

4. PART II

El receptor de complement 2 (CR2, CD21)

El virus de l'Epstein Barr

4.1 Introducció

4.1.1 EBV: característiques generals i estructura

El primer en descobrir i estudiar el virus de l'EBV va ser el metge missioner Denis Burkitt, mentre treballava a l'est de l'Àfrica als voltants de 1950. Burkitt va reconèixer i descriure les característiques clíniques i epidemiològiques d'un tumor infantil nou, conegut actualment per la limfoma de Burkitt, que ell va trobar rarament comú i endèmic a l'Àfrica equatorial. Burkitt va postular que el causant d'aquesta malaltia havia de ser un agent infecciós. El doctor Epstein i la seva estudianta Barr a Londres van establir una sèrie línies cel·lulars derivades d'aquests tumors, i en examinar-les al microscopi electrònic van observar que una part de les cèl·lules contenien partícules virals similars als herpesvirus. Aquestes partícules eren diferents biològicament i antigènicament a altres membres de la família dels herpesvirus. Aquest va ser el primer cop en què un virus s'associava amb el desenvolupament de tumors en humans.

Estudis de seroepidemiologia van demostrar que el virus de l'EBV era present en tota la població humana, i la gran majoria d'adults tenien anticossos contra el virus. Com en el cas dels HSV, existeixen dos tipus d'EBV, EBV-1 i EBV-2, que es diferencien en pocs gens. Els limfocriptovirus s'han aïllat només en primats i humans. EBV només infecta a humans.

La primera infecció per el virus es produeix en molts casos en els tres primers anys de vida, i generalment és asimptomàtica, en moltes poblacions humanes. En alguns casos, però, i sobretot en la societat occidental, la infecció primària es retarda fins als vint anys o més endavant, causant la malaltia de la mononucleosi infecciosa, altrament anomenada la malaltia del petó, perquè es transmet amb la saliva. Aquesta malaltia provoca mal de caps, febres altes, faringitis, limfadenopatia, i inflamació dels nòduls limfàtics, però la majoria dels pacients immunocompetents s'en recuperen. El virus infecta primer les cèl·lules epitelials de la faringe, i després s'estén a les cèl·lules B circulants, on hi estableix latència. En pacients immunodeficients el virus pot causar una malaltia de limfoproliferaçió policlonal de cèl·lules B en humans, i s'ha associat amb

limfomes de cèl·lules B, com la limfoma de Burkitt, la malaltia de Hodgkin, i limfomes de cèl·lules T.

L'estructura del virió és com els altres herpesvirus. Consisteix, doncs de dins a enfora, en un DNA lineal i de doble cadena, de 172 kpb, compostat en un 60% de guanidina i citosina, dins d'un centre proteínic, rodejat d'una nucleocàpside, un tegument, i la membrana lipídica, amb glicoproteïnes associades. Aquestes no han estat tant estudiades com en el cas dels HSV. EBV es diferencia de l'HSV en la presència de glicoproteïnes de membrana. Es coneix que existeix una glicoproteïna de membrana predominant, l'anomenada gp350/220. S'ha observat la presència d'altres glicoproteïnes, com les gp55/80, gp42, i gp85 i gp110. Les dues darreres són homòlogues a les glicoproteïnes H (gH) i B (gB), de l'HSV, respectivament.

4.1.2 Entrada de l'EBV a la cèl·lula

Els tipus cel·lulars que s'han descrit susceptibles a la infecció per EBV són els limfòcits B, les cèl·lules epitelials de la faringe, i els limfòcits T. Tot i que sembla ser que existeixen diferents receptors per a l'EBV, fins ara, un sol receptor ha estat caracteritzat. Aquest és el receptor de complement CR2 (CD21), del qual parlarem detalladament més endavant en aquesta introducció; l'expressió de CR2 es correlaciona amb el tropisme del virus (Einhorn et al., 1978; Jondal et al., 1976; Sixbey et al., 1987). A més a més, anticossos monoclonals contra CR2 inhibeixen l'adsorció del virus (Fingerth et al., 1984; Nemerow et al., 1985). CR2 purificat s'uneix a EBV, i l'expressió del receptor en cèl·lules no permissives les fa susceptibles a la infecció.

La glicoproteïna viral que interactua amb CR2 és gp350/220 (Nemerow et al., 1987); gp350/220 purificada de cèl·lules infectades amb EBV o recombinant s'uneix a CR2, i inhibeix l'entrada del virus a cèl·lules susceptibles d'ésser-ne infectades (Nemerow et al., 1987; Nemerow et al., 1986; Tanner et al., 1988). Totes aquestes dades indiquen que la interacció gp350/220- CR2 és essencial per a l'adsorció del virus a les cèl·lules.

En les cèl·lules B, els complexos d'histocompatibilitat (HLA) de la classe II, concretament HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DQ serveixen com a co-receptors, als quals s'uneix la glicoproteïna viral gp42 (Haan and Longnecker, 2000). Aleshores, es creu que ambdues gp350 i gH participen en la fusió de la membrana viral amb la membrana cel·lular (Molesworth et al., 2000; Tanner et al., 1988).

Altres receptors cel·lulars podrien estar implicats en l'entrada de l'EBV a les cèl·lules. Per exemple, s'ha descrit la presència d'un receptor fenotípicament diferent de CR2, que és utilitzat per el virus per unir-se i infectar limfòcits T (Hedrick et al., 1992). Aquest receptor no ha estat encara clonat.

4.1.3 El sistema de complement

El sistema de complement és un grup complex de proteïnes i glicoproteïnes que plegades, juguen un paper molt important en la defensa de l'organisme contra les infeccions (Lambris et al., 1999; Song et al., 2000). El complement constitueix una part important de la resposta innata, i a més, funciona junt amb la resposta immunològica adquirida servint com al principal mediador de les conseqüències de la interacció entre antigen i anticòs. La presència de patògens forans o complexos immunes inicia una cascada enzimàtica complexa en la qual cada component de complement s'uneix i n'activa un altre seqüencialment. Durant aquesta sèrie d'activacions els diferents components inicien diferents processos biològics, dels quals cal destacar la inflamació i la fagocitosi. El resultat final d'aquests esdeveniments mediat per complement és la lisi directa de les cèl·lules diana i microorganismes com a conseqüència de lesions en les membranes d'aquests. Al mateix temps, el complement participa en el desenvolupament de la resposta adaptiva en contra d'aquests patògens.

Fins ara s'han identificat unes 30 proteïnes de complement, i deficiències en alguna d'aquestes han estat associades freqüentment amb una disminució de l'habilitat d'eliminar complexos immunològics de la circulació o lluitar contra les infeccions. Aquesta associació entre deficiències de complement i malalties emfatitza el paper fisiològic tan important del sistema de complement (Lambris et al., 1999; Sahu and

Lambris, 2000). De fet, estudis del complement al llarg de l'evolució indiquen que els deuterostomes invertebrats ja el posseeixen. A més el sistema de complement està altament conservat al llarg de l'escala evolutiva, la qual cosa indica la importància d'aquest sistema de defensa contra la invasió forània (Nonaka, 2000; Smith et al., 1999; Sunyer et al., 1998; Sunyer et al., 1996).

La proteïna C3

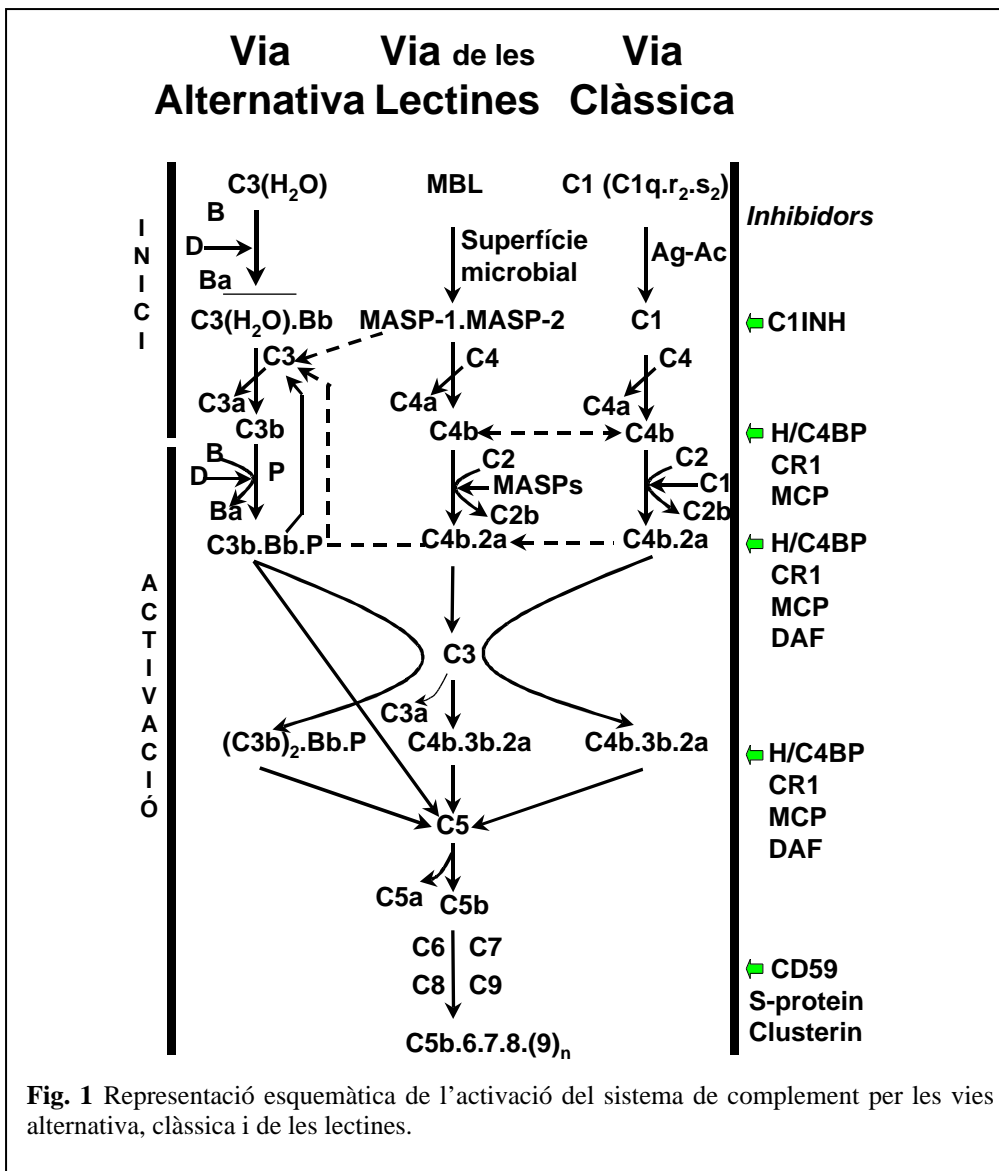
Entre les proteïnes del sistema de complement, C3, és probablement una de les molècules més versàtils i multifuncionals conegudes (Lambris et al., 1999; Sahu et al., 1998). Aquesta proteïna interactua amb, com a mínim, 20 proteïnes diferents. C3 és la proteïna de complement més abundant en sèrum (1-2 mg/ml). Està composta d'una cadena de 115 kDa, unida a través d'un enllaç disulfur i forces no covalents a una cadena , de 75 kDa. En humans, l'estructura primària deduida de la seva seqüència de cDNA (de Bruijn and Fey, 1985), consisteix en 1663 aminoàcids, inclosos 22 aminoàcids que formen el pèptid senyal. L'anàlisi dels carbohidrats d'aquesta molècula ha revelat que C3 conté dos llocs de N-glicosilació, als residus 63 de la cadena i 917 a la cadena , que junts n'incrementen el pes molecular un 1.5 % (Hirani et al., 1986).

Una característica important de C3 és la seva habilitat d'unir-se covalentment a molècules acceptores a la superfície de les cèl·lules, amb un enllaç èster o amida (Law and Dodds, 1990; Levine and Dodds, 1990). En molts sistemes biològics, C3b està unit amb un enllaç éster, la qual cosa indica una preferència per a les molècules hidroxilades (Law et al., 1979; Sahu et al., 1994). Aquesta habilitat ha estat atribuïda a la presència d'un enllaç tioéster present a la regió de C3d de C3, que és susceptible de ser atacat nucleofilicament (Law and Dodds, 1997). L'enllaç tioéster és el producte d'una transacilació entre el grup tiol del residu Cys⁹⁸⁸ i el grup amida de la Gln⁹⁹¹ (Law and Dodds, 1990; Law and Dodds, 1997). En C3 el grup tioéster sembla estar protegit dins d'una butxaca hidrofòbica, i s'exposa quan C3 és digerit per les convertases a C3b. Aleshores aquest enllaç pot participar en una reacció de transacilació amb grups nucleofílics dels carbohidrats de la superfície cel·lular o complexes immunes. La vida mitja del grup tioester és, però, molt curta, de 100µs (Levine and Dodds, 1990).

La deposició de C3b a les superfícies és necessària per iniciar la formació del complex d'atac de membrana (membrane attack complex, MAC), i la fagocitosi i l'increment del contacte entre cèl·lules efectores i partícules foranies (Lambris et al., 1999).

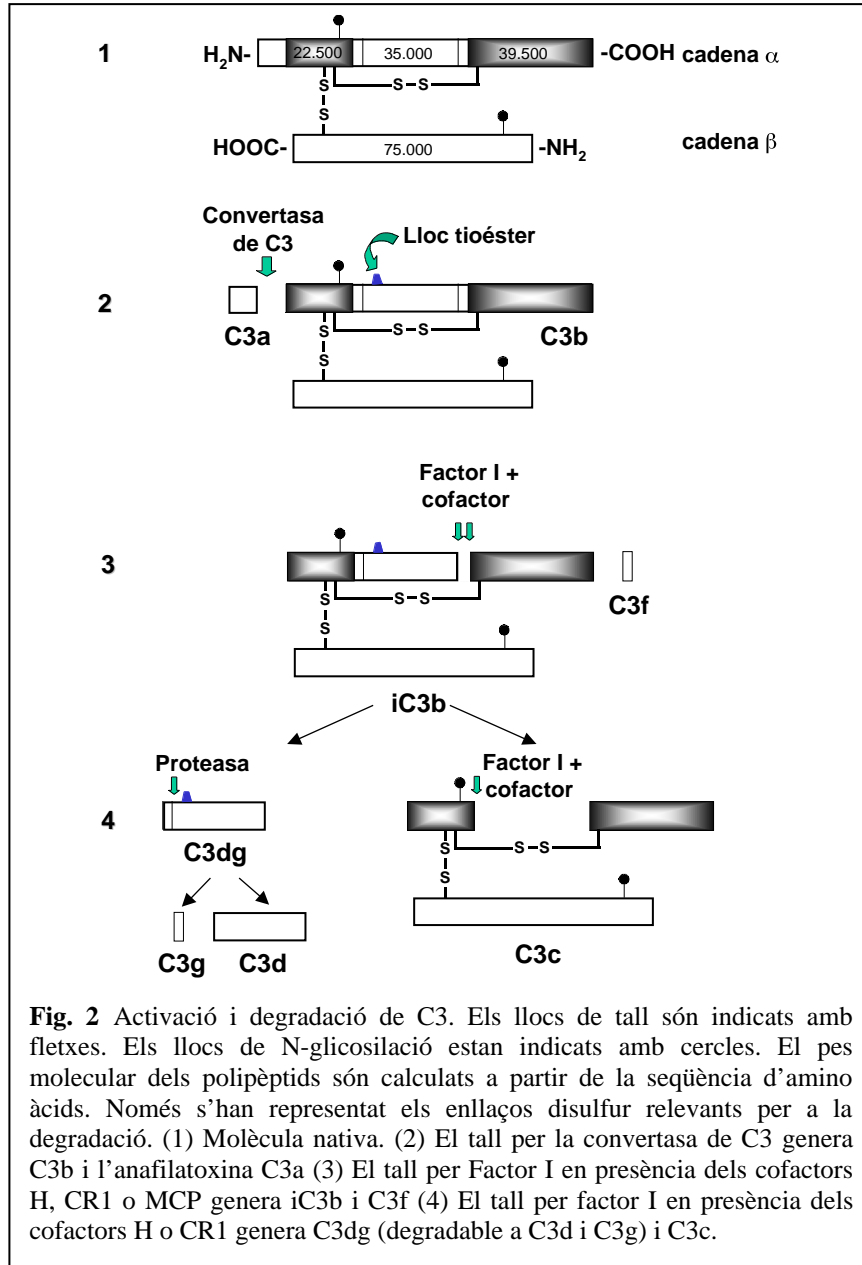
Activació i degradació de C3

L'activació del sistema de complement per les vies clàssica, alternativa o de lectina (detallades en la Fig. 1) resulta en el tall de C3 als residus 726-727 (Arg-Ser), i la generació de C3b (180 Kda) i C3a (9Kda). Aquest tall exposa el grup tioéster en C3b, que és important per la unió covalent de C3 amb un amb les superfícies que l'activen (Sahu et al., 1994). El canvi conformacional induït per el tall en C3 capacita a C3b per unir-se a diferents components del sistema de complement, com els factors B, I, i H, C5, Properdina (P), CR1 (receptor de C3b) i la proteïna cofactor de membrana (membrane cofactor protein, MCP) (Lambris, 1988). La unió d'aquestes proteïnes a C3 resulta en l'amplificació de la convertasa de C3 (per B i P en presència del factor D) i la formació del complex d'atac de membrana (membrane attack complex, MAC), o en la inactivació (per factor I, junt amb els cofactors H, CR1, MCP) depenent de la naturalesa de la superfície a la qual C3b s'uneix (Davis et al., 1984).



L'activació de complement és inhibida mitjançant la inactivació de C3b per el factor I. Aquesta succeeix en tres etapes, i requereix la participació d'un dels diversos cofactors (MCP, CR1 o H) (Lambris, 1988). El tall de la cadena ' de C3b entre els residus 1281-1282 (Arg-Ser) (Figura 2), i posteriorment entre els residus 1298-1299 (Arg-Ser) de C3 allibera el fragment C3f (2 Kda) i iC3b (Davis and Harrison, 1982; Medicus et al., 1983; Ross et al., 1982). Un tercer lloc de tall per factor I als residus 932-933 (Arg-Glu), amb CR1 i factor H com a cofactors, genera els fragments C3c i C3dg (Medicus et al., 1983; Medof et al., 1982; Ross et al., 1982). Els fragments de C3 generats durant l'activació del sistema de complement (detallat en la Figura 2) interaccionen amb diferents receptors de la superfície cel·lular (CR1, CR2, CR3, CR4,

CR5, C3aR) induint diferents respostes biològiques com el processament de complexos immunològics, la fagocitosi, l'adhesió dels neutròfils, la quimotaxis, la inducció d'una resposta adaptativa, etc.. (Lambris et al., 1999).



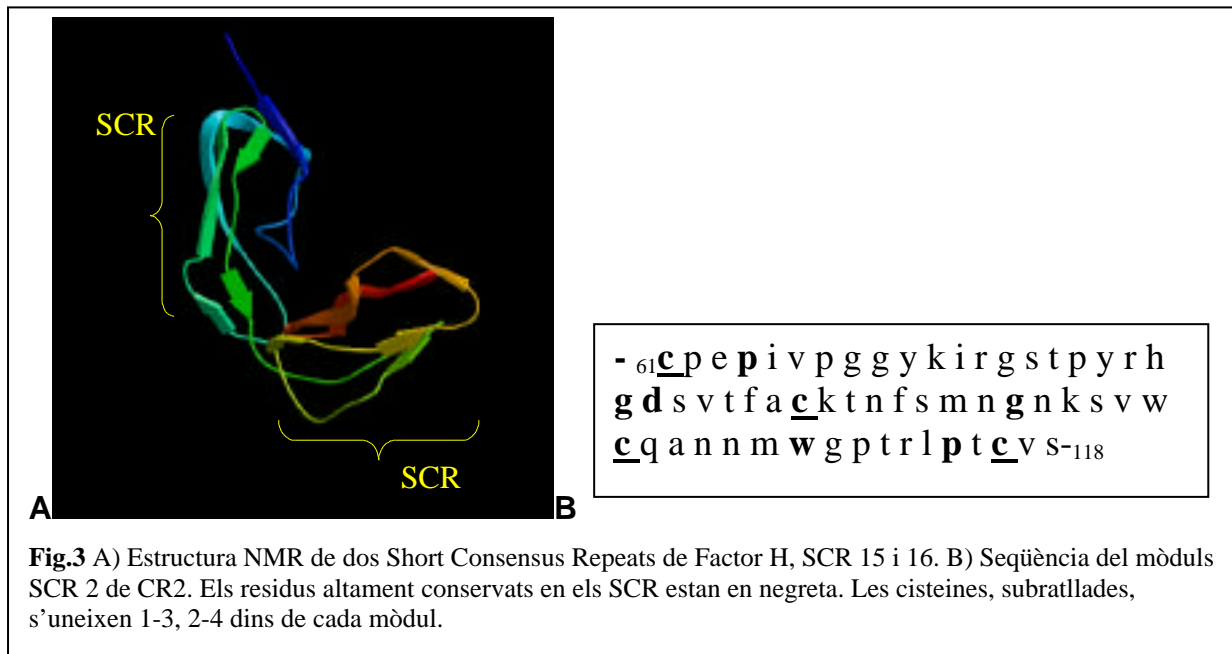
4.1.4 El receptor cel·lular CR2

La identificació d'un receptor en limfòcits, específic per al fragment de complement C3d va ser fruit del treball de tres grups que treballaven independentment

l'any 1973 (Eden et al., 1973; Okada and Nishioka, 1973; Ross et al., 1973) . Aquest receptor es va definir per la seva habilitat funcional de formar rosetes amb eritròcits que tenien C3d a la seva superfície. Deu anys després, Iida et al. purificaven per primer cop el receptor d'extractes cel·lulars, identificant-lo amb l'ajut d'anticossos monoclonals, i assaigs funcionals (Iida et al., 1983). Des de llavors, s'han dut a terme nombrosos estudis per caracteritzar aquest important receptor (Carroll, 1998; Fearon and Carter, 1995; Nemerow et al., 1990)

CR2 és una glicoproteïna transmembrana de 140 Kda de tipus I, que s'expressa en limfòcits Bs madurs i Pre-limfòcits B, línies cel·lulars B, algunes línies cel·lulars T, cèl·lules T, i cèl·lules fol·liculars dendrítiques (Nemerow et al., 1990). Existeix evidència que aquest receptor també s'expressa en cèl·lules epitelials (Sixbey et al., 1987).

El receptor té una cua citoplasmàtica de 34 amino àcids, amb 4 tirosines, 4 serines i dos treonines, les quals són llocs potencials de fosforilació per kinases intracel·lulars. La regió transmembrana conté 24 residus. El domini extracel·lular conté 11 llocs de N-glicosilació i està compost per 15 o 16 short consensus repeats (SCR), o complement control mòduls (CCP), cadascun dels quals conté 60-75 amino àcids. Aquests mòduls tenen un 25-35 % d'identitat entre ells: contenen una sèrie de residus altament conservats, entre ells, quatre cisteïnes que formen enllaços C1-C3 i C2-C4 dins de cada domini (Fig 3). Estudis hidrodinàmics i de microscòpia electrònica amb CR2 recombinant soluble, demostren que és una molècula estesa i molt flexible, amb una llargada de 386 ± 35 Å, on els SCR es distribueixen adjacents (Moore et al., 1989). Diferents proteïnes que s'uneixen a C3 i C4 contenen SCRs, com CR1, factor H, C4bp, DAF, MCP, C2, i factor B (Hourcade et al., 1989). Per tant, aquestes proteïnes mantenen certa homologia de seqüència i molta homologia estructural. L'estructura terciària de SCR de diferents proteïnes ha estat resolta; a la figura 3 demostrem l'estructura dels SCR 15 i 16 del factor H (Barlow et al., 1993).



