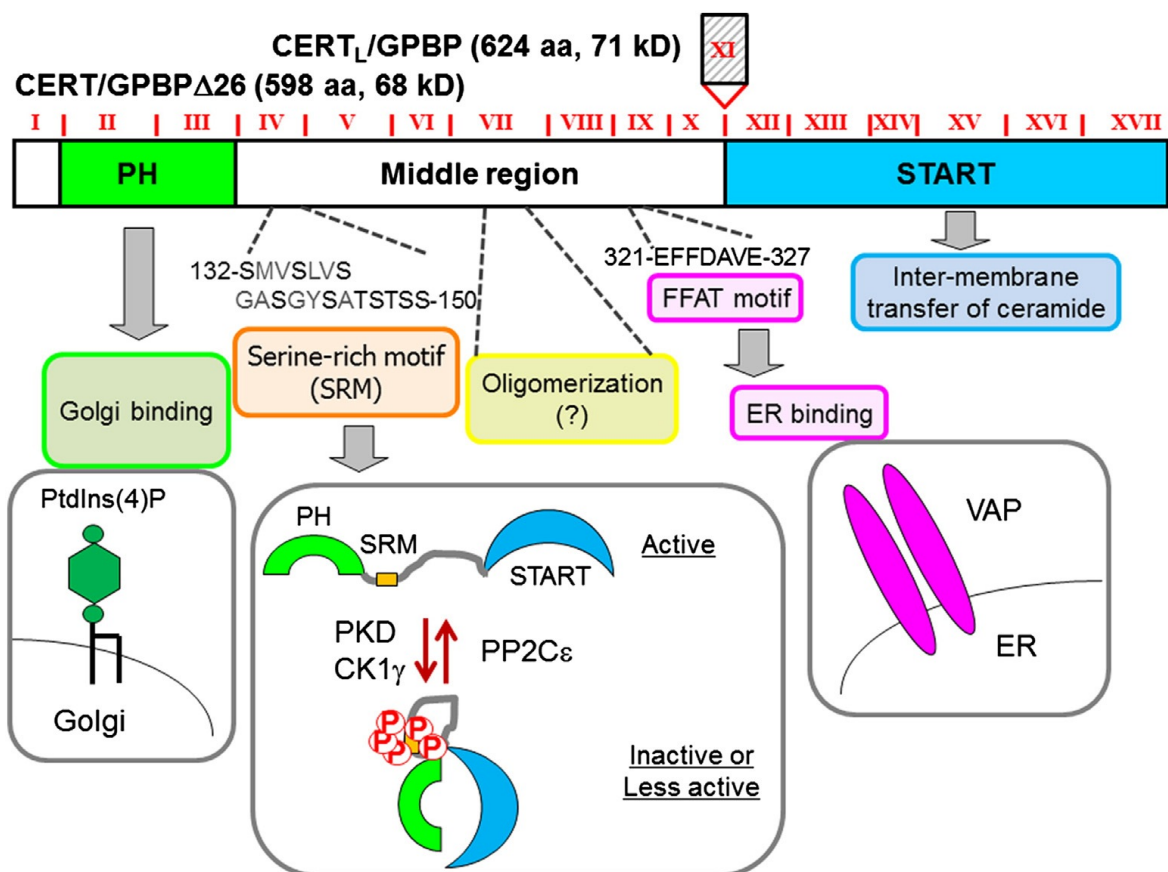


Figura 16. Regiones funcionales de GPBP (CERT).

GPBP humano es la suma de varios dominios, cuyas funciones conocidas se detallan en el esquema. Se representa esquemáticamente la estructura de GPBP-1 (CERT_L) y GPBP-2 (CERT). Las uniones exón-exón se representan mediante líneas verticales rojas en el gen humano COL4A3BP. GPBP-2 posee 26 residuos menos que GPBP-1 (codificados en el exón 11). Tomado de Hanada 2013.

GPBP presenta tres isoformas: 1) GPBP-1 que se corresponde con el producto canónico del gen (Raya y cols. 1999); 2) GPBP-2, resultado de un procesamiento alternativo que elimina el exón XI (Raya y cols. 2000) (ver Figura 16); 3) GPBP-3, resultado de un inicio alternativo en la traducción a partir de un codón no canónico (Granero-Molto y cols. 2008). El tamaño molecular de GPBP-1 y GPBP-2 es similar, concretamente de unos 77 kDa; sin embargo, GPBP-3 genera un polipéptido de 91 kDa que mediante modificaciones post-traduccionales puede llegar a alcanzar los 120 kDa (Revert y cols. 2008).

GPBP-1 es una proteína soluble y exportable que se localiza en el espacio extracelular e interactúa con el colágeno IV (Revert y cols. 2007, Revert y cols. 2008) mientras que GPBP-2 queda restringida al citosol (Revert y cols. 2008). Ambas isoformas presentan actividad cinasa in vitro y capacidad de autofosforilación (Raya y cols. 2000), y juegan un papel en la organización de las miofibrillas musculares mediante interacción con una proteína efectora, GIP130 (GPBP-interacting protein of 130 kDa) (Revert-Ros y cols. 2011). GPBP-3 probablemente actúa como proteína de unión a membrana regulando la secreción de GPBP-1 (Revert y cols. 2008). Se ha encontrado también que GPBP-2 (GPBP Δ 26) es un transportador de ceramida entre el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi, recibiendo el nombre por ello de CERT (Hanada y cols. 2003).

En un contexto patológico, GPBP-1 aparece sobreexpresada en riñones de pacientes afectados por el Síndrome de Goodpasture y, además, se ha relacionado con la inducción de la secreción de la citocina inflamatoria pro-autoinmune Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α) y con el Lupus Eritematoso Sistémico (LES). Por ello y otras observaciones (ver más adelante), se ha sugerido que GPBP podría jugar un papel importante en la organización del colágeno en la membrana basal glomerular y estar

involucrada en enfermedades mediadas por inmunocomplejos (Raya y cols. 2000, Granero y cols. 2005).

Estudios realizados con modelos animales han puesto de manifiesto que el envejecimiento en ratones New Zealand White (NZW), una estirpe propensa a sufrir Lupus (Theofilopoulos y Dixon 1985), se correlaciona tanto con un aumento en la expresión glomerular de GPBP como con la interrupción de la membrana basal glomerular y la aparición de depósitos de IgA asociados a la expansión de la matriz de la MBG en el contexto de una respuesta autoinmune (Revert y cols. 2007). Paralelamente, la expresión transgénica de h-GPBP-1 en ratones no propensos a sufrir Lupus, origina anomalías similares a las anteriormente descritas en la membrana basal glomerular, aunque con ausencia de respuesta autoinmune (Revert y cols. 2007) (Figura 17).

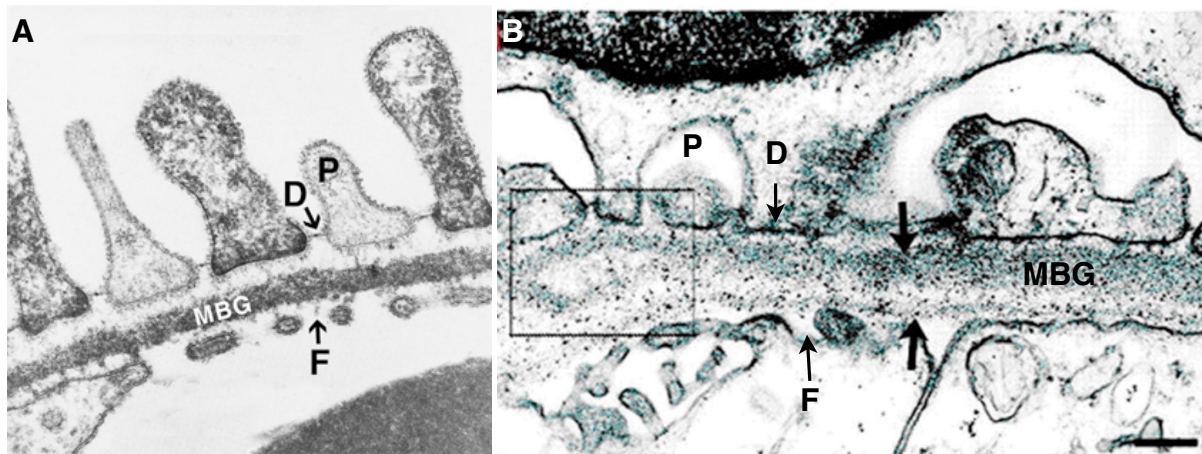


Figura 17. Efectos de la sobreexpresión de GPBP-1 humana en ratones NZW.

A) micrografía electrónica de membrana basal glomerular humana en donde se observa la fusión correcta de las redes de colágeno $\alpha3\alpha4\alpha5(IV)$ (arriba) y $\alpha1\alpha1\alpha2(IV)$ (abajo) para formar la MBG. **B)** micrografía electrónica de membrana basal glomerular humana de ratones que sobreexpresan h-GPBP-1 en donde se observa la fusión defectuosa (flechas gruesas) de las redes $\alpha3\alpha4\alpha5(IV)$ (arriba) y $\alpha1\alpha1\alpha2(IV)$ (abajo), así como la aparición de puntos de disociación de la MBG (cuadro). P podocito, D diafragma, MBG membrana basal glomerular, F Fenestra. Tomado de Revert y cols. 2007.

Estas observaciones sustentan la propuesta de que GPBP-1 in vivo podría participar en la regulación de la organización del colágeno tipo IV y muestran que su expresión elevada induce glomerulonefritis mediada por inmunocomplejos. Se observa en este modelo que GPBP-1 se acumula entre el componente epitelial de la MBG y el mesangio engrosado (glomerulonefritis mesangial) o bien en el componente endotelial de la MBG alargado y engrosado (glomerulonefritis nodular) (Revert y cols. 2007). Se desconoce el mecanismo por el cual el aumento de GPBP-1 causa la disociación en las redes de $(\alpha 1)_2\alpha 2(\text{IV})$ y $\alpha 3\alpha 4\alpha 5(\text{IV})$ así como interrupciones en la MBG. Como ya mencionamos antes, se ha propuesto que $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ presente diversificación estructural basada en el ensamblado de múltiples isoformas conformacionales (confórmeros) los cuales divergen en el estado redox de cisteínas específicas implicadas en la formación de enlaces disulfuro (Calvete y cols. 2006). En esta tesis nos ocupamos también de profundizar en el papel de GPBP-1 en el ensamblaje del colágeno IV y sus consecuencias inmunopatogénicas.

Objetivos.

Objetivos.

El objetivo general de este trabajo persigue esclarecer la etiología de la enfermedad Goodpasture y profundizar en el conocimiento del epítipo de los autoanticuerpos y en la estructura 3D y ensamblaje de los componentes proteicos que forman el heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$ y albergan el epítipo.

1 Caracterización mediante tecnología phage display y bioinformática del epítipo de los autoanticuerpos GPc ya localizado en el dominio $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ del colágeno tipo IV.

El estudio del epítipo de los GPc se ha abordado clásicamente a partir del análisis del antígeno en si mismo. En el presente trabajo, pretendemos extraer información del epítipo a partir del análisis de los autoanticuerpos GPc patogénicos así como de mAb 3, un anticuerpo monoclonal murino que compite con los autoanticuerpos de paciente.

Para ello pretendemos: (1) poner a punto un sistema de expresión que usa células de insecto y baculovirus que permita la producción recombinante de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y del resto de cadenas proteicas del colágeno tipo IV humano en forma abundante, funcional y estructuralmente competente; (2) aplicar la tecnología phage display y procedimientos bioinformáticos para lograr el cartografiado del autoepítipo para los anticuerpos circulantes de un paciente Goodpasture sobre la estructura 3D del heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$, que es la diana de los autoanticuerpos en el síndrome de Goodpasture y de los aloanticuerpos en aquellos casos en los que se recurre a un trasplante renal en respuesta al síndrome de Alport.

2 Establecer las bases estructurales de los dominios NC1 del colágeno IV para comprender la biología y patología asociadas al colágeno IV en las membranas basales.

Se pretende alcanzar la cristalización de los seis α (IV)NC1 y de varias asociaciones entre ellos para, mediante la resolución de sus respectivas estructuras a nivel atómico, entender el proceso de ensamblaje y formación del protómero en el colágeno IV, así como de las interacciones que lo mantienen y preservan del ataque de los GPc.

3 Implicación de GPBP-1 en el ensamblaje del colágeno tipo IV y consecuencias inmunopatogénicas.

Se pretende verificar a través de la coexpresión simultánea de α 3(IV)NC1 y GPBP-1 y mediante estudios de resonancia de plasmon de superficie, de estructura de proteínas por cristalografía de rayos X y de caracterización inmunoquímica y de mutagénesis dirigida, si GPBP-1 modifica el plegamiento de α 3(IV)NC1 e influye en la exposición de epítomos de anticuerpos patogénicos.

Metodología.

1 Técnicas de biología molecular.

1.1 Construcción de librerías de cDNA.

Se preparó una librería de cDNA (DNA complementario) a partir de células embrionarias de riñón (línea celular HEK 293) con la finalidad de obtener aquellos genes que se están expresando en dichas células. Para ello se extrajo el mRNA de 1×10^6 células HEK 293 mediante el método del Trizol (Invitrogen) según el protocolo del fabricante, y, posteriormente, se retrotranscribió a cDNA mediante el uso de la superscript retrotranscriptase (Invitrogen), amplificada con hexanucleótidos al azar ("random primers"). La librería se almacenó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su utilización.

1.2 Clonado de genes.

$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ se subclonó a partir del vector fa3ANU-pRC-CMV (Netzer y cols. 1999). Esta construcción poseía la señal de exportación BM40 y el tag FLAG (DYKDDDDK) ambas en posición amino terminal a continuación de doce residuos pertenecientes a la región de cadena α -hélice (estos residuos corresponden con aquellos que generaría la colagenasa bacteriana utilizada para solubilizar muestras biológicas), flanqueada por sitios de corte para *SacI*, por lo que la digestión con *SacI* libera el fragmento codificante del NC1 listo para subclonar en el vector correspondiente. Los genes de las proteínas humanas $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$ se amplificaron a partir de la librería de cDNA renal previamente descrita, utilizando sus respectivos cebadores (Tabla A1 en Anexo I).

GPBP-1 se subclonó a partir del vector GPBP (n4')-pcDNA3 (Raya y cols. 1999), utilizando sus respectivos cebadores que introducían sitios de corte únicos (Tabla A1 en Anexo I).

1.3 Inserción de BM40 y etiquetado con FLAG.

Para el correcto plegado de las proteínas se requiere de la formación de seis puentes disulfuro intermoleculares, que no pueden originarse adecuadamente en el ambiente reductor del interior celular, por lo que, para permitir la exportación de estas proteínas al medio de cultivo se introdujo en posición amino terminal la señal de exportación BM40. A su vez, para facilitar su recuperación del medio de cultivo, se añadió en posición amino terminal, la etiqueta FLAG. El ensamblaje de dichas secuencias se realiza mediante una amplificación secuencial, en la que, el resultado de una amplificación, es el punto de partida de la siguiente (ver Figura 76 en Anexo I), de tal forma que se van añadiendo fragmentos solapantes de DNA en dirección 5' → 3' mediante los cebadores descritos en la Tabla A1 (Anexo I). Con la última amplificación se introducen los sitios de restricción únicos para su posterior clonado en el vector adecuado.

Con este procedimiento, se consigue el ensamblado correcto de la proteína y su exportación al medio de cultivo. Así, se facilita la purificación de las proteínas que, además, quedan menos expuestas a la acción de proteasas en comparación a las proteínas purificadas a partir de lisados celulares.

1.4 Construcción de los vectores.

1.4.1 Vectores de expresión en células de mamífero.

La construcción de partida $\alpha 3(IV)NC1$, estaba clonada en el vector pRC-CMV, por lo que no se realizó ninguna modificación (Netzer y cols. 1999).

1.4.2 Vectores de expresión en células de Insecto.

Se utilizaron los vectores pFastBac1 y también pFastBac Dual (Invitrogen) con el que se puede conseguir la expresión simultánea de dos proteínas bajo el control de promotores distintos.

Cada uno de los NC1, así como los distintos mutantes generados, se expresaron de forma individual en el vector pFastBac 1.

$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, se co-expresó, además, junto con GPBP-1 utilizando el vector pFastBac Dual, estando $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y GPBP-1 bajo la acción de los promotores PH y PD10 respectivamente. $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ también se co-expresaron utilizando el mismo vector, con $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ bajo la acción respectiva de los promotores PD10 y PH.

Finalmente, se preparó una construcción para la coexpresión de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ y GPBP-1 a la que se llamó Tt4. Para ello se amplificó mediante los cebadores descritos en la Tabla A1 (Anexo I), la secuencia que engloba ambos promotores y terminadores del vector “donador” $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ - $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ -pFastBac Dual con un punto de corte para *SnaBI* (NEB) en ambos extremos. Este fragmento amplificado se uso para subclonar en el sitio de restricción *SnaBI* del vector pFastBac Dual que actúa como “huésped”, $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -GPBP-pFastBac Dual, (Figura 18).

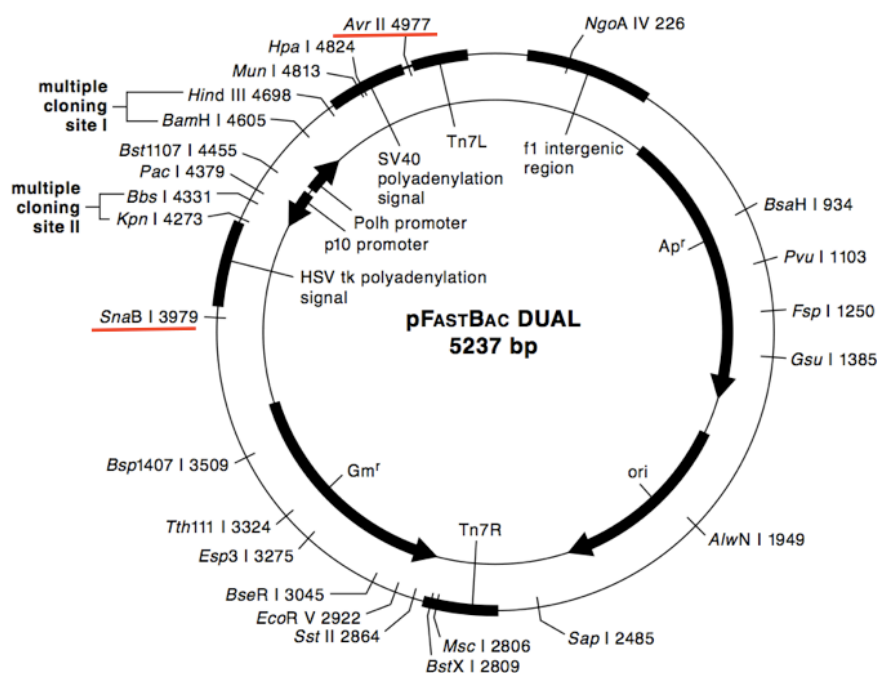


Figura 18. Esquema del procedimiento utilizado para expresar más de dos proteínas en el vector pFastBac DUAL.

Tras clonar las secuencias proteicas de interés, en dos vectores pFastBac DUAL diferentes, se amplifica mediante los cebadores descritos en la Tabla A1 (Anexo I) el cassette de expresión completo de una de ellas. Dichos cebadores se aparean en las regiones subrayadas en

rojo e insertan un sitio de corte para el enzima de restricción *SnaBI* que permitirá introducir esta región en el vector pFasBac DUAL receptor.

1.5 Mutagénesis dirigida.

Los ensayos de mutagénesis dirigida se realizaron sobre los genes de $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (tanto en la construcción en la que $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ se expresa en solitario, como en la que se co-expresa junto a GPBP-1). Las mutaciones se llevaron a cabo mediante el método de PCR basado en el sistema Quickchange de Stratagene (Stratagene, Agilent Technologies, La Jolla, CA). Siguiendo las instrucciones del fabricante, se utilizaron dos cebadores solapantes que introducían la mutación tanto en dirección 5'→3' así como en dirección 3'→5' siendo el resultado la amplificación de todo el vector parental con las mutaciones introducidas. Posteriormente, el vector parental utilizado como molde (no mutado) se digirió con la enzima de restricción *DpnI* (1 U/ μL) durante 2 h a 37 °C. *DpnI* digiere únicamente el DNA metilado correspondiente al vector parental. Seguidamente, 10 μL de producto de digestión se transformó en células *E. coli* DH5 α quimiocompetentes mediante un choque térmico de dos minutos a 42 °C.

La Tabla A2 (Construcción de la quimera $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$ con aquellos residuos de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ determinados como parte del epítipo mediante otras técnicas), la Tabla A3 (Mutaciones a partir de la quimera $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$ con los nuevos candidatos a formar parte del epítipo determinados mediante phage display) y la Tabla A4 (Mutaciones a partir de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$) localizadas en el Anexo I, muestran los cebadores utilizados para cada una de las mutaciones introducidas en $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$. Se comprobó mediante secuenciación del DNA plasmídico que las mutaciones introducidas eran correctas.

1.5.1 Delección de fragmentos de proteínas (truncados).

Se generaron dos truncados de la proteína GPBP-1 a partir de la construcción en la que éste se coexpresa con $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, de forma secuencial y acumulativa. Se truncaron dos regiones contiguas, concretamente el dominio PH (delecionado desde la Met₁ hasta

la Ser₁₂₃) y el dominio PH junto con la región SR1 (delecionado desde la Met₁ hasta el Glu₁₆₃). Para ello se amplificó la construcción que coexpresaba ambas proteínas con los oligos descritos en la Tabla A5 (Truncados a partir de GPBP-1, Anexo I), que introducen un sitio de corte para *XhoI* en el extremo 5' junto con un nuevo codón de inicio *ATG* y un sitio *KpnI* en el extremo 3', posteriormente el producto de PCR amplificado, se usó para reemplazar el fragmento generado tras digerir el vector de origen con los mismos enzimas.

2 Obtención y caracterización de los anticuerpos utilizados.

2.1 Anticuerpos circulantes Goodpasture (GPc).

Los anticuerpos circulantes cedidos por el Dr. Saus se obtuvieron de un paciente varón de 58 años de edad, fumador y que manifestó una afección gripal previa a su hospitalización debida a un fallo renal agudo. Las analíticas pusieron de manifiesto anticuerpos anti-membrana basal (216 UI/mL), glomerulonefritis rápidamente progresiva (con una afectación del 50 % de los glomérulos) y depósitos lineales de IgG a lo largo de la MBG.

El paciente fue diagnosticado con un Síndrome de Goodpasture y se le practicó una plasmaféresis terapéutica para retirar los anticuerpos patogénicos del organismo. Los GPc se obtuvieron a partir de dicha plasmaféresis. Inicialmente se purificaron los anticuerpos IgG mediante cromatografía de afinidad en proteína A agarosa (GE Healthcare, Piscataway, NJ) según el protocolo establecido por el fabricante. Posteriormente, a partir de estas IgG se purificaron los GPc por afinidad a través de una columna de 1 ml de resina Affi-Gel-10 (Bio-Rad, Hercules, CA) a la que se había inmovilizado $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ a una concentración de 1 mg/ml. Tras cargar la columna de

$\alpha 3(IV)NC1$ con las IgGs previamente purificadas por su unión a la proteína-A, la columna se lavó con 10 volúmenes de tampón TBS (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,4). Las IgG retenidas se eluyeron con 5 volúmenes (5 ml) de Gentle Immunopure (Pierce) y se dializaron tres veces frente a 2 litros de TBS. Por último, los anticuerpos GPc se concentraron mediante ultra-filtración utilizando Amicon Ultra devices (Millipore, Bedford, MA) con punto de corte de 100 kDa.

La caracterización inmunológica de los anticuerpos GPc recuperados utilizando $\alpha 3(IV)NC1$ recombinante reducido y no reducido, así como hexámero renal humano en paralelo con mAb 3 (un anticuerpo monoclonal que compite y comparte parte del epítipo conformacional con los anticuerpos GPc)(David y cols. 2001) y M3/1a (otro anticuerpo monoclonal preparado previamente en nuestro laboratorio cuyo epítipo lineal se encuentra en el extremo amino terminal de $\alpha 3(IV)NC1$) (Borza y cols. 2000) puso de manifiesto de modo inequívoco que el paciente bajo estudio se encontraba frente a una respuesta autoinmune Goodpasture, (Figura 19).

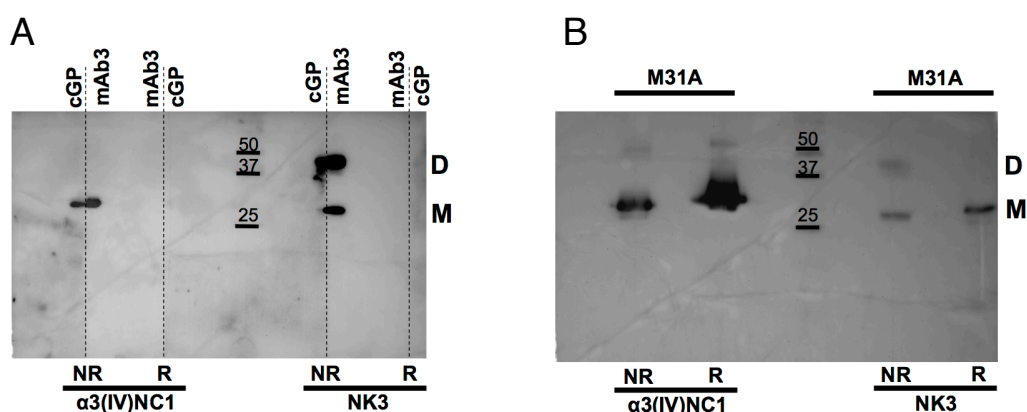


Figura 19. Efecto de la reducción de los puentes disulfuro de $\alpha 3(IV)NC1$ en la reactividad de los GPc.

La reducción de los puentes disulfuro en $\alpha 3(IV)NC1$ y el hexámero renal humano (NK3) causa la pérdida de reactividad de los GPc y mAb 3 (A), revelando el carácter conformacional de sus epítipos, mientras que no tiene efecto en la reactividad de M3/1a (B) cuyo epítipo es lineal.

2.2 Anticuerpo monoclonal murino mAb 3.

mAb 3 fue amablemente suministrado por Thomas Hellmark y Jörgen Wieslander (Wieslab Ab, Sweeden) en forma de medio de cultivo de hibridomas. Los anticuerpos se purificaron a partir del medio de cultivo mediante cromatografía de afinidad en proteína A agarosa (GE Healthcare, Piscataway, NJ) según el protocolo establecido por el fabricante, tras lo que se concentraron mediante ultra-filtración utilizando Amicon Ultra devices (Millipore, Bedford, MA) con punto de corte de 100 kDa.

3 Métodos generales para el estudio de proteínas.

3.1 Técnicas cromatográficas para la purificación y análisis de proteínas.

- La purificación de proteínas mediante cromatografía de exclusión molecular así como la determinación del estado de oligomerización de las mismas, se llevó a cabo usando el sistema cromatográfico líquido de media presión FPLC (Fast Performance Liquid Chromatography) y la columna Superdex S200 (GE Healthcare).

En los ensayos de oligomerización la proteína (o las diferentes proteínas en el caso de complejos) se ajustó a una concentración final de 1 mg/ml en TBS (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,4) y se mantuvo durante la noche a 20 °C. Tras este período de incubación, la muestra se analizó mediante cromatografía de exclusión molecular, con el equipo y columna citados anteriormente, realizándose el experimento a una temperatura de 20 °C y con un flujo de TBS (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,4) de 0,5 ml/min. Para conocer el tamaño de las especies obtenidas, previamente se calibró la columna con un conjunto de proteínas patrón de masa molecular en kDa indicada entre paréntesis: quimotripsinógeno (25), albúmina de suero bovino (66,4), aldolasa (156,8), tiroglobulina bovina (669) y azul dextrano (210,3).

- La inmunopurificación de las proteínas etiquetadas con FLAG, se llevo a cabo en columnas de 15 ml (Biorad) previamente empaquetadas con 1 ml de resina anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma). El medio de cultivo con la proteína a purificar, previamente centrifugado para eliminar células y restos celulares, se ultracentrifugó a 100.000 x g durante 1 hora para precipitar el baculovirus presente en el medio. Posteriormente se hizo pasar el medio ya ultracentrifugado por dicha columna a 4 °C y a un flujo de 0,5 ml/min con ayuda de una bomba peristáltica. Tras lavar la columna con 25 volúmenes de columna de TBS (50 mM tris, 150 mM cloruro sódico, pH 7,4) se eluyó la proteína allí retenida aplicando cinco volúmenes de columna de péptido FLAG (DYKDDDDK) 0,1 mg/ml en TBS. Finalmente, se concentraron las fracciones y se eliminaron los restos de péptido mediante sucesivos ciclos de ultrafiltración usando filtros Amicon ultra devices (Millipore) con punto de corte de 10 kDa.

3.2 Electroforesis SDS-PAGE.

En la electroforesis bajo condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) (Laemmli 1970), las proteínas se sometieron a un campo eléctrico de 200V en tampón Tris-Glicina en presencia del detergente aniónico dodecil sulfato sódico (SDS), asegurando la completa desnaturización. En esta situación la migración es proporcional al tamaño molecular de la molécula pero no a su carga intrínseca. Las electroforesis se realizaron tanto en condiciones reductoras (presencia de DTT o 2-mercaptoethanol) como no reductoras (ausencia de tioles) con la finalidad de comprobar la presencia o no de oligómeros y/o agregados moleculares, y la reactividad frente a anticuerpos conformacionales dependientes de la presencia de puentes disulfuro.

Para la visualización de las proteínas, los geles se tiñeron con azul de Coomasie.

3.3 Western-blotting e inmunodetección.

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Burnette 1981) utilizando un equipo de transferencia semiseco (Sigma Aldrich), con una intensidad de corriente de 0,84 mA/cm² durante una hora. La efectividad de la transferencia electroforética y la localización de las bandas proteicas en la membrana se comprobó y alcanzó, respectivamente, mediante tinción de la membrana con Rojo Ponceau. La inmunodetección se llevó a cabo mediante anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa, anti-FLAG (Sigma Aldrich) en una dilución 1:1.000 para aquellas proteínas etiquetadas con FLAG (es decir todos los NC1, así como los mutantes generados), así como anti-Human y Anti-Mouse (Promega) en una dilución 1:10.000 en aquellos anticuerpos no conjugados a peroxidasa (concretamente, se usó anti-Human para detectar los GPc y Anti-Mouse para la detección de M3/1a, mAb 14 y mAb 3). Los anticuerpos se revelaron con el reactivo luminiscente ECL prime (GE healthcare) mezclando los componentes en proporción 1:1 y tras aplicar la mezcla sobre las membranas, éstas impresionaron películas fotográficas (Kodak) que se revelaron convencionalmente.

3.4 Análisis por huella peptídica.

Para el estudio mediante espectrometría de masas (maldi toff-toff), las proteínas se obtuvieron a partir de bandas bien definidas y aisladas en geles de electroforesis SDS-PAGE. Se tomaron las precauciones adecuadas para evitar su contaminación con otras proteínas y se escindió la banda con la ayuda de un bisturí. Las muestras se analizaron en el servicio de proteómica del CIPF (integrado dentro de la red nacional Proteored).

4 Métodos para la cuantificación de la proteína.

- Método de Bradford. Se utilizó el reactivo Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratorios, Hercules, CA) para cuantificar la concentración de proteína. Para ello se construyó una recta patrón con concentraciones conocidas de BSA, se obtuvo la ecuación de la recta de regresión lineal y se interpolaron los valores de absorbancia de las concentraciones a determinar (Bradford 1976).

- Tinción con azul de Coomassie. Se utilizó una solución colorante (0,1 % Coomassie R-250, 10 % ácido acético y 40 % etanol en agua) para visualizar las bandas de proteína en los geles de electroforesis SDS-PAGE y Nativo-PAGE. Los geles se tiñeron durante 10 min y se destiñeron con una solución 10 % ácido acético glacial y 10 % metanol en agua.

5 Expresión y purificación de proteínas.

Las proteínas producidas en este estudio al ser susceptibles de modificaciones post-traduccionales y requerir una correcta formación de puentes disulfuro en su proceso de plegamiento, se expresaron en sistemas celulares eucariotas.

5.1 Expresión en células de mamífero.

La expresión de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ inicialmente se abordó en células de riñón embrionario (HEK 293). Para ello se utilizaron cultivos de estas células crecidas en placas de 150 mm con medio D-MEM (Dabelcos) suplementado con glutamina (2 mM) (Sigma Aldrich,). Se escalaron los cultivos hasta un total de 60 placas confluyentes y, a continuación, se indujo la expresión con medio D-MEM F12. Tras realizar cuatro cambios del medio de cultivo (uno por día) se recuperó la proteína a partir del medio de cultivo, previamente centrifugado a 8.000 x g 20 minutos y filtrado a través de filtros con poro de

0,45 μm . Posteriormente, la proteína se purificó por afinidad en una columna empaquetada con resina M2 anti-FLAG affinity gel (SIGMA), tal como está descrito en el punto 3.3.1.

El rendimiento con este sistema de expresión resultó ser escaso para los objetivos que perseguíamos, ya que en una purificación estándar (4 litros de medio de cultivo recuperados a partir de 60 placas de 150 mm) se obtenía ~ 800 μg de proteína.

5.2 Expresión en células de insecto.

Anticipamos que este sistema resultó ser adecuado al permitir que ocurran modificaciones post-traduccionales propias de sistemas eucariotas, si son requeridas, y proporcionar un satisfactorio rendimiento en la expresión.

El método consiste en la expresión de la proteína bajo la acción del promotor de la polihedrina (PH), que es la proteína mayoritaria en la cápside vírica. El vector pFastBac Dual incorpora, además, el promotor PD10, ya que contiene dos sitios de expresión. El proceso se inicia con el clonado de la secuencia de interés en un vector puente (pFastBac 1, pFastBac DUAL, etc.) que posee dos marcadores antibióticos de selección y un sitio de transposición. En un segundo paso, la proteína de interés se transpone en el genoma del vector lanzadera con capacidad infectiva (Bacmid) que se usará posteriormente para transfectar las células de ovario de insecto (SF9, Invitrogen). Con el virus resultante de la transfección se volverá a infectar células SF9 dando lugar a la amplificación del stock vírico, a partir del cual, se realizarán infecciones a mayor escala para la producción de la proteína, (Figura 20).

Para optimizar el procedimiento, debe testarse la expresión de la proteína a diferentes intervalos de la infección para seleccionar la fase de mayor y mejor expresión, así como

el índice MOI (“multiplicity of infection”) o ratio virus/células que varía en función de la proteína que se va a expresar. Realizamos una batería de infecciones con diferentes MOI (0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5 y 4) y se monitorizó la expresión de la proteína a distintos tiempos de infección mediante SDS-PAGE.

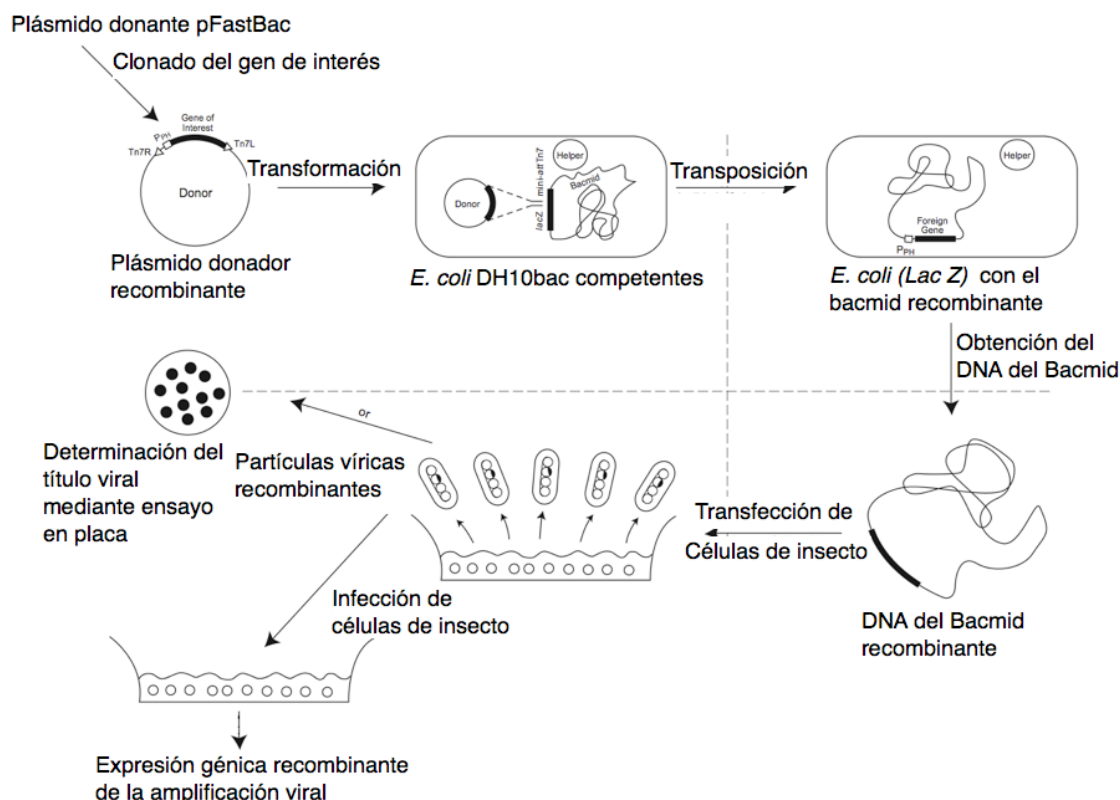


Figura 20. Esquema del proceso de expresión de proteínas en el sistema de células de insecto.

Tomado y modificado del manual Bac-To-Bac (Life Technologies).

La infección estándar se realizó en matraces ventilados de 500 ml de capacidad (Corning), con un volumen de 200 ml (lo que permite una correcta oxigenación) de cultivo de células sf9 a una densidad de $1,5 \times 10^6$ células/ml. Las células se infectaron con un MOI de 2 y se incubaron a 27,5 °C en agitación orbital (110 rpm) durante 72 hrs. El cultivo se centrifugó a 500 x g durante 10 minutos a 4 °C para eliminar las células (la proteína se exporta al medio por la acción del péptido señal BM40) y el sobrenadante,

previamente a la inmunopurificación con la resina FLAG, se ultracentrifugó a 100.000 x g durante una hora a 4 °C para eliminar tanto restos de origen celular, como el virus presente. La purificación se realizó por afinidad mediante el uso de la resina anti-FLAG tal como hemos descrito anteriormente, (Figura 21).

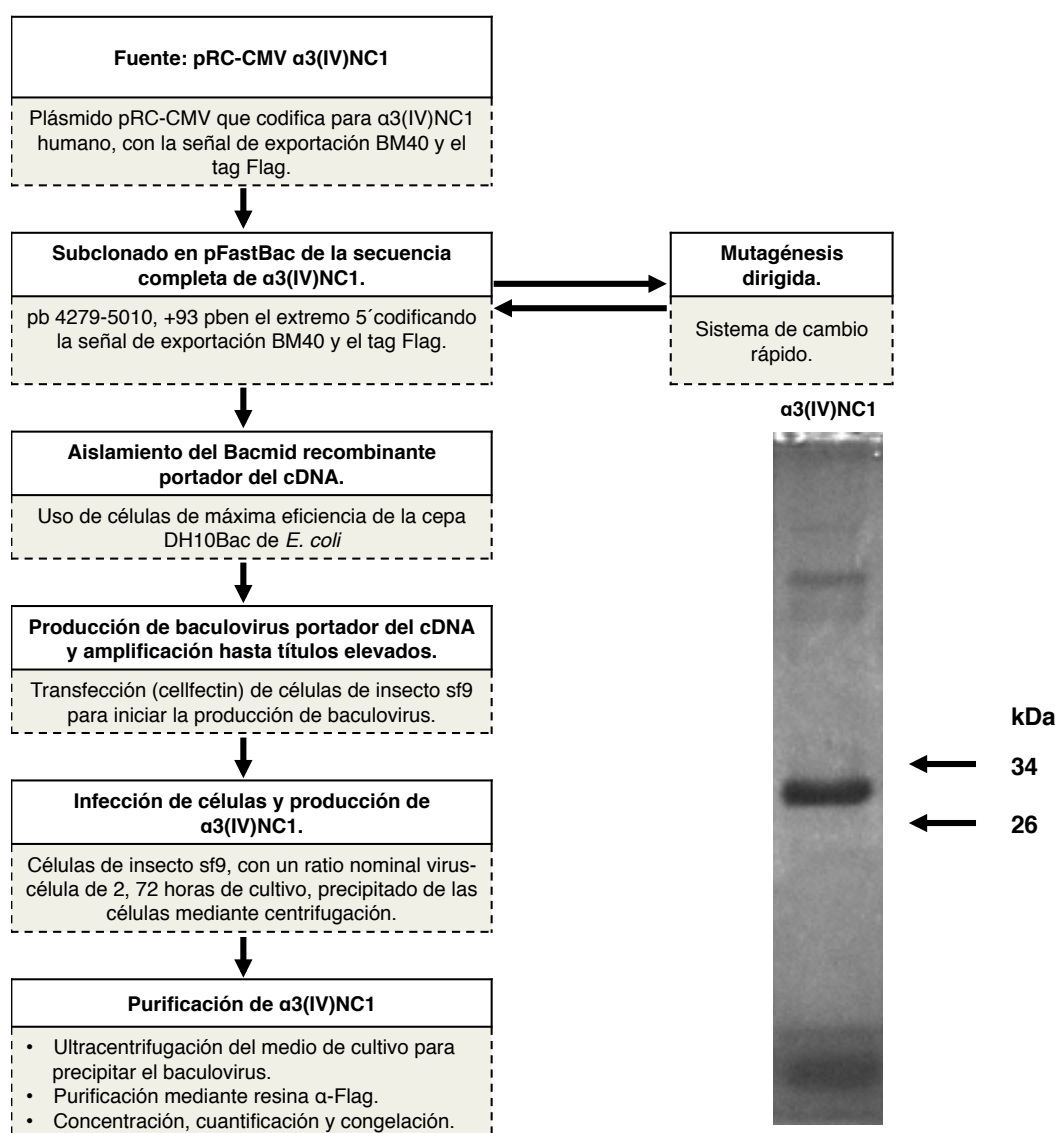


Figura 21. Diagrama en el que se esquematizan los pasos para la producción de α3(IV)NC1 humana recombinante.

El gel (SDS-PAGE, 12 % poliacrilamida) bajo condiciones reductoras corresponde al proceso de purificación a partir del medio de cultivo. Las flechas indican la posición del marcador de pesos moleculares con su tamaño correspondiente indicado en kDa.

El rendimiento en este sistema de expresión osciló entre 1-3 μg de proteína exportada por cada mililitro de cultivo infectado, que resulta claramente superior (alrededor de un orden de magnitud) al obtenido en células de mamífero.

6 Phage display.

Esta tecnología se basa en la capacidad infectiva del bacteriofago M13 sobre *E. coli*, que a través de la proteína de superficie pIII es capaz de unirse al pilus bacteriano e inyectar su genoma en el interior celular donde seguirá la vía lisogénica. Existen cinco copias de la proteína pIII en uno de los extremos del bacteriofago, siendo posible modificarlas para que expresen una molécula de interés sin que el bacteriofago pierda capacidad infectiva. Con esta técnica se puede expresar una gran variedad de moléculas y exponerlas en la superficie del bacteriofago para luego seleccionar aquellas con capacidad de reaccionar con una molécula por la que manifieste afinidad. Tras la formación del complejo entre la molécula de interés expuesta por el fago y la diana específica se eliminan los bacteriofagos no reactivos mediante un proceso de lavado, quedando los fagos de interés adheridos a la molécula diana. Posteriormente se eluyen los bacteriofagos adheridos mediante el uso de soluciones ácidas que debilitan las interacciones molécula de interés-bacteriofago. Con los bacteriofagos recuperados se infectan células de *E. coli* para amplificar aquellos clones que reconocen la molécula diana. Tras varias rondas de selección y con un aumento de la astringencia en los procesos de lavado, se obtiene una mezcla de bacteriofagos enriquecida en clones específicos que reconocen la molécula diana, (Figura 22).

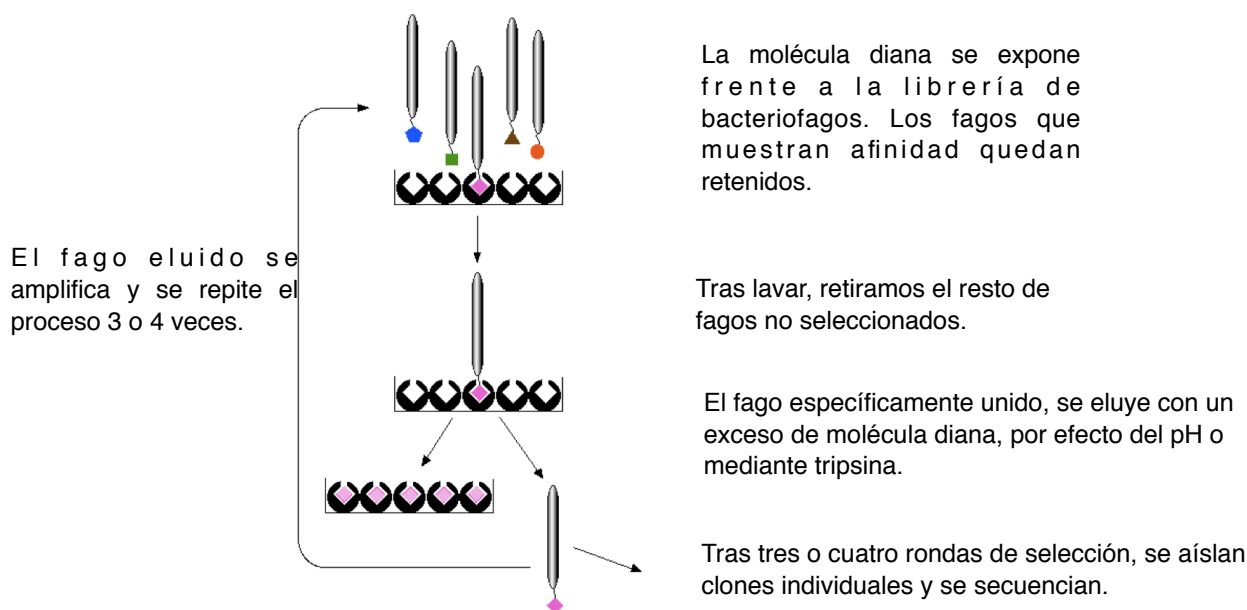


Figura 22. Esquema del proceso de selección o “panning”.

Modificado del manual Ph.D.TM Phage display libraries (New England Biolabs).

6.1 Librerías peptídicas para la determinación de epítomos.

Hemos utilizado dos librerías comerciales (New England Biolabs (Beverly, MA) tipo phage display de péptidos combinatoriales para el estudio de los epítomos de los anticuerpos circulantes Goodpasture (GPc) y del anticuerpo monoclonal mAb 3. Las librerías, con una complejidad de secuencia mayor de 2×10^8 componentes, están constituidas por péptidos de 12 o de 7 aminoácidos, estos últimos constreñidos por un puente disulfuro formado entre las dos cisteínas situadas en los extremos del péptido. Se han utilizado dos librerías distintas para incrementar las posibilidades de reconocimiento de los anticuerpos por péptidos con conformaciones diferentes.

Ambas librerías se escrutaron en paralelo frente a los anticuerpos inmovilizados en placas de 96 pocillos (Maxisorb, Roskilde, Denmark). Para tal fin, se tapizaron dos pocillos (uno por librería) con una solución de $1 \mu\text{g}$ de anticuerpo en PBS a 4°C durante toda la noche y con agitación orbital (50 rpm). Tras retirar el exceso de anticuerpo, se bloquearon los pocillos con una solución de PBS/BSA al 1 % durante una hora. Posteriormente se añadieron 2×10^{11} fagos en PBS y la mezcla se dejó en agitación

orbital durante una hora. Finalmente, tras realizar los lavados adecuados con PBS tween 20, se eluyó el fago retenido mediante competición con la proteína $\alpha 3(IV)NC1$ (0,1 mg/ml en PBS) y se usaron estos fagos para infectar células de *E. coli* Er₂₇₃₈ (F' proA+B+ lacIq $\Delta(lacZ)M15$ zff::Tn10 (Tet^R)/fhuA2 glnV thi $\Delta(lac-proAB)$ $\Delta(hsdMS-mcrB)5$ (rk- mk- McrBC-)). Se titularon los fagos obtenidos y se amplificaron para las sucesivas rondas. Se realizaron tres rondas de selección o "panning", con una astringencia de lavado superior en cada ronda (se incremento el porcentaje de Tween 20 en 0,1 % cada vez desde el 0,1 % al 0,5 % y se aumentó el número de lavados de 10 a 20 en la segunda y tercera ronda). Finalmente, en la última ronda de selección, se seleccionaron 10 colonias de cada librería y se analizaron sus secuencias.

6.2 ELISA de fagos mono y policlonales.

La afinidad de los anticuerpos por el "pool" de péptidos seleccionados, se determinó mediante un ELISA de Fagos policlonales. Para ello, se tapizó durante toda la noche a 4 °C un pocillo de una microplaca de 96 pocillos con el anticuerpo a analizar a la misma concentración a la que se realizó el "panning" (1 μ g/ml). Los sucesivos pasos se realizaron a temperatura ambiente. Tras bloquear durante una hora con leche al 1 % en PBS, se añadió el fago resultante de las sucesivas rondas de amplificación, diluido 1/100 en PBST ($\sim 1 \times 10^{10}$ ufc/ml) y se dejó una hora en agitación orbital (250 rpm). Tras tres lavados consecutivos con PBST se añadió el anticuerpo anti-M13 conjugado con HRP a una dilución 1:5000 en solución de bloqueo y se incubó una hora. Se retiró el anticuerpo conjugado y la placa se lavó por tres veces con PBST y la HRP unida se reveló con o-fenilen-diamina (OPD) 1 mg/ml y H₂O₂ al 0,001 % en tampón citrato 1 M pH 5. El desarrollo de color se detuvo a los 10 minutos con 50 μ l de H₂SO₄ 2,5 M y se midió la absorbancia a 492 nm con un lector de placas Dynatech MR4000.

Para comprobar la afinidad de péptidos individuales, se realizó un ELISA de Fagos Monoclonales exactamente igual al ELISA Policlonal pero partiendo en este caso de colonias aisladas de fagos, que presentaban por tanto una única secuencia peptídica.

7 Modelado de proteínas.

El modelado informático del hexámero se ha llevado a cabo mediante el programa “Modeller” (<http://salilab.org/modeller>) que permite obtener un modelo tridimensional de la estructura de péptidos y/o proteínas por homología (Sali y Blundell 1993, Kumar y Carugo 2011). La dinámica de trabajo de este programa es el siguiente:

- Identificación de homólogos. Se trata del primer paso y del más crítico, consiste en encontrar un(os) homólogo(s) de estructura conocida de la proteína problema.

- Alineamiento de las secuencias. Es el proceso clave para construir un buen modelo. Las regiones alineadas (posibles moldes y problema) son consideradas por Modeller como equivalentes.

- Determinación de las restricciones. Las regiones alineadas del molde proporcionan un primer conjunto de restricciones que la secuencia modelo debe de respetar. Se añaden además muchas otras restricciones genéricas y otras propias de la proteína problema.

- Construcción del modelo. Para ello Modeller construye un modelo utilizando el molde que le hemos suministrado, en el que intentará superponer las regiones alineadas, evitar colisiones estéricas, respetar la estereoquímica del modelo y optimizar funciones estadísticas de situación de aminoácidos en el interior de las proteínas.

- Refinado y Validación. Para lo cual, Modeller realiza internamente una evaluación del modelo y señalará errores graves en el mismo. Mediante reiteración se logra encontrar un modelo que cumpla con nuestras expectativas y no incurra en violaciones graves de posibles restricciones.

El hexámero $(\alpha_{3,4,5(IV)})_2NC1$ se modeló sobre la estructura del hexámero cristalizado de placenta humana $((\alpha_1)_2(\alpha_2))_2(IV)NC1$ (PDB id:1t60) con el que presenta una elevada homología (ver Anexo II). Se realizaron más de cien modelos y finalmente se eligió el que presentaba menor dope score (índice estadístico de comparación atómica por pares). Se comprobó además, mediante diagramas de Ramachandran (Ramachandran y cols. 1963) que todas las interacciones intra-atómicas en el modelo fueran coherentes.

8 Predicción de epítomos.

La predicción de epítomos se realizó mediante el algoritmo informático Pepsurf (<http://pepitope.tau.ac.il/sources.html>). El procedimiento utilizado por pepsurf se inicia con la identificación de aquellos residuos que se encuentran en la superficie del antígeno y son por tanto accesibles a los anticuerpos. Con esta información, Pepsurf traza una superficie gráfica figurada a la que se va a alinear los residuos presentes en cada uno de los péptidos seleccionados por phage display, de tal forma que se obtiene una serie de residuos candidatos a dicho epítomo organizados por grupos o clusters (Mayrose y cols. 2007).

Pepsurf se utilizó para predecir el epítomo de los anticuerpos GPc y mAb 3. Para realizar esta predicciones, además del algoritmo se utilizaron las librerías peptídicas

combinatorias de 7 y 12 aminoácidos (NEB), así como el modelo de hexámero ($\alpha_{3,4,5(IV)}_2NC1$) generado por modeller.

9 Resonancia de plasmón de superficie (SPR).

La resonancia de plasmón de superficie (Surface Plasmon Resonance) es una técnica utilizada para caracterizar los parámetros de afinidad existentes entre dos moléculas que interaccionan entre ellas.

En este estudio se ha utilizado el equipo Biacore T100 (GE healthcare) (Figura 23A), junto con una serie de chips en los que se ha inmovilizado una de las proteínas, actuando ésta como “ligando”. La proteína, queda entonces inmovilizada de forma covalente mediante una reacción en la que los grupos amino de la proteína forman un enlace covalente con grupos carboxilo presentes en una matriz de dextrano ubicada sobre una delgada capa de oro que recubre una lámina de vidrio presente en el chip. El chip se excita con una longitud de onda y un ángulo fijo, de tal forma que la luz incidente excita los plasmones (ondas de densidad de carga electrónica) en la lámina de oro; cambios en la concentración de la proteína en solución o “analito” sobre la superficie del chip traerán asociados cambios en el ángulo del índice de refracción (monitorizados mediante un detector y medido en unidades de resonancia o RU, con valor proporcional a la cantidad de analito en la superficie del chip) (Figura 23B). El analito se encuentra en solución y accede al ligando a través de unos canales formados sobre el propio chip al superponerse sobre la microfluídica del equipo, de tal forma que tenemos cuatro canales que funcionan en paralelo sobre la superficie del chip en la que se encuentra el ligando.

