

03062
1ej. 6

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSTGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

COOPERATIVIDAD APARENTE EN LA REACCION DE ANTICUERPOS ANTI-DNP
CON EL HAPTENO H- ϵ -DNP-LISINA EN DIALISIS EN EQUILIBRIO

Tesis

Para obtener el título de

Doctor en Investigación Biomédica Básica

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Presenta:

Ruy Pérez Montfort

Bajo la dirección de:

Dr. Carlos Larralde

Trabajo llevado a cabo en el
Instituto de Investigaciones Biomédicas

México, D. F., 1982.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	pag.
RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
MATERIALES Y METODOS	7
RESULTADOS	11
DISCUSION	14
APENDICE	20
REFERENCIAS	29

RESUMEN

Gráficas de Scatchard de la reacción de $^3\text{H-DNP}^*$ -lisina con anticuerpos anti-DNP estudiada por diálisis en equilibrio muestran un brazo ascendente en valores bajos de ligando pegado que son consistentes con cooperatividad entre sitios activos. Se han eliminado experimentalmente todas las posibilidades razonables de que este fenómeno sea un artefacto. La digestión de los anticuerpos con papaína produce una disminución en el efecto o su desaparición, conforme la mayoría o todas las moléculas bivalentes se transforman en fragmentos monovalentes Fab. Por medio de un modelo de fijación de haptenos monovalentes por anticuerpos bivalentes se hizo un estimado conservador de la constante de afinidad del segundo sitio activo (K_2). Los resultados indican que por lo menos es dos veces mayor que su valor teórico esperado en ausencia de interacciones. Se sugiere que existen una o varias subpoblaciones de anticuerpos que fijan hapteno y/o antígeno en forma cooperativa.

* Abreviación:

DNP= dinitrofenol

INTRODUCCION

La reacción antígeno-anticuerpo es uno de los eventos principales relacionados con la respuesta inmune. Esta reacción se ha estudiado por métodos muy diversos por varias décadas. Como resultado de estos estudios el consenso científico actual es que la interacción del antígeno con el anticuerpo tiene efectos sobre las propiedades de los anticuerpos. Estos efectos se han asociado con la generación de señales biológicas que pueden iniciar una de diversas reacciones subsecuentes, como la fijación de complemento o la degranulación de células cebadas.

Existe todavía controversia respecto a la naturaleza y el mecanismo de transmisión de las señales biológicas relevantes que resultan de la reacción antígeno-anticuerpo. Actualmente existen dos líneas principales de pensamiento; una postula que la única señal relevante consiste en la agregación de moléculas de anticuerpo por el antígeno (Metzger, 1974, 1978) y la otra postula que hay otras señales relevantes, además de la agregación (Hoffmann, 1976). Un problema central en esta discusión se refiere a la pregunta sobre la existencia de interacciones entre los diversos sitios activos de la molécula de anticuerpo. Hasta la fecha esta controversia no se ha resuelto y continúan apareciendo reportes de estudios con evidencia que trata de soportar o refutar alguna de las hipótesis (ver por ejemplo Liberti et al, 1982 y Grote et al, 1982). (Ver también Fewtrell et al, 1979 y Nisonoff et al, 1975.)

Existen teóricamente varias posibilidades y mecanismos de interacción entre los sitios activos conocidos de los anticuerpos. El trabajo presentado en esta tesis trata solo una: la existencia de interacciones positivas entre dos sitios activos idénticos (cooperatividad homotrópica) en una molécula bivalente de anticuerpo. La cooperatividad consiste en un aumento en la constante aparente de afinidad del segundo sitio activo sobre el valor estadístico esperado ($K_2 = K_1/4$; ver apéndice) en el caso de independencia de los sitios activos.

Este efecto no implica necesariamente la ocurrencia de un cambio conformacional en la molécula de anticuerpo, aunque su observación (Schlessinger et al, 1975), especialmente si es subsecuente a la fijación de haptenos monovalentes (Lancet et al, 1977; Zav'yalov et al, 1977; Zidovetsky et al, 1980), puede ser interpretada como sugerente de la existencia de interacciones entre sitios activos.

Estudios Previos

La idea prevalente de que los sitios activos de un anticuerpo fijan al antígeno en forma independiente proviene originalmente de estudios de la reacción en equilibrio. Estos estudios, que representan el soporte principal de la hipótesis, se hicieron, en la mayor parte de los casos, con haptenos monovalentes y anticuerpos inducidos. Karush (1959) midió, por la técnica de diálisis en equilibrio, la misma constante de afinidad promedio por el hapteno para anticuerpos de conejo con actividad anti-p-azofenil- β -lactósido y sus fragmentos Fab, obtenidos por digestión con papaína. Nisonoff y colaboradores (1960), utilizando la misma técnica, hicieron la misma observación en anticuerpos de conejo y sus fragmentos Fab', obtenidos por digestión con pepsina y reducción, con actividad anti-ácido-azop-benzóico. También reportaron que ambas preparaciones tenían el mismo índice de heterogeneidad. Velick y colaboradores (1960) usaron la técnica de apagamiento de la fluorescencia para medir la fijación de DNP-lisina a anticuerpos de conejo y sus fragmentos Fab con actividad anti-DNP y reportaron resultados similares. El descubrimiento de que algunas proteínas de mieloma tienen afinidad por algunos antígenos o haptenos, generó estudios similares de fijación con estas moléculas. Ashman y Metzger (1969) obtuvieron datos de fijación consistentes con independencia y homogeneidad de sitios activos con una proteína de mieloma humana de la clase IgM y sus diversos fragmentos bivalentes y monovalentes usando ^3H -DNP-ácido- ϵ -aminocapróico como hapteno.

Estos experimentos y otros experimentos subsecuentes muy similares , son la fuente de evidencia menos ambigua en favor de la hipótesis de ausencia de interacción entre sitios activos. La mayor parte de la evidencia acumulada por métodos directos o indirectos relativa a esta hipótesis ha sido discutida previamente en las revisiones por Metzger en 1974 y 1978. La conclusión a la que llega el autor es que la evidencia sugiere que no existen interacciones entre sitios activos en la molécula de anticuerpo, aunque admite y describe numerosos reportes con evidencia contraria a su hipótesis.

La observación de cooperatividad positiva en reacciones antígeno-anticuerpo se reportó por primera vez en 1967 por Zimmering y colaboradores. Estos investigadores estudiaron la fijación de hormonas esteroides a anticuerpos (IgG) de borrego por diálisis en equilibrio. En varios casos observaron curvas de fijación consistentes con un efecto cooperativo. Este efecto ocurrió en un pequeño porcentaje de la población total de anticuerpos, los de menor afinidad por el antígeno. Utilizando la técnica de radioinmunoensayo dos grupos independientes de investigadores (Matsukura et al, 1971; Matsuyama et al, 1971) observaron un efecto cooperativo en la fijación de hormona adrenocorticotrópica humana a anticuerpos de cobayo. En estos casos el efecto se observó otra vez en un porcentaje pequeño de la población total de anticuerpos pero, como se ha observado en todos los estudios posteriores, en anticuerpos de alta afinidad. En ambos reportes la detección del efecto cooperativo ocurrió por un aumento inicial en el cociente de ligando pegado y ligando libre conforme aumentaba la concentración de ligando pegado. En el caso de sitios activos independientes la tendencia de dicho cociente(en situaciones similares)es exclusivamente a disminuir (Scatchard, 1949). Weintraub y colaboradores (1973) observaron el mismo fenómeno en un radioinmunoensayo utilizando anticuerpos de cobayo anti-gonadotropina coriónica humana y sus fragmentos bivalentes $F(ab')_2$. También demostraron que las curvas obtenidas con fragmentos monovalentes $F(ab')$ no mostraban ningún signo de

interacción.

Carayon y Carella (1974) observaron curvas de fijación cooperativa en un radioinmunoensayo con anticuerpos de conejo inducidos contra las hormonas tiroideas 3,5,3'-triiodo-l-tiroxina y l-tiraxina. Con ayuda de un modelo teórico mostraron además que se podían obtener curvas de fijación similares a las experimentales bajo la hipótesis de cooperatividad positiva entre sitios activos idénticos y ligando monovalente.

Celis y colaboradores (1977) reportaron que anticuerpos de borrego anti-DNP o anti-albúmina sérica humana fijados a un soporte sólido, fijan albúmina sérica humana dinitrofenilada en forma cooperativa. En el caso de anticuerpos anti-DNP demostraron que el efecto cooperativo está relacionado con la valencia del antígeno. Con un modelo gráfico pudieron generar curvas de fijación cooperativa mucho más parecidas a las curvas experimentales simulando fijación no específica y heterogeneidad entre sitios activos, además de cooperación.*

*Nota: Una serie de estudios ha sido realizado por el grupo de I. Pecht sobre la fijación cooperativa de ligandos monovalentes por un dímero de cadenas ligeras de la proteína de mieloma MOPC 315(IgA de ratón). Sugieren que los dímeros pueden servir como modelos de receptores de antígeno en los linfocitos T o de anticuerpos, debido a que cada dímero posee dos sitios activos que fijan hapteno monovalente. Han estudiado la fijación de dos haptenos a dímeros unidos covalentemente por un puente disulfuro (L_2cov), dímeros reducidos y alquilados (L_2ncov) y a dímeros de la región variable (V_{L2}) de estas cadenas ligeras. En todos los casos han observado fijación cooperativa y han cuantificado los parámetros de cooperación según el formalismo de Adair y el modelo mecanístico de Monod, Wyman y Changeux. Han observado que el efecto cooperativo aumenta notablemente en presencia del puente disulfuro en el extremo carboxilo-terminal de los dímeros (Zidovetzky et al, 1979). Basados en sus resultados y evidencia indirecta (Klein et al, 1979), han postulado que el efecto cooperativo está relacionado con cambios conformacionales que se transmiten longitudinalmente en las cadenas que forman el dímero (Lancet et al, 1977; Zidovetzky et al, 1981). También

Todos estos estudios, aunque sugieren que hay cooperatividad positiva en la reacción antígeno-anticuerpo, se han hecho con antígenos multivalentes. Esto presenta dos problemas en la interpretación de los resultados. El primer problema es que no se puede distinguir claramente cual es la contribución individual de ambas moléculas a la fijación cooperativa (Tosi et al, 1981). El segundo problema es que no existe un modelo matemático que considere la multivalencia del antígeno y permita un análisis riguroso de la reacción. Estos problemas se pueden evitar, hasta cierto punto, estudiando la fijación de haptenos monovalentes a anticuerpos bivalentes y sus fragmentos.