Els gens que codifiquen CR1, CR2, C4bp, DAF i factor H estan lligats en el genoma, formant el que s'ha anomenat el cluster RCA (regulador de l'activació de complement), en el cromosoma 1. Aquesta unió genètica suggereix que totes aquestes proteïnes tenen un origen evolutiu comú (Rodríguez de Cordoba et al., 1985).

Cal mencionar que diferents virus expressen proteïnes que contenen SCRs, encarregades de controlar l'atac del sistema de complement, com les proteïnes virals VCP (vaccinia Virus), HVS CCPH (Herpes Virus Saimiri), entre d'altres (Alcami and Koszinowski, 2000; Cooper, 1991; Doherty et al., 1994; Sahu et al., 1998). Malgrat tot, l'estructura dels SCR no és exclusiva del sistema de complement. Proteïnes com la cadena del receptor d'interleucina 2 (IL-2R) i CD26, altament anomenada P-Selectina també contenen aquests mòduls.

Els lligands naturals de CR2 són iC3b, C3d i C3dg, els fragments de l'activació de C3, descrits anteriorment en la introducció (Fig. 2). S'ha descrit també la unió de C3b a CR2, amb una afinitat molt baixa (Fearon and Carter, 1995; Lambris et al., 1999; Nemerow et al., 1990). Un altre lligand que s'uneix a CR2 és l'interferó alfa (Delcayre et al., 1991); tot i així, el significat d'aquesta interacció és força desconegut. Com hem mencionat prèviament, la glicoproteïna d'EBV gp350/220 també s'uneix a CR2, per

facilitar l'adsorció del virus a les cèl·lules. Cal remarcar que gp350/220, C3d i iC3b competeixen per la unió al receptor. El lloc d'unió dels lligands a CR2 s'ha localitzat en els dos dominis SCR N-terminal de CR2 (SCR 1 i 2) (Lowell et al., 1989; Molina et al., 1991). Tot i així, els dos lligands no interactuen amb exactament els mateixos residus de CR2. Per exemple, C3d humà s'uneix a CR2 de ratolí, mentre que gp350 no (Molina et al., 1991).

Com hem mencionat anteriorment, CR2 forma part de la família de reguladors de l'activació de complement. Tot i així, aquesta molècula no té la capacitat dels altres reguladors de complement d'actuar o bé com a cofactor de la digestió de C3b per el Factor I, o d'accelerar la separació dels components de les convertases de C3. Diferents estudis indiquen que CR2 actua com a activador del sistema de complement (Mold et al., 1988; Mold et al., 1988; Nemerow et al., 1990). El significat d'aquesta activació no és clar; podria ser que CR2 servís com a activador de complement en les cèl·lules transformades per EBV, permetent la deposició de C3 que les marcaria per a ser destruïdes per les cèl·lules del sistema reticuloendotelial.

A més a més, CR2 ha estat implicat en la regulació de la resposta de les cèl·lules B. Cal remarcar que en aquesta interacció, la valència del lligand que s'uneix a CR2 sembla repercutir en el tipus de resposta. Així, C3d/dg polivalent incrementa la proliferació de les cèl·lules B activades, i aquest efecte pot ser inhibit per C3d/dg monovalent (Bohnsack and Cooper, 1988; Melchers et al., 1985). C3dg polivalent, però no monovalent, pot induir els limfòcits B a proliferar en resposta a anti-IgM, i incrementa l'infus de calci causat per aquesta resposta (Carter and Fearon, 1989; Tsokos et al., 1990).

Diferents línies de recerca estan reforçant la hipòtesi que l'activació de la resposta innata proporciona un senyal coestimuladori molt important per poder muntar una resposta adquirida efectiva (Carroll, 1998; Carroll and Prodeus, 1998; Fearon and Locksley, 1996). Dins el sistema de complement, CR2, entre d'altres, juga un paper clau en diferents aspectes moduladors de la resposta adquirida. Els resultats d'anys de recerca intensa per part de molts grups diferents, realitzant tan estudis fets *in vitro* com *in vivo*, amb animals deficients en proteïnes de complement, inclòs CR2, han ajudat a

construir una teoria de com l'activació del sistema de complement modula la resposta humoral mitjançant el receptor CR2. En les següents línies, se'n destaquen alguns dels mecanismes publicats en els darrers anys.

En les cèl·lules B en humans, CR2 forma un complex amb CD19 i CD81, anomenat el coreceptor de les cèl·lules B (Fearon and Carter, 1995). L'activació del sistema de complement resulta en l'enllaç covalent dels fragments de C3, iC3b, i C3dg o C3d amb l'antigen. Llavors, aquest antigen marcat esdevé capaç d'unir-se alhora al receptor d'antigen (B cell receptor, BCR), i a CR2 en el coreceptor (B cell coreceptor). Això resulta en la fosforilació de CD19 per kinases associades a BCR, induint una sèrie de senyals intracel·lulars que activen el limfòcit B (Bohnsack and Cooper, 1988). Cal mencionar que encara no s'ha identificat cap lligand per a CD19. S'ha observat utilitzant animals deficients en complement i CR2 que aquest "cross-linking" pot disminuir la quantitat d'antigen requerit per activar les cèl·lules B de 10 a 100 vegades (Carter and Fearon, 1992). Així doncs, la participació del sistema de complement és essencial per poder desenvolupar respostes humorals a antigens de baixa afinitat. Recolzant aquesta idea, la unió de tres còpies de C3d a un antigen model de resposta T-dependent, HEL, disminueix el nivell de resposta immunològica en ratolins de 100 a 1000 cops (Dempsey et al., 1996). És a dir, C3d actuaria com a un adjuvant natural. Un resultat similar s'ha obtingut recentment en l'aplicació d'una vacuna de DNA que codificava per l'antigen Hemaglutinina (HA, del virus de l'influenza) unit a tres còpies de C3d (sHA-3C3d) en ratolins (Ross et al., 2000). L'anàlisi dels títols, la maduració, i l'activitat inhibidora d'hemaglutinina dels anticossos produïts van demostrar que la immunització amb sHA-3C3d accelerava tant la maduració dels anticossos com l'aparició d'activitat inhibidora d'hemaglutinina. Aquests resultats s'esdevenien en una aparició més ràpida de la protecció immune, i una protecció completa a la infecció per el virus a una dosi 10 cops menor que la vacunació amb la proteïna HA sola (Ross et al., 2000).

La unió del complex antigen-iC3b/C3d/C3dg al receptor CR2 en cèl·lules presentadores d'antigen, principalment les cèl·lules fol·liculars dendrítiques podria millorar la presentació de l'antigen a les cèl·lules B (Prodeus et al., 1998). Aquesta interacció entre el sistema de complement i les cèl·lules presentadores d'antigen podria

facilitar la formació de centres germinals, modular la tolerància als antígens propis, i millorar la persistència de la memòria de les cèl·lules B (Carroll, 1998; Carroll and Prodeus, 1998; Fearon and Locksley, 1996; Fischer et al., 1998; Noorchashm et al., 1999; Prodeus et al., 1998).

Totes aquestes dades proven la necessitat de l'estudi de la interacció de CR2 amb els seus lligands. Per una banda, molècules que inhibeixin la interacció entre CR2 i els seus lligands naturals podrien utilitzar-se com a immunosupressors. Per l'altra, el potenciament d'aquesta resposta podria generar la millora de vacunes. I en tercer lloc, conèixer la interacció gp350-CR2 ens és necessària per a la lluita contra aquest virus associat a la formació de tumors.

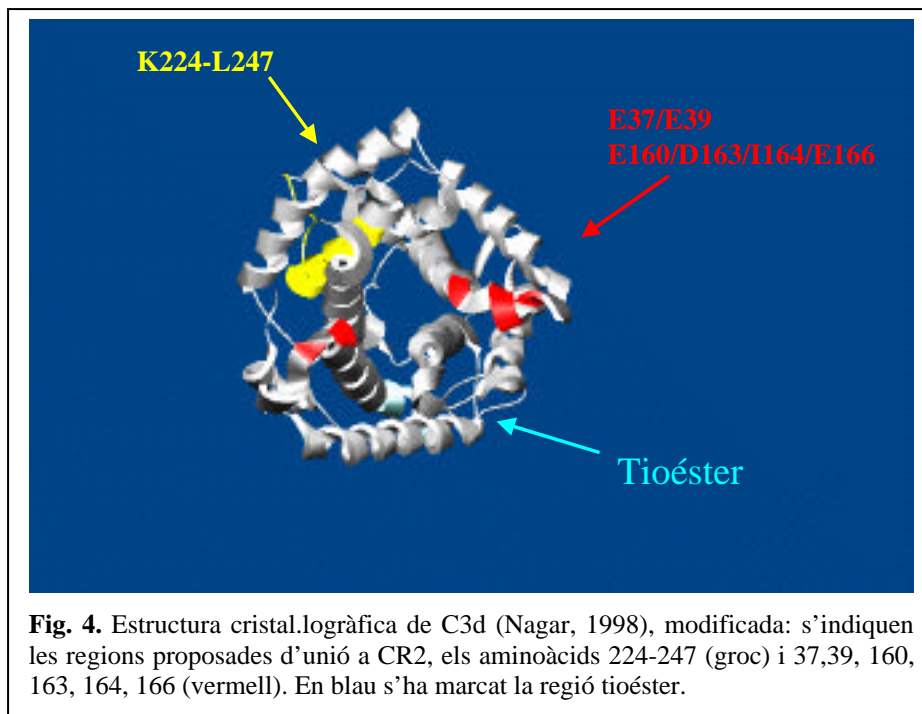
4.1.5 Interacció de C3 amb CR2

Un cop descrites en general les funcions del sistema de complement i de CR2, en aquest apartat ens centrarem en les interaccions a nivell molecular dels fragments de C3 amb CR2.

Com hem comentat anteriorment, els principals fragments de C3 que interactuen amb CR2 són C3d/g i iC3b. C3d/g són els fragments de C3 que resulten del tall del factor I en presència d'un cofactor (H, CR1 o MCP) (Fig. 2), com a conseqüència de l'activació del sistema de complement (Davis and Harrison, 1982; Davis et al., 1984; Medicus et al., 1983; Medof et al., 1982; Ross et al., 1982). Aquests fragments tenen una massa de 35 i 40 Kda, respectivament. L'estructura de C3d ha estat recentment resolta amb cristallografia. (Nagar et al., 1998) (Fig.4). C3d forma una estructura globular, amb cinc hèlixs formant la regió exterior, i sis hèlixs en l'interior. C3d forma dues superfícies diferents, una convexa que conté l'enllaç tioèster, i a la part oposada, una superfície còncava. Aquesta superfície és totalment accessible al solvent, i està rodejada de residus acídics amb càrrega electronegativa. Es creu que aquest podria ser un lloc candidat a la interacció mitjançant enllaços iònics amb CR2: els dominis SCR 1 i 2 del receptor provats necessaris per a la interacció amb C3d, contenen regions de càrrega electropositiva (Molina et al., 1995). Un treball recent corrobora aquesta

idea. En aquest treball els autors han utilitzat la informació de l'estructura de C3d, i han expressat diferents molècules de C3 en els quals es substituïen amb Alanina els residus més electronegatius de la part còncava de C3d, (residus 37, 39, 160, 163, 164 166 de C3d). Els C3 recombinants que portaven aquestes mutacions es van activar en superfícies cel·lulars i digerir amb els factors I i H per aconseguir iC3b depositat en les cèl·lules. Quan els autors van comprovar l'habilitat de CR2 d'unir-se a aquests complexos van observar que les mutacions en els residus de C3d mencionats anteriorment afectaven la interacció d'iC3b amb CR2. Els autors conclouen que aquests són els majors punts de contacte dels fragments de C3, iC3b i C3d amb el receptor CR2 (Clemenza and Isenman, 2000).

Una altra regió en C3d que s'ha descrit que interactua amb CR2 la formen els residus 1201-1214 (PGKQLYNVEATSYA) (Lambris et al., 1985). Aquesta seqüència és similar a una regió en la proteïna d'EBV gp350/220, la qual també s'uneix al receptor (EDPG...FFNVEI) (Nemerow et al., 1989). Un pèptid sintètic que correspon a aquesta regió s'uneix a cèl·lules Raji d'una manera dependent de CR2 (Servis and Lambris, 1989). A més, mutacions en la regió homòloga de gp350/220 n'aboleixen la unió al receptor (Tanner et al., 1988). Tot i així, quan la participació dels residus 1199-1210 en la unió a CR2 va ser analitzada fent servir mutació dirigida, els resultats suggerien que altres regions en C3d participen en la unió a CR2 (Diefenbach and Isenman, 1995). En aquest estudi 8 dels 11 residus d'aquesta regió van ser mutats, tan individualment com en grup. Substitució amb l' Alanina a la posició 1199-1200 (ED), 1203-1204 (KQ), o 1207-1208 (NV) no va tenir cap efecte en la unió a CR2. En canvi, un triple mutant que contenia substitucions en tots els sis residus, mostra una reducció del 20% en la unió al receptor comparat amb la forma salvatge de C3. Aquests resultats suggereixen que a part de la regió 1201-1214, altres residus en C3d participen en la unió a CR2. Així doncs, és possible que dues regions en C3d, la primera formada per els residus 1201-1214 (224-237 en la numeració de C3d), i la segona per els residus 37, 39, 160, 163, 164 166, constitueixin dominis d'interacció amb CR2.



L'afinitat de la interacció de C3d i CR2 ha estat determinada amb estudis d'equilibri d'unió. Els valors de la K_D d'aquesta interacció són $1\mu\text{M}$ (Kalli et al., 1991) i $27.5\mu\text{M}$ (Moore et al., 1989). Aquesta discrepància podria ser deguda a dos diferents dissenys experimentals. En el primer estudi, es van fer estudis de competició per la unió a CR2 expressat a la superfície cel·lular, i en el segon, es va estudiar el coeficient de sedimentació del complex C3d-CR2 amb proteïnes recombinants solubles. És a dir, és possible que C3d tingui una afinitat diferent per a CR2 soluble o ancorat a la membrana cel·lular. Aquest aspecte s'analitzarà en el treball 5 d'aquesta tesi.

En estudis de competició s'ha determinat que iC3b té la mateixa afinitat per CR2 que C3d, suggerint que en la interacció entre la proteïna C3 i CR2 només participa la regió de C3d (Kalli et al., 1991). Tot i així, existeix evidència que sembla indicar que altres regions de C3 interactuen amb CR2 (Esparza et al., 1991). Per exemple, existeixen dues regions en C3 fora de C3d amb seqüència d'homologia al pèptid de C3d i gp350/220 que s'uneix a CR2. Aquestes regions es localitzen als residus 295-306 (cadena) i 744-755 de la cadena . Pèptids sintètics que representen aquests segments s'uneixen a CR2. A més a més, un anticòs monoclonal contra C3 que no s'uneix a la regió de C3d és capaç d'inhibir la interacció iC3b-C3d, recolzant la idea de que la regió

en iC3b fora de C3d participa en aquesta interacció. Així doncs, existeix una disparitat en els resultats de diferents laboratoris, en respecte a les regions de C3 que interactuen amb CR2. Aquest aspecte es treballarà en el treball 5 d'aquesta tesis, en el qual compararem la cinètica d'unió a CR2 de C3d i iC3b.

4.1.6 La proteïna viral gp350/220

Les dues majors glicoproteïnes de la superfície del virus de l'Epstein Barr, gp350 i gp220, són productes d'esplicing alternatiu del mateix gen. Un "open reading frame" de 907 codons codifica per gp350; un sol tall en el transcrit primari elimina 197 codons i junta els codons de gp350 501 i 699, in frame, per donar lloc a l'mRNA de gp220. Així doncs, gp220 i gp350 tenen el mateix pèptid senyal hidrofòbic, el qual no té un lloc de tall que es pugui predir clarament. Ambdues proteïnes tenen molts llocs d'O- i N-glicosilació (36 en gp350) (Edson and Thorley-Lawson, 1981; Edson and Thorley-Lawson, 1983), un sol domini transmembrana, i un domini citoplasmàtic carboxi terminal molt curt [Beisel, 1985 #187] (Fig. 5). El domini que es presenta exclusivament en gp350 conté tres seqüències de 21 amino àcids repetides, amb característiques amfipàtiques, que podrien interactuar amb la membrana cel·lular (Tanner et al., 1988).



L'expressió de formes recombinants de gp350/220 ha ajudat a determinar que la regió que cobreix els amino àcids 1 a 470 [gp350(470t)] conté els dominis d'unió a CR2 (Tanner et al., 1988). A més a més, un anticòs monoclonal (72A1) que s'uneix a aquesta regió en gp350 inhibeix l'entrada del virus a les cèl·lules i la interacció gp350-CR2 (Tanner et al., 1988). De fet, existeix una seqüència en gp350/220 similar a C3d, com hem mencionat abans, en la posició 21-20 de gp350/220: EDPG...FFNVEI (Nemerow et al., 1989) (Fig 5). Cal remarcar que tot i que gp350 (470t) s'uneix a CR2, quan es va examinar l'habilitat d'aquesta forma truncada per inhibir l'entrada del virus a cel.lules Raji, es va observar un bloqueig parcial, si es comparava amb gp350 (570t). Sembla ser que el fet de truncar la proteïna podria alterar-ne la conformació lleugerament. (Tanner et al., 1988). Alternativament, la regió que compren els amino àcids 470 a 576 podria facilitar la unió a CR2, exposant-ne els dominis necessaris.

L'afinitat de la proteïna gp350/220 per a CR2 ha estat determinada amb estudis d'equilibri d'unió, en la superfície de cèl·lules que expressen CR2 i en estudis de sedimentació amb formes recombinants d'ambdues proteïnes. La K_D d'aquesta

interacció obtinguda en els dos treballs és 1.2 nM (Tanner et al., 1988) i 3.2 nM (Moore et al., 1989), respectivament. Ambdós treballs determinaven que l'estequiometria de la interacció és 1:1. Així doncs, gp350/220 s'uneix a CR2 amb una afinitat de 100 a 1000 vegades més alta que C3d.

Com hem mencionat anteriorment, gp350 i C3d no només contenen seqüències similars que semblen mediar la seva interacció amb CR2, sinó que també competeixen per la unió al receptor. Tot i així, el fet que gp350 no s'uneix a CR2 de ratolí (Molina et al., 1991) suggereix que els dos lligands reconeixen diferents residus en CR2. Cal remarcar que la inhabilitat de gp350 d'unir-se al receptor murí es tradueix en la no infecció dels ratolins per EBV. Per tant, els ratolins no es poden fer servir com a models animals per a l'estudi de la biologia d'aquest virus.

4.2 Treball 4:

Expressió, purificació i marcatge de les proteïnes CR2 (SCR1,16), CR2-BCCP, gp350(470t), C3, C3d, i iC3b

Resum

En el nostre estudi de la interacció del receptor de complement CR2 amb els seus lligands, ens hem centrat en l'anàlisi del mecanisme d'unió d'aquestes proteïnes. Per a fer aquesta anàlisi hem utilitzat la tecnologia de BIAcore. Així doncs, el disseny experimental requeria l'expressió i/o purificació de les proteïnes a estudiar. A més a més, ens era necessari dissenyar mètodes de marcatge específic per a CR2 i C3 i els fragments derivats, que ens permetria poder orientar les proteïnes al chip de BIAcore. En el present treball es descriu, doncs, l'expressió de les proteïnes recombinants, com gp350/220 del virus d'Epstein Barr, el receptor de complement CR2 (CD21), i la proteïna C3d. També descriurem la purificació de la proteïna de complement C3 i la digestió d'aquesta per a l'obtenció dels fragments que s'en deriven: C3d, iC3b, C3b, i C3c. Totes aquestes proteïnes han estat purificades seguint diferents metodologies que seran detallades a continuació. A més, es descriurà el marcatge amb biotina d'un sol residu de C3 i els seus fragments, i del receptor CR2. Aquest marcatge ha estat essencial per al disseny experimental del treball següent, on es presentarà l'estudi de les interaccions de CR2 amb els seus lligands mitjançant la tecnologia de BIAcore.

Materials i mètodes

Productes químics i solucions

Els productes químics per a la seqüenciació es van obtenir d' Applied Biosystems (Foster City, CA.). La tripsina es va comprar a Promega (Madison, WI). PBS (phosphate buffered saline) és una solució 10 mM NaH₂PO₄, que conté 150 mM NaCl, pH 7.4. BSA és albumina de serum boví (Sigma).

Proteïnes recombinants

El cDNA d'interès va ser amplificat fent servir la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) per a cada proteïna. gp350(470t) va ser amplificada del clon pGEM-gp350 (Hedrick et al., 1992), amb els encebadors 5'-TCGG GA TCCA ATG GAG GCA GCC TTG ATT GTG TGT CAG TA-3' (forward), i 5'-CCT GCGGCCGC CTA ATG GTG ATG GTG ATG GTG GGA T GAT ACA GTG GGG CCT GT-3' (reverse), el qual afegia sis codons His a la part C-terminal, i un codó de STOP. La cua d'Histidines va ser afegida com a lloc d'unió d'una resina de níquel-nitrioacètic àcid utilitzada en la purificació de la proteïna expressada. El producte de l'amplificació per PCR va ser clonat al vector pVT-Bac (Tessier et al., 1991), amb la seqüència senyal de honeybee mellitin.

La molècula CR2-BCCP consisteix en CR2 (SCR1,15) en fusió amb els amino àcids 70 a 156 de la proteïna BCCP (Beckett et al., 1999). El constructe va ser clonat com s'indica a continuació: es va extreure DNA total de cèl·lules DH5⁺, precipitant 1ml de cèl·lules crescudes tota la nit, les quals van ser lisades amb una solució que contenia 0.4 M Tris (pH 8), 0.1 M EDTA, 1% SDS, 200µg/ml proteïnasa K, i posterior extracció amb fenol-cloroform. El cDNA que codifica per a BCCP (70-156) va ser aleshores amplificat per PCR fent servir els encebadors següents: 5'-AAC TGA GCT CAT GGA AGC GCC AGC AGC A-3' (forward), i 5'-ATT AGC TAG CCT ACT CGA TGA CGA CCA GCG G-3' (reverse), i clonat al vector pVT-Bac (pVT-Bac-BCCP). El cDNA que codifica per CR2 es va amplificar del clon pGEM-CR2, amb els encebadors 5'AAT TCC CGG GAT GGG CGC CGC GGG CCT G- 3' i 5' CAC GAG CTC TGA ACG GGA TCT GCA AAC 3', i posteriorment es va clonar al constructe pVT-Bac-BCCP

Així doncs, el constructe resultant, pVT-Bac-CR2-BCCP, conté el cDNA de CR2 en fusió amb BCCP a la part 3'-terminal.

Ambdós constructes (gp350 (470t), i CR2-BCCP) van ser seqüenciats i recombinats amb el virus de baculovirus (*Autographa Californica*) per cotransfecció amb Baculogold DNA (Pharmingen, San Diego). Les plaques recombinants van ser aïllades, amplificades, i l'expressió de proteïna es va examinar sotmetent els sobrenedants de cultiu a SDS-PAGE i Western blot. Els sobrenedants de cultiu que expressaven la proteïna d'interès van ser sotmesos a una ronda més de purificació per placa.