Como resultado, podemos comprobar en tiempo real y con proteínas en solución, si se produce o no interacción entre ellas así como las propiedades de estas interacciones (Figura 23C). La elección de la proteína que va a actuar como ligando depende, en principio, de la relación existente entre los pesos moleculares de ambas proteínas y, una

vez elegido el ligando, se determina la cantidad de ligando a inmovilizar que es función de la máxima señal (Rmax) que esperamos obtener y que podemos cuantificar por la fórmula:

$$R_{max} = \frac{\text{Peso molecular Analito}}{\text{Peso molecular Ligando}} \times \text{Ligando inmovilizado} \times \text{Estequiometría}$$

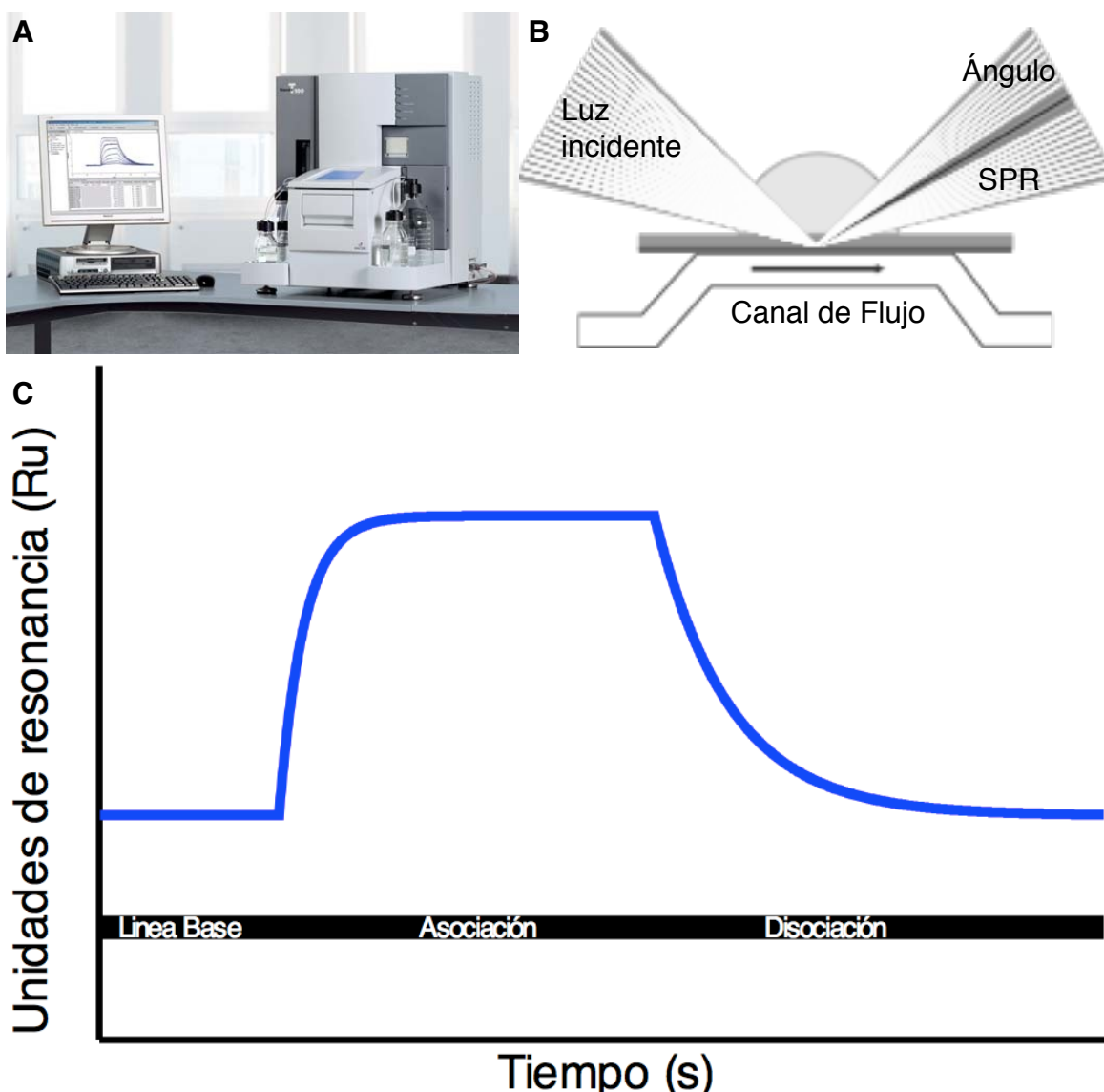


Figura 23. Resonancia de Plasmón de Superficie (SPR).

A) Los experimentos se llevaron a cabo en un Biacore T100 (GE Healthcare). **B)** El principio utilizado consiste en la monitorización de cambios en el ángulo del índice de refracción como consecuencia de la interacción entre dos moléculas. **C)** Los sensorgramas o curvas de interacción típicas presentan una fase de asociación o formación del complejo entre las dos moléculas y una de disociación o separación del complejo. **A y B** Modificados de SensorSurface Handbook (GE Healthcare).

Finalmente, se debe elegir: **a)** el tampón adecuado para analizar el complejo; **b)** la solución de regeneración para recuperar las condiciones iniciales (generalmente, un ácido o una base capaz de romper las interacciones entre ligando y analito y eliminar el analito que pudiese quedar unido al chip tras el experimento); **c)** el flujo al que se realizará el experimento (determinado en esencia por la afinidad de las proteínas y que, en ocasiones puede verse condicionado por la disponibilidad de analito); **d)** los tiempos de asociación y disociación de las proteínas; y finalmente **e)** la temperatura del experimento.

Como resultado del análisis por Resonancia de Plasmon de Superficie, se puede estimar la constante de afinidad de la interacción proteína-proteína (KD), así como los parámetros cinéticos de la misma (K_{on} y K_{off}); y además, si el mismo experimento se lleva a cabo a diferentes temperaturas, se pueden estimar los parámetros termodinámicos (ΔG (Energía libre de Gibbs) = ΔH (Entalpía) – $T \cdot \Delta S$ (Entropía) que caracterizan la reacción.

9.1 Análisis cinético de la interacción antígeno-anticuerpo.

Se estimó la afinidad de mAb 3 y de los anticuerpos GPc por los diferentes $\alpha(IV)NC1$, así como frente a los mutantes generados en base a las predicciones obtenidas por phage display. Se inmovilizaron 300 RU de anticuerpo en un chip CM5 (GE healthcare) mediante el asistente de inmovilización del equipo y el método de inmovilización basado en los grupos amino. En el proceso se forma un enlace covalente entre los grupos amino libres de los anticuerpos y los grupos carboxilo existentes en los extremos de las moléculas de dextrano de la matriz del chip. Los anticuerpos (1 $\mu g/ml$) en solución tampón acetato sódico 10 mM pH 5 se inyectaron sobre la superficie del chip previamente activado con una mezcla equimolar de EDC-NHS (1-etil-3-(3-

dimetilaminopropil)carbodiimida-N-hidroxisuccinimida) hasta alcanzar el nivel de inmovilización adecuado. Por último, se bloquearon los grupos amino reactivos mediante etanolamina 1 M.

Los experimentos se realizaron a 37 °C en el tampón HBS-EP⁺ (Hepes 10 mM pH 7,4, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA y 0,05 % surfactante P20 (GE Healthcare)). Se diluyeron los analitos en el tampón HBS-EP⁺ a diferentes concentraciones (50, 100, 150, 200 y 250 nM), se introdujeron tres blancos (sin proteína) entre las muestras y se duplicó la concentración de 100 nM como control. El flujo de trabajo se fijó en 100 µl/min, con un tiempo de contacto de 60 s seguido de un tiempo de disociación de 1000 s. Tras cada ciclo, la superficie del chip se regeneró con una inyección de 20 mM NaOH durante 45 s. Todos los datos se procesaron con el software BIAevaluation 2.0 (GE Healthcare).

9.2 Análisis termodinámico de la interacción antígeno-anticuerpo.

Para caracterizar los parámetros termodinámicos de la interacción se realizaron estudios cinéticos, tal como están descritos en el apartado anterior, pero a diferentes temperaturas. Se repitió el mismo ensayo a 27, 32 y 37 °C y con los datos obtenidos, el equipo nos permite estimar las variables ΔH y ΔS , así como la ΔG de las interacciones antígeno anticuerpo. Estos parámetros termodinámicos pusieron de manifiesto diferencias en la reactividad de mAb 3 frente a $\alpha 3(IV)NC1$ y $\alpha 3(IV)NC1$ co-expresada con GPBP-1.

9.3 Análisis cinético de la interacción $\alpha(IV)NC1$ - $\alpha(IV)NC1$.

El proceso de oligomerización y formación del protómero a través de la interacción entre los $\alpha(IV)NC1$ es un proceso variable del que, hasta el momento, únicamente sólo se han descrito tres tipos de protómeros. Para verificar estas premisas, se realizó un estudio de la capacidad de interacción existente entre los $\alpha(IV)NC1$. Para ello, se

siguieron los mismos pasos descritos en las interacciones antígeno-anticuerpo con ciertas variaciones a nivel experimental.

Los experimentos se realizaron a 25 °C en el tampón TBS-P⁺ (10 mM Tris pH 7,4, 50 mM NaCl y 0,05 % surfactante P20 (GE Healthcare)). Se diluyeron los analitos en el tampón TBS-P⁺ a diferentes concentraciones (0,25, 0,5, 1, 2 y 4 µM), se introdujeron tres blancos (sin proteína) entre las muestras y se duplicó la concentración de 0,5 µM como control. El flujo de trabajo se fijó en 5 µl/min, con un tiempo de contacto de 300 s seguido de un tiempo de disociación de 300 s. Tras cada ciclo, la superficie del chip se regeneró con una inyección de 20 mM NaOH durante 15 s a un flujo de 10 µl/min.

Todos los datos fueron procesados con el software BIAevaluation 2.0 (GE Healthcare).

10 Ensayos de cristalización y resolución de las estructuras cristalinas mediante difracción de rayos X.

(Llevados a cabo en la unidad de cristalografía de macromoléculas del Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC).

10.1 Cristalización de proteínas.

Las proteínas se cristalizaron mediante el método de difusión de vapor de la gota sentada en placas Greiner CrystalQuick de 96 pocillos y el kit Research Crystal Screen HT (Hampton Research, Aliso Viejo, CA). Las gotas de cristalización se prepararon mezclando 0,4 µl de cada proteína (7,4 mg/ml en tampón TBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,4)) con 0,4 µl de la mezcla de cristalización.

Los cristales de $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ se obtuvieron en una solución de sulfato de litio 1,4 M y Mes 0,1 M pH 6,5. Los cristales de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ crecieron en PEG3350 16 %, Mes 0,1 M pH 6,5.

BisTrisPropano pH 7,5 y MgCl_2 0,2 M (en el caso de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, el incremento de la concentración de NaCl hasta 500 mM en el tampón de conservación mejoró sustancialmente la calidad de los cristales). $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ cristalizó en una solución de PEG3350 6 %, acetato sódico 0,2 M y Mes 0,1 M pH 6,5 y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ lo hizo en PEG8000 20 %, NaCl 0,2 M, CAPS pH 10,5. Se obtuvieron complejos cristalinos de $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$ y de $(\alpha 5,6,6)_2(\text{IV})\text{NC1}$ en PEG8000 10 %, acetato magnésico 0,2 M y en PEG8000 20 %, MgCl_2 0,2 M y Tris pH 8,5 respectivamente.

10.2 Solución crioprotectora.

Para evitar la formación de hielo cristalino durante la congelación de los cristales mediante nitrógeno líquido, se empleó una disolución crioprotectora. Los cristales de $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ se criopreservaron mediante inmersión rápida en una disolución compuesta por la disolución madre más sacarosa 15 % y etilenglicol 7,5 %. Para la criopreservación de los cristales de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ y $(\alpha 5,6,6)_2(\text{IV})\text{NC1}$ se utilizó un 40 % de PEG3350 ($\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$) o PEG8000 ($\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$, $(\alpha 5,6,6)_2(\text{IV})\text{NC1}$). En el caso de los cristales de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$, la criopreservación se obtuvo con un primer lavado de los cristales en PEG3350 20 % para posteriormente llegar a un porcentaje del 40 %. Por último los cristales de $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$ se criopreservaron con una solución de PEG 8000 20 % y sacarosa 20 %.

10.3 Difracción de rayos X de los cristales $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$.

(El estudio estructural de los cristales $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ ha sido realizado esencialmente por la Dra. Patricia Casino bajo la dirección del Dr. Alberto Marina del IBV, CSIC).

La difracción de los cristales de los $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ se realizó en el sincrotrón ESRF (Grenoble, Francia). Se recogieron datos de difracción a diferentes resoluciones; $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ (1,8 Å en ID23-2), $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (2,7 Å en ID23-1), $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ (2,6 Å en ID23-1),

$\alpha_5(\text{IV})\text{NC1}$ (1,85 Å en ID-14-1), $((\alpha_1)_2(\alpha_2))_2(\text{IV})\text{NC1}$ (2,82 Å en ID29) y $(\alpha_5,6,6)_2(\text{IV})\text{NC1}$ (2,85 Å en ID23-2).

10.4 Determinación de la estructura y refinamiento.

Los datos cristalográficos se procesaron y escalaron mediante los programas informáticos MOSFLM y SCALA, incluidos en la suite informática CCP4 (Collaborative Computational Project 1994), o bien mediante el software XDS.

Los cristales de $\alpha_1(\text{IV})\text{NC1}$ pertenecieron al grupo espacial ortorrómbico $P2_12_12_1$ con parámetros de la celda unidad $a=94,85$ Å, $b=127,05$ Å, $c=130,54$ Å y $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$; los cristales de $\alpha_3(\text{IV})\text{NC1}$ pertenecieron al grupo espacial hexagonal $H3$ con parámetros de la celda unidad $a=b=131,52$ Å, $c=248,86$ Å y $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$; los cristales de $\alpha_4(\text{IV})\text{NC1}$ pertenecieron al grupo espacial ortorrómbico $C222_1$ con parámetros de la celda unidad $a=145,58$ Å, $b=167,56$ Å, $c=155,41$ Å y $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$; los cristales de $\alpha_5(\text{IV})\text{NC1}$ pertenecieron al grupo espacial cúbico $P4_132$ con parámetros de la celda unidad $a=b=c=121,28$ Å y $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$; los cristales de $((\alpha_1)_2(\alpha_2))_2(\text{IV})\text{NC1}$ pertenecieron al grupo espacial trigonal $P3_121$ con parámetros de la celda unidad $a=b=126,15$ Å, $c=216,21$ Å y $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$ y finalmente, los cristales de $(\alpha_5,6,6)_2(\text{IV})\text{NC1}$ pertenecieron al grupo espacial ortorrómbico $C222_1$ con parámetros de la celda unidad $a=158,41$ Å, $b=178,39$ Å, $c=121,80$ Å y $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$.

Las estructuras de los diferentes $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ se determinaron mediante reemplazo molecular partiendo de la estructura de la molécula $\alpha_1(\text{IV})\text{NC1}$ de placenta humana (PDB id: 1T60) utilizando el programa Phaser (CCP4, 1994). Los modelos finales se obtuvieron mediante la reiteración de ciclos de refinado realizados con el programa Refmac5 (Collaborative Computational Project 1994) y construcción manual realizada mediante el programa Coot (Emsley y Cowtan 2004). El análisis de los datos cristalográficos obtenidos para $\alpha_3(\text{IV})\text{NC1}$ y $((\alpha_1)_2(\alpha_2))_2(\text{IV})\text{NC1}$ mediante el programa Scala puso de manifiesto un porcentaje de twinning del 40 % y 39 % respectivamente, por lo que se les aplicó un refinado para dicho twinning implementado de manera

específica en el programa Refmac5. Los detalles del proceso de refinado se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros del proceso de refinado de los cristales obtenidos. Los valores entre paréntesis corresponden a los datos para la celda de mayor resolución. Rfree es el Rfactor calculado con un 5 % del total de las reflexiones únicas escogidas al azar y omitidas en el refinamiento.

Datos Procesados	$\alpha 1(IV)NC1$	$\alpha 3(IV)NC1$	$\alpha 4(IV)NC1$	$\alpha 5(IV)NC1$	$((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(IV)NC1$	$(\alpha 5,6,6)_2(IV)NC1$
Línea ESRF	ID23-2	ID23-1	ID23-1	ID14-1	ID29	ID23-2
Longitud onda (Å)	0,87	1,00	1,00	0,98	1,25	0,87
Resolución (Å)	57,12-1,80 (1,9-1,8)	65,76-2,70 (2,85-2,70)	49,44-2,80 (2,95-2,80)	60,63-1,85 (1,95-1,85)	48,75-2,82 (2,97-2,82)	84,92-2,85 (3,00-2,85)
Rmerge (%)	7,6 (38,8)	8,4 (26,4)	7,9 (33,6)	10 (35,4)	9,2 (36,7)	10,1 (34,2)
Rpim (%)	4,8 (24,8)	6,9 (22,3)	3,2 (13,1)	4,9 (17,4)	4 (16,6)	6,4 (22,2)
Media I/ δ (I)	10,7 (2,8)	11,2 (4,9)	14,6 (5,6)	12,1 (4,1)	12,7 (3,6)	10,4 (3,7)
Nº reflexiones (observadas/únicas)	479.345/142.960 (68.684/20.928)	96.546/43.361 (12.599/6.111)	341.405/46.979 (51.123/6.783)	125.648/26.393 (18.482/3.812)	258.124/48.121 (36.709/6.976)	137.258/40.033 (19.915/5.798)
Complejidad (%)	98,2 (99,0)	98,4 (95,0)	99,9 (100)	99,3 (99,9)	98,9 (99,8)	99,0 (99,6)
Redundancia	3,4 (3,3)	2,2 (2,1)	7,3 (7,5)	4,8 (4,8)	5,4 (5,3)	3,4 (3,4)
Grupo espacial	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁	H3	C222 ₁	P4 ₁ 32	P3 ₁ 21	C222 ₁
Dimensiones de la celda (Å)	a=94,85 b=127,05 c=130,54	a=b=131,52 c=248,86	a=145,58 b=167,56 c=155,41	a=b=c=121,2 8	a=b=126,15 c=216,21	a=158,41 b=178,39 c=121,80
Ángulos (°)	$\alpha=\beta=\gamma=90$	$\alpha=\beta=90$ $\gamma=120$	$\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$	$\alpha=\beta=\gamma=90$	$\alpha=\beta=90$ $\gamma=120$	$\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$
Unidad asimétrica (nº de moléculas)	6	8	6	1	6	6
Datos refinados						
Rcrys (%)	18,3	16,6	23,2	18,8	16,6	19,8
Rfree (%)	20,8	18,9	28,0	20,7	18,9	24,2
Nº átomos:						
- Proteína	10.609	13.891	9.603	1.764	10.413	10.475
- Ligando/ión	70	0	0	24	0	6
- Agua	670	312	72	115	171	139
B-factors (Å ²)						
- Proteína	17,9	29,5	56,9	12,39	63,9	33,3
- Ligando/ión	25,9	0	0	17,8	0	36,1
- Agua	25,5	35,8	48,7	18,3	51,8	24,5
Desviaciones r.m.s						
- Longitud enlace (Å)	0,008	0,008	0,009	0,007	0,005	0,006
- Ángulos enlace (°)	1,30	1,14	1,33	1,09	0,81	1,06
Gráficos de Ramachandran:						
- Favorables (%)	97,6	97,7	94,7	97,8	96	96,2
- Permitidos (%)	2,4	2,3	5,4	2,2	3,8	3,7
- No permitidas (%)	0,0	0,0	0,0	0,0	0,1	0,1

Resultados y desarrollo argumental.

1 Caracterización del epítopo.

La diana de los autoanticuerpos patogénicos anti-membrana basal en la enfermedad de Goodpasture se identificó como el dominio no colagenoso de la cadena $\alpha 3$ del colágeno tipo IV ($\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$) (Saus y cols. 1988). Esta molécula pertenece a una familia de proteínas formada por seis componentes ($\alpha 1$ - $\alpha 6(\text{IV})$) en la que las diferentes cadenas se agrupan en base a sus características en un grupo similar a $\alpha 1$ ($\alpha 1, \alpha 3$ y $\alpha 5(\text{IV})$) y en otro grupo similar a $\alpha 2$ ($\alpha 2, \alpha 4$ y $\alpha 6(\text{IV})$) (Hudson y cols. 1993)

Mediante el uso de tecnología phage display, librerías peptídicas de 7 y 12 aminoácidos y los anticuerpos circulantes de paciente (GPc) y el monoclonal mAb 3 hemos identificado nuevos residuos implicados en el epítopo de los autoanticuerpos. Como resultado de este proceso se obtuvieron una serie de péptidos que mimetizaban el epítopo de los anticuerpos analizados y de los que se pudo extraer la información estructural presente en los propios autoanticuerpos, inaccesible mediante aproximaciones previas. Las predicciones realizadas por phage display se comprobaron mediante ensayos de reactividad de los propios anticuerpos frente a mutantes generados en base a dichas predicciones. El proceso de mutagénesis se realizó sobre $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$ que presenta el mismo esqueleto que el resto de dominios NC1, pero además, al incluirse en otro subgrupo (el similar a $\alpha 2(\text{IV})$) nos permitió comprobar la reactividad de residuos que son comunes en $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ pero difieren en $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$. Estos residuos, habían pasado inadvertidos hasta el momento debido al diseño experimental utilizado previamente.

1.1 Epítopo mAb 3.

mAb 3 es un anticuerpo monoclonal murino que se caracteriza por competir con los autoanticuerpos de paciente. Su epítopo se mapeó utilizando la misma técnica de

construcción de quimeras utilizada en el análisis del epítopo para los anticuerpos GPc, identificándose como parte de su epítopo los residuos Ser₂₁, Pro₂₈ y Ser₃₁, así como otros residuos indeterminados en la región E_B (David y cols. 2001). Estos hallazgos convierten a mAb 3 en una herramienta apropiada para comprobar la validez de nuestra aproximación experimental sin comprometer los difícilmente accesibles y limitados anticuerpos GPc.

1.1.1 Péptidos obtenidos.

La **Tabla 2** muestra el título de los fagos obtenidos tras someter mAb 3 a ensayos de “panning” frente a las librerías phage display de 7 y 12 aminoácidos.

Tabla 2. Título, en ufc/ml, de los bacteriofagos recuperados tras el “panning” de mAb 3 frente a las librerías peptídicas de 7 (constreñida con dos cisteínas) y 12 aminoácidos, así como del resultado de amplificar los bacteriofagos seleccionados.

Librería	1ª Ronda		2ª Ronda		3ª Ronda	
	c7c	12	c7c	12	c7c	12
Título fagos	9,4x10 ⁴	1,28x10 ⁵	3,8x10 ⁵	1x10 ⁷	1,1x10 ⁶	6x10 ⁷
Amplificación	2,1x10 ¹³	6x10 ¹²	7x10 ¹²	4x10 ¹²	No se amplifica.	

El incremento en el número de fagos recuperados conforme se van realizando las rondas de “panning” indica el enriquecimiento de la población de fagos con péptidos específicos para mAb 3.

Tras la última ronda de selección se secuenciaron 10 clones de fagos de cada librería y su resultado se detalla en la Figura 24. Del total de secuencias obtenidas, la secuencia CTWTISRHC se repitió tres veces y las secuencias HGWLYPHPRYPV y APWHLSSQYSRT 4 y 2 veces respectivamente.

mAb3_c7c_01	CTWTISRHC	9	mAb3_12_02	HGWLYPHPRY	- - - - PV	12
mAb3_c7c_06	CTWTISRHC	9	mAb3_12_04	HGWLYPHPRY	- - - - PV	12
mAb3_c7c_05	CTWTISRHC	9	mAb3_12_07	HGWLYPHPRY	- - - - PV	12
mAb3_c7c_09	CVPILRDAC	9	mAb3_12_08	HGWLYPHPRY	- - - - PV	12
mAb3_c7c_10	CVPQWNIRC	9	mAb3_12_09	- SHLYPKTDY	- - - - ILS	12
mAb3_c7c_07	CGPMWVFP	9	mAb3_12_01	- APWHLSSQY	- - SR - - T	12
mAb3_c7c_04	CTQSPHALC	9	mAb3_12_06	- APWHLSSQY	- - SR - - T	12
mAb3_c7c_02	CISSYAQSC	9	mAb3_12_05	SAPGHLSSQY	- - SR - - -	12
mAb3_c7c_08	CHSLQDPLC	9	mAb3_12_03	A - - - H L S P K H	H L K N - - L	12
mAb3_c7c_03	CRIGDHPAC	9	mAb3_12_10	I D T F Y M S T M S	H - - - - - S	12

Figura 24. Alineamiento tipo clustalW de los péptidos específicos de los clones de fagos seleccionados por mAb 3 a partir de las librerías de siete (izquierda) y doce (derecha) aminoácidos.

Los residuos se representan en código de una letra. El código de colores agrupa residuos con similares propiedades químico-físicas.

La aparición de secuencias repetidas se puede deber bien a la elevada afinidad del anticuerpo por dichos péptidos, o bien a que el fago presente ciertas ventajas durante la infección. Para diferenciar entre una y otra opción realizamos un ELISA de fagos monoclonales en el que la placa de microtest se había recubierto con mAb 3 pudiendo revelar así la afinidad de los péptidos.

Se dispone de una base de datos de péptidos seleccionados en experimentos de phage display (Huang y cols. 2012, Liu y cols. 2012) y se sabe que, a menos que se realice un adecuado bloqueo de la microplaca, pueden unirse a ella preferentemente ciertos fagos portando péptidos con secuencias ricas en residuos de triptófano que favorecen su interacción con la superficie plástica de la microplaca. En ninguno de nuestros experimentos de “panning” se seleccionaron fagos portadores de secuencias con afinidad por el plástico de la microplaca o por reactivos componentes del ensayo, como son los agentes de bloqueo.

1.1.2 Determinación de la afinidad de mAb 3 por los péptidos.

En el análisis de los péptidos mediante ELISA de los fagos monoclonales se observó que todos los péptidos seleccionados se unían a mAb 3 (Figura 25).

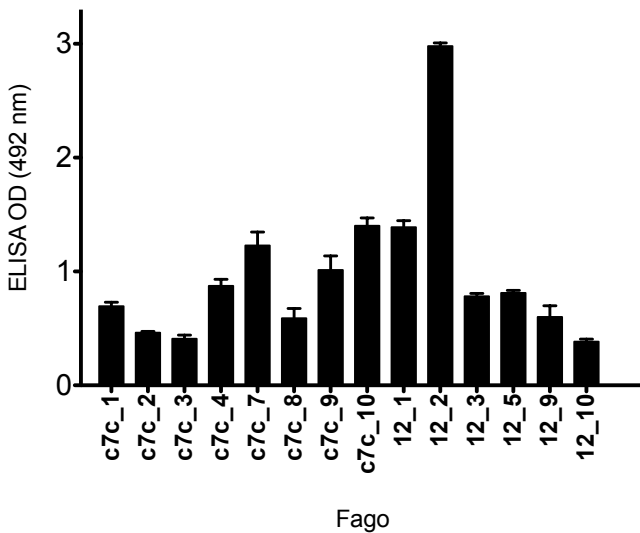


Figura 25. Reactividad en ELISA de los fagotopos seleccionados a partir de las dos librerías phage display frente a mAb 3.

Se representa la media y la desviación estándar del desarrollo de color (absorbancia en OD a λ de 492) para cada fagotopo de 3 ELISAs. La señal de fagos control no específicos fue del orden de decenas de mOD (no mostrado en la gráfica). La placa se tapizó con mAb 3 (1 $\mu\text{g/ml}$) y se añadieron del orden de 1×10^{10} ufc de bacteriofagos.

Ya que los fagos que exhibieron secuencias repetidas se unían fuertemente al anticuerpo mAb 3 en ELISA, la presencia de copias de dichas secuencias entre los clones seleccionados debería responder a su elevada afinidad por el mAb 3 y no a ventajas en el proceso de infección.

1.1.3 Predicción de epítomos mediante pepsurf.

Una vez conocida la secuencia de los péptidos seleccionados por mAb 3, se analizaron mediante el algoritmo informático del programa Pepsurf. Para ubicar dichos péptidos en la molécula, ante la carencia de estructura 3D para el heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$, utilizamos un modelo de este heterohexámero que generamos mediante el programa Modeller (ver Anexo II).

Se realizó la predicción del epítomo de mAb 3 usando como parámetros iniciales: Epitope mapping algorithm= Pepsurf; Protein structure= PDB del heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$ modelado en la presente tesis; Chain identifier= A (se utilizó tanto $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ como el heterohexámero completo, pero al obtenerse resultados similares, se

acotó la búsqueda a $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ para agilizar los cálculos informáticos), y las secuencias de los péptidos seleccionados mediante phage display mostrados en la Figura 24.

Pepsurf realiza una representación gráfica del heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$ en donde posteriormente buscará en la superficie de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ regiones con elevada similitud a los péptidos seleccionados por el anticuerpo mAb 3 (Mayrose y cols. 2007). Con este proceso de alineamiento, los péptidos seleccionados se ordenan respecto a los residuos del antígeno a través de su semejanza en el plegado (Mayrose y cols. 2007), proporcionando la posibilidad de identificar epítomos conformacionales en mAb 3. En la Figura 26 se muestra un ejemplo de los datos que proporciona Pepsurf para cada uno de los péptidos analizados.

```

*Alignment with highest score*
Alignment score: 14,7146 P-value: 0,00049876
peptide: IDTFYMSTMSHS
path: L84A P82A T81A Y180A Y181A S184A T143A F187A S186A Y185A S182A
Alignment:
IDTFYMSTMSHS
LPTY Y-STFSYS

```

Figura 26. Ejemplo de los datos proporcionados por Pepsurf para el péptido mAb 3_12_10.

Cada péptido analizado recibe una puntuación para su alineamiento en la superficie de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$. Ya que puede haber más de un región candidata, la región con un p-valor menor se considera la más idónea. Luego, cada aminoácido presente en el péptido seleccionado se asigna a un residuo presente en la superficie de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$. A partir del análisis de todos los residuos de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ revelados por los péptidos se determinan las zonas de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ con elevada probabilidad de participar en el epítomo de mAb 3.

La Figura 27 muestra, a partir del análisis de todos los péptidos seleccionados por mAb 3, un histograma de frecuencias en el que se representa el número de veces que cada residuo de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ aparece en las predicciones generadas por Pepsurf. El histograma pone de manifiesto que las predicciones alcanzadas por Pepsurf son compatibles con aquellas procedentes del uso de quimeras y mutagénesis dirigida (Netzer y cols. 1999, David y cols. 2001) además de añadir nueva información sobre el epítipo. La concordancia de resultados nos confirió seguridad en el uso de la metodología phage display para profundizar en el conocimiento del epítipo Goodpasture.

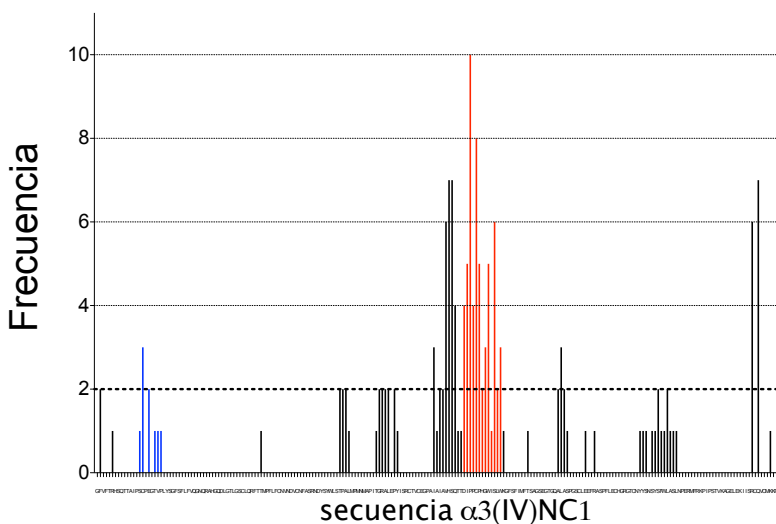


Figura 27. Histograma de frecuencias para aquellos residuos de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ candidatos a formar parte del epítipo de mAb 3. Predicciones generadas por Pepsurf usando los péptidos seleccionados por mAb 3 a partir de las dos librerías peptídicas phage display. Se representan las frecuencias de los residuos ubicados en la región EA (azul) y EB (rojo).

En la Figura 28 se visualizan los tres residuos identificados previamente usando mutagénesis dirigida como parte del epítipo de mAb 3 (representados con esferas en color azul y amarillo) y los nueve residuos predichos mediante phage display y Pepsurf para ese anticuerpo (representados con esferas en color amarillo y rojo). De los tres residuos Ser₂₁, Ser₃₁ y Pro₂₈ previamente identificados mediante mutagénesis dirigida (David y cols. 2001), dos de ellos, Ser₂₁ y Pro₂₈ (en amarillo en la figura), también han sido identificados mediante phage display. Además, los resultados obtenidos con el uso

de esta metodología permiten predecir la participación en el epítipo de mAb 3 de otros 7 residuos localizados en la región E_B (Asp₁₂₈, Ile₁₂₉, Pro₁₃₀, Pro₁₃₁, Cys₁₃₂, Pro₁₃₃ y Trp₁₃₆) de $\alpha 3(IV)NC1$ no identificados previamente. La implicación de la región E_B en el epítipo Goodpasture era conocida por la reactividad mostrada por los anticuerpos GPc y mAb 3 hacia las quimeras que albergaban dicha región (Netzer y cols. 1999).

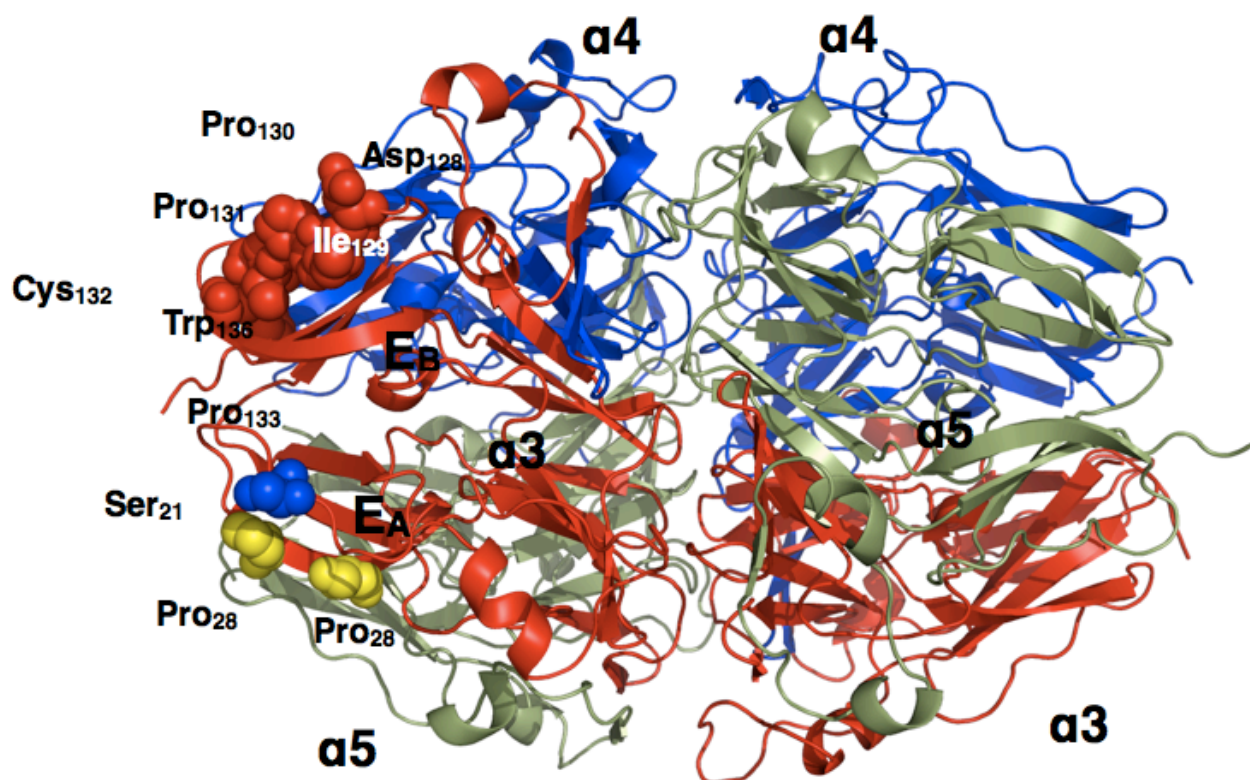


Figura 28. Predicción de residuos del epítipo de mAb 3 mediante mutagénesis dirigida y phage display-Pepsurf.

Representación en cinta del modelo de $(\alpha 3,4,5(IV))_2NC1$ y en esferas de los residuos predichos ser parte del epítipo de mAb 3 mediante ambas técnicas (amarillo), mutagénesis dirigida (azul) y phage display-Pepsurf (rojo).

Así, con el uso del anticuerpo mAb 3, que compite por el epítipo GP con los anticuerpos de paciente Goodpasture, pudimos comprobar que la combinación de las técnicas de phage display y predicción de epítipos mediante Pepsurf podía ser adecuada para proporcionar información válida sobre el epítipo de anticuerpos con un marcado carácter conformacional. Además, esta técnica presenta una ventaja inherente

frente a otras aproximaciones anteriores, pues la información sobre el epítipo se extrae directamente a partir de los anticuerpos. Es decir, los anticuerpos seleccionan aquellos péptidos que mimetizan el epítipo real del antígeno en base a sus características físico-químicas y estructurales y es, a partir de dichos péptidos, de donde se extrae la información del epítipo.

1.2 Epítipo anticuerpos GP circulantes.

Una vez comprobada con mAb 3 la posible idoneidad del binomio phage display-Pepsurf en la caracterización de un epítipo conformacional, utilizamos los anticuerpos circulantes de paciente.

1.2.1 Péptidos obtenidos.

La Tabla 3 detalla el título de los bacteriofagos recuperados tras exponer los anticuerpos GPc a tres rondas de “panning” utilizando las librerías peptídicas combinatoriales de 7 y 12 aminoácidos.

Tabla 3. Título, en ufc/ml, de los bacteriofagos recuperados tras el “panning” de los GPc frente a las librerías peptídicas de 7 (constreñidos por dos cisteínas) y 12 aminoácidos, así como del resultado de amplificar los bacteriofagos seleccionados.

	1ª Ronda		2ª Ronda		3ª Ronda	
Librería	c7c	12	c7c	12	c7c	12
Título fagos	1x10 ⁶	2x10 ⁶	6x10 ⁶	8x10 ⁶	1,2x10 ⁷	1x10 ⁷
Amplificación	2,3x10 ¹³	2,3x10 ¹²	1,5x10 ¹³	9x10 ¹²	No se amplifica.	

El incremento en el número de fagos recuperados conforme se van realizando las rondas de “panning” indica el enriquecimiento de la población de fagos portadores de péptidos que se unen a los anticuerpos GPc. Lógicamente el número de fagos recuperados con los GPc es sensiblemente mayor (entre 10 y 100 veces) que los fagos

recuperados en el “panning” con mAb3. Este hecho se fundamenta en la monoclonalidad de mAb 3 frente a los anticuerpos GPc que constituyen una población heterogénea de anticuerpos con diferentes epítomos (compartidos o no).

Tras la última ronda de selección se secuenciaron 20 clones de fagos de cada librería, cuyas secuencias se detallan en la Figura 29. El número de fagos secuenciados se incrementó respecto el caso de mAb 3, debido a la complejidad del epítomo a analizar. Se partía de una población de anticuerpos posiblemente heterogéneos purificados a partir de plasmaféresis de un paciente Goodpasture, cuyos GPc iban dirigidos contra la molécula de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$. La existencia de más de una región implicada en el epítomo (Borza y cols. 2000) exigía disponer de la mayor cantidad de información posible referente a dichos epítomos.

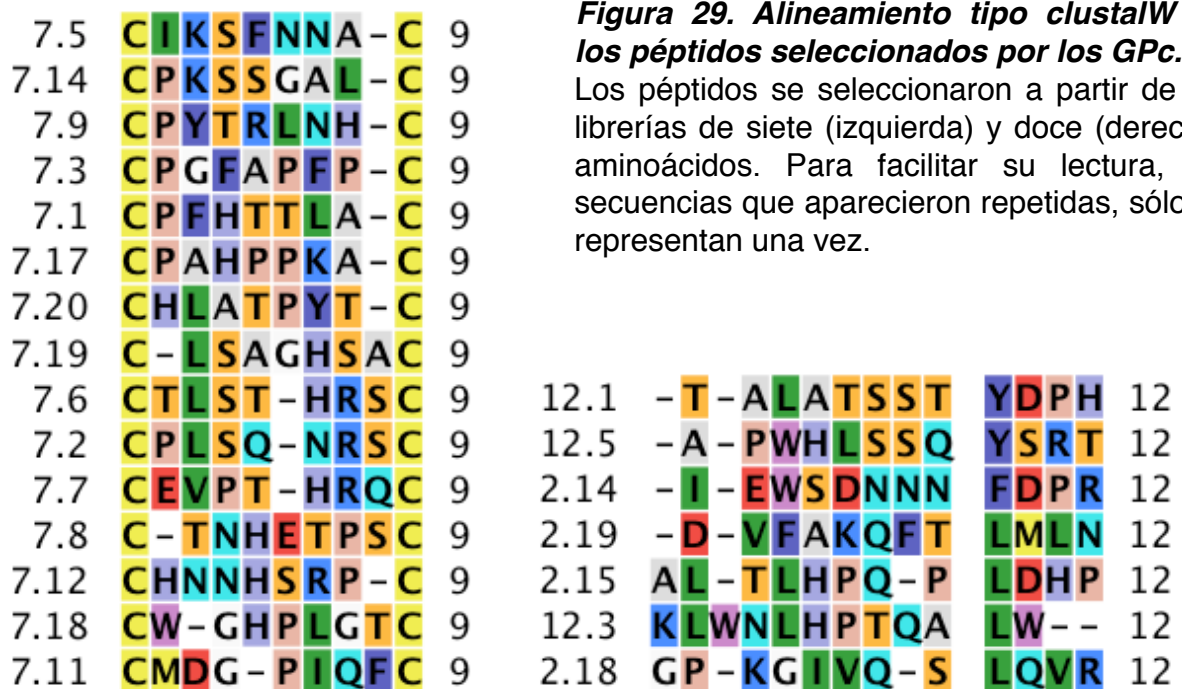


Figura 29. Alineamiento tipo clustalW de los péptidos seleccionados por los GPc.

Los péptidos se seleccionaron a partir de las librerías de siete (izquierda) y doce (derecha) aminoácidos. Para facilitar su lectura, las secuencias que aparecieron repetidas, sólo se representan una vez.

Del total de péptidos distintos obtenidos, la secuencia CIKSFNNAC apareció dos veces y CPGFAPFPC se repitió cuatro veces tras el uso de la librería de 7 aminoácidos y las secuencias TALATSSTYDPH y APWHLSSQYSRT se repitieron 7 y 3 veces respectivamente con el uso de la librería de 12 aminoácidos. Interesantemente el último péptido, APWHLSSQYSRT se seleccionó también por mAb 3, lo que confirma que mAb 3 y los anticuerpos GPc comparten parte de su epítipo. Esto quedó, además, demostrado por la unión de este clon de fagos a ambos tipos de anticuerpos (mAb 3 y GPc) en el ELISA de fagos monoclonales.

1.2.2 Determinación de la afinidad de los anticuerpos GPc por los péptidos.

El ELISA con los anticuerpos GPc y los fagos monoclonales reveló (Figura 30) que aunque la gran mayoría de péptidos seleccionados se unían a los anticuerpos GPc, algunos lo hacían muy débilmente. Aun así, estos péptidos que proporcionaron baja señal se incluyeron también en el análisis realizado por Pepsurf, ya que datos previos obtenidos en nuestro laboratorio, referentes a “panning” de anticuerpos lineales, indicaban que aunque el anticuerpo no reconociera los péptidos seleccionados en el ELISA de fagos monoclonales, éstos si poseían información estructural del epítipo, como se puso de manifiesto en el posterior cartografiado del epítipo mediante Pepsurf.

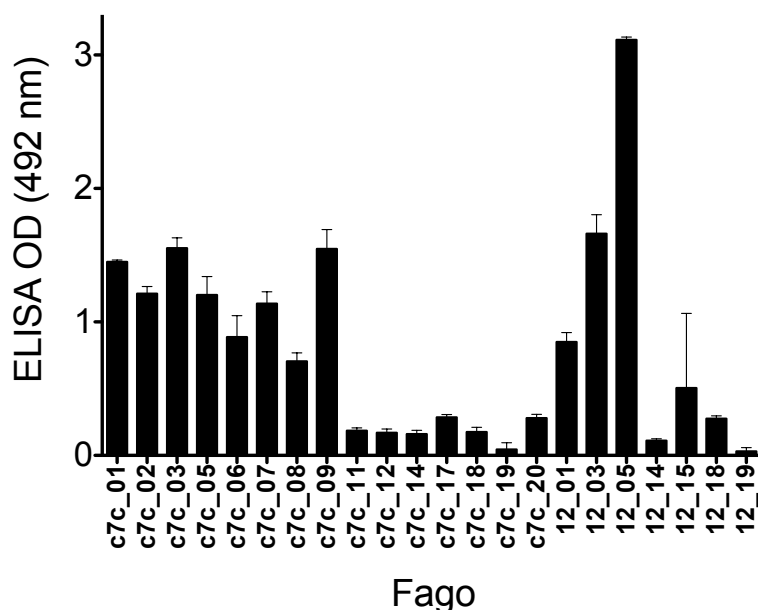


Figura 30. Reactividad en ELISA de los fagotopos seleccionados a partir de las dos librerías phage display frente a los anticuerpos GPC. Se representa la media y la desviación estándar del desarrollo de color (absorbancia en OD a λ de 492) para cada fagotopo de 3 ELISAs. Los pocillos de la microplaca se tapizaron con autoanticuerpos GPC (1 μ g/ml). Se añadieron 1×10^{10} ufc de bacteriofagos.

Al igual que observamos en los experimentos de “panning” con mAb 3, ya que los péptidos con secuencias que aparecieron repetidamente se unían fuertemente a los anticuerpos GPC proporcionando alta señal en estos ELISAs, la presencia de más de una copia de dichas secuencias entre los clones seleccionados, debería responder a su elevada afinidad por los anticuerpos GPC y no a ventajas en el proceso de infección

1.2.3 Predicción de epítomos mediante pepsurf.

Una vez realizado el “panning” y secuenciados los péptidos seleccionados por los GPC, se sometieron al análisis mediante Pepsurf. Nuevamente, por las razones arriba expuestas para mAb 3, usamos el modelo de heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(IV)NC1$ recogido en el Anexo II.

En el estudio bioinformático se usaron como parámetros iniciales: Epitope mapping algorithm= Pepsurf; Protein structure= PDB del heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(IV)NC1$ modelado en la presente tesis; Chain identifier= A (se utilizó tanto $\alpha 3(IV)NC1$ como el heterohexámero completo, pero al obtenerse resultados similares, se acotó la búsqueda

a $\alpha 3(IV)NC1$ para agilizar los cálculos), y las secuencias de los péptidos seleccionados frente a anticuerpos GPc mostrados en la Figura 29.

Al igual que indicamos para el caso de mAb 3, se construyó un histograma de frecuencias, en el que se representa el número de veces que cada residuo de $\alpha 3(IV)NC1$ aparecía en las predicciones generadas por Pepsurf (Figura 31). El análisis del histograma, pone de manifiesto que los residuos predichos por Pepsurf como candidatos al epítipo de los GPc concuerdan con las regiones propuestas mediante el uso de quimeras y mutagénesis dirigida (Netzer y cols. 1999, David y cols. 2001). Dos zonas en la superficie de $\alpha 3(IV)NC1$ destacan como regiones donde con mayor probabilidad se ubican los residuos candidatos a formar parte de los epítipos. Estas regiones incluían todos los residuos previamente propuestos mediante otros métodos (Gunnarsson y cols. 2000, David y cols. 2001), con la excepción de Val₂₇ y Gln₅₄.

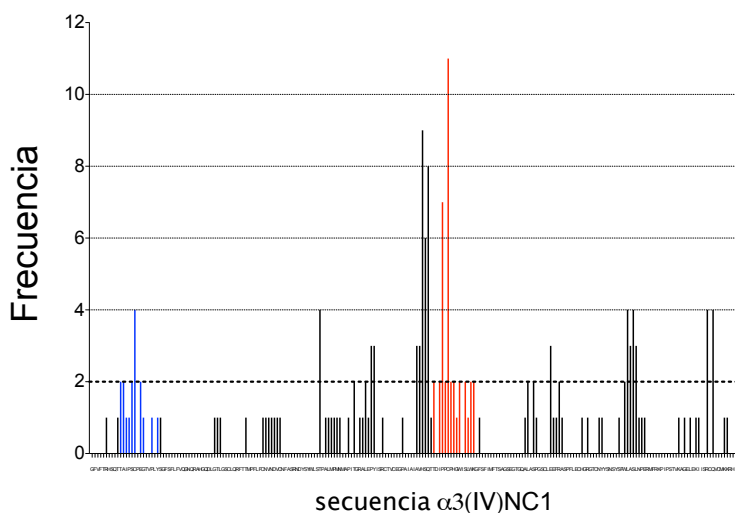


Figura 31. Histograma de frecuencias para los residuos de $\alpha 3(IV)NC1$ candidatos a formar parte del epítipo de los GPc.

Predicciones generadas por Pepsurf usando los péptidos seleccionados por los anticuerpos GPc a partir de las dos librerías peptídicas phage display. En azul y en rojo se representan las frecuencias de los residuos ubicados en la región E_A y E_B, respectivamente.

La comparación de los histogramas correspondientes a los anticuerpos mAb 3 y GPc (Figuras 27 y 31) reveló, como se esperaba para epítipos con elementos compartidos,

una gran similitud, pero no exactitud, en el patrón de distribución de los residuos candidatos a formar parte del epítipo. En el caso de mAb 3, los residuos pertenecientes a la región E_A son escasos y presentaron frecuencias menores. En cambio, la región E_B está ampliamente representada y la frecuencia de los residuos era mucho mayor. No era este el patrón en el histograma de frecuencias obtenido para los anticuerpos GPc, en donde la región E_A apareció estar mucho más representada tanto en el número como en la frecuencia de los residuos. Sin embargo, en la región E_B, pese a que el número e identidad de aminoácidos involucrados en el epítipo resulta ser similar, su frecuencia parece ser mucho menor, lo que, en principio, restaría peso a la contribución de esta región al epítipo de los anticuerpos GPc.

1.2.4 Selección de los residuos candidatos a mutagénesis.

Tras la predicción por Pepsurf de los residuos candidatos al epítipo de los autoanticuerpos GPc (Figura 31), decidimos, para poder confirmar su participación en el epítipo mediante mutagénesis dirigida, acotar más los probables elementos involucrados. Se eliminaron las áreas comunes entre todos los α (IV)NC1, como la secuencia (119)Ala,Val,His,Ser,Gln(123) y aquellos residuos comunes entre α 2(IV)NC1 y α 3(IV)NC1. Se descartaron, además, aquellos residuos que presentaron una frecuencia inferior a dos en nuestros resultados, de tal forma que establecimos como candidatos definitivos al estudio de mutagénesis dirigida del epítipo de los autoanticuerpos GPc los residuos Thr₂₆ and Tyr₃₀ en la región E_A; Thr₁₂₇, Pro₁₃₁, His₁₃₄, y Lys₁₄₁ en la región E_B; y Thr₉₉ y Ala₁₉₆ fuera de ambas regiones (E_A y E_B).



Figura 32. Alineamiento tipo ClustalW de las secuencias de $\alpha 1(IV)NC1$, $\alpha 2(IV)NC1$ y $\alpha 3(IV)NC1$.

Las regiones E_A y E_B aparecen sombreadas. Los nueve aminoácidos previamente descritos como parte del epítopo, que han sido mutados en M1, aparecen en negrita (nótese que la Ser₃₁ es común entre $\alpha 2(IV)NC1$ y $\alpha 3(IV)NC1$, por lo que no fue mutada). Los residuos mutados en $\alpha 2(IV)NC1$, aparecen identificados con el nombre de la quimera en la que se incluyen.

En la Figura 32 se indica el nombre de las quimeras aquí preparadas que contiene los residuos a mutar. Así, primero se mutaron los residuos que eran comunes entre $\alpha 1(IV)NC1$ y $\alpha 3(IV)NC1$ pero diferentes de $\alpha 2(IV)NC1$. A continuación, aquellos residuos que eran diferentes entre los $\alpha(IV)NC1$ y se encontraban ubicados en la región E_B . Por último, mutamos aquellos residuos diferentes entre los $\alpha(IV)NC1$ ubicados fuera de la región E_B . En la Figura 33 del modelo de heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(IV)NC1$, se indica la localización en superficie de los residuos mutados aquí.