El trabajo presentado en esta tesis muestra evidencia consistente con la existencia de cooperatividad en la reacción de anticuerpos anti-DNP y el hapteno monovalente $^3\text{H-DNP-lisina}$ en diálisis en equilibrio. En una búsqueda de diversas posibles fuentes de error experimental los resultados fueron consistentemente negativos. Bajo la suposición de sitios homogéneos se pudo hacer un estimado conservador del grado de cooperación. Con ecuaciones que consideran la bivalencia de los anticuerpos, K_2 , la constante aparente de afinidad del segundo sitio activo, resultó ser por lo menos dos veces mayor que el valor teórico esperado para sitios activos independientes. Además la digestión de anticuerpos a fragmentos monovalentes Fab altera las características de las curvas de fijación en forma consistente con la hipótesis de fijación cooperativa en anticuerpos bivalentes.

*Nota (cont.): han especulado sobre la posible importancia de la cooperatividad en la función de receptores para el antígeno en el linfocito T (Blanden et al, 1980). Es difícil evaluar la relevancia de estos estudios para la reacción hapteno-anticuerpo, especialmente si se considera el hecho de que la proteína de mieloma intacta ($2\text{H} + 2\text{L}$) fija los mismos haptenos en forma no cooperativa.

MATERIALES Y METODOS

Anticuerpos Purificados Anti-DNP

El antígeno DNP₂₃-albúmina sérica bovina se preparó según el método de Eisen (Eisen et al, 1953). Varios borregos se inmunizaron inicialmente con el antígeno y un adyuvante de Freund completo que contenía 0.5 mg/mL de M. tuberculosis H37R_v autoclaveado. Las inmunizaciones posteriores (cada 15 días) se hicieron solo con una solución del antígeno. Los sueros de diferentes sangrados en un período de dos años que precipitaron proteínas heterólogas dinitrofeniladas (ovalbúmina, albúmina sérica humana y gamaglobulinas bovinas) en doble inmunodifusión fueron tratadas tres veces con sulfato de amonio al 33% de saturación a un pH de 7.8 (Campbell et al, 1970) para precipitar sus inmunoglobulinas. Los anticuerpos anti-DNP se purificaron por cromatografía de afinidad con una columna de Sepharose 4B-DNP-1-lisina (Sepharose 4B, Pharmacia Fine Chemicals; DNP-1-lisina, Sigma Chemical Co.). Los anticuerpos puros se eluyeron en una solución 0.001 M de dinitrofenol (Merck Darmstadt) en solución salina amortiguada de fosfatos (PBS; 0.01 M PO₄³⁻, 0.15 M NaCl, pH 7.4). El dinitrofenol se separó de los anticuerpos por cromatografía en PBS sobre una columna de Sephadex G25 y/o por diálisis exhaustiva contra PBS hasta que la solución de anticuerpos puros mostraba una relación de absorbancias a 280 y 363 nm idéntica a las inmunoglobulinas antes de su purificación. En cada etapa de la purificación se probó la actividad de anticuerpo por la capacidad de las distintas preparaciones de formar bandas de precipitación en doble inmunodifusión contra antígenos heterólogos. Las soluciones de anticuerpo mostraron una banda en electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio en la región de peso molecular de ~150,000 (figura 6). En análisis por inmunoelectroforesis mostraron también una sola banda de precipitación con heterogeneidad de carga restringida, en la región de la inmunoglobulina G.

Preparación de los Fragmentos Fab y Procedimiento de Reducción

Se prepararon fragmentos Fab de fracciones de inmunoglobulinas que contenían anticuerpos anti-DNP por digestión con papaína (Sigma Chemical Co.) al 1% siguiendo el método de Hudson y Hay (1976). La mezcla de digestión se separó por cromatografía de intercambio iónico en carboximetil-celulosa (Whatman). Las fracciones que contenían los fragmentos, cuando se analizaron por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio, mostraron una banda de peso molecular de $\sim 150,000$ (figura 6). Los fragmentos de peso molecular de $\sim 48,000$ se purificaron por cromatografía en Sephadex G200 al grado de que por el mismo método no se detectó ningún contaminante de peso molecular mayor a $\sim 50,000$ (figura 6). Ambas preparaciones se utilizaron en estudios de fijación.

Un mL de una solución con 2 mg/mL de anticuerpos anti-DNP purificados por cromatografía de afinidad se redujo con 0.1 mL de β -mercaptoetanol (Sigma Chemical Co.) 0.75 M en solución amortiguadora de Tris-HCl 0.55 M pH 8.2 durante una hora a temperatura ambiente. A la mezcla se le agregó 0.1 mL de iodoacetamida (Sigma Chemical Co.) 0.75 M y se incubó una hora a 0° C en la oscuridad. Los anticuerpos reducidos y alquilados se dializaron exhaustivamente contra PBS.

Hapteno

El hapteno utilizado en los estudios de fijación fue 3,5- 3 [H]-2,4DNP- ϵ -l-lisina (3 H-DNP-lisina) de New England Nuclear con actividades específicas de 1.1 o 4.86 Ci/mmol. Por cromatografía en capa fina en gel de sílice con un sistema de solventes isopropanol:hidróxido de amonio::7:3, se detectaron cuatro manchas radioactivas. La más abundante (79%) mostró un comportamiento cromatográfico idéntico a DNP- ϵ -l-lisina y el resto de la actividad se distribuyó en contaminantes no identificados. En algunos de los estudios de fijación se usó la preparación comercial del hapteno y en otros se utilizó el hapteno purificado por cromatografía en capa fina en gel de sílice para checar si algún contaminante era responsable de la fijación aumentada a ciertas concentraciones del hapteno.

Estudios de Fijación

Se estudió la fijación de ^3H -DNP-lisina a inmunoglobulinas sin actividad de anticuerpo, inmunoglobulinas con actividad de anticuerpo (anti-DNP), anticuerpos anti-DNP puros en estado nativo o reducidos y alquilados y sus fragmentos Fab por diálisis en equilibrio. Las concentraciones de proteína variaron entre 0.09 mg/mL y 12 mg/mL. Se utilizaron ocho o doce concentraciones diferentes del hapteno en triplicado o duplicado, dependiendo del estudio. Los experimentos se realizaron en aparatos de multi-diálisis (Hoeffer Scientific Instruments) a 4°C . Muestras de 100 μL de anticuerpo y hapteno se dializaron durante 72 horas con agitación constante. Se estableció experimentalmente que estas condiciones son más que suficientes para establecer el equilibrio de difusión en este sistema. Después de la diálisis se extrajeron 50 μL de las cámaras sin proteína para estimar directamente las concentraciones de hapteno libre (H_1) y 50 μL de las cámaras con proteína para estimar las concentraciones de hapteno pegado (B_1), por diferencia de la radioactividad en estas cámaras con la radioactividad en las cámaras sin proteína respectivas ($[B]_1 = (\text{concentración del hapteno en la cámara con proteína} - [H]_1)$). Las concentraciones de hapteno se estimaron en tolueno (PPO, 4 g/L; POPOP, 0.4 g/L, NCS, 40 mL/L; Amersham Searle) o dioxano (PPO, 8 g/L; Dimetil-POPOP, 0.6 g/L (Amersham Searle); naftaleno 150 g/L; etilenglicol 20 mL/L (Baker); 2-etoxietanol 100 mL/L (Sigma Chemical Co.)) en un contador de centelleo líquido con una eficiencia de $\sim 50\%$.

Los datos se graficaron como el cociente de ligando pegado y libre ($[B]_1/[H]_1$) contra la concentración de ligando pegado ($[B]_1$) (Scatchard, 1949). Los máximos se estimaron en la intersección de dos regresiones lineares, una para la porción ascendente y otra para la porción descendente de la curva (figura 2). El intercepto de la regresión linear para la porción descendente de la curva con el eje de las abscisas se utilizó para estimar S_0 (el número de sitios activos) y A_0 (la concentración de anticuerpo bivalente). El intercepto de la regresión linear para la porción ascendente de la

curva con el eje de las ordenadas se utilizó para estimar K_1 (la constante de afinidad aparente del primer sitio activo) con la relación:

$$\begin{array}{l} \left(\frac{B_T}{H}\right) \longrightarrow A_0 K_1 \\ H \longrightarrow 0 \\ B_T \longrightarrow 0 \end{array} \quad \text{(XVI)}$$

(ver apéndice).

K_2 (la constante de afinidad del segundo sitio activo) se estimó con las ecuaciones:

$$K_2 = \frac{Y^2 + ((Y^2(Y^2 - A_0^2 K_1^2)))^{\frac{1}{2}}}{2A_0^2 K_1} \quad \text{(XXI)}$$

$$K_2 = \frac{K_1}{4} \left(\left(\frac{A_0^2}{(A_0 - X)^2} \right) + 1 \right) \quad \text{(XXII)}$$

$$K_2 = \frac{Y}{2(A_0 - X)} \quad \text{(XXIII)}$$

(ver apéndice).

RESULTADOS

Todas las curvas de fijación son de datos que se obtuvieron por diálisis en equilibrio. Siempre se colocaron volúmenes iguales de una solución de proteína a concentración constante en cámaras de un lado de la membrana y una solución de hapteno radioactivo a diferentes concentraciones en las cámaras correspondientes del lado opuesto de la membrana.

La fijación del hapteno a inmunoglobulinas de borregos inmunes (círculos vacíos) y no inmunes (círculos llenos) se ilustra en la figura 1. Conforme aumenta la concentración de ligando pegado a inmunoglobulinas de los borregos inmunes, las gráficas de Scatchard muestran primero un aumento en el cociente de concentraciones de ligando pegado y libre. Una vez que este valor alcanza un máximo comienza a decrecer en la forma esperada por la fijación del hapteno a sitios activos heterogéneos de los anticuerpos. Cuando se llega a concentraciones altas de ligando pegado el cociente decrece muy lentamente o permanece constante sugiriendo fijación no específica o de muy baja afinidad. Las inmunoglobulinas de borregos no inmunes no muestran fijación significativa del hapteno en el mismo rango de concentraciones de hapteno pegado. La gran concentración de puntos cerca del origen también indica que, en las condiciones experimentales, el hapteno ha alcanzado el equilibrio de difusión.