Per a l'expressió de CR2 (SCR1,15) en baculovirus, es va utilitzar el constructe VM5, prèviament descrit.

Cèl·lules de *Spodoptera fugiperda*, Sf9 (GIBCO BRL) es van fer créixer en cultius en suspensió, i van ser infectades amb cada baculovirus recombinant a una multiplicitat d'infecció de 4. A les 48 o 72 h després de la infecció, es van centrifugar els cultius, i es van concentrar els sobrenedants, que van ser posteriorment dialitzats amb solució fosfat (PBS). gp350(470t) va ser purificada amb la columna de níquel-nitroacètic àcid i eluïda amb concentracions en augment d'imidazol (de 0.01 a 0.25 M) en 0.02 M solució de fosfat, pH 7.5, 0.5 M NaCl. La part N-terminal de gp350(470t) es va seqüenciar per el mètode d'Edman, per comprovar si el putatiu pèptid senyal havia estat processat. Les dues formes recombinants de CR2 van ser purificades amb una columna d'afinitat de sefarosa que contenia l'anticòs monoclonal anti-CR2 HB5 unit covalentment. Aquesta columna va ser preparada seguint les instruccions del manufacturí. Amb la intenció d'eliminar traces d'anticòs que haguessin pogut desprendre's de la columna durant el procés de purificació de CR2 (1,15), la proteïna van ser passades per una columna que contenia proteïna G unida covalentment.

Les proteïnes CR2 (SCR1,15) i gp350(470t) van ser llavors dialitzades amb PBS i concentrades. Es va comprovar el seu pes molecular i puresa amb espectrometria de masses (Moore, 1997).

El clon per a l'expressió de la proteïna BirA va ser una donació de la Dra. Beckett (Dept. of Chemistry and Biochemistry, Univ. of Maryland, MD). Aquesta proteïna va ser expressada en el sistema d'E. Coli, segons Nenortas et al., (Nenortas and Beckett, 1996), purificada amb la columna de níquel-nitroacètic àcid i eluïda amb concentracions en augment d'imidazol (de 0.01 a 0.25 M) en 0.02 M solució de fosfat, pH 7.5, 0.5 M NaCl. BirA va ser dialitzada en una solució que contenia 200 mM KCl, 50 mM Tris, 5% glicerol, pH 7.5.

Proteïnes del sèrum

Els factors H i I, i la proteïna C3 van ser purificats de plasma humà tal i com s'ha descrit anteriorment. C3 va ser purificat fent servir dos passos cromatogràfics. Breument, el plasma va ser precipitat amb 4.5 % (w/v) de polietilè glicol (PEG) barrejant constantment a 4⁰C, en presència dels següents inhibidors: 10 mM EDTA, 10 mM benzadimina, 0.001% NaN₃ i 1mM fenilmetilsulfonilfluorid (PMSF). Es va centrifugar a 10000 g durant 25 min. i el sobrenedant es va precipitar altre cop amb 12 % PEG. Després de centrifugar durant 25 min a 10000 g, el precipitat va ser resuspès en solució A (20 mM Na₂HPO₄, pH 7.4) i purificada parcialment amb una columna de DEAE. El flux d' aquesta purificació fou 8ml/min. Després d'equilibrar la columna amb solució A, es van programar tres gradients: un gradient inicial de 0 a 10 % de solució B (solució A amb 0.5 M NaCl), durant 10 min., seguit d' un gradient de 10% a 60 % de solució B durant 55 min., i finalment un gradient de 60 a 100% de solució B durant 15 min.. Les fraccions que contenien C3 van ser sotmeses a una segona purificació amb una columna MonoQ 10/10, fent servir un flux de 3 ml/min, i tres gradients: de 0 a 20 % de solució B en 5 min., de 20 a 60% de solució B en 45 min, i finalment de 60 a 100% de solució B en 2 min. Les solucions A i B utilitzades foren les mateixes que les de la columna DEAE.

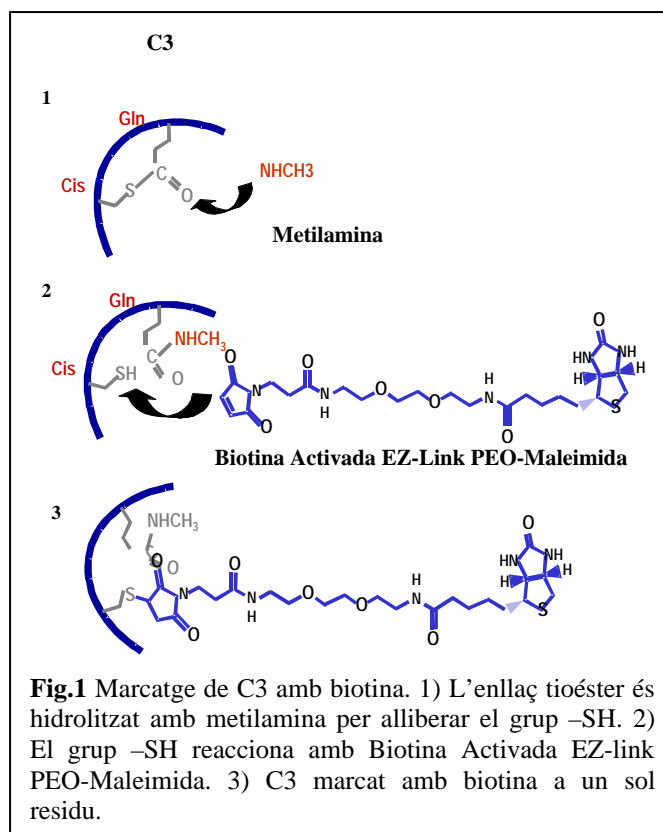
Per a l'obtenció de C3b o C3d, C3 va ser digerit a 37⁰C amb 1% en pes de tripsina (en 1 mM HCl) durant 10 minuts, i 5% en pes de tripsina (en 1 mM HCl) durant 1h, respectivament. Les reaccions van ser aturades afegint 3 vegades la quantitat en pes de tripsina de "soybean trypsin inhibitor" (SBTI). Per a l'obtenció d'iC3b, 500µg d'iC3b van ser incubats amb 64 µg de Factor H i 6 µg de Factor I, durant 4h a 37⁰C. C3b, C3d, i iC3b van ser purificades per FPLC amb una columna MonoQ, com s'ha descrit

anteriorment. Breument, les proteïnes van ser diluïdes en solució A (10 mM NaH₂PO₄, pH 7.9, K 1.5). La columna MonoQ va ser equilibrada inicialment amb solució A durant 5 min. amb un flux d' 1 ml/min., i les fraccions de proteïna van ser eluïdes amb diferents gradients de solució B (solució A, 0.5M NaCl), amb el mateix flux. Per a la purificació de C3b i C3d, el gradient fou lineal de 0 a 100 % de solució B, durant 70 min. Per a la purificació d'iC3b, el gradient consistí en dues etapes, de 0 a 20 % de solució B en 10 min., i de 20 % a 70 % en 55 min.

L'elució de totes les proteïnes va ser monitoritzada mitjançant detecció per llum UV a 280 nm, i els pics més grans van ser analitzats per SDS-PAGE i tinció amb Comassie Blue.

Marcatge amb biotina de C3 i els fragments derivats

Per hidrolitzar l'enllaç tioéster entre els residus Cis⁹⁸⁸ i Gln⁹⁹¹ i així alliberar el grup SH- del residu Cis⁹⁸⁸, 7.8 mg de C3 (d'una solució 144 µM) van ser incubats durant tota la nit a 37⁰C amb un volum igual d'una solució de metilamina 0.2M, pH 7.3. C3 va ser aleshores dialitzada a una solució que contenia 0.1 M NaH₂PO₄, 5mM EDTA, pH 6.3, utilitzant una columna de PD-10. La Biotina EZ-linkTM activada amb PEO-maleimida (Pierce, Rockford, IL) va ser solubilitzada amb PBS a una concentració de 10mM, i aleshores es va afegir a la suspensió de C3 a raó de 5:1 (Fig.1). La reacció es va incubar durant 30 min. a temperatura ambient.

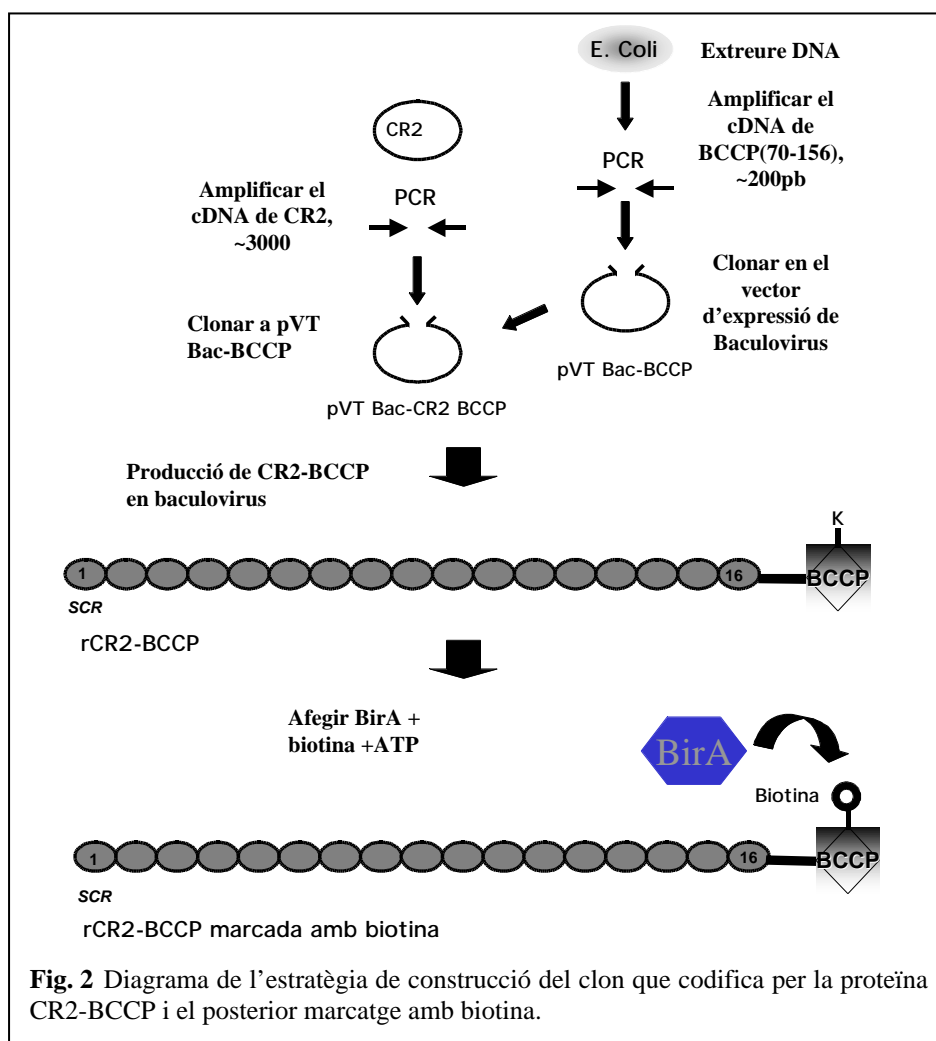


Per a eliminar la biotina no incorporada, la mostra es va intercanviar a solució PBS dos cops amb una columna PD-10. Els fragments C3b, iC3b, i C3d es van obtenir per digestió de la mateixa mostra de C3 marcada amb biotina. Aquesta digestió i la posterior purificació ha estat descrita en l'apartat de proteïnes de sèrum d'aquest treball. El marcatge amb biotina, i les digestions i purificacions van ser examinades per SDS-PAGE i western blot.

Marcatge amb biotina de CR2-BCCP

Les proteïnes recombinants CR2-BCCP i CR2 (SCR1,15) (utilitzada com a control) van ser dialitzades a una solució 40 mM TrisCl, 5.5 mM MgCl₂, 100mM KCl, pH 8. 31 μmols de cada una d'aquestes molècules es va incubar amb 365 μmols de la proteïna BirA, 24 μg de biotina (dissolta en aigua) i 20mM d'ATP (dissolt en aigua). La mescla de reacció es va incubar 1h a 37⁰C, i l'excés de biotina no incorporada es va eliminar passant la mostra per una columna PD-10 i posterior diàlisi extensiva amb PBS. El marcatge amb biotina es va comprovar per SDS-PAGE i western blot. A la figura 2 es

mostra un diagrama de la construcció i marcatge amb biotina de la molècula CR2-BCCP.



Anticossos

Els anticossos monoclonals anti-CR2 625, 994, 171, 1048, i HB5, l'anticòs monoclonal anti gp350, 72 A1, i l'anticòs policlonal anti-EBV van ser obtinguts del laboratori del Dr. Holers .

Seqüenciació i espectrometria de masses.

Per obtenir la seqüència NH₂ terminal de gp350 (470t), aquesta proteïna va ser sotmesa a electroforesi i llavors va ser electrotransferida a una membrana ProBlott (Applied Biosystems). La banda corresponent a gp350 (470t) va ser tallada de la membrana i sotmesa a degradació d'Edman automatitzada en un microseqüenciador de Perkin-Elmer/Applied Biosystems 473 A (Foster City, CA), fent servir cicles

programats i programes d'operació d'HPLC obtinguts de Perkin-Elmer. Per a l'anàlisi d'espectrometria de masses gp350 (470t) i CR2 1,15 es van precipitar en una matriu paracristalina com s'ha descrit anteriorment. Aleshores, les proteïnes es van sotmetre a "matrix assisted laser desorption-ionization" (MALDI-MS), fent servir un espectrofotòmetre de masses "TofSpec 2E time-of-flight", equipat amb un làser de nitrogen (337nm).

Western blots i ELISAs

Per examinar el marcatge amb biotina de les proteïnes CR2-BCCP, C3b, iC3b, i C3d, aquestes es van resoldre en un gel de SDS-PAGE. Posteriorment, les proteïnes es van electrotransferir a una membrana de nitrocel·lulosa. La membrana va ser bloquejada incubant-la amb una solució de PBS amb 10% de llet, durant 1h a temperatura ambient. La detecció de biotina es va fer amb estreptavidina marcada amb peroxidasa, diluïda 1:500 en la solució de bloqueig. La detecció de CR2 i CR2-BCCP es va fer amb l'anticòs monoclonal HB5, a una concentració de 2µg/ml en solució de bloqueig, i posterior incubació amb una dilució 1:1000 d'anticòs anti-immunoglobulina G de ratolí conjugat amb peroxidasa (Bio-Rad laboratories, Richmond, Calif.). El sistema de detecció va ser la quimioluminescència (ECL, Amersham Pharmacia Biotech). Entre els diferents passos, les membranes van ser rentades amb PBS que contenia Tween-20 al 0.05%.

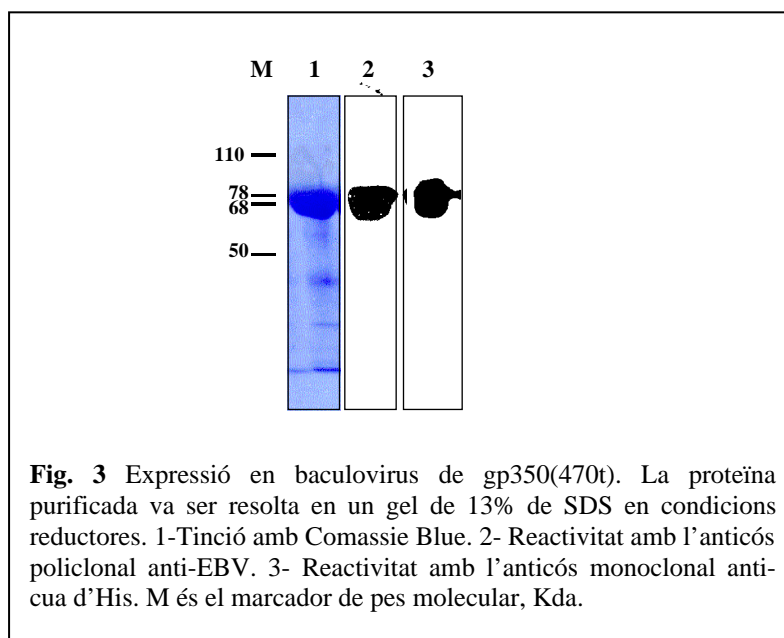
Per analitzar les interaccions entre CR2, CR2-BCCP, gp350 (470t), C3d, i iC3b es van realitzar diverses ELISAs. En aquests assaigs, gp350 (470t), C3d, iC3b, avidina BSA, van ser immobilitzades durant 2 h a 22⁰C en els pous de la plata a una concentració de 10µg/ml. La unió no específica als pous va ser bloquejada amb una solució de PBS que contenia 1% BSA, durant 1h a 22⁰C. Les proteïnes CR2, CR2-BCCP, i iC3b i C3d marcades amb biotina van ser afegides a cada pou i incubades durant 1h a 22⁰C. Per anàlisi de competició, dilucions seriades de gp350(470t), C3d, o BSA es van pre-incubar durant 30 min. a 22⁰C amb CR2, 0.5µM, abans de ser afegides a la plata. Els pous es van rentar dos cops amb PBS que contenia Tween-20 al 0.05% i incubats amb (i) HB5, 625, 994, 171, o 1048, que son anticòs monoclonals anti-CR2, a una concentració 2µg/ml, durant 1h a 22⁰C. Els pous es van rentar amb PBS-Tween 20 0.05% dos cops, i després van ser incubats amb una dilució 1:1000 d'anticòs anti-

immunoglobulina G de ratolí conjugat amb peroxidasa (Bio-Rad laboratories, Richmond, Calif.). Les plates es van incubar durant 30 mins. a 22⁰C. El color es va revelar afegint 2.2'-azino-di-[3-etilbenziazolinsulfonat (6)] (ABTS: Boehringer Mannheim), i 0.05% de peròxid d'hidrogen, i la densitat òptica es va llegir a 405nm. Per a l'assaig de l'efecte de la concentració de sal en la interacció de CR2 amb els seus lligands, totes les solucions es van ajustar a la concentració de sal adequada, sia 150 mM o 75 mM de sal.

Resultats i discussió

Proteïnes recombinants

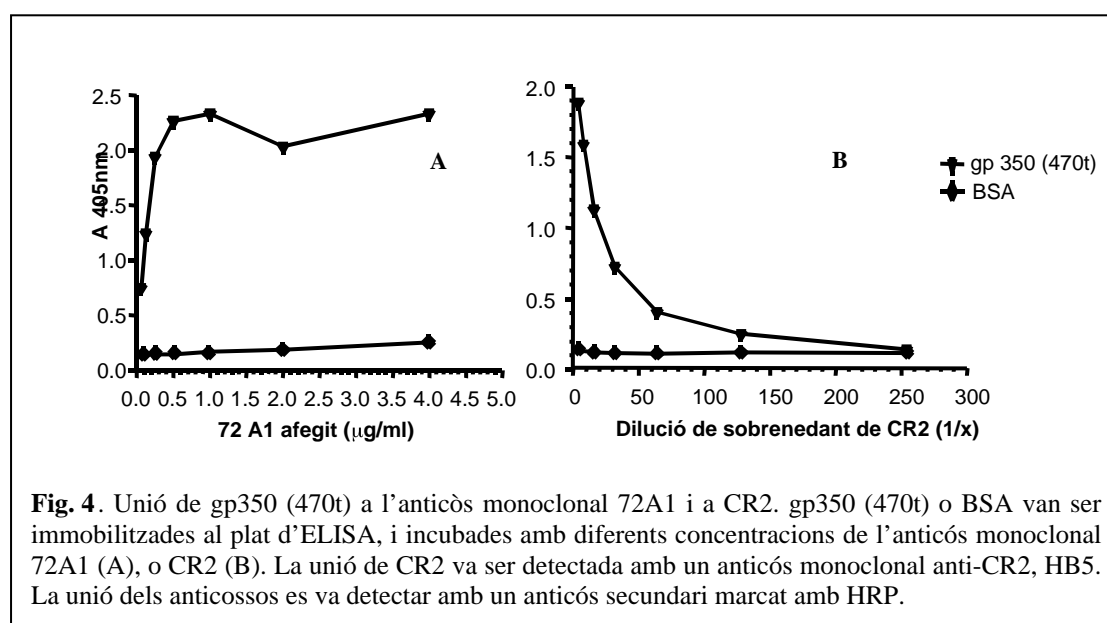
gp350(470t) és una forma recombinant truncada de la proteïna del virus de l'Epstein Barr, gp350/220. Com ha estat descrit anteriorment, aquesta part de la molècula conté tots els dominis necessaris per a la seva unió amb el receptor cel·lular CR2. La proteïna viral va ser expressada en el sistema de baculovirus, en fusió amb una cua de 6 His a la part C-terminal, que va permetre'n la purificació amb una columna de resina de níquel-nitrioacètic àcid. Per a cada expressió s'obtingué d'1-2 mg de proteïna per litre de cultiu. La proteïna recombinant tenia un pes molecular esperat de 50 Kda (deduït de la seqüència d'aminoàcids), però es va observar per SDS-PAGE i western blot que el pes aparent era de 65-70 Kda (fig. 3). Per comprovar el pes de la proteïna, la vam analitzar amb espectrometria de masses, que demostrava que el pes molecular de gp350 (470t) és 71 Kda (dades no mostrades). gp350 (470t) conté en la seva seqüència primària 18 llocs de potencials de N-glicosilació. Així doncs, els 20 Kda de massa afegits consisteixen en glicosilacions.



El disseny del constructe afegia dos aminoàcids (DP) a la part N-terminal de la proteïna. Per comprovar si el possible pèptid senyal de la proteïna era processat durant l'expressió, vam sequenciar-ne la part N-terminal fent servir la degradació d'Edman. La

sequència que vam obtenir és DPMEAALIV, on DP són els aminoàcids afegits degut al clonatge, i MEAALIV és el putatiu pèptid senyal, que no va ser processat.

Per comprovar que la proteïna recombinant era activa, vam realitzar un assaig d'ELISA on s'analitzava la seva habilitat d'unir-se a l'anticòs monoclonal anti-gp350/220 72A1, i a la proteïna recombinant CR2 (Fig. 4). gp350 (470t) es va immobilitzar als pous de la plata d'ELISA, i es va incubar amb diferents concentracions de l'anticòs 72A1, seguit d'un anticòs anti-IgG de ratolí marcat amb peroxidasa (A), o CR2 (B). La unió de CR2 es va detectar amb un anticòs monoclonal anti-CR2, HB5, i d'un anticòs anti-IgG de ratolí marcat amb peroxidasa. Com es pot observar a la figura 4, CR2 i l'anticòs 72A1 s'uniren d'una manera dosi-depenent a gp350(470t). Aquest anticòs és conformacional i reconeix la part N-terminal de la proteïna. Aquests resultats indicaven que l'expressió en el sistema de baculovirus no modifica aparentment l'activitat de gp350(470t).



CR2 (SCR1,15) consisteix en el domini extracel·lular del receptor de complement CR2. Aquesta forma recombinant conté 15 dominis SCR, i la seva expressió ha estat descrita anteriorment. En el nostre laboratori, l'expressió d'aquest receptor en el sistema de baculovirus proporciona de 2-3 mg de proteïna per litre de cultiu. CR2 (SCR1,15) va ser purificada amb una columna d'afinitat on s'havia immobilitzat l'anticòs monoclonal HB5. Amb l'objectiu d'utilitzar aquesta proteïna per a estudis de BIAcore, la presència

de traces de l'anticòs monoclonal no ens era convenient; BIAcore és un instrument molt sensible, i si aquest anticòs romaní unit a CR2, n'afectaria la massa total de la proteïna. Així doncs, vam procedir a un segon pas en la purificació, eliminant les restes d'HB5 de la mostra passant-la per una columna de proteïna G. La qualitat i puresa de la mostra es va comprovar per SDS-PAGE i western blot (Fig. 8).