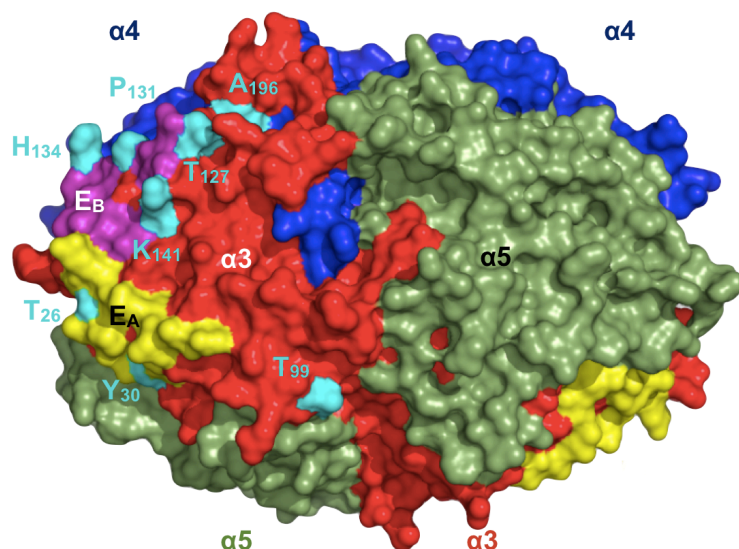


Figura 33. Representación en superficie del modelo de heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(IV)NC1$ y de los residuos mutados.

El heterohexámero está formado por dos protómeros idénticos, compuestos de una cadena de $\alpha 3(IV)NC1$ (rojo), una cadena de $\alpha 4(IV)NC1$ (azul marino) y una cadena de $\alpha 5(IV)NC1$ (verde). Las regiones del epítipo aparecen coloreadas E_A (amarillo) y E_B (morado) en la superficie de $\alpha 3(IV)NC1$. Los residuos aquí propuestos para

ser parte del epítipo de los autoanticuerpos GPc aparecen identificados y coloreados en azul cian.

El esquema de la Figura 34 muestra la composición en residuos y nomenclatura de los seis mutantes generados (M1-M6) a partir de la proteína $\alpha 2(IV)NC1$, tras reemplazar residuos en ésta por sus equivalentes en $\alpha 3(IV)NC1$ en base al alineamiento de las secuencias de $\alpha 1(IV)NC1$, $\alpha 2(IV)NC1$ y $\alpha 3(IV)NC1$ (Figura 32) y las predicciones del epítipo generadas en este trabajo.

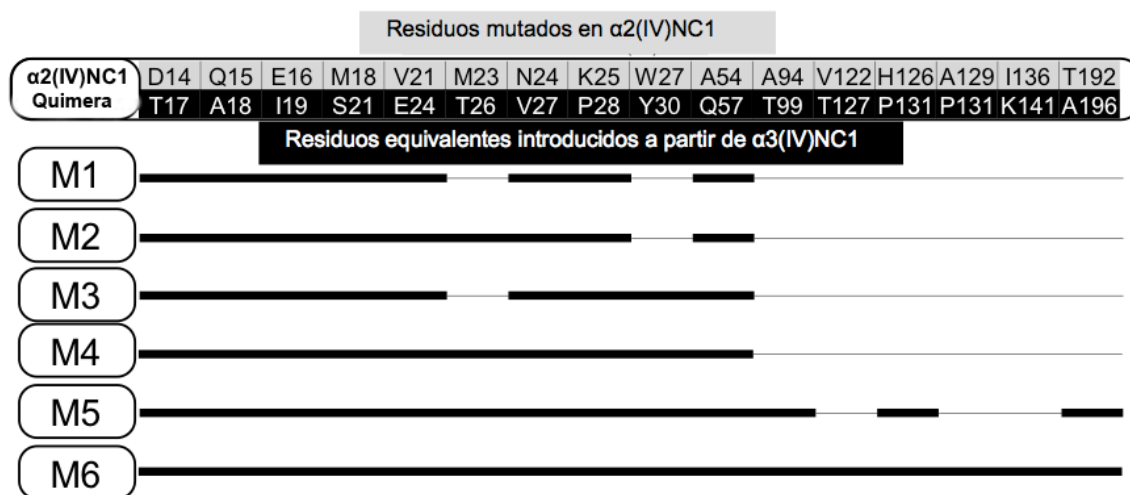


Figura 34. Esquema de las quimeras preparadas a partir de $\alpha 2(IV)NC1$.

La barra superior (correspondiente con la quimera M6) representa la molécula de $\alpha 2(IV)NC1$ mostrando los 16 residuos que se mutan (mitad superior de la barra) por los residuos indicados de $\alpha 3(IV)NC1$ (mitad inferior de la barra). Las líneas gruesas en las quimeras mutantes M1-M6 representan los residuos mutados en cada quimera de $\alpha 2(IV)NC1$ correspondientes con la barra superior.

1.2.5 Análisis de las quimeras generadas. ELISA, Western Blotting y SPR.

Todas las quimeras generadas se purificaron por afinidad mediante columnas de resina anti-FLAG tal y como se recoge en metodología. Las quimeras purificadas mostraron movilidades electroforéticas (SDS-PAGE) como bandas únicas de un tamaño ~ 30 kDa (Figura 35A) que resultaron ser reconocidas por los autoanticuerpos GPc al analizarlas en condiciones no reductoras mediante Western-blotting. Interessantemente, los mutantes M2-M6 manifestaron mayor reactividad frente a los autoanticuerpos GPc en comparación a la quimera control M1, poniendo de manifiesto que los residuos mutados en dichas quimeras, como consecuencia de las predicciones obtenidas mediante phage display, deberían contribuir de forma crítica al autoantígeno Goodpasture (Figura 35B).

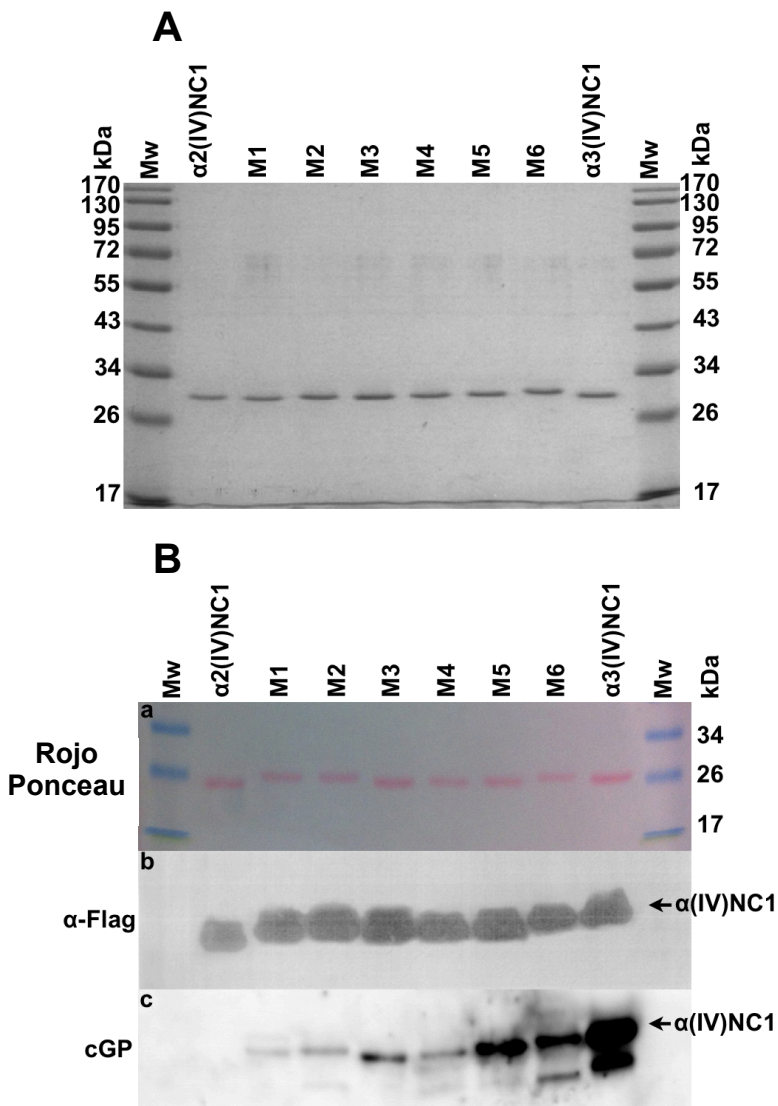


Figura 35. Caracterización electroforética e inmunoquímica de las quimeras.

A) Tinción con azul de Coomassie de la electroforesis (SDS-PAGE, 12 % poliacrilamida) bajo condiciones reductoras de las quimeras M1-M6 y de $\alpha 2(IV)NC1$ y $\alpha 3(IV)NC1$. **B)** Western blotting a membrana de nitrocelulosa de la electroforesis de las proteínas analizadas en A bajo condiciones no reductoras: **a)** tinción con rojo Ponceau; Inmunodetección de las proteínas con anticuerpos anti-FLAG **b)** o con anticuerpos GPc **c)**. Las flechas señalan los diferentes tipos de proteínas $\alpha(IV)NC1$ analizados.

Cuando las quimeras se analizaron mediante ELISA, se obtuvo un resultado conforme con aquel procedente de Western-blotting en términos de la reactividad mostrada por los anticuerpos GPc hacia las quimeras en comparación con la exhibida frente a $\alpha 3(IV)NC1$. La reactividad de los anticuerpos GPc hacia la quimera M3 dobló su intensidad respecto a la quimera control M1, manteniéndose en línea con la proporcionada frente a $\alpha 3(IV)NC1$, el antígeno real de los GPc. Las diferencias en la reactividad entre M2 y M3, que son significativas, pusieron de manifiesto que el residuo Tyr₃₀ es crítico en la región E_A para el reconocimiento por los GPc (Figura 36). Los residuos mutados en las quimeras M5 y M6, escasamente incrementaron la reactividad de los anticuerpos GPc más allá de lo observado con la quimera M3.

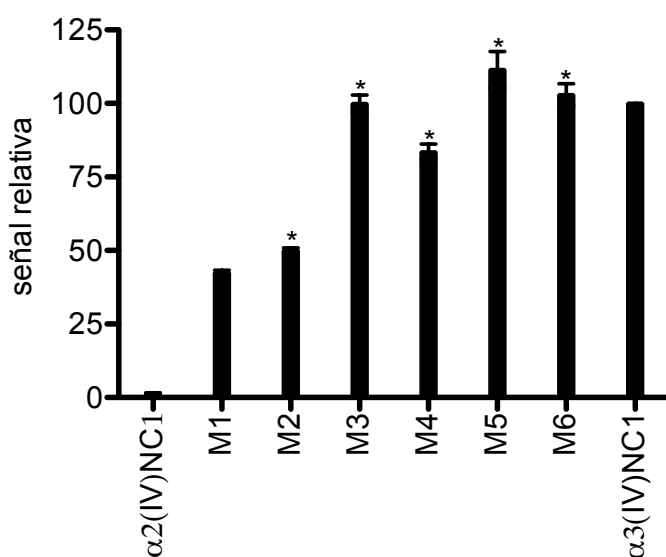


Figura 36. Reactividad en ELISA de los anticuerpos GPc hacia las proteínas $\alpha 2(IV)NC1$, $\alpha 3(IV)NC1$ y las quimeras M1-M6 preparadas aquí.

Los resultados se expresan en tanto por ciento relativo a la señal obtenida con $\alpha 3(IV)NC1$, la diana natural. Los asteriscos indican que existen diferencias estadísticamente significativas $P < 0,01$ respecto a la reactividad hacia M1.

Los análisis realizados mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR) pusieron de manifiesto una disminución gradual en la constante de afinidad (KD) de los anticuerpos GPc por las quimeras desde la M1 a la M6. Así, la afinidad de los anticuerpos GPc hacia las quimeras aumentó desde la quimera M1 al resto de ellas, aproximándose a la afinidad de su diana natural $\alpha 3(IV)NC1$ (Figura 37A). Estos

hallazgos confirmaban la participación de los residuos mutados en el epítipo. Paralelamente, al analizar el Valor de R_{max} (que representa la señal máxima teórica de analito que se puede alcanzar para un valor dado de anticuerpos GPC inmovilizados en el chip) obtenido en los experimentos de afinidad, se observó un incremento de este valor R_{max} desde el mutante M1 hasta $\alpha 3(IV)NC1$ (Figura 37B) lo que, de nuevo, corroboraba los resultados anteriores e indicaba que el proceso secuencial de mutagénesis llevado a cabo mejoraba el reconocimiento de los GPC hacia su epítipo.

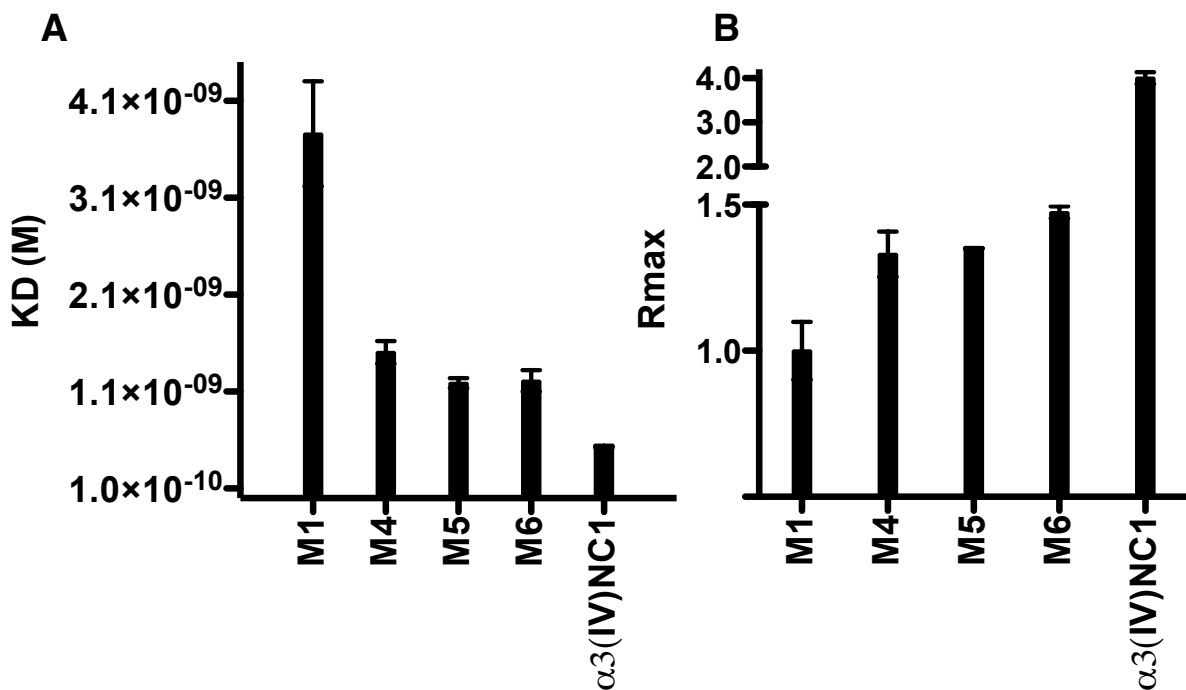


Figura 37. Estudio mediante SPR de la influencia de las mutaciones introducidas en $\alpha 2(IV)NC1$ en las quimeras indicadas sobre su afinidad frente a los anticuerpos GPC.

Se representa la constante de afinidad (KD) en el panel **A** y el valor R_{max} en el panel **B**.

1.3 Conclusiones objetivo 1.

Hemos profundizado en la caracterización del epítipo de los anticuerpos GPC mediante la aplicación de la tecnología phage display por primera vez a este fin. Esta tecnología, nos ha permitido la obtención de péptidos seleccionados por los

autoanticuerpos GPc a partir de dos librerías de péptidos combinatoriales comerciales. Es de aceptación general la creencia de que los péptidos seleccionados o fagotopos mimetizarían las propiedades físico-químicas y la organización espacial de los autoepítomos (Mayrose y cols. 2007). De hecho, hemos generado, en base a esta información, quimeras que fueron reconocidas por los anticuerpos GPc con similar intensidad a como reconocen a la diana natural $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$. Estas quimeras se prepararon a partir de la proteína $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$ que presenta una mayor divergencia frente a $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ que la proteína $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ usada hasta el momento por otros investigadores en estudios de mutagénesis (Quinones y cols. 1989). Los resultados obtenidos aquí, no sólo corroboraron hallazgos previos en la definición del epítomo (Borza y cols. 2001, Hellmark y cols. 2003), sino que identificaron nuevos residuos (Thr₂₆, Tyr₃₀, Thr₁₂₇, Pro₁₃₁, His₁₃₄, Lys₁₄₁, Thr₉₉ y Ala₁₉₆) involucrados en la unión de los autoanticuerpos GPc, cuya participación era desconocida hasta el momento.

Paralelamente a proporcionar nueva información estructural complementaria acerca de los epítomos GP, la aproximación realizada por phage display ha abierto la posibilidad del uso de nuevos compuestos (péptidos) con capacidad de bloquear la unión de los autoanticuerpos GPc a su autoantígeno "in vivo".

La confirmación de la reactividad de los mutantes generados de $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$ (las quimeras) frente a los autoanticuerpos GPc verificada mediante ELISA, Western blotting y SPR, sugirió el papel inmunopatogénico de los residuos mutados, aportando datos cinéticos de la interacción antígeno-anticuerpo que, eventualmente, podrían resultar críticos en la generación de agentes bloqueantes terapéuticos.

Los hallazgos y resultados alcanzados aquí se obtuvieron a partir del estudio de suero de un único paciente, lo que podría hacer dudar de la representatividad de los

datos en la enfermedad o bien hacer pensar en que aquellos se encuentren sesgados. A nuestro entender, se pueden descartar dichas sospechas ya que las evidencias y datos disponibles indican que no existen diferencias sustanciales entre los auto-epítomos de los pacientes. Todos los sueros de pacientes GP ensayados por nosotros (datos no mostrados y no publicados) y otros investigadores (Hellmark y cols. 1994, Segelmark y cols. 2003) compiten con mAb 3 por $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$. Como hemos mencionado arriba, el epítomo de mAb 3 se ubica en una región solapante con los autoanticuerpos GPc, por lo que comparte su carácter conformacional y la dependencia de la correcta formación de los puentes disulfuro. Apoyando estos hechos, nuestros resultados obtenidos por phage display para mAb 3, han revelado la existencia de residuos tanto localizados en la región E_A como en la región E_B , implicados en el epítomo que son comunes a los autoanticuerpos GPc. Además, hemos aportado la evidencia de la existencia de un péptido en común, seleccionado por ambos anticuerpos durante el proceso de “panning”, lo que es indicativo, sin lugar a dudas, que mAb 3 y los anticuerpos GPc comparten parte de su epítomo.

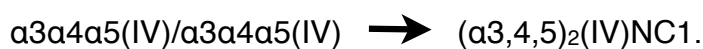
Consecuentemente, los residuos con elevada reactividad descritos para los autoanticuerpos GPc utilizados en este trabajo, resultaron ser idénticos a los descritos previamente para otros pacientes GP, que, además, manifestaron propiedades inmunopatogénicas tras su ensayo en modelos animales (Hellmark y cols. 2003). Por tanto, aunque se espera la existencia de cierta variabilidad en los epítomos a nivel individual (Hellmark y cols. 1994), los datos de los que se dispone hasta el momento, claramente indican que los residuos reactivos no varían significativamente entre los pacientes GP. En consecuencia, los residuos de interacción con los autoanticuerpos GPc, Thr₂₆, Tyr₃₀, Thr₉₉, Pro₁₃₁, y Ala₁₉₆, comunes a los dominios $\alpha 1$ - $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, no

identificados en estudios previos y por tanto, de los que no se tienen datos acerca de sus propiedades inmunopatogénicas, han sido identificados aquí utilizando técnicas de biología molecular. Resta pues por esclarecer la relevancia patogénica de nuestros hallazgos, comprobando las propiedades inmunopatogénicas en modelos animales adecuados de las quimeras de $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$ que hemos generado en base a las predicciones obtenidas utilizando la tecnología del phage display.

2 Integración del epítipo Goodpasture en el hexámero $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$.

Los síndromes de Goodpasture y Alport son dos enfermedades raras causadas por un fallo funcional en riñón y pulmón (Hudson y cols. 2003). El síndrome de Goodpasture se desencadena a partir de un ataque autoinmune rápidamente progresivo frente a la cadena α_3 del colágeno tipo IV como diana. Por contra, el síndrome de Alport se presenta como una enfermedad genética desarrollada a partir de mutaciones en alguno de los genes que codifican para las cadenas de α_3 (COL4A3), α_4 (COL4A4) y α_5 (COL4A5) en el colágeno tipo IV, de tal forma que la integridad de la membrana basal glomerular queda comprometida por la persistencia de la redes constituidas a partir de protómeros $(\alpha_1)_2\alpha_2(\text{IV})\text{NC1}$, lo que acabará por generar fallo renal y la posible formación de aloanticuerpos en respuesta a trasplantes renales en los que están presentes los protómeros $\alpha_3\alpha_4\alpha_5(\text{IV})\text{NC1}$.

El colágeno tipo IV se engloba en el grupo de los colágenos no fibrilares, es capaz de formar redes y es el mayor constituyente de las membranas basales. Existen seis cadenas distintas de colágeno tipo IV (α_1 - $\alpha_6(\text{IV})$), estas poseen la capacidad de ensamblarse en trímeros, que reciben el nombre de protómeros, que iniciarán la formación de la red de colágeno, sin embargo, a pesar de la multitud de combinaciones posibles, en la naturaleza sólo se han identificado tres de ellas, que se corresponden con los siguientes heterohexámeros:



Desde que se resolvió la primera estructura atómica 3-D del heterohexámero $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$ (Than y cols. 2002), no se han obtenido estructuras 3-D para otro tipo de hexámeros $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$. Ya que el heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$ es la diana del ataque autoinmune en los síndromes de Goodpasture y Alport, el segundo objetivo de esta tesis perseguía resolver su estructura 3-D para comprender las bases estructurales a nivel atómico de la enfermedad e integrar en aquellas la información obtenida del epítopo Goodpasture mediante la tecnología de phage display.

Las seis cadenas de proteína recombinante de colágeno humano tipo IV obtenidas aquí mediante el sistema de expresión en células de insecto, permitió abordar estudios tanto de afinidad mediante SPR entre las diferentes cadenas $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$, como de cristalografía de proteínas. Estos estudios culminaron en la resolución de la estructura atómica 3-D de los homohexámeros $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ y de los heterohexámeros de $(\alpha 5,6,6)_2(\text{IV})\text{NC1}$ y de $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$ junto con la forma monomérica de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$.

2.1 Estructuras de los dominios no colagenosos del colágeno IV.

2.1.1 Heterohexámero $(\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5)_2(\text{IV})\text{NC1}$.

- Expresión y caracterización de cada uno de los dominios no colagenosos que integran el heterohexámero $(\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5)_2(\text{IV})\text{NC1}$.

Las proteínas $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ se obtuvieron de forma individual en un sistema de expresión que usa baculovirus y células de insecto y que incorpora en su extremo N-terminal un tag (FLAG) para facilitar su purificación (Figura 38). Las masas moleculares obtenidas de acuerdo a su movilidad electroforética de 28, 31 y 27 kDa son consistentes con los calculados a partir de la estructura primaria de ~ 28 kDa para

monómeros de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ portando el tag FLAG N-terminal, respectivamente.

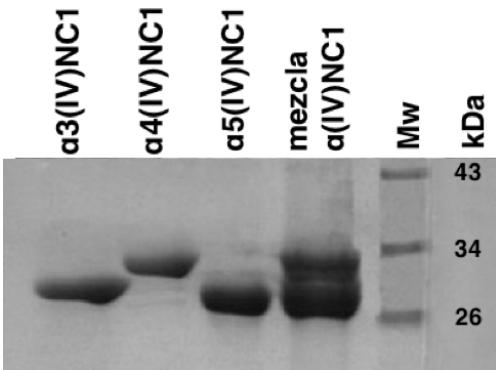


Figura 38. Tinción con azul Coomassie de las proteínas recombinantes $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$.

Las proteínas se sometieron a electroforesis (SDS-12 % poliacrilamida) bajo condiciones reductoras. Junto al carril (Mw) de marcadores de masas moleculares indicadas en kDa, se ha cargado una mezcla de las tres proteínas recombinantes bajo estudio.

El análisis mediante cromatografía de exclusión molecular (Figura 39) del estado oligomérico de las proteínas purificadas reveló que mientras $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ se comportan como monómeros, $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ eluyó en dos fracciones, una mayoritaria ($\sim 70\%$) monomérica y el resto hexamérica.

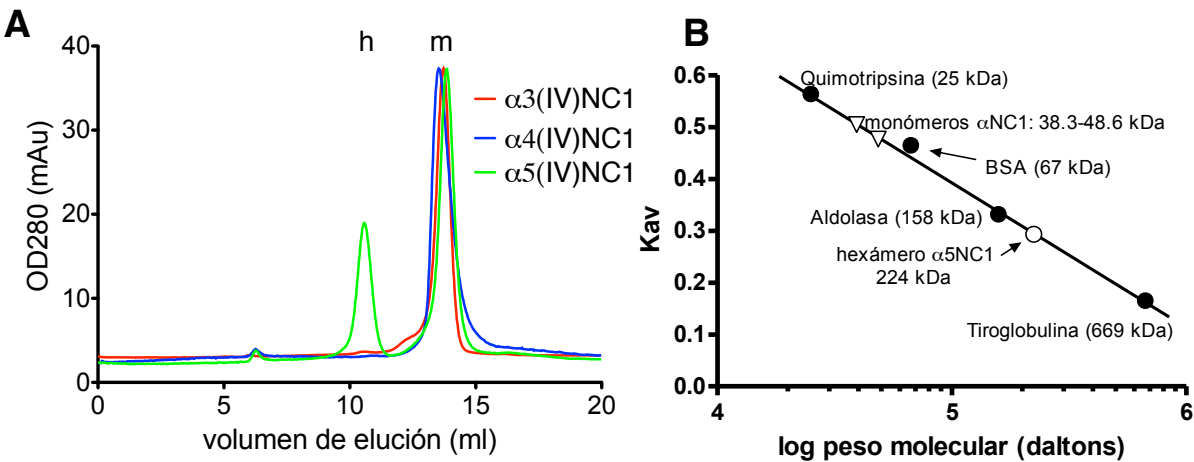


Figura 39. Perfil cromatográfico de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$.

A) Las proteínas fueron analizadas mediante cromatografía de exclusión molecular en columna Superdex 200HR 10/30 a una concentración de 1 mg/ml. En el cromatograma de las tres proteínas bajo estudio destaca un pico mayoritario correspondiente a formas monoméricas y una fracción hexamérica (h) exclusivamente presente en el caso de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$. También se observa un pequeño pico de material agregado de elevado peso molecular (> 680 kDa) que eluyó con el volumen vacío de la columna. **B)** Curva de calibración de la columna. $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$; K_{av} : equivalente a la constante de distribución. V_e : volumen de elución de la proteína. V_o : volumen vacío de la columna estimado a partir del volumen de elución de azul dextran 2000 (7,8 ml). V_t : volumen total de la columna (21,4 ml). Marcadores de masas moleculares: Quimotripsina (25 kDa), BSA (66,9 kDa), Aldolasa (158 kDa), Tiroglobulina (669 kDa).

- Formación de oligómeros.

Para el estudio de la formación del heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$ utilizamos mezclas equimoleculares ($\sim 37 \mu\text{M}$) de los dominios no colagenosos $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ recombinantes (Figura 40). Como indicamos arriba (Figura 39), a la concentración utilizada (1 mg/ml), un tercio de la cantidad de partida de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ se encuentra en forma hexamérica, lo que corresponde con el $\sim 11 \%$ de la proteína de la mezcla en el momento inicial del ensayo. Tras el corto periodo de tiempo requerido para mezclar las proteínas y realizar el análisis cromatográfico inicial (tiempo cero de incubación) se detectó un 20, 50, y 20 % de la proteína total como monómero, dímero y hexámero, respectivamente, lo que indica que el proceso de oligomerización se inicia inmediatamente después de la exposición mutua de las proteínas. Bajo las condiciones utilizadas, la generación de la/s forma/s hexamérica/s sigue una cinética hiperbólica (Figura 40B), alcanzándose un máximo que representa del orden del 84 % de la proteína total y requiriéndose ~ 50 min para formar el 50 % de la/s forma/s oligomérica/s nuevamente generadas. La limitación de la/s forma/s hexamérica/s a un máximo del $\sim 85\%$ del total se debe, probablemente, a la presencia inicial arriba indicada de un 11 % de homohexámero de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ que no está disponible para su posible ensamblado con los monómeros de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$, que a la concentración utilizada permanecen como formas monoméricas (Figura 39). La incubación de los dominios no colagenosos $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ recombinantes (Figura 40) de manera individual no condujo a otra forma oligomérica que la de monómero. El análisis tanto mediante espectrometría de masas MALDI TOF-TOF como Western blotting e inmunodetección de la fracción hexamérica reveló la presencia de moléculas de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$, lo que, junto con los análisis cinéticos, son consistentes con la formación de heterohexámeros $(\alpha 3\alpha 4\alpha 5)_2(\text{IV})\text{NC1}$ y de homohexámeros $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ a partir de los

dominios no colagenosos $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ recombinantes producidos con el sistema de baculovirus/células de insecto. Así pues, este proceso de oligomerización *in vitro* permite reproducir la formación del heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$ como ha sido descrito a partir de fuente natural y de material recombinante (Boutaud y cols. 2000).

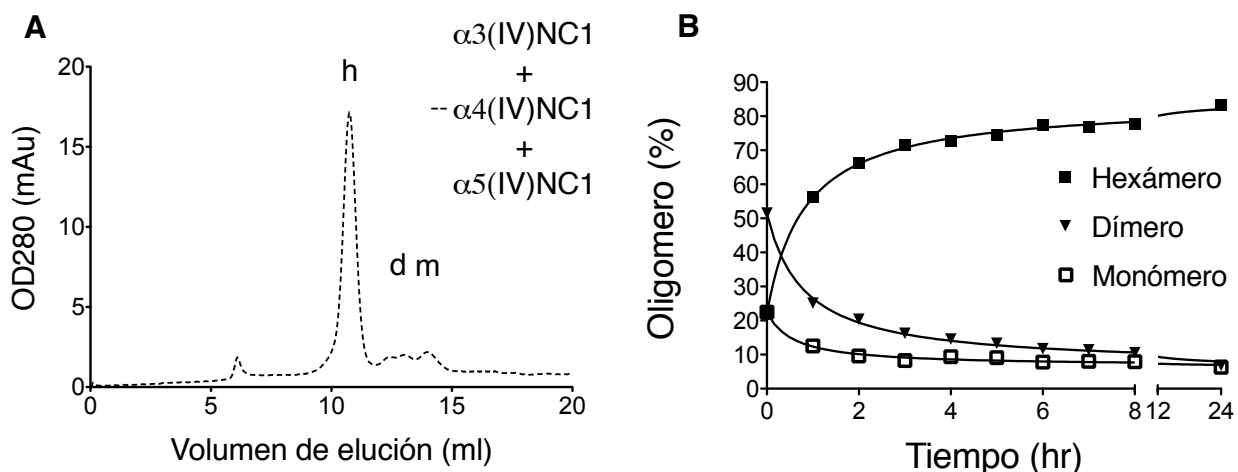


Figura 40. Caracterización del heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$.

Los monómeros $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ se mezclaron en concentraciones equimolares y se expusieron a condiciones de oligomerización. **A)** Cromatograma en donde se identifican los picos correspondientes a hexámero (h), dímero (d) y monómero (m). **B)** Curso temporal de la formación de hexámeros monitorizada mediante cromatografía de exclusión molecular.

- Intentos de cristalización del heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$.

Las proteínas recombinantes $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ concentradas individualmente a ≥ 10 mg/ml, se mezclaron equimolecularmente, y tras ajustar la concentración de la mezcla a $\sim 7,4$ mg/ml en TBS (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,4) se sometieron a diferentes condiciones de cristalización (ver métodos). Se obtuvo rápidamente una población homogénea de cristales con simetría $P4_132$ que difractaron con una resolución de 1,9 Å (Figura 41). Los datos cristalográficos revelaron que el cristal estaba constituido únicamente por una molécula de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ en la unidad asimétrica. En la celda unidad, las moléculas de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ se disponían formando

homohexámeros con una arquitectura y tamaño idénticos al heterohexámero de placenta humana $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(IV)NC1$ (PDB id:1LI1) (ver mas adelante).

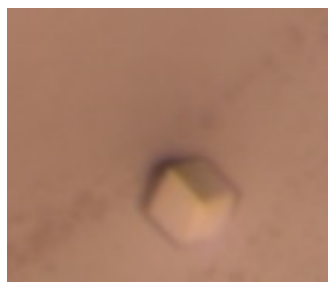


Figura 41. Cristal cúbico de $\alpha 5(IV)NC1$.

Obtenido, bajo las condiciones indicadas en métodos, a partir de mezclas equimoleculares de los dominios recombinantes humanos no colagenosos $\alpha 3(IV)NC1$, $\alpha 4(IV)NC1$ y $\alpha 5(IV)NC1$.

A partir de esta muestra, ninguna condición de cristalización condujo a la obtención de otro tipo de cristales difractables que no estuvieran constituidos por homohexámeros de $\alpha 5(IV)NC1$. Ya que las proteínas $\alpha 3(IV)NC1$, $\alpha 4(IV)NC1$ y $\alpha 5(IV)NC1$ se usaron en la mezcla de cristalización a una concentración mayor a 1 mg/ml, de la que conocíamos su grado de agregación, comprobamos ahora, mediante cromatografía de exclusión molecular, el estado de oligomerización exhibido a las altas concentraciones usadas en cada una de las tres proteínas $\alpha(IV)NC1$ (Figura 42). Mientras el aumento en la concentración proteica no varió el patrón de elución y por tanto el estado de oligomerización de $\alpha 3(IV)NC1$ y $\alpha 4(IV)NC1$, si provocó un desplazamiento del equilibrio de las especies de $\alpha 5(IV)NC1$ hacia la formación de homohexámeros. Ya que más del 80 % de $\alpha 5(IV)NC1$ se encuentra en forma de homohexámero, cabe pensar que la no obtención de cristales de heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(IV)NC1$ en el ensayo anterior podría deberse a la baja cantidad generada de éste por falta de disponibilidad de suficiente monómero de $\alpha 5(IV)NC1$ para participar en el ensamblaje del heterohexámero junto a las proteínas $\alpha 3(IV)NC1$ y $\alpha 4(IV)NC1$.

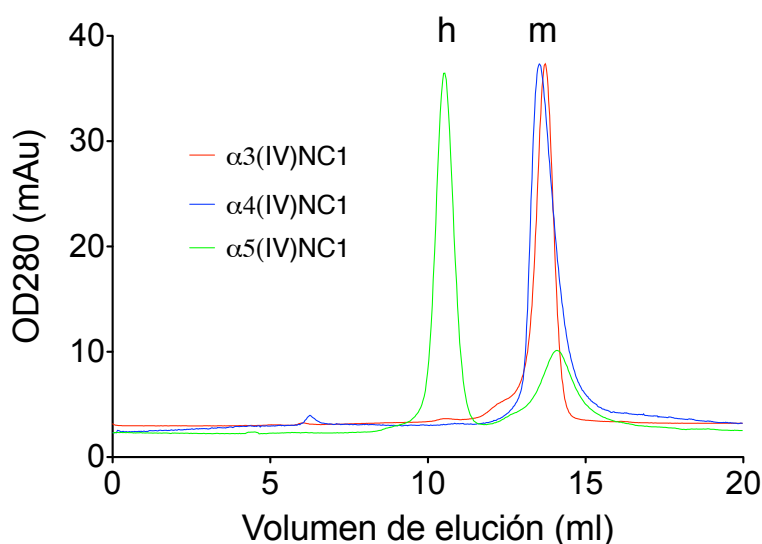


Figura 42. Influencia sobre el estado oligomérico del incremento de concentración de $\alpha 3(IV)NC1$, $\alpha 4(IV)NC1$ y $\alpha 5(IV)NC1$.

Mientras el perfil cromatográfico se mantiene invariable en $\alpha 3(IV)NC1$ y $\alpha 4(IV)NC1$ con respecto a aquel obtenido a concentración inferior (1 mg/ml) (ver Figura 39), en $\alpha 5(IV)NC1$ se desplaza el equilibrio hacia la forma hexámerica. m: monómero; h: hexámero.

Para evitar la formación en exceso de homohexámeros de $\alpha 5(IV)NC1$ antes de la mezcla con las otras dos proteínas, se inició el proceso de ensamblado del heterohexámero a una concentración de cada una de ellas de ~ 1 mg/ml, para, posteriormente, concentrarlas hasta $\sim 7,4$ mg/ml. Se pretendía de este modo promover la interacción entre los tres tipos de monómero, evitando el secuestro de $\alpha 5(IV)NC1$ en forma hexamérica dependiente de concentración. Sin embargo, los resultados no se apartaron del anterior: sólo se obtuvieron cristales formados por una molécula de $\alpha 5(IV)NC1$ en la unidad asimétrica.

También para no favorecer su autoasociación, se mantuvo la concentración de $\alpha 5(IV)NC1$ por debajo de 0,5 mg/ml. Para ello, en el proceso de purificación, tras eluir la proteína a través de la resina anti-FLAG por competición con péptido FLAG soluble, éste no se eliminó por sucesivos pases de ultrafiltración, (lo que conducía a la concentración de la proteína), sino que la muestra se dializó frente a TBS (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,4) tomando la precaución de que $\alpha 5(IV)NC1$ no superase la concentración de $\sim 0,5$ mg/ml. La monitorización mediante cromatografía de exclusión molecular reveló

que esta aproximación no proporcionó los resultados esperados (Figura 43) ya que la proporción de homohexámero no se redujo respecto a la obtenida usando ultrafiltración.

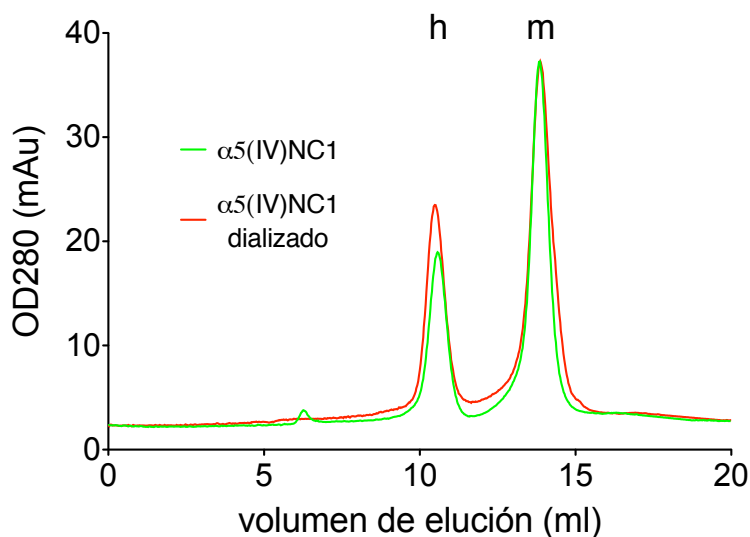


Figura 43. Efecto en la distribución de formas oligoméricas de $\alpha 5(IV)NC1$ del procedimiento seguido para la eliminación del péptido FLAG utilizado en la purificación.

Perfiles cromatográficos tras cromatografía de exclusión molecular de preparaciones de $\alpha 5(IV)NC1$ sometidas a ultrafiltración o diálisis. m: monómero; h: hexámero.

Para poder disponer de una población de $\alpha 5(IV)NC1$ mayoritaria en forma monomérica y facilitar de este modo la interacción con los monómeros de las otras dos proteínas del heterohexámero, se analizó también la influencia de la fuerza iónica sobre la distribución del equilibrio de oligomerización en $\alpha 5(IV)NC1$. La reducción paulatina del pH desde la neutralidad hasta un pH ácido de 3 no alteró por sí misma la proporción de homohexámero, pero acompañada de un descenso en la fuerza iónica, produjo un desplazamiento de las especies de $\alpha 5(IV)NC1$ hacia formas no oligoméricas (Figura 44). Así, en presencia de 10 mM de K_2HPO_4 (pH 3) y 2,5 mM de NaCl, no se observaron formas oligoméricas de $\alpha 5(IV)NC1$. La influencia de una adecuada fuerza iónica (> 75 mM) es esencial para alcanzar el correcto plegamiento observado a 500 mM de NaCl ya que este queda perturbado a las concentraciones inferiores ensayadas. Sin embargo, estas últimas permiten revertir el correcto ensamblado tras recuperar la fuerza iónica inicial como se muestra en la Figura 45.

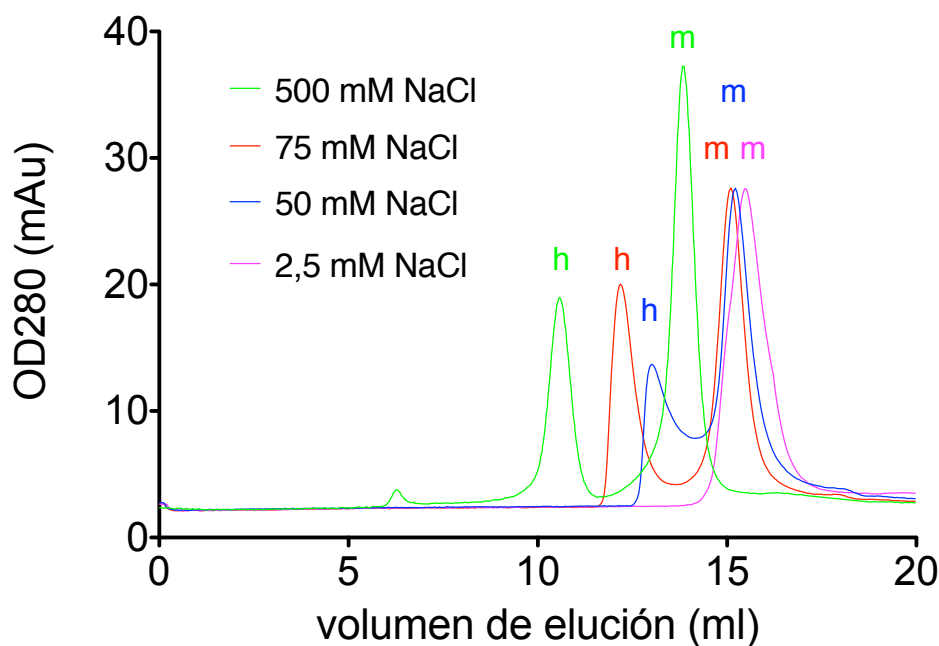


Figura 44. Influencia de la fuerza iónica a pH 3 en el equilibrio de oligomerización de $\alpha 5(IV)NC1$. Perfiles cromatográficos tras cromatografía de exclusión molecular de $\alpha 5(IV)NC1$ frente a diferentes concentraciones de NaCl. m: monómero; h: hexámero.

$\alpha 3(IV)NC1$, $\alpha 4(IV)NC1$ y $\alpha 5(IV)NC1$ previamente dializadas frente a 10 mM $KHPO_4$, 2,5 mM NaCl, pH 3 se mezclaron en cantidades equimolares. La mezcla, dializada nuevamente frente a TBS (50 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,4) y posteriormente concentrada hasta $\sim 7,4$ mg/ml, se comportó mayoritariamente como un hexámero (Figura 45), con picos menores de formas mono y diméricas. La formación de una fracción mayoritaria hexamérica es consistente con la generación de un heterohexámero, en el que se confirmó, además, por espectrometría de masas, la presencia de $\alpha 3(IV)NC1$, $\alpha 4(IV)NC1$ y $\alpha 5(IV)NC1$. Sin embargo, el heterohexámero así preparado no generó cristales bajo ninguna condición. La incapacidad para formar cristales, podría deberse a una propiedad intrínseca del heterohexámero. También podría deberse a que las condiciones utilizadas temporalmente, bajos pH y fuerza iónica, para mantener en forma monomérica y facilitar la interacción de las proteínas que lo componen, hubiesen alterado, de forma no totalmente reversible, su conformación, perturbando en cierta extensión su ensamblaje e impidiendo su cristalización, aunque sin llegar a imposibilitar que alcance su estado de oligomerización hexamérica.

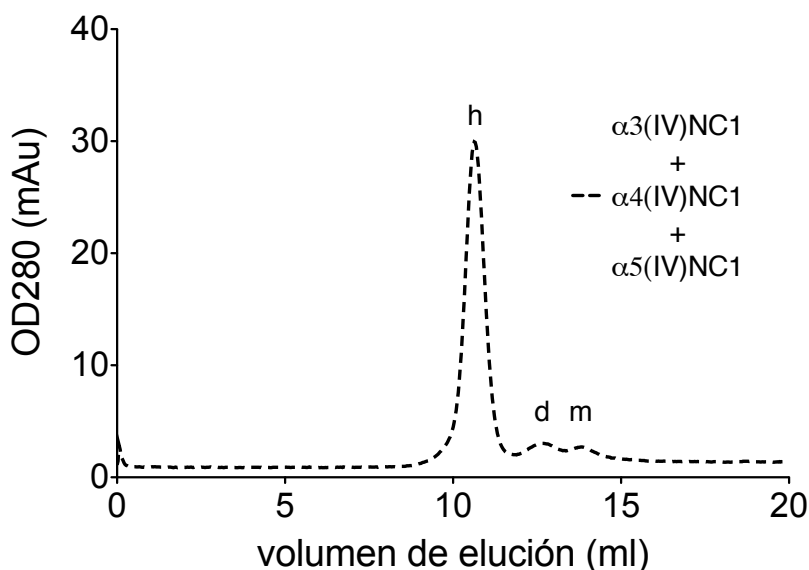


Figura 45. Perfil cromatográfico tras cromatografía de exclusión molecular de una mezcla equimolecular de $\alpha 3(IV)NC1$, $\alpha 4(IV)NC1$ y $\alpha 5(IV)NC1$.

La muestra fue preparada a pH 3 y baja fuerza iónica y equilibrada de nuevo en TBS. El cromatograma obtenido es consistente con el ensamblaje de las tres proteínas como un heterohexámero. h: hexámero; d: dímero; m: monómero.

Se realizaron diversas aproximaciones mas para intentar cristalizar el heterohexámero de $\alpha 3(IV)NC1$, $\alpha 4(IV)NC1$ y $\alpha 5(IV)NC1$: Expresión y purificación de cada una de las tres proteínas en cultivos infectados independientemente o purificación de las tres proteínas a partir de cultivos infectados con los tres baculovirus simultáneamente; purificación de las proteínas expresadas tras infectar células con el vector pFastBac Dual modificado en el que $\alpha 3(IV)NC1$, $\alpha 4(IV)NC1$ y $\alpha 5(IV)NC1$ se clonaron conjuntamente, de tal forma que las tres proteínas siguiesen simultáneamente el mismo procesamiento dentro de la maquinaria celular; aislamiento mediante cromatografía de exclusión molecular, independientemente, de las fracciones monoméricas de $\alpha 3(IV)NC1$, $\alpha 4(IV)NC1$ y $\alpha 5(IV)NC1$, (fracciones “ultrapurificadas”), posterior mezcla en cantidades equimoleculares para permitir su ensamblaje y, posterior concentración. En todos lo casos, el perfil de los cromatogramas es consistente con la presencia, en la fracción hexamérica, de heterohexámeros de $\alpha 3(IV)NC1$, $\alpha 4(IV)NC1$ y $\alpha 5(IV)NC1$ y de homohexámeros de $\alpha 5(IV)NC1$, y de nuevo, los ensayos de cristalización proporcionaron el mismo resultado: sólo se generaron cristales de homohexámero $\alpha 5(IV)NC1$.

Dado que todos los α (IV)NC1 recombinantes portan en el extremo N-terminal una región variable de hélice alfa (9 aminoácidos en el caso de α 3(IV)NC1 y entre 11-15 residuos en el resto de α (IV)NC1) investigamos si su eliminación en α 5(IV)NC1 tenía alguna repercusión en su autoasociación. El motivo de la existencia en las construcciones del material recombinante de esta pequeña cola N-terminal deriva de que los dominios α (IV)NC1 obtenidos de fuente natural incorporan esta extensión como consecuencia de ser producto del proceso de solubilización con la colagenasa bacteriana. Tanto en otros laboratorios, como en el nuestro, los α (IV)NC1 se clonaron en diferentes vectores de forma equivalente a como se hizo aquí con α 3(IV)NC1, la diana predicha para la respuesta autoinmune, y por tanto en todos los α (IV)NC1 recombinantes se incorporó la correspondiente región de hélice alfa. Diseñamos ahora una construcción α 5(IV)NC1 sin los quince residuos N-terminales correspondientes a la cadena α 5(IV), de forma que sólo incluyera el dominio α 5(IV)NC1 propiamente dicho y que llamamos α 5(IV)NC1del15aaN-term (clonado a partir de la Ser1459, en lugar de la Gly1445).

La expresión de α 5(IV)NC1del15aaN-term generó una proteína soluble con una movilidad electroforética bajo condiciones reductoras compatible con su masa molecular (Figura 46).

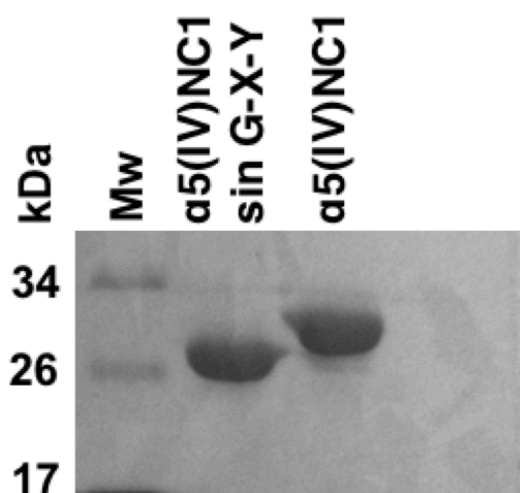


Figura 46. PAGE-SDS de α 5(IV)NC1 y su variante α 5(IV)NC1del15aaN-term.

La tinción de Coomassie del gel (condiciones reductoras y 10 % poliacrilamida) muestra los marcadores de peso molecular (Mw) con sus masas en kDa y la distinta movilidad electroforética entre ambas variantes compatible con su diferente masa molecular.

La comparación del cromatograma de exclusión molecular de ambas proteínas a una concentración de 1 mg/ml también reveló volúmenes de elución mayores tanto para el homohexámero como para el monómero de la variante delecionada (Figura 47). Interesantemente, la proporción de la fracción hexamérica correspondiente a la variante delecionada era mucho menor que aquella de la proteína $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ original cromatografiadas bajo las mismas condiciones. Así, la presencia del fragmento N-terminal de 15 aminoácidos parece facilitar la formación del homohexámero $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$. Podría ser que este fragmento actuase como factor de nucleación, favoreciendo la formación de la triple hélice y el posterior ensamblaje del protómero.

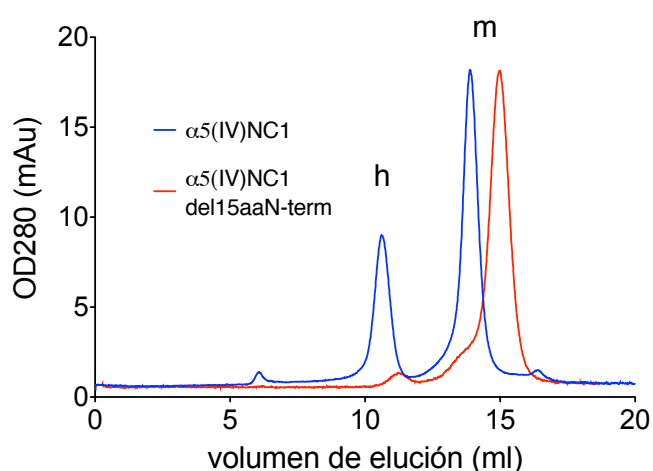


Figura 47. Perfil de elución tras cromatografía de exclusión molecular de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ y su variante $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1del15aaN-term}$.

Las diferencias en los volúmenes de elución correspondientes al homohexámero y al monómero de la variante delecionada respecto de la proteína $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ debidas a la reducción de sus masas moleculares acompañan a la escasa presencia de la forma hexamérica de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1del15aaN-term}$.

La disponibilidad de la variante $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1del15aaN-term}$ que exhibía un mayor desplazamiento del equilibrio de los oligómeros hacia la forma monomérica podría favorecer el rendimiento de formación de heterohexámeros de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ y quizás también su cristalización.

Se partió de fracciones monoméricas ultrapurificadas de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1del15aaN-term}$, para evitar al máximo proteínas contaminantes. Tras someterlas a condiciones de asociación se concentraron a $\sim 7,4$ mg/ml.

Ambas preparaciones (con $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1del15aaN-term}$ o $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$) se comportaron ligeramente diferente en la cromatografía de exclusión molecular (Figura 48) aunque los perfiles cromatográficos, a la vista de los resultados anteriores, indican que ambas fracciones hexaméricas deben estar constituidas por heterohexámeros de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1del15aaN-term}$ y homohexámeros de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1del15aaN-term}$ en un caso, y por heterohexámeros de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ y homohexámeros de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$, en el otro. Como se aprecia en la Figura 48 la fracción hexamérica de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1del15aaN-term}$ eluye un poco más tarde (0,3 ml) y su pico es ligeramente más abierto que el correspondiente a la fracción equivalente de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$, lo que es consistente, respectivamente, con el tamaño ligeramente menor del componente $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1del15aaN-term}$ en los hexámeros de esta preparación y con su mayor heterogeneidad en tamaños ($6 \times [X-15\text{aa}]$ y $(4 \times X + 2 \times [X-15\text{aa}])$) frente a $6 \times X$ en el material sin deleccionar (Figura 48). Probablemente, los fragmentos de cadenas α de 15aa en los NC1 no deleccionados, influyen ligeramente su plegamiento y perturban su movilidad cromatográfica, lo que conduce a las diferencias observadas experimentalmente.

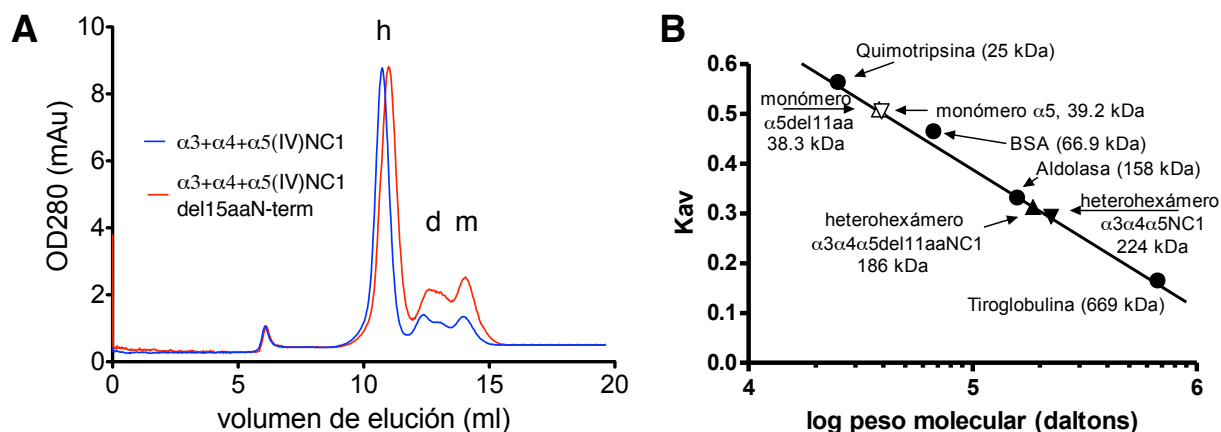


Figura 48. Caracterización del heterohexámero formado por $\alpha 3(IV)NC1$, $\alpha 4(IV)NC1$ y $\alpha 5(IV)NC1del15aaN-term$.