Los anticuerpos anti-DNP purificados por cromatografía de afinidad muestran el mismo tipo de curva de fijación (ejemplos representativos se muestran en la figura 2). En un gran número de experimentos de este tipo se pudo reproducir en forma consistente el fenómeno de aumento inicial de la relación pegado/libre (B/H). El máximo en esta relación así como B_{max} y A_0 mostraron variaciones según el lote de anticuerpos purificados con los que se hacía el experimento (ver Discusión).

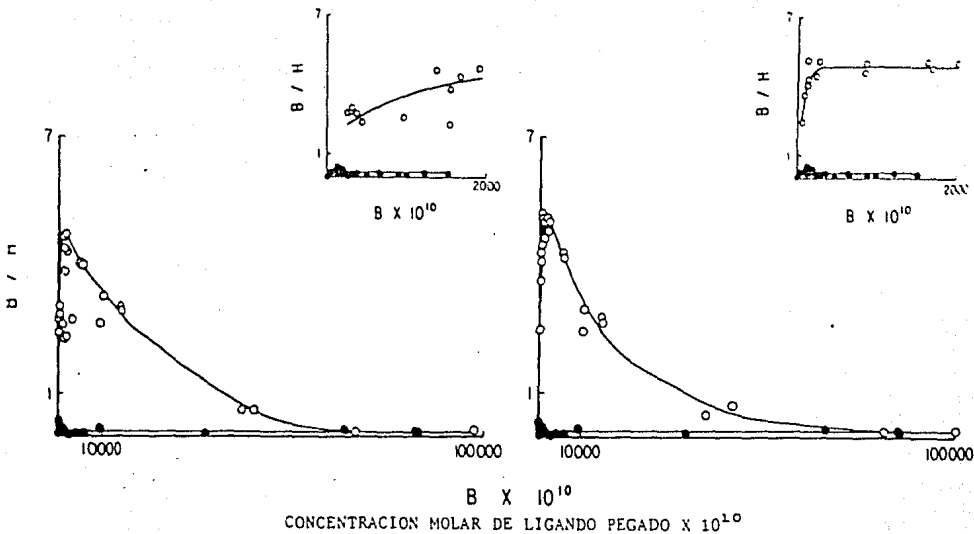


Figura 1

Gráficas de Scatchard de la fijación de ^3H -DNP-lisina a inmunoglobulinas anti-DNP precipitadas con sulfato de amonio (o) a una concentración de $7.5 \times 10^{-5}\text{M}$ y a gamaglobulinas no inmunes (●) a una concentración de $6.9 \times 10^{-5}\text{M}$ en dos experimentos independientes. El rango de concentraciones de hapteno es de $5 \times 10^{-9}\text{M}$ a $5 \times 10^{-4}\text{M}$. Los insertos muestran una amplificación de los puntos cercanos al eje B/H.

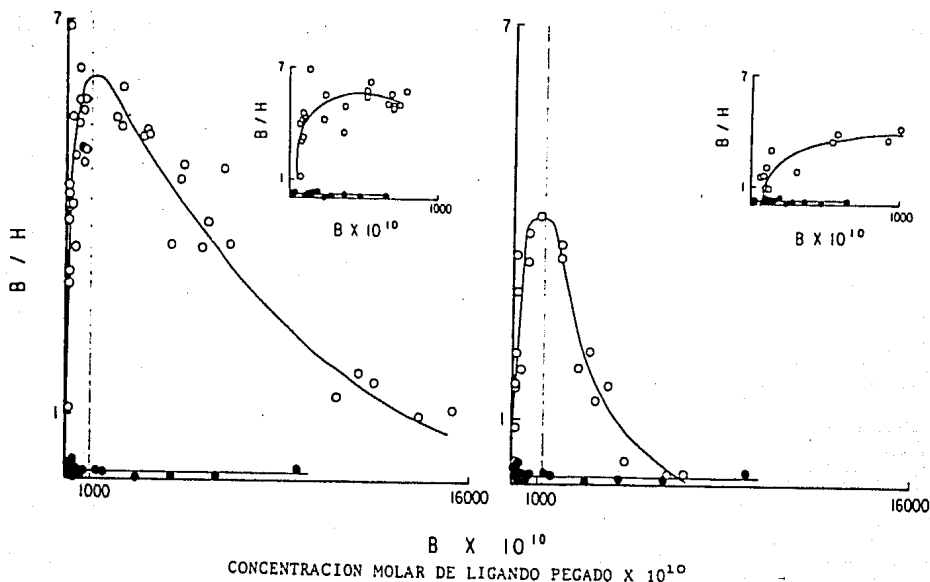


Figura 2

Gráficas de Scatchard de la fijación de ³H-DNP-lisina a anticuerpos anti-DNP purificados por cromatografía de afinidad (o) y a gamaglobulinas no inmunes (●). La línea vertical discontinua pasa por el máximo observado. Los puntos en el area comprendida entre el origen y la línea discontinua muestran correlaciones positivas de B/H sobre B estadísticamente significativas en la mayor parte de las curvas analizadas por regresión lineal (Tabla 1). La curva de la izquierda se obtuvo con los anticuerpos de un borrego a una concentración de 1×10^{-6} M y la curva de la derecha con anticuerpos de otro borrego a una concentración de 3.1×10^{-6} M. El rango de concentraciones de hapteno es de 5×10^{-9} M a 5×10^{-6} M y la concentración de gamaglobulinas no inmunes de 6.9×10^{-6} M. Los insertos muestran una amplificación de los puntos cercanos al eje B/H.

Como la región del brazo ascendente de la gráfica de Scatchard está sujeta a una gran variación experimental, en parte debida a las concentraciones tan bajas de hapteno así como a la misma técnica de diálisis en equilibrio, sometimos nuestra hipótesis a una prueba estadística. Los resultados de regresiones lineares para varios experimentos de los puntos localizados en el área limitada por el eje de las ordenadas y la línea vertical discontinua ejemplificadas en las gráficas de la figura 2 se muestran en la tabla 1.

La mayor parte de los coeficientes de correlación y todas las pendientes obtenidas en la regresión indican tendencias positivas y lineares estadísticamente significativas en el intervalo estudiado. Como control se siguió el mismo procedimiento para la región del brazo descendente (tabla 1). Esta regresión se utilizó para estimar los parámetros S_0 y A_0 y el intercepto de las regresiones para los brazos ascendentes y descendentes respectivos para estimar los valores $(B/H)_{\max}$ y B_{\max} (Celis et al, 1977). Los valores de K_1 y K_2 se calcularon con la relación XVI y las ecuaciones XXI, XXII y XXIII respectivamente (Materiales y Métodos o Apéndice) y los estimados resultantes se muestran en la tabla 2.

En todos los casos K_2 excede el valor teórico de fijación por sitios independientes $K_2 = K_1/4$ ($K_2/K_1 = 0.25$). Hay discrepancias en los estimados calculados por las diferentes ecuaciones (ver Discusión) pero es aparente que cada ecuación produjo estimados similares entre sí. Nótese que el estimado de K_2 por la ecuación XXII es el menos variable de todos.

Como existía la posibilidad de que un contaminante de la preparación comercial de ^3H -DNP-lisina fuera la causa del brazo ascendente en las gráficas de Scatchard, el hapteno se analizó por cromatografía en capa fina en gel de sílice. Como ya se mencionó, 79% de la radioactividad estaba asociada a un compuesto con un R_f idéntico a controles de ξ -DNP-lisina y la radioactividad restante se encontraba distribuida entre tres contaminantes no identificados. La fijación de hapteno

TABLA 1

ANTICUERPOS ANTI-DNP BIVALENTES PURIFICADOS

Análisis estadístico de brazos ascendentes y descendentes en gráficas de Scatchard

Regresión linear brazo ascendente	gl ^a	r	P <	Regresión linear brazo descendente	gl	r	P <
$y = 1.21 + 30304010x$	10	0.83	0.001	$y = 4.30 - 7081430x$	8	-0.91	0.001
$y = 1.08 + 101598373x$	3	0.80	NS ^b	$y = 2.24 - 7294490x$	17	-0.93	0.001
$y = 3.65 + 27178161x$	21	0.57	0.001	$y = 6.31 - 3937820x$	17	-0.96	0.001
$y = 1.23 + 48798473x$	11	0.68	0.01	$y = 3.34 - 4384280x$	7	-0.87	0.01
$y = 2.79 + 61784370x$	21	0.62	0.001	$y = 6.19 - 5926810x$	14	-0.96	0.001

a=grados de libertad; b=no significativo.

TABLA 2

ANTICUERPOS ANTI-DNP BIVALENTES PURIFICADOS

Estimados del cociente de las constantes de afinidad experimentales para el segundo y primer sitios activos

Concentración molar de proteína	$\times 10^6$	$A_0 \times 10^7$	$(B/H)_{\max}$	$B_{\max} \times 10^8$	$K_1 \times 10^{-6}$ (M^{-1})	K_2/K_1^a	K_2/K_1^b	K_2/K_1^c
3.1		3.04	3.71	8.26	3.98	9.14	0.72	2.11
1.6		1.53	2.16	1.06	7.06	3.73	0.54	1.07
1.0		8.01	5.97	8.55	4.55	2.40	0.56	0.92
1.0		3.81	3.17	3.97	3.23	6.38	0.56	1.44
1.0		5.22	5.89	5.02	5.34	4.20	0.56	1.17
					media	= \bar{x} = 5.17	0.59	1.34
					desviación standard	= σ = 2.64	0.08	0.47
					coeficiente de variación	= σ/\bar{x} = 0.51	0.13	0.35

a ecuación XXI
b ecuación XXII
c ecuación XXIII

purificado por cromatografía en capa fina y hapteno contaminado a anticuerpos puros se ilustra en la figura 3. Los resultados tan similares sugieren que los contaminantes radioactivos no alteran cualitativamente ni cuantitativamente las características de la curva de fijación.