El pes molecular de les proteïnes que contenen els mòduls SCR no es resol bé en SDS-PAGE, degut l'estructura globular d'aquests mòduls. Per a estudis de BIAcore és essencial conèixer la massa acurada de les proteïnes. Així doncs, vam analitzar el constructe amb espectrometria de masses (dades no mostrades). El pes molecular de CR2 (SCR1,15) és, doncs de 116 kDa, 5 kDa més que el deduit de la seva seqüència d'aminoàcids. Com que CR2 té 11 llocs potencials d'N-glicosilació, és possible que les glicosilacions constitueixin 5 kDa de massa.

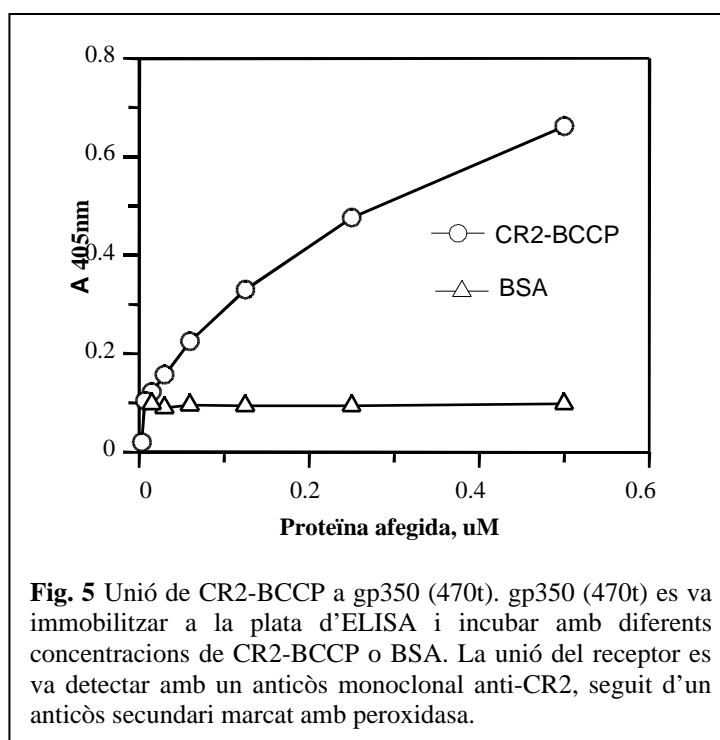
Un aspecte important que cal remarcar és que CR2 perd l'activitat quan és immobilitzada al plat d'ELISA. Això junt amb la intenció d'orientar les proteïnes en el xip del biosensor de BIAcore, ens va incitar a dissenyar una molècula CR2 que es pogués immobilitzar d'una manera orientada al xip. Aquesta molècula és CR2-BCCP.

CR2-BCCP és una forma recombinant de CR2 (SCR1,15) en fusió amb una cua C-terminal que en permet el marcatge localitzat amb biotina. Aquesta cua consisteix en els aminoàcids 70-156 de la proteïna BCCP (biotin carboxyl carrier protein). BCCP és una subunitat de l'acetil-CoA carboxilasa d'*E. Coli*, la qual conté un residu lisina específic, acceptor de biotina. L'enzim catalitzador d'aquesta reacció és BirA (biotin holoenzyme synthetase) d'*E. Coli*, (Beckett et al., 1999).

Com el lloc d'unió de CR2 als seus lligands ha estat localitzat als dominis SCR 1 i 2 del receptor (Molina et al., 1991; Molina et al., 1995), i aquest té una estructura allargada (Moore et al., 1989), vam assumir que una cua d'aminoàcids a la part C-terminal de la molècula no afectaria la interacció del receptor amb els seus lligands.

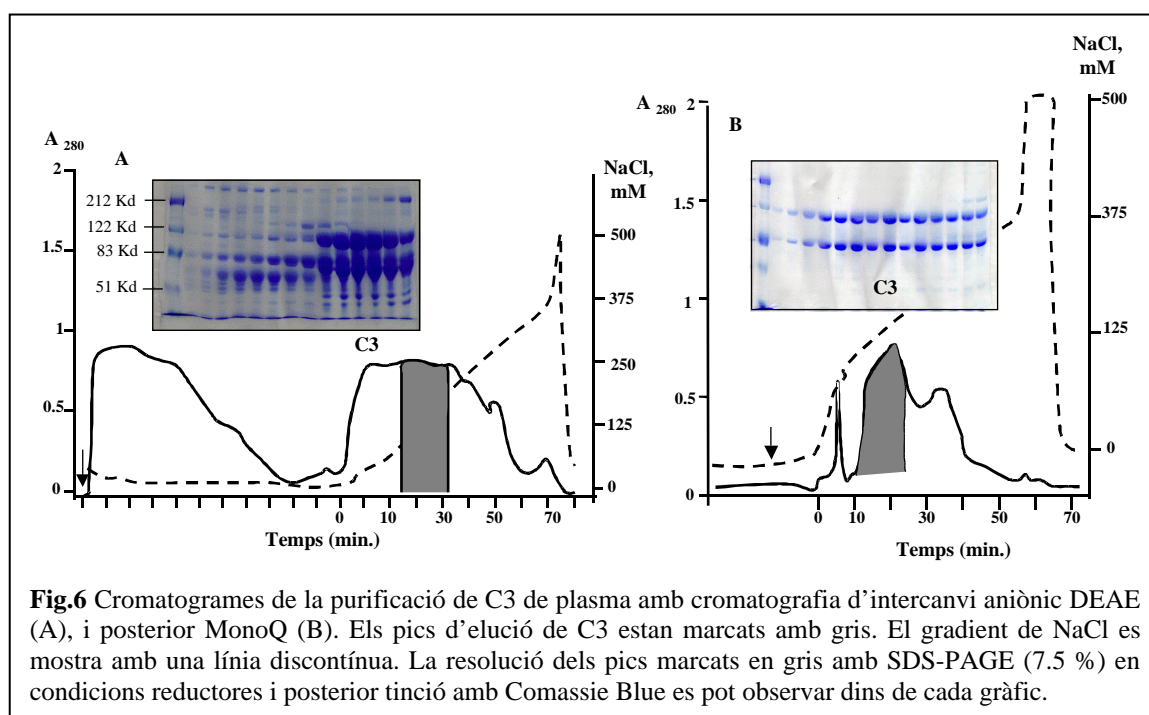
El cDNA de CR2-BCCP que codifica per a CR2 va ser amplificat per PCR a partir del cDNA del clon de CR2 (SCR1,15); així doncs, la part de la molècula que codifica

per el domini extracel·lular del receptor hauria de ser la mateixa. Tot i així es va seqüenciar el producte de PCR per assegurar que en aquest pas no s'havia incorporat cap mutació. Degut a la poca quantitat de proteïna necessària per als experiments de BIAcore, l'expressió de CR2-BCCP en baculovirus no va ser optimitzada, per reduir-ne el temps que això requereix. Així doncs, s'obtingueren 400µg de proteïna per litre d'expressió. Aquesta proteïna va ser parcialment purificada dels sobrenedants de cultiu passant-la per una columna d'afinitat que contenia l'anticòs monoclonal anti-CR2 HB5. Es va comprovar la presència de la molècula per SDS-PAGE i western blot (Fig. 8). També se'n va examinar l'activitat amb un assaig d'ELISA, on es verificava la seva habilitat d'unir-se a la proteïna recombinant gp350 (470t) (Fig. 5). En aquest assaig es va immobilitzar gp350 (470t) al plat d'ELISA i es va incubar amb diferents concentracions de CR2-BCCP o BSA. La unió del receptor es va detectar amb un anticòs monoclonal anti-HB5, seguit d'un anticòs anti-IgG de ratolí marcat amb peroxidasa. Com es pot observar a la fig., només CR2-BCCP s'unia d'una manera dosi-dependent a gp350 (470t), suggerint que la inserció de la cua BCCP no modifica l'habilitat del receptor d'unir-se a la proteïna viral.

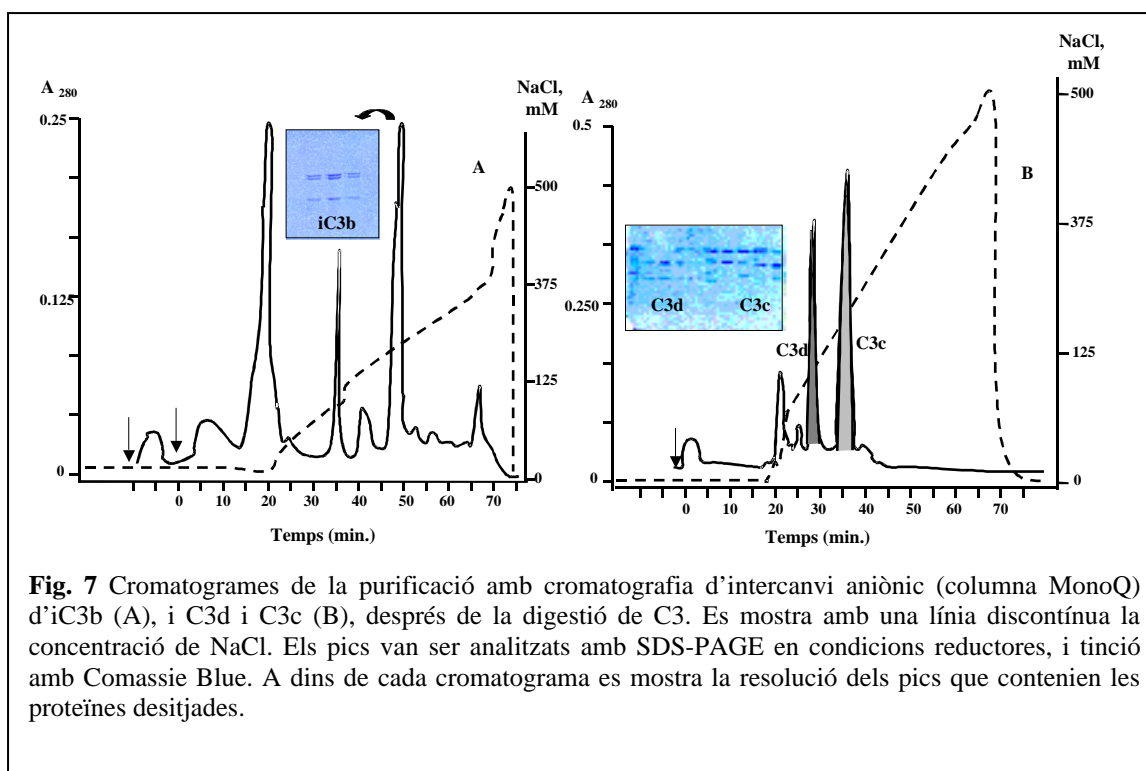


Proteïnes de sèrum

La purificació de C3 del plasma humà es va realitzar com ha estat descrita anteriorment. Així, el plasma es va fraccionar amb precipitació amb PEG, i aleshores es va sotmetre a cromatografia d'intercanvi aniònic, DEAE primer (Fig. 6A) i posteriorment MonoQ (Fig. 6B). Per detectar la presència de C3 es van examinar les mostres per SDS-PAGE (Fig 6) i western blot (dades no mostrades). El C3 purificat es va dialitzar amb PBS.



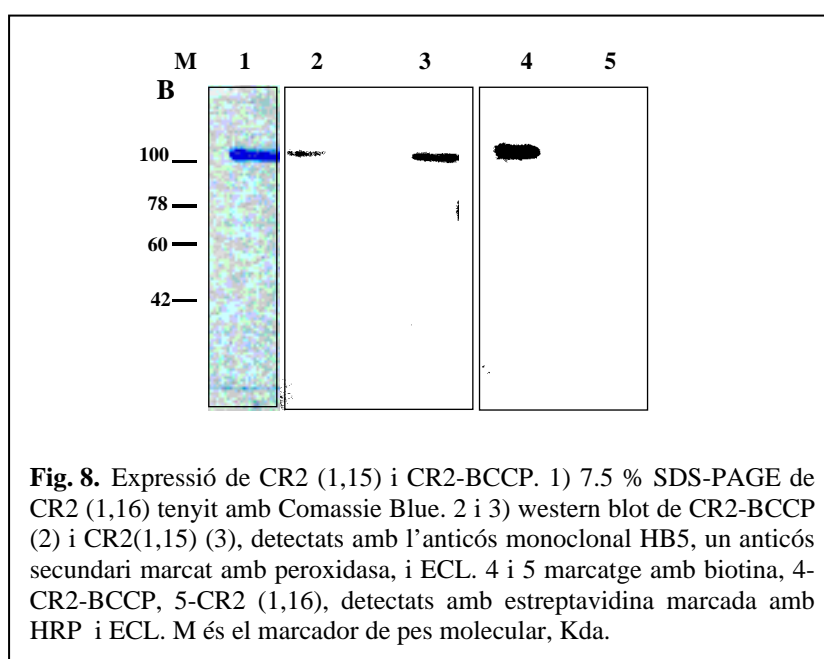
Per obtenir C3b, iC3b i C3d, la proteïna C3 es va sotmetre a diferents digestions. Per obtenir C3b i C3d, s'utilitza tripsina; iC3b és el producte de la digestió de C3b amb els factors I i H. Cada digestió va ser purificada amb cromatografia d'intercanvi aniònic, fent servir una columna MonoQ (Fig. 7). Els pics més grans van ser analitzats per SDS-PAGE i tinció amb Comassie Blue.



Marcatge amb biotina

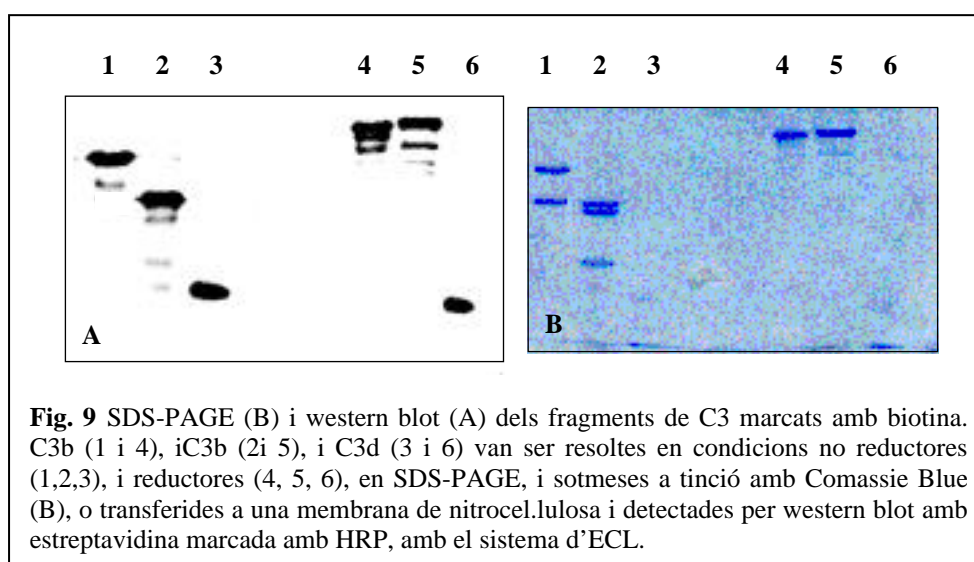
Aquesta modificació de les proteïnes ens era necessària per a poder realitzar els experiments amb la tecnologia de “surface plasmon resonance” amb un aparell Biacore, descrits en el treball següent. En aquests estudis, la immobilització del lligand es produeix generalment fent servir la reacció química d'unió per enllaços amina. Però aquesta estratègia produeix superfícies heterogènies, impeding la mesura de constants cinètiques homogènies. Sabent que la interacció biotina-avidina és de gran afinitat, el nostre objectiu era marcar les proteïnes amb biotina en un sol residu, i que aquest marcatge simulés la biologia de les molècules a ser estudiades. Així doncs, la nostra intenció era incorporar una molècula de biotina a l'extrem C-terminal del receptor cel·lular CR2. Quan aquesta biotina s'unís a una superfície que contingués avidina, la posició del receptor seria similar a la que es troba a la superfície de les cèl·lules. Per altra banda, volíem simular la deposició de C3 i els fragments derivats en la superfície de l'antigen. Com hem comentat en la introducció, C3 s'uneix covalentment a l'antigen mitjançant el lloc tioèster. Així, vam decidir marcar aquest lloc tioèster amb biotina, i immobilitzar les molècules derivades de C3 d'aquesta manera en una superfície d'avidina.

El marcatge de CR2-BCCP es va produir en una reacció enzimàtica, amb la presència de la proteïna catalitzadora BirA. Per comprovar que CR2-BCCP era marcat específicament a la regió de BCCP, vam utilitzar CR2 (SCR1,15) com a control negatiu de la reacció. Es van resoldre ambdues barreges de reacció amb SDS-PAGE i western blot, on es va utilitzar estreptavidina marcada amb HRP per detectar la incorporació de biotina. Com s'observa a la figura 8, només CR2-BCCP va incorporar biotina, la qual cosa ens indicava que la reacció era específica. Degut a la poca quantitat de proteïna expressada i la impuresa de la mostra, es va calcular la quantitat de CR2-BCCP-biotina amb una corba patró de C3 marcat amb biotina amb SDS-PAGE i western blot (dades no mostrades).

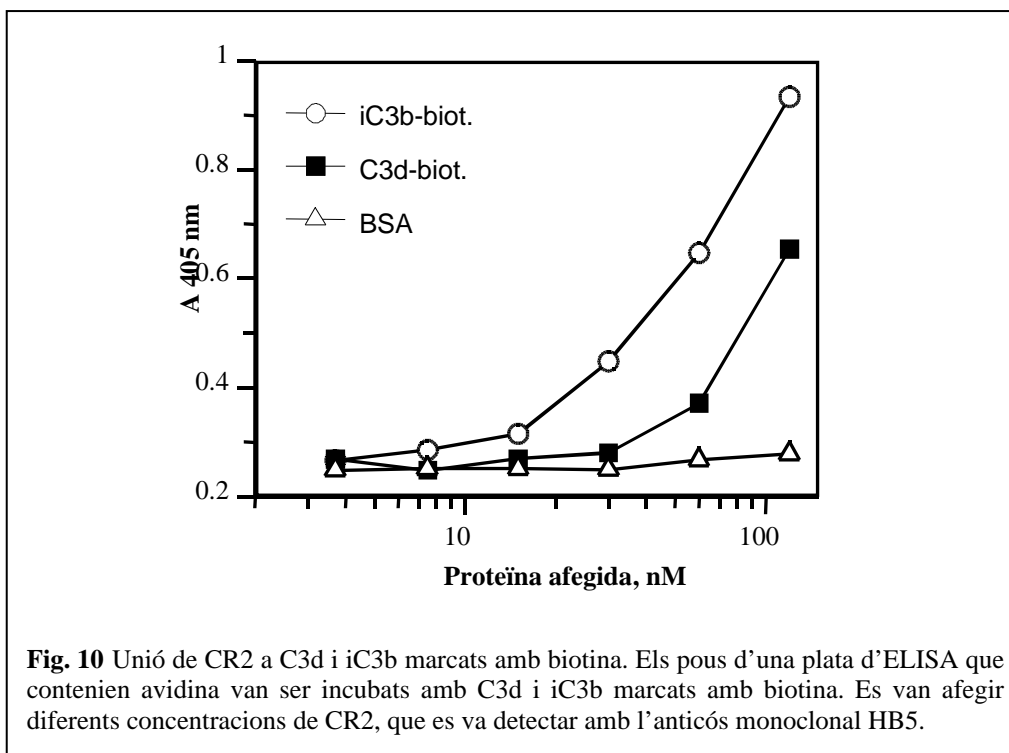


D'altra banda, la proteïna C3 es va marcar fent servir una reacció química, detallada en l'apartat de materials i mètodes. Per a comprovar l'especificitat d'aquesta reacció, és a dir, que només el lloc tioéster havia incorporat biotina, vam resoldre la proteïna per SDS-PAGE i western blot, i es va utilitzar estreptavidina marcada amb HRP per detectar la incorporació de biotina. (fig. 9). En gels SDS-PAGE en condicions reductores la cadena α i β de C3 són identificables per la diferència en el seu pes molecular, 110 i 70 Kda, respectivament. Si la reacció havia estat específica, només la cadena α de C3, on es localitza el lloc tioéster, hauria de reaccionar amb estreptavidina. Com s'observa a la figura 9, tan sols la cadena α va reaccionar amb estreptavidina

marcada amb HRP, indicant que les molècules de biotina s'havien incorporat a la cadena γ , i molt probablement, al lloc tioèster. A més a més, quan les digestions de C3 marcat amb biotina per obtenir els seus fragments van ser monitoritzades amb SDS-PAGE i western blot, només els fragments que contenen el lloc tioèster reaccionaven amb estreptavidina conjugada amb HRP (Fig. 9)

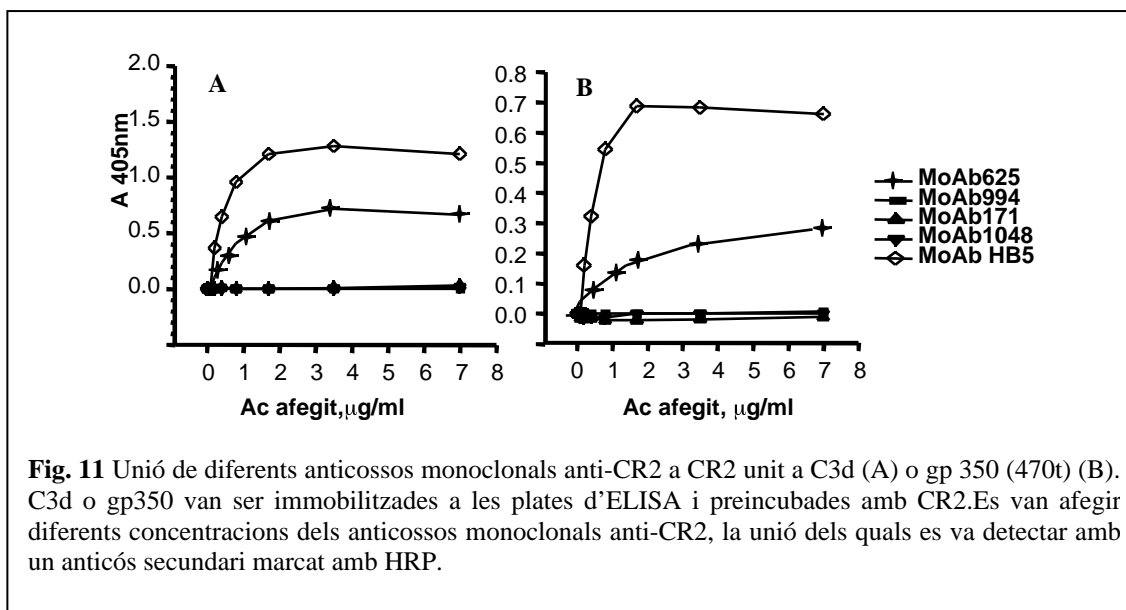


L'activitat de C3 i tots els fragments derivats va ser monitoritzada mitjançant assaigs d'ELISA, en els quals es va immobilitzar avidina als pous de la plata. Posteriorment es va afegir cadascun dels fragments de C3 marcats amb biotina. Es va comprovar la unió de diferents anticossos monoclonals anti-C3 (dades no mostrades), i del receptor de complement CR2 (Fig. 10).