A) Cromatografía de exclusión molecular de preparaciones de ensamblaje de mezclas equimoleculares de monómeros “ultrapurificados” concentradas a 7,4 mg/ml. **B)** Curva de calibración de la columna. $K_{av} = (V_e - V_o) / (V_t - V_o)$; K_{av} : equivalente a la constante de distribución. V_e : volumen de elución de la proteína. V_o : volumen vacío de la columna estimado a partir del volumen de elución de azul dextran 2000 (7,8 ml). V_t : volumen total de la columna (21,4 ml). Marcadores de masas moleculares: Quimotripsina (25 kDa), BSA (66,9 kDa), Aldolasa (158 kDa), Tiroglobulina (669 kDa).

Desafortunadamente, a pesar del esfuerzo realizado y la esperanza de éxito tras el comportamiento cromatográfico observado en $\alpha 5(IV)NC1del15aaN-term$, sólo se obtuvieron cristales de homohexámeros $\alpha 5(IV)NC1$, por lo que abandonamos los intentos para encontrar condiciones que permitiesen la cristalización del heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(IV)NC1$.

2.1.2 Estructura de los restantes $\alpha(IV)NC1$.

Los resultados cristalográficos obtenidos con $\alpha 5(IV)NC1$ nos impulsaron a tratar de resolver la estructura cristalina de los seis tipos de $\alpha(IV)NC1$ así como de los posibles hetero-oligómeros dado que en la naturaleza se han detectado, además de los heterohexámeros $(\alpha 3,4,5)_2(IV)NC1$, los heterohexámeros $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(IV)NC1$ y $(\alpha 5,6,6(IV))_2NC1$. Se clonaron y expresaron con el sistema de baculovirus/células de insecto el resto de $\alpha(IV)NC1$. La Figura 49 muestra la pureza, movilidad electroforética y comportamiento cromatográfico (exclusión molecular) de las proteínas obtenidas, una

vez purificadas. Todas las proteínas migran y eluyen como monómeros excepto $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ que, como ya mostramos arriba, eluye también como complejo hexamérico.

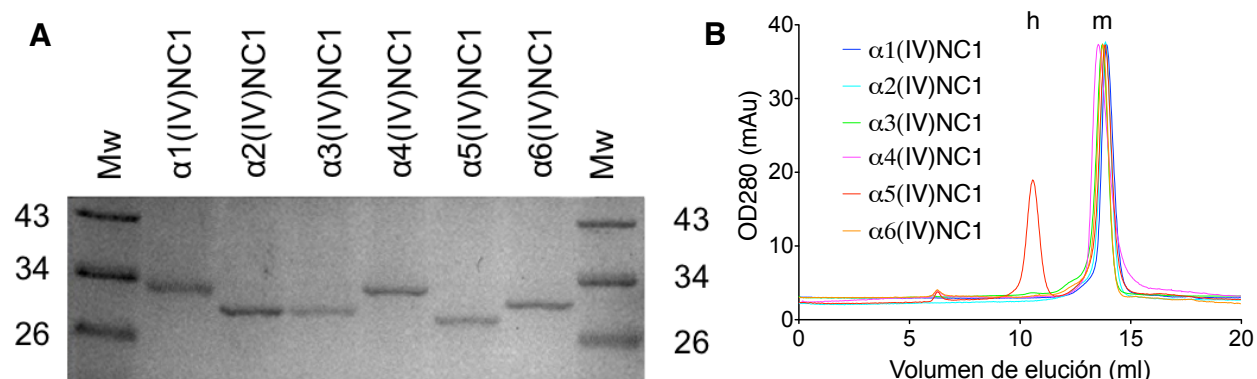


Figura 49. Análisis de los seis tipos de proteínas recombinantes $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$.

A) Tinción de azul de Coomassie tras someter las proteínas a electroforesis PAGE-SDS bajo condiciones reductoras y 12,5 % poliacrilamida. Las proteínas están flanqueadas por los marcadores de masa molecular que viene indicada en kDa. B) Cromatograma exclusión molecular de las proteínas recombinantes $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ (1 mg/ml) expresadas con el sistema de baculovirus/células de insecto y purificadas con una columna de afinidad anti-FLAG.

- Expresión, asociación y estado de oligomerización de las diferentes proteínas $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ y de mezclas de pares de las mismas.

La **Tabla 4** reúne las propiedades oligoméricas de las proteínas $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ y de asociaciones por pares entre ellas.

Tabla 4. Abundancia de forma hexamérica (%) en mezclas de pares de proteínas $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$.

Proteína	$\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$	$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$	$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$	$\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$	$\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$	$\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$
$\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$	0	30,5	15,2	0	59,8	23,0
$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$		0	8,3	0	44,3	0
$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$			0	0	95,5	0
$\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$				0	52,8	0
$\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$					29,6	69,3
$\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$						0

Bajo las condiciones de ensayo utilizadas (1 mg de cada proteína/ml) esencialmente sólo se detectaron, tras cromatografía de exclusión molecular, monómeros y formas oligoméricas hexaméricas. Dado que $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ es la única proteína que exhibe la capacidad de formar homohexamémeros, los hexámeros generados tras las mezclas de

pares de $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ corresponden a heterohexámeros. En el caso de mezclas que comprometen a $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$, si no hubiese heteroasociación, cabría esperar un $\sim 85\%$ de la proteína total en forma de monómero y un 15% en forma de homohexámero correspondiente a $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$. Toda variación respecto a esta distribución se debe a la formación de algún tipo de heterohexámero $\alpha i \alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$. En la tabla destaca la alta capacidad de asociación de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ con todos los $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$, incluido $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$, siendo especialmente llamativa la avidez entre $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$.

Se intentó obtener cristales a partir de cada una de estas proteínas recombinantes así como de las combinaciones ya encontradas en la naturaleza. Además de cristales de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$, se obtuvieron cristales de $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$, así como de mezclas de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ con $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$ y de $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ y con $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$. La Figura 50 muestra los diferentes cristales obtenidos a partir de las proteínas indicadas.

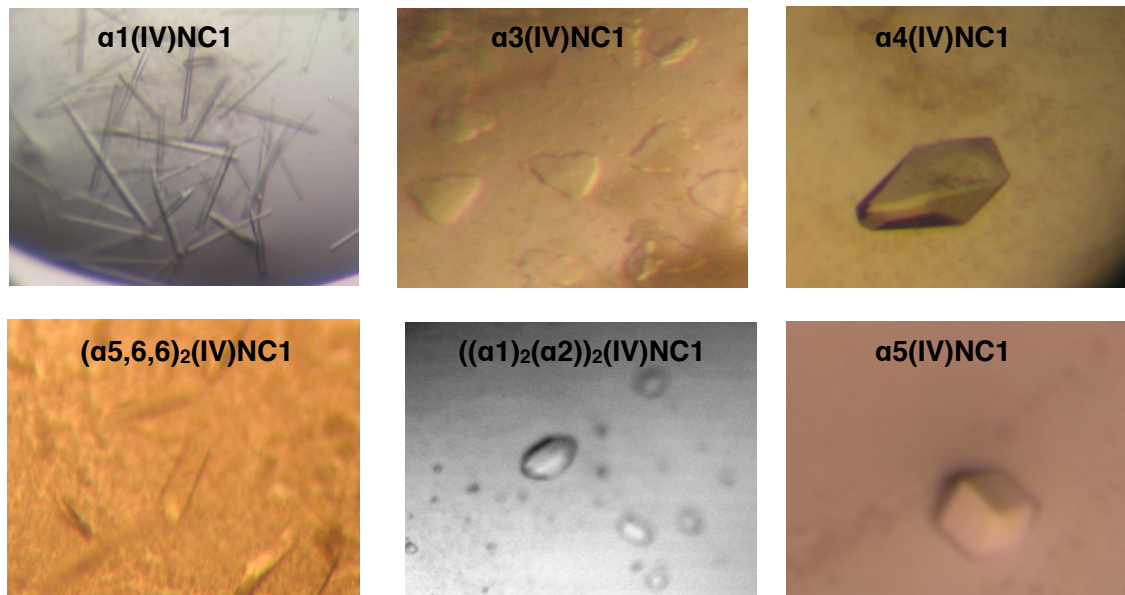


Figura 50. Cristales obtenidos de las proteínas $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ indicadas y mezclas de ellas.

Los cristales de $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ pertenecieron al grupo espacial ortorrómbico $P2_12_12_1$ con parámetros de la celda unidad $a=94,85 \text{ \AA}$, $b=127,05 \text{ \AA}$, $c=130,54 \text{ \AA}$ y $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$; los cristales de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ pertenecieron al grupo espacial hexagonal $H3$ con parámetros de

la celda unidad $a=b=131,52 \text{ \AA}$, $c=248,86 \text{ \AA}$ y $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$; los cristales de $\alpha_4(\text{IV})\text{NC1}$ pertenecieron al grupo espacial ortorrómbico $C222_1$ con parámetros de la celda unidad $a=145,58 \text{ \AA}$, $b=167,56 \text{ \AA}$, $c=155,41 \text{ \AA}$ y $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$; los cristales de $\alpha_5(\text{IV})\text{NC1}$ pertenecieron al grupo espacial cúbico $P4_32$ con parámetros de la celda unidad $a=b=c=121,28 \text{ \AA}$ y $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$; los cristales de mezclas de pares de $\alpha_1(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha_2(\text{IV})\text{NC1}$ pertenecieron al grupo espacial trigonal $P3_121$ con parámetros de la celda unidad $a=b=126,15 \text{ \AA}$, $c=216,21 \text{ \AA}$ y $\alpha=\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$ y resultaron ser heterohexámeros $((\alpha_1)_2(\alpha_2))_2(\text{IV})\text{NC1}$; finalmente, los cristales de mezclas de pares de $\alpha_5(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha_6(\text{IV})\text{NC1}$ pertenecieron al grupo espacial ortorrómbico $C222_1$ con parámetros de la celda unidad $a=158,41 \text{ \AA}$, $b=178,39 \text{ \AA}$, $c=121,80 \text{ \AA}$ y $\alpha=\beta=\gamma=90^\circ$, y resultaron ser heterohexámeros $(\alpha_5,6,6)_2(\text{IV})\text{NC1}$. Ver detalles en la Tabla 1 en metodología.

La Figura 51 muestra una representación en superficie de la estructura de los diferentes cristales de $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ obtenidos. El cristal de $\alpha_1(\text{IV})\text{NC1}$ contiene seis moléculas en la unidad asimétrica formando un homohexámero (Figura 51A). El cristal de $\alpha_3(\text{IV})\text{NC1}$ contiene ocho moléculas en la unidad asimétrica, de las que, seis constituyen un homohexámero y las otras dos forman parte de un homohexámero generado mediante simetría cristalográfica (Figura 51B). El caso de $\alpha_4(\text{IV})\text{NC1}$ resulta especial, pues en su cristal, hay seis moléculas en la unidad asimétrica, tres de las cuales se sitúan de modo consecutivo a lo largo de un anillo hexamérico y los otras tres se encuentran justo debajo de éstas, dispuestas en otro anillo hexamérico. Así, las seis moléculas de $\alpha_4(\text{IV})\text{NC1}$ forman parte de un homohexámero particular, que, mediante simetría cristalográfica, genera un homodecámero (Figura 51C). El cristal de $\alpha_5(\text{IV})\text{NC1}$ posee una molécula en la unidad asimétrica formando un homohexámero (Figura 51D). El cristal de mezcla de $\alpha_5(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha_6(\text{IV})\text{NC1}$ está constituido por seis moléculas en la unidad asimétrica que dan lugar al heterohexámero $(\alpha_5,6,6)_2(\text{IV})\text{NC1}$, en donde cada

protómero se forma por una molécula de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ y dos de $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$ (Figura 51E). El cristal de mezcla de $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$ también contienen seis moléculas en la unidad asimétrica dando lugar al heterohexámero $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$, que se ensambla siguiendo la misma disposición que el heterohexámero de placenta humana $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$ (PDB id:1LI1), en donde cada protómero está formado por una molécula de $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$ y dos moléculas de $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ (Figura 51F).

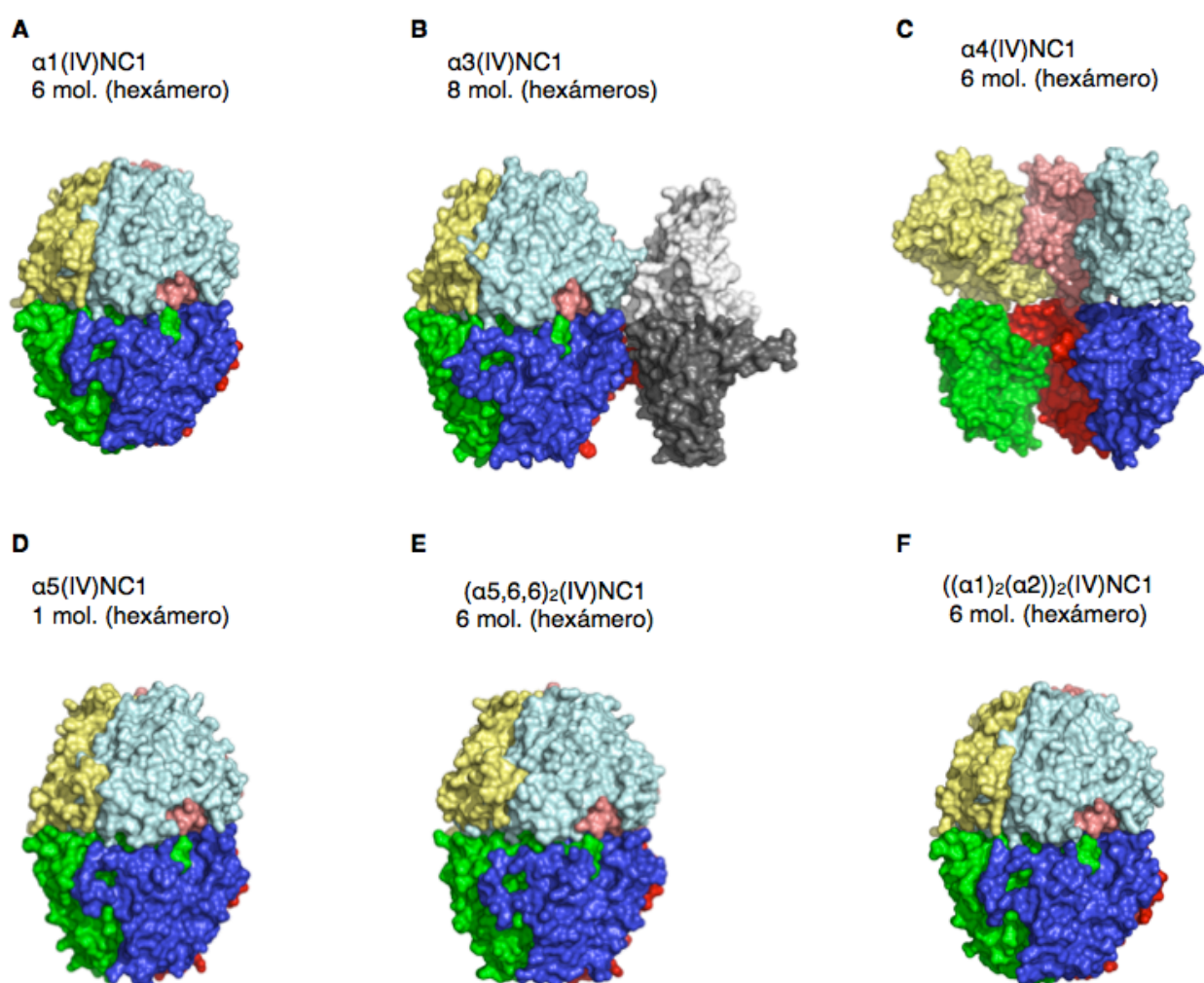


Figura 51. Representación en superficie de la estructura cuaternaria de los diferentes cristales de $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ obtenidos.

Los homohexámeros de $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ y los heterohexámeros $(\alpha 5,6,6)_2(\text{IV})\text{NC1}$ y $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$ presentan idéntica estructura cuaternaria al heterohexámero $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$ obtenido de fuente natural. Sin embargo, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ forma parte de un homohexámero particular, que, mediante simetría cristalográfica, genera un homodecámero.

Los homohexámeros $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ al igual que los heterohexámeros $(\alpha 5,6,6)_2(\text{IV})\text{NC1}$ y $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$ presentaron volúmenes similares ($\sim 195.000 \text{ \AA}^3$), así como áreas de superficie con ligera variabilidad (desde 33.700 a 35.900 \AA^2) y con un valor RMSD de superposición inferior a $0,8 \text{ \AA}$ (Tabla 5). Todas las estructuras de homo y heterohexámeros obtenidas, excepto $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$, mostraron la estructura hexamérica cuaternaria típica de los $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$, un elipsoide alargado idéntico a la estructura $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$ del heterohexámero de placenta humana (PDB id:1LI1), de placenta bovina (PDB id:1T61) y de cápsula de cristalino bovino (PDB id:1M3D, 1T60). La reproducción fiel de la estructura 3D del heterohexámero $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$ obtenido de fuente natural con nuestro material recombinante del heterohexámero $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$ obtenido de fuente natural, valida el sistema de expresión con baculovirus y células de insecto que hemos usado y apunta al hecho de que el resto de estructuras que hemos obtenido pudiesen también corresponderse con posibles estructuras cuaternarias fisiológicas no identificadas hasta el momento.

Tabla 5. Propiedades físicas de los hexámeros $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ obtenidos.

	$\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$	$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$	$\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$	$((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$	$(\alpha 5,6,6)_2(\text{IV})\text{NC1}$	
Volumen (Å^3)	194.840	194.485	193.234	194.959	196.313	
Area superficie (Å^2)	34.210,2	35.143,6	33.696,6	34.361,7	35.902,6	
Radio esférico (Å)	35,96	35,94	35,86	35,97	36,05	
R M S D (Å)	$\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$	-	0,62	0,55	0,59	0,66
	$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$		-	0,67	0,72	0,76
	$\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$			-	0,67	0,75
	$((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$				-	0,66
	$(\alpha 5,6,6)_2(\text{IV})\text{NC1}$					-

El hexámero tipo, se encuentra constituido por dos protómeros o trímeros, el superior formado por las subunidades A, B y C y el inferior por las subunidades D, E y F. El caso de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ resulta particular pues este presenta tres subunidades A, B y C que interaccionan con tres subunidades D, E y F, ubicadas en posición inferior. Los monómeros de un trímero se relacionan con los del trímero opuesto mediante un eje binario, independientemente de que pertenezcan a un homohexámero o a un heterohexámero. Dentro del propio trímero, los monómeros se relacionan a través de un eje ternario, a excepción del homohexámero de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ en donde A-B, A-C, D-E, D-F se relacionan mediante un eje hexagonal y sólo C-B y E-F lo hacen mediante un eje ternario. El cambio en los ejes de geometría de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ conlleva un desapareamiento que impide la adquisición de la estructura típica del hexámero, pasando a adquirir una estructura dodecamérica abierta. Figura 52.

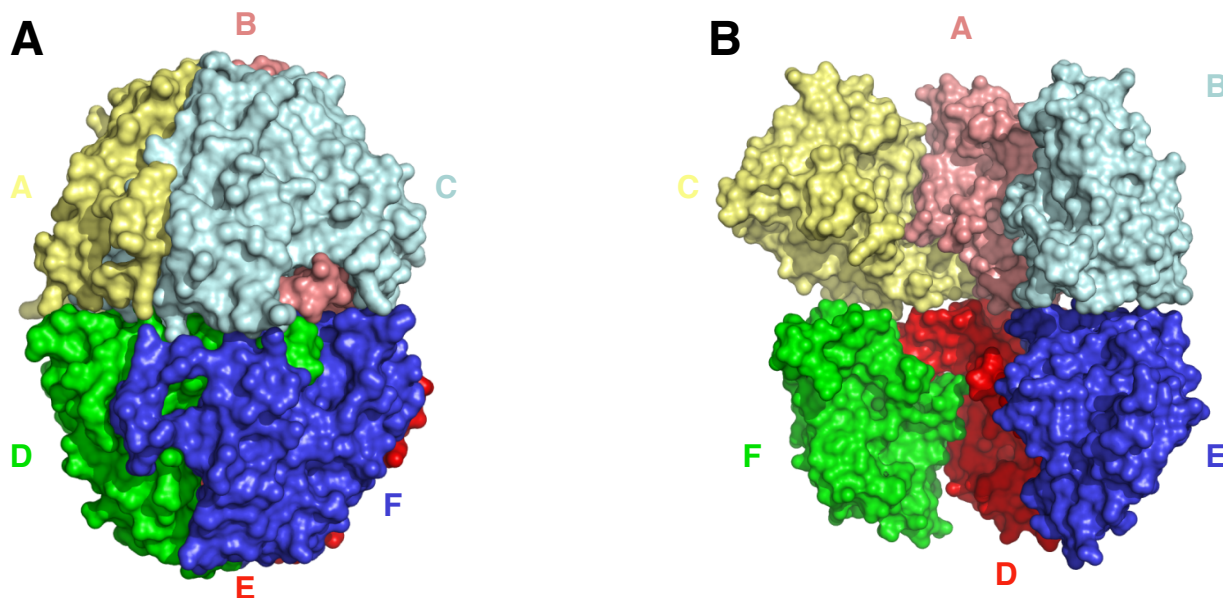


Figura 52. Distribución de los monómeros constituyentes en la estructura cuaternaria de los $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ resueltos.

A) Distribución en el hexámero tipo, en donde los monómeros A, B y C forman el trímero superior y los monómeros D, E y F forman el trímero inferior. **B)** Distribución de los monómeros en el homohexámero $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$.

Todas las estructuras, a excepción de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$, presentaron una superficie de interacción similar entre los monómeros que constituyen los trímeros ($\sim 4.000 \text{ \AA}^2$), sin embargo la superficie de interacción entre monómeros de trímeros opuestos, resultó de mayor variabilidad, mostrando mayor interacción ($\sim 2.000 \text{ \AA}^2$) entre los monómeros A-D, B-E y C-F, aproximadamente la mitad ($\sim 1.200 \text{ \AA}^2$) entre los monómeros A-F, B-D y C-E y una ligera interacción ($\sim 100 \text{ \AA}^2$) entre A-E, B-F y C-D, (ver Tabla 6). En el caso de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$, los monómeros A-B, A-C, D-E y D-F ubicados dentro del trímero mostraron una superficie de interacción relativamente menor respecto a los hexámeros tipo ($\sim 2000 \text{ \AA}^2$) y una superficie reducida ($\sim 600 \text{ \AA}^2$) entre los monómeros A-D, A-E, B-E, C-D y C-F de trímeros opuestos.

Tabla 6. Comparación de las superficies de interacción (Å^2) entre los monómeros que constituyen los trímeros/hexámeros $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ indicados.

Área de interacción	$\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$	$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$	$\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$	$\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$	$((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$	$(\alpha 5,6,6)_2(\text{IV})\text{NC1}$
A-B	4544	4.364	2.089	4.163	4.547	4.570
A-C	4568	4.320	2.124	4.163	4.222	4.338
B-C	4.544	4.447	-	4.163	4.435	4.583
D-E	4.624	4.406	2.031	4.182	4.154	4.432
D-F	4.569	4.450	2.076	4.182	4.324	4.392
E-F	4.620	4.238	-	4.183	4.305	4.397
A-D	2.259	2.237	751	1.658	1.952	2.217
A-E	146	102	564	79	25	121
A-F	1.162	1.101	-	882	737	1.020
B-D	1.146	1.089	-	883	801	779
B-E	2.222	2.227		1.658	1.874	1.937
B-F	101	102	-	79	148	123
C-D	135	103	583	79	17	125
C-E	1.179	1133	-	882	850	680
C-F	2.292	2.262		1.658	1.880	2.187

2.2 Relación entre los α (IV)NC1 en base a la interacciones entre residuos.

En términos estructurales, cada uno de los α (IV)NC1 está formado por dos dominios C4 (número de acceso SMART SM00111) encontrándose uno de ellos ($C4_1$; residuos 1-114) girado 60° respecto al otro dominio ($C4_2$; residuos 115-230/4) (ver mas adelante). Tras analizar las estructuras de los α (IV)NC1 resueltos aquí, se distinguen tres grandes tipos de interacciones entre sus residuos constituyentes. (I) Interacciones que ocurren entre las subunidades que mantienen unidos los dominios C4, (II) Interacciones que mantienen la estructura del trímero y (III) Interacciones que mantienen la estructura hexamérica.

2.2.1 Interacciones entre subunidades que mantienen los dominios C4 juntos.

En los monómeros de $\alpha 1$ (IV)NC1, $\alpha 2$ (IV)NC1, $\alpha 3$ (IV)NC1, $\alpha 5$ (IV)NC1 y $\alpha 6$ (IV)NC1, las interacciones que estabilizan los dominios C4 se corresponden fundamentalmente con los residuos 10-13 que interactúan con los residuos 166-169, residuos 35-37 que interactúan con los residuos 146-149, residuos 41-47 que interactúan con los residuos 152-156, residuos 80-84 que interactúan con los residuos 169-178, residuos 90-96 que interactúan con los residuos 182-183 y por último los residuos 113-114 que interactúan con el residuo 115.

En el caso de $\alpha 4$ (IV)NC1 se han mantenido ciertas interacciones, tales como el residuo 13 con los residuos 164-167, el residuo 35 con el residuo 143, el residuo 94 con el residuo 181, el residuo 114 con el residuo 115. Debido a los cambios conformacionales en esta proteína respecto al resto de α (IV)NC1 se han producido variaciones en ciertas interacciones, por lo que los residuos 73-85 ahora interactúan con los residuos 167-177 y se pierde la interacción entre los residuos 41-47 y los residuos 152-156.

2.2.2 Interacciones que mantienen la estructura del trímero.

El segundo tipo de relaciones son responsables de la formación del trímero e implican un mayor número de interacciones entre las subunidades A-B, B-C, C-A en un trímero y las subunidades D-E, E-F y F-D en el trímero opuesto. En los homohexámeros $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$, la interacción entre A-B es igual a la existente entre D-E (A-B=D-E), la interacción existente entre B-C es igual a la existente entre E-F (B-C=E-F) y finalmente la interacción C-A es igual a la existente entre F-D (C-A=F-D). Por tanto, las interacciones existentes entre las subunidades A-B, B-C y C-A son similares e implican un porcentaje elevado de interacciones polares, tales como la interacción de la His₄ con la Met₁₁₆; residuos Asn₃₉-Gln₄₅ con los residuos Thr₁₄₇-Leu₁₅₈ y Arg₅₅-Lys₅₆-Gln₁₂₃; residuos Phe₅₆-Arg₇₆ con los residuos Ser₁₉₀-Leu₂₁₀ y Glu₁₁₂-Trp₁₃₄ y por último, un puente salino entre el Glu₁₁₂ y la Arg₂₂₇.

Los heterohexámeros $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$ y $(\alpha 5,6,6)_2(\text{IV})\text{NC1}$ comparten las mismas regiones de interacción que los homohexámeros con la salvedad que en $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$ las interacciones entre A-B son iguales a las interacciones entre F-D (A-B=F-D) y se corresponden a interacciones entre $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ - $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$; las interacciones entre B-C son iguales a las interacciones entre D-E (B-C=D-E) y se corresponden a interacciones entre $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ - $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$ y finalmente las interacciones entre C-A son iguales a las existentes entre E-F (C-A=E-F) y corresponden a interacciones entre $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$ - $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$. De igual forma, en el heterohexámero $(\alpha 5,6,6)_2(\text{IV})\text{NC1}$, las interacciones entre A-B son iguales a las existentes entre F-D (A-B=F-D) y se corresponden a contactos entre $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ - $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$; las interacciones entre B-C son idénticas a las existentes entre D-E (B-C=D-E) y se corresponden a contactos entre $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$ - $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$ y las interacciones entre C-A son idénticas a las

interacciones existentes entre E-F (C-A=E-F) y se corresponden a contactos entre $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$ - $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$.

En $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$, estas interacciones engloban a las subunidades A-B, que son idénticas a las interacciones existentes entre D-F (A-B=D-F) y las interacciones entre las subunidades C-A que son idénticas a las interacciones existentes entre E-D (C-A=E-D). Todas las interacciones engloban contactos similares, ya sean polares o hidrofóbicos, que se corresponden con contactos entre Trp₂₈-Gly₁₅₃, Thr₂₉-Gln₁₂₁, puente salino Glu₄₀-Lys₄₁, residuos Pro₆₁-Tyr₆₄ con los residuos Ala₁₄₄-Gly₁₄₇, Ile₆₇-Ser₁₈₉ y Val₇₀-Phe₁₈₄.

2.2.3 Interacciones que mantienen la estructura hexamérica.

El último grupo engloba interacciones entre ambos trímeros para estabilizar el hexámero e implica interacciones entre las subunidades A-D, A-E, A-F, B-D, B-E, B-F, C-D, C-E y C-F. De acuerdo con la área de interacción compartida entre subunidades opuestas dentro del hexámero, la interfaz más pequeña corresponde a A-E, B-F y C-D las cuales poseen sólo una interacción polar entre Asn₆₈-Asn₆₈. En $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$, las subunidades A-E y C-D no muestran esta interacción polar, ya que al tratarse las subunidades C y E de $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$, poseen un residuo de Gly₆₈ en vez del Asn impidiendo la formación del contacto polar entre esta subunidad y $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$. En $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$, B-F no interaccionan, el residuo 68 es una His y los cambios conformacionales experimentados ocasionan la formación de nuevos contactos polares entre Gln₆₉C-Gln₁₇₈D, Ala₇₄C-His₇₂D, His₇₂A-Tyr₇₃E y un contacto hidrofóbico entre His₇₂-Arg₁₇₇.

Las subunidades ubicadas alrededor del hexámero que comparten una área de interacción moderada son A-F, B-D y C-E, que en $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ muestran contactos similares entre las respectivas subunidades (A-F=B-D=C-E) e

implican un contacto polar entre Met₉₁-Lys₂₁₁/Lys₂₁₁-Met₉₁, contactos hidrofóbicos Gly₁₅₀-Ala₁₅₁/Ala₁₅₁-Gly₁₅₀ (en α₃(IV)NC1 Ala₁₅₁ es Ser₁₅₁) y Asn₁₈₇-Asn₁₈₇, junto con un juego de contactos polares entre los residuos Ala₁₈₆-Tyr₁₈₉ con los residuos Ala₁₈₆-Tyr₁₈₉. En ((α₁)₂(α₂))₂(IV)NC1, el contacto polar entre la Met₉₁-Lys₂₁₁/Lys₂₁₁-Ser₉₂ se encuentra presente en A-F (α₁(IV)NC1-α₁(IV)NC1) y Met₉₃-Lys₂₁₁/Lys₂₁₁-Met₉₁ en B-D (α₁(IV)NC1-α₁(IV)NC1), pero no en C-E (α₂(IV)NC1-α₂(IV)NC1), las interacciones entre Gly₁₅₀-Ala₁₅₁/Ala₁₅₁-Gly₁₅₀ están presentes en A-F y B-D, pero no en C-E; sin embargo, los residuos Ala₁₈₆-Tyr₁₈₉ están presente en todos ellos. En (α_{5,6,6})₂(IV)NC1, el contacto polar entre la Met₉₁-Lys₂₁₁ se encuentra presente únicamente en A-F (α₅(IV)NC1-α₅(IV)NC1), no en B-D (α₆(IV)NC1-α₆(IV)NC1) ni en C-E (α₆(IV)NC1-α₆(IV)NC1). En A-F las interacciones hidrofóbicas Gly₁₅₀-Ala₁₅₁/Ala₁₅₁-Gly₁₅₀ y Asn₁₈₇-Asn₁₈₇ están presentes, así como las interacciones hidrofóbicas Ala₁₄₉-Gly₁₄₈ en B-D y C-E. Las interacciones polares Asn₁₈₇-Tyr₁₈₉/Tyr₁₈₉-Asn₁₈₇ que se encuentran en A-F, poseen interacciones homólogas en B-D y C-E entre Tyr₁₈₈-Ala₁₈₅-Asn₁₈₆. El hecho de que los heterohexámeros ((α₁)₂(α₂))₂(IV)NC1 y (α_{5,6,6})₂(IV)NC1 hayan perdido el contacto polar entre la Met₉₁-Lys₂₁₁ entre las subunidades impares parece indicar que estos se restringen a las interacciones entre subunidades pares. La estructura cristalina del hexámero de placenta humana ((α₁)₂(α₂))₂(IV)NC1 (PDB:1LI1), presenta también un puente similar entre la Ser₉₂-K₂₁₁ en las subunidades impares (α₁(IV)NC1-α₁(IV)NC1) (ubicadas en los monómeros A-F y B-D), las cuales están ausentes entre las subunidades pares (α₂(IV)NC1-α₂(IV)NC1) (ubicadas en los monómeros C-F), y finalmente, cerca de este puente polar, existe un enlace sulfilimina (N-S) entre la Met₉₃-Lys₂₁₁ en A-F, B-D y C-F y que no hemos detectado en ninguna de las estructuras aquí obtenidas.

La mayor zona de interacción dentro del hexámero es la compartida por A-D, B-E y C-F, que en $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ muestran contactos similares con interacciones polares en las que participan los residuos $\text{Asn}_{39}\text{-Asn}_{187}/\text{Asn}_{187}\text{-Asn}_{39}$ y $\text{Asn}_{39}\text{-Gly}_{150}/\text{Gly}_{150}\text{-Asn}_{39}$; $\text{Gln}_{40}\text{-Gln}_{37}$; $\text{Gln}_{40}\text{-Gln}_{40}$ (sustituida en $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ por Lys_{40}), $\text{Ala}_{74}\text{-Arg}_{179}$; la Arg_{76} forma una red con la Ser_{148} (sólo en $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$), un puente salino con el Glu_{175} , un contacto polar con la Arg_{179} y el Asn_{187} y finalmente un contacto hidrofóbico con la Tyr_{185} ; la región $\text{Asn}_{77}\text{-Asp}_{79}$ con la región $\text{Asn}_{77}\text{-Tyr}_{79}$, y por último sendos puentes salinos entre $\text{Glu}_{175}\text{-Arg}_{76}$ y $\text{Arg}_{179}\text{-Ala}_{74}$. En el caso de $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$, se observa en los monómeros A-D ($\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}\text{-}\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$) las mismas interacciones que se dan en los homohexámeros junto con interacciones entre el $\text{Gln}_{37}\text{-Glu}_{40}$, contactos hidrofóbicos entre $\text{Asn}_{77}\text{-His}_{177}/\text{His}_{177}\text{-Asn}_{77}$ y $\text{Arg}_{179}\text{-Gly}_{178}$; en los monómeros B-E ($\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}\text{-}\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$) también se observan las mismas interacciones que en los monómeros A-D junto con un el contacto específico $\text{Asn}_{183}\text{-Tyr}_{72}$ (ya que la Tyr_{72} es un residuo específico de $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$). Las interacciones entre los monómeros C-F ($\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}\text{-}\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$) son también similares a las existentes en los monómeros A-D con la única excepción de un puente salino entre $\text{Lys}_{79}\text{-Glu}_{40}$. En $(\alpha 5,6,6)_2(\text{IV})\text{NC1}$ las interacciones entre los monómeros A-D ($\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}\text{-}\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$), B-E ($\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}\text{-}\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$) y C-F ($\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}\text{-}\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$) son similares y únicamente aparecen contactos polares nuevos en la interacción entre los monómeros A-D entre el $\text{Gln}_{94}\text{-Arg}_{75}$, $\text{Gln}_{126}\text{-Arg}_{56}$. En $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$, las interacciones entre los monómeros A-D, B-E y C-F son semejantes y además aparece un puente salino entre $\text{Arg}_{79}\text{-Asp}_{78}$ e interacciones polares entre $\text{Arg}_{79}\text{-Ala}_{76}$, $\text{Arg}_{79}\text{-Gln}_{178}$, $\text{Glu}_{173}\text{-Gln}_{178}/\text{Gln}_{178}\text{-Glu}_{173}$, junto con la interacción entre $\text{Gln}_{178}\text{-His}_{182}$ en C-F. Para la observación detallada de todas estas interacciones es

necesario recurrir a los correspondientes PDBs generados de estas estructuras que se encuentran en fase de preparación para someterlos a publicación.

2.3 Ensamblado monómero-hexámero.

Como muestra la Tabla 7, la superposición de los monómeros de $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$ con $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ mostraron un valor de RMSD de $\sim 7,0 \text{ \AA}$, un orden de magnitud superior que el valor RMSD hallado para la superposición entre el resto de monómeros $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$. El elevado valor de RMSD con $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ se debe a los cambios conformacionales respecto al resto de $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ en las regiones I (residuos 38-44), II (residuos 63-77), III (residuos 90-93), IV (residuos 144-154), V (residuos 185-188) de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$, además de a la región VI (residuos 196-213) que no pudo trazarse al carecer de suficiente densidad electrónica por ser, probablemente, una región que permanece desordenada (Figura 53).

Tabla 7. Valor de RMSD de superposición de los monómeros $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ resueltos.

Monómero	$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$	$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$	$\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$	$\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$	$\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$
$\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ (\AA)	0,95	0,53	7,25	0,41	0,77
$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$ (\AA)	-	0,86	5,97	0,81	0,68
$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (\AA)		-	6,67	0,58	0,74
$\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ (\AA)*			-	7,07	6,22
$\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ (\AA)				-	0,77
$\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$ (\AA)					-

*Para el alineamiento con $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ se tomaron 208 residuos, en lugar de los 225 utilizados en el resto de proteínas $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$, debido a que parte de la estructura de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ no se pudo trazar por falta de densidad electrónica.

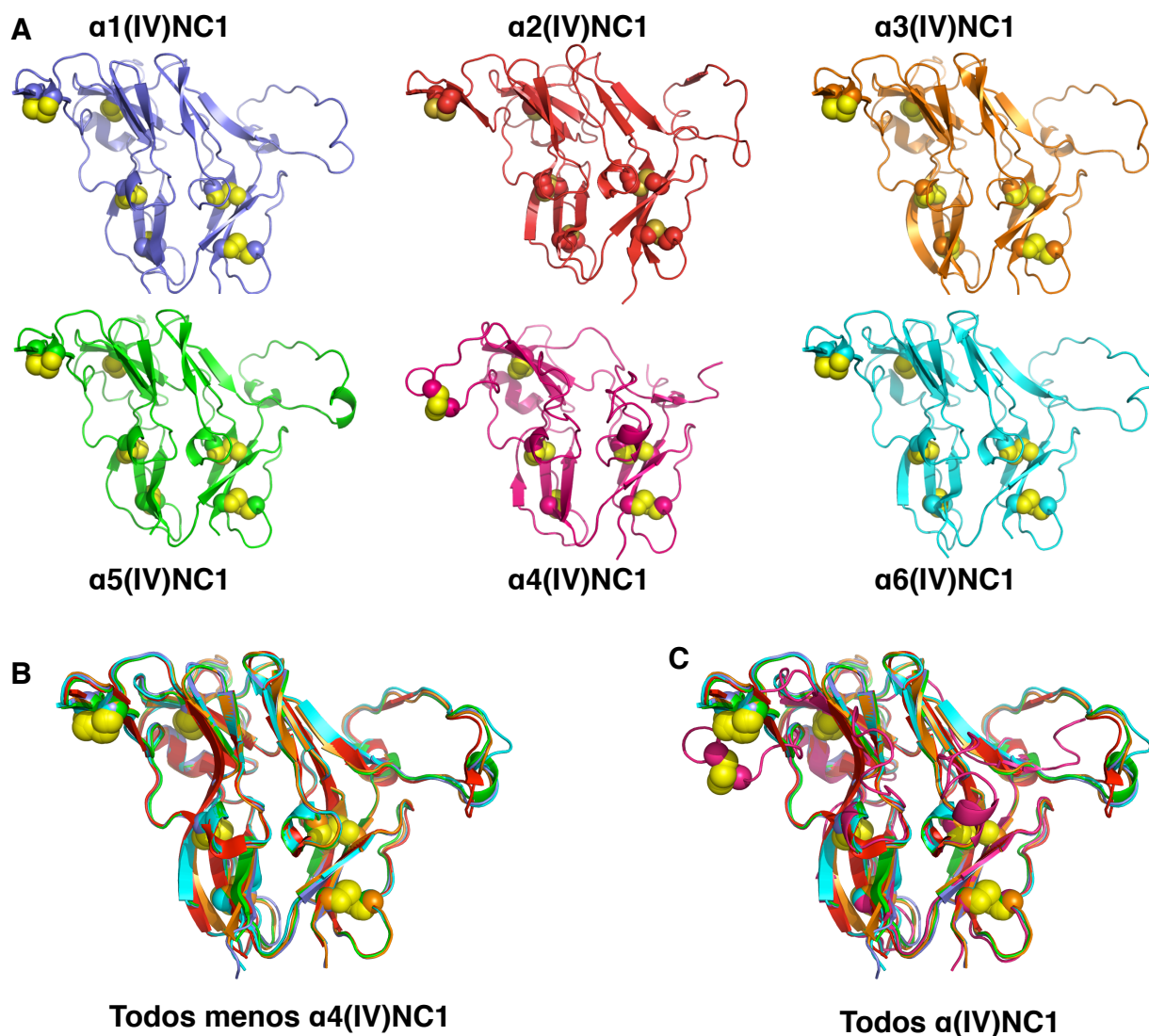


Figura 53. Estructura y superposición de los monómeros de las proteínas $\alpha(IV)NC1$.

A) Representación en cinta de la estructura de los seis monómeros $\alpha(IV)NC1$. **B)** Superposición de los monómeros $\alpha 1(IV)NC1$ (azul), $\alpha 2(IV)NC1$ (rojo), $\alpha 3(IV)NC1$ (naranja), $\alpha 5(IV)NC1$ (verde), y $\alpha 6(IV)NC1$ (cian). **C)** Misma superposición que en B pero incluyendo también $\alpha 4(IV)NC1$ (púrpura). En los tres paneles los puentes disulfuro se representan mediante esferas.

Como mencionamos antes, cada uno de los $\alpha(IV)NC1$ están formados por dos dominios C4 (número de acceso SMART SM00111), encontrándose uno de ellos ($C4_1$; residuos 1-114) girado 60° respecto al otro dominio ($C4_2$; residuos 115-230/4). Las regiones I a III (regI, regII y regIII) se encuentran en el dominio $C4_1$, mientras que las regiones IV a VI (regIV, regV y regVI) lo hacen en el dominio $C4_2$. La superposición de $C4_1$ y $C4_2$ en cada uno de los $\alpha(IV)NC1$ pone de relieve que la regI forma parte de una

horquilla-beta (34-44) que se superpone con la regIV, otra horquilla-beta; que la regII comprende una horquilla-beta (64-72) y un lazo que se superponen con la horquilla-beta (175-183) y el lazo de la regV y, finalmente, que la regIII es un lazo que se superpone con otro lazo de la regVI. En todos los α (IV)NC1, descontando α 4(IV)NC1, las regiones superpuestas muestran buenos valores RMSD ($\sim 1,2$ Å) a excepción de la superposición de las regiones III y VI. Sin embargo, en α 4(IV)NC1, todas las regiones que han sufrido cambios conformacionales (regI con regIV, regII con regV y regIII con la ausente regVI) muestran desviaciones elevadas, especialmente entre regI, regII y regIV que han perdido su estructura secundaria, Figura 54.

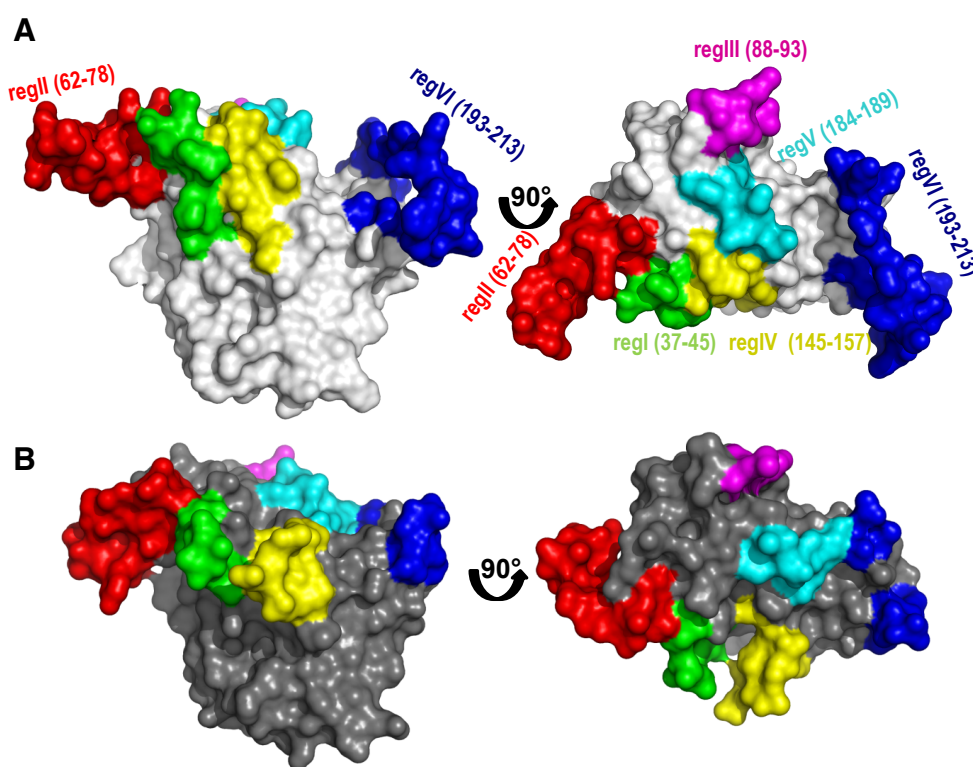


Figura 54. Representación en superficie de la organización de las diferentes regiones en los monómeros α (IV)NC1.

A) Identificación de las regiones II (residuos 62-78, en rojo), III (residuos 88-93, en morado), IV (residuos 145-157, en amarillo), V (residuos 184-189, en cian) y VI (residuos 193-213, azul) en todos los α (IV)NC1 excepto en α 4(IV)NC1. **B)** Identificación de las mismas regiones en α 4(IV)NC1.

Las regiones I a VI establecen contactos que contribuyen a la formación del protómero o bien del hexámero en $\alpha 1(IV)NC1$, $\alpha 2(IV)NC1$, $\alpha 3(IV)NC1$, $\alpha 5(IV)NC1$ y $\alpha 6(IV)NC1$.

Las regiones II y VI se encuentran a ambos lados de las moléculas de $\alpha(IV)NC1$, siendo la regII una horquilla-beta que se extiende desde un lado del $\alpha(IV)NC1$ y la regVI un lazo que avanza desde el otro lado del $\alpha(IV)NC1$. En el protómero, las regiones II y VI interaccionan para entrelazar tres $\alpha(IV)NC1$, por lo que resultan claves en la formación del protómero y como consecuencia, la regII permanece oculta e interaccionará con otras regiones del protómero opuesto (regII, regIII y regV), Figura 55. La RegVI permanece parcialmente expuesta al solvente e interacciona con la RegIII del protómero opuesto, a través de la Lys₂₁₁. El átomo de nitrógeno de la cadena lateral de esta lisina podría interaccionar con un átomo de azufre de uno de los residuos de metionina de la RegIII para formar un enlace covalente del tipo llamado “sulfilimina”, cuya rotura se ha propuesto como posible desencadenante del Síndrome de Goodpasture (Vanacore y cols. 2009).

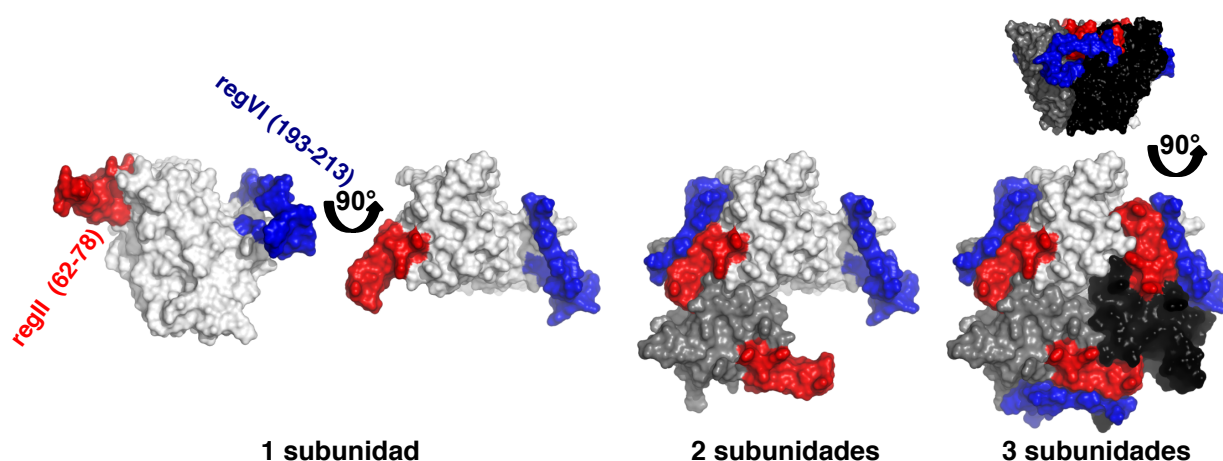


Figura 55. Esquema de la participación en la formación del protómero de las regiones II (rojo) y VI (azul) en los monómeros $\alpha 1(IV)NC1$, $\alpha 2(IV)NC1$, $\alpha 3(IV)NC1$, $\alpha 5(IV)NC1$ y $\alpha 6(IV)NC1$ en la formación del protómero.

La regI de un α (IV)NC1 interacciona con la región regIV de un α (IV)NC1 vecino para entrelazarse con tres α (IV)NC1 contribuyendo también a la estabilidad del protómero. Las regiones I y IV permanecen parcialmente ocultas en la parte central de la base del protómero donde interaccionan con otras regiones del protómero opuesto para estabilizar el hexámero. La regV se encuentra en la base del protómero e interacciona con la regII del protómero opuesto contribuyendo también a la estabilidad del hexámero (Figura 56).

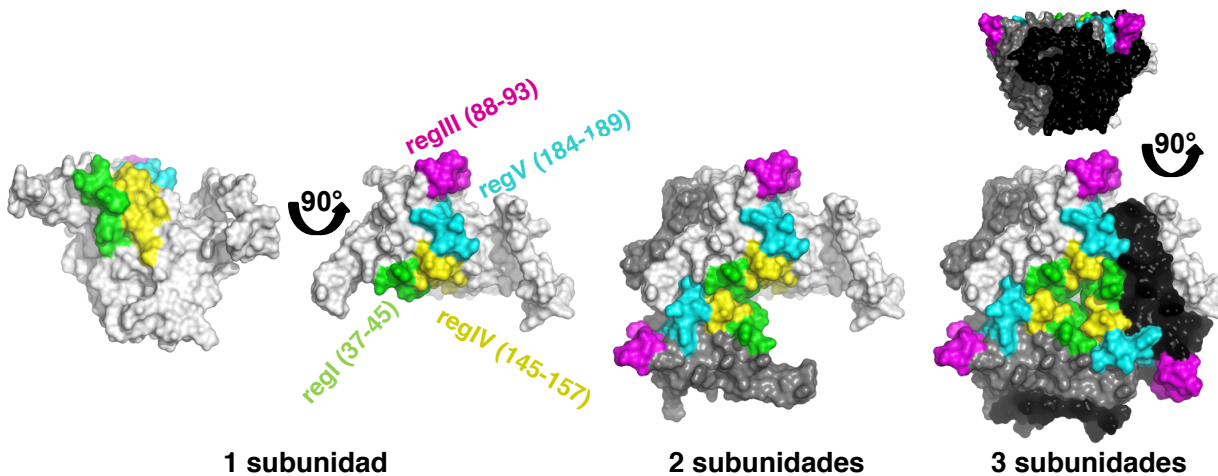


Figura 56. Esquema de la participación de la regI (verde), regIII (morado), regIV (amarillo) y regV (cian) de los monómeros α 1(IV)NC1, α 2(IV)NC1, α 3(IV)NC1, α 5(IV)NC1 y α 6(IV)NC1 en la estabilidad del hexámero.

En α 4(IV)NC1 los cambios de conformación observados en las regiones I-VI interfieren en la formación del protómero y del hexámero, de modo que cambian y limitan las interacciones entre las diferentes regiones. Así, entre α 4(IV)NC1 vecinos, las regiones I y IV, no interaccionan entre sí, ni lo hacen mutuamente las regiones II y VI. Sin embargo, la regII interacciona con las regiones IV y V. Por otra parte, entre α 4(IV)NC1 opuestos, la regI no interacciona con otras regiones, ni la regII lo hace con la regVI, pero la regII todavía mantiene interacciones con la regV permitiendo la formación de dímeros (Figura 57).