La figura 4 muestra las curvas de fijación obtenidas variando la concentración de un mismo lote de anticuerpos purificados por cromatografía de afinidad. Es aparente que los valores de $(B/H)_{\max}$ y B_{\max} aumentan conforme aumenta el valor de S_0 .

La misma preparación de anticuerpos en estado nativo y reducidos y alquilados, en concentraciones equivalentes de proteína muestran curvas de fijación diferentes como ilustra la figura 5. La altura del brazo ascendente disminuye con la reducción y alquilación de los puentes disulfuro.

Una prueba crítica de la hipótesis de cooperatividad entre sitios activos es la ausencia de un aumento en la relación de ligando pegado sobre libre, a cualquier concentración de ligando pegado, con fragmentos monovalentes de anticuerpos. Se prepararon fragmentos Fab por digestión con papaína y se purificaron al grado de que no mostraban contaminación cuando se analizaron por electroforesis en gel de acrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio (figura 6, círculos vacíos). Las curvas de fijación obtenidas con diferentes concentraciones de estos fragmentos muestran exclusivamente un decremento en la relación ligando pegado sobre libre (figura 7, lado izquierdo). Un análisis estadístico de los datos, igual al aplicado a los datos que se obtuvieron con anticuerpos bivalentes, no mostró ninguna correlación lineal significativa en la región del brazo ascendente (tabla 3). Esto sugiere que la variación observada se debe a error experimental.

En la gráfica de la fijación de hapteno por la mezcla de digestión de los anticuerpos bivalentes con papaína, se observó un brazo ascendente pequeño pero muy claro (figura 7, lado derecho). El análisis por densitometría del patrón electroforético, en un gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio, de esta preparación, mostró que contenía 36% de anticuerpo bivalente (figura 6, triángulos vacíos).

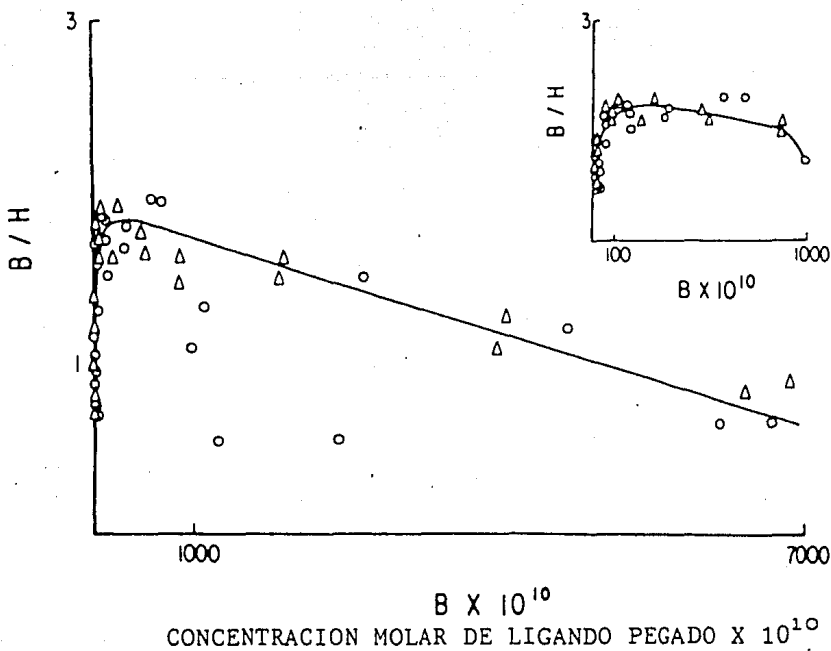


Figura 3

Gráfica de Scatchard de la fijación de $^3\text{H-DNP-lysine}$ purificada (Δ) y comercial (\circ) a anticuerpos anti-DNP purificados. La concentración de proteína fue de $3.1 \times 10^{-6}\text{M}$ y el rango de concentraciones de hapteno de $1 \times 10^{-9}\text{M}$ a $6 \times 10^{-6}\text{M}$. El inserto muestra una ampliación de los puntos cercanos al eje B/H .

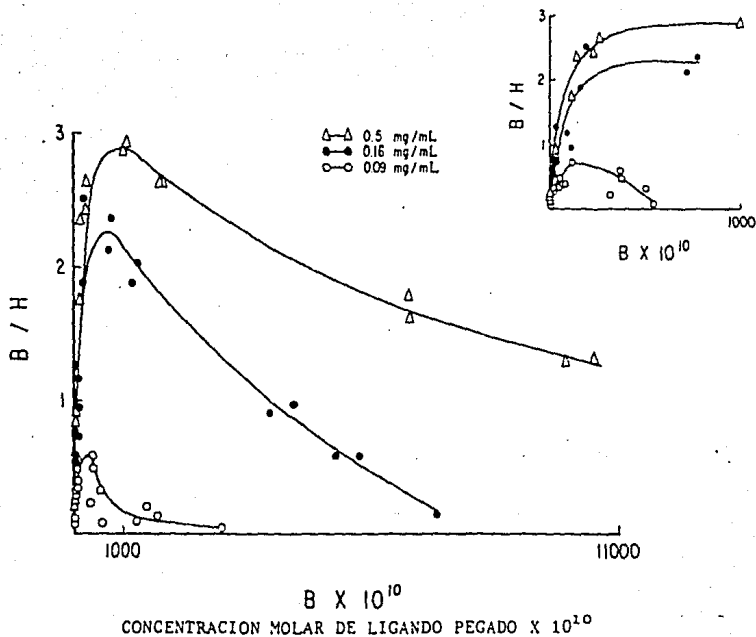


Figura 4

Gráficas de Scatchard de la fijación de ³H-DNP-lisina al mismo lote de anticuerpos anti-DNP purificados a distintas concentraciones de proteína. El rango de concentraciones de hapteno es de 1×10^{-10} M a 5×10^{-5} M. El inserto muestra una amplificación de los puntos cercanos al eje B/H.

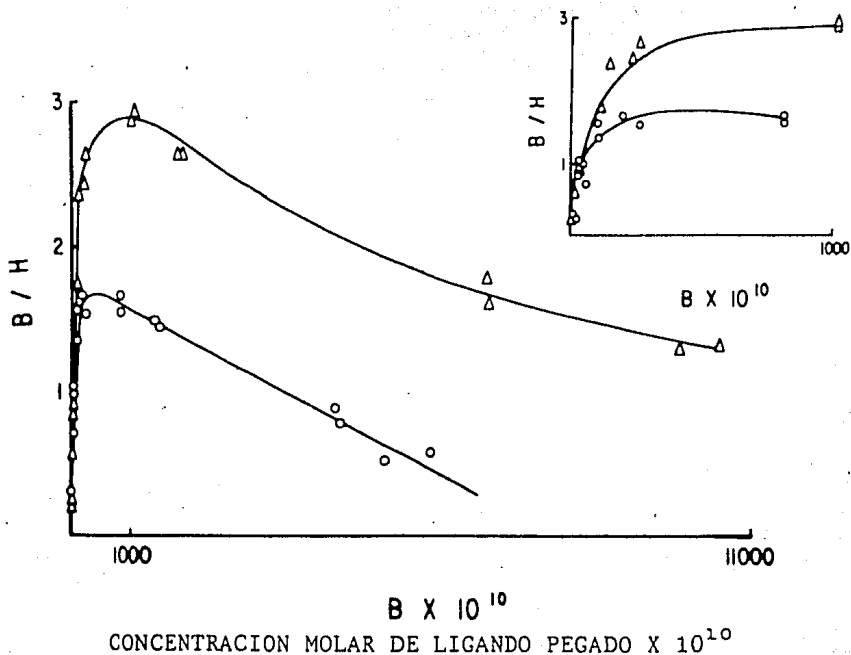


Figura 5

Gráficas de Scatchard de la fijación de ^3H -DNP-lisina al mismo lote de anticuerpos anti-DNP purificados: reducidos y alquilados (o) e intactos (Δ). La concentración de ambas preparaciones de anticuerpo se ajustó espectrofotométricamente a $3.1 \times 10^{-6}\text{M}$. El rango de concentraciones de hapteno es de $1 \times 10^{-10}\text{M}$ a $5 \times 10^{-5}\text{M}$. El inserto muestra una amplificación de los puntos cercanos al eje B/H.

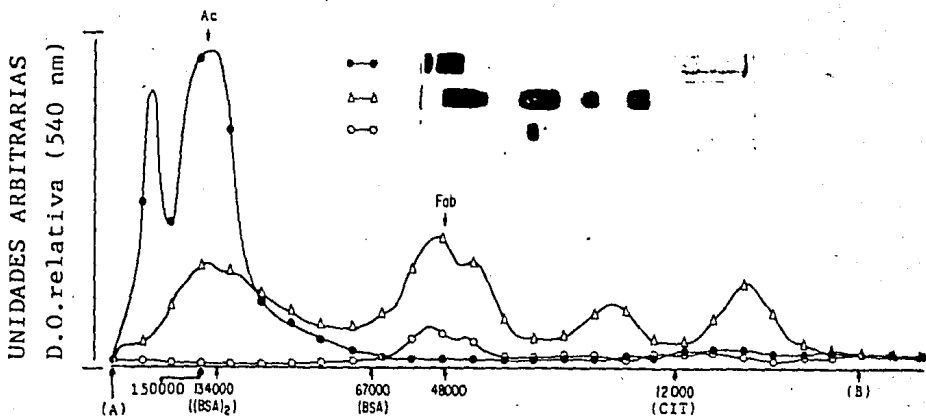


Figura 6

Patrones de lectura de integración fotocolorimétrica de diversas preparaciones de anticuerpos analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida (7.5%) en solución amortiguadora de fosfatos pH 8 en presencia de dodecil sulfato de sodio (0.01M). Anticuerpos bivalentes (●), fragmentos Fab puros (○) y fragmentos Fab contaminados con anticuerpos bivalentes (Δ). El símbolo (A) marca el punto de aplicación de la muestra y (B) la posición del marcador colorido (azul de bromofenol); $(BSA)_2$, BSA, y CIT marcan la posición de dímeros de albúmina sérica bovina, monómeros de albúmina sérica bovina y citocromo C respectivamente. El inserto muestra el patrón de tinción con azul Coomassie de los geles de poliacrilamida analizados.