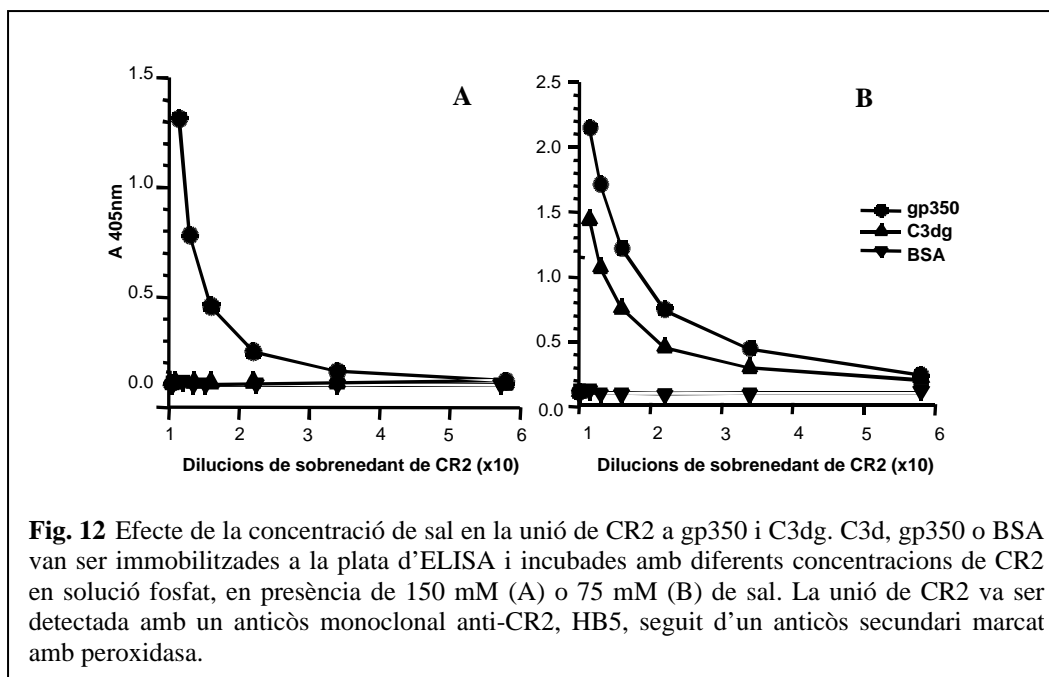
Unió de diferents anticossos monoclonals anti-CR2 a CR2 unit a C3d i gp350

S'ha descrit en la literatura que tot i que gp350 (470t) i C3d competeixen per la seva unió al receptor CR2, els residus en CR2 que interactuen amb els dos lligands no són exactament iguals (Molina et al., 1991). Per analitzar aquestes interaccions es va dissenyar un assaig d'ELISA (Fig. 11). Vam examinar la unió a CR2 de diferents anticossos monoclonals anti-CR2 quan aquest està unit als seus lligands, C3d, i gp350 (470t). En aquest assaig, C3d, i gp350 es van immobilitzar a les plates d'ELISA, i posteriorment es van incubar amb una concentració fixa de CR2. Aleshores, es van afegir diferents concentracions dels anticossos monoclonals 625, 994, 171, 1048, i HB5. En ambdós casos només els anticossos HB5 i 625 s'uniren a CR2. És a dir, els epítops de CR2 que reaccionen amb els anticossos 994, 171, i 1048 quedaven emmascarats en unir-se el receptor a gp350 o C3d. La unió d'aquests anticossos s'ha localitzat als dos primers dominis de CR2. Els anticossos HB5 i 1048, per altra banda, s'uneixen a altres dominis en CR2. Aquests resultats suggereixen que els residus en CR2 que interactuen amb gp350 i C3d són molt similars.



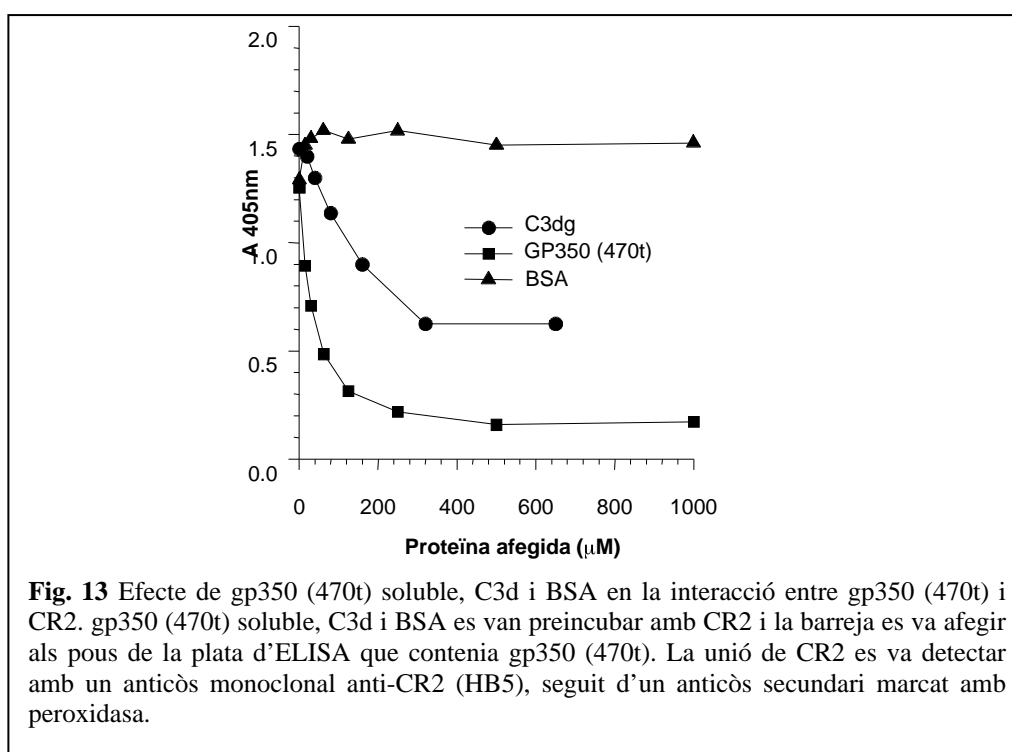
Efecte de la concentració de sal en la interacció de CR2 amb C3d i gp350

Per analitzar millor la unió de CR2 a C3d i gp350 (470t) van comprovar si la presència de diferents concentracions de sal afectarien aquestes interaccions. Així, van immobilitzar en el plat d'ELISA C3d, gp350 (470t), o BSA, on van ser incubades amb diferents concentracions de CR2, en una solució fosfat en presència de 150mM (A) o 75mM (B) de sal. La unió de CR2 es va detectar amb l'anticòs monoclonal HB5. Com s'observa a la fig. 12, la concentració de sal va tenir un efecte dràstic en la unió de C3d a CR2. Mentre que a 150 mM de sal no s'observa unió de C3d a CR2, aquesta unió és evident en presència de 75 mM de sal. La unió de gp350 (470t) a CR2 sembla incrementar en 75 mM de sal, però l'efecte de la quantitat de sal a la solució no és tan dràstic. Aquests resultats indiquen que la interacció C3d-CR2 és diferent de la interacció gp350-CR2. Tot i que ambdues proteïnes competeixen per la unió al receptor, les interaccions electrostàtiques semblen ser molt importants per a la unió de C3d amb CR2. En canvi, la unió de gp350 podria involucrar interaccions electrostàtiques, però aquestes no jugarien un paper tan important. Aquest resultat també suggereix que l'afinitat de gp350 per CR2 és més alta que la de C3d per al receptor.



Competició entre gp350 i C3d per la unió a CR2

Els resultats de la figura anterior indicaven que gp350(470t) té una afinitat més gran d'unió a CR2 que C3d. Per comprovar aquesta diferència d'afinitats, es va realitzar un assaig ELISA de competició en el qual es va immobilitzar gp350 (470t) als pous de la plata (Fig. 13). Aleshores es va preincubar CR2 amb diferents concentracions de C3dg, gp350 o BSA, els quals es van afegir a la plata d'ELISA. La unió de CR2 va ser detectada amb un anticòs monoclonal anti-CR2, HB5, seguit d'un anticòs secundari marcat amb peroxidasa. Com es pot observar a la figura 13, ambdues C3d i gp350, però no BSA, inhibien la unió en una manera dosi-depenent, però la concentració de CR2 requerida per inhibir la unió fou 25 cops més alta que la de gp350. Aquest assaig es va haver de realitzar a una concentració de sal de 75 mM, per permetre la unió de C3d a CR2 (mirar la figura anterior). Aquests resultats suggereixen que gp350 té una afinitat aparent més alta per CR2 que C3d.



4.3 Treball 5

**“Anàlisi cinètica de la interacció del receptor de complement 2
(CR2, CD21) amb els seus lligands C3d, iC3b i la glicoproteïna del
virus de l’Epstein Barr gp350/220”
(Sarrias et al., 2001)**

Resum

Els mecanismes moleculars implicats en la interacció de CR2 amb els seus lligands naturals iC3b i C3d són força desconeguts. Estudis sobre el/s lloc/s d’unió del receptor en C3 i les afinitats dels fragments de C3 per a CR2 semblen ser polèmics. En aquest estudi, hem utilitzat la tecnologia de ressonància de plasmon de superfície (SPR) per a estudiar la interacció de CR2 amb els seus lligands C3d, iC3b i la proteïna del virus de l’Epstein Barr gp350/220. Hem mesurat la cinètica d’unió del receptor als seus lligands, examinat la influència dels contactes iònics en aquestes interaccions, i investigat si iC3b immobilitzat o soluble s’unia amb cinètiques similars a CR2. Els nostres resultats indiquen que i) la unió de gp350 a CR2 segueix un model simple d’interacció 1:1, mentre que la interacció dels fragments de C3 és més complexa i inclou més d’un component, ii) existeixen diferències cinètiques entre la unió de C3d i iC3b a CR2, i iii) iC3b s’uneix a CR2 amb diferents cinètiques depenent de si està en solució o immobilitzat a la superfície. Aquests resultats suggereixen que la unió de CR2 a iC3b i C3d és més complexa del que s’havia pensat prèviament

Materials i mètodes

Proteïnes recombinants i de sèrum

En aquest estudi hem utilitzat una forma truncada de la proteïna d'EBV gp350/220 (gp350(470t)), l'ectodomini de CR2 (CR2 soluble que contenia els dominis SCR 1-15), i CR2 soluble en fusió amb un senyal de biotinització (CR2-BCCP) a la part C-terminal. També hem expressat la proteïna BirA, la qual catalitza la incorporació de biotina a BCCP. L'expressió, purificació i caracterització de les proteïnes recombinants ha estat detallada en el capítol 4 d'aquesta tesi. De la mateixa manera, la purificació de la proteïna C3 i la digestió d'aquesta per obtenir els fragments C3d i iC3b ha estat detallada en el capítol 4 d'aquesta tesi.

Marcatge específic de C3 i CR2-BCCP amb biotina

Per incorporar biotina a un sol residu en CR2-BCCP i C3, es van fer servir les següents estratègies: 1) El marcatge de CR2-BCCP es va aconseguir en presència de la proteïna BirA, la qual va catalitzar la reacció. 2) El marcatge de C3 i els fragments derivats es va fer utilitzant biotina activada EZ-Link™ PEO-maleimida (Pierce, Rockford, IL.) Els detalls d'ambdues reaccions han estat descrits en el capítol 4 d'aquesta tesi.

Assaigs de ressonància de plasmon de superfície (SPR)

Les cinètiques d'unió de CR2 als seus lligands C3d, iC3b i gp350 van ser determinades en el biosensor Biacore X (Biacore, Piscataway, NJ). Tots els experiments es van produir a 25 °C, en solució PBS que contenia 0.05% Tween-20, pH 7.4, amb condicions fisiològiques de sal (150 mM NaCl), o 75 mM NaCl. Per orientar les proteïnes al xip, i obtenir una superfície de lligand homogènia, les proteïnes es van marcar amb biotina a un residu específic, i llavors es van immobilitzar en un xip d'estreptavidina (Sensor Chip SA, Biacore, AB). Es van immobilitzar 140 RU de CR2, 250 RU de C3d o 350 RU d'iC3b a la cèl·lula de flux 2 (Fc2), mentre que la cèl·lula de flux 1 (Fc1) es va utilitzar com a control. La unió es va mesurar a 50 µl/min, per evitar problemes de transport de massa. El flux es va permetre durant alguns segons, per establir una línia base, i llavors es van injectar diferents concentracions de l'anàlit i l'associació es va seguir durant 120 seg. En aquest moment, la mostra es va substituir

amb PBS-Tween-20 0.05%, i la dissociació del complex es va monitoritzar durant 240 seg. El xip es va regenerar amb polsos curts de sodi carbonat 0.2 M, pH 9.5. L'activitat de la proteïna immobilitzada es va comprovar observant la resposta de la unió d'una concentració concreta d'analit durant l'experiment. Les dades del biosensor provinents de la cèl·lula control Fc1 es van restar de les dades obtingudes de la cèl·lula Fc2. També es van fer diferents injeccions de PBS-Tween-20 0.05%, les quals es van restar de les dades de la Fc2. Per analitzar les dades es va utilitzar el software de Biacore (Biaevaluation 3.0), fent servir l'ajustament global (global fitting). L'anàlisi lineal de les dades d'unió es van obtenir com s'ha descrit prèviament (Sahu et al., 2000), expressant-les en un gràfic de dRU/dt vs RU, on RU és la resposta relativa del biosensor en temps t. La constant de dissociació en l'equilibri (K_D) es calcula amb l'equació $K_D = K_{off}/K_{on}$

Resultats

Anàlisi cinètica de la interacció de CR2 amb els seus lligands

En aquest estudi hem examinat la interacció de CR2 amb els seus lligands amb la tecnologia d'SPR, fent servir un biosensor Biacore X. És possible que C3d i iC3b tinguin diferents afinitats per CR2 soluble o unit a la superfície. D'una manera similar, les afinitats de CR2 per C3d/iC3b en fase fluida o ancorat a una superfície (per exemple, quan C3d/iC3b estan ancorats a partícules activadores de complement) podria variar depenent de la diferent accessibilitat dels residus que participen en la interacció. Així doncs, per a entendre millor aquestes interaccions, hem 1) analitzat la unió de C3d, iC3b i gp350 a CR2 immobilitzat en el xip, i 2) estudiat la interacció de CR2 soluble amb iC3b i C3d immobilitzats en el xip.

Quan hem estudiat la unió de gp350 (470t) a CR2 immobilitzat en el xip hem trobat que la unió de gp350 (470t) a CR2 és dosi-depenent i saturable. L'anàlisi de les dades d'unió fent servir "global fitting" (amb el software de Biaevaluation 3.0), va demostrar ajustar-se força bé a un model d'unió de Langmuir 1:1 ($A + B \rightleftharpoons AB$, Fig 1A). Una distribució aleatòria dels residuals i un valor de χ^2 per a aquesta interacció d' 1.8, indicava que aquest model descriu bé les dades experimentals.

Seguidament vam analitzar la interacció de CR2 amb els seus lligands naturals, els fragments de C3, C3d i iC3b. Es van realitzar experiments en els quals C3d i iC3b soluble es van unir a CR2 immobilitzat. Només es va poder analitzar la cinètica d'unió d' iC3b. Les dades corresponents a la unió de C3d soluble a CR2 immobilitzat no foren reproduïbles i per tant no es van incloure en aquest estudi, però sospitem que això fou degut a limitacions de la superfície. També vam examinar la situació inversa, és a dir, es va injectar soluble CR2 en un xip que contenia C3d o iC3d immobilitzats. Quan vam analitzar aquestes unions amb l'anàlisi de "global fitting", les dades no s'ajustaven a un model d'unió de Langmuir 1:1. Tot i que els valors de χ^2 per a aquestes interaccions eren menors de 2, els valors obtinguts per la resposta màxima (R_{max}) eren menors que els valors esperats, fins i tot menors que les respostes observades. La transformació lineal de les dades d'unió demostraren gràfics no lineals, (Fig. 1), indicant que la unió segueix models complexos.

Diferents dades del nostre laboratori i altres han indicat que dues regions en CR2 (Molina et al., 1991; Molina et al., 1995) i més d'una regió en C3d/iC3b (Clemenza and Isenman, 2000; Diefenbach and Isenman, 1995; Esparza et al., 1991; Lambris et al., 1985; Nagar et al., 1998; Servis and Lambris, 1989) participen en la interacció de C3d/iC3b amb el receptor. Així doncs, és possible que dues regions en C3d/iC3b interactuïn amb dues regions de CR2. Per comprovar aquesta possibilitat, vam intentar ajustar les nostres dades a un model d'unió bivalent: $AA + B \rightleftharpoons AAB$; $AAB + B \rightleftharpoons AABB$ (Fig. 1). Aquestes dades inclouen la unió de CR2 a iC3b i C3d immobilitzats al xip i la unió d'iC3b a CR2 immobilitzat al xip. Aquest darrer experiment es va realitzar en presència de 75 mM NaCl la qual cosa ens va permetre observar millor la unió. Per a aquestes anàlisis, els valors dels residuals i X^2 estaven entre 1 a 3, i 1.5-2.1, respectivament, i els residuals estaven distribuïts homogèniament al voltant de l'ajustament. A més, els valors per a R_{max} s'apropaven a la resposta màxima esperada. Altres models, com el del canvi conformacional no describen bé les dades obtingudes. Un model d'unió de dos passos descriu bé les dades, on dos o més passos en la unió estan afectant l'equilibri d'unió entre CR2 i C3d, i CR2 i iC3b. Els gràfics per a aquestes dades amb el resultat del global fitting a un model d'unió bivalent per la interacció d'iC3b amb CR2 immobilitzat es mostren a la figura 1B, i els de la unió de CR2 soluble a C3d o iC3b immobilitzats es mostren a les figures 1C i 1D, respectivament. Les constants cinètiques de la unió de CR2 amb els seus lligands obtingudes amb l'anàlisi global fitting es resumeixen a la taula I.

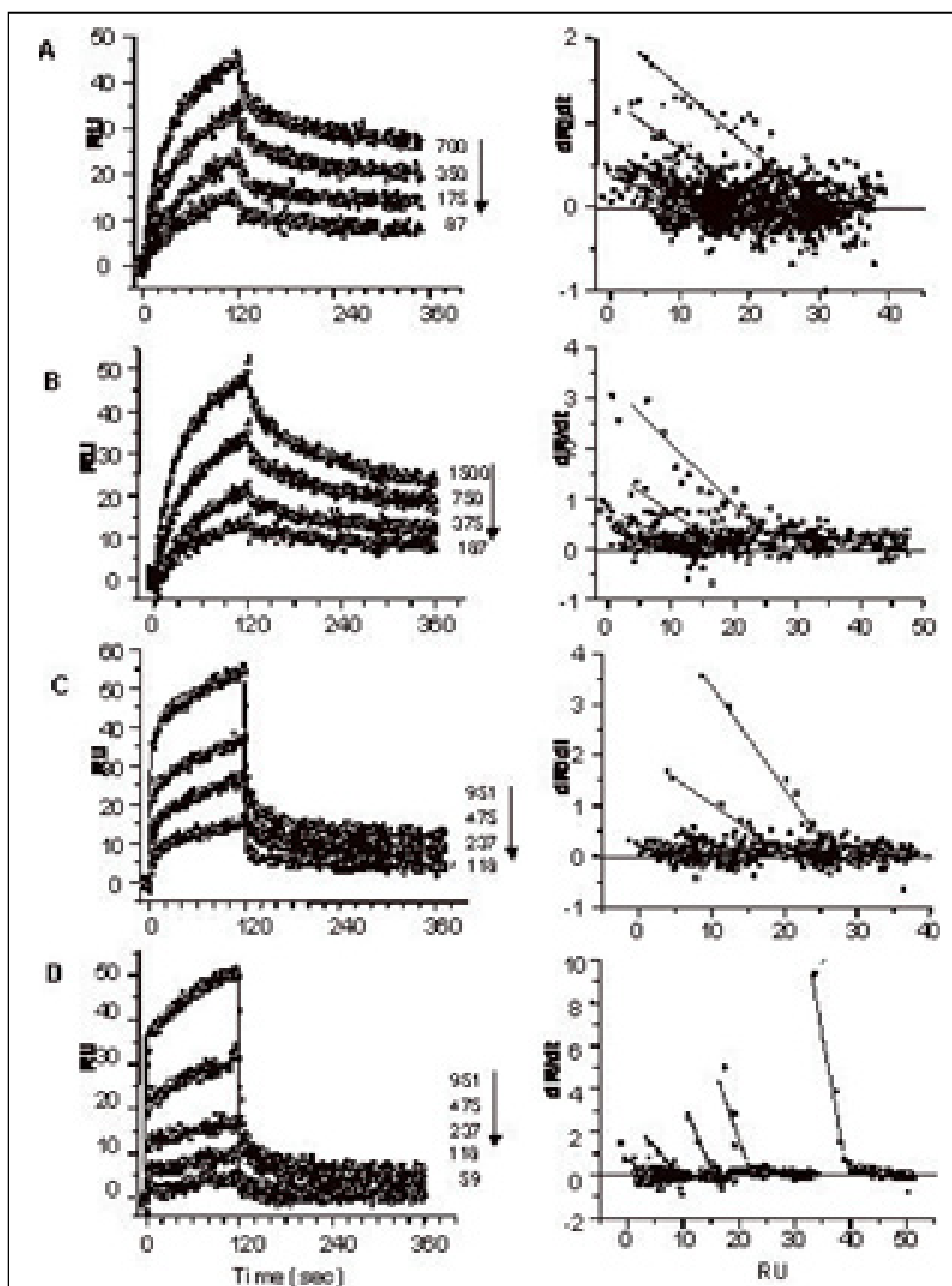


Figura 1 Anàlisi de launió de CR2 amb els seus lligands gp350, C3d, i iC3b amb SPR. Columna esquerra, sensogrames de la interacció de CR2-BCCP immobilitzat amb gp350 (470t) (A), i iC3b (B), així com de la interacció de CR2 soluble amb C3d immobilitzat (C), i iC3b (D). La concentració d' analit injectat, nM, s' indica al costat del sensograma. Les línies sòlides són el resultat del "global fitting". La unió de gp350 (470t) (A) es va poder ajustar a un model d' interacció 1:1, mentre que la unió dels fragments de C3 al receptor es va ajustar a una interacció bivalent. La columna de la dreta mostra la transformació lineal de les dades d' associació.