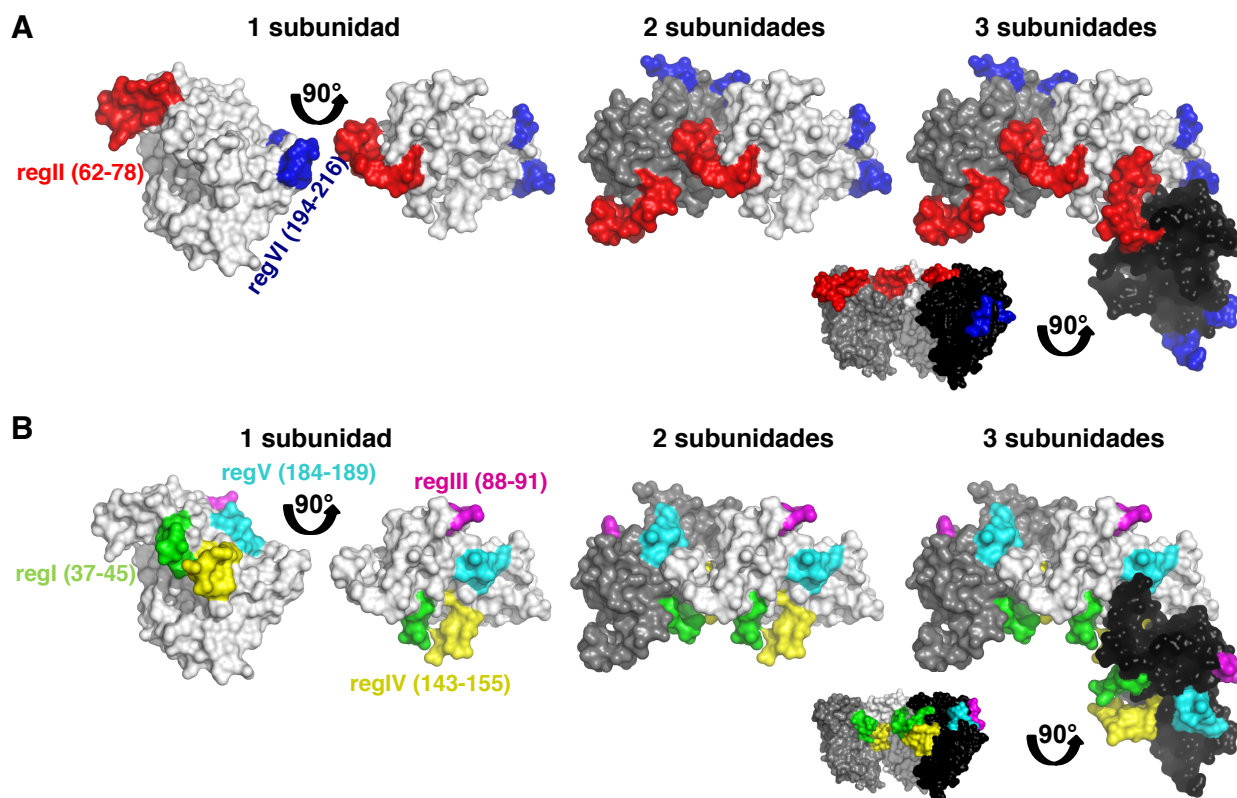


Figura 57. Representación en superficie de las diferentes regiones en $\alpha 4(IV)NC1$ y visualización de sus interacciones.

A) Ausencia de interacción entre las regiones II y VI, que son las encargadas de iniciar la formación del protómero. **B)** Ausencia de interacciones entre las regiones I y IV, pero aparición de nuevas interacciones entre la regII con las regiones IV y V.

Los resultados ponen claramente de manifiesto el papel jugado por las regiones I a VI en proporcionar el plegamiento adecuado a los $\alpha(IV)NC1$ para la formación de los protómeros y del hexámero.

2.4 Selección de cadena en el colágeno tipo IV.

Tanto la estructura de los homohexámeros $\alpha 1(IV)NC1$, $\alpha 3(IV)NC1$, $\alpha 5(IV)NC1$, como la de los heterohexámeros de $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(IV)NC1$ y de $(\alpha 5,6,6)_2(IV)NC1$ exhiben estructura cuaternaria fisiológica aunque sólo tres heterohexámeros, $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(IV)NC1$, $(\alpha 3,4,5)_2(IV)NC1$ y $(\alpha 1)_2(\alpha 5)_2(\alpha 2)_1(\alpha 6)_1(IV)NC1$, se hayan detectado en muestras biológicas. Como hemos comentado, los hexámeros se generan por la interacción de dos protómeros, de tal forma que la formación del protómero debe ser el paso limitante.

Cabe pues preguntarse por la existencia de un posible mecanismo de selección de los $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ que vayan a entrar a formar parte del protómero.

Los datos estructurales que hemos obtenidos indican que no parece haber ningún tipo de impedimento para que los diferentes $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ formen cualquier combinación posible de protómero. La formación de protómeros podría verse condicionada por **1)** la cinética de plegado de las proteínas, **2)** por las diferentes afinidades entre los distintos $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$, y **3)** por la todavía no conocida maquinaria celular implicada en el ensamblaje de los protómeros.

2.4.1 Cinética de plegado de las proteínas.

La velocidad de plegado parece diferir entre los distintos $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$. Los cambios en la conformación de $\alpha4(\text{IV})\text{NC1}$ se relacionan con la pérdida de estructura secundaria característica en $\alpha1(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha3(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha5(\text{IV})\text{NC1}$, que aunque dificultan la formación del protómero todavía permiten mantener el plegamiento global de la molécula de $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$. El hecho de que no se hayan obtenido cristales de homohexámero de $\alpha2(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha6(\text{IV})\text{NC1}$ sugiere que ambos podrían caracterizarse por una lenta cinética de plegado tal como ocurre en $\alpha4(\text{IV})\text{NC1}$. La velocidad de plegado podría modularse a través de la interacción proteína-proteína entre los distintos $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$, de modo que la afinidad entre los diferentes $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ influya en la formación de los protómeros. Recordemos que (Figura 55 B, capítulo Resultados punto 2.1.2) todos los $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ se comportaron como monómeros al ser analizados mediante cromatografía de exclusión molecular, excepto $\alpha5(\text{IV})\text{NC1}$ que presentaba también una fracción hexamérica en equilibrio con la monomérica dependiente de la concentración de proteína.

La proteína $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ parece tener la mayor velocidad de plegado y la más alta capacidad entre los $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ para asociarse consigo misma, probablemente seguida de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$, ambas capaces también de formar homohexámeros. El porqué de la mayor velocidad de plegamiento de $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ respecto a $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$ lo desconocemos aunque no parece estar relacionado con la estructura primaria en dichas proteínas, ya que comparten el 60 % de identidad de secuencia, especialmente entre $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ (74 %) y $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$ (71 %) (Tabla 8). Sería probable que la propia maquinaria celular fuese la encargada de seleccionar aquellos $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ que surtan a la membrana basal de las características fisiológicas requeridas.

Tabla 8. Identidad de secuencia de aminoácidos (%) entre las diferentes proteínas $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$.

	$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$	$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$	$\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$	$\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$	$\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$
$\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$	63	70	59	83	62
$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$	-	58	70	63	76
$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$		-	53	69	55
$\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$			-	57	67
$\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$				-	63
$\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$					-

2.4.2 Afinidades entre las diferentes proteínas $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$.

Se evaluó, mediante resonancia de plasmón de superficie (SPR) la capacidad de interacción entre pares de proteínas $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$, determinándose la constante de afinidad para cada par de ellas incluida la interacción consigo misma (Tabla 9).

Tabla 9. Constantes de afinidad (KD) en la interacción entre los diferentes α (IV)NC1.

	Analito					
	α 1(IV)NC1	α 2(IV)NC1	α 3(IV)NC1	α 4(IV)NC1	α 5(IV)NC1	α 6(IV)NC1
α 1(IV)NC1	0,19	22	2,65	ND	ND	ND
α 2(IV)NC1	1,36	ND	0,48	ND	1,34	ND
α 3(IV)NC1	ND	19,3	1,71	0,0002*	1,58	16,2
α 4(IV)NC1	ND	ND	0,23	ND	158	ND
α 5(IV)NC1	ND	0,22	0,46	ND	4,92	0,14
α 6(IV)NC1	ND	ND	1,12	ND	0,37	ND

La KD obtenida mediante SPR se muestra en μ M tanto para la proteína α (IV)NC1 actuando como analito (valores en vertical) o como ligando (valores en horizontal). *Este valor responde a la falta de disociación del complejo (ver más adelante). ND: no determinada.

En base a los valores de sus constantes de afinidad el análisis de las interacciones entre proteínas α (IV)NC1 puso de manifiesto que la afinidad varía drásticamente en función de cual sea la proteína α (IV)NC1 que se inmoviliza en el chip. Esto obedece a que las regiones que van a iniciar el proceso de ensamblaje, fundamentalmente las regiones II y VI, y que deben poseer libertad de movimiento para facilitar la acomodación de la molécula con la que interaccionarán, pueden quedar comprometidas por la unión al chip perturbando o incluso impidiendo la interacción entre dos α (IV)NC1. Así por ejemplo ocurre entre α 1(IV)NC1 y α 3(IV)NC1, capaces sólo de interaccionar entre si en este sistema cuando α 1(IV)NC1 está unido a la matriz y α 3(IV)NC1 se encuentra en solución.

El análisis de los sensorgramas obtenidos mediante SPR, arroja luz sobre las posibles relaciones existentes entre los diferentes α (IV)NC1, que en última instancia son las que condicionarán la formación de estructuras cuaternarias. A continuación se recogen las interacciones encontradas para cada proteína α (IV)NC1 unida al chip (ligando) con ella misma y con el resto de proteínas α (IV)NC1 en solución (analito).

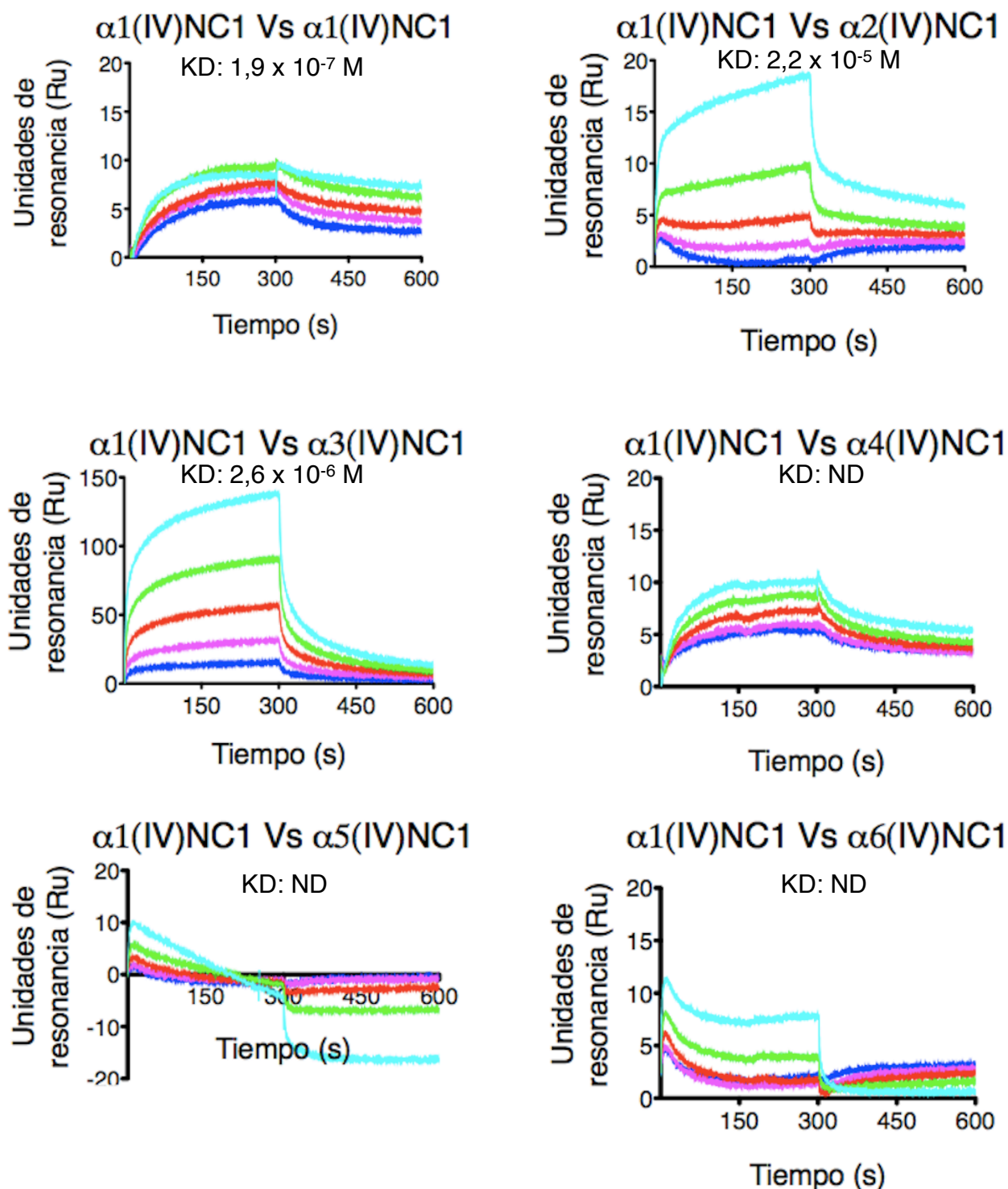
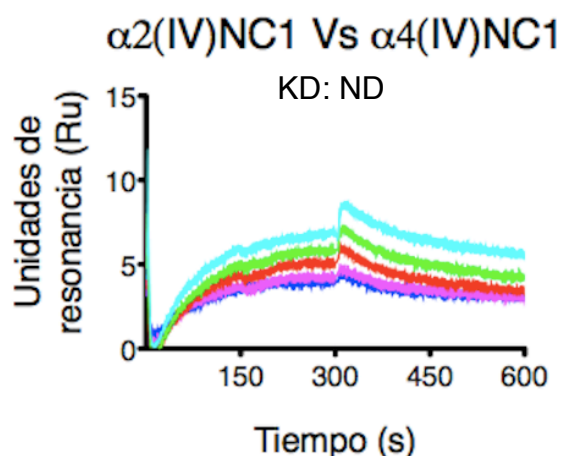
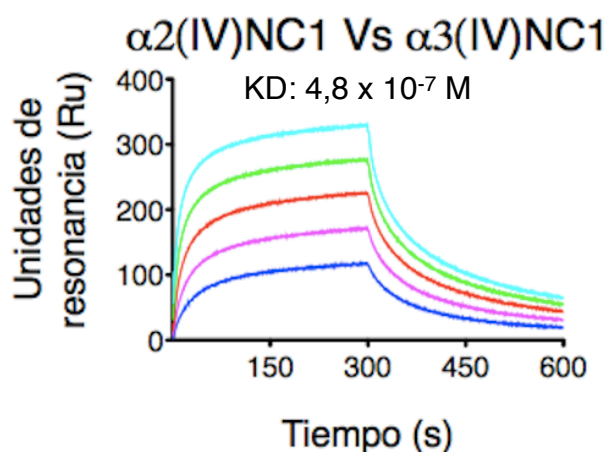
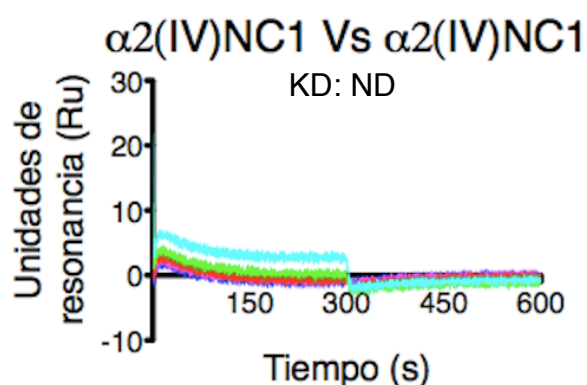
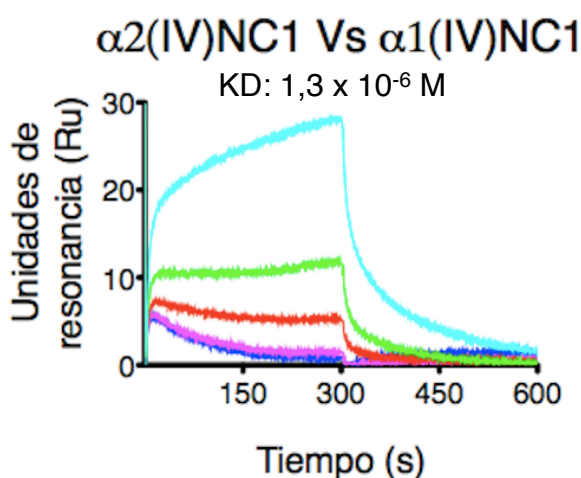
- $\alpha 1(IV)NC1$:

Figura 58. Sensorgramas obtenidos mediante resonancia de plasmón de superficie de la interacción de $\alpha 1(IV)NC1$ con cada una de las proteínas $\alpha(IV)NC1$.

Las curvas se corresponden con el analito a concentración de 250 mM (azul), 500 mM (rosa), 1 mM (rojo), 2 mM (verde) y 4 mM (cian). KD: constante de afinidad.

Como se observa en la Figura 58, $\alpha 1(IV)NC1$ interacciona de manera muy estable consigo misma. También interacciona con $\alpha 2(IV)NC1$ y $\alpha 3(IV)NC1$, destacando el alto valor para Ru en este último caso. La interacción consigo misma y con $\alpha 2(IV)NC1$ era esperable ya que hemos obtenido cristales de homohexámero $\alpha 1(IV)NC1$ y de heterohexámero $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(IV)NC1$. Sin embargo, la interacción $\alpha 1(IV)NC1$ con $\alpha 3(IV)NC1$ no se ha testado en ensayos de cristalización. Por último, ya que no se observa una interacción clara entre pares de $\alpha 1(IV)NC1$ y $\alpha 5(IV)NC1$ o $\alpha 1(IV)NC1$ y $\alpha 6(IV)NC1$, cuando sabemos de sus interacciones en el heterohexámero $(\alpha 1)_2(\alpha 5)_2(\alpha 2)_1(\alpha 6)_1(IV)NC1$, probablemente $\alpha 2(IV)NC1$ sea necesario para la interacción de estos $\alpha(IV)NC1$.

- $\alpha 2(IV)NC1$:



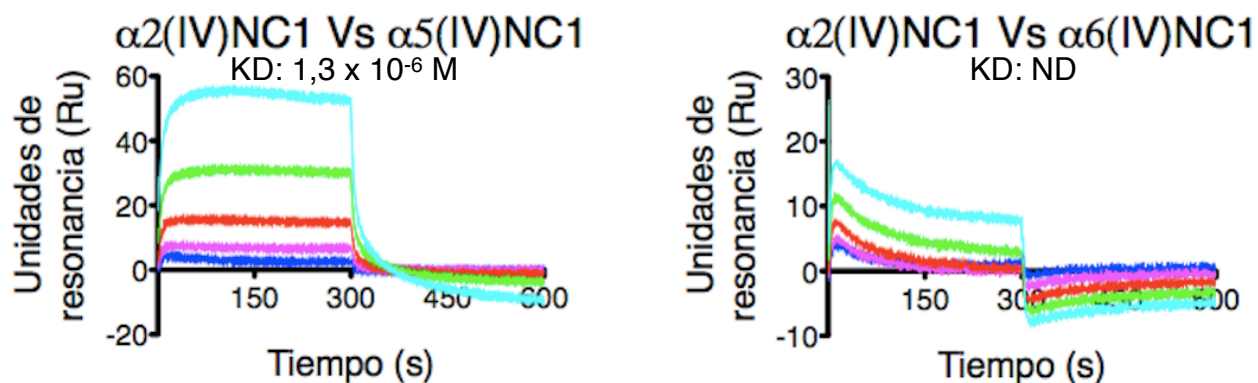


Figura 59. Sensorgramas obtenidos mediante resonancia de plasmón de superficie de la interacción de $\alpha 1(IV)NC1$ con cada una de las proteínas $\alpha(IV)NC1$.

Las curvas se corresponden con el analito a concentración de 250 mM (azul), 500 mM (rosa), 1 mM (rojo), 2 mM (verde) y 4 mM (cian). KD: constante de afinidad.

Como se observa en la Figura 59, la interacción de $\alpha 2(IV)NC1$ consigo misma es prácticamente nula, consistente con la no obtención de homohexámeros que hemos indicado antes. Como era de esperar $\alpha 2(IV)NC1$ interacciona con $\alpha 1(IV)NC1$, con el que forma un heterohexámero fisiológico. Al igual que ocurría con $\alpha 1(IV)NC1$, la interacción de $\alpha 2(IV)NC1$ con $\alpha 3(IV)NC1$ es fuerte (elevado valor de Ru) pero habrá que esperar a la posible formación de cristales de estos pares de proteínas $\alpha(IV)NC1$ que no ha sido ensayada todavía. Por último, se observa una clara interacción entre $\alpha 2(IV)NC1$ y $\alpha 5(IV)NC1$ pero no entre $\alpha 2(IV)NC1$ y $\alpha 6(IV)NC1$. Esta situación es complementaria, en parte, a la que se obtiene en el caso de $\alpha 1(IV)NC1$, en donde $\alpha 1(IV)NC1$ se asocia mejor con $\alpha 6(IV)NC1$ que con $\alpha 5(IV)NC1$. Recordemos también la capacidad de $\alpha 1(IV)NC1$ pero no de $\alpha 2(IV)NC1$, de formar heterohexámeros con $\alpha 6(IV)NC1$ que fue monitorizada mediante cromatografía de exclusión molecular (Tabla 3). En base a ello, se puede sospechar que, dentro del heterohexámero $(\alpha 1)_2(\alpha 5)_2(\alpha 2)_1(\alpha 6)_1(IV)NC1$, $\alpha 2(IV)NC1$ interaccionaría preferentemente con la molécula de $\alpha 5(IV)NC1$ del protómero opuesto y las dos moléculas de $\alpha 1(IV)NC1$ lo harían con las dos moléculas de $\alpha 6(IV)NC1$ presentes en el protómero opuesto.

- $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$:

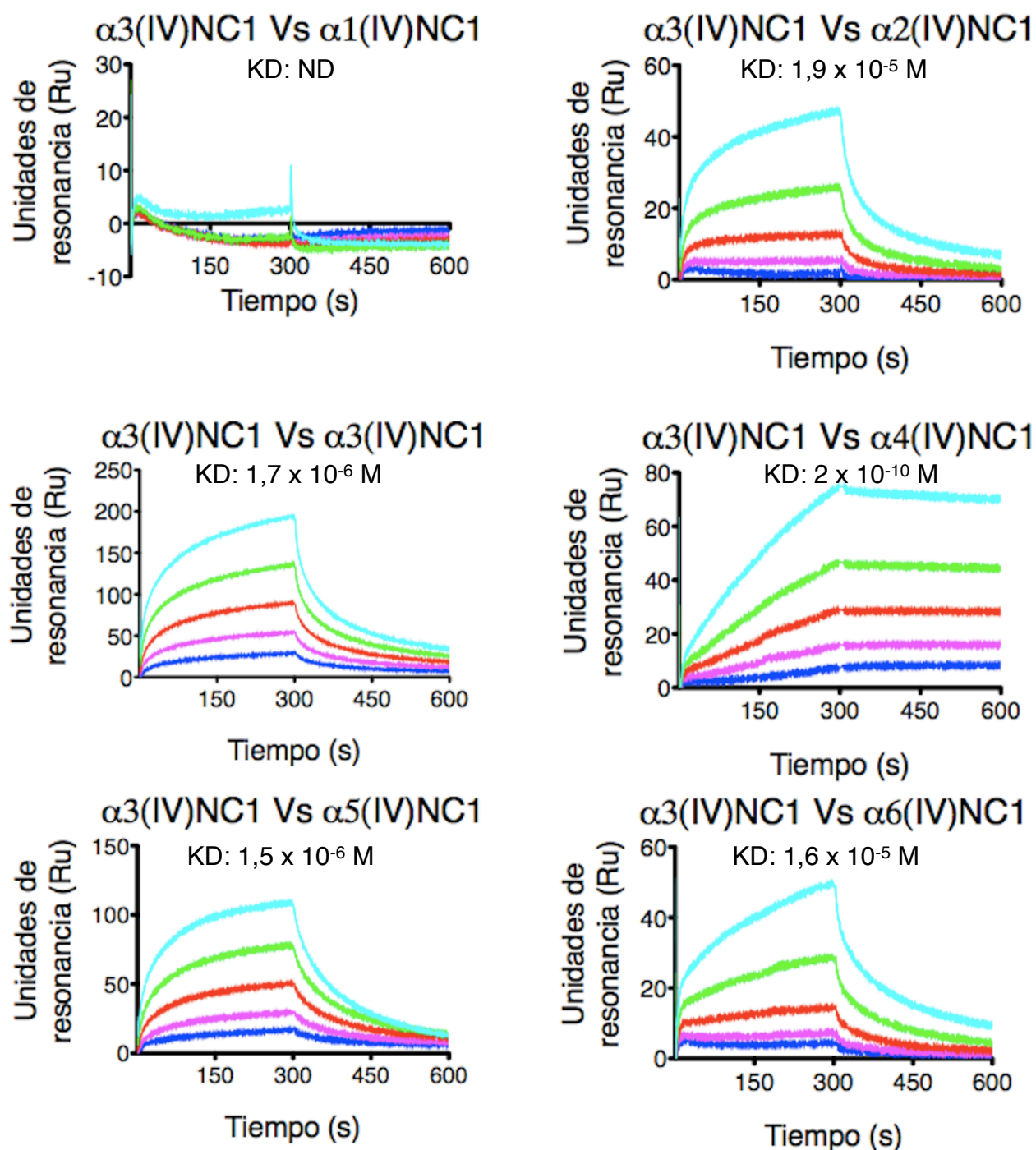


Figura 60. Sensorgramas obtenidos mediante resonancia de plasmón de superficie de la interacción de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ con cada una de las proteínas $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$.

Las curvas se corresponden con el analito a concentración de 250 mM (azul), 500 mM (rosa), 1 mM (rojo), 2 mM (verde) y 4 mM (cian). KD: constante de afinidad.

$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ resultó ser la proteína más promiscua entre todas las $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$. Como muestra la Figura 60, $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ interacciona con todas las $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ a excepción de

$\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$. Sin embargo, cuando $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ es la proteína inmovilizada en el chip (ligando), sí se produce interacción con $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (Figura 58), por lo que, probablemente, en la interacción $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ - $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ sea esta última la que dirija la formación del protómero.

Al igual que ocurre con $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ también interacciona con $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$, lo que era de esperar en base a la elevada identidad de secuencia entre $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (Figura 59).

$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ interacciona fuertemente consigo mismo (alto valor para R_u), lo que es consistente con su capacidad de formación de homohexámeros.

De especial carácter resulta el tipo de interacción entre $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ que, pese a no exhibir el valor más alto de R_u , manifiesta una estabilidad muy elevada que se mantiene constante en el tiempo de ensayo. Es decir, una vez se forma el complejo, éste disocia muy lentamente. Este hecho sugiere la posibilidad de que el complejo $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ - $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$, debido a su alta estabilidad, fuese el resultado del primer paso en la formación del heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$.

La interacción de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ con $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ revela la capacidad de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ de interaccionar con los otros dos $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ integrantes del heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$, postulándolo como nexos entre $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$.

Por último, $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ interacciona también con $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$, poniendo de manifiesto la capacidad de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ de asociarse con todas las proteínas $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$.

- $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$:

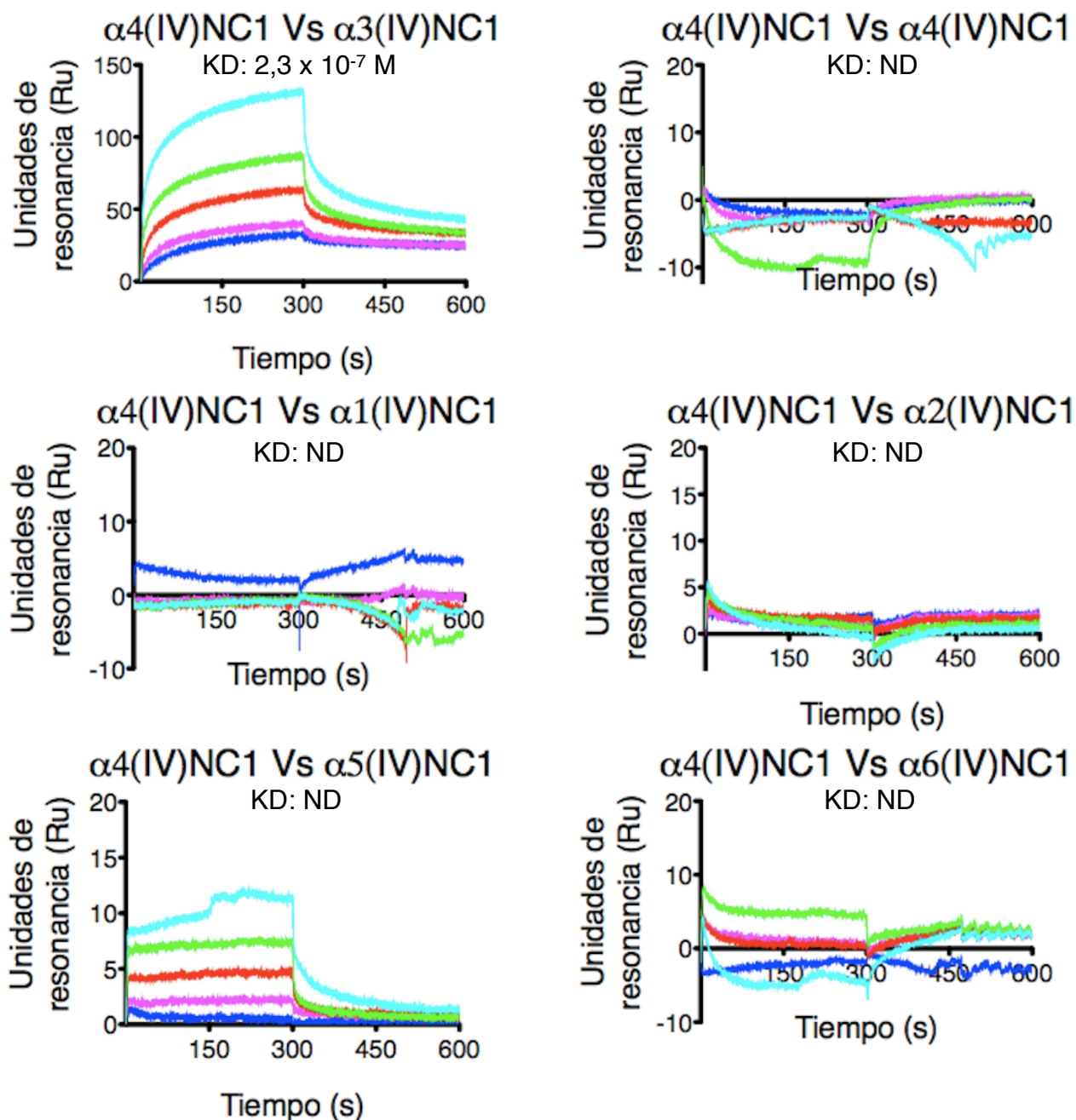


Figura 61. Sensorgramas obtenidos mediante resonancia de plasmón de superficie de la interacción de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ con cada una de las proteínas $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$.

Las curvas se corresponden con el analito a concentración de 250 mM (azul), 500 mM (rosa), 1 mM (rojo), 2 mM (verde) y 4 mM (cian). KD: constante de afinidad.

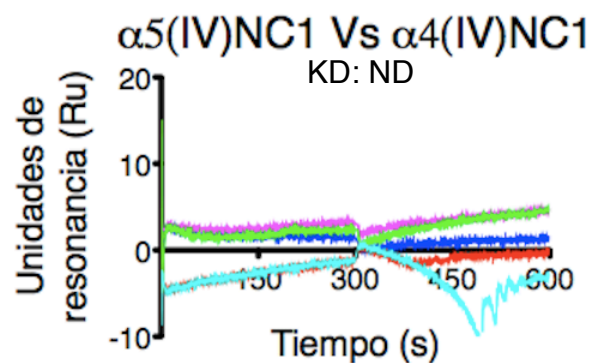
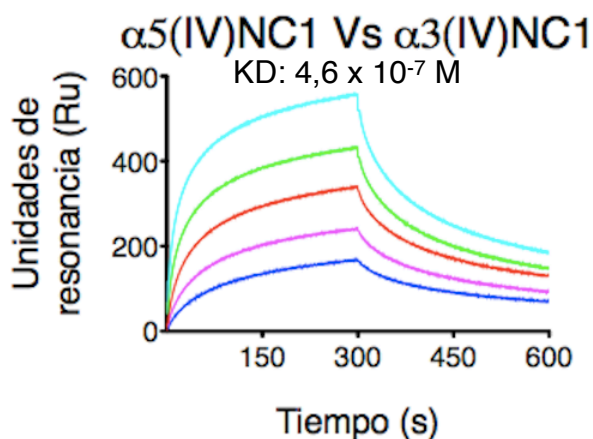
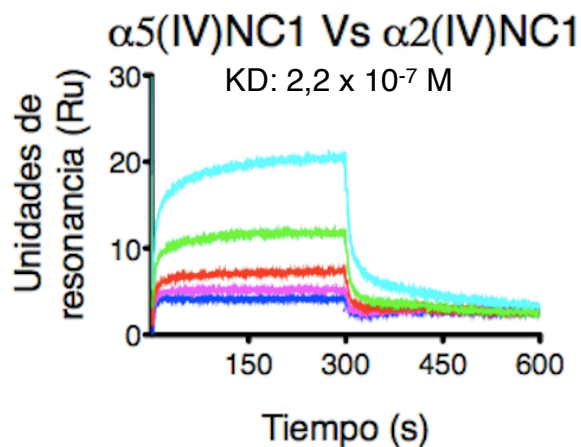
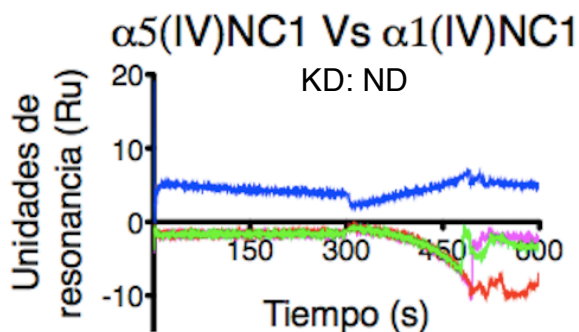
El comportamiento de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ resulta singular, y revela ser entre las proteínas $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ aquella con menor capacidad de interacción (Figura 61). Esto se relaciona directamente con las peculiaridades estructurales observadas en el cristal del homohexámero de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$. $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ sólo interacciona plenamente con $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$

y lo hace en mucha menor medida con $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$. No detectamos interacción alguna con el resto de proteínas $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$.

El perfil del sensorgrama en la interacción entre $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ indica que tras una fase de disociación rápida, se sigue una segunda fase mucho más lenta. Este fenómeno podría interpretarse como la formación en, un primer momento, de un complejo binario entre $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ - $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, al que posteriormente se uniese una nueva molécula de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, que disociara rápidamente del complejo ternario, mientras que la molécula de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ que integraba el complejo binario disociase mucho más lentamente.

El complejo $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ - $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$, no resulta estable.

- $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$:



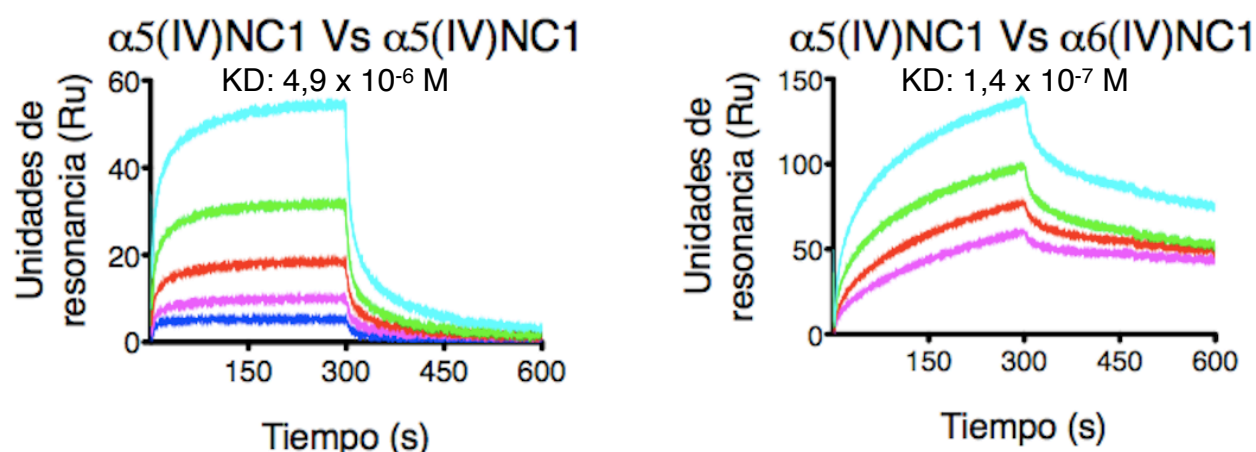


Figura 62. Sensorgramas obtenidos mediante resonancia de plasmón de superficie de la interacción de $\alpha 5(IV)NC1$ con cada una de las proteínas $\alpha(IV)NC1$.

Las curvas se corresponden con el analito a concentración de 250 mM (azul), 500 mM (rosa), 1 mM (rojo), 2 mM (verde) y 4 mM (cian). KD: constante de afinidad.

Los perfiles de las interacciones de $\alpha 5(IV)NC1$ mostradas en la Figura 62 desvelan que $\alpha 5(IV)NC1$ es, entre las proteínas $\alpha(IV)NC1$, la segunda con mayor capacidad de interacción. No hay interacción con $\alpha 1(IV)NC1$ pero sí, aunque ligera, con $\alpha 2(IV)NC1$, corroborándose lo observado cuando $\alpha 1(IV)NC1$ o $\alpha 2(IV)NC1$ eran las proteínas inmovilizadas. Por tanto, podemos predecir que en el heterohexámero $(\alpha 1)_2(\alpha 5)_2(\alpha 2)_1(\alpha 6)_1(IV)NC1$, la interacción entre protómeros opuestos vendría dada por uniones $\alpha 1(IV)NC1-\alpha 6(IV)NC1$ y $\alpha 2(IV)NC1-\alpha 5(IV)NC1$.

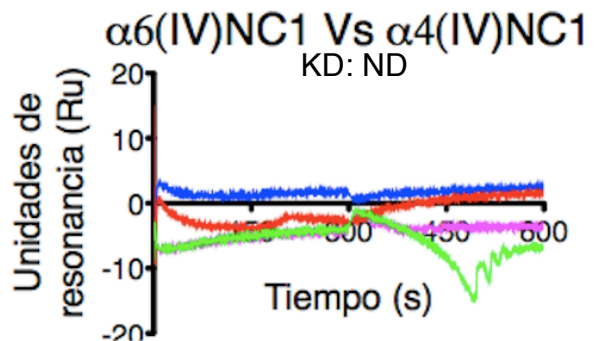
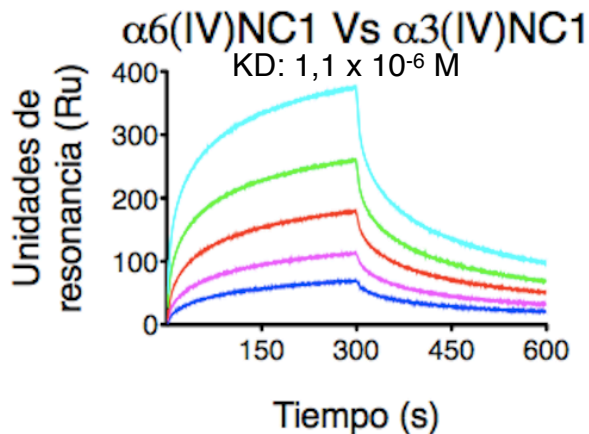
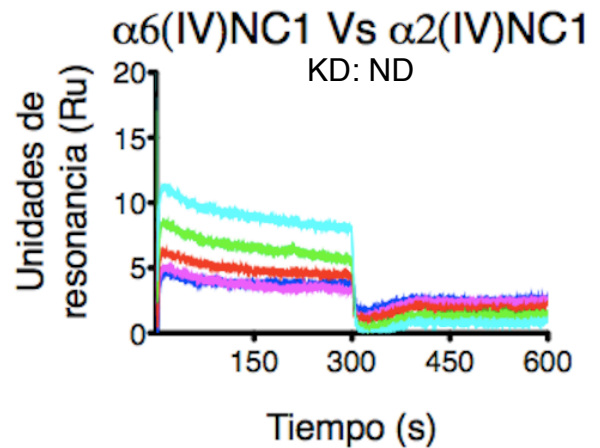
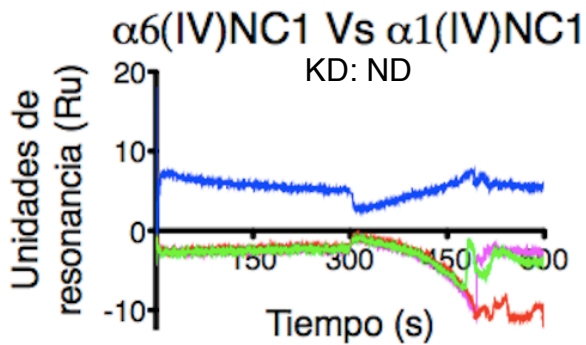
La interacción de $\alpha 5(IV)NC1$ con $\alpha 3(IV)NC1$ generó los mayores valores de resonancia de todo el experimento, que, además, se acompañó de una lenta disociación. Los altos valores de RU son indicativos de la enorme complementariedad existente entre ambos $\alpha(IV)NC1$, de tal forma que el heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(IV)NC1$ podría iniciarse con la interacción de una moléculas de $\alpha 3(IV)NC1$ con otra de $\alpha 5(IV)NC1$, para, posteriormente, acomodarse la molécula de $\alpha 4(IV)NC1$ estabilizando el protómero. Esta propuesta se encuentra apoyada por la prácticamente nula interacción entre $\alpha 4(IV)NC1$ y

$\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ (que aumenta ligeramente en el caso de que sea la molécula de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ la que está inmovilizada), limitándose $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$, en la formación del protómero, a estabilizar la interacción $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}-\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$.

De que $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ interacciona consigo mismo ya disponíamos de prueba en la formación de homohexámeros y en la estructura del cristal de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$.

Por último, la interacción de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ con $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$ era esperable dado que habíamos obtenido un cristal de heterohexámero $(\alpha 5,6,6)_2(\text{IV})\text{NC1}$.

- $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$:



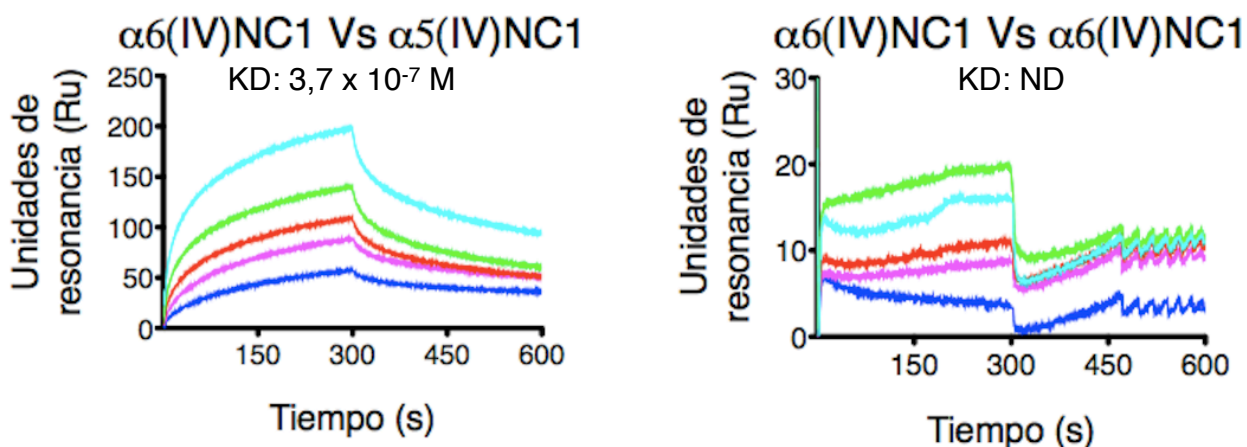


Figura 63. Sensorgramas obtenidos mediante resonancia de plasmón de superficie de la interacción de $\alpha 6(IV)NC1$ con cada una de las proteínas $\alpha(IV)NC1$.

Las curvas se corresponden con el analito a concentración de 250 mM (azul), 500 mM (rosa), 1 mM (rojo), 2 mM (verde) y 4 mM (cian). KD: constante de afinidad.

La Figura 63 muestra que $\alpha 6(IV)NC1$ interacciona tan solo con $\alpha 3(IV)NC1$ y con $\alpha 5(IV)NC1$. La interacción con $\alpha 3(IV)NC1$ exhibe unos valores muy altos de RU, mayores que en la recíproca inversa en la que $\alpha 3(IV)NC1$ actúa como ligando y $\alpha 6(IV)NC1$ como analito, resultantes probablemente de un primer evento de interacción entre $\alpha 6(IV)NC1$ y $\alpha 3(IV)NC1$, sin comprometer regiones necesarias en $\alpha 3(IV)NC1$ para su inmediatamente posterior interacción con otra molécula de $\alpha 3(IV)NC1$.

La interacción de $\alpha 6(IV)NC1$ con $\alpha 4(IV)NC1$ es nula, al igual que todas las interacciones entre $\alpha(IV)NC1$ pares, lo que enfatiza la necesidad de proteínas $\alpha(IV)NC1$ impares para la consecución de protómeros.

$\alpha 6(IV)NC1$ interacciona ampliamente con $\alpha 5(IV)NC1$, tal y como cabía esperar dada la existencia del cristal de heterohexámero $(\alpha 5,6,6)_2(IV)NC1$, siendo, sin embargo, incapaz de interaccionar consigo misma. Ésta última falta de interacción es esperable pues ningún $\alpha(IV)NC1$ par es capaz de hacerlo. La existencia del heterohexámero $(\alpha 5,6,6)_2(IV)NC1$, sugiere que al formarse el dímero inicial $\alpha 5(IV)NC1-\alpha 6(IV)NC1$ se produciría un cambio conformacional en $\alpha 6(IV)NC1$ que permitiría acomodar otra molécula de $\alpha 6(IV)NC1$ completando de esta manera el protómero.

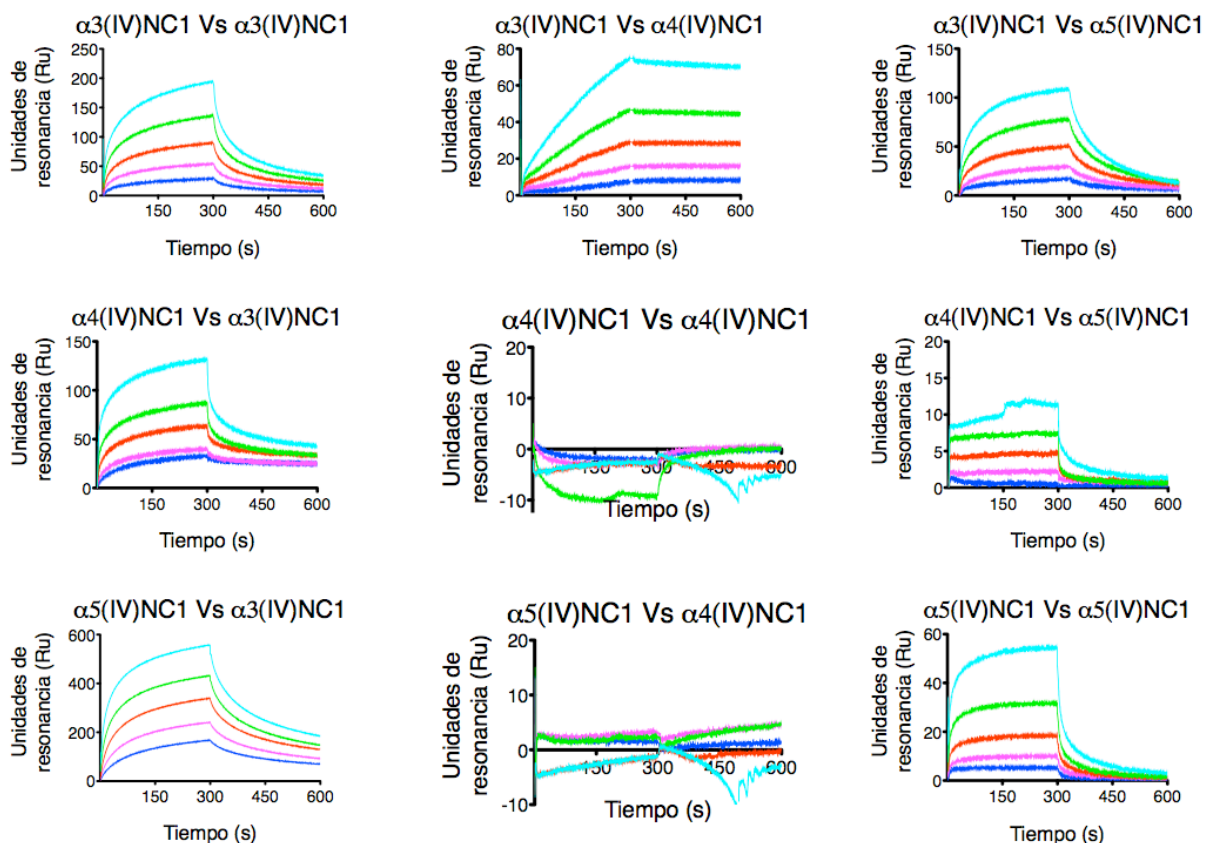


Figura 64. Matriz de interacción de las proteínas $\alpha(IV)NC1$ implicadas en la formación del heterohexámero $(\alpha3,4,5)_2(IV)NC1$.

Sensorgramas SPR de la interacción entre $\alpha3(IV)NC1$, $\alpha4(IV)NC1$ y $\alpha5(IV)NC1$ que forman el heterohexámero $(\alpha3,4,5)_2(IV)NC1$. Las curvas se corresponden con el analito a concentración de 250 mM (azul), 500 mM (rosa), 1 mM (rojo), 2 mM (verde) y 4 mM (cian).

- $\alpha3(IV)NC1$ es la única $\alpha(IV)NC1$ que interacciona con todas las moléculas que integran el heterohexámero $(\alpha3,4,5)_2(IV)NC1$.

- $\alpha4(IV)NC1$ y $\alpha5(IV)NC1$ no exhiben afinidad alguna entre ellas, por lo que su papel no debe estar en el inicio de la formación del protómero, sino más bien relegado a la estabilización de este.

- La formación del protómero debe desencadenarse con la formación de un dímero $\alpha3(IV)NC1$ - $\alpha5(IV)NC1$, cuyas moléculas presentan una elevada afinidad.

- El dímero $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}-\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ facilitaría la incorporación de una molécula de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ que cerraría el complejo dando lugar al protómero. Esta última interacción, al venir acompañada de cambios estructurales en $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$, ocurriría de modo más lento y probablemente contribuya de manera importante a la estabilidad del heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$.

- Por otra parte, a la vista de las interacciones aquí detectadas entre las proteínas $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ implicadas en el heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$, no se puede descartar otras posibles combinaciones para la formación de dicho heterohexámero. La relación por pares entre $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}-\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}-\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ se mantiene constante independientemente de quien sea la molécula de $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ que esté inmovilizado en el chip, por lo que no se puede descartar que en el heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$, existiera un protómero $\alpha 3,4,4(\text{IV})\text{NC1}$ junto a un protómero $\alpha 3,5,5(\text{IV})\text{NC1}$ que respetaría la estequiometría propuesta en la literatura (Borza y cols. 2002).

Para tratar de verificar esta posibilidad se cristalizó, por un lado, el complejo $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}-\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y, por otro, el complejo $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}-\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$. En ambos casos utilizamos cantidades equimolares de cada proteína con una concentración final de la mezcla de 7,4 mg/ml en TBS (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,4). Se obtuvieron cristales para ambos complejos, aunque estos no difractaron satisfactoriamente en el único intento del que dispusimos en el sincrotrón. El hecho experimental que mantiene todavía esta propuesta en vigor es la ausencia de cristales de homohexámero $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ en la mezcla $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}-\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$, lo que permite sospechar que no hubiese $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ disponible para formar homohexámeros por estar comprometido en la interacción con $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$.

2.5 Conclusiones objetivo 2.

El presente objetivo pretendía establecer la estructura del heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$, la diana de los autoanticuerpos en el síndrome de Goodpasture y de los aloanticuerpos en aquellos casos en los que se recurre a un trasplante renal en respuesta al síndrome de Alport. La finalidad principal buscaba trasladar los resultados obtenidos en el objetivo 1 a una estructura hasta entonces desconocida, así como incorporar la información existente en la literatura.

Intentamos con insistencia pero sin éxito cristalizar el heterohexámero. Quizás esta imposibilidad pueda atribuirse a la asombrosa facilidad de uno de sus $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ componentes ($\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$) para cristalizar de forma aislada. Es de destacar que los cristales de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ resultaron ser tremendamente estables. La modificación de la secuencia de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ clonada mediante eliminación de la región inicial de α -hélice, sí redujo la cantidad producida de homohexámero monitorizada mediante cromatografía de exclusión molecular, pero no tuvo consecuencia en los ensayos de cristalización, en donde se generaron de nuevo y exclusivamente homohexámeros de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$.

Por otra parte, la estructura de los homohexámeros de $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, junto con la de los heterohexámeros de $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$ y $(\alpha 5,6,6)_2(\text{IV})\text{NC1}$, resultó ser extremadamente similar. Todas presentaron volúmenes similares con ligera variabilidad en el área de superficie y con un valor RMSD de superposición inferior a 0,8 Å. Tanto las estructuras homohexaméricas como las de los heterohexámeros mostraron la estructura hexamérica cuaternaria típica de los $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$, un elipsoide alargado idéntico a la estructura $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$ del heterohexámero de placenta humana (PDB id:1LI1), placenta bovina (PDB id:1T61) y cápsula de cristalino bovino (PDB id:1M3D, 1T60). Un hecho, que demostraba que las estructuras aquí obtenidas poseen estructura cuaternaria

fisiológica y por tanto validaba el sistema de expresión elegido, así como la idoneidad de los procesos de purificación y cristalización. La resolución del cristal del heterohexámero $(\alpha 5,6,6)_2(\text{IV})\text{NC1}$ aporta nuevos datos, y revela que este protómero no está constituido por dos moléculas de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ y una de $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$, sino por dos moléculas de $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$ y una de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$.