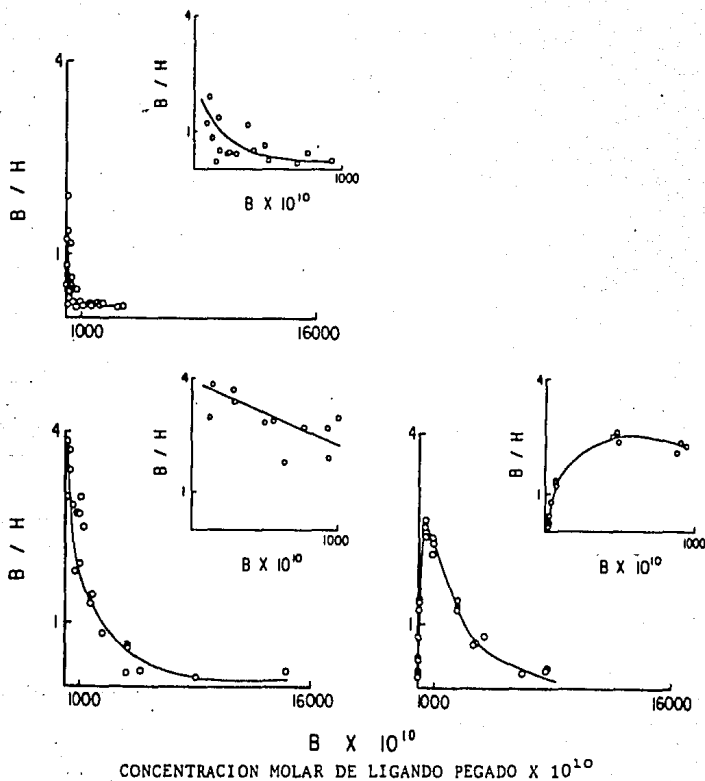


Figura 7

Gráficas de Scatchard de la fijación de ^3H -DNP-lisina a fragmentos Fab monovalentes puros (ambas curvas del lado izquierdo) o contaminados con 36% de anticuerpos bivalentes (curva del lado derecho). La concentración de proteína para la curva superior izquierda es de 0.5 mg/mL y para las otras dos curvas de 1 mg/mL. El rango de concentraciones de hapteno es de $1 \times 10^{-8}\text{M}$ a $2 \times 10^{-6}\text{M}$. Los insertos muestran una ampliación de los puntos cercanos al eje B/H.

TABLA 3

FRAGMENTOS Fab ANTI-DNP MONOVALENTES PURIFICADOS

Análisis estadístico de brazos ascendentes y descendentes en gráficas de Scatchard

Regresión linear brazo ascendente	gl ^a	r	P <	Regresión linear brazo descendente	gl	r	P <
$y = -1.62 + 317555451x$	0		NS ^b	$y = 0.71 - 2054877x$	21	-0.49	0.05
$y = 0.48 + 11441575x$	5	0.26	NS	$y = 0.54 - 1347759x$	15	-0.56	0.05
$y = -2.86 + 469095488x$	2	0.94	NS	$y = 0.75 - 2192788x$	18	-0.58	0.01
$y = -3.03 + 463504043x$	0		NS	$y = 2.35 - 2031439x$	21	-0.70	0.001

a=grados de libertad; b=no significativo

DISCUSION

Los datos experimentales presentados muestran evidencia de un aumento inicial en el cociente de hapteno pegado y hapteno libre en la reacción de hapteno monovalente y anticuerpo bivalente estudiada por diálisis en equilibrio. Una prueba estadística indica que se puede rechazar la hipótesis de un aumento similar en curvas de fijación con fragmentos Fab monovalentes (tablas 1 y 3). Estos resultados son consistentes con interacción positiva entre sitios activos en anticuerpos bivalentes de acuerdo a nuestro modelo (ver apéndice) y los de otros autores (Carayon & Carella, 1974; Dahlquist, 1974; Fletcher & Spector, 1977; Koshland & Neet, 1968; Parsons & Vallner, 1978; Rodbard & Bertino, 1973; Schwarz, 1976).

Se han considerado varias posibles fuentes de error experimental que podrían generar curvas de fijación como las observadas. No se detectó fijación inespecífica significativa del hapteno radioactivo a inmunoglobulinas sin actividad de anticuerpo en todo el rango de concentraciones de hapteno usado (figuras 1 y 2). La acumulación de puntos cerca del origen en estos experimentos muestra que el hapteno radioactivo alcanza el equilibrio de difusión y que se recupera en forma constante, bajo las condiciones utilizadas para estudiar la fijación.

La similaridad de los datos presentados en la figura 3 eliminan la posibilidad de que algún contaminante en la preparación comercial del hapteno sea la causa del brazo ascendente en las curvas de fijación.

Cambios conformacionales como agregación del ligando a ciertas concentraciones, podrían generar brazos ascendentes si la constante de afinidad aumentara con dichos cambios. En un caso así, se esperaría ver también fijación aumentada en los rangos de concentración de hapteno 10^{-9} M a 10^{-7} M en curvas de fijación de fragmentos monovalentes Fab. La evidencia experimental está en contra de esta hipótesis (figura 7).

La competencia entre el ligando radioactivo utilizado en la diálisis en equilibrio y residuos de hapteno no radioactivo utilizado en la purificación de anticuerpos, podría resultar en un brazo ascendente en curvas de fijación. Esta posibilidad se ha descartado experimentalmente; se ha demostrado la presencia de brazos ascendentes en curvas de fijación con anticuerpos que no han estado en contacto previo con el hapteno: inmunoglobulinas inmunes purificadas exclusivamente por precipitación con sulfato de amonio (figura 1) y anticuerpos monoclonales (Ortega & Larralde, 1981; del Bosque et al, 1981; ver adelante).

Los brazos ascendentes no son artefactos de alguna concentración especial de anticuerpos. El experimento presentado en la figura 4 muestra que hay una relación entre la posición del máximo en la gráfica de Scatchard y la concentración total de proteína. Este comportamiento es un requisito de fijación cooperativa en cualquier modelo teórico de fijación de ligandos a macromoléculas (Gäbler et al, 1976; Weber, 1975).

Varias fuentes de evidencia indican que el brazo ascendente no se genera fortuitamente como resultado de la variación inherente al método de diálisis an equilibrio: a) La reproducibilidad del fenómeno: brazos ascendentes, en condiciones similares a las observadas en este trabajo, han sido observados (aunque no reportados) por un gran número de investigadores; además, con la misma preparación de anticuerpos se puede reproducir el fenómeno en forma cuantitativa (figura 3).

b) Análisis estadístico: el factor de correlación r en una regresión lineal es una prueba objetiva para evaluar la hipótesis de la linealidad de los datos. En el caso de brazos ascendentes generados al azar, el valor de P debería ser no significativo en todas o la mayor parte de las regresiones (compárese tabla 1 y tabla 3; nótese también que en tres de las regresiones lineales para el brazo ascendente en las curvas de fijación de fragmentos Fab, la línea calculada intercepta al eje de las ordenadas en valores negativos).

c) Observación del fenómeno por métodos independientes: Ortega y Larralde (1981) han estudiado el mismo sistema hapteno anticuerpo por el método de apagamiento de la fluorescencia. Sus resultados confirman las observaciones reportadas aquí para anticuerpos bivalentes y fragmentos Fab.

En un organismo inmunizado los anticuerpos inducidos son una mezcla heterogénea en sus constantes de afinidad por el determinante antigénico. No existe en la actualidad una manera de conocer el número de subpoblaciones y sus diversas afinidades. Simulaciones con modelos matemáticos de fijación, en los que se consideran números pequeños de subpoblaciones con distintas afinidades y grados de interacción, muestran que hay una interrelación compleja entre la magnitud de las constantes de afinidad, la magnitud relativa de cada subpoblación y el grado de interacción que tiene la subpoblación que lo presenta. Por ejemplo, se ha demostrado que en gráficas de Scatchard la heterogeneidad y la cooperatividad positiva tienden a cancelar mutuamente sus efectos, de manera que en presencia de interacciones positivas es posible obtener curvas muy similares a las que se obtienen con sitios activos independientes (José & Larralde, 1982; ver también figura 9 en el apéndice). Los resultados de estos estudios implican que no se puede saber exactamente como ocurre la fijación en sistemas heterogéneos, cuando se toma en cuenta únicamente la parte descendente de la curva de Scatchard y no se conocen ni el número, ni las concentraciones relativas, ni los grados de interacción de las diferentes subpoblaciones que forman la mezcla. Por lo tanto, un alto grado de heterogeneidad puede ser una razón por la cual no se detecten interacciones positivas en algunas preparaciones de anticuerpos (ver por ejemplo Matsukura et al, 1971; Weintraub et al, 1973; Zimmering et al, 1967 y tabla 1). En estudios cinéticos de la reacción hapteno-anticuerpo se ha obtenido evidencia experimental sugerente de la existencia de cooperatividad negativa (Kelly et al, 1971) y de ausencia de interacciones (Skubitz et al, 1977). Toda esta información

apunta claramente a que la reacción antígeno o hapteno-anticuerpo es bastante más compleja de lo que supone la hipótesis de fijación por sitios activos independientes.

La presencia de heterogeneidad hace que los estimados cuantitativos de los parámetros de interacción en curvas de fijación sean inconfiables (José & Larralde, 1982 ; Thakur et al, 1980). Sin embargo, la suposición de homogeneidad de sitios activos en las curvas experimentales permite un estimado conservador del grado de interacción (tabla 2). Tratando de minimizar errores, K_1 se estimó por la relación XVI, que es independiente de los parámetros de máximo. Aún así, K_2 presenta diferencias según la ecuación utilizada para calcularla. (Estas diferencias se deben probablemente a errores en el estimado de todos los parámetros y a la diferente susceptibilidad de las ecuaciones a dichos errores.) Pero todos los estimados de K_2/K_1 coinciden en que exceden al valor estadístico de fijación por sitios independientes (0.25), por lo menos, en un factor de dos.