Taula I Valors cinètics per a la interacció de CR2 amb els seus lligands gp350, iC3b i C3d¹

immobilitzat	Soluble	$k_{d1}(1/s) / k_{a1}(1/M\ s)$	$SE^f(k_{d1}/k_{a1})$	K_{D1}	$k_{d2}(1/s) / k_{a2}(1/Ms^b)$	$SE^f(k_{d2}/k_{a2})$	K_{D2}	χ^2	E. Rmax Calc. Rmax ^d (RU)
CR2	gp350	$1.5 \times 10^{-3} / 3.3 \times 10^4$	$1.7 \times 10^{-5} / 160$	45 nM	N. A. ^g	N. A.	N. A.	1.8	88 / 40
CR2	iC3b ^a	$0.0293 / 4.7 \times 10^3$	$8.2 \times 10^{-4} / 32$	6.2 μ M	$1.28 \times 10^{-3} / 4148$	$2.52 \times 10^{-5} / 61$	308 nM	1.51	163 / 114
C3b	CR2	$0.247 / 3.9 \times 10^4$	$4 \times 10^{-3} / 8 \times 10^2$	6.3 μ M	$1.52 \times 10^{-3} / 2134$	$3.8 \times 10^{-5} / 3.8$	712 nM	1.7	238 / 192
C3d	CR2	$0.082 / 1.9 \times 10^4$	$6 \times 10^{-3} / 1 \times 10^3$	4.3 μ M	$1.1 \times 10^{-3} / 4245$	$1.6 \times 10^{-9} / 8.5$	259 nM	2.37	828 / 124
CR2	gp350 ^a	$5.5 \times 10^{-4} / 1.2 \times 10^5$	$5.5 \times 10^{-6} / 534$	4.6 nM	N. A.	N. A.	N.A.	1.35	88 / 40
C3d	CR2 ^a	$0.202 / 7.24 \times 10^4$	$3.1 \times 10^{-3} / 998$	2.8 μ M	$8.28 \times 10^{-4} / 3584$	$8.9 \times 10^{-6} / 50$	231 nM	1.67	828 / 114
C3b	CR2 ^a	$0.332 / 2.74 \times 10^5$	$6 \times 10^{-3} / 5 \times 10^3$	1.2 μ M	$5.9 \times 10^{-4} / 1055$	$1.5 \times 10^{-5} / 10$	559 nM	2.39	238 / 139

¹ Les dades representen la mitja d'experiments fets en duplicat

^a Experiments fets a 75 mM NaCl

^b $k_{a2}(1/Ms) = k_{a2}(1/RUs) \times 100 \times$ (pes molecular de la proteïna immobilitzada)

^c E. (expected) Rmax = RU immobilitzat x pes molecular de la proteïna soluble / pes molecular proteïna immobilitzada

^d Calc. (calculated) Rmax = Rmax obtinguda el l'anàlisi de "global fitting"

^f Standard error from the fit

^g N. A. Non-applicable

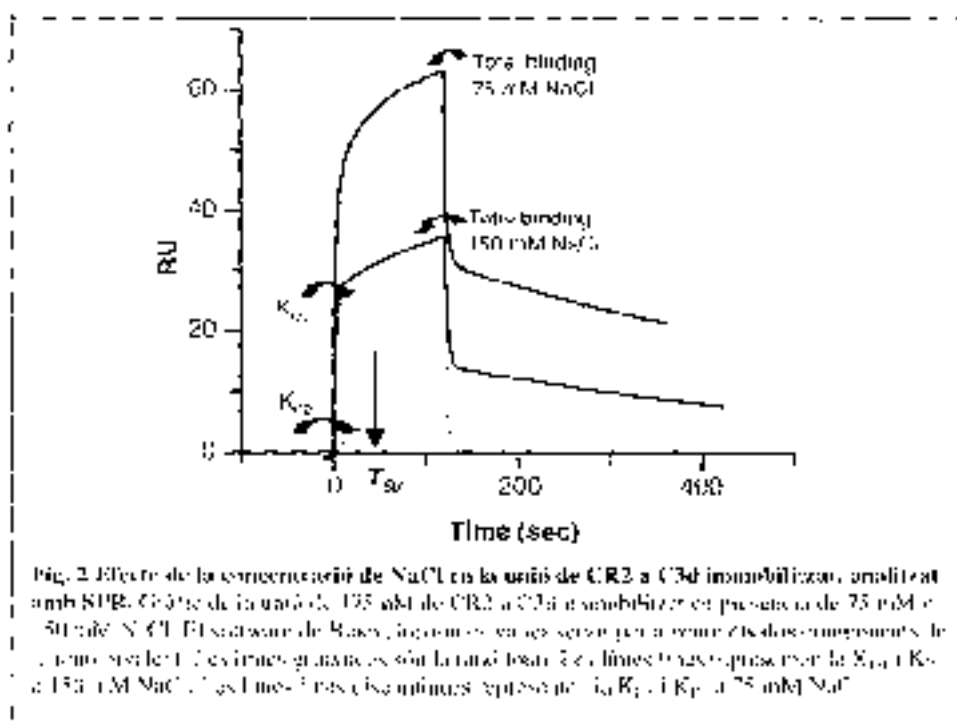
Efecte de la sal en la cinètica d'unió de CR2 amb els seus lligands

La publicació recent de l'estructura cristal·logràfica de C3d (Nagar et al., 1998) i l'anàlisi per mutació dels aminoàcids de C3d amb càrrega (Clemenza and Isenman, 2000) han remarcat la importància dels contactes iònics en la interacció de C3d amb CR2. Per poder entendre la influència dels contactes iònics en la cinètica de les interaccions de CR2 amb els seus lligands, hem estudiat aquestes interaccions a diferents concentracions de sal fent servir la tecnologia SPR.

En el nostre estudi hem mesurat la unió de CR2 amb els seus lligands a condicions fisiològiques de sal (150 mM NaCl), i 75 mM NaCl. En totes les interaccions analitzades, una disminució en la quantitat de sal disminuï aproximadament 4 i 5 cops la quantitat de C3d/iC3b o gp350, respectivament, necessària per a obtenir respostes similars (dades no mostrades). Així doncs, disminuint la quantitat de sal es facilita aparentment la unió de CR2 als seus lligands, incrementant l'afinitat d'aquestes interaccions.

Aleshores vam intentar ajustar les dades d'unió a models cinètics. La unió de gp350 a CR2 immobilitzat i la de CR2 a C3d i iC3b immobilitzats s'ajustaren bé als models 1:1 i bivalent, respectivament (dades no mostrades). Aquestes dades suggereixen que el mecanisme d'unió de CR2 a C3d, iC3b, i gp350 no depen de la força iònica de la solució. Els valors de K_D obtinguts per a aquesta interacció es presenten a la taula I.

Per entendre millor el significat d'aquests valors en la unió de CR2 a C3d, hem representat els sensogrames de la unió de CR2 soluble amb C3d en presència de 75 o 150 mM de sal. S'observa en la figura 2 com la unió total de 475 nM de CR2 va augmentar en disminuir la concentració de sal. Aleshores les corbes d'unió total es van separar en els components del model bivalent. Això ens va permetre analitzar el paràmetre T_{50} , que com van definir Lipschultz et al. (Lipschultz et al., 2000), és el temps en la fase d'associació en la qual els complexos de contacte i final són equimolars. T_{50} a 75 mM de sal és 40 seg., mentre que a 150 mM de sal aquest valor no es pot observar. Així doncs, sembla ser que la unió inicial dependent de càrrega és crítica per a la formació estable dels complexos C3d-CR2 o iC3b-CR2.



L'orientació de l'assaig afecta la cinètica d'unió d'iC3b a CR2

Per poder determinar si l'orientació de l'assaig afectava la cinètica de la formació del complex iC3b-CR2, vam comparar la unió de CR2 soluble a iC3b, i viceversa, en presència de 75 mM NaCl. Aquesta comparació es demostra a la figura 3. A més, les fases inicials d'associació i dissociació foren més ràpides quan CR2 soluble es va unir a iC3b immobilitzat (Fig. 3A) que en la situació contrària (Fig. 3B). Aquesta observació suggereix que el disseny experimental podria afectar la interacció de CR2 amb els seus lligands en funció del temps.

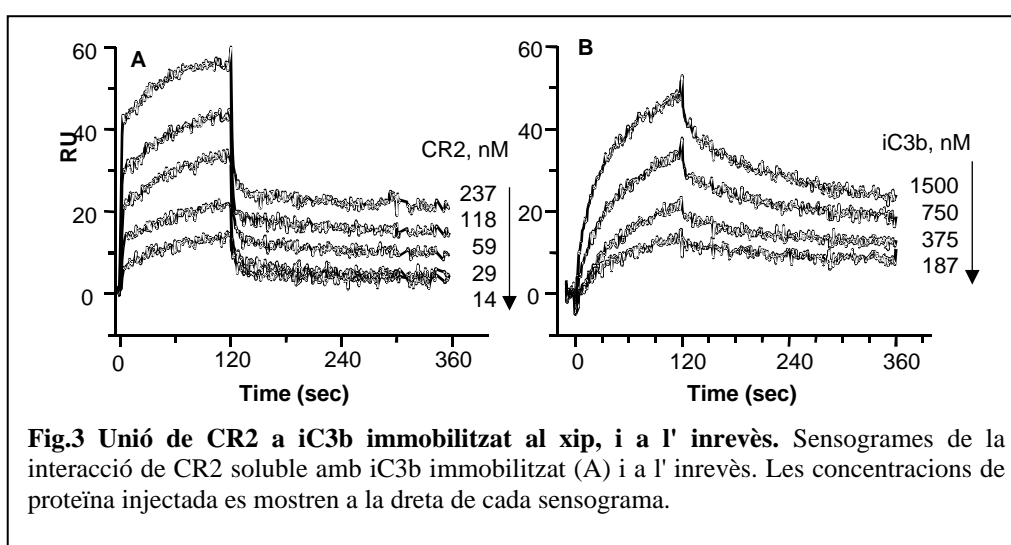


Fig.3 Unió de CR2 a iC3b immobilitzat al xip, i a l' inrevès. Sensogrames de la interacció de CR2 soluble amb iC3b immobilitzat (A) i a l' inrevès. Les concentracions de proteïna injectada es mostren a la dreta de cada sensograma.

Discussió

En aquest estudi hem utilitzat la tecnologia de SPR per analitzar la interacció de CR2 amb els seus lligands, C3d, iC3b i gp350/220 d'EBV. Tot i que la importància d'aquestes interaccions ha estat demostrada per diferents grups (Bohnsack and Cooper, 1988; Carroll, 1998; Carroll and Prodeus, 1998; Dempsey et al., 1996; Einhorn et al., 1978; Fearon and Carter, 1995; Fearon and Locksley, 1996; Fischer et al., 1998; Lambris et al., 1999; Noorchashm et al., 1999; Prodeus et al., 1998; Song et al., 2000), la naturalesa i els mecanismes moleculars involucrats encara no són clars. Nosaltres hem demostrat que el mecanisme d'unió de CR2 varia amb els seus lligands: la seva unió a gp350 segueix un model d'unió simple 1:1, mentre que la seva unió a C3d i iC3b és més complex i suggereix la participació de més d'un lloc en aquestes interaccions. A més, les nostres dades demostren diferències en la cinètica d'unió d'iC3b a CR2 respecte la de C3d a CR2, la qual cosa suggereix que les regions en iC3b que participen a la interacció amb CR2 podrien ser diferents o podrien estar diferentment exposades en les dues molècules.

En un intent d'imitar l'orientació *in vivo* d'aquestes proteïnes, les hem marcades amb biotina a residus clau, és a dir, el residu Cis⁹⁸⁸ que participa en la formació de l'enllaç tioéster en C3 (Law and Dodds, 1997; Levine and Dodds, 1990; Sahu et al., 1994), i la part C-terminal de CR2. La immobilització de C3d/iC3b marcades amb biotina en una superfície d'estreptavidina (és a dir, el xip de Biacore), imita la deposició de C3 en les partícules activadores. De la mateixa manera, la immobilització d'una molècula de CR2 que conté biotina a la part C-terminal imita l'ancoratge a la superfície cel·lular. L'orientació de les proteïnes d'aquesta manera és avantatjosa respecte a la unió a l'atzar dels grups amino en el xip, mètode que és força utilitzat en aquest tipus d'assaigs, perquè produeix una superfície de lligand homogènia, la qual cosa facilita la mesura de constants d'unió homogènies.

Per a estudiar la interacció de CR2 amb gp350 d'EBV, vam expressar una forma truncada de gp350/220, que consisteix en els residus 1-470 perquè es va demostrar prèviament que aquesta part de la molècula inhibeix la unió de l'EBV a CR2 (Tanner et al., 1988). Aquest resultat suggeria que gp350 (470t) conté totes les regions necessàries

per a la unió amb CR2. Les dades de SPR obtingudes per a aquesta interacció van demostrar un ajustament bo a un model Langmuir d'uníó simple 1:1 (Fig.1). El valor aparent per a la K_D obtingut per a aquesta interacció fou 45 nM (taula I). L'afinitat d'uníó de gp350 a CR2 ha estat prèviament determinada en assaigs d'equilibri d'uníó fent servir dos dissenys experimentals diferents. Tanner et al. van examinar l'habilitat de gp350/220 d'inhibir la unió de gp350/220 marcada amb ^{125}I a cèl·lules que expressen CR2 (cèl·lules Raji) (Tanner et al., 1988). Per altra banda, Moore et al. van estudiar la unió de CR2 soluble a gp350/220 mesurant els canvis en la mobilitat del complex CR2-gp350/220 en la ultracentrífuga en funció de la concentració de lligand (Moore et al., 1989). Els valors obtinguts foren 12 nM i 3.2 nM, respectivament. Les diferències observades entre aquests estudis podrien demostrar diferents afinitats de CR2 per gp350/220 quan el receptor és present en la superfície cel·lular o en solució. Les diferències en el valor de la K_D observades entre aquest estudi (CR2 ancorat al xip, $K_D=45\text{nM}$), i l'estudi previ de Tanner et al. (CR2 present a la superfície cel·lular, $K_D=12\text{nM}$), podrien ser degudes a la mida de la proteïna feta servir en ambdós estudis. Aquest estudi ha utilitzat una proteïna truncada al residu 470 mentre que l'estudi anterior utilitzà tota la molècula. Així doncs, les dades suggereixen que altres regions a gp350 podrien participar directament o influenciar la seva unió a CR2.

Les nostres dades de l'anàlisi de la unió de CR2 amb els seus lligands naturals C3d i iC3b van revelar que aquestes interaccions no segueixen un model d'uníó 1:1 (Fig. 1). Aquests resultats podrien ser deguts a l'existència d'heterogeneïtat en la superfície del xip. Però vam eliminar l'heterogeneïtat de la superfície orientant les proteïnes immobilitzades. A més, l'habilitat d'ajustar les dades de la unió de gp350 a un model 1:1 ens indiquen que aquesta possibilitat és força remota. La transformació lineal de l'associació indicava gràfics no lineals (Fig 1). Aquests gràfics no lineals podrien ser conseqüència de diferents llocs d'uníó amb diferents afinitats, cooperativitat o models més complexes. L'ajustament global de les dades d'uníó suggereix que la interacció entre CR2 i C3d/iC3b segueix un model bivalent (Fig1). És possible que dues regions d'una molècula de C3d/iC3b interactuïn amb dues regions en una molècula de CR2; així, l'estequiometria del complex seria 1:1, d'acord amb resultats previs de Moore et al. (Moore et al., 1989).

Diferents resultats indiquen que el model de múltiples llocs d'interacció és vàlid. Primer, s'ha demostrat que dues regions en els dominis SCR 1 i 2 de CR2 participen en la interacció amb C3 (Molina et al., 1991; Molina et al., 1995). A més, dades de diferents laboratoris indiquen que almenys dues regions en C3d participen en la seva interacció amb CR2 (Clemenza and Isenman, 2000; Lambris et al., 1985; Servis and Lambris, 1989). Tot i que les nostres dades indiquen clarament que les interaccions CR2-C3d/iC3b no segueixen un model simple d'unió 1:1, i les dades mostren dos components (Fig1, dreta), i s'ajusten bé a un model bivalent, (fig 1, esquerra), la complexitat del model ens impedeix concloure que aquestes interaccions són en efecte bivalents; com més complex és el model, el potencial per a molts mínims per a la funció de X^2 augmenta, cosa que fa disminuir l'estabilitat del procés d'ajustament. Així doncs, faria falta evidència més directa per a poder confirmar la validesa del model bivalent. La determinació de l'estructura dels co-cristalls dels dominis SCR 1 i 2 de CR2 amb C3d i iC3b confirmaria si aquestes interaccions són, en efecte, bivalents, o de naturalesa més complexa.

L'anàlisi més detallada de les nostres dades de SPR indica que la interacció de C3d i iC3b amb CR2 no són idèntiques. Tot i que ambdues interaccions semblen seguir un model complex, sembla que existeixen diferències significatives entre la unió de CR2 soluble amb C3d o iC3b immobilitzats. Per exemple, les dades k_{on} i k_{off} del primer component de C3d i iC3b difereixen entre elles més de dos cops (taula 1). Aquestes diferències podrien ser degudes a la participació dels residus en iC3b que interactuen amb CR2 localitzats fora de la regió de C3d (Esparza et al., 1991). Alternativament, alguns residus en la regió de C3d dins d' iC3b podrien ser menys accessibles a CR2 que en C3d. L'evidència que aquesta ocultació estèrica podria contribuir a la unió diferencial a CR2 es va presentar en un estudi que va utilitzar l' anticòs monoclonal 130. Aquest anticòs, el qual reconeix un lloc neoantigenic que s'expressa quan C3b és digerit a iC3b i inhibeix la unió a CR2, es va unir a C3d millor que a iC3b.

Les dades obtingudes tant en aquest (Fig. 2) com en estudis previs indiquen clarament que la unió de C3d a CR2 depèn en gran mesura de les interaccions iòniques. Les dades de SPR obtingudes en aquest estudi indiquen la participació de dos components en la interacció de C3d amb CR2 (Fig. 1, dreta). Per poder entendre millor

la influència dels contactes iònics en aquests components vam obtenir els valors de T_{50} (temps requerit per a assolir quantitats equimolars dels complexos inicial i final) per la unió de C3d a CR2 en condicions de sal fisiològiques i a 75 mM NaCl. Vam observar que quan disminuïem la quantitat de sal el temps requerit per a l'aparició de contactes secundaris es reduïa substancialment (Fig. 2). Aquest descobriment suggereix que el cluster carregat d'aminoàcids en C3d (E37, E39, E160, D163 i E166) que es coneix que influencien la unió de CR2 quan són absents, (Clemenza and Isenman, 2000) podrien participar en el segon component d'aquesta interacció. En absència d'aquests residus, la unió de CR2 a C3d podria tenir uns components d'associació i dissociació tan ràpids que n'impedirien la detecció en assaigs que no constitueixin cross-linking químic o SPR. Alternativament, aquests residus podrien contribuir a la interacció de manera cooperativa.

És possible que CR2 tingui diferents afinitats per els fragments de C3 en solució o units a una superfície (és a dir, units a la partícula activadora mitjançant el lloc tioéster). En aquest estudi hem examinat l'efecte de l'orientació del lligand en la cinètica d'unió d'iC3b a CR2. Hem observat diferències en els valors de K_{on} i K_{off} d'iC3b depenent de si estava orientat en la superfície o en solució. La formació del complex i dissociació fou inicialment més ràpida quan iC3b estava immobilitzada que quan estava en solució. La immobilització d'iC3b en el residu Cis⁹⁸⁸, el qual participa en la formació de l'enllaç tioéster podria fer que els residus que interactuen amb CR2 fossin més accessibles. L'expressió de diferents epítops quan C3 es troba en fase fluida vers quan està unida a la superfície s'ha descrit anteriorment. Nilsson et al. van trobar que la reactivitat de diferents anticossos monoclonals que reconeixen la cadena α de C3 variava quan els fragments de C3 estaven en solució o units a una superfície (Nilsson et al., 1992).

En resum, hem utilitzat la tecnologia de SPR per conèixer més a fons les interaccions entre CR2 i els seus lligands. Hem trobat que contràriament a gp350(470t), C3d i iC3b semblen unir-se a CR2 d'una manera complexa.

5. CONCLUSIONS I DISCUSSIÓ GENERAL

El plantejament d'aquesta tesi es basava en el concepte d'evasió del sistema immunològic humà per part dels patògens. Aquests s'han anat proveint al llarg de l'evolució d'un increïble dispositiu molecular per protegir-se del complex sistema de defensa de l'hoste. S'ha observat que diversos patògens no tan sols utilitzen els receptors cel·lulars per l'adsorció sino que a més a més podrien estar-ne modificant la interacció amb els seus lligands naturals per al seu propi benefici. Això ens va incitar a estudiar la interacció de dos receptors virals que formen part del sistema immunològic de l'hoste amb els seus lligands; hem treballat amb HveA, receptor del virus de l'herpes simplex, el qual pertany a la família dels receptors de factors de necrosi tumoral. També hem estudiat CR2, el receptor del virus de l'epstein barr, el qual forma part del sistema de complement. Les conclusions que ens agradaria destacar d'ambdós treballs són les següents:

1- L' screening de llibreries aleatòries en el fag M13 per trobar lligands peptídics de HveA va resultar en l'aïllament de dos pèptids, BP-1 i BP-2. Aquests pèptids van ser inicialment caracteritzats per la seva habilitat d'inhibir la interacció de HveA tant amb els seus lligands naturals, LT- i LIGHT, com amb la proteïna viral gD. En efecte, BP-1 era capaç d'inhibir la interacció HveA-LT- , mentre que BP-2 inhibia la interacció HveA-gD. Vam observar que BP-2 inhibia l'entrada del virus de l'herpes simplex a cèl·lules CHO que expressen HveA. Aquest primer treball resultava doncs en l'aïllament de dues noves molècules amb diversos potencials, entre els quals:

2- El poder disposar de BP-1 i BP-2 va facilitar el nostre estudi de les interaccions a nivell molecular entre el receptor HveA i LIGHT, LT- i gD. El fet de disposar de les formes recombinants d'aquestes proteïnes, a més de diversos anticossos monoclonals, ens va permetre fer una predicció inicial dels mecanismes moleculars implicats en la interacció de HveA amb els seus lligands. Incloure els pèptids BP-1 i BP-2 en la nostra anàlisi va ser clau per a poder interpretar els nostres resultats; per exemple, la utilització de molècules de mida reduïda en assaigs de competició pot reduir la probabilitat d'inhibició per oclusió estèrica si dos dels lligands interactuen amb residus molt propers en el receptor. Així, vam elaborar un model basat en els nostres resultats en el qual la

unió d'un lligand a HveA sembla induir un canvi conformacional en el receptor que n'impedeix la unió de l'altre.

Per altra banda, tot i no haver-hi treballat, ens agradaria destacar el potencial farmacològic d'ambdós pèptids. El pèptid BP-1 podria ser utilitzat en ocasions en que el sistema HveA-LT- estigués desregulat. Existeixen situacions descrites en les quals la LT- ha estat associada a malalties d'autoimmunitat contra teixits específics, com l'encefalomielitis autoimmune experimental (EAE), i, possiblement, l'artritis reumatoide (Korner H., and Sedwick, J.D., 1996). Tot i així som conscients que caldrà esperar a conèixer més a fons el paper de HveA dins el complex sistema de la família dels receptors de necrosi tumoral. També creiem que BP-2 podria ser un candidat idoni per al desenvolupament d'un compost inhibidor de la infecció per herpes simplex. Actualment es creu que HveA no és el principal receptor del virus, perquè no s'expressa en les cèl.lules que en formen el reservori natural, és a dir, l'epiteli i les cèl.lules neuronals. Tot i així la literatura recent comença a descriure la interacció del virus amb les cèl.lules T i dendrítiques, per inhibir l'atac del sistema immunològic. Impedir aquesta acció del virus podria ajudar a l'hoste a combatre'l millor, facilitant el correcte funcionament dels propis mecanismes de defensa de l'hoste.

Per al desenvolupament d'ambdós pèptids com a medicaments, seria idoni primer fer-ne estudis estructurals per poder determinar quins són els residus importants per llur activitat. Caldria també determinar-ne la vida mitja en sèrum, i tractar d'optimitzar-la analitzant-ne molècules anàlogues. S'hauria de determinar el seu potencial en sistemes animals models de la infecció. Un model ben establert és el ratolí, tot i que es coneixen diferències en el tropisme del virus i la manipulació que el virus fa del sistema immunològic entre aquest animal i el ser humà. Finalment, s'hauria de comprovar la toxicitat dels pèptids.

