

**Mecanismes moleculars implicats en la interacció dels receptors  
cel·lulars herpes simplex entry mediator A (HveA) i receptor de  
complement 2 (CR2, CD21) amb els seus lligands.**

Maria Rosa Sarrias i Fornés

Memòria de Tesis presentada per na Maria Rosa Sarrias i Fornés per optar al grau de  
Doctora en Bioquímica i Biologia Molecular per la Universitat Autònoma de Barcelona.

Dipositada el X de...



## Índex

<b>1. Introducció general.</b> .....	<b>5</b>
El sistema immunològic	
Definició de virus	
Els patògens manipulen i s'escapen de la resposta immunològica de l'hoste	
Els herpesvirus	
Les llibreries aleatòries de pèptids expressats en el fag M13	
Utilització dels biosensors per a l'estudi de la interacció entre proteïnes	
<b>2. Objectius del treball.</b> .....	<b>21</b>
<b>3. PART I: El receptor HveA; el virus de l'Herpes Simplex.</b> .....	<b>23</b>
<b>Introducció als Herpes Simplex Virus.</b> .....	<b>24</b>
Característiques generals i estructura	
Entrada dels Herpes Simplex Virus a la cèl·lula de l'hoste	
El receptor cel·lular HveA	
Els lligands naturals de HveA: la limfotoxina- i la proteïna LIGHT	
Els receptors cel·lulars HveB i HveC	