La evidencia experimental consistente con cooperatividad positiva en la reacción antígeno o hapteno-anticuerpo es la siguiente: se han observado brazos ascendentes en gráficas de Scatchard a) utilizando diferentes métodos para estudiar reacciones de fijación en el equilibrio (radioinmunoensayo, inmunoensayo en fase sólida, diálisis en equilibrio, método de Farr con $(\text{NH}_4)_3\text{SO}_4$ (Larralde, C. no publicado) y apagamiento de la fluorescencia), b) con diferentes ligandos (polivalentes: diversas hormonas y albúmina sérica humana dinitrofenilada; monovalentes: DNP-lisina y ácido iodosulfanílico (Perez-Montfort, R. & Larralde, C. no publicado)) y c) con anticuerpos de diversas especies (conejo, cobayo, borrego, ratón y rata) (Carayon & Carella, 1974; Celis et al, 1977; Matsukura et al, 1971; Matsuyama et al, 1971; Ortega & Larralde, 1981; Weintraub et al, 1973; Zimmering et al, 1967).

El análisis de la reacción de anticuerpos anti-DNP acoplados a un soporte sólido y albúmina sérica humana dinitrofenilada, muestra una relación entre la valencia del antígeno y el máximo en gráficas de Scatchard (Celis et al, 1977).

La modificación de la molécula de anticuerpo tiene efectos sobre las características del brazo ascendente. La reducción y alquilación de los puentes disulfuro reducen aparentemente la posición de máximo (figura 5). Este efecto es paralelo a la observación de la disminución del grado de cooperatividad en la fijación de hapteno por dímeros de cadenas ligeras de una proteína de mieloma, por reducción del puente disulfuro que las une (Zidovetzki et al, 1979).

La reducción de la valencia del anticuerpo resulta en la desaparición del brazo ascendente por tres métodos diferentes: radioinmunoensayo (Weintraub et al, 1973), diálisis en equilibrio (figura 7) y apagamiento de la fluorescencia (Ortega & Larralde, 1981), mientras que las curvas de fijación con cierta proporción de anticuerpos bivalentes (figura 7) o con fragmentos bivalentes $F(ab')_2$ lo muestran claramente (Weintraub et al, 1973). (El hecho de que los fragmentos $F(ab')_2$ muestren brazos ascendentes sugiere que el fragmento F_c no está necesariamente involucrado en este fenómeno.)

Finalmente, se ha obtenido una proteína de hibridoma en ratón (clase $\gamma 3$) con especificidad anti-DNP que muestra curvas de fijación de consistentes con cooperatividad positiva (del Bosque et al, 1981; Ortega & Larralde, 1981). La fijación de DNP-lisina a esta proteína se ha estudiado por el método de apagamiento de la fluorescencia y las gráficas obtenidas son consistentes con homogeneidad entre sitios activos y muestran una constante de afinidad por el hapteno similar a la de anticuerpos inducidos. En estudios similares la proteína de hibridoma DNP- ϵ -26-82 (clase IgE) y la proteína de mieloma MOPC 315 (clase IgA), ambas de ratón y con especificidad anti-DNP, no muestran brazos ascendentes en gráficas de Scatchard (H. Metzger, comunicación personal y Ortega & Larralde, 1981).

Los datos y las observaciones mencionados anteriormente, sugieren fuertemente que existen una o varias subpoblaciones de anticuerpos que fijan hapteno y/o antígeno en forma cooperativa.

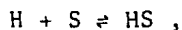
Las propiedades de estos anticuerpos referentes a que clase(s) de inmunoglobulinas pertenece(n), su concentración relativa al total de anticuerpos y su variación en distintas especies, individuos o en diversas fases de la respuesta inmune, se desconoce.

El efecto fisicoquímico de la cooperatividad en la reacción antígeno-anticuerpo es aumentar el rango y la sensibilidad de esta reacción, especialmente en concentraciones bajas de antígeno. Probablemente también contribuya a la estabilización del complejo antígeno-anticuerpo, por el aumento en la constante de afinidad del segundo sitio activo. El significado biológico de la cooperación y otros efectos posiblemente relacionados con ella, todavía está por explorarse.

APENDICE

i) Sitios Activos Idénticos e Independientes en Anticuerpos Monovalentes

La ecuación de Scatchard aplicada a la fijación de un ligando monovalente (H) a sitios activos monovalentes, idénticos y sin interacciones (S):



en el equilibrio es

$$\frac{[HS]}{[H]} = k[S_0] - k[HS]$$

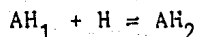
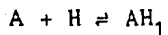
que también se puede expresar como

$$\frac{B}{H} = kS_0 - kB \quad (I)$$

donde B y H son las concentraciones molares de ligando pegado y libre respectivamente, S_0 el número total de sitios activos y k es la constante intrínseca de asociación o constante de afinidad.

ii) Sitios Activos Idénticos e Independientes en Anticuerpos Bivalentes

En el caso de que cada molécula de anticuerpo (A) tenga dos sitios activos cada uno con la misma constante de asociación intrínseca (k) las reacciones son:



y en el equilibrio

$$[AH_1] = K_1[A][H] \quad (II)$$

$$[AH_2] = K_2[AH_1][H] = K_1K_2[A][H]^2 \quad (III)$$

$$[A] = [A_0] - [AH_1] - [AH_2] \quad (IV)$$

donde $[A_0]$ es la concentración molar total de anticuerpos bivalentes y K_1 y K_2 son las constantes de afinidad experimentales de la primera y segunda reacción respectivamente. Sustituyendo las ecuaciones III y IV en II se obtiene:

$$[AH_1] = \frac{K_1[A_0][H]}{1 + K_1[H] + K_1K_2[H]^2} \quad (V)$$

$$[AH_2] = \frac{K_1K_2[A_0][H]^2}{1 + K_1[H] + K_1K_2[H]^2} \quad (VI)$$

El ligando pegado total (B_T) es:

$$B_T = AH_1 + 2AH_2 = \frac{K_1A_0H + 2K_1K_2A_0H^2}{1 + K_1H + K_1K_2H^2} \quad (VII)$$

y

$$H = \frac{-K_1(A_0 - B_T) \pm \left((K_1^2(A_0 - B_T)^2 + 4B_TK_2K_1(2A_0 - B_T)) \right)^{\frac{1}{2}}}{2K_2K_1(2A_0 - B_T)}$$

o tomando el valor positivo de la raíz de manera que $H = 0$ cuando $B_T = 0$:

$$H = \frac{B_T - A_O + \left((A_O - B_T)^2 + 4 \frac{K_2}{K_1} B_T (2A_O - B_T) \right)^{\frac{1}{2}}}{2K_2 (2A_O - B_T)} \quad (\text{VIII}).$$

De la ecuación VII se puede derivar que la relación de ligando pegado a libre es:

$$\frac{B_T}{H} = \frac{K_1 A_O (1 + 2K_2 H)}{1 + K_1 H + K_1 K_2 H^2} \quad (\text{IX})$$

y (de las ecuaciones VIII y IX) que la pendiente es:

$$\frac{d(B_T/H)}{d B_T} = \frac{d(B_T/H)}{d H} \frac{dH}{dB_T} = \frac{2K_2 - K_1 - 2K_1 K_2 H - 2K_1 K_2^2 H^2}{1 + 4K_2 H + K_1 K_2 H^2} \quad (\text{X}).$$

Cuando los sitios son idénticos y no hay interacciones Klotz (Klotz, 1953) ha demostrado que K_1 y K_2 están relacionadas a k y entre si de la manera siguiente:

$$K_i = \frac{n - i + 1}{i} k \quad (\text{XI})$$

donde n es el número total de sitios activos por molécula de proteína e i es el número de sitios ocupados por molécula en la i -ésima reacción. En el caso de anticuerpos monoméricos $n = 2$ e $i = 1$ o $i = 2$ y por lo tanto:

$$K_2/K_1 = 0.25 \quad (\text{XII})$$

si los sitios activos son idénticos e independientes. En tal caso las ecuaciones VIII y IX resultan en:

$$H = \frac{B_T}{2K_2(2A_0 - B_T)} \quad (\text{XIII})$$

y

$$\frac{B_T}{H} = \frac{4K_2A_0}{1 + 2K_2H} \quad (\text{XIV}).$$

De estas ecuaciones se puede obtener:

$$\frac{B_T}{H} = K_1A_0 - 2K_2B_T \quad (\text{XV}),$$

una relación lineal entre B_T/H y B_T con un intercepto en el eje de las ordenadas igual al producto K_1A_0 , un intercepto en el eje de las abscisas igual a $2A_0$ y una pendiente igual a $-2K_2$ (Figura 8).

iii) Sitios Activos Idénticos con Interacción en Anticuerpos Bivalentes

La figura 8 muestra lo que ocurre a gráficas de Scatchard cuando los sitios activos son idénticos pero no independientes: interacciones positivas cuando $K_2 > K_1/4$ e interacciones negativas cuando $K_2 < K_1/4$. En ambos casos la gráfica lineal se curva; hacia abajo con interacciones negativas (cooperatividad negativa) y hacia arriba con interacciones positivas (cooperatividad positiva). Sin embargo los interceptos no se alteran por las interacciones como muestran las gráficas en