3- L'èxit de la utilització de la tècnica d'escreening amb les llibreries aleatòries en el fag M13 amb el receptor HveA, ens va inspirar a aventurar-nos a intentar trobar lligands peptídics de HveC. HveC s'expressa a cèl.lules neuronals, i es creu que aquesta proteïna podria ser la principal mediadora de l'entrada del virus en aquest tipus cel.lular. Aquest escreening va resultar, sorprenentment, en l'aïllament del pèptid C-6, capaç

d'unir-se a ambdòs receptors, HveA i HveC. Així, dels nostres resultats concluiem que C-6 podria constituir un agonista de la proteïna viral gD. En tot cas, es tractaria d'un agonista estructural, perquè no vam trobar cap semblança de seqüència entre C-6 i gD. Tot i la inhabilitat del pèptid d'inhibir la interacció gD-HveC o gD-HveA, aquest treball reiterava el potencial de la tècnica d'escreening amb llibreries aleatòries.

Un fet a destacar dels tres nous pèptids aïllats durant el nostre treball és que malgrat que tots tres s'unien a HveA, i en el cas de BP-1 i BP-2 competien amb els seus lligands, no en vam trobar cap semblança de seqüència en les bases de dades. Aquest fet ens remarca com fer un escreening aleatori ens facilita l'aïllament d'estructures noves amb una activitat biològica determinada, cosa que altrament seria molt difícil de dissenyar racionalment. Per exemple, mentre finalitzàvem la redacció d'aquesta tesi, es va resoldre l'estructura cristal·logràfica de gD unit a l'ectodomini de HveA (Dr. C. Whitbeck, comunicació personal). Aquestes dades demostraven que existeixen dues regions de contacte en gD amb el receptor. Els autors d'aquest treball van sintetitzar dos pèptids que contenien la seqüència d'aquestes regions, i en van provar l'habilitat d'inhibir la interacció gD-HveA, en assaigs d'ELISA. En aquest experiment van utilitzar el pèptid BP-2 com a control positiu. Tan sols el pèptid BP-2 fou capaç d'inhibir la unió de gD a HveA. És possible que existeixin determinants estructurals en gD fora de la regió continguda en els pèptids derivats de la seva seqüència que n'influencïn la unió a HveA, probablement incrementant-ne l'afinitat.

4- Per a l'estudi de la interacció del receptor de complement CR2 amb els seus lligands naturals C3d i iC3b, i la proteïna viral gp350 vam utilitzar la tecnologia de SPR. Una factor clau per als nostres resultats fou el disseny d'aquests experiments. Vam idear una manera d'orientar tant el receptor com els fragments de C3 simulant la seva situació *in vivo*. És a dir, la immobilització de CR2 imitava l'ancoratge a la superfície cel·lular; la immobilització de C3d/iC3b imitava la deposició de C3 en les partícules activadores. S'ha demostrat que C3 canvia de conformació durant la seva digestió per les proteases de complement, així com si està en fase soluble o ancorada a les superfícies. De fet, en el nostre estudi vam observar diferències en la cinètica d'unió d'iC3b a CR2 depenent de quina molècula estava orientada. Els nostres resultats suggerien que el disseny experimental pot influenciar aquestes interaccions, i aquest

podria ser un dels motius de les discrepàncies que es toben a la literatura respecte els mecanismes moleculars implicats en la interacció de CR2 amb els fragments de C3.

De fet, mentre finalitzavem el nostre treball amb CR2, el Dr. Holers i col.laboradors van aconseguir resoldre l'estructura cristal·logràfica de CR2 unit a C3d. El resultat fou sorprenent; en primer lloc els residus de contacte en C3d per a CR2 no són els anteriorment proposats (Fig. 4 de la part EBV: introducció). Tot i així, la interacció C3d-CR2 sembla ser complexa, i hi participa més d'una regió en C3d, la qual cosa valida els nostres resultats dels experiments amb Biacore (Dr. Holers, comunicació personal).

Els resultats del nostre treball plantejen moltes qüestions que caldrà resoldre en el futur. Vam observar que les interaccions CR2-C3d/iC3b són de caire complexe, i molt probablement existeixen efectes de cooperativitat en aquestes interaccions; com afecta aquesta complexitat en els esdeveniments posteriors relacionats amb la funció de C3d com a adjuvant natural? Diferents treballs coincideixen en què es necessiten múltiples còpies de C3d units a l'antigen per observar aquest efecte estimulador de la resposta adaptiva (Ross, T.M., et al. 2000, Dempsey et al, 1996). A més, quan pèptids corresponents a la regió 224-247 es van provar per la seva habilitat d'afectar la proliferació de cèl.lules B (Raji) que expressen el receptor, es va observar que pèptids multimèrics n'estimulaven la proliferació. En canvi, pèptids monomèrics de la mateixa seqüència, n'inhibien aquest efecte proliferador (Servis C., and Lambris, J.D., 1989). Una altra qüestió que caldrà resoldre és si les diferències observades entre la unió de C3d i iC3b a CR2 es reflecteixen en diferències funcionals entre els diferents fragments de C3.

5- Ens va interessar comparar la interacció de CR2-gp350 amb la dels seus lligands naturals. Hem trobat que contràriament a gp350(470t), C3d i iC3b semblen unir-se a CR2 d'una manera complexa. Podria ser que en estudiar només la porció N-terminal de gp350 haguem eliminat un grau de complexitat en la seva interacció amb el receptor. De fet, observavem una afinitat d'unió menor per a aquesta proteïna truncada que en estudis anteriors, on s'havia treballat amb tot l'ectodomini de gp350. Aquesta diferència

d'afinitats també podria ser deguda a les diferents tècniques utilitzades per a estudiar aquestes interaccions.

La interacció gp350-CR2 ha estat prèviament comparada a la de la glicoproteïna gp120 del virus de la immunodeficiència adquirida (HIV-1), amb el receptor cel.lular CD4. Existeix un paral.lelisme molt interessant; en ambdós casos la proteïna viral competeix amb els lligands naturals de l'hoste per la unió al receptor cel.lular, els fragments de C3 en el cas de CR2, i els complexos d'histocompatibilitat de tipus II (MHC-II) expressats en les cèl.lules B, en el cas de CD4 (Clayton, L.K. et al. 1989). En el treball de Clayton et al. es comparava la unió de CD4 amb gp120 i la de CD4 amb MHC-II fent servir la mutagenèsi dirigida de CD4. Els autors observaven que mutacions en CD4 que destrueixen la unió de gp120 també destrueixen la unió del receptor cel.lular amb MHC-II. Però també existien altres mutacions que no tenien cap efecte en la unió de gp120 i eliminaven completament o parcialment la unió de MHC-II. Els autors conclueixen que és possible que el lloc d'unió de CD4 per MHC-II sigui més complex que el de gp120. Posteriorment l' estructura cristal.logràfica de CD4 unida a gp120 ha demostrat que Trobem que aquests resultats s'aproximen molt al que nosaltres hem observat en la interacció de CR2 amb gp350 i els fragments de C3. És a dir, en ambdós casos la proteïna viral competeix amb el lligand natural de l'hoste per la unió al receptor, però sembla interactuar-hi d'una manera menys complexa. També en els dos casos la proteïna viral té una afinitat aparent aproximadament 100 vegades més alta per al receptor que els seus lligands naturals (Moore, M. D., et al, 1989). Seria interessant determinar si aquest paral.lelisme constitueix un patró comú d'estratègia adaptada per alguns virus al llarg de la seva evolució sota la pressió selectiva constant creada per el sistema immunològic de l'hoste.

6. REFERÈNCIES

(1996). Fields Virology, 3rd Edition, D. M. K. Fields Bernard N, Peter M. Howley, ed. (Philadelphia , USA: Lippincott-Raven).

(1997). Viral Pathogenesis, First Edition, N. Nathanson, ed. (Philadelphia , USA: Lippincott-Raven).

Adey, N., and Kay, B.K. (1996). Identification of calmodulin-binding peptide consensus sequences from a phage displayed random peptide library. *Gene* 169, 133-134.

Adey, N. B., Guo, R. , Hanson, H. L., Rider, J. E., Sparks, A. B. , Kay, B. K. (1996). Construction and Screening of M13 Phage-Displayed Random Peptide Libraries. *Methods in Molecular and Cellular Biology* 6, 34-45.

Alcami, A., and Koszinowski, U. H. (2000). Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol Today* 21, 447-455.

Banner, D. W., D'Arcy, A., Janes, W., Gentz, R., Schoenfeld, H. J., Broger, C., Loetscher, H., and Lesslauer, W. (1993). Crystal structure of the soluble human 55 kd TNF receptor-human TNF beta complex: implications for TNF receptor activation. *Cell* 73, 431-45.

Barlow, P. N., Steinkasserer, A., Norman, D. G., Kieffer, B., Wiles, A. P., Sim, R. B., and Campbell, I. D. (1993). Solution structure of a pair of complement modules by nuclear magnetic resonance. *J Mol Biol* 232, 268-84.

Beckett, D., Kovaleva, E., and Schatz, P. J. (1999). A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. *Protein Sci* 8, 921-9.

Bohnsack, J. F., and Cooper, N. R. (1988). CR2 ligands modulate human B cell activation. *J Immunol* 141, 2569-76.

- Bradbury, A., Persic, L., Werge, T., and Cattaneo, A. (1993). Use of living columns to select specific phage antibodies. *Biotechnology (N Y)* *11*, 1565-9.
- Browning, J. L., Dougas, I., Ngam-ek, A., Bourdon, P. R., Ehrenfels, B. N., Miatkowski, K., Zafari, M., Yampaglia, A. M., Lawton, P., Meier, W., and et al. (1995). Characterization of surface lymphotoxin forms. Use of specific monoclonal antibodies and soluble receptors. *J Immunol* *154*, 33-46.
- Carroll, M. C. (1998). The role of complement and complement receptors in induction and regulation of immunity. *Annu Rev Immunol* *16*, 545-68.
- Carroll, M. C., and Prodeus, A. P. (1998). Linkages of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol* *10*, 36-40.
- Carter, R. H., and Fearon, D. T. (1992). CD19: lowering the threshold for antigen receptor stimulation of B lymphocytes. *Science* *256*, 105-7.
- Carter, R. H., and Fearon, D. T. (1989). Polymeric C3dg primes human B lymphocytes for proliferation induced by anti-IgM. *J Immunol* *143*, 1755-60.
- Clayton, L.K., Sieh, M., Pious D.A., Reinherz E.L. (1989) Identification of human CD4 residues affecting class II MHC versus HIV-1 gp120 binding. *Nature* *339*, 548-551
- Clemenza, L., and Isenman, D. E. (2000). Structure-guided identification of C3d Residues essential for its binding to complement receptor 2 (CD21). *Journal of Immunology* *165*, 3839-48.
- Cocchi, F., Lopez, M., Menotti, L., Aoubala, M., Dubreuil, P., and Campadelli-Fiume, G. (1998). The V domain of herpesvirus Ig-like receptor (HIgR) contains a major functional region in herpes simplex virus-1 entry into cells and interacts physically with the viral glycoprotein D. *Proc Natl Acad Sci U S A* *95*, 15700-5.

Cooper, N. R. (1991). Complement evasion strategies of microorganisms. *Immunol Today* *12*, 327-31.

Crowe, P. D., VanArsdale, T. L., Walter, B. N., Dahms, K. M., and Ware, C. F. (1994). Production of lymphotoxin (LT alpha) and a soluble dimeric form of its receptor using the baculovirus expression system. *J Immunol Methods* *168*, 79-89.

Davis, A. E. d., and Harrison, R. A. (1982). Structural characterization of factor I mediated cleavage of the third component of complement. *Biochemistry* *21*, 5745-9.

Davis, A. E. d., Harrison, R. A., and Lachmann, P. J. (1984). Physiologic inactivation of fluid phase C3b: isolation and structural analysis of C3c, C3d,g (alpha 2D), and C3g. *J Immunol* *132*, 1960-6.

de Bruijn, M. H., and Fey, G. H. (1985). Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* *82*, 708-12.

Dean, H. J., Warner, M. S., Terhune, S. S., Johnson, R. M., and Spear, P. G. (1995). Viral determinants of the variable sensitivity of herpes simplex virus strains to gD-mediated interference. *J Virol* *69*, 5171-6.

Delcayre, A. X., Salas, F., Mathur, S., Kovats, K., Lotz, M., and Lernhardt, W. (1991). Epstein Barr virus/complement C3d receptor is an interferon alpha receptor. *Embo J* *10*, 919-26.

Dempsey, P. W., Allison, M. E., Akkaraju, S., Goodnow, C. C., and Fearon, D. T. (1996). C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* *271*, 348-50.

Diefenbach, R. J., and Isenman, D. E. (1995). Mutation of residues in the C3dg region of human complement component C3 corresponding to a proposed binding site for complement receptor type 2 (CR2, CD21) does not abolish binding of iC3b or C3dg to CR2. *J Immunol* *154*, 2303-20.

- Doherty, P. C., Tripp, R. A., and Sixbey, J. W. (1994). Evasion of host immune responses by tumours and viruses. *Ciba Found Symp* 187, 245-56.
- Eberle, F., Dubreuil, P., Mattei, M. G., Devilard, E., and Lopez, M. (1995). The human PRR2 gene, related to the human poliovirus receptor gene (PVR), is the true homolog of the murine MPH gene. *Gene* 159, 267-72.
- Eden, A., Miller, G. W., and Nussenzweig, V. (1973). Human lymphocytes bear membrane receptors for C3b and C3d. *J Clin Invest* 52, 3239-42.
- Edson, C. M., and Thorley-Lawson, D. A. (1981). Epstein-Barr virus membrane antigens: characterization, distribution, and strain differences. *J Virol* 39, 172-84.
- Edson, C. M., and Thorley-Lawson, D. A. (1983). Synthesis and processing of the three major envelope glycoproteins of Epstein-Barr virus. *J Virol* 46, 547-56.
- Eichler, J., Appel, J. R., Blondelle, S. E., Dooley, C. T., Dorner, B., Ostresh, J. M., Perez-Paya, E., Pinilla, C., and Houghten, R. A. (1995). Peptide, peptidomimetic, and organic synthetic combinatorial libraries. *Med Res Rev* 15, 481-96.
- Einhorn, L., Steinitz, M., Yefenof, E., Ernberg, I., Bakacs, T., and Klein, G. (1978). Epstein-Barr virus (EBV) receptors, complement receptors, and EBV infectibility of different lymphocyte fractions of human peripheral blood. II. Epstein-Barr virus studies. *Cell Immunol* 35, 43-58.
- Esparza, I., Becherer, J. D., Alsenz, J., De la Hera, A., Lao, Z., Tsoukas, C. D., and Lambris, J. D. (1991). Evidence for multiple sites of interaction in C3 for complement receptor type 2 (C3d/EBV receptor, CD21). *Eur J Immunol* 21, 2829-38.
- Fearon, D. T., and Carter, R. H. (1995). The CD19/CR2/TAPA-1 complex of B lymphocytes: linking natural to acquired immunity. *Annu Rev Immunol* 13, 127-49.

- Fearon, D. T., and Locksley, R. M. (1996). The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science* 272, 50-3.
- Fingerroth, J. D., Weis, J. J., Tedder, T. F., Strominger, J. L., Biro, P. A., and Fearon, D. T. (1984). Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 4510-4.
- Fischer, M. B., Goerg, S., Shen, L., Prodeus, A. P., Goodnow, C. C., Kelsoe, G., and Carroll, M. C. (1998). Dependence of germinal center B cells on expression of CD21/CD35 for survival. *Science* 280, 582-5.
- Fivash, M., Towler, E. M., and Fisher, R. J. (1998). BIAcore for macromolecular interaction. *Curr Opin Biotechnol* 9, 97-101.
- G., S. P. (1993). Membrane fusion induced by herpes simplex virus. In *Viral fusion mechanisms*, J. Bentz, ed. (Boca Raton, Fla.: CRC Press, Inc).
- Geraghty, R. J., Krummenacher, C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., and Spear, P. G. (1998). Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. *Science* 280, 1618-20.
- Goldstein, D. J., and Weller, S. K. (1988). Herpes simplex virus type 1-induced ribonucleotide reductase activity is dispensable for virus growth and DNA synthesis: isolation and characterization of an ICP6 lacZ insertion mutant. *J Virol* 62, 196-205.
- Gooding, L. R. (1992). Virus proteins that counteract host immune defenses. *Cell* 71, 5-7.
- Goodson, R. J., Doyle, M. V., Kaufman, S. E., and Rosenberg, S. (1994). High-affinity urokinase receptor antagonists identified with bacteriophage peptide display. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 7129-33.

- Gruss, H. J., and Dower, S. K. (1995). Tumor necrosis factor ligand superfamily: involvement in the pathology of malignant lymphomas. *Blood* 85, 3378-404.
- Haan, K. M., and Longnecker, R. (2000). Coreceptor restriction within the HLA-DQ locus for Epstein-Barr virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9252-7.
- Harrop, J. A., Reddy, M., Dede, K., Brigham-Burke, M., Lyn, S., Tan, K. B., Silverman, C., Eichman, C., DiPrinzio, R., Spampinato, J., Porter, T., Holmes, S., Young, P. R., and Truneh, A. (1998). Antibodies to TR2 (herpesvirus entry mediator), a new member of the TNF receptor superfamily, block T cell proliferation, expression of activation markers, and production of cytokines. *J Immunol* 161, 1786-94.
- Hedrick, J. A., Watry, D., Speiser, C., O'Donnell, P., Lambris, J. D., and Tsoukas, C. D. (1992). Interaction between Epstein-Barr virus and a T cell line (HSB-2) via a receptor phenotypically distinct from complement receptor type 2. *Eur J Immunol* 22, 1123-31.
- Hirani, S., Lambris, J. D., and Muller-Eberhard, H. J. (1986). Structural analysis of the asparagine-linked oligosaccharides of human complement component C3. *Biochem J* 233, 613-6.
- Hourcade, D., Holers, V. M., and Atkinson, J. P. (1989). The regulators of complement activation (RCA) gene cluster. *Adv Immunol* 45, 381-416.
- Hsu, H., Solovyev, I., Colombero, A., Elliott, R., Kelley, M., and Boyle, W. J. (1997). ATAR, a novel tumor necrosis factor receptor family member, signals through TRAF2 and TRAF5. *J Biol Chem* 272, 13471-4.
- Iida, K., Nadler, L., and Nussenzweig, V. (1983). Identification of the membrane receptor for the complement fragment C3d by means of a monoclonal antibody. *J Exp Med* 158, 1021-33.

Isola, V. J., Eisenberg, R. J., Siebert, G. R., Heilman, C. J., Wilcox, W. C., and Cohen, G. H. (1989). Fine mapping of antigenic site II of herpes simplex virus glycoprotein D. *J Virol* *63*, 2325-34.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. and Capra J. D. (1999). *Immunobiology*, fourth Edition (NY: Elsevier Science).

Johnson, D. C., Burke, R. L., and Gregory, T. (1990). Soluble forms of herpes simplex virus glycoprotein D bind to a limited number of cell surface receptors and inhibit virus entry into cells. *J Virol* *64*, 2569-76.

Johnson, R. M., and Spear, P. G. (1989). Herpes simplex virus glycoprotein D mediates interference with herpes simplex virus infection. *J Virol* *63*, 819-27.

Johnsson, K., and Ge, L. (1999). Phage display of combinatorial peptide and protein libraries and their applications in biology and chemistry. *Curr Top Microbiol Immunol* *243*, 87-105.

Jondal, M., Klein, G., Oldstone, M. B., Bokish, V., and Yefenof, E. (1976). Surface markers on human B and T lymphocytes. VIII. Association between complement and Epstein-Barr virus receptors on human lymphoid cells. *Scand J Immunol* *5*, 401-10.

Kalli, K. R., Ahearn, J. M., and Fearon, D. T. (1991). Interaction of iC3b with recombinant isotypic and chimeric forms of CR2. *J Immunol* *147*, 590-4.

Karp, C. L. (1999). Measles: immunosuppression, interleukin-12, and complement receptors. *Immunol Rev* *168*, 91-101.

Karp, C. L., Wysocka, M., Wahl, L. M., Ahearn, J. M., Cuomo, P. J., Sherry, B., Trinchieri, G., and Griffin, D. E. (1996). Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus [published erratum appears in *Science* 1997 Feb 21;275(5303):1053]. *Science* *273*, 228-31.

Kay B. K., K. A. V., Hyde-DeRuyscher R. (1998). From peptides to drugs via phage display. *DDT* 3, 370-378.

Kay, B. K., Adey, N. B., He, Y. S., Manfredi, J. P., Mataragnon, A. H., and Fowlkes, D. M. (1993). An M13 phage library displaying random 38-amino-acid peptides as a source of novel sequences with affinity to selected targets. *Gene* 128, 59-65.

Korner, H., and Sedgwick, J. D. (1996). Tumour necrosis factor and lymphotoxin: molecular aspects and role in tissue-specific autoimmunity. *Immunol Cell Biol* 74, 465-72.

Kremser, A., and Rasched, I. (1994). The adsorption protein of filamentous phage fd: assignment of its disulfide bridges and identification of the domain incorporated in the coat. *Biochemistry* 33, 13954-8.

Krummenacher, C., Nicola, A. V., Whitbeck, J. C., Lou, H., Hou, W., Lambris, J. D., Geraghty, R. J., Spear, P. G., Cohen, G. H., and Eisenberg, R. J. (1998). Herpes simplex virus glycoprotein D can bind to poliovirus receptor-related protein 1 or herpesvirus entry mediator, two structurally unrelated mediators of virus entry. *J Virol* 72, 7064-74.

Krummenacher, C., Rux, A. H., Whitbeck, J. C., Ponce-de-Leon, M., Lou, H., Baribaud, I., Hou, W., Zou, C., Geraghty, R. J., Spear, P. G., Eisenberg, R. J., and Cohen, G. H. (1999). The first immunoglobulin-like domain of HveC is sufficient to bind herpes simplex virus gD with full affinity, while the third domain is involved in oligomerization of HveC. *J Virol* 73, 8127-37.

Kwon, B., Youn, B. S., and Kwon, B. S. (1999). Functions of newly identified members of the tumor necrosis factor receptor/ligand superfamilies in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 11, 340-5.

Kwon, B. S., Tan, K. B., Ni, J., Oh, K. O., Lee, Z. H., Kim, K. K., Kim, Y. J., Wang, S., Gentz, R., Yu, G. L., Harrop, J., Lyn, S. D., Silverman, C., Porter, T. G., Truneh, A., and Young, P. R. (1997). A newly identified member of the tumor necrosis factor

receptor superfamily with a wide tissue distribution and involvement in lymphocyte activation. *J Biol Chem* 272, 14272-6.

Lakey, J. H., and Raggett, E. M. (1998). Measuring protein-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol* 8, 119-23.

Lambris, J. D. (1988). The multifunctional role of C3, the third component of complement. *Immunol Today* 9, 387-93.

Lambris, J. D., Ganu, V. S., Hirani, S., and Muller-Eberhard, H. J. (1985). Mapping of the C3d receptor (CR2)-binding site and a neoantigenic site in the C3d domain of the third component of complement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4235-9.

Lambris, J. D., Reid, K. B., and Volanakis, J. E. (1999). The evolution, structure, biology and pathophysiology of complement. *Immunol Today* 20, 207-11.

Law, S. K., and Dodds, A. W. (1990). C3, C4 and C5: the thioester site. *Biochem Soc Trans* 18, 1155-9.

Law, S. K., and Dodds, A. W. (1997). The internal thioester and the covalent binding properties of the complement proteins C3 and C4. *Protein Sci* 6, 263-74.