Únicamente la estructura de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ mostró ser claramente diferente respecto al resto de homohexámeros. El análisis de dichas diferencias evidencia que las proteínas $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ pares exhiben menor plasticidad, lo que probablemente sea la causa de y limite su tendencia a la autoasociación. Cabe recordar que la única estructura resuelta de una proteína $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ par, corresponde a la obtenida aquí de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$, que cristalizó con seis moléculas en la unidad asimétrica, tres de las cuales se encontraban situadas consecutivamente a lo largo de un anillo hexamérico y las otras tres se encontraban justo debajo de éstas, dispuestas en otro anillo hexamérico. Las seis moléculas de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ se encontraban formando parte de un homohexámero particular, que mediante simetría cristalográfica generaba un homodecámero. Además, en $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ los cambios estructurales observados impedían la formación del protómero y del hexámero al cambiar y limitar las interacciones que se establecían entre las diferentes regiones. El resto de $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ pares, $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$ junto con $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$, se obtuvieron como resultado de la cristalización de los heterohexámeros $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(\text{IV})\text{NC1}$ y $(\alpha 5,6,6)_2(\text{IV})\text{NC1}$ manifestando estructura muy similar al resto de monómeros $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ con un valor de RMSD entre 0,74 y 0,95 Å. Por tanto, una vez los $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ pares interactúan con $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ impares, modifican su conformación para favorecer la formación del protómero, así como para proveerle estabilidad.

Con el conocimiento de las estructuras cristalinas de los homohexámeros y teniendo en cuenta que el Síndrome de Goodpasture se caracteriza por la presencia de anticuerpos patogénicos unidos a $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ y en escasos casos a $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ en riñón y pulmones (Pedchenko y cols. 2010), se pudieron analizar las regiones diana de dichos autoanticuerpos. Estos autoanticuerpos van dirigidos a dos regiones en $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ que comprenden los residuos 15-TAIPSCPEGTVPLYS-29 (E_A) y 125-TDIPPCPHGWISLWK-139 (E_B). La región E_A se encuentra en el dominio $C4_1$ y la región E_B se encuentra en el dominio $C4_2$. La superposición de ambos dominios $C4$, muestra que dichas regiones se encuentran en el ápice de los dos dominios $C4$. La comparación de estas regiones entre $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ no muestra variaciones en la estructura secundaria y presenta un bajo valor de RMSD [E_A ($\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ - $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ =0,95), ($\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ - $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ =0,48) y E_B ($\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ - $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ =0,54), ($\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ - $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ =0,47)], lo que sugiere que las regiones que incluyen los epítopos son unas estructuras rígidas dentro de los dominios $C4$.

Por otra parte, la estructura de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ que hemos obtenido a partir del homohexámero $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ resultó ser esencialmente indistinguible de la modelada en Anexo II, por lo que las predicciones realizadas en el objetivo 1, que ya habían sido contrastadas mediante Western blotting, ELISA y SPR, resultaron ser totalmente acertadas y precisas.

3 Implicación de la proteína Goodpasture-antigen binding protein-1 (GPBP-1) en el ensamblaje del colágeno IV y consecuencias inmunopatogénicas.

Tal como comentamos en la introducción general, la participación de GPBP-1 en enfermedades renales autoinmunes está cada vez mas establecida habiéndose observado niveles de sobreexpresión de esta proteína en riñones de pacientes afectados por el Síndrome de Goodpasture (Raya y cols. 2000). La capacidad de GPBP-1 de fosforilar selectivamente a $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ humano pero no su homólogo vacuno, donde no se presenta la enfermedad de Goodpasture, (Raya y cols. 1999), y de catalizar la síntesis de confórmeros de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (Calvete y cols. 2006), sustenta la propuesta de que GPBP-1 forma parte esencial de la maquinaria que cataliza la formación de la red de colágeno IV y que sus funciones se ven alteradas durante el proceso autoinmune (Saus 2002). En este sentido, la sobreexpresión de GPBP-1 humana en ratones transgénicos (Tg-hGPBP-1) resultó en una glomerulonefritis con alteración en la organización de las redes de colágeno IV que conforman la membrana basal glomerular (MBG) (Revert y cols. 2007).

3.1 La co-expresión de GPBP-1 y $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ condiciona la conformación de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ como revela su reactividad inmunológica y su estructura atómica.

Explotando el éxito del sistema de expresión heteróloga de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ que usa células de insecto y baculovirus, se coexpresaron GPBP-1 y $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ utilizando el vector pFastBac-Dual con el fin de explorar si GPBP-1 ejercía alguna influencia sobre $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$. En una primera aproximación, la reactividad de mAb 3, un anticuerpo que compite por el epítipo de los autoanticuerpos de paciente Goodpasture, se ensayó

frente a ambas formas de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$: la expresada junto a GPBP-1 y la producida individualmente (Figura 65).

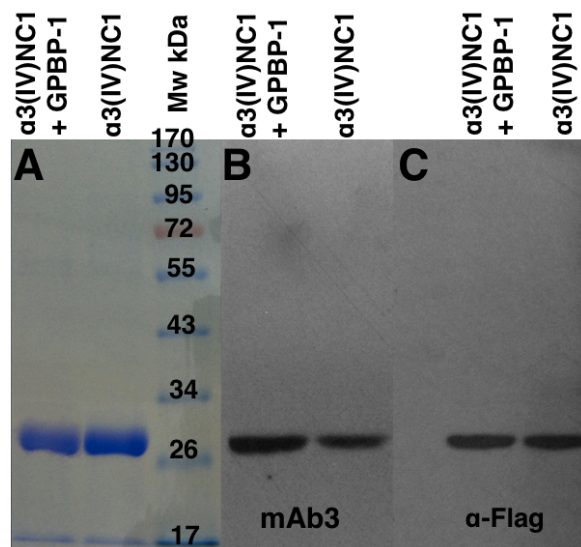


Figura 65. Gel (SDS-PAGE 12 % poliacrilamida) bajo condiciones no reductoras de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ co-expresada con GPBP-1.

A) Tinción con azul de Coomasie. El tercer carril corresponde a los marcadores coloreados con sus respectivas masas moleculares en kDa, **B)** y **C)** Western blotting revelados con mAb 3 y anti-FLAG, respectivamente.

Mientras ambas formas de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ exhibían la misma movilidad electroforética (Figura 65A), la reactividad del anticuerpo conformacional mAb 3 resultó ser mayor frente a la forma co-expresada de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (Figura 65B). El panel C de la Figura 65 revela que la distinta reactividad exhibida por mAb 3 entre ambas muestras no es atribuible a diferencias en las cantidades de proteína cargada. Este resultado sugiere que GPBP-1 influye en el plegamiento de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ en el entorno del epítipo para mAb 3 y, por tanto, quizás también en el epítipo de los autoanticuerpos. Para analizar esta posibilidad y tratar de verificar si GPBP-1 modifica el plegamiento de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ e influye en la exposición de epítipos de anticuerpos patogénicos, hemos sometido a comparación ambas formas de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (co-expresada o no junto a GPBP-1) mediante estudios de resonancia de plasmón de superficie (SPR), de estructura de proteínas por cristalografía de rayos X, de caracterización inmunoquímica y de mutagénesis dirigida.

3.1.1 Análisis mediante resonancia de plasmón de superficie.

Hemos utilizado esta tecnología para caracterizar la unión antígeno-anticuerpo entre la forma co-expresada o no junto a GPBP-1 de $\alpha 3(IV)NC1$ y los autoanticuerpos GPc, el anticuerpo conformacional mAb 3 y el anticuerpo M3/1a, con la finalidad de detectar la posible existencia de diferencias conformacionales entre ambas formas de $\alpha 3(IV)NC1$. M3/1a corresponde a un mAb con epítipo de tipo secuencial presente en la región N-terminal de 20 aminoácidos de $\alpha 3(IV)NC1$, preparado anteriormente en nuestro laboratorio (Penades y cols. 1995), mientras que mAb 3, como indicamos antes, es un mAb con epítipo conformacional que compite por aquel de los autoanticuerpos de paciente Goodpasture (autoanticuerpos GPc). Hemos realizado con esta metodología, tanto un análisis cinético, determinando la constante de afinidad de estos anticuerpos frente a ambas formas de $\alpha 3(IV)NC1$, como un estudio termodinámico de su interacción. La Figura 66 muestra el estudio cinético mediante SPR.

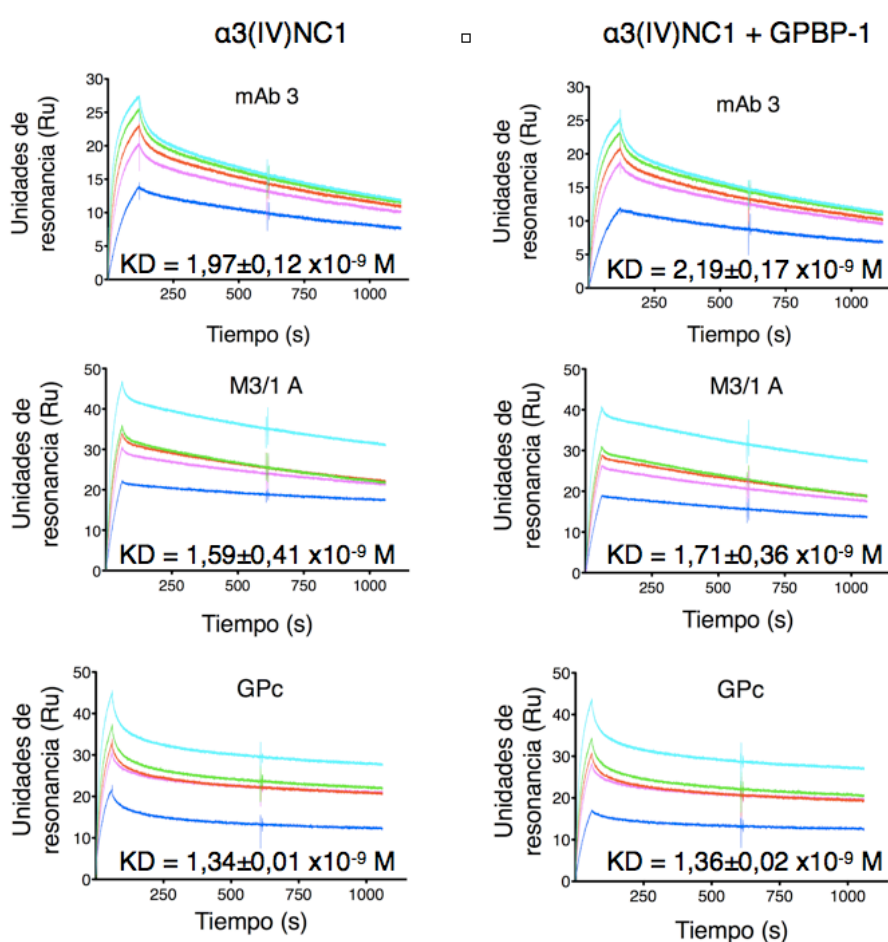


Figura 66. Análisis mediante SPR de la interacción de los anticuerpos GPc, mAb 3 y M3/1a con $\alpha 3(IV)NC1$ expresada simultáneamente o no con GPBP-1.

La constante de afinidad (KD) se indica arriba del eje de ordenadas. Concentración del analito 250 mM (azul), 500 mM (rosa), 1 mM (rojo), 2 mM (verde) y 4 mM (cian).

El análisis de los sensorgramas revela que ninguno de los tres tipos de anticuerpo exhibe una afinidad marcadamente diferente por una u otra de las formas de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$. Ante la repetitividad de los hallazgos del apartado anterior mostrado en la Figura 65, los resultados con SPR nos sorprendieron en un primer momento, excepto para M3/1a. Como era de esperar para este anticuerpo, al poseer un epítipo lineal en el extremo N-terminal de la proteína $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, no parecía probable que esta región sufriese una variación conformacional que repercutiese de forma importante en el reconocimiento por el anticuerpo. Sin embargo, esperábamos que los residuos críticos de los epítopos conformacionales para los anticuerpos mAb 3 y GPc pudiesen verse afectados por acción de GPBP-1 y ello repercutiese en la afinidad. No obstante, el análisis detallado de las estructuras que habíamos resuelto predecía la exclusión de estas regiones esenciales del epítipo como dianas críticas de los posibles cambios conformacionales gobernados por la presencia de GPBP-1, y por tanto, que se modificase la afinidad para la forma de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ expresada junto a GPBP-1 por estos anticuerpos conformacionales. Los anticuerpos mAb 3 y GPc tienen su diana sobre la región E_A en el dominio $C4_1$ de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (ver Figura 33) y del análisis de las estructuras resueltas en el objetivo anterior (ver apartado 4.2.2), concluimos que dichas regiones $C4$ son estructuras rígidas, con poca variabilidad conformacional. Sin embargo revelamos también a partir de aquellos cristales la existencia de zonas sometidas a variabilidad estructural, que se corresponden con cambios en la disposición o conformación de lazos que comunican las regiones de interacción, de tal forma que esas ligeras variaciones en la estructura, podrían favorecer la acomodación de epítopos conformacionales, tal como el de los anticuerpos mAb 3 y los autoanticuerpos circulantes, ubicados en el dominio $C4_1$. Para intentar iluminar esta propuesta requeríamos, además de estudios estructurales a nivel

atómico, examinar otros parámetros de la interacción entre ambas formas de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y los anticuerpos conformacionales.

Utilizamos el equipo de SPR Biacore T100 para analizar los parámetros termodinámicos de estas interacciones. Biacore no es un calorímetro y no posee la capacidad de medir directamente la energía generada o consumida en una reacción química, pero si puede, mediante una aproximación matemática, proporcionar información sobre los parámetros termodinámicos involucrados en el mecanismo de interacción entre un ligando y un analito, seguido a diferentes temperaturas. Esta aproximación nos permitiría analizar cómo varía una interacción intermolecular en función de la temperatura y cómo las variaciones en la estructura de las moléculas participantes, pueden afectar a las propiedades alcanzadas en el equilibrio químico de la reacción a una determinada concentración de dichas moléculas. Así, hemos caracterizado la interacción entre cada una de las formas de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (co-expresado o no junto a GPBP-1) y los anticuerpos monoclonales mAb 3 y M3/1a a través de los parámetros termodinámicos de la ecuación de Gibbs, $\Delta G = \Delta H - T \times \Delta S$. Esencialmente repetimos los mismos ensayos que hemos descrito arriba para los estudios cinéticos pero llevados a cabo en un rango de temperaturas entre 27 y 37 °C. Aunque es evidente que la información que pudiere derivarse con el uso de los autoanticuerpos GPc resultaría de relevancia, no es factible realizar el análisis termodinámico con esta muestra de anticuerpos ya que los GPc representan una mezcla heterogénea de inmunoglobulinas dirigidas frente a $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y no un tipo único de molécula química.

Como comentábamos arriba, por las características del epítipo para M3/1a, no parecía predecible que la acción de GPBP-1 tuviese repercusión conformacional en el entorno del epítipo lineal de este mAb y, efectivamente, el análisis mostrado en la Figura

67 no revela diferencias en ninguno de los parámetros termodinámicos en la interacción de M3/1a con una u otra de las formas de $\alpha 3(IV)NC1$. Por otro lado, la interacción entre cada uno de los anticuerpos y ambas formas de $\alpha 3(IV)NC1$, se caracteriza por un valor negativo de ΔG (Figura 67) propio de un proceso espontáneo exergónico guiado por interacciones energéticas del tipo de puentes de hidrógeno, puentes salinos e interacciones hidrofóbicas y electrostáticas que serían responsables de la especificidad, conforme con una variación entálpica negativa. La principal diferencia ostensible en términos termodinámicos entre ambos anticuerpos en la interacción con las formas de $\alpha 3(IV)NC1$ corresponde al cambio entrópico, que es positivo con mAb 3 pero negativo con M3/1a, indicando que se trata de una interacción con mayor grado de libertad estructural y movilidad en el caso de mAb 3. Pero el punto de interés buscado con este estudio reside en la detección de diferencias significativas en los parámetros termodinámicos ΔH y ΔS entre la interacción de mAb 3 con $\alpha 3(IV)NC1$ y aquella con $\alpha 3(IV)NC1$ co-expresado junto a GPBP-1 (Figura 67). Estos resultados sustentan la propuesta de que existen zonas sometidas a variabilidad estructural, influenciadas por GPBP-1, que alteran el reconocimiento por el anticuerpo conformacional mAb 3 y, probablemente, por los anticuerpos GPc, con los que compete en la unión al antígeno.

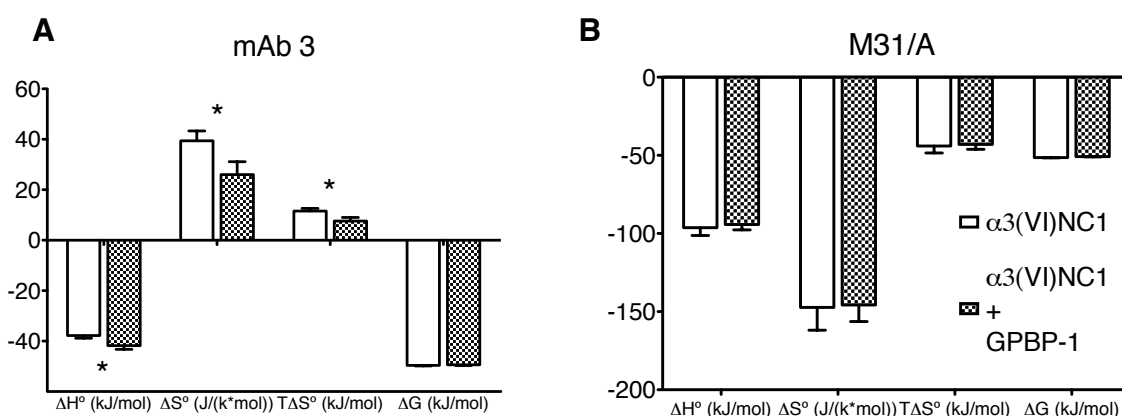


Figura 67. Caracterización termodinámica de la interacción de mAb 3 (A) y M3/1a (B) con $\alpha 3(IV)NC1$ y $\alpha 3(IV)NC1$ expresado junto a GPBP-1.

Valores obtenidos mediante SPR. Los experimentos se realizaron entre 27 y 37 °C.

*, diferencia significativa, $p < 0,05$.

GPBP-1 es una Ser/Thr cinasa no convencional que fosforila $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ humano (Raya y cols. 1999) y que se ha propuesto que está involucrada en la patogénesis autoinmune (Raya y cols. 2000, Revert y cols. 2007). Para intentar establecer la naturaleza de las variaciones mediadas por GPBP-1 en $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ que hemos detectado inmunoquímicamente y mediante SPR, y profundizar en el posible papel que se sospecha juega GPBP-1 en la patogénesis de la enfermedad GP, abordamos el estudio estructural de ambas formas de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ mediante cristalografía de rayos X.

3.1.2 Determinación de la estructura atómica de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ co-expresada con GPBP-1.

Se realizaron ensayos de cristalización de preparaciones purificadas de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ coexpresada con GPBP-1 que habían sido obtenidas con el sistema de baculovirus/células de insecto. En ambos casos, se obtuvieron cristales bajo distintas condiciones de cristalización que fueron siempre triangulares para $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y cúbicos para la forma $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ co-expresada con GPBP-1 (Figura 68).

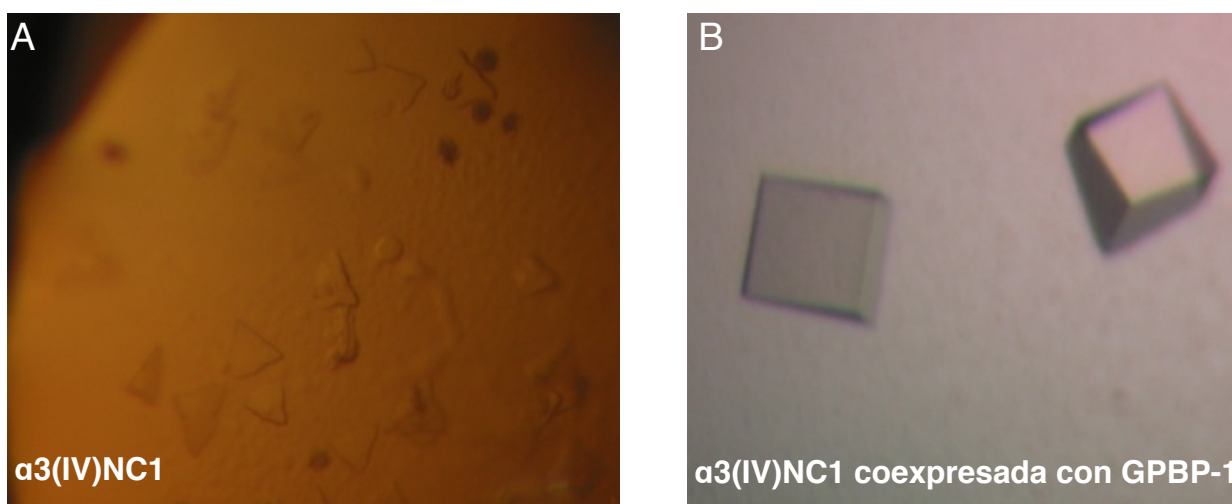


Figura 68. Cristales de las proteínas $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (A) y $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ co-expresada con GPBP-1 (B).

Las soluciones de cristalización fueron en **A)** PEG 3,5 kDa 16 %, BTP pH 7,5, MgCl_2 0,2 M y en **B)** Li_2SO_4 1,3 M, Hepes pH 7,5.

Los cristales de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ pertenecieron al grupo espacial H3, mientras que los cristales de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ co-expresada con GPBP-1 mostraron geometría cúbica P2_13 (Tabla 10).

Tabla 10. Propiedades de los cristales de las proteínas $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ co-expresada con GPBP-1.

Datos Procesados	$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$	$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1} + \text{GPBP-1}$	Datos refinados	$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$	$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1} + \text{GPBP-1}$
Línea ESRF	ID23-1	ID29	Rcrys (%)	16,6	16,0
Longitud de onda (Å)	1,00	0,98	Rfree (%)	18,9	18,6
Resolución (Å)	65,76-2,70 (2,85-2,70)	30,0-1,8 (1,9-1,8)	<i>Nº átomos:</i>		
Rmerge (%)	8,4 (26,4)	4,8 (23,3)	- Proteína	13.891	5.086
			- Ligando/ión	0	4/5
			- Agua	312	341
			<i>B-factors (Å²)</i>		
Rpim (%)	6,9 (22,3)	3,1 (15,6)	- Proteína	29,5	18,36
			- Ligando/ión	0	0
			- Agua	35,8	21,13
			<i>Desviaciones r.m.s</i>		
Media I/ δ (I)	11,2 (4,9)	13,4 (4,2)	- Longitud enlace (Å)	0,008	0,012
			- Ángulos enlace (°)	1,14	1,3
			<i>Gráficos de Ramachandran:</i>		
Redundancia	2,2	3,1	- Favorables (%)	97,7	98
			- Permitidos (%)	2,3	2
			- Regiones no permitidas (%)	0,0	0,0
Unidad asimétrica (nº de moléculas)	8	3			

Ambas estructuras se resolvieron mediante reemplazo molecular, utilizando como modelo la molécula de $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ presente en el heterohexámero de lente de cápsula bovina ($(\alpha 1)_2(\alpha 2)_2(\text{IV})\text{NC1}$ (PDB id: 1T60). La resolución alcanzada fue de 2,7 Å para $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y de 1,8 Å para $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ co-expresada con GPBP-1.

El cristal de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ presentó 8 moléculas (a-h) con idéntica estructura en la unidad asimétrica, de las cuales, seis se encontraban formando parte de un hexámero y las otras dos en forma monomérica, pero mediante la aplicación de simetría cristalográfica daban lugar a dos nuevos hexámeros (Figura 69A). En el caso de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ co-expresado con GPBP-1 aparecieron tres moléculas en la unidad

asimétrica, $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1a/b/c}$, cada una de los cuales era capaz de generar un trímero por simetría cristalográfica. Los trímeros formados por la asociación de tres $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1a}$ más tres $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1b}$ constituían un homohexámero indistinguible del obtenido en el cristal de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, mientras $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1c}$ permaneció en forma de trímero (Figura 69B).

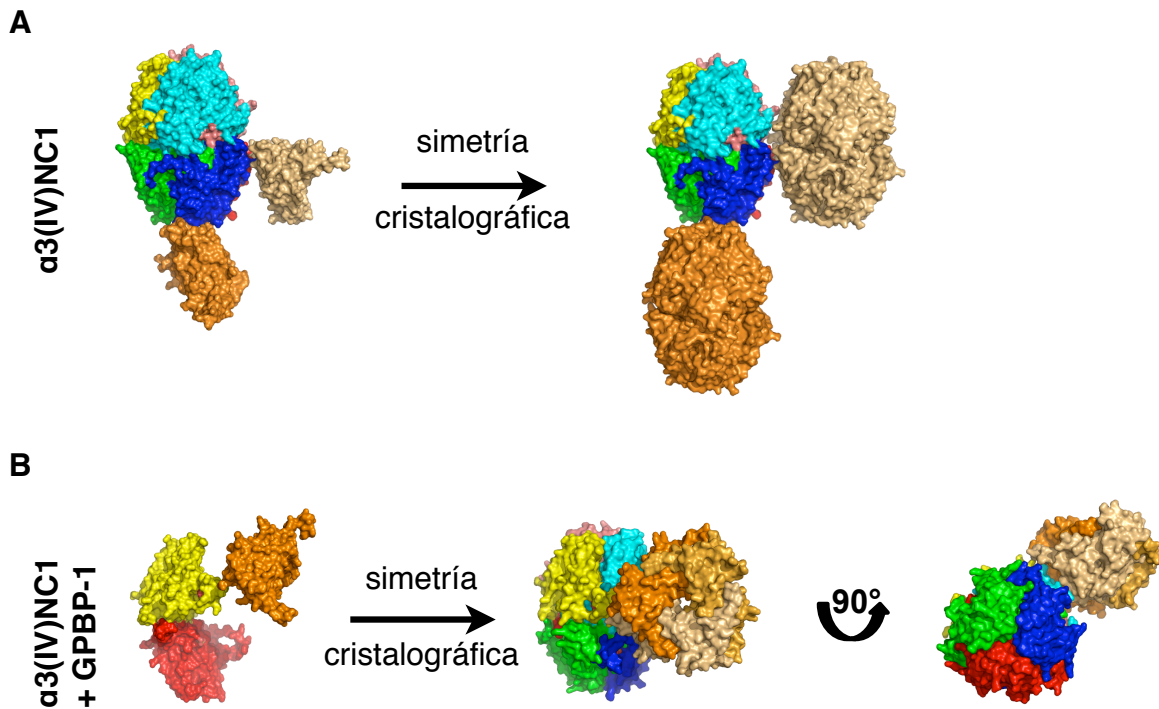


Figura 69. Representación en superficie de la estructura de los cristales de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ co-expresada con GPBP-1.

A) La unidad asimétrica del cristal de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ contiene ocho moléculas con idéntica estructura, seis formando parte de un hexámero y otras dos en forma de monómero, que tras aplicar simetría cristalográfica originan dos hexámeros. **B)** La unidad asimétrica del cristal de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ co-expresado con GPBP-1 contiene tres moléculas, de las que $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1a}$ (rojo) y $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1b}$ (amarillo), forman un hexámero con idéntica estructura al mostrado en el panel A, mientras que $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1c}$ (naranja) difiere de las otras dos exhibiendo cambios estructurales que únicamente le permiten ensamblarse en trímero.

Todas las moléculas de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ mostraron la estructura terciaria típica descrita para $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$ en el hexámero de fuente natural cristalizado (($\alpha 1$)₂($\alpha 2$)₂($\text{IV})\text{NC1}$ (PDB id: 1T60), con dos dominios C4 (acceso PFAM PF01413) enlazados en tándem y rotados 60° uno respecto del otro. Los dominios C4 están constituidos por dos subdominios: uno, N-terminal C4 (N-C4), residuos 1-114 y otro,

C-terminal C4 (C-C4), residuos 115-228, que presentan un plegamiento similar constituido por dos hojas- β compuestas cada una por 3 hebras- β antiparalelas, y compartiendo ambas hojas una hebra- β , un tonel- β y tres α -hélices. Cada subdominio presenta tres puentes disulfuro ocupando posiciones equivalentes en ambos dominios (N-C4: Cys20-Cys111, Cys53-Cys108 y Cys65-Cys71; y C-C4: Cys130-Cys225, Cys164-Cys222 y Cys176-Cys182) (Figura 70).

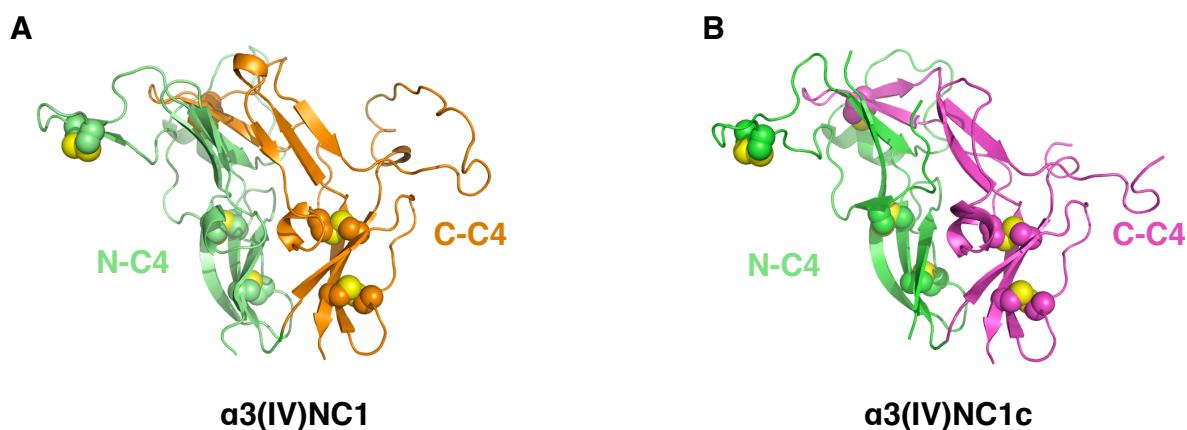


Figura 70. Representación en cinta de los dos tipos de monómeros $\alpha 3(IV)NC1$ resueltos.

Ambos monómeros comparten la estructura terciaria típica ya descrita (PDB 1T60). **A)** Se ha coloreado en verde y naranja los subdominios N-C4 y C-C4, respectivamente, del monómero $\alpha 3(IV)NC1a/b$. **B)** Se ha coloreado en verde y rosa los dominios N-C4 y C-C4, respectivamente, del monómero $\alpha 3(IV)NC1c$. Las cisteínas que participan en los puentes disulfuro aparecen representadas mediante esferas.

Las moléculas de $\alpha 3(IV)NC1$ en el homohexámero son prácticamente idénticas entre sí, con un valor RMSD de superposición menor de 0,25 Å. Por el contrario, la molécula $\alpha 3(IV)NC1c$ del cristal de $\alpha 3(IV)NC1$ co-expresada con GPBP-1 presentó, respecto al resto de moléculas $\alpha 3(IV)NC1$, cambios puntuales y una elevada flexibilidad en dos lazos (residuos 39-45 [que se corresponden con regI, ver apartado cristalográfico objetivo 2, sección 3] y residuos 204-213 [que se corresponden con regVI]) que incrementaron el valor RMSD de superposición a $\sim 3,3$ Å (Tabla 11).

Tabla 11. Valores RMSD de superposición de los monómeros de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ co-expresada con GPBP-1 y comparación con el monómero de $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ presente en el hexámero de fuente natural cristalizado ($(\alpha 1)_2(\alpha 2)_2(\text{IV})\text{NC1}$ (PDB id: 1T60).

	$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (a-h)	$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}^{\text{GPBP-1}}$ (a-b)	$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}^{\text{GPBP-1}}$ (c)	$\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$
$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1(a-h)}$	0,16			
$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}^{\text{GPBP-1(a-b)}}$	0,23	0,16		
$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}^{\text{GPBP-1(c)}}$	3,31	3,29	0	
$\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$	0,65	0,63	3,35	0,36

Las densidades electrónicas de los residuos comprendidos entre los aminoácidos 39-45 y 204-213, no pudieron asignarse a sus aminoácidos correspondientes, (como tampoco lo pudieron hacer 14 residuos de la secuencia FLAG, más otros 12 residuos de α -hélice ubicados en la zona N-terminal) debido a la alta flexibilidad en estas regiones. El lazo incluido en el fragmento de secuencia (residuos 204-213) de la molécula $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1c}$ tiene gran importancia desde el punto de vista del mantenimiento y estabilización de la estructura cuaternaria, pues incluye la Lys₂₁₁, descrita como responsable de la formación de un enlace sulfilimina con la Met₉₃ del $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ del protómero opuesto (Than y cols. 2002, Vanacore y cols. 2009). A este enlace se le atribuye un papel substancial en la patogenia del síndrome GP pues contribuye a la estabilidad del hexámero restringiendo la accesibilidad de los autoanticuerpos GP. Sobre esta base, cabe pensar que en los heterohexámeros $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$ que alojasen moléculas de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1c}$, sería improbable la formación del enlace sulfilimina, sustentándose así la relevancia de GPBP-1 en la etiología de la enfermedad.

Dentro de la molécula $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1c}$, las mayores diferencias respecto a $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ se identificaron en las regiones correspondientes a los residuos 38-51 (regI) y 145-156

(regIV), acompañadas de cambios menores en las regiones correspondientes a los residuos 66-78 (regII), 88-92 (regIII), 170-187 (regV) y 199-203 (regVI), Figura 71.

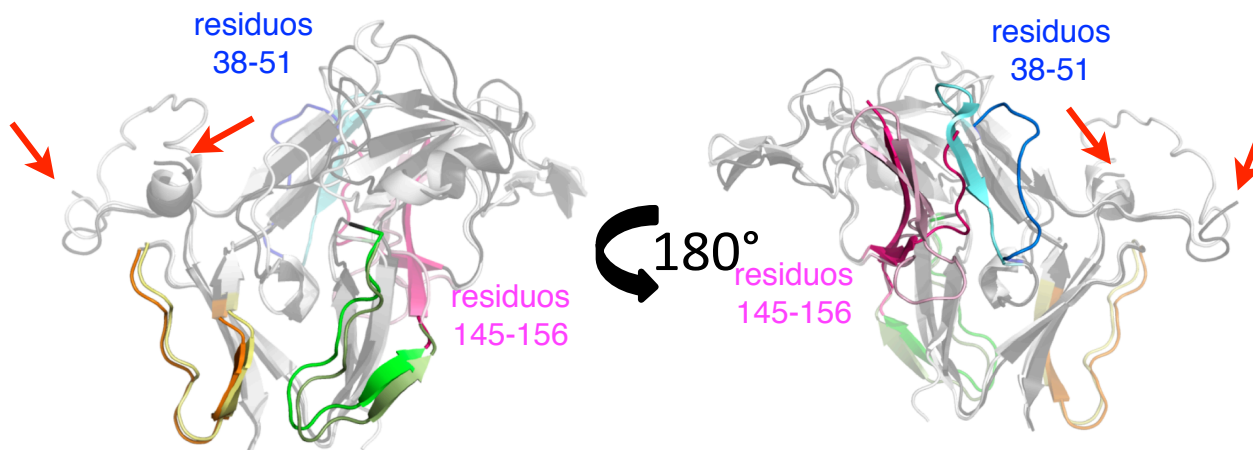


Figura 71. Superposición de $\alpha 3(IV)NC1$ (gris claro) y $\alpha 3(IV)NC1c$ (gris oscuro).

Las regiones de mayor divergencia están coloreadas en rosa/magenta (residuos 38-51) y cian/azul (residuos 145-156) en $\alpha 3(IV)NC1/\alpha 3(IV)NC1c$, respectivamente. Las flechas rojas señalan los extremos del lazo que no se ha podido trazar en $\alpha 3(IV)NC1c$ (residuos 204-213). Las regiones E_A y E_B , que albergan los epítomos GP, están coloreadas en verde y naranja, respectivamente.

El análisis detallado de la variabilidad entre las moléculas de $\alpha 3(IV)NC1$ y $\alpha 3(IV)NC1c$ revela que los cambios se ubican en regiones equivalentes dentro del propio dominio C4, ya que la región 38-51 es equivalente a la región 145-156, la región 66-76 lo es a la 170-187 y la 88-92 a la 199-203. Así, estas áreas del dominio C4 presentan mayor movilidad, lo que junto a su ubicación cerca o dentro del plano ecuatorial de los hexámeros, condiciona la capacidad de ensamblaje de los trímeros en hexámeros. Esto se evidencia bien en el ensanchamiento de los trímeros originados por $\alpha 3(IV)NC1c$ que presentan mayor perímetro, así como mayor tamaño del orificio central y en el polo basal

(Figura 72). La dilatación del trímero generado por $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1c}$ perturbaría e incluso llegaría a impedir el ensamblaje con el trímero vecino para formar el hexámero.

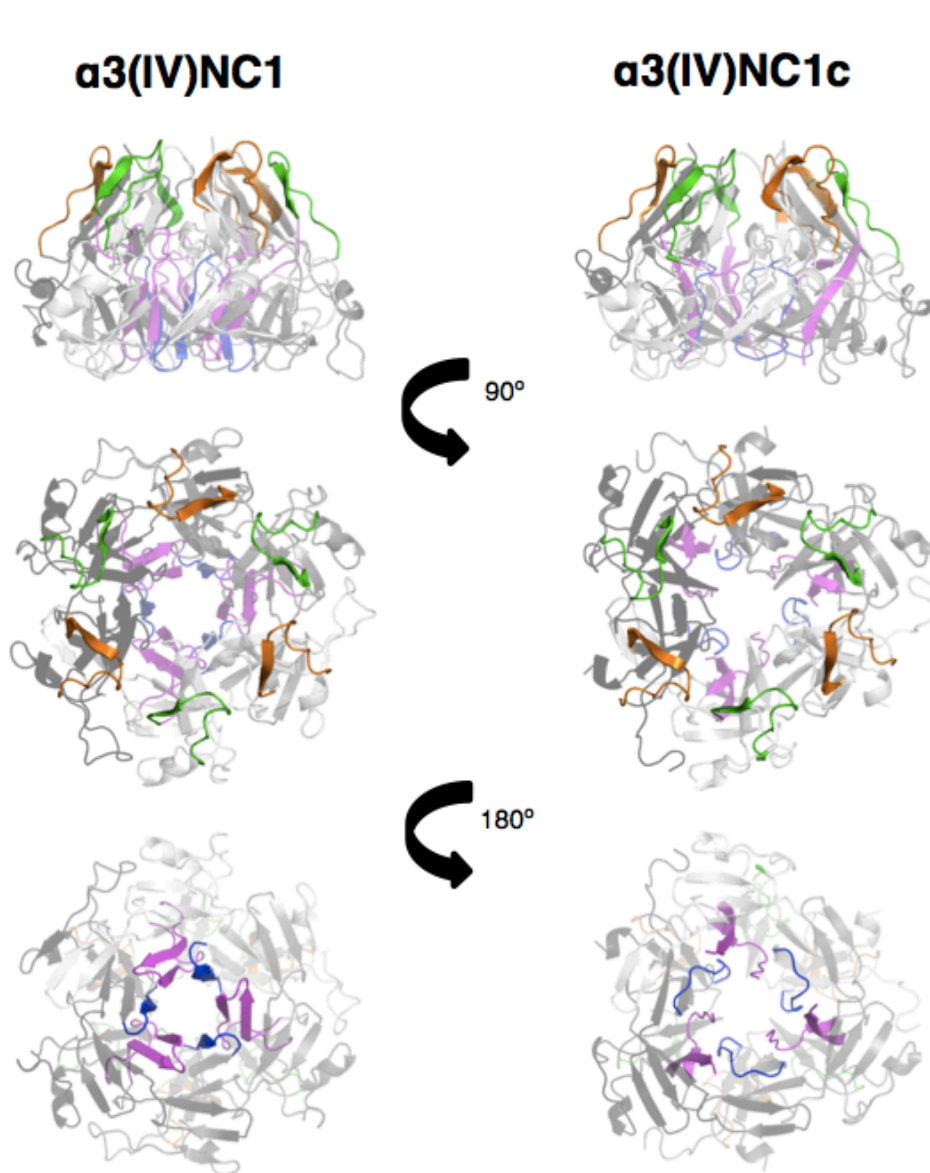


Figura 72. Comparación de los trímeros que originan las moléculas de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ resueltos.

Las regiones con mayor divergencia a p a r e c e n coloreadas en rosa/magenta (38-51) y cian/azul (145-156) para $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1c}$ respectivamente. Las regiones E_A y E_B en donde se ubican los epítomos GP aparecen coloreados en verde y naranja respectivamente. Se observa un ensanchamiento general en el trímero generado por $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1c}$ que impide el ensamblaje con el trímero enfrentado para formar el hexámero.

Las variaciones estructurales entre $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1c}$ y el resto de moléculas $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, introducen también un patrón diferente de distribución de cargas electrostáticas en la

superficie de los trímeros formados por la molécula $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1c}$ (Figura 73), que, probablemente, influirá también en las interacciones intermoleculares.

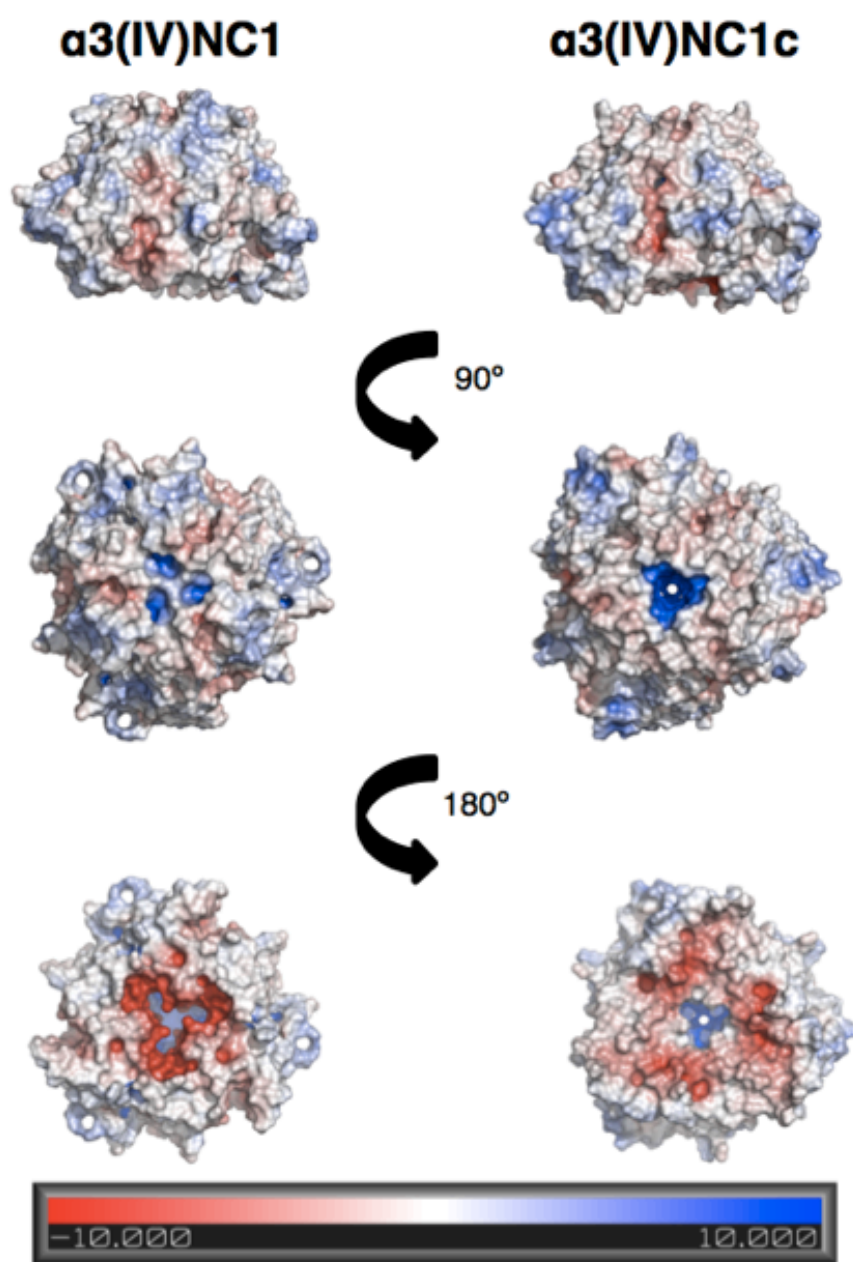


Figura 73. Representación del potencial electrostático en la superficie de los trímeros que originan las dos formas de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$.

Las regiones cargadas negativamente y positivamente se han coloreado en rojo y azul, respectivamente, con la intensidad de color siendo proporcional a su potencial electrostático. Se han omitido en la representación de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ aquellos residuos que no fueron resueltos en $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1c}$ para que las superficies sean equiparables.

Del estudio estructural realizado con la proteína $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ expresada o no junto a GPBP-1 podemos resumir que existen dos tipos de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, uno competente para ensamblarse en hexámeros y otro ($\alpha 3(\text{IV})\text{NC1c}$), sólo presente cuando su expresión ocurre junto a GPBP-1, cuya capacidad de interacción se restringe a trímeros.

3.1.3 Caracterización inmunológica de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ expresada junto a GPBP-1.

Dadas las peculiaridades estructurales y de potencial electrostático revelados para $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1c}$, podemos predecir que la integración de esta forma en un heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$ interferiría notablemente en las interacciones con las moléculas de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ vecinas dentro del heterohexámero, así como en la reactividad de los autoanticuerpos GPc.

Para valorar esta predicción, se analizó mediante ELISA la reactividad de los autoanticuerpos GPc tanto frente a ambos tipos de monómeros $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (proteína expresada o no junto a GPBP-1, purificada y mantenida a baja concentración) como frente a ambos tipos de hexámeros $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (obtenidos tras solubilizar con TBS cristales cúbicos y triangulares (generados, respectivamente, con proteína expresada o no junto a GPBP-1, purificada y concentrada). Con estas cuatro muestras proteicas solubles, se tapizaron microplacas de 96 pocillos, analizando su reactividad frente a los autoanticuerpos GPc, tanto en condiciones nativas, como en condiciones desnaturizantes (adición de urea 8 M a la solución de tapizado) (Figura 74).

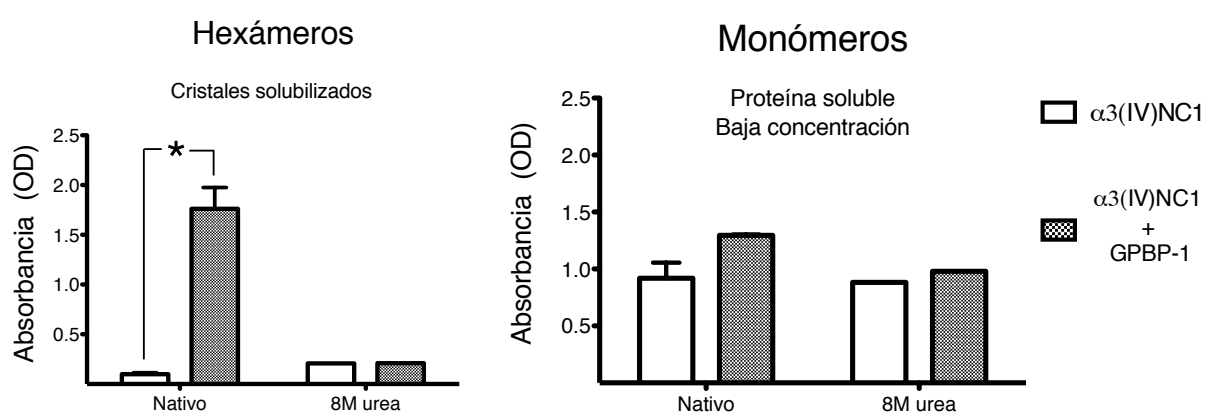


Figura 74. Reactividad de los autoanticuerpos GPc frente a cristales solubilizados, bien triangulares de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ o cúbicos de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ co-expresada con GPBP-1 (panel A) y frente a monómeros de ambas formas de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (panel B).

Las absorbancias se normalizaron en base a la reactividad con anti-FLAG. *, diferencia significativa al 99 %. La normalización en base a la reactividad con anti-FLAG no influyó en ningún momento a la significación estadística.

Los resultados muestran que los anticuerpos GPc no exhiben un grado de reactividad diferente frente a ningún tipo de monómero de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, bajo cualquier condición, co-expresión o no con GPBP-1, nativa o desnaturizante (Figura 74B). Sin embargo, la reactividad de estos anticuerpos hacia la proteína expresada en presencia de GPBP-1 y mantenida bajo condiciones no desnaturizantes es un orden de magnitud mayor que aquella frente a homohexámeros nativos de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ expresados sin el concurso de GPBP-1 (Figura 74A) y también es mayor frente a cualquier forma monomérica de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$. Además, la elevada reactividad de los anticuerpos GPc hacia los cristales solubilizados de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ coexpresado con GPBP-1, se pierde cuando los hexámeros se someten a condiciones desnaturizantes, indicando la esencialidad de mantener la estructura cuaternaria para preservar los epítomos patogénicos. Así, la mayor reactividad de los autoanticuerpos GPc se presenta frente a hexámeros no desnaturizados de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ que han sido producidos en presencia de GPBP-1.

3.1.4 Aproximación mediante mutagénesis dirigida en $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y en GPBP-1 a la abolición del efecto de la cinasa sobre $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$.

Como mencionamos arriba, GPBP-1 es una Ser/Thr cinasa no convencional que fosforila $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ humano (Raya y cols. 1999) que podría estar involucrada en la patogénesis autoinmune (Raya y cols. 2000, Revert y cols. 2007). Con la finalidad de confirmar el papel causal de GPBP-1 en las modificaciones introducidas en $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ a GPBP-1, mutamos a Ala y a Asp el residuo Ser₉ de la alfa hélice de la molécula de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, que es la diana fosforilable de GPBP-1 (Raya y cols. 1999). Las formas mutadas se co-expresaron o no junto a GPBP-1 y las proteínas purificadas se sometieron a condiciones de cristalización.

La Tabla 12 resume los resultados del estudio estructural de los cristales obtenidos. La mutación Ser9Ala no alteró las características de los cristales de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ que resultaron ser triangulares, constituidos por homohexámeros. En el caso de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1/Ser9Ala}$ co-expresado con GPBP-1 se obtuvieron dos tipos de cristales que contenían, unos, un homohexámero típico $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (cristales triangulares), y otros, un homohexámero más un homotrímero como los cristales cúbicos de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ modificado mostrados arriba.

Tabla 12. Composición de los cristales obtenidos a partir de las proteínas mutantes Ser9Ala $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y Ser9Asp $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ expresadas o no junto a GPBP-1.

Mutación	GPBP-1 Ausente	GPBP-1 Presente
Ser9Ala	- Homohexámero	- Homohexámero - Homohexámero + Homotrímero
Ser9Asp	- No difractan bien	- Homohexámero + Homotrímero

Los cristales generados por la proteína mutante Ser9Asp $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ son cristales de morfología triangular que no difractaron correctamente impidiendo recoger un espectro de difracción válido. Así, la imitación de la fosforilación causada por GPBP-1 en esta serina al introducir la cadena lateral de un residuo de aspartato, parece tener repercusiones notables en el plegamiento de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ que impiden una difracción homogénea de los cristales de morfología triangular. Por el contrario, el cristal cúbico que se genera cuando este mutante Ser9Asp $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ se co-expresa con GPBP-1 contiene un homohexámero más un homotrímero, como los cristales de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ no mutados co-expresados con GPBP-1. Estos resultados demuestran el papel causal de GPBP-1 en las modificaciones encontradas en $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ cuando se expresan conjuntamente y están en línea con la propuesta de su participación en el fenómeno autoinmune. También

sugieren que la Ser₉ de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, aunque esencial, no es la diana única de GPBP-1. En esta dirección, resultados no publicados del grupo del Dr. Saus muestran que otros residuos además de la Ser₉, probablemente el residuo adyacente, Ser₁₁, se fosforilan también por GPBP-1, mediando en el efecto conformacional. Así, aquí mostramos que la mutación Ser9Ala no es suficiente para abolir todo el efecto de GPBP-1 sobre $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ obteniéndose los dos tipos de cristales que hemos encontrado. Además, el mero mimetismo de la fosforilación de la Ser₉ por su cambio a Asp₉, ya produce un cambio conformacional en ausencia de GPBP-1 que se refleja en un patrón de difracción aberrante. Si al mismo tiempo se co-expresa GPBP-1, al haber fijado ya una carga positiva en esta posición por la mutación Ser9Asp y permitir la fosforilación de otro/s residuo/s diana, se favorece la formación de moléculas $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ modificadas tal como hemos observado en estos cristales.

La segunda aproximación que llevamos a cabo intentó suprimir la actividad cinasa de GPBP-1. Para ello truncamos de forma secuencial y acumulativa, dos regiones contiguas que podían resultar claves para la actividad de GPBP-1: el dominio PH y la región SR1 rica en el motivo SXY (Figura 75). En la región N terminal de GPBP-1 hay un dominio homólogo a pleckstrina (dominio PH) (Hanada 2013) que facilita la interacción con membranas celulares a través fosfoinosítidos (Dowler y cols. 2000), y dos regiones ricas en serinas, una de ellas N-terminal (SR1), con motivo “Ser-Xaa-Yaa” que es un sitio de fosforilación de la proteína cinasa D (Fugmann y cols. 2007) (ver Figura 16). Con toda probabilidad, la región SR1 conteniendo el motivo SXY es la responsable de la fosforilación de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, ya que presenta una elevada cantidad de residuos serina susceptibles de ser fosforilados y transferir el grupo fosfato.