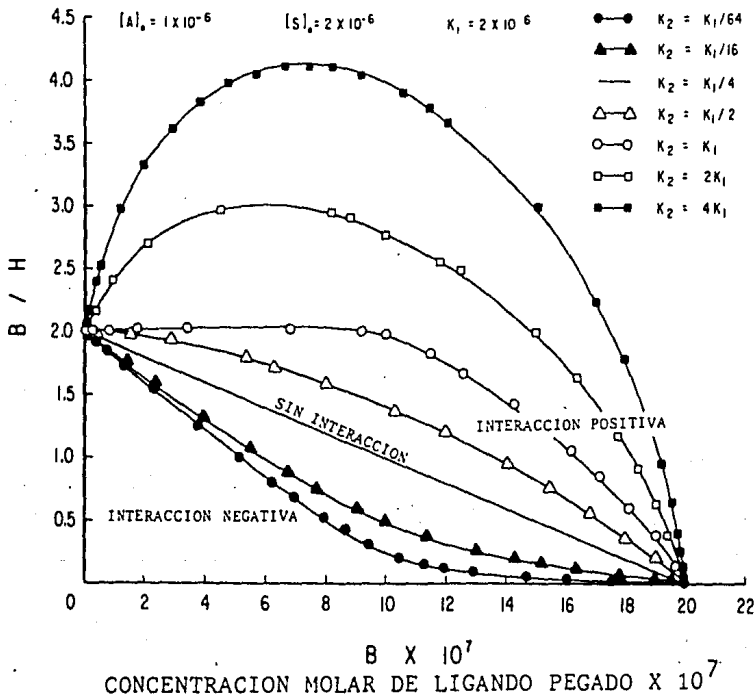


Figura 8

Gráficas de Scatchard de reacciones simuladas entre anticuerpos bivalentes homogéneos y ligando monovalente con distinto grado de interacción entre sitios activos: interacciones positivas ($K_2 > K_1/4$), sin interacciones ($K_2 = K_1/4$) e interacciones negativas ($K_2 < K_1/4$). Las gráficas se construyeron asignando valores arbitrarios a H y calculando B_T/H y B_T con las ecuaciones VIII y IX. Las interacciones positivas curvan las gráficas hacia arriba y las interacciones negativas hacia abajo; la fijación por sitios independientes resulta en una recta. Nótese que los interceptos ($K_1 A_0$ para las ordenadas y $2A_0$ para las abscisas) no se alteran por las interacciones.

la figura 8 y como se puede deducir de la ecuación IX:

$$\begin{aligned} \left(\frac{B_T}{H}\right) &\longrightarrow A_0 K_1 & (XVI) \\ H &\longrightarrow 0 \\ B_T &\longrightarrow 0 \end{aligned}$$

y de la ecuación VIII, considerando que:

$$\begin{aligned} \left(\frac{B_T}{H}\right) &\longrightarrow 0 \\ H &\longrightarrow \infty \\ B_T &\longrightarrow 2A_0 \end{aligned}$$

Para anticuerpos bivalentes la condición para obtener un máximo en gráficas de Scatchard es que $K_2 > K_1/2$. Esto se deduce a partir de la ecuación X cuando:

$$\frac{d B_T/H}{d B_T} = 0$$

se obtiene que:

$$H = \frac{-K_1 + ((4K_1K_2 - K_1^2))^{1/2}}{2K_1K_2} \quad (XVII)$$

y

$$K_2 \geq K_1/2 \quad (XVIII),$$

para que H tenga valores positivos.

Sustituyendo la ecuación XVII en las ecuaciones VII y IX, las coordenadas del máximo son:

$$Y = \left(\frac{B_T}{H}\right)_{\max} = \frac{2A_0 K_2 ((4K_1 K_2 - K_1^2))^{\frac{1}{2}}}{4K_2 - K_1} \quad (\text{XIX})$$

$$X = (B_T)_{\max} = A_0 \left(1 - \frac{((4K_1 K_2 - K_1^2))^{\frac{1}{2}}}{4K_2 - K_1}\right) \quad (\text{XX})$$

En gráficas de Scatchard que presentan un máximo se pueden obtener estimados de K_1 y K_2 a partir de la ecuación XIX:

$$K_2 = \frac{Y^2 + ((Y^2(Y^2 - A_0^2 K_1^2)))^{\frac{1}{2}}}{2A_0^2 K_1} \quad (\text{XXI})$$

$$K_1 = \frac{4Y^2 K_2}{4A_0^2 K_2^2 + Y^2}$$

la ecuación XX:

$$K_2 = \frac{K_1}{4} \left(\left(\frac{A_0^2}{(A_0 - X)^2} \right) + 1 \right) \quad (\text{XXII})$$

$$K_1 = \frac{(A_0 - X)^2 4K_2}{A_0^2 + (A_0^2 - X)^2}$$

y las ecuaciones XIX y XX:

$$K_2 = \frac{Y}{2(A_0 - X)} \quad (\text{XXIII})$$

$$K_1 = 4K_2 - \frac{2K_2 X + Y}{2A_0 K_2}$$

K_2 también se puede estimar de la pendiente de la curva en el intercepto con el eje de las abscisas, K_1 del intercepto con el eje de las ordenadas y la relación K_2/K_1 del intercepto con las ordenadas y $(B_T/H)_{\max}$:

$$N = \frac{(B_T/H)_{B_T} \rightarrow 0}{(B_T/H)_{\max}} \quad \text{ó} \quad N = \frac{K_1 A_0}{Y}$$

o de la ecuación XIX:

$$\frac{K_2}{K_1} = \frac{1 + ((1 - N^2))^{\frac{1}{2}}}{(2N)^2} \quad (\text{XXIV}).$$

iv) Sitios Heterogéneos con Interacción en Anticuerpos Bivalentes

Cuando las poblaciones de anticuerpos contra un determinante antigénico son heterogéneas en cuanto a sus afinidades intrínsecas (k_1, k_2, \dots, k_n), sus concentraciones ($A_{0,1}, A_{0,2}, \dots, A_{0,n}$) y en la magnitud del efecto cooperativo entre sitios en cada subpoblación de anticuerpos:

$$\frac{B_T}{H} = \sum_{i=1}^n \frac{K_{1i} A_{oi} (1 + 2K_{2i} H)}{1 + K_{1i} H + K_{1i} K_{2i} H^2} \quad (\text{XXV})$$

y su pendiente:

$$\frac{d(B_T/H)}{d(B_T)} = \sum_{i=1}^n \frac{2K_{2i} - K_{1i} - 2K_{1i}K_{2i}H - 2K_{1i}K_{2i}^2H^2}{1 + 4K_{2i}H + K_{1i}K_{2i}H^2} \quad (\text{XXVI}).$$

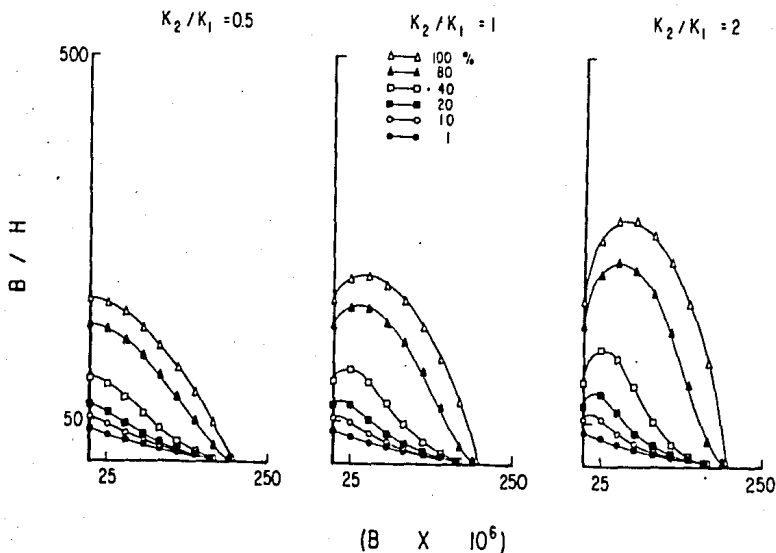
De las ecuaciones XXV y XXVI se puede deducir que en el intercepto en el eje de las ordenadas conforme $H \rightarrow 0$ y $B_T \rightarrow 0$:

$$\frac{B_T}{H} \rightarrow \sum_{i=1}^n K_{1i} A_{oi} \quad (\text{XXVII})$$

y en el intercepto en el eje de las abscisas cuando $H \rightarrow \infty$:

$$\frac{d(B_T/H)}{d(B_T)} \rightarrow \sum_{i=1}^n -2K_{2i} \quad (\text{XXVIII}).$$

No es posible estimar todas las constantes individuales, ni siquiera un valor promedio, pero se puede demostrar gráficamente que, aún en sistemas heterogéneos, hay brazos ascendentes en gráficas de Scatchard si hay cooperatividad positiva en por lo menos una subpoblación de anticuerpos (Figura 9).



CONCENTRACION MOLAR DE LIGANDO PEGADO X 10⁶

Figura 9

Gráficas de Scatchard de reacciones simuladas entre cinco poblaciones de anticuerpos bivalentes y ligando monovalente. Las diferentes poblaciones de anticuerpo varían en sus constantes de asociación intrínseca, el grado de cooperación y en la concentración relativa de la población que muestra cooperación (1 a 100%). Nótese que el intercepto en las ordenadas y la altura y posición del brazo ascendente varían conforme la proporción de anticuerpos cooperativos y el grado de cooperatividad aumenta. Por lo tanto en poblaciones heterogéneas de anticuerpos, aunque el brazo ascendente es indicativo de cooperatividad, los estimados de K_2 no son confiables si la concentración relativa de anticuerpos que son cooperativos respecto a la concentración total no se conoce. Nótese también que en algunos casos la ausencia de un brazo ascendente no elimina la posibilidad de interacciones positivas en poblaciones heterogéneas de anticuerpos.

En el modelo teórico la altura del máximo y su posición en el eje de las abscisas (B) es una función de la proporción de las moléculas de anticuerpo que muestran cooperatividad y la magnitud del efecto cooperativo; entre más pequeños sean la proporción de moléculas y el efecto cooperativo que presenten, menores serán las coordenadas del máximo. La figura 9 también muestra que, aún en presencia de interacciones positivas, es posible obtener en gráficas de Scatchard curvas con pendientes negativas en todos los puntos. Esto puede ocurrir tanto en sistemas con sitios activos homogéneos o heterogéneos. La condición para que ocurra en sistemas homogéneos es:

$$\frac{K_1}{4} < K_2 < \frac{K_1}{2} \quad (\text{XXIX}).$$

La ocurrencia de este fenómeno en sistemas heterogéneos se debe a una interrelación compleja de varios factores entre los cuales por lo menos están: el número de subpoblaciones de anticuerpos en el sistema, la distribución de sus constantes de afinidad respectivas, la proporción y afinidad de las moléculas de anticuerpo que muestren cooperatividad y la magnitud del efecto cooperativo.