Law, S. K., Lichtenberg, N. A., and Levine, R. P. (1979). Evidence for an ester linkage between the labile binding site of C3b and receptive surfaces. *J Immunol* 123, 1388-94.

Levine, R. P., and Dodds, A. W. (1990). The thioester bond of C3. *Curr Top Microbiol Immunol* 153, 73-82.

Lin, Z., and Eisenstein, E. (1996). Nucleotide binding-promoted conformational changes release a nonnative polypeptide from the Escherichia coli chaperonin GroEL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1977-81.

- Lipschultz, C. A., Li, Y., and Smith-Gill, S. (2000). Experimental design for analysis of complex kinetics using surface plasmon resonance. *Methods* 20, 310-8.
- Lowell, C. A., Klickstein, L. B., Carter, R. H., Mitchell, J. A., Fearon, D. T., and Ahearn, J. M. (1989). Mapping of the Epstein-Barr virus and C3dg binding sites to a common domain on complement receptor type 2. *J Exp Med* 170, 1931-46.
- Lowman, H. B. (1997). Bacteriophage display and discovery of peptide leads for drug development. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26, 401-24.
- Marsters, S. A., Ayres, T. M., Skubatch, M., Gray, C. L., Rothe, M., and Ashkenazi, A. (1997). Herpesvirus entry mediator, a member of the tumor necrosis factor receptor (TNFR) family, interacts with members of the TNFR-associated factor family and activates the transcription factors NF-kappaB and AP-1. *J Biol Chem* 272, 14029-32.
- Mauri, D. N., Ebner, R., Montgomery, R. I., Kochel, K. D., Cheung, T. C., Yu, G. L., Ruben, S., Murphy, M., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H., Spear, P. G., and Ware, C. F. (1998). LIGHT, a new member of the TNF superfamily, and lymphotoxin alpha are ligands for herpesvirus entry mediator. *Immunity* 8, 21-30.
- Medicus, R. G., Melamed, J., and Arnaout, M. A. (1983). Role of human factor I and C3b receptor in the cleavage of surface-bound C3bi molecules. *Eur J Immunol* 13, 465-70.
- Medof, M. E., Iida, K., Mold, C., and Nussenzweig, V. (1982). Unique role of the complement receptor CR1 in the degradation of C3b associated with immune complexes. *J Exp Med* 156, 1739-54.
- Melchers, F., Erdei, A., Schulz, T., and Dierich, M. P. (1985). Growth control of activated, synchronized murine B cells by the C3d fragment of human complement. *Nature* 317, 264-7.

Mold, C., Bradt, B. M., Nemerow, G. R., and Cooper, N. R. (1988). Activation of the alternative complement pathway by EBV and the viral envelope glycoprotein, gp350. *J Immunol* *140*, 3867-74.

Mold, C., Nemerow, G. R., Bradt, B. M., and Cooper, N. R. (1988). CR2 is a complement activator and the covalent binding site for C3 during alternative pathway activation by Raji cells. *J Immunol* *140*, 1923-9.

Molesworth, S. J., Lake, C. M., Borza, C. M., Turk, S. M., and Hutt-Fletcher, L. M. (2000). Epstein-Barr virus gH is essential for penetration of B cells but also plays a role in attachment of virus to epithelial cells. *J Virol* *74*, 6324-32.

Molina, H., Brenner, C., Jacobi, S., Gorka, J., Carel, J. C., Kinoshita, T., and Holers, V. M. (1991). Analysis of Epstein-Barr virus-binding sites on complement receptor 2 (CR2/CD21) using human-mouse chimeras and peptides. At least two distinct sites are necessary for ligand-receptor interaction. *J Biol Chem* *266*, 12173-9.

Molina, H., Perkins, S. J., Guthridge, J., Gorka, J., Kinoshita, T., and Holers, V. M. (1995). Characterization of a complement receptor 2 (CR2, CD21) ligand binding site for C3. An initial model of ligand interaction with two linked short consensus repeat modules. *J Immunol* *154*, 5426-35.

Montgomery, R. I., Warner, M. S., Lum, B. J., and Spear, P. G. (1996). Herpes simplex virus-1 entry into cells mediated by a novel member of the TNF/NGF receptor family. *Cell* *87*, 427-36.

Moore, M. D., DiScipio, R. G., Cooper, N. R., and Nemerow, G. R. (1989). Hydrodynamic, electron microscopic, and ligand-binding analysis of the Epstein-Barr virus/C3dg receptor (CR2). *J Biol Chem* *264*, 20576-82.

Moore, W. T. (1993). Integration of mass spectrometry into strategies for peptide synthesis. *Biol Mass Spectrom* *22*, 149-62.

- Moore, W. T. (1997). Laser desorption mass spectrometry. *Methods Enzymol* 289, 520-42.
- Morton, T. A., and Myszka, D. G. (1998). Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Methods Enzymol* 295, 268-94.
- Myszka, D. G. (1997). Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors. *Curr Opin Biotechnol* 8, 50-7.
- Nagar, B., Jones, R. G., Diefenbach, R. J., Isenman, D. E., and Rini, J. M. (1998). X-ray crystal structure of C3d: a C3 fragment and ligand for complement receptor 2. *Science* 280, 1277-81.
- Naniche, D., Varior-Krishnan, G., Cervoni, F., Wild, T. F., Rossi, B., Rabourdin-Combe, C., and Gerlier, D. (1993). Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* 67, 6025-32.
- Nemerow, G. R., Houghten, R. A., Moore, M. D., and Cooper, N. R. (1989). Identification of an epitope in the major envelope protein of Epstein-Barr virus that mediates viral binding to the B lymphocyte EBV receptor (CR2). *Cell* 56, 369-77.
- Nemerow, G. R., Mold, C., Schwend, V. K., Tollefson, V., and Cooper, N. R. (1987). Identification of gp350 as the viral glycoprotein mediating attachment of Epstein-Barr virus (EBV) to the EBV/C3d receptor of B cells: sequence homology of gp350 and C3 complement fragment C3d. *J Virol* 61, 1416-20.
- Nemerow, G. R., Moore, M. D., and Cooper, N. R. (1990). Structure and function of the B-lymphocyte Epstein-Barr virus/C3d receptor. *Adv Cancer Res* 54, 273-300.
- Nemerow, G. R., Siaw, M. F., and Cooper, N. R. (1986). Purification of the Epstein-Barr virus/C3d complement receptor of human B lymphocytes: antigenic and functional properties of the purified protein. *J Virol* 58, 709-12.

Nemerow, G. R., Wolfert, R., McNaughton, M. E., and Cooper, N. R. (1985). Identification and characterization of the Epstein-Barr virus receptor on human B lymphocytes and its relationship to the C3d complement receptor (CR2). *J Virol* 55, 347-51.

Nenortas, E., and Beckett, D. (1996). Purification and characterization of intact and truncated forms of the Escherichia coli biotin carboxyl carrier subunit of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem* 271, 7559-67.

Nicola, A. V., Peng, C., Lou, H., Cohen, G. H., and Eisenberg, R. J. (1997). Antigenic structure of soluble herpes simplex virus (HSV) glycoprotein D correlates with inhibition of HSV infection. *J Virol* 71, 2940-6.

Nicola, A. V., Ponce de Leon, M., Xu, R., Hou, W., Whitbeck, J. C., Krummenacher, C., Montgomery, R. I., Spear, P. G., Eisenberg, R. J., and Cohen, G. H. (1998). Monoclonal antibodies to distinct sites on herpes simplex virus (HSV) glycoprotein D block HSV binding to HVEM. *J Virol* 72, 3595-601.

Nicola, A. V., Willis, S. H., Naidoo, N. N., Eisenberg, R. J., and Cohen, G. H. (1996). Structure-function analysis of soluble forms of herpes simplex virus glycoprotein D. *J Virol* 70, 3815-22.

Nilsson, B., Grossberger, D., Nilsson Ekdahl, K., Riegert, P., Becherer, D. J., Nilsson, U. R., and Lambris, J. D. (1992). Conformational differences between surface-bound and fluid-phase complement-component-C3 fragments. Epitope mapping by cDNA expression. *Biochem J* 282, 715-21.

Nonaka, M. (2000). Origin and evolution of the complement system. *Curr Top Microbiol Immunol* 248, 37-50.

Noorchashm, H., Moore, D. J., Lieu, Y. K., Noorchashm, N., Schlachterman, A., Song, H. K., Barker, C. F., and Najj, A. (1999). Contribution of the innate immune system to

autoimmune diabetes: a role for the CR1/CR2 complement receptors [published erratum appears in *Cell Immunol* 1999 Dec 15;198(2):143]. *Cell Immunol* 195, 75-9.

Nussbaum, O., Broder, C. C., Moss, B., Stern, L. B., Rozenblatt, S., and Berger, E. A. (1995). Functional and structural interactions between measles virus hemagglutinin and CD46. *J Virol* 69, 3341-9.

Okada, H., and Nishioka, K. (1973). Complement receptors on cell membranes. I. Evidence for two complement receptors. *J Immunol* 111, 1444-9.

Panayotou, G. (1998). Surface plasmon resonance. Measuring protein interactions in real time. *Methods Mol Biol* 88, 1-10.

Pasqualini, R., and Ruoslahti, E. (1996). Tissue targeting with phage peptide libraries *Mol Psychiatry* 1, 423.

Prodeus, A. P., Goerg, S., Shen, L. M., Pozdnyakova, O. O., Chu, L., Alicot, E. M., Goodnow, C. C., and Carroll, M. C. (1998). A critical role for complement in maintenance of self-tolerance. *Immunity* 9, 721-31.

Raftery, M. J., Behrens, C. K., Muller, A., Krammer, P. H., Walczak, H., and Schonrich, G. (1999). Herpes simplex virus type 1 infection of activated cytotoxic T cells: Induction of fratricide as a mechanism of viral immune evasion. *J Exp Med* 190, 1103-14.

Rodriguez de Cordoba, S., Lublin, D. M., Rubinstein, P., and Atkinson, J. P. (1985). Human genes for three complement components that regulate the activation of C3 are tightly linked. *J Exp Med* 161, 1189-95.

Roller, R. J., and Rauch, D. (1998). Herpesvirus entry mediator HVEM mediates cell-cell spread in BHK(TK-) cell clones. *J Virol* 72, 1411-7.

Rooney, I. A., Butrovich, K. D., Glass, A. A., Borboroglu, S., Benedict, C. A., Whitbeck, J. C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., and Ware, C. F. (2000). The lymphotoxin-beta receptor is necessary and sufficient for LIGHT-mediated apoptosis of tumor cells. *J Biol Chem* 275, 14307-15.

Ross, G. D., Lambris, J. D., Cain, J. A., and Newman, S. L. (1982). Generation of three different fragments of bound C3 with purified factor I or serum. I. Requirements for factor H vs CR1 cofactor activity. *J Immunol* 129, 2051-60.

Ross, G. D., Polley, M. J., Rabellino, E. M., and Grey, H. M. (1973). Two different complement receptors on human lymphocytes. One specific for C3b and one specific for C3b inactivator-cleaved C3b. *J Exp Med* 138, 798-811.

Ross, T. M., Xu, Y., Bright, R. A., and Robinson, H. L. (2000). C3d enhancement of antibodies to hemagglutinin accelerates protection against influenza virus challenge. *Nature Immunology* 1, 127-131.

Rux, A. H., Moore, W. T., Lambris, J. D., Abrams, W. R., Peng, C., Friedman, H. M., Cohen, G. H., and Eisenberg, R. J. (1996). Disulfide bond structure determination and biochemical analysis of glycoprotein C from herpes simplex virus. *J Virol* 70, 5455-65.

Sahu, A., Kay, B. K., and Lambris, J. D. (1996). Inhibition of human complement by a C3-binding peptide isolated from a phage-displayed random peptide library. *J Immunol* 157, 884-91.

Sahu, A., Kozel, T. R., and Pangburn, M. K. (1994). Specificity of the thioester-containing reactive site of human C3 and its significance to complement activation. *Biochem J* 302, 429-36.

Sahu, A., and Lambris, J. D. (2000). Complement inhibitors: a resurgent concept in anti-inflammatory therapeutics. *Immunopharmacology* 49, 133-148.

Sahu, A., Soulika, A. M., Morikis, D., Spruce, L., Moore, W. T., and Lambris, J. D. (2000). Binding kinetics, structure-activity relationship, and biotransformation of the complement inhibitor compstatin. *J Immunol* 165, 2491-9.

Sahu, A., Sunyer, J. O., Moore, W. T., Sarrias, M. R., Soulika, A. M., and Lambris, J. D. (1998). Structure, functions, and evolution of the third complement component and viral molecular mimicry. *Immunol Res* 17, 109-21.

Salio, M., Cella, M., Suter, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Inhibition of dendritic cell maturation by herpes simplex virus. *Eur J Immunol* 29, 3245-53.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7.

Sarrias, M. R., Sahu, A., Franchini, s., Canziani, G., Tort, L., and Lambris, J. D. (2001). Kinetic analysis of the interactions of complement receptor 2 (CR2, CD21) with its ligands, C3d, iC3b and the Epstein Barr virus glycoprotein gp350/220. *J. of Immunology Submitted*.

Sarrias, M. R., Whitbeck, J. C., Rooney, I., Ware, C. F., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H., and Lambris, J. D. (2000). Lymphotoxin alpha and LIGHT bind to distinct sites on HveA. *Molecular Immunology Accepted for publication*.

Sarrias, M. R., Whitbeck, J. C., Rooney, I., Spruce, L., Kay, B. K., Montgomery, R. I., Spear, P. G., Ware, C. F., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H., and Lambris, J. D. (1999). Inhibition of herpes simplex virus gD and lymphotoxin-alpha binding to HveA by peptide antagonists. *J Virol* 73, 5681-7.

Servis, C., and Lambris, J. D. (1989). C3 synthetic peptides support growth of human CR2-positive lymphoblastoid B cells. *J Immunol* 142, 2207-12.

Shen, B. J., Hage, T., and Sebald, W. (1996). Global and local determinants for the kinetics of interleukin-4/interleukin-4 receptor alpha chain interaction. *A biosensor*

study employing recombinant interleukin-4-binding protein. *Eur J Biochem* 240, 252-61.

Shukla, D., Liu, J., Blaiklock, P., Shworak, N. W., Bai, X., Esko, J. D., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Rosenberg, R. D., and Spear, P. G. (1999). A novel role for 3-O-sulfated heparan sulfate in herpes simplex virus 1 entry. *Cell* 99, 13-22.

Sisk, W. P., Bradley, J. D., Leipold, R. J., Stoltzfus, A. M., Ponce de Leon, M., Hilf, M., Peng, C., Cohen, G. H., and Eisenberg, R. J. (1994). High-level expression and purification of secreted forms of herpes simplex virus type 1 glycoprotein gD synthesized by baculovirus- infected insect cells. *J Virol* 68, 766-75.

Sixbey, J. W., Davis, D. S., Young, L. S., Hutt-Fletcher, L., Tedder, T. F., and Rickinson, A. B. (1987). Human epithelial cell expression of an Epstein-Barr virus receptor. *J Gen Virol* 68, 805-11.

Slepenkov, S. V., and Witt, S. N. (1998). Peptide-induced conformational changes in the molecular chaperone DnaK. *Biochemistry* 37, 16749-56.

Smith, C. A., Farrah, T., and Goodwin, R. G. (1994). The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell* 76, 959-62.

Smith, G. P., and Scott, J. K. (1993). Libraries of peptides and proteins displayed on filamentous phage. *Methods Enzymol* 217, 228-57.

Smith, L. C., Azumi, K., and Nonaka, M. (1999). Complement systems in invertebrates. The ancient alternative and lectin pathways. *Immunopharmacology* 42, 107-20.

Sodora, D. L., Cohen, G. H., Muggeridge, M. I., and Eisenberg, R. J. (1991). Absence of asparagine-linked oligosaccharides from glycoprotein D of herpes simplex virus type 1 results in a structurally altered but biologically active protein. *J Virol* 65, 4424-31.

Song, W., Sarrias, M. R., and Lambris, J. D. (2000). Complement and innate immunity. *Immunopharmacology* 49, 187-198.

Sunyer, J. O., Zarkadis, I. K., and Lambris, J. D. (1998). Complement diversity: a mechanism for generating immune diversity? *Immunol Today* 19, 519-23.

Sunyer, J. O., Zarkadis, I. K., Sahu, A., and Lambris, J. D. (1996). Multiple forms of complement C3 in trout that differ in binding to complement activators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 8546-51.

Takahashi, K., Nakanishi, H., Miyahara, M., Mandai, K., Satoh, K., Satoh, A., Nishioka, H., Aoki, J., Nomoto, A., Mizoguchi, A., and Takai, Y. (1999). Nectin/PRR: an immunoglobulin-like cell adhesion molecule recruited to cadherin-based adherens junctions through interaction with Afadin, a PDZ domain-containing protein. *J Cell Biol* 145, 539-49.

Tal-Singer, R., Eisenberg, R. J., Valyi-Nagy, T., Fraser, N. W., and Cohen, G. H. (1994). N-linked oligosaccharides on herpes simplex virus glycoprotein gD are not essential for establishment of viral latency or reactivation in the mouse eye model. *Virology* 202, 1050-3.

Tamamura, H., Ishihara, T., Otaka, A., Murakami, T., Ibuka, T., Waki, M., Matsumoto, A., Yamamoto, N., and Fujii, N. (1996). Analysis of the interaction of an anti-HIV peptide, T22 ([Tyr⁵, 12, Lys⁷]-polyphemusin II), with gp120 and CD4 by surface plasmon resonance. *Biochim Biophys Acta* 1298, 37-44.

Tanner, J., Whang, Y., Sample, J., Sears, A., and Kieff, E. (1988). Soluble gp350/220 and deletion mutant glycoproteins block Epstein-Barr virus adsorption to lymphocytes. *J Virol* 62, 4452-64.

Terry-Allison, T., Montgomery, R. I., Whitbeck, J. C., Xu, R., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., and Spear, P. G. (1998). HveA (herpesvirus entry mediator A), a coreceptor for

herpes simplex virus entry, also participates in virus-induced cell fusion. *J Virol* 72, 5802-10.

Tessier, D. C., Thomas, D. Y., Khouri, H. E., Laliberte, F., and Vernet, T. (1991). Enhanced secretion from insect cells of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene* 98, 177-83.

Tsokos, G. C., Lambris, J. D., Finkelman, F. D., Anastassiou, E. D., and June, C. H. (1990). Monovalent ligands of complement receptor 2 inhibit whereas polyvalent ligands enhance anti-Ig-induced human B cell intracytoplasmic free calcium concentration. *J Immunol* 144, 1640-5.

Ware, C. F., Crowe, P. D., Grayson, M. H., Androlewicz, M. J., and Browning, J. L. (1992). Expression of surface lymphotoxin and tumor necrosis factor on activated T, B, and natural killer cells. *J Immunol* 149, 3881-8.

Ware, C. F., VanArsdale, T. L., Crowe, P. D., and Browning, J. L. (1995). The ligands and receptors of the lymphotoxin system. *Curr Top Microbiol Immunol* 198, 175-218.

Warner, M. S., Geraghty, R. J., Martinez, W. M., Montgomery, R. I., Whitbeck, J. C., Xu, R., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H., and Spear, P. G. (1998). A cell surface protein with herpesvirus entry activity (HveB) confers susceptibility to infection by mutants of herpes simplex virus type 1, herpes simplex virus type 2, and pseudorabies virus. *Virology* 246, 179-89.

Whitbeck, J. C., E. S. Connolly, S. H. Willis, W. Hou, C. Krummenacher, M. Ponce de Leon, H. Lou, I. Baribaud, R. J. Eisenberg, and G. H. Cohen (2000). Localization of the gD-binding region of the human HSV receptor, HveA. *J. Virol* *Submitted*.

Whitbeck, J. C., Muggeridge, M. I., Rux, A. H., Hou, W., Krummenacher, C., Lou, H., van Geelen, A., Eisenberg, R. J., and Cohen, G. H. (1999). The major neutralizing antigenic site on herpes simplex virus glycoprotein D overlaps a receptor-binding domain. *J Virol* 73, 9879-90.

Whitbeck, J. C., Peng, C., Lou, H., Xu, R., Willis, S. H., Ponce de Leon, M., Peng, T., Nicola, A. V., Montgomery, R. I., Warner, M. S., Soulika, A. M., Spruce, L. A., Moore, W. T., Lambris, J. D., Spear, P. G., Cohen, G. H., and Eisenberg, R. J. (1997). Glycoprotein D of herpes simplex virus (HSV) binds directly to HVEM, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily and a mediator of HSV entry. *J Virol* 71, 6083-93.

Williams-Abbott, L., Walter, B. N., Cheung, T. C., Goh, C. R., Porter, A. G., and Ware, C. F. (1997). The lymphotoxin-alpha (LTalpha) subunit is essential for the assembly, but not for the receptor specificity, of the membrane-anchored LTalpha1beta2 heterotrimeric ligand. *J Biol Chem* 272, 19451-6.

Willis, S. H., Rux, A. H., Peng, C., Whitbeck, J. C., Nicola, A. V., Lou, H., Hou, W., Salvador, L., Eisenberg, R. J., and Cohen, G. H. (1998). Examination of the kinetics of herpes simplex virus glycoprotein D binding to the herpesvirus entry mediator, using surface plasmon resonance. *J Virol* 72, 5937-47.

7. AGRAÏMENTS

En aquestes quatre ratlles m'agradaria expressar el meu agraïment a la molta gent que ha fet possible la realització d'aquest treball. Sóc conscient que sense ells aquesta tesi hagués estat tan sols una il·lusió.

Al Dr. Lluís Tort, director de la tesis doctoral, per la confiança que va posar en mi des del primer moment; per la seva tan valuosa ajuda tan científica com personal.

Al Dr. Lambris, del Dept. of Pathology and Laboratory Medicine, University of Pennsylvania. Per acollir-me al seu laboratori i guiar-me durant tots aquests anys en la nostra col·laboració. Ha estat una experiència extraordinària i intensa.

Al Dr. Arvind Sahu, National Centre for Cell Science, Pune University, India, per la seva inacabable paciència per explicar i ajudar. Per esdevenir un molt bon amic al llarg dels anys.

Al Dr. J. Oriol Sunyer, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, amic i company de feina. Per la guia i el suport que he rebut durant tots aquests anys. Per totes les converses, tant dins com fora del laboratori.

Als Dr. Cohen i Eisenberg, i al seu equip de treball, especialment els Drs. Whitbeck i Krummenacher, que ens van cedir material, instrumentació i coneixements; i per els molts bons moments saborejant un café deliciós.

A la Dra. Gabriela Canziani, que em va ajudar a entendre els biosensors, i a desxifrar els meus resultats.

Als meus companys el Dr. Moore, la Rodanthi, la Yuko, el Dimitris, la Silvia, la Lynn, la Ivonne, el Dr. Zarkadis. Especialment, gràcies a l'Athena i el Manolis, perquè he pogut comptar amb ells en tot moment.

A tota la gent de la Unitat de Fisiologia Animal, especialment al Quino, per al seu suport i acolliment.

A la Marta C., el Dani, l'Anna, la Marta R., el Xavi, i als molts amics que he tingut la sort de conèixer, a la facultat, a St. Antoni, a Barcelona i a Philadelphia.

Al Luís, per valorar-me i creure en mi en tot moment, per la força que m'ha donat.

I finalment, a la família, la Mercè, el Joan, al pare i la mare, que sempre han estat prop meu, fent-me costat.

Moltíssimes gràcies