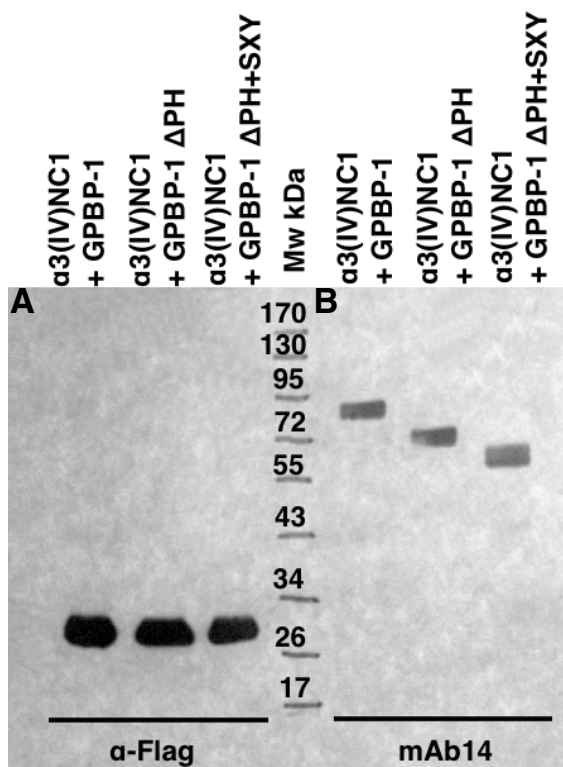


Figura 75. Inmunodetección con anti-FLAG de $\alpha 3(IV)NC1$ co-expresado con GPBP-1 o con sus formas mutantes: ΔPH y $\Delta PH+SXY$ (A) y con mAb14 de GPBP-1 y sus dos formas mutantes: ΔPH y $\Delta PH+SXY$ (B).

mAb14 reconoce la región C-terminal de GPBP-1; (Raya y cols. 1999). La electroforesis (SDS-PAGE, 12 % poliacrilamida) se llevó a cabo en condiciones reductoras. La movilidad electroforética de $\alpha 3(IV)NC1$ expresada en cualquiera de las condiciones ensayadas y de las tres formas de GPBP-1 es en todos los casos la esperada.

Las deleción de la región más N-terminal entre las dos seleccionadas (dominio PH), abolió las modificaciones estructurales en $\alpha 3(IV)NC1$ inducidas por la co-expresión de GPBP-1, obteniéndose cristales de morfología triangular constituidos por homohexámeros $\alpha 3(IV)NC1$. Este resultado sugiere que el dominio PH también es importante en el proceso de fosforilación, bien interaccionando con $\alpha 3(IV)NC1$ para favorecer su acomodación en el sitio catalítico o bien favoreciendo la autofosforilación de GPBP-1 para posteriormente transferir el grupo fosfato. Como era de esperar ante este resultado neutralizante, con el doble mutante que incorpora la deleción del dominio SR1 rico en el motivo SerXY, a la anterior truncación, tampoco se produjeron modificaciones en $\alpha 3(IV)NC1$, obteniéndose cristales de morfología triangular constituidos por homohexámeros. Así pues, la deficiencia funcional en GPBP-1 causada por las deleciones, suprime las modificaciones estructurales encontradas en $\alpha 3(IV)NC1$ co-expresado con GPBP-1 wild-type, demostrando el papel causal de esta cinasa en

aquellas alteraciones y haciendo gravitar en GPBP-1 un posible papel esencial en el desencadenamiento de la patología autoinmune en la enfermedad GP.

3.2 Conclusiones objetivo 3.

Recientes avenidas de información en los últimos años están impulsando la idea de que GPBP-1 regula la organización supramolecular de proteínas estructurales en los compartimientos extracelular, como el colágeno tipo IV (Raya y cols. 1999, Raya y cols. 2000, Revert y cols. 2007, Revert y cols. 2008) e intracelular, como la miosina (Revert-Ros y cols. 2011) y que esta cinasa puede mediar en la patogénesis autoinmune (Raya y cols. 2000)). En esta dirección, se ha mostrado que una expresión aumentada de GPBP-1 induce una desorganización del colágeno de la membrana basal (Revert y cols. 2007). Está bien establecido que el dominio no colagenoso NC1 dirige la organización molecular y supramolecular del colágeno tipo IV de la membrana basal (Hudson y cols. 2003). Y también está bien determinado que el autoantígeno de la enfermedad GP corresponde a la cadena $\alpha 3$ del colágeno IV (Butkowski y cols. 1987, Saus y cols. 1988, Kalluri y cols. 1995) y que los epítomos para los autoanticuerpos se han cartografiado en el dominio NC1, en la región C-terminal de la cadena $\alpha 3$ (IV) (Hellmark y cols. 1999, Netzer y cols. 1999, Borza y cols. 2000, David y cols. 2001, Hellmark y cols. 2003, Gozalbo-Rovira y cols. 2013). Sin embargo, existen escasas evidencias experimentales sobre la causalidad de GPBP-1 en estos procesos y muy limitado conocimiento estructural sobre ellos.

Nosotros hemos presentado aquí, por primera vez, evidencias de que GPBP-1 puede influenciar la estructura de $\alpha 3$ (IV)NC1 como se observa tras la co-expresión de ambas proteínas en la estructura cristalina a nivel atómico de $\alpha 3$ (IV)NC1, en la caracterización termodinámica de la interacción de $\alpha 3$ (IV)NC1 con anticuerpos conformacionales y en su

reconocimiento inmunoquímico. Mientras que los resultados inmunoquímicos y mediante SPR son indicativos de que GPBP-1 influencia la conformación de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, el estudio de difracción de rayos de cristales de proteína $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ expresada o no junto a GPBP-1, claramente revela la naturaleza de los cambios estructurales mediados por la presencia de la cinasa.

GPBP-1 promueve la generación de cristales diferentes (en términos de grupo espacial y moléculas en la unidad asimétrica) a aquellos constituidos por un solo tipo de moléculas de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (que es competente para ensamblarse en hexámeros) por contener también un segundo tipo de molécula de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ modificada ($\alpha 3(\text{IV})\text{NC1c}$), sólo encontrada cuando su expresión ocurre junto a GPBP-1, y cuya capacidad de interacción se restringe a trímeros. Los cambios estructurales observados se localizan esencialmente en dos lazos de de las regiones I y VI del dominio C4 que al presentar mayor movilidad, junto a su ubicación cerca o dentro del plano ecuatorial de los hexámeros, condiciona la capacidad de ensamblaje de los trímeros en hexámeros. Este hecho se evidencia mejor en el ensanchamiento general de los trímeros originados por $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1c}$ que impide el ensamblaje con el trímero vecino para formar el hexámero. Además, uno de estos lazos alberga la Lys_{211} involucrada en un enlace sulfilimina con la Met_{93} del $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ del protómero opuesto (Than y cols. 2002, Vanacore y cols. 2009). A este enlace se le ha atribuido un papel substancial en la patogenia del síndrome GP por contribuir a la estabilidad del hexámero y restringir la accesibilidad de los autoanticuerpos GP. En base a nuestros resultados, la predicción para un heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$ que contuviese una molécula de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1c}$ apuntaría a una perturbación de las interacciones con las moléculas de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ vecinas dentro del heterohexámero y a una abolición de los enlaces sulfilimina, convirtiéndolo, más susceptible al acceso de los anticuerpos GPc. Así, estos

resultados estructurales sustentan la relevancia de GPBP-1 en la organización molecular del colágeno IV y en la etiología de la enfermedad.

También hemos mostrado que el incremento observado en la reactividad (ELISA) de los anticuerpos GPc frente a cristales solubilizados de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ cuando la proteína se co-expresó junto a GPBP-1, obedecía a particularidades presentes en la estructura cuaternaria, ya que se perdía bajo condiciones desnaturalizantes. Comparativamente, la reactividad de aquellos anticuerpos frente a las proteínas tapizadas en forma monomérica en la placa de ensayo no mostraron diferencias significativas por el efecto de la coexpresión con GPBP-1, independientemente de que estas estuviesen en condiciones nativas o desnaturalizantes. Que los autoanticuerpos GPc sean más reactivos frente a homohexámeros de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ cuando se co-expresan con GPBP-1 y también lo sean frente a las formas monoméricas bajo cualquier circunstancia, es consistente con el conocimiento presente del autoepítipo y refuerza la propuesta del papel de la cinasa en la etiología de la enfermedad Goodpasture, quizás facilitando la exposición del epítipo, la activación del sistema inmune y la producción de autoanticuerpos patogénicos. Los resultados de mutagénesis dirigida en $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y en GPBP-1 se complementan y confirman que las modificaciones estructurales observadas en $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ cuando se co-expresa junto a GPBP-1 se deben a la presencia de la cinasa.

Así pues, nuestros resultados son consistentes con la propuesta de que la expresión elevada de GPBP-1 in vivo podría desorganizar la MBG, permitiendo la exposición de epítipos crípticos y desencadenando un proceso autoinmune en el síndrome de Goodpasture y/o un proceso inflamatorio que culminaría en una Glomerulonefritis.

Conclusiones finales.

1- Se ha puesto a punto un sistema eucariota de expresión heteróloga, que emplea la infección mediada por baculovirus en células de insecto, para la producción recombinante de las proteínas humanas α (IV)NC1 y GPBP-1 en cantidad abundante y forma competente, para la realización de estudios de estructura y función de estas proteínas.

2- Se ha profundizado en la caracterización del epítipo Goodpasture usando tecnología phage display y análisis bioinformático, un abordaje que aporta información a partir de las características de los anticuerpos GPc y mAb 3 y que supone una aproximación alternativa a las hasta ahora utilizadas, lo que ha permitido confirmar los datos disponibles y establecer la participación, hasta el momento no identificada, de los residuos Thr₂₆, Tyr₃₀, Thr₉₉, Thr₁₂₇, Pro₁₃₁, His₁₃₄, Lys₁₄₁, y Ala₁₉₆, en el autoepítipo.

3- Producto de este abordaje se han identificado péptidos con capacidad de unión a los autoanticuerpos GPc, lo que abre la puerta a la generación de nuevos agentes bloqueantes terapéuticos.

4- Se ha obtenido cristales y resuelto la estructura proteica mediante cristalografía de rayos X de homohexámeros de α 1(IV)NC1, α 3(IV)NC1, α 4(IV)NC1 y α 5(IV)NC1 y de heterohexámeros de $((\alpha$ 1)₂(α 2))₂(IV)NC1 y de $(\alpha$ 5,6,6)₂(IV)NC1, utilizando en todos los casos reemplazo molecular. La estructura de los cristales obtenidos a partir de homohexámeros de α 2(IV)NC1, heterohexámeros de α 3(IV)NC1- α 4(IV)NC1 y α 3(IV)NC1- α 5(IV)NC1, así como el mutante de α 3(IV)NC1 Ser9Asp, de momento, no han podido ser resueltas.

5- Todas las estructuras resueltas, salvo la de α 4(IV)NC1, exhiben la arquitectura hexamérica cuaternaria típica de los α (IV)NC1 ya conocida, de modo que comparten una estructura cuaternaria fisiológica, validando, así, el sistema de expresión usado.

6- Se ha confirmado e identificado en detalle para todas las proteínas $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ las regiones claves en la formación del protómero (regII y regVI) así como aquellas implicadas en la estabilidad del hexámero (regI, regIII, regIV y regV).

7- El análisis estructural revela claras diferencias en $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ respecto al resto de homohexámeros y evidencia la mayor rigidez de las proteínas $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ pares. Esta menor plasticidad, probablemente, limita su capacidad de autoasociación, precisando de su unión a $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ impares para lograr obtener la arquitectura hexamérica cuaternaria típica.

8- A pesar de los numerosos esfuerzos aplicados, no se han obtenido cristales del heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$ que alberga la diana de los autoanticuerpos GP. Aunque desconocemos las causas para ello y ya que hemos observado la formación de este heterohexámero mediante cromatografía de exclusión molecular junto con la capacidad de todos sus $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$ participantes de cristalizar individualmente, parece que este heterohexámero requiera de la participación de factores adicionales en el proceso de oligomerización y/o estabilización.

9- La formación del protómero en el heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$ podría iniciarse con la formación de un dímero $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}-\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ para, posteriormente, incorporar una molécula de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ que cierre el complejo dando lugar al protómero. Sin embargo, a la vista de los ensayos de afinidad entre los diferentes $\alpha(\text{IV})\text{NC1}$, cabría también la posibilidad de una estequiometría alternativa en la que coexistieran un protómero $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}-\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}-\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$, junto con un protómero $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}-\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}-\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$. Este hecho se sustenta en que ambas combinaciones dan lugar a la formación de cristales, que hasta el momento no hemos logrado difractar en condiciones satisfactorias.

10- La resolución del cristal del heterohexámero $(\alpha 5,6,6)_2(\text{IV})\text{NC1}$ esclarece su arquitectura y revela que su protómero no está constituido, como se sospechaba, por dos moléculas de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ y una de $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$, sino por dos moléculas de $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$ y una de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$.

11- Las regiones diana de los autoanticuerpos GPc se encuentran en el ápice de los dos dominios C4 y corresponden a estructuras rígidas, flanqueadas por puentes disulfuro que contribuyen tanto a la rigidez del epítipo como a su carácter conformacional.

12- La co-expresión de GPBP-1 y $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ altera la estructura cristalina a nivel atómico de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$.

13- GPBP-1 induce cambios estructurales en dos lazos ubicados en las regiones I y VI de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ aportando mayor flexibilidad e impidiendo el ensamblaje de los protómeros en hexámeros.

14- La modificación promovida por GPBP-1 de estos lazos impide la formación del enlace sulfilimina entre protómeros opuestos lo que debe contribuir a inestabilizar el hexámero, facilitando la accesibilidad de los autoanticuerpos GP, lo que sugiere la contribución de GPBP-1 en la patogenia de la enfermedad.

15- Los cambios en la estructura cuaternaria de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ asociados a la coexpresión simultánea de GPBP-1 se acompañan de una mayor sensibilización de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ frente a los anticuerpos GPc, lo que sugiere una mayor exposición del epítipo, que podría actuar como desencadenante de la respuesta del sistema inmune, iniciándose el síndrome de Goodpasture.

16- La mutagénesis dirigida tanto en $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ como en GPBP-1 dan prueba de que la coexpresión simultánea de la cinasa es la causa de las modificaciones estructurales observadas en $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ cuando se coexpresa junto a GPBP-1.

Conclusiones finales.

Bibliografía.

- Abrahamson, D. R., B. G. Hudson, L. Stroganova, D.-B. Borza and P. L. St John (2009). "Cellular origins of type IV collagen networks in developing glomeruli." J. Am. Soc. Nephrol. **20**(7): 1471-1479.
- Aumailley, M., L. Bruckner-Tuderman, W. G. Carter, R. Deutzmann, D. Edgar, P. Ekblom, J. Engel, E. Engvall, E. Hohenester, J. C. Jones, H. K. Kleinman, M. P. Marinkovich, G. R. Martin, U. Mayer, G. Meneguzzi, J. H. Miner, K. Miyazaki, M. Patarroyo, M. Paulsson, V. Quaranta, J. R. Sanes, T. Sasaki, K. Sekiguchi, L. M. Sorokin, J. F. Talts, K. Tryggvason, J. Uitto, I. Virtanen, K. von der Mark, U. M. Wewer, Y. Yamada and P. D. Yurchenco (2005). "A simplified laminin nomenclature." Matrix Biol **24**(5): 326-332.
- Bader, B. L., N. Smyth, S. Nedbal, N. Miosge, A. Baranowsky, S. Mokkapati, M. Murshed and R. Nischt (2005). "Compound genetic ablation of nidogen 1 and 2 causes basement membrane defects and perinatal lethality in mice." Mol Cell Biol **25**(15): 6846-6856.
- Basford, A. W., J. Lewis, J. P. Dwyer and A. B. Fogo (2011). "Membranous nephropathy with crescents." J Am Soc Nephrol **22**(10): 1804-1808.
- Bernal, D., S. Quinones and J. Saus (1993). "The human mRNA encoding the Goodpasture antigen is alternatively spliced." J Biol Chem **268**(16): 12090-12094.
- Bohrer, M. P., C. Baylis, H. D. Humes, R. J. Glassock, C. R. Robertson and B. M. Brenner (1978). "Permeability of the glomerular capillary wall. Facilitated filtration of circulating polycations." J Clin Invest **61**(1): 72-78.
- Borza, C. M., D. B. Borza, V. Pedchenko, M. A. Saleem, P. W. Mathieson, Y. Sado, H. M. Hudson, A. Pozzi, J. Saus, D. R. Abrahamson, R. Zent and B. G. Hudson (2008). "Human podocytes adhere to the KRGDS motif of the alpha3alpha4alpha5 collagen IV network." J Am Soc Nephrol **19**(4): 677-684.
- Borza, D. B., O. Bondar, S. Colon, P. Todd, Y. Sado, E. G. Neilson and B. G. Hudson (2005). "Goodpasture autoantibodies unmask cryptic epitopes by selectively dissociating autoantigen complexes lacking structural reinforcement: novel mechanisms for immune privilege and autoimmune pathogenesis." J Biol Chem **280**(29): 27147-27154.
- Borza, D. B., O. Bondar, Y. Ninomiya, Y. Sado, I. Naito, P. Todd and B. G. Hudson (2001). "The NC1 domain of collagen IV encodes a novel network composed of the alpha 1, alpha 2, alpha 5, and alpha 6 chains in smooth muscle basement membranes." J Biol Chem **276**(30): 28532-28540.
- Borza, D. B., O. Bondar, P. Todd, M. Sundaramoorthy, Y. Sado, Y. Ninomiya and B. G. Hudson (2002). "Quaternary organization of the goodpasture autoantigen, the alpha 3(IV) collagen chain. Sequestration of two cryptic autoepitopes by intrapromoter interactions with the alpha4 and alpha5 NC1 domains." J Biol Chem **277**(42): 40075-40083.
- Borza, D. B., K. O. Netzer, A. Leinonen, P. Todd, J. Cervera, J. Saus and B. G. Hudson (2000). "The goodpasture autoantigen. Identification of multiple cryptic epitopes on the NC1 domain of the alpha3(IV) collagen chain." J Biol Chem **275**(8): 6030-6037.
- Boutaud, A., D. B. Borza, O. Bondar, S. Gunwar, K. O. Netzer, N. Singh, Y. Ninomiya, Y. Sado, M. E. Noelken and B. G. Hudson (2000). "Type IV collagen of the glomerular

- basement membrane. Evidence that the chain specificity of network assembly is encoded by the noncollagenous NC1 domains." *J Biol Chem* **275**(39): 30716-30724.
- Boute, N., O. Gribouval, S. Roselli, F. Benessy, H. Lee, A. Fuchshuber, K. Dahan, M. C. Gubler, P. Niaudet and C. Antignac (2000). "NPHS2, encoding the glomerular protein podocin, is mutated in autosomal recessive steroid-resistant nephrotic syndrome." *Nat Genet* **24**(4): 349-354.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Bulger, R. E., G. Eknayan, D. J. Purcell, 2nd and D. C. Dobyan (1983). "Endothelial characteristics of glomerular capillaries in normal, mercuric chloride-induced, and gentamicin-induced acute renal failure in the rat." *J Clin Invest* **72**(1): 128-141.
- Burnette, W. N. (1981). "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." *Anal Biochem* **112**(2): 195-203.
- Butkowski, R. J., J. P. Langeveld, J. Wieslander, J. Hamilton and B. G. Hudson (1987). "Localization of the Goodpasture epitope to a novel chain of basement membrane collagen." *J Biol Chem* **262**(16): 7874-7877.
- Calvete, J. J., F. Revert, M. Blanco, J. Cervera, C. Tarrega, L. Sanz, F. Revert-Ros, F. Granero, E. Perez-Paya, B. G. Hudson and J. Saus (2006). "Conformational diversity of the Goodpasture antigen, the noncollagenous-1 domain of the alpha3 chain of collagen IV." *Proteomics* **6 Suppl 1**: S237-244.
- Chiang, C. K. and R. Inagi (2010). "Glomerular diseases: genetic causes and future therapeutics." *Nat Rev Nephrol* **6**(9): 539-554.
- Collaborative Computational Project, N. (1994). "The CCP4 suite: programs for protein crystallography." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **50**(Pt 5): 760-763.
- Cui, Z., M. H. Zhao, A. K. Singh and H. Y. Wang (2007). "Antiglomerular basement membrane disease with normal renal function." *Kidney Int* **72**(11): 1403-1408.
- David, M., D. B. Borza, A. Leinonen, J. M. Belmont and B. G. Hudson (2001). "Hydrophobic amino acid residues are critical for the immunodominant epitope of the Goodpasture autoantigen. A molecular basis for the cryptic nature of the epitope." *J Biol Chem* **276**(9): 6370-6377.
- Dowler, S., R. A. Currie, D. G. Campbell, M. Deak, G. Kular, C. P. Downes and D. R. Alessi (2000). "Identification of pleckstrin-homology-domain-containing proteins with novel phosphoinositide-binding specificities." *Biochem J* **351**(Pt 1): 19-31.
- Emsley, P. and K. Cowtan (2004). "Coot: model-building tools for molecular graphics." *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **60**(Pt 12 Pt 1): 2126-2132.
- Ermann, J. and C. G. Fathman (2001). "Autoimmune diseases: genes, bugs and failed regulation." *Nat Immunol* **2**(9): 759-761.
- Fox, J. W., U. Mayer, R. Nischt, M. Aumailley, D. Reinhardt, H. Wiedemann, K. Mann, R. Timpl, T. Krieg, J. Engel and et al. (1991). "Recombinant nidogen consists of three

- globular domains and mediates binding of laminin to collagen type IV." *EMBO J* **10**(11): 3137-3146.
- Fugmann, T., A. Hausser, P. Schoffler, S. Schmid, K. Pfizenmaier and M. A. Olayioye (2007). "Regulation of secretory transport by protein kinase D-mediated phosphorylation of the ceramide transfer protein." *J Cell Biol* **178**(1): 15-22.
- Glanville, R. W., R. Q. Qian, B. Siebold, J. Risteli and K. Kuhn (1985). "Amino acid sequence of the N-terminal aggregation and cross-linking region (7S domain) of the alpha 1 (IV) chain of human basement membrane collagen." *Eur J Biochem* **152**(1): 213-219.
- Gozalbo-Rovira, R., J. Rodriguez-Diaz, J. Saus and J. Cervera (2013). "Precise mapping of the Goodpasture epitope(s) using phage display, site-directed mutagenesis, and surface plasmon resonance." *Kidney Int* **83**(3): 438-445.
- Granero, F., F. Revert, F. Revert-Ros, S. Lainez, P. Martinez-Martinez and J. Saus (2005). "A human-specific TNF-responsive promoter for Goodpasture antigen-binding protein." *FEBS J* **272**(20): 5291-5305.
- Granero-Molto, F., S. Sarmah, L. O'Rear, A. Spagnoli, D. Abrahamson, J. Saus, B. G. Hudson and E. W. Knapik (2008). "Goodpasture antigen-binding protein and its spliced variant, ceramide transfer protein, have different functions in the modulation of apoptosis during zebrafish development." *J Biol Chem* **283**(29): 20495-20504.
- Groffen, A. J., M. A. Ruegg, H. Dijkman, T. J. van de Velden, C. A. Buskens, J. van den Born, K. J. Assmann, L. A. Monnens, J. H. Veerkamp and L. P. van den Heuvel (1998). "Agrin is a major heparan sulfate proteoglycan in the human glomerular basement membrane." *J Histochem Cytochem* **46**(1): 19-27.
- Gunnarsson, A., T. Hellmark and J. Wieslander (2000). "Molecular properties of the Goodpasture epitope." *J Biol Chem* **275**(40): 30844-30848.
- Hanada, K. (2013). "Co-evolution of sphingomyelin and the ceramide transport protein CERT." *Biochim Biophys Acta*.
- Hanada, K., K. Kumagai, S. Yasuda, Y. Miura, M. Kawano, M. Fukasawa and M. Nishijima (2003). "Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide." *Nature* **426**(6968): 803-809.
- Haraldsson, B., J. Nystrom and W. M. Deen (2008). "Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria." *Physiol Rev* **88**(2): 451-487.
- Hausmann, R., C. Kuppe, H. Egger, F. Schweda, V. Knecht, M. Elger, S. Menzel, D. Somers, G. Braun, A. Fuss, S. Uhlig, W. Kriz, G. Tanner, J. Floege and M. J. Moeller (2010). "Electrical forces determine glomerular permeability." *J Am Soc Nephrol* **21**(12): 2053-2058.
- Hellmark, T., C. Brunmark, J. Trojnar and J. Wieslander (1996). "Epitope mapping of anti-glomerular basement membrane (GBM) antibodies with synthetic peptides." *Clin Exp Immunol* **105**(3): 504-510.
- Hellmark, T., H. Burkhardt and J. Wieslander (1999). "Goodpasture disease. Characterization of a single conformational epitope as the target of pathogenic autoantibodies." *J Biol Chem* **274**(36): 25862-25868.

- Hellmark, T., L. Chen, S. Ohlsson, J. Wieslander and W. K. Bolton (2003). "Point mutations of single amino acids abolish ability of alpha3 NC1 domain to elicit experimental autoimmune glomerulonephritis in rats." J Biol Chem **278**(47): 46516-46522.
- Hellmark, T., C. Johansson and J. Wieslander (1994). "Characterization of anti-GBM antibodies involved in Goodpasture's syndrome." Kidney Int **46**(3): 823-829.
- Hellmark, T., J. L. Niles, A. B. Collins, R. T. McCluskey and C. Brunmark (1997). "Comparison of anti-GBM antibodies in sera with or without ANCA." J Am Soc Nephrol **8**(3): 376-385.
- Hellmark, T. and M. Segelmark (2014). "Diagnosis and classification of Goodpasture's disease (anti-GBM)." J Autoimmun **48-49**: 108-112.
- Hellmark, T., M. Segelmark, C. Unger, H. Burkhardt, J. Saus and J. Wieslander (1999). "Identification of a clinically relevant immunodominant region of collagen IV in Goodpasture disease." Kidney Int **55**(3): 936-944.
- Huang, R., P. Fang and B. K. Kay (2012). "Improvements to the Kunkel mutagenesis protocol for constructing primary and secondary phage-display libraries." Methods **58**(1): 10-17.
- Hudson, B. G., S. T. Reeders and K. Tryggvason (1993). "Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis." J Biol Chem **268**(35): 26033-26036.
- Hudson, B. G., K. Tryggvason, M. Sundaramoorthy and E. G. Neilson (2003). "Alport's syndrome, Goodpasture's syndrome, and type IV collagen." N Engl J Med **348**(25): 2543-2556.
- Jeansson, M., A. B. Granqvist, J. S. Nystrom and B. Haraldsson (2006). "Functional and molecular alterations of the glomerular barrier in long-term diabetes in mice." Diabetologia **49**(9): 2200-2209.
- Jeansson, M. and B. Haraldsson (2006). "Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier." Am J Physiol Renal Physiol **290**(1): F111-116.
- Johansson, C., R. Butkowski and J. Wieslander (1991). "Characterization of monoclonal antibodies to the globular domain of collagen IV." Connect Tissue Res **25**(3-4): 229-241.
- Julian, B. A. and J. Novak (2004). "IgA nephropathy: an update." Curr Opin Nephrol Hypertens **13**(2): 171-179.
- Kalluri, R., S. Gunwar, S. T. Reeders, K. C. Morrison, M. Mariyama, K. E. Ebner, M. E. Noelken and B. G. Hudson (1991). "Goodpasture syndrome. Localization of the epitope for the autoantibodies to the carboxyl-terminal region of the alpha 3(IV) chain of basement membrane collagen." J Biol Chem **266**(35): 24018-24024.
- Kalluri, R., E. Melendez, K. W. Rumpf, K. Sattler, G. A. Muller, F. Strutz and E. G. Neilson (1996). "Specificity of circulating and tissue-bound autoantibodies in Goodpasture syndrome." Proc Assoc Am Physicians **108**(2): 134-139.
- Kalluri, R., C. B. Wilson, M. Weber, S. Gunwar, A. M. Chonko, E. G. Neilson and B. G. Hudson (1995). "Identification of the alpha 3 chain of type IV collagen as the common

- autoantigen in antibasement membrane disease and Goodpasture syndrome." J Am Soc Nephrol **6**(4): 1178-1185.
- Kanwar, Y. S., F. R. Danesh and S. S. Chugh (2007). "Contribution of proteoglycans towards the integrated functions of renal glomerular capillaries: a historical perspective." Am J Pathol **171**(1): 9-13.
- Khoshnoodi, J., J. P. Cartailer, K. Alvares, A. Veis and B. G. Hudson (2006). "Molecular recognition in the assembly of collagens: terminal noncollagenous domains are key recognition modules in the formation of triple helical protomers." J Biol Chem **281**(50): 38117-38121.
- Khoshnoodi, J., V. Pedchenko and B. G. Hudson (2008). "Mammalian collagen IV." Microsc Res Tech **71**(5): 357-370.
- Kleppel, M. M., P. A. Santi, J. D. Cameron, J. Wieslander and A. F. Michael (1989). "Human tissue distribution of novel basement membrane collagen." Am J Pathol **134**(4): 813-825.
- Kreisberg, J. I., M. Venkatachalam and D. Troyer (1985). "Contractile properties of cultured glomerular mesangial cells." Am J Physiol **249**(4 Pt 2): F457-463.
- Kuhn, K., H. Wiedemann, R. Timpl, J. Risteli, H. Dieringer, T. Voss and R. W. Glanville (1981). "Macromolecular structure of basement membrane collagens." FEBS Lett **125**(1): 123-128.
- Kumar, S. and O. Carugo (2011). "Homology modeling and consensus protein disorder prediction of human filamin." Bioinformatics **6**(10): 366-369.
- Kurkinen, M., M. R. Condon, B. Blumberg, D. P. Barlow, S. Quinones, J. Saus and T. Pihlajaniemi (1987). "Extensive homology between the carboxyl-terminal peptides of mouse alpha 1(IV) and alpha 2(IV) collagen." J Biol Chem **262**(18): 8496-8499.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lahdenpera, J., P. Kilpelainen, X. L. Liu, T. Pikkarainen, P. Reponen, V. Ruotsalainen and K. Tryggvason (2003). "Clustering-induced tyrosine phosphorylation of nephrin by Src family kinases." Kidney Int **64**(2): 404-413.
- Langeveld, J. P., M. E. Noelken, K. Hard, P. Todd, J. F. Vliegthart, J. Rouse and B. G. Hudson (1991). "Bovine glomerular basement membrane. Location and structure of the asparagine-linked oligosaccharide units and their potential role in the assembly of the 7 S collagen IV tetramer." J Biol Chem **266**(4): 2622-2631.
- Lazor, R., L. Bigay-Game, V. Cottin, J. Cadranet, O. Decaux, J. M. Fellrath, J. F. Cordier, P. Groupe d'Etudes et de Recherche sur les Maladies Orphelines, I. Swiss Group for and D. Orphan Lung (2007). "Alveolar hemorrhage in anti-basement membrane antibody disease: a series of 28 cases." Medicine (Baltimore) **86**(3): 181-193.
- Lerner, R. A., R. J. Glasscock and F. J. Dixon (1967). "The role of anti-glomerular basement membrane antibody in the pathogenesis of human glomerulonephritis." J Exp Med **126**(6): 989-1004.
- Levy, J. B., T. Hammad, A. Coulthart, T. Dougan and C. D. Pusey (2004). "Clinical features and outcome of patients with both ANCA and anti-GBM antibodies." Kidney Int **66**(4): 1535-1540.

- Liu, K., X. Feng, Z. Ma, C. Luo, B. Zhou, R. Cao, L. Huang, D. Miao, R. Pang, D. He, X. Lian and P. Chen (2012). "Antiviral activity of phage display selected peptides against Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in vitro." *Virology* **432**(1): 73-80.
- Mayrose, I., T. Shlomi, N. D. Rubinstein, J. M. Gershoni, E. Ruppim, R. Sharan and T. Pupko (2007). "Epitope mapping using combinatorial phage-display libraries: a graph-based algorithm." *Nucleic Acids Res* **35**(1): 69-78.
- McKee, K. K., D. Harrison, S. Capizzi and P. D. Yurchenco (2007). "Role of laminin terminal globular domains in basement membrane assembly." *J Biol Chem* **282**(29): 21437-21447.
- Mene, P., M. S. Simonson and M. J. Dunn (1989). "Physiology of the mesangial cell." *Physiol Rev* **69**(4): 1347-1424.
- Miner, J. H. (1998). "Developmental biology of glomerular basement membrane components." *Curr Opin Nephrol Hypertens* **7**(1): 13-19.
- Miner, J. H. (2013). "The Glomerular Basement Membrane." **318**(9): 5.
- Miner, J. H., B. L. Patton, S. I. Lentz, D. J. Gilbert, W. D. Snider, N. A. Jenkins, N. G. Copeland and J. R. Sanes (1997). "The laminin alpha chains: expression, developmental transitions, and chromosomal locations of alpha1-5, identification of heterotrimeric laminins 8-11, and cloning of a novel alpha3 isoform." *J Cell Biol* **137**(3): 685-701.
- Miner, J. H. and J. R. Sanes (1994). "Collagen IV alpha 3, alpha 4, and alpha 5 chains in rodent basal laminae: sequence, distribution, association with laminins, and developmental switches." *J Cell Biol* **127**(3): 879-891.
- Myers, J. C., P. S. Howard, A. M. Jelen, A. S. Dion and E. J. Macarak (1987). "Duplication of type IV collagen COOH-terminal repeats and species-specific expression of alpha 1(IV) and alpha 2(IV) collagen genes." *J Biol Chem* **262**(19): 9231-9238.
- Neilson, E. G., R. Kalluri, M. J. Sun, S. Gunwar, T. Danoff, M. Mariyama, J. C. Myers, S. T. Reeders and B. G. Hudson (1993). "Specificity of Goodpasture autoantibodies for the recombinant noncollagenous domains of human type IV collagen." *J Biol Chem* **268**(12): 8402-8405.
- Netzer, K. O., A. Leinonen, A. Boutaud, D. B. Borza, P. Todd, S. Gunwar, J. P. Langeveld and B. G. Hudson (1999). "The goodpasture autoantigen. Mapping the major conformational epitope(s) of alpha3(IV) collagen to residues 17-31 and 127-141 of the NC1 domain." *J Biol Chem* **274**(16): 11267-11274.
- Ooi, J. D., R. K. Phoon, S. R. Holdsworth and A. R. Kitching (2009). "IL-23, not IL-12, directs autoimmunity to the Goodpasture antigen." *J Am Soc Nephrol* **20**(5): 980-989.
- Pedchenko, V., O. Bondar, A. B. Fogo, R. Vanacore, P. Voziyan, A. R. Kitching, J. Wieslander, C. Kashtan, D. B. Borza, E. G. Neilson, C. B. Wilson and B. G. Hudson (2010). "Molecular architecture of the Goodpasture autoantigen in anti-GBM nephritis." *N Engl J Med* **363**(4): 343-354.
- Penades, J. R., D. Bernal, F. Revert, C. Johansson, V. J. Fresquet, J. Cervera, J. Wieslander, S. Quinones and J. Saus (1995). "Characterization and expression of multiple alternatively spliced transcripts of the Goodpasture antigen gene region. Goodpasture antibodies recognize recombinant proteins representing the autoantigen and one of its alternative forms." *Eur J Biochem* **229**(3): 754-760.

- Phelps, R. G. and A. J. Rees (1999). "The HLA complex in Goodpasture's disease: a model for analyzing susceptibility to autoimmunity." *Kidney Int* **56**(5): 1638-1653.
- Quinones, S., D. Bernal, M. Garcia-Sogo, S. F. Elena and J. Saus (1992). "Exon/intron structure of the human alpha 3(IV) gene encompassing the Goodpasture antigen (alpha 3(IV)NC1). Identification of a potentially antigenic region at the triple helix/NC1 domain junction." *J Biol Chem* **267**(28): 19780-19784.
- Quinones, S., J. Saus, Y. Otani, E. D. Harris, Jr. and M. Kurkinen (1989). "Transcriptional regulation of human stromelysin." *J Biol Chem* **264**(14): 8339-8344.
- Ramachandran, G. N., C. Ramakrishnan and V. Sasisekharan (1963). "Stereochemistry of polypeptide chain configurations." *J Mol Biol* **7**: 95-99.
- Raya, A., F. Revert, S. Navarro and J. Saus (1999). "Characterization of a novel type of serine/threonine kinase that specifically phosphorylates the human goodpasture antigen." *J Biol Chem* **274**(18): 12642-12649.
- Raya, A., F. Revert-Ros, P. Martinez-Martinez, S. Navarro, E. Rosello, B. Vieites, F. Granero, J. Forteza and J. Saus (2000). "Goodpasture antigen-binding protein, the kinase that phosphorylates the goodpasture antigen, is an alternatively spliced variant implicated in autoimmune pathogenesis." *J Biol Chem* **275**(51): 40392-40399.
- Revert, F., R. Merino, C. Monteagudo, J. Macias, A. Peydro, J. Alcacer, P. Muniesa, R. Marquina, M. Blanco, M. Iglesias, F. Revert-Ros, J. Merino and J. Saus (2007). "Increased Goodpasture antigen-binding protein expression induces type IV collagen disorganization and deposit of immunoglobulin A in glomerular basement membrane." *Am J Pathol* **171**(5): 1419-1430.
- Revert, F., J. R. Penades, M. Plana, D. Bernal, C. Johansson, E. Itarte, J. Cervera, J. Wieslander, S. Quinones and J. Saus (1995). "Phosphorylation of the Goodpasture antigen by type A protein kinases." *J Biol Chem* **270**(22): 13254-13261.
- Revert, F., I. Ventura, P. Martinez-Martinez, F. Granero-Molto, F. Revert-Ros, J. Macias and J. Saus (2008). "Goodpasture Antigen-binding Protein Is a Soluble Exportable Protein That Interacts with Type IV Collagen: IDENTIFICATION OF NOVEL MEMBRANE-BOUND ISOFORMS." *Journal of Biological Chemistry* **283**(44): 30246-30255.
- Revert, F., I. Ventura, P. Martinez-Martinez, F. Granero-Molto, F. Revert-Ros, J. Macias and J. Saus (2008). "Goodpasture antigen-binding protein is a soluble exportable protein that interacts with type IV collagen. Identification of novel membrane-bound isoforms." *J Biol Chem* **283**(44): 30246-30255.
- Revert-Ros, F., E. Lopez-Pascual, F. Granero-Molto, J. Macias, R. Breyer, R. Zent, B. G. Hudson, A. Saadeddin, F. Revert, R. Blasco, C. Navarro, D. Burks and J. Saus (2011). "Goodpasture antigen-binding protein (GPBP) directs myofibril formation: identification of intracellular downstream effector 130-kDa GPBP-interacting protein (GIP130)." *J Biol Chem* **286**(40): 35030-35043.
- Risteli, J., H. P. Bachinger, J. Engel, H. Furthmayr and R. Timpl (1980). "7-S collagen: characterization of an unusual basement membrane structure." *Eur J Biochem* **108**(1): 239-250.

- Sado, Y., A. Boutaud, M. Kagawa, I. Naito, Y. Ninomiya and B. G. Hudson (1998). "Induction of anti-GBM nephritis in rats by recombinant alpha 3(IV)NC1 and alpha 4(IV)NC1 of type IV collagen." *Kidney Int* **53**(3): 664-671.
- Salama, A. D., J. B. Levy, L. Lightstone and C. D. Pusey (2001). "Goodpasture's disease." *Lancet* **358**(9285): 917-920.
- Sali, A. and T. L. Blundell (1993). "Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints." *J Mol Biol* **234**(3): 779-815.
- Saus, J. (2002). Methods and reagents for treating autoimmune disorders.
- Saus, J., J. Wieslander, J. P. Langeveld, S. Quinones and B. G. Hudson (1988). "Identification of the Goodpasture antigen as the alpha 3(IV) chain of collagen IV." *J Biol Chem* **263**(26): 13374-13380.
- Segelmark, M., T. Hellmark and J. Wieslander (2003). "The prognostic significance in Goodpasture's disease of specificity, titre and affinity of anti-glomerular-basement-membrane antibodies." *Nephron Clin Pract* **94**(3): c59-68.
- Siebold, B., R. Deutzmann and K. Kuhn (1988). "The arrangement of intra- and intermolecular disulfide bonds in the carboxyterminal, non-collagenous aggregation and cross-linking domain of basement-membrane type IV collagen." *Eur J Biochem* **176**(3): 617-624.
- Siebold, B., R. A. Qian, R. W. Glanville, H. Hofmann, R. Deutzmann and K. Kuhn (1987). "Construction of a model for the aggregation and cross-linking region (7S domain) of type IV collagen based upon an evaluation of the primary structure of the alpha 1 and alpha 2 chains in this region." *Eur J Biochem* **168**(3): 569-575.
- Stanton, M. C. and J. D. Tange (1958). "Goodpasture's syndrome (pulmonary haemorrhage associated with glomerulonephritis)." *Australas Ann Med* **7**(2): 132-144.
- Sundaramoorthy, M., M. Meiyappan, P. Todd and B. G. Hudson (2002). "Crystal structure of NC1 domains. Structural basis for type IV collagen assembly in basement membranes." *J Biol Chem* **277**(34): 31142-31153.
- Than, M. E., S. Henrich, R. Huber, A. Ries, K. Mann, K. Kuhn, R. Timpl, G. P. Bourenkov, H. D. Bartunik and W. Bode (2002). "The 1.9-A crystal structure of the noncollagenous (NC1) domain of human placenta collagen IV shows stabilization via a novel type of covalent Met-Lys cross-link." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(10): 6607-6612.
- Theofilopoulos, A. N. and F. J. Dixon (1985). "Murine models of systemic lupus erythematosus." *Adv Immunol* **37**: 269-390.
- Timpl, R., P. Bruckner and P. Fietzek (1979). "Characterization of pepsin fragments of basement membrane collagen obtained from a mouse tumor." *Eur J Biochem* **95**(2): 255-263.
- Timpl, R., H. Wiedemann, V. van Delden, H. Furthmayr and K. Kuhn (1981). "A network model for the organization of type IV collagen molecules in basement membranes." *Eur J Biochem* **120**(2): 203-211.
- Vanacore, R., A.-J. L. Ham, M. Voehler, C. R. Sanders, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, K. B. Sharpless, P. E. Dawson and B. G. Hudson (2009). "A sulfilimine bond identified in collagen IV." *Science* **325**(5945): 1230-1234.

- Vandenberg, P., A. Kern, A. Ries, L. Luckenbill-Edds, K. Mann and K. Kuhn (1991). "Characterization of a type IV collagen major cell binding site with affinity to the alpha 1 beta 1 and the alpha 2 beta 1 integrins." J Cell Biol **113**(6): 1475-1483.
- Welsh, G. I. and M. A. Saleem (2012). "The podocyte cytoskeleton--key to a functioning glomerulus in health and disease." Nat Rev Nephrol **8**(1): 14-21.
- Wu, J., J. Hicks, C. Ou, D. Singleton, J. Borillo and Y. H. Lou (2001). "Glomerulonephritis induced by recombinant collagen IV alpha 3 chain noncollagen domain 1 is not associated with glomerular basement membrane antibody: a potential T cell-mediated mechanism." J Immunol **167**(4): 2388-2395.
- Zhou, J., M. Ding, Z. Zhao and S. T. Reeders (1994). "Complete primary structure of the sixth chain of human basement membrane collagen, alpha 6(IV). Isolation of the cDNAs for alpha 6(IV) and comparison with five other type IV collagen chains." J Biol Chem **269**(18): 13193-13199.

Anexo I. Cebadores utilizados.

Las siguientes tablas resumen los cebadores aquí utilizados.

Tabla A1. Secuencia de los cebadores utilizados en el clonado de los genes.

Proteína	Acrónimo	Secuencia Cebador
$\alpha 1(IV)NC1$	NC11_FLAG1/2_FWD	5'-GACAAGGGCCCCGATGGGTTGCCAGGATCCATGGGGCCC-3'
	NC11_FLAG_FWD	5'-GACTACAAGGACGACGATGACAAGGGCCCCGATGGGTTGCCAGGATCC-3'
	NC11_REV	5'-TAGCTGAGTCAGGCTTCATTATGTTCT-3'
	NC11_KpnI_REV	5'-CCATGTTGGTACCTTAGCTGAGTCAGGCTTCATTATGTTCT-3'
$\alpha 2(IV)NC1$	NC12_FLAG1/2_FWD	5'-GACAAGGGCCGTCAGGGAGCCCCGGCCTGCCGGGTATG-3'
	NC12_FLAG_FWD	5'-GACTACAAGGACGACGATGACAAGGGCCGTCAGGGAGC-3'
	NC12_REV	5'-TTCCTGGCACGCGCCGGCTCACAGGTT-3'
	NC12_SacI_REV	5'-TTCCTGGCAGAGCTCGGCTCACAGGTT-3'
$\alpha 4(IV)NC1$	NC14_FLAG1/2_FWD	5'-GACAAGCTAGCTGGTCCCATTGGGGATCCTGGGCCAAA-3'
	NC14_FLAG_FWD	5'-GACTACAAGGACGACGATGACAAGCTAGCTGGTCCCATTGGGGATCCTGGGCC-3'
	NC14_REV	5'-GCCGAGGGCCCCTAGCTATACTTCACGCAG-3'
	NC14_KpnI_REV	5'-ATTGGTACCGCCGAGGGCCCCTAGCTA-3'
$\alpha 5(IV)NC1$	NC15_FLAG1/2_FWD	5'-GACAAGGGTCCAGATGGATTGCAAGGTCCCCAGGTCCC-3'
	NC15_FLAG_FWD	5'-GACTACAAGGACGACGATGACAAGGGTCCAGATGGATTGCAAGGTCCC-3'
	NC15_FLAG_REV	5'-AAGGAATTCTTCAAATGTTATGTCCT-3'
	NC15_SacI_REV	5'-GGTGAGCTCAAGGAATTCTTCAAATG-3'
$\alpha 6(IV)NC1$	NC16_FLAG1/2_FWD	5'-GACAAGGGGCAGCAAGGCCCTTCGGGATGCCTGGAATG-3'
	NC16_FLAG_FWD	5'-GACTACAAGGACGACGATGACAAGGGGCAGCAAGGCC-3'
	NC16_REV	5'-AGAGTGGCAGGTGCCACCCTACAGGCT-3'
	NC16_SacI_REV	5'-AGAGTGGGAGCTCCACCCTACAGGCT-3'
GPBP-1	GPBP_XhoI_FWD	5'-CGGCCCCAGTGTGCTCGAGGCAGAA-3'
	GPBP_KpnI_REV	5'-CATATCTTCTGGTACCTGTTAATA-3'
	GPBP_FLAG1/2_FWD	5'-CGATGACAAGATGTCGGATAATCAGAGCTGG-3'
	GPBP_FLAG_FWD	5'-GACTACAAGGACGACGATGACAAGATGTCGGATAATCA-3'
Adición FLAG + péptido señal (Común)	FLAG_Pseñal_FWD	5'-AGGGCTCTGGCAGCCCCACTAGCCGACTACAAGGACGACGATGACAAG-3'
	Pseñal1_Pseñal2_FWD	5'-TTCTTTCTCCTTTGCCTGGCCGGGAGGGCTCTGGCAGCCCCACTAGCC-3'
	Pseñal2_BamHI_FWD	5'-AGGGGGATCCATGAGGGCCTGGATCTTCTTTCTCCTTTGCCTG-3'
	Pseñal2_XhoI_FWD	5'-AGGGCTCGAGATGAGGGCCTGGATCTTCTTTCTCCTTTGCCTG-3'
Duplicación sitio clonado pFastBac-Dual	Dual_SnaBI_FWD	5'-GTGGTTGGCCTACGTACCCGTAGT-3'
	Dual_SnaBI_Rev	5'-CTGGTTGGGATCTACGTAGGCTCAA-3'

```

AGGGCTGAGATGAGGGCCTGGATCTTCTTTCTCCTTTGCCTG
TTCTTTCTCCTTTGCCTGGCCGGGAGGGCTCTGGCAGCCCCACTAGCC
AGGGCTCTGGCAGCCCCACTAGCCGACTACAAGGACGACGATGACAAG
GACTACAAGGACGACGATGACAAGCTAGCTGGTCCCATTGGGGATCCTGGGCC
GACAAGCTAGCTGGTCCCATTGGGGATCCTGGGCCAAA
CTGGTCCCATTGGGGATCCTGGGCCAAAAGGGTTTGGCCCTGG
NC14_FLAG_Fwd
NC14_FLAG1/2_Fwd
NC14_RNA

ATGAGGGCCTGGATCTTCTTTCTCCTTTGCCTGGCCGGGAGGGCTCTGGCAGCCCCACTAGCCGACTACAAGGACGACGATGACAAG_Exportación+FLAG
GGTCCAGATGGATTGCAAGGTCCCCAGGTCCCCCTGGAACCTCCTC
GACAAGGTCCAGATGGATTGCAAGGTCCCCAGGTCCC
GACTACAAGGACGACGATGACAAGGTCCAGATGGATTGCAAGGTCCC
NC15_RNA
NC15_FLAG1/2_Fwd
NC15_FLAG_Fwd
FLAG_Pseña11_Fwd
Pseña11_pseña12_Fwd
Pseña12_BarHI_Fwd

TTCTTTCTCCTTTGCCTGGCCGGGAGGGCTCTGGCAGCCCCACTAGCC
AGGGCTCTGGCAGCCCCACTAGCCGACTACAAGGACGACGATGACAAG
AGGGGGATCCATGAGGGCCTGGATCTTCTTTCTCCTTTGCCTG

```

Figura 76. Ejemplo de amplificación secuencial para el clonaje de $\alpha 4(IV)NC1$ y $\alpha 5(IV)NC1$.

Se detallan tanto los cebadores utilizados en el proceso, así como el resultado final que concluye con la adición de la señal de exportación BM40 y el tag FLAG.

Tabla A2. Construcción de la quimera de $\alpha 2(IV)NC1$ con aquellos residuos de $\alpha 3(IV)NC1$ descritos previamente como parte del epítipo de los autoanticuerpos GP.

Mutación	Acrónimo	Secuencia del cebador
Asp17Thr	$\alpha 2(IV)NC1_D17T_FWD$	5'-CACAGCCAGACGACCCAGGAGCCCATG-3'
	$\alpha 2(IV)NC1_D17T_REV$	5'-CATGGGCTCCTGGGTCTGCTGGCTGTG-3'
Gln18Ala	$\alpha 2(IV)NC1_Q18A_FWD$	5'-CAGACGACCGCGGAGCCCATGTGC-3'
	$\alpha 2(IV)NC1_Q18A_REV$	5'-GCACATGGGCTCCGCGGTCTGCTG-3'
Glu19Ile	$\alpha 2(IV)NC1_E19I_FWD$	5'-CAGACGACCGCGATACCCATGTGC-3
	$\alpha 2(IV)NC1_E19I_REV$	5'-GCACATGGGTATCGCGGTCTGCTG-3'
Met21Ser	$\alpha 2(IV)NC1_M21S_FWD$	5'-ACCGCGATACCCAGTTGCCAGTG-3'
	$\alpha 2(IV)NC1_M21S_REV$	5'-CACTGGGCAACTGGGTATCGCGGT-3'
Val24glu	$\alpha 2(IV)NC1_V24E_FWD$	5'-ATGTGCCCAGAGGGCATGAAC-3'
	$\alpha 2(IV)NC1_V24E_REV$	5'-GTTTCATGCCCTCTGGGCACAT-3'
Asn27Val	$\alpha 2(IV)NC1_N27V_FWD$	5'-CCAGAGGGCATGGTGCCACTCTGGAGT-3'
	$\alpha 2(IV)NC1_N27V_REV$	5'-ACTCCAGAGTTTCACCATGCCACTGG-3'
Lys28Pro	$\alpha 2(IV)NC1_K28P_FWD$	5'-GTGGGCATGAACCCACTCTGGAGTGGA-3'
	$\alpha 2(IV)NC1_K28P_REV$	5'-TCCACTCCAGAGTGGGTTCATGCCAC-3'
Ala57Gln	$\alpha 2(IV)NC1_A57Q_FWD$	5'-GGCTCCTGCCTGCAGCGTTTCAGCACC-3'
	$\alpha 2(IV)NC1_A57Q_REV$	5'-GGTGTGAACCGCTGCAGGCAGGAGCC-3

Tabla A3. Mutaciones introducidas en la quimera de $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$.

Mutación	Acrónimo	Secuencia del cebador
Met26Thr	$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1_M26T_FWD}$	5'-TGCCCAGAGGGCACAGTGCCACT-3'
	$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1_M26T_REV}$	5'-AGTGGCACTGTGCCCTCTGGGCA-3'
Trp30Tyr	$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1_W30Y_FWD}$	5'-GTGCCACTCTACAGTGGATACAGC-3'
	$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1_W30Y_REV}$	5'-GCTGTATCCACTGTAGAGTGGCAC-3'
Ala97Thr	$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1_A97T_FWD}$	5'-ATGATGCCCCGTGACTGAGGACGAG-3'
	$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1_A97T_REV}$	5'-CTCGTCCTCAGTCACGGGCATCAT-3'
His129Pro	$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1_H129P_FWD}$	5'-TCCATCCCACCATGCCCA-3'
	$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1_H129P_REV}$	5'-TGGGCATGGTGGGATGGA-3'
Thr195Ala	$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1_T195A_FWD}$	5'-TTCTGGCTGGCCACCATTCCCGAG-3'
	$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1_T195A_REV}$	5'-CTCGGGAATGGTGGCCAGCCAGAA-3'
Val125Thr	$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1_V125T_FWD}$	5'-CACAGTCAGGATACTTCCATCCCA-3'
	$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1_V125T_REV}$	5'-TGGGATGGAAGTATCCTGACTGTG-3'
Ala132His	$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1_A132H_FWD}$	5'-TGCCCACATGGGTGGCGGAGTTTG-3'
	$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1_A132H_REV}$	5'-CAAACCCGCCACCCATGTGGGCA-3'
Ile139Lys	$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1_I139K_FWD}$	5'-AGTTTGTGGAAGGATATTCCTTC-3'
	$\alpha 2(\text{IV})\text{NC1_I139K_REV}$	5'-GAAGGAATATCCTTTCCACAAACT-3'

Tabla A4. Mutaciones introducidas en $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$.