Nota: Gäbler et al (1976) han revisado un gran número de modelos teóricos de fijación cooperativa. Modelos similares o relacionados al presentado en este apéndice, así como algunos de los problemas principales en la detección, identificación y medición de cooperatividad se pueden encontrar en la siguiente selección de referencias:

Carayon & Carella (1974); Celis et al (1977); Dahlquist (1974); De Lisi (1978); De Lisi & Thakur (1978); Fletcher & Spector (1977); Gäbler (1977); José & Larralde (1982); Koshland & Neet (1968); Parsons & Vallner (1978); Rodbard & Bertino (1973); Scatchard (1949); Schwarz (1976); Thakur & Rodbard (1979); y Weber (1975).

REFERENCIAS

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Ashman, R.A. & Metzger, H. (1969) A Waldenström macroglobulin which binds nitrophenyl ligands. *J. Biol. Chem.* 244: 3405-3414.
- Blanden, R.V., Gill, D.B.E.C., Zidovetzki, R. & Pecht, I. (1980) Cooperativity in antigen binding as a potential element in T_C cell recognition. *Mol. Immunol* 17:893-896.
- Campbell, D.H., Garvey, J.S., Cremer, N.E. & Sussdorf, D.H. (1970) *Methods in immunology*, 2nd ed., pp. 189-191. W.A. Benjamin Inc., New York.
- Carayon, P. & Carella, C. (1974) Evidence for positive cooperativity in antigen-antibody reactions. *FEBS Letters* 40: 13-17.
- Celis, E., Ridaaura, R. & Larralde, C. (1977) Effects of the extent of DNP substitution on the apparent affinity constant and cooperation between sites in the reactions of dinitrophenylated human serum albumin with anti-DNP and anti-HSA antibodies coupled to agarose. *Immunochemistry* 14:553-559.
- Dahlquist, F.W. (1974) The quantitative interpretation of maximum in Scatchard plots. *FEBS Letters* 49:267-268.
- del Bosque, J., Ortega, E., Ortiz-Ortiz, L. & Larralde, C. (1981) Hybridoma producing immunoglobulins that cooperatively bind DNP. *Cuarto Congreso Nacional de Inmunología, Oaxtepec Mor. Resumen No.20.*
- De Lisi, C. (1978) Characterization of receptor affinity heterogeneity by Scatchard plots. *Biopolymers* 17:1385-1386.
- De Lisi, C. & Thakur, A.K. (1978) An analysis of the limits of resolution of binding experiments as assays for affinity heterogeneity. *Immunochemistry* 15:389-391.
- Eisen, H.N., Belman, S. & Carsten, M.E. (1953) The reaction of 2,4-dinitrobenzenesulfonic acid with free amino groups of proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 75:4583-4585.
- Fewtrell, C., Geier, M., Goetze, A., Holowka, D., Isenman, D.E., Jones, J.F., Metzger, H., Navia, M., Sieckmann, D., Silverton, E. & Stein, K. (1979) Mediation of effector functions by antibodies: report of a workshop. *Mol. Immunol.* 16:741-754.

Fletcher, J.E. & Spector, A.A. (1977) Alternative models for the analysis of drug-protein binding. *Mol. Pharmacol.* 13:387-399.

Gäbler, E. Franke, R. & Oehme, P. (1976) Theoretische Modelle der Protein-Ligand-Bindung. Beiträge zur Wirkstoffforschung, Heft 2, Institut für Wirkstoffforschung, Berlin (DDR).

Gäbler, E. (1977) Cooperativity concepts in protein binding models - problems of cooperativity detection, identification and measuring. *Pharmazie* 32:739-747.

Grote, G., Koethe, S. & Winkelhake, J.L. (1982) Relationships between monoclonal antibody affinity and Fc structure(s) in formation and stability of immune complexes. *Fed. Proc.* 41:288.

Hoffmann, L.G. (1976) Antibodies as allosteric proteins. I, II & III. *Immunochemistry* 13:725-742.

Hudson, L. & Hay, F.C. (1976) *Practical immunology*, pp.183-184. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

José, M.V. & Larralde, C. (1982) Alternative interpretation of unusual Scatchard plots: contribution of interactions and heterogeneity. *Math. Biosci.* (en prensa).

Karush, F. (1959) Properties of papain digested purified antihapten antibody. *Fed. Proc.* 18:577.

Kelly, K.A., Schon, A.H. & Froese, A. (1971) Kinetic studies on antibody-hapten reactions-I. Reactions with antibodies and their univalent Fab' fragments. *Immunochemistry* 8:613-625.

Klein, M., Kortan, C., Kells, D.I.C. & Dorrington, K.J. (1979) Equilibrium and kinetic aspects of the interaction of isolated variable and constant domains of light chain with the Fd' fragment of immunoglobulin G. *Biochemistry* 18:1473-1481.

Klotz, I.M. (1953) Protein interactions. In "The Proteins" (Neurath, H. & Bailey, K., eds.), Vol. I, pp. 727-806. Academic Press, New York.

Koshland, D.E.Jr., & Neet, K.E. (1968) The catalytic and regulatory properties of enzymes. *Ann. Rev. Biochem.* 37:359-410.

Lancet, D., Licht, A., Schechter, I. & Pecht, I. (1977) Hapten-induced allosteric transition in the light chain dimer of an immunoglobulin. *Nature* 269:827-829.

Lancet, D. & Pecht, I. (1976) Kinetic evidence for haptens induced conformational transition in immunoglobulin MOPC 460. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73:3549-3553.

Liberti, P.A., Bausch, D.M. & Schoenberg, L.M. (1982) On the mechanism of C1q binding to antibody- I. Aggregation and/or distortion of IgG vs combining site-transmitted effects. Mol. Immunol. 19:143-149.

Matsukura, S., West, C.D., Ichikawa, Y., Jubiz, W., Harada, G. & Tyler, F. (1971) A new phenomenon of usefulness in the radioimmunoassay of plasma adrenocorticotrophic hormone. J. Lab. Clin. Med. 77:490-500.

Matsuyama, H., Ruhmann-Wennhold, A. & Nelson, D.H. (1971) Radioimmunoassay of plasma ACTH in intact rats. Endocrinology 88:692-695.

Metzger, H. (1974) Effect of antigen binding on the properties of antibody. Adv. Immunol. 18:169-207.

Metzger, H. (1978) The effect of antigen on antibodies: recent studies. Contemp. Top. Mol. Immunol. 7:119-152.

Nisonoff, A., Wissler, F.C., Lipman, L.N. & Woernley, D.L. (1960) Separation of univalent fragments from the bivalent antibody molecule by reduction of disulfide bonds. Arch. Biochem. Biophys. 89:230-244.

Nisonoff, A., Hopper, J.E. & Spring, S.B. (1975) The antibody molecule. Academic Press, New York.

Ortega, E. & Larralde, C. (1981) Cooperativity in the reaction of polyclonal and monoclonal anti-DNP antibodies with DNP-lisine. Cuarto Congreso Nacional de Inmunología, Oaxtepec, Mor. Resúmen No. 19.

Parsons, D.L. & Vallner J.J. (1978) Theoretical models for cooperative binding. I, II & III. Math. Biosci. 41:189-240.

Rodbard, D. & Bertino, R.E. (1973) Theory of radioimmunoassays and hormone-receptor interactions - II. Simulation of antibody divalency, cooperativity and allosteric effects. Adv. Exp. Med. Biol. 36:327-341.

Scatchard, G. (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions. Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660-672.

Schlessinger, J., Steinberg, I.Z., Givol, D., Hochman, I. & Pecht, I. (1975) Antigen-induced conformational changes in antibodies and their Fab fragments studied by circular polarization fluorescence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:2775-2779.

Schwarz, G. (1976) Some general aspects regarding the interpretation of binding data by means of a Scatchard plot. *Biophys. Struct. Mechanism.* 1:1-12.

Skubitz, K.M., O'Hara, D.S. & Smith, T.W. (1977) Antibody-hapten reaction kinetics: a comparison of hapten interactions with IgG and Fab preparations. *J. Immunol.* 118:1971-1976.

Thakur, A.K. & Rodbard, D. (1979) Graphical aids to interpretation of Scatchard plots and dose-response curves. *J. Theor. Biol.* 80:383-403.

Thakur, A.K., Jaffe, M.L. & Rodbard, D. (1980) Graphical analysis of ligand-binding systems: evaluation by Monte-Carlo studies. *Anal. Biochem.* 107:279-295.

Tosi, R., Tanigaki, N., Sorrentino, R., Accolla, R. & Corte, G. (1981) Binding of one monoclonal antibody to human Ia molecules can be enhanced by a second monoclonal antibody. *Eur. J. Immunol.* 11:721-726.

Velick, S.F., Parker, C.W. & Eisen, H.N. (1960) Excitation energy transfer and the quantitative study of the antibody hapten reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 46:1470-1482.

Weber, G. (1975) Energetics of ligand binding to proteins. *Adv. Prot. Chem.* 29:1-83.

Weintraub, B.D., Rosen, S.W., McCammon, J.A. & Perlman R.L. (1973) Apparent cooperativity in radioimmunoassay of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology* 92:1250-1255.

Zav'yalov, V.P., Abramov, V.M., Skvortzov, V.G. & Troitsky, G.V. (1977) Conformational transitions of antibodies induced by hapten binding. *Biochim. Biophys. Acta* 493:359-366.

Zidovetzki, R., Licht, A. & Pecht, I. (1979) Effect of interchain disulfide bond on hapten binding properties of light chain dimer of protein 315. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5848-5852.

Zidovetzki, R., Blatt, Y., Glaudemans, C.P.J., Manjula, B.N. & Pecht, I. (1980) A common mechanism of hapten binding to immunoglobulins and their heterologous recombinants. *Biochemistry* 19:2790-2795.

Zidovetzki, R., Licht, A. & Pecht, I. (1981) Positive cooperativity in the hapten binding by the V_L dimer of protein 315. *Mol. Immunol.* 18:491-497.

Zimmering, P.E., Lieberman, S. & Erlanger, B.F. (1967)
Binding of steroids to steroid specific antibodies.
Biochemistry 6:154-164.