Mutación	Acrónimo	Secuencia del cebador
Ser9Ala	$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1_S9A_FWD}$	5'-CGTGGAGACGCTGGATCACCTGCA-3'
	$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1_S9A_REV}$	5'-TGCAGGTGATCCAGCTCTCCACG-3'
Ser9Asp	$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1_S9D_FWD}$	5'-CGTGGAGACGATGGATCACCTGCA-3'
	$\alpha 3(\text{IV})\text{NC1_S9D_REV}$	5'-TGCAGGTGATCCATCGTCTCCACG-3'

Tabla A5. Proteínas truncadas generadas a partir de GPBP-1. Los nuevos codones *ATG* de inicio de la traducción aparecen representados en negrita.

Truncado GPBP-1	Acrónimo	Secuencia del cebador
ΔPH	GPBP_APH_XhoI_FWD	5'-AAGACTCGAGCTGGATATGGA ATG GAATCCAGCTTG-3'
$\Delta\text{PH} + \text{SR1}$	GPBP_APH+SXY_XhoI_FWD	5'-AAGTTGCTCGAG ATG GAAACATTTAGA-3'
Ambas	GPBP_KpnI_REV	5'-CATATCTTCTGGTACCTGTTAATA-3'

Anexo II. Construcción del modelo del heterohexámero $(\alpha 3, \alpha 4, \alpha 5)_2(IV)NC1$.

Para poder cartografiar los epítomos propuestos a partir de los péptidos seleccionados desde las librerías phage display por los anticuerpos mAb 3 y GPc en los experimentos de “panning”, necesitábamos disponer de un modelo 3D del hexámero $(\alpha 3, 4, 5(IV))_2NC1$ que se construyó mediante el uso del programa Modeller (Sali y Blundell 1993).

Las secuencias en formato FASTA de $\alpha 3(IV)NC1$, $\alpha 4(IV)NC1$, $\alpha 5(IV)NC1$ se obtuvieron de la base de datos del NCBI (GenBank ID: CAC36101.1, CAA76763.1 y CAA22267.2 respectivamente). Como molde se utilizó el hexámero $((\alpha 1)_2(\alpha 2))_2(IV)NC1$ cristalizado a partir de placenta humana. Su estructura y las secuencias de $\alpha 1(IV)NC1$ y $\alpha 2(IV)NC1$ se obtuvieron de la base de estructuras Protein Data Bank (PDB id: 1T60).

La Figura 77 muestra el alineamiento (clustalW) de estas secuencias. Las moléculas de $\alpha 3(IV)NC1$ y $\alpha 5(IV)NC1$ ocupan el espacio correspondiente a la molécula de $\alpha 1(IV)NC1$ en el pdb 1T60 y $\alpha 4(IV)NC1$ ocupa el espacio correspondiente a $\alpha 2(IV)NC1$.

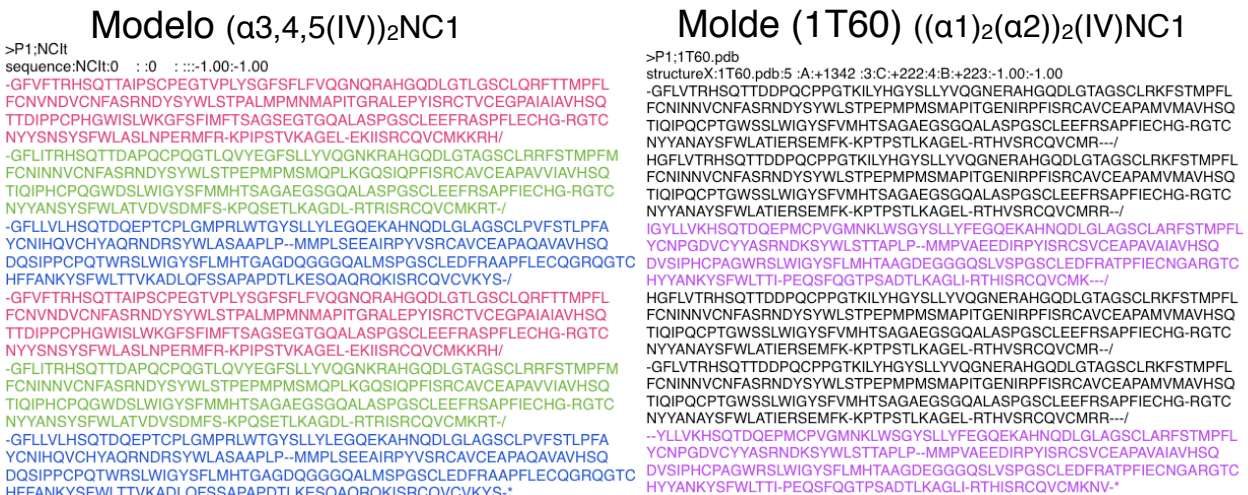


Figura 77. Alineamiento tipo ClustalW en donde aparecen los diferentes $\alpha(IV)NC1$ utilizados para el modelado del heterohexámero $(\alpha 3, 4, 5)_2(IV)NC1$.

Código de color: $\alpha 3(IV)NC1$ (rojo), $\alpha 4(IV)NC1$ (azul), $\alpha 5(IV)NC1$ (verde), $\alpha 1(IV)NC1$ (negro), $\alpha 2(IV)NC1$ (morado).

Esta disposición permite que los NC1 de los mismos subgrupos ocupen posiciones equivalentes (hay que recordar que existe un subgrupo tipo $\alpha 1$, que engloba al propio

$\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$, a $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ y a $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$; y un subgrupo tipo $\alpha 2$ que engloba al propio $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$, a $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ y a $\alpha 6(\text{IV})\text{NC1}$ (Hudson y cols. 1993)) respecto a la disposición de éste y todos los heterohexámeros cristalizados hasta el momento.

Se construyeron mediante Modeller 200 modelos del hexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$ y finalmente se eligió aquel que presentó menor valor "Dope score" o energía para cada residuo, también se comprobó mediante diagramas de tipo Ramachandran (Ramachandran y cols. 1963) que las interacciones intra-atómicas se encontraran dentro de la normalidad.

La Figura 78 muestra una representación en superficie de la estructura del hexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$. En este modelo, que está de acuerdo con los datos existentes (Borza y cols. 2002), la molécula de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ de un protómero, quedaría enfrentada a una molécula de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ del protómero opuesto. Las moléculas de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ quedarían enfrentadas entre si y cerrando el hexámero, la molécula de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ de un protómero, quedaría enfrentado a una molécula de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ del protómero opuesto. Las regiones E_A y E_B del epítipo aparecen en amarillo y morado, respectivamente.

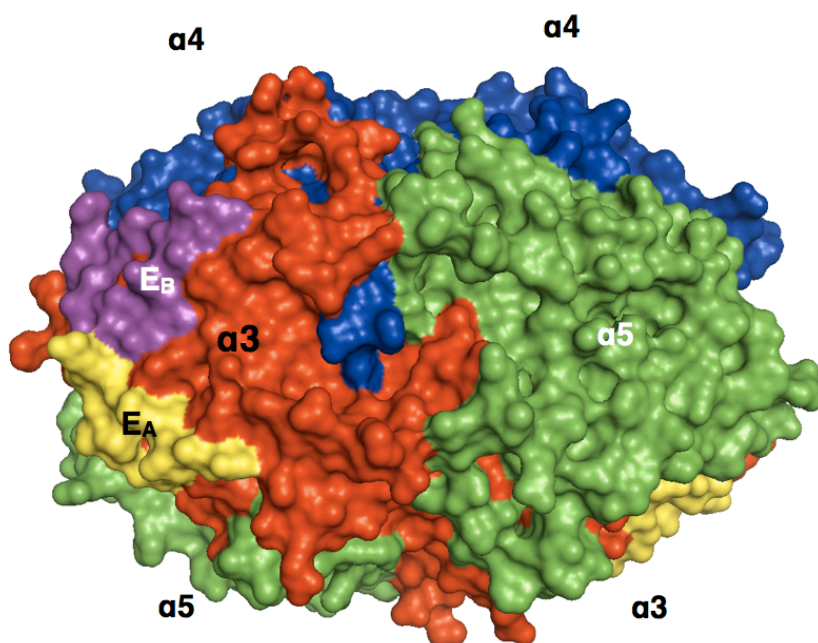


Figura 78. Modelo de heterohexámero $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$ realizado mediante el programa modeller.

Representación en superficie del modelo de $(\alpha 3,4,5)_2(\text{IV})\text{NC1}$. Las moléculas de $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ aparecen en color rojo, con las regiones E_A y E_B del epítipo de los anticuerpos GP representados en amarillo y morado respectivamente. Las moléculas de $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$ aparecen en color azul y las de $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ en color verde.

Anexo III. Abreviaturas.

°C Grados centígrados.
µg Microgramo.
µL Microlitro.
µM Micromolar.
A Adenina.
AA Amino ácido.
Ab Anticuerpo.
Amp Ampicilina.
ANCA Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos.
AP Fosfatasa alcalina.
APS Persulfato amónico.
ATP Adenosina trifosfato.
BSA Albúmina de suero bovino.
C Citosina.
cDNA DNA complementario.
CDR Región determinante complementaria.
DMEM Modificación de Dulbecco del medio Eagle.
DMSO Dimetil sulfóxido.
DNA Ácido desoxirribonucleico.
dNTP Desoxirribonucleótido-trifosfato.
DTT Ditioneitol.
E. coli Escherichia coli.
EDC 1-Etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDTA Ácido etilendiamino-tetraacético.
ELISA Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).
FBS Suero bovino fetal.
g Gramo.
G Guanina.
GAGs Glicosaminoglicanos.
GP Goodpasture.
GPBP Proteína de unión al antígeno de Goodpasture.
GPc Anticuerpo Goodpasture circulante.
h Hora.
HEK Células humanas embrionarias de riñón (Human Embryonic Kidneys cells).
HLA Antígeno leucocitario humano.
HRP Peroxidasa de rábano.
Ig Inmunoglobulina.
IPTG Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido.
Kan Kanamicina.
kbp 1000 pares de bases.
kDa Kilo-Dalton.
LB Medio Luria Bernati.
M Molar.
mA Miliamperio.
mAb Anticuerpo monoclonal.

mg Miligramo.
min Minuto.
mL Mililitro.
mM Milimolar.
mRNA RNA mensajero.
mol. molécula.
NC1 Dominio no colagenoso 1.
nm Nanómetro.
NHS N-Hidroxisuccinimida.
nM Nanomolar.
nt Nucleótido.
ori origen de replicación.
PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida.
pb Pares de bases.
PBS Tampón fosfato salino.
PBS-T Tampón fosfato salino-tween.
PCR Reacción en cadena de la polimerasa.
RNA Ácido ribonucleico.
rpm Revoluciones por minuto.
RT Temperatura ambiente.
Ru Unidades de resonancia.
scFv Anticuerpo de cadena sencilla.
SDS Dodecil sulfato sódico.
Sf *Spodoptera frugiperda*.
sf9 Células sf9 de ovario de Sf.
SRP Resonancia de plasmón de superficie.
T Timidina.
TAE Tampón tris-acetato-EDTA.
TE Tampón tris-EDTA.
TEMED N, N, N', N'-Tetrametilendiamina.
Tet Tetraciclina.
Tris Tris-(hydroxymetil)-aminometano.
U Unidad.

Anexo IV. Publicaciones.

Gozalbo-Rovira, R., J. Rodríguez-Díaz, J. Saus and J. Cervera (2013). "Precise mapping of the Goodpasture epitope(s) using phage display, site-directed mutagenesis, and surface plasmon resonance." *Kidney Int* **83**(3): 438-445.

basic research

<http://www.kidney-international.org>

© 2012 International Society of Nephrology

Precise mapping of the Goodpasture epitope(s) using phage display, site-directed mutagenesis, and surface plasmon resonance

Roberto Gozalbo-Rovira^{1,2}, Jesús Rodríguez-Díaz^{1,2}, Juan Saus^{1,3,5} and Javier Cervera^{1,4,6}

¹Centro de Investigación Príncipe Felipe (CIPF), Valencia, Spain; ²Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA-CSIC), Valencia, Spain; ³Department de Bioquímica i Biologia Molecular Universitat de Valencia Estudi General (UVEG), Valencia, Spain and ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red para Enfermedades Raras (CIBERER-ISCI), Valencia, Spain

Goodpasture disease is an autoimmune disorder mediated by circulating autoantibodies against the noncollagenous-1 (NC1) domain of the $\alpha 3$ chain of type IV collagen ($\alpha 3$ (IV)NC1). The structure of Goodpasture epitope(s) has been previously mapped into two main binding regions (E_A and E_B) of the $\alpha 3$ (IV)NC1 domain using a residue mutation approach on the highly related $\alpha 1$ (IV)NC1 domain. Here we combined phage display and surface plasmon resonance technology to more precisely localize the pathogenic binding sites. Peptides mimicking the Goodpasture epitope(s) were used to identify residues involved in autoantibody binding and found involvement of eight residues previously unrecognized within and outside of the E_A or E_B regions. Residue involvement in pathogenic reactivity was confirmed by site-directed mutagenesis on a more divergent $\alpha 2$ (IV)NC1 molecule. From a mutant (M1) of the $\alpha 2$ (IV)NC1 molecule, harboring residues previously identified as belonging to the Goodpasture epitope, additional chimeras were generated on the bases of phage display findings. All these mutants were shown to display higher reactivity with circulating Goodpasture autoantibodies than the M1 mutant. Thus, our results more precisely define Goodpasture epitope determinants and open new avenues to delineate comprehensive autoantibody-blocking agents for therapeutics.

Kidney International (2013) **83**, 438–445; doi:10.1038/ki.2012.399; published online 19 December 2012

KEYWORDS: autoantibodies; collagen type IV; epitope; Goodpasture disease; phage display; surface plasmon resonance

Correspondence: Javier Cervera, Instituto de Biomedicina de Valencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IBV-CSIC). C/ Jaime Roig 11, 46010 Valencia, Spain. E-mail: cervera@ibv.csic.es

⁵Current address: Facultad de Medicina, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Valencia, Valencia, Spain

⁶Current address: Instituto de Biomedicina de Valencia, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IBV-CSIC), Valencia, Spain

Received 30 March 2012; revised 11 September 2012; accepted 1 October 2012; published online 19 December 2012

Goodpasture disease (GP) is an autoimmune disorder characterized by a rapidly progressive glomerulonephritis, and the presence of autoantibodies, detected as circulating antibodies or as linear deposits of antibodies along the glomerular basement membrane.¹

The target autoantigen in the glomerular basement membrane has been identified as the noncollagenous-1 (NC1) domain of the $\alpha 3$ (IV) collagen chain ($\alpha 3$ (IV)NC1), one of the six homologous collagen chains designated $\alpha 1$ – $\alpha 6$ that comprise type IV collagen.^{2,3} The chains are highly homologous and are classified in two classes: the $\alpha 1$ -like class composed of $\alpha 1$ (IV), $\alpha 3$ (IV), and $\alpha 5$ (IV) chains, and an $\alpha 2$ -like class composed of $\alpha 25$ (IV), $\alpha 4$ (IV), and $\alpha 6$ (IV) chains.⁴

Linear synthetic peptides of the $\alpha 3$ (IV)NC1 domain were used to block the binding of autoantibodies to collagen IV in a first attempt to map the GP epitope. This method was unable to map any epitope, because it used linear peptides to characterize a conformational epitope.^{5,6}

To avoid the problem with linear peptides, new mapping strategies based on chimeric proteins were used. Chimeric $\alpha 1/\alpha 3$ (IV)NC1 domains were constructed, in which $\alpha 3$ (IV)NC1 sequences replaced the corresponding sequences in the non-immunoreactive $\alpha 1$ (IV)NC1 domain and then the autoantibody reactivity was checked. The chimeras were expressed in mammalian cells for correct protein folding, disulfide bond formation, and conformational epitope preservation. Two specific homologous regions in $\alpha 3$ (IV)NC1 domain were identified to be part of GP autoepitopes, E_A spanning from amino acid 17–31 and E_B from amino acid 127–141 of the $\alpha 3$ (IV)NC1 domain,⁷ and allowed the characterization of four subpopulations of GP antibodies with distinct epitope specificity for the $\alpha 3$ (IV)NC1 domain, called GP_A , GP_B , GP_{AB} , and GP_X .⁸ Later, using site-directed mutagenesis to replace the $\alpha 3$ (IV)NC1 residues in the chimeric E_A region with the corresponding residues of $\alpha 1$ (IV)NC1 domain, three hydrophobic residues (Ala₁₈, Ile₁₉, and Val₂₇) and Pro₂₈ were shown to be critical for the GP_A autoepitope and defined the immunodominant GP epitope.⁹

Table 1 | ClustalW alignment of peptide sequences from the phagotopes isolated using the cGP antibodies

Phagotope	Sequence														
<i>Constrained library</i>															
c7c_7.5	C	I	K	S	F	N	N	A	—	C					
c7c_7.14	C	P	K	S	S	G	A	L	—	C					
c7c_7.9	C	P	Y	T	R	L	N	H	—	C					
c7c_7.3	C	P	G	F	A	P	F	P	—	C					
c7c_7.1	C	P	F	H	T	T	L	A	—	C					
c7c_7.17	C	P	A	H	P	P	K	A	—	C					
c7c_7.20	C	H	L	A	T	P	Y	T	—	C					
c7c_7.19	C	—	L	S	A	G	H	S	A	C					
c7c_7.6	C	T	L	S	T	—	H	R	S	C					
c7c_7.2	C	P	L	S	Q	—	N	R	S	C					
c7c_7.7	C	E	V	P	T	—	H	R	Q	C					
c7c_7.8	C	—	T	N	H	E	T	P	S	C					
c7c_7.12	C	H	N	N	H	S	R	P	—	C					
c7c_7.18	C	W	—	G	H	P	L	G	T	C					
c7c_7.11	C	M	D	G	—	P	I	Q	F	C					
<i>Linear library</i>															
12.1	—	T	—	A	L	A	T	S	S	T	Y	D	P	H	
12.5	—	A	—	P	W	H	L	S	S	Q	Y	S	R	T	
12.14	—	I	—	E	W	S	D	N	N	N	F	D	P	R	
12.19	—	D	—	V	F	A	K	Q	F	T	L	M	L	N	
12.15	A	L	—	T	L	H	P	Q	—	P	L	D	H	P	
12.3	K	L	W	N	L	H	P	T	Q	A	L	W	—	—	
12.18	G	P	—	K	G	I	V	Q	—	S	L	Q	V	R	

Parallel studies identified that the N-terminal region of $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ domain was immunodominant and was the target of B-cell response.¹⁰ Site-directed mutagenesis was used to replace the N-terminal residues of $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ domain (Thr₁₇, Ala₁₈, Ile₁₉, Ser₂₁, Glu₂₄, Val₂₇, Pro₂₈, Ser₃₁, and Gln₅₄) in the $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ domain and showed that they were critical in conforming the GP autoepitope and confer nephritogenicity to the chimeric protein.¹¹

The GP epitopes are cryptic in the NC1 hexamer and inaccessible for autoantibody binding, but they are exposed upon dissociation of the hexamer into subunits, allowing binding of the autoantibody.¹² The $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ monomer is assembled into the collagen IV network through the association of the $\alpha 3$, $\alpha 4$, and $\alpha 5$ chains to form a triple helical protomer. The quaternary structure is responsible for the epitope's crypticity. There are two distinct subsets of $\alpha 3,4,5(\text{IV})\text{NC1}$ hexamers, autoantibody-reactive M-hexamers containing only monomer subunits and autoantibody-impenetrable D-hexamers composed of dimer and monomer subunits.¹³ D-hexamers are cross-linked with a recently reported sulfilimine bond,^{14,15} which fasten adjacent protomers and avoid autoantibody accessibility.¹⁶

In this study, we have used phage display technology to increase our knowledge of the conformational GP autoepitope and to find new contact residues for circulating Goodpasture (cGP) autoantibody binding.

RESULTS

Selection of phage sequences by cGP autoantibodies and reactivity of individual phagotopes by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

After three rounds of selection using cGP antibodies with both phage libraries, 40 phage DNA inserts were sequenced,

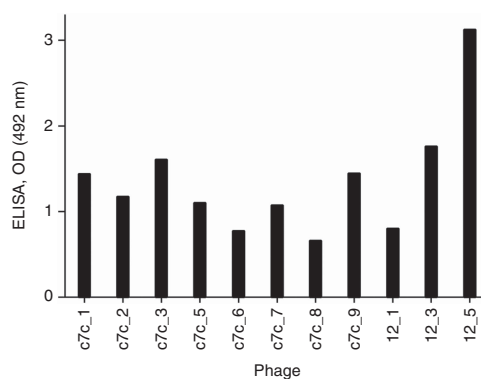


Figure 1 | Capture ELISA of cGP antibodies against phage display-selected peptides. Reactivity of phagotopes from the constrained library (c7c_1-8) and from the linear dodecapeptide library (12_1-3). cGP, circulating Goodpasture.

20 of each phage library. Two sequences from each phage library occurred in more than one phagotope. The sequence CIKSFNNAC was found twice and CPGFAPFPC four times in the cysteine-constrained phage library; the sequence TALATSSTYDPH was present seven times and APWHLSS-QYSRT three times in the linear phage library. There were 22 different peptides (Table 1), but only 11 out of them showed significant reactivity against cGP antibodies (Figure 1).

Comparative modeling of $\alpha 3,4,5(\text{IV})\text{NC1}$ hexamer

The FASTA sequences of human $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$, $\alpha 4(\text{IV})\text{NC1}$, and $\alpha 5(\text{IV})\text{NC1}$ were obtained from NCBI (GenBank

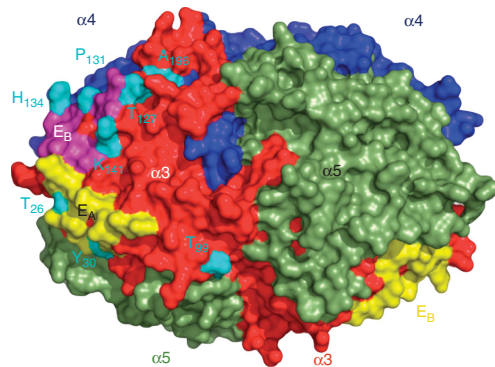


Figure 2 | Quaternary organization of the $\alpha 3,4,5(IV)NC1$ hexamer. The hexamer is composed by two identical protomers containing one $\alpha 3$ chain (red), along with an $\alpha 4$ (blue) chain and an $\alpha 5$ (green) chain, respectively. The E_A (yellow) and E_B (purple) are depicted on the $\alpha 3(IV)NC1$ surface. Residues proposed in this study to contribute to the GP epitope appear written and numbered in cyan.

ID: CAC36101.1, CAA76763.1, and CAA22267.2, respectively). These sequences were queried against the PDB of the $\alpha 1,1,2(IV)NC1$ hexamer using the modeller software. The model was selected according to the lowest dope score, which is a pairwise atomistic statistical potential, and also confirmed by Ramachandran plots that provide the correct intraatomic interactions (data not shown). The resultant hexamer is composed by two identical protomers containing one $\alpha 3(IV)NC1$ chain, along with an $\alpha 4(IV)NC1$ chain and an $\alpha 5(IV)NC1$ chain, respectively, in which the $\alpha 3$, $\alpha 4$, and $\alpha 5$ NC1 domains of one protomer connect with the $\alpha 5$, $\alpha 4$, and $\alpha 3$ NC1 domains of the other protomer, respectively (Figure 2).

Circulating GP antibody epitope prediction integrating Pepsurf information and $\alpha 1(IV)NC1$, $\alpha 2(IV)NC1$, $\alpha 3(IV)NC1$ sequence alignment

We conducted a Pepsurf analysis of the cGP antibodies, using the following as initial parameters: Epitope mapping algorithm = Pepsurf; Protein structure = PDB of $\alpha 3,4,5(IV)NC1$ hexamer modeled here; Chain identifier = A (either $\alpha 3(IV)NC1$ or whole hexamer), and the phage display selected sequences shown in Table 1 were uploaded to the server. As similar predictions were obtained using $\alpha 3(IV)NC1$ or whole hexamer as chain identifier, $\alpha 3(IV)NC1$ was selected for further analysis. The Pepsurf algorithm represents the surface of the $\alpha 3,4,5(IV)NC1$ hexamer as a graph, and then it searches on the $\alpha 3(IV)NC1$ surface for paths that exhibit high similarity to each peptide selected by cGP antibodies. With this alignment procedure, selected peptides may be aligned to antigen residues brought to proximity by folding,¹⁷ bringing us the possibility to analyze conformational cGP antibody epitopes. Pepsurf clustered the paths to two $\alpha 3(IV)NC1$ surface regions. These clusters

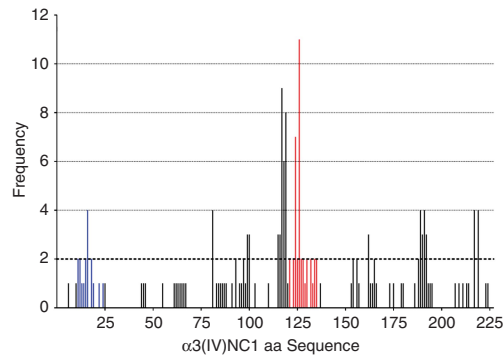


Figure 3 | Predicted residues from Pepsurf. The frequency of predicted residues from Pepsurf results using the selected phage display peptides is depicted on the amino-acid sequence of $\alpha 3(IV)NC1$. The residues involved in E_A and E_B regions are identified with blue and red bars, respectively.

included all previously determined residues by other techniques,^{9,18} with the only exception of Val₂₇ and Gln₅₄. With the predictions from the Pepsurf analysis, a histogram of residues was generated (Figure 3) and integrated with the $\alpha 1(IV)NC1$, $\alpha 2(IV)NC1$, and $\alpha 3(IV)NC1$ sequence alignment, revealing new epitope candidates (Figures 3 and 4). We discarded the areas that are common in all $\alpha(IV)NC1$ such as A₁₁₉VHSQ₁₂₃ and areas that are common between $\alpha 2(IV)NC1$ and $\alpha 3(IV)NC1$. Only residues that have a frequency of two or more were selected. Thus, Thr₂₆ and Tyr₃₀ in the E_A region; Thr₁₂₇, Pro₁₃₁, His₁₃₄, and Lys₁₄₁ in the E_B region; and Thr₉₉ and Ala₁₉₆ outside E_A and E_B regions were suggested as new candidates of the epitope for cGP antibodies. See Figure 2 for location of predicted residues on $\alpha 3,4,5(IV)NC1$ hexamer surface.

Reactivity of the cGP antibodies vs. mutated forms of $\alpha 2(IV)NC1$ domain

Figure 4 schematizes the six mutated forms (M1–M6) of the $\alpha 2(IV)NC1$ domain prepared after replacing residues in $\alpha 2(IV)NC1$ by those corresponding in $\alpha 3(IV)NC1$ on the basis of the alignment of $\alpha 1(IV)NC1$, $\alpha 2(IV)NC1$, and $\alpha 3(IV)NC1$ sequences (Figure 5) and of phage display epitope predictions (see Materials and Methods section).

After purification by affinity chromatography on an anti-FLAG column, the proteins appeared as a single band of ~30 kDa on SDS-polyacrylamide gel under reduced conditions (Figure 6a). All created chimeras reacted with cGP antibodies in western blot under nonreduced conditions. Interestingly, mutants M2–M6 showed greater reactivity than the control M1 chimera, indicating that the mutated residues selected by phage display appear to be a critical part of the GP autoantigen (Figure 6b). When these mutant proteins were analyzed by direct ELISA, differences in reactivity were

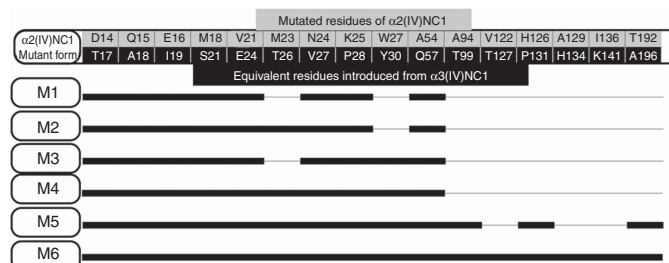


Figure 4 | Mutant M1-M6 forms of $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$. The higher bar (which would correspond with mutant M6) schematizes the $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$ molecule showing the 16 residues mutated (upper half of the bar) by their corresponding residues in $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (lower half of the bar). Thick lines in M1-M6 mutants represent the corresponding residues from the upper bar mutated in each type of $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$ mutant molecule.

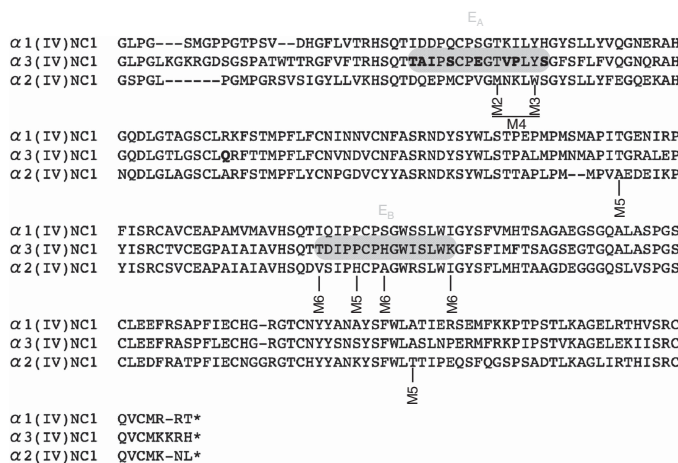


Figure 5 | ClustalW alignment of the sequences of $\alpha 1, \alpha 2, \alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ domains. The E_A and E_B regions are gray shadowed. The nine amino acids previously described as epitope components, which are mutated in M1, are in bold (note that Ser₃₁ is common between $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$ and $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$). Mutated residues in $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$ appear identified with the name of the chimera that contains it.

also detected. Mutant M3 reactivity increased 50% relative to that of mutant M1 and was in line with $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$. Differences in reactivity between M2 and M3 indicate that Tyr₃₀ was the critical residue inside the E_A region (Figure 7). Changes introduced in M5 and M6 scarcely contribute to increase the reactivity determined by ELISA.

Surface plasmon resonance (SPR) analysis of cGP antibodies with the chimeric proteins indicated that the affinity constant (KD) decreases from the M1 template across sequential mutants to the antigen $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (Figure 8a). This confirmed that mutated residues contribute to the epitopes and increase the cGP antibody recognition. Consistent with it, the R_{max} value (which represents the maximum binding capacity of the cGP antibodies immobilized at the sensor chip surface) increases from the M1 template across mutants to the $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ (Figure 8b),

indicating that the sequential process of mutagenesis improved cGP antibody reactivity for their epitope.

DISCUSSION

In the present study, phage display technology was used to characterize cGP antibody binding sites. Previous approaches used mutagenesis on $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ highly-related $\alpha 1(\text{IV})\text{NC1}$ domain to generate chimeras that reacted with cGP antibodies.^{7,10} Now, selected peptides mimicking physical-chemical properties and spatial organization of self-epitope(s)¹⁷ were used to design chimeras that reacted with cGP antibodies from a less $\alpha 3(\text{IV})\text{NC1}$ -related $\alpha 2(\text{IV})\text{NC1}$ domain.¹⁹ Our results not only confirmed previous findings^{9,11} but also identified previously unrecognized residues Thr₂₆, Tyr₃₀, Thr₉₉, Thr₁₂₇, Pro₁₃₁, His₁₃₄, Lys₁₄₁, and Ala₁₉₆, mediating cGP antibody binding. In addition to providing new critical complementary

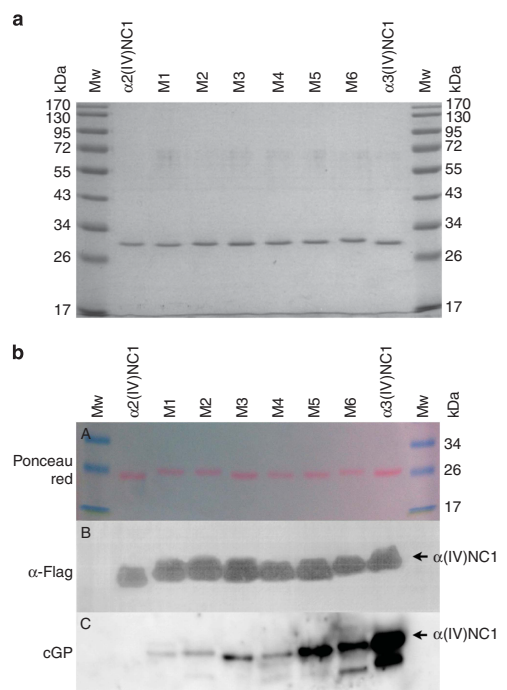


Figure 6 | Chimera analysis. (a) SDS-polyacrylamide gel (PAGE) analysis of the chimeras. SDS-PAGE electrophoresis was performed in 12% gels under reducing conditions, and the proteins were Coomassie blue stained. (b) Immune detection of the chimeras. Ponceau red staining of nonreducing SDS-PAGE electrophoresis blotted onto nitrocellulose membranes (A). Protein immunodetection with α -FLAG antibody (B) or cGP antibodies (C).

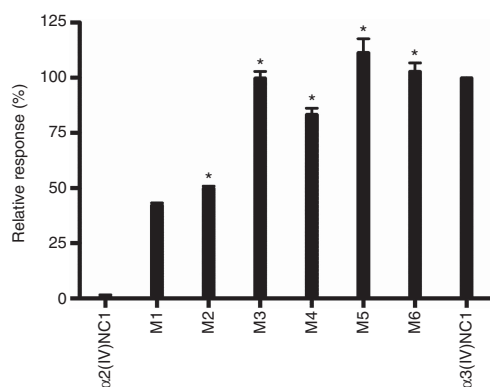


Figure 7 | ELISA of the reactivity of the cGP antibodies against the $\alpha 3(IV)NC1$ domain and different forms of the $\alpha 2(IV)NC1$ domain. The asterisks indicate significant differences $P < 0.01$.

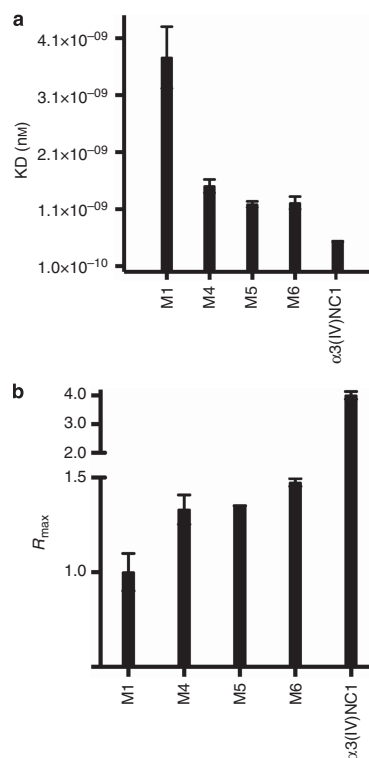


Figure 8 | Surface plasmon resonance (SPR) analysis of the chimeras. SPR analysis of the effect of the mutations M1,4-6 on the affinity of cGP antibodies for the $\alpha 2(IV)NC1$ domain. (a) Affinity constant (KD) of the cGP antibodies. (b) R_{max} value of binding.

structural information on the GP epitope(s), the phage display approach also identified new compounds (peptides) to block the binding of cGP antibodies to the autoantigen *in vivo*. The parallel confirmation by ELISA, western blot, and SPR of the reactivity of mutated $\alpha 2(IV)NC1$ domains with cGP autoantibodies suggested an immunopathogenic role for the individual residues and rendered kinetic data on the antigen-antibody interaction that eventually will be critical to generate blocking agents for therapeutics.

Our studies were performed with a single patient's sera; however, the evidence suggests that no major differences will exist between patient's self-epitopes, as virtually all the individual sera tested by us (unpublished observations) and others^{20,21} were efficiently competed by mAb 3. This mAb has been shown to bind to an epitope that overlaps with GP epitope(s) and shares with it the condition of being conformational and disulfide bond-dependent.⁹ Consistently, major reactive residues with the present cGP antibodies were found to be identical to those previously described for other individual cGP antibodies and shown to be

immunopathogenic in animal models.¹¹ Although some variability on individual epitope mapping is expected,²⁰ the data generated so far strongly support the fact that the reactive residues will not significantly vary between patients. Consistently, cGP-binding residues Thr₂₆, Tyr₃₀, Thr₉₉, Pro₁₃₁, and Ala₁₉₆ common to α 1- and α 3(IV)NC1 domains, and which escaped identification in previous studies, were inadvertently tested for immunopathogenicity and found positive in these same studies. Further work is needed, however, to unambiguously demonstrate the pathogenic relevance of our findings by checking the pathogenesis that the α 2(IV)NC1 mutants generated here induce in appropriate animal models.

MATERIALS AND METHODS

Characterization of cGP antibodies

A 58-year-old man with a history of cigarette smoking displayed a flu-like affection days before developing acute renal failure, the reason for hospitalization. Analytical studies showed the presence of significant titers of antibasement membrane autoantibodies (216 UI/ml), rapidly progressive glomerulonephritis with abundant crescent (50% glomeruli), and linear deposits of IgG along glomerular basement membrane. The patient was diagnosed with GP disease and therapeutic plasmapheresis was used to purify IgG by affinity chromatography on protein A-agarose (GE Healthcare, Piscataway, NJ), according to the manufacturer's protocol. The next step consisted in the immobilization of α 3(IV)NC1 into Affi-Gel-10 (Bio-Rad, Hercules, CA) at a concentration of 1 mg/ml gel. The protein A-purified IgG was applied to the affinity column (1 ml of gel). The column was washed with 10 volumes of Tris-buffered saline (50 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.4). The bound IgG was sequentially eluted with five column volumes (5 ml) of Gentle Immunopure (Pierce, Thermo Scientific, Rockford, IL) and dialyzed three times against 2 l of Tris-buffered saline followed by ultrafiltration in 10-KDa Amicon Ultra devices (Millipore, Bedford, MA). Immunochemical characterization using nonreduced and reduced recombinant α 3(IV)NC1 and isolated human renal hexamer and the patient's affinity-purified circulating antibodies in parallel with mAb 3 (a mAb that has been shown to bind to an epitope which overlaps with GP epitope)^{9,20} and M31A (previously shown to bind a linear epitope in the N-terminus of the human α 3(IV)NC1)⁸ unambiguously demonstrate that the patient under study underwent Goodpasture autoimmune response (Supplementary Figure S1 online, Supplementary Material online).

Phage display

Phage libraries. Two random phage display peptide libraries were purchased from New England Biolabs (Beverly, MA), a cysteine-constrained heptapeptide library (PhD-c7c) and a linear dodecapeptide library (PhD-12). Both libraries expressed random peptides in the pIII coat protein and contained 2×10^{13} plaque-forming units per ml (p.f.u./ml), with a complexity of $> 2 \times 10^9$ transformants. Phages were propagated in *Escherichia coli* ER2738 and selected in microtiter plates, Maxisorb (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA), following the manufacturer's recommendations. Briefly, 1 μ g of immunopurified circulating autoantibodies in phosphate-buffered saline (PBS) was used to coat the plates at 4 °C overnight, although subsequent steps were performed at room temperature. Plates were washed with PBS and blocked with 2% MPBS (skimmed

milk in phosphate-buffered saline) for 1 h. The plates were then washed with PBS, and Phages (10^{12}) in PBS were added and incubated for 1 h under gentle rocking. After extensive washing with PBS-0.1% Tween-20 (10 times in the first round and 20 times in subsequent rounds), bound phages were competitively eluted with α 3(IV)NC1 0.1 mg/ml in PBS. *E. coli* ER2738 was infected with the eluted phages and 20 randomly selected individual clones from each library were isolated after three rounds of selection. Each individual clone is referred to as phagotope. Single-strand phagemid DNA was purified and sequenced using an ABI7002 automated sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Monoclonal Phage ELISA. Capture ELISA was used to study the reactivity of each phagotope. The cGP autoantibodies were immobilized on microtiter plates and captured phages were detected with anti-M13-HRP (horseradish peroxidase) antibodies (GE Healthcare). Specifically, plates were coated with 0.1 μ g/well of cGP antibodies in PBS, left at 4 °C overnight, and brought to room temperature for the rest of the procedure. The plates were blocked with blocking buffer (2% bovine serum albumin and 0.5% skimmed milk PBS) and after extensive washing with PBS: 100 μ l containing 10^{10} p.f.u. from each phagotope was added in PBS. Bound phages were detected after incubation with HRP-conjugated anti-M13 antibodies diluted 1/5000 in blocking buffer for 1 h. The substrate used was 1 mg/ml o-phenylene-diamine in 1 mol/l citrate buffer, pH 5, containing 0.001% H₂O₂. Color development was stopped with 50 μ l of 2.5 mol/l H₂SO₄ after 10 min and monitored at 492 nm with a Dynatech MR4000 plate reader (Dynes Technologies, Chantilly, VA).

Sequence alignment

Peptides and α (IV)NC1 sequences were aligned using CLC sequence viewer 6 (<http://www.clcbio.com>) with clustalW algorithm.

Molecular modeling of α 3,4,5(IV)NC1 hexamer

The Modeller (<http://salilab.org/modeller/>) program was used for homology and comparative modeling of protein three-dimensional structures.²² We used the α 1,1,2(IV)NC1 hexamer structure as template (PDB id: 1t60) and provided an adequate alignment with the α 3,4,5(IV)NC1 sequence according to literature.²³ The Modeller software built the required number of models of the target and estimated the quality parameters of the models. One hundred models of α 3,4,5(IV)NC1 hexamers were built using the Modeller program, and the model with the best dope score was chosen. The structures were visualized with the Pymol (The PyMol Molecular Graphics System, Version 0.99, Schrodinger, LLC) program.

Epitope mapping

PepSurf (<http://pepitope.tau.ac.il/index.html>) is a web-accessible algorithm that first maps each phage display-selected peptides onto the provided protein surface and then clusters the resulting hits, thus obtaining a predicted epitope.¹⁷ We obtained a set of epitope clusters localized on the α 3,4,5(IV)NC1 hexamer model surface and then created a frequency histogram for each residue in the α 3(IV)NC1 sequence. With histogram analysis, the cGP antibody-binding epitope was inferred and the candidate residues for the site-directed mutagenesis were obtained.

DNA constructs

The α 3(IV)NC1 coding sequence containing the BM40 secretion signal and an N-terminal FLAG tag was subcloned into the

pFastBac1 vector from the F α 3ANU-pRC-CMV vector⁷ after digestion with *SacI* (New England Biolabs).

To amplify the human α 2(IV)NC1, mRNA was extracted using the trizol method (Invitrogen, Carlsbad, CA) from human embryonic kidney cells (HEK293) and retro-transcribed using the SuperScript Reverse Transcriptase (Invitrogen, Life Technologies), and the cDNA of interest was amplified by PCR using Pfu polymerase (Stratagene, La Jolla, CA) with primers detailed in Supplementary Table S1 online in order to introduce a FLAG tag sequence and a BM40 exportation signal. The construction was finally subcloned into the pFastBac1 vector after digestion with *Bam*HI and *SacI* (New England Biolabs).

Site-directed mutagenesis

Residues in α 2(IV)NC1 were replaced with the corresponding α 3(IV)NC1 residue based on α 1(IV)NC1, α 2(IV)NC1, and α 3(IV)NC1 sequence alignment and phage display epitope predictions. Six mutants (M1–M6) were sequentially constructed (Figure 4) using a Quick-Change site-directed mutagenesis kit (Stratagene) and appropriate oligonucleotides (Supplementary Table S1 online), and their correctness was confirmed by DNA sequencing. Mutant M1 containing the common residue Ser₂₈ and all eight residue substitutions previously reported to be part of the GP epitope^{9,18} was used as a control for immunoassays and as a template for further mutagenic steps. Mutants M2–M4, in addition, substitute either Met₂₃ (M2) or Trp₂₇ (M3) or both (M4) (Figure 4) by residues Thr₂₆ and Tyr₃₀, respectively, which are localized in the E_A region and that are common in α 1(IV)NC1 and α 3(IV)NC1 but differ in α 2(IV)NC1. Mutant M5 keeps the changes of the mutant M4 but introduces three new substitutions in residues, which are common in α 1(IV)NC1 and α 3(IV)NC1 but differ in α 2(IV)NC1 (Figure 4). Although two of these last residues (Ala and Thr) localize out of the E_A and E_B regions, the proline introduced localizes inside the E_B region. Finally, mutant M6 adds to mutant M5 three new changes localized in the E_B region (Figures 4 and 5).

Expression and purification of NC1 proteins in insect cells

Recombinant proteins α 2-3(IV)NC1 and the mutants M1–M6 were cloned in the baculovirus expression vector pFastBac1. Each plasmid was transformed into DH10Bac competent cells and the recombinant baculovirus was produced by following the manufacturer's recommendations (Bac-to-Bac Baculovirus Expression System, Invitrogen, Life Technologies). Briefly, Sf9 cells were grown in SF900SFMII medium supplemented with antibiotics and 1% Pluronic (SIGMA, St Louis, MO) in suspension in spin flasks at 120 r.p.m. and 28 °C. The cells were subcultured to a density of 3 × 10⁵ cells/ml and infected at a multiplicity of infection of two when they reached a density of 1.5 × 10⁶ cells/ml. The cell supernatants were removed after 72 h and the α 3(IV)NC1 protein was purified from the medium using the anti-flag affinity gel (SIGMA-ALDRICH, St Louis, MO) according to the manufacturer's recommendations. The recombinant protein was eluted from the column with 0.1 mg/ml of FLAG peptide (DYKDDDDK) that was subsequently removed from the protein preparation by successive ultrafiltration in 10-KDa Amicon Ultra devices (Millipore). In a typical purification, about 1 mg of soluble recombinant protein exported to the medium was obtained from each liter of infected cells measured by the Bradford assay using bovine serum albumin as standard.²⁴ SDS-polyacrylamide gel was performed according to Laemmli.²⁵

Western blot

Purified recombinant NC1 domains (500 ng) were separated by SDS-12% polyacrylamide gel electrophoresis under nonreducing conditions and transferred onto nitrocellulose membranes.²⁶ The remaining binding sites were blocked with 5% skimmed milk Tris-buffered saline, and membranes were incubated with appropriately diluted anti-Flag-HRP or cGP antibodies and with anti-Human IgG-HRP. The blots were developed with ECL (GE Healthcare) and exposed to Kodak MR film (Kodak, Rochester, NY) for 60 to 120 s.

Enzyme-linked immunosorbent assay

The antigens (100 ng of recombinant NC1 domains) were coated onto microtiter plates, Maxisorb (Life Technologies), overnight, at 4 °C temperature, in 100 μ l of PBS, and the following steps performed at room temperature. Nonspecific binding sites were blocked with 0.5% bovine serum albumin for 1 h. Primary and secondary antibodies were diluted in binding buffer (PBS containing 0.25% bovine serum albumin and 0.05% Tween-20) and incubated for 1 h each. The primary antibody was the cGP antibody. The anti-human horseradish peroxidase-labeled antibody IgG (Sigma-Aldrich) was used as the secondary antibody. Each sample was analyzed in triplicate and the mean values and s.d. were calculated. To estimate the actual amount of mutant protein coated on the plate, a parallel ELISA using anti-Flag HRP (Sigma) was performed and used for normalizing the signal generated by the cGP antibodies vs. the mutant proteins.

Surface plasmon resonance

The affinity assays were based on SPR and performed in a Biacore T100 instrument (GE Healthcare). A total of 1000 Resonance Units of cGP antibodies were immobilized in a CM5 sensor chip (GE Healthcare). The IgG was diluted to a concentration of 1 μ g/ml in 10 mmol/l sodium acetate, pH 5, and immobilized by the amine coupling chemistry (GE Healthcare). Immobilization was performed in the channel 2 of the sensor chip and the channel 1 was used as the reference surface.

Kinetic assays were carried out at 37 °C. The experiments were performed in 10 mmol/l 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid, pH 7.4, containing 150 mmol/l NaCl, 3 mmol/l ethylenediaminetetraacetic acid, and 0.005% surfactant P20 as the running buffer with a flow of 0.1 ml/min with 60 s of contact and a dissociation time of 1000 s. The regeneration step consisted in washing with 20 mmol/l NaOH for 45 s at the same flow. The kinetic assays were performed with all NC1-purified domains at different concentrations (50, 100, 150, 200, and 250 nmol/l). Each run included at least two repetitions of the 100 nmol/l sample and three blanks without sample.

The kinetic data were obtained after the analysis of the sensograms performed with the BIAevaluation 2.0 software (GE Healthcare).

DISCLOSURE

All the authors declared no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Drs Belén Barcelona (CIPF) and Karlen Gazarian (Universidad Nacional Autónoma de Mexico) for their help with the phage display methodology, Carmen Vozmediano (Hospital Ciudad Real, Spain) for providing us the patient's plasmapheresis and clinical information, Fernando Revert (CIPF) for his advice with the use of cGP antibodies, and CIPF, UVEG, IBV-CSIC, and CIBERER for facilities. mAb 3 and isolated human renal hexamers were kindly provided by

Thomas Hellmark and Jörgen Wieslander. Fundings were provided by 'CIBERER-736' to JC, 'Ramon Areces XV Concurso Nacional' to JRD, and 'SAF2009-10703 (MICINN) and Prometeo 2009/065 (Generalitat Valenciana)' to JS. RGR was a fellow of the Spanish Ministry for Science (MICINN).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Figure S1. Effect of reduction of disulfides bonds on the binding of patient circulating Goodpasture antibodies.

Table S1. Primers utilized in the present study.

Supplementary material is linked to the online version of the paper at <http://www.nature.com/ki>

REFERENCES

- Wilson CB, Dixon FJ. Anti-glomerular basement membrane antibody-induced glomerulonephritis. *Kidney Int* 1973; **3**: 74-89.
- Saus J, Wieslander J, Langeveld JP et al. Identification of the Goodpasture antigen as the alpha 3(IV) chain of collagen IV. *J Biol Chem* 1988; **263**: 13374-13380.
- Neilson EG, Kalluri R, Sun MJ et al. Specificity of Goodpasture autoantibodies for the recombinant noncollagenous domains of human type IV collagen. *J Biol Chem* 1993; **268**: 8402-8405.
- Hudson BG, Reeders ST, Tryggvason K. Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. Molecular basis of Goodpasture and Alport syndromes and diffuse leiomyomatosis. *J Biol Chem* 1993; **268**: 26033-26036.
- Kalluri R, Gunwar S, Reeders ST et al. Goodpasture syndrome. Localization of the epitope for the autoantibodies to the carboxyl-terminal region of the alpha 3(IV) chain of basement membrane collagen. *J Biol Chem* 1991; **266**: 24018-24024.
- Hellmark T, Brunmark C, Trojnar J et al. Epitope mapping of anti-glomerular basement membrane (GBM) antibodies with synthetic peptides. *Clin Exp Immunol* 1996; **105**: 504-510.
- Netzer KO, Leinonen A, Boutaud A et al. The goodpasture autoantigen. Mapping the major conformational epitope(s) of alpha3(IV) collagen to residues 17-31 and 127-141 of the NC1 domain. *J Biol Chem* 1999; **274**: 11267-11274.
- Borza DB, Netzer KO, Leinonen A et al. The goodpasture autoantigen. Identification of multiple cryptic epitopes on the NC1 domain of the alpha3(IV) collagen chain. *J Biol Chem* 2000; **275**: 6030-6037.
- David M, Borza DB, Leinonen A et al. Hydrophobic amino acid residues are critical for the immunodominant epitope of the Goodpasture autoantigen. A molecular basis for the cryptic nature of the epitope. *J Biol Chem* 2001; **276**: 6370-6377.
- Hellmark T, Segelmark M, Unger C et al. Identification of a clinically relevant immunodominant region of collagen IV in Goodpasture disease. *Kidney Int* 1999; **55**: 936-944.
- Hellmark T, Chen L, Ohlsson S et al. Point mutations of single amino acids abolish ability of alpha3 NC1 domain to elicit experimental autoimmune glomerulonephritis in rats. *J Biol Chem* 2003; **278**: 46516-46522.
- Wieslander J, Langeveld J, Butkowski R et al. Physical and immunochemical studies of the globular domain of type IV collagen. Cryptic properties of the Goodpasture antigen. *J Biol Chem* 1985; **260**: 8564-8570.
- Borza DB, Bondar O, Colon S et al. Goodpasture autoantibodies unmask cryptic epitopes by selectively dissociating autoantigen complexes lacking structural reinforcement: novel mechanisms for immune privilege and autoimmune pathogenesis. *J Biol Chem* 2005; **280**: 27147-27154.
- Than ME, Henrich S, Huber R et al. The 1.9-A crystal structure of the noncollagenous (NC1) domain of human placenta collagen IV shows stabilization via a novel type of covalent Met-Lys cross-link. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 6607-6612.
- Vanacore R, Ham A-JL, Voehler M et al. A sulfimine bond identified in collagen IV. *Science* 2009; **325**: 1230-1234.
- Pedchenko V, Bondar O, Fogo AB et al. Molecular architecture of the Goodpasture autoantigen in anti-GBM nephritis. *N Engl J Med* 2010; **363**: 343-354.
- Mayrose I, Shlomi T, Rubinstein ND et al. Epitope mapping using combinatorial phage-display libraries: a graph-based algorithm. *Nucleic Acids Res* 2007; **35**: 69-78.
- Gunnarsson A, Hellmark T, Wieslander J. Molecular properties of the Goodpasture epitope. *J Biol Chem* 2000; **275**: 30844-30848.
- Saus J, Quinones S, MacKrell A et al. The complete primary structure of mouse alpha 2(IV) collagen. Alignment with mouse alpha 1(IV) collagen. *J Biol Chem* 1989; **264**: 6318-6324.
- Hellmark T, Johansson C, Wieslander J. Characterization of anti-GBM antibodies involved in Goodpasture's syndrome. *Kidney Int* 1994; **46**: 823-829.
- Segelmark M, Hellmark T, Wieslander J. The prognostic significance in Goodpasture's disease of specificity, titre and affinity of anti-glomerular-basement-membrane antibodies. *Nephron Clin Pract* 2003; **94**: c59-c68.
- Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol* 1993; **234**: 779-815.
- Borza DB, Bondar O, Todd P et al. Quaternary organization of the goodpasture autoantigen, the alpha 3(IV) collagen chain. Sequestration of two cryptic autoepitopes by intrapromoter interactions with the alpha4 and alpha5 NC1 domains. *J Biol Chem* 2002; **277**: 40075-40083.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-254.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**: 680-685.
- Burnette WN. 'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981; **112**: 195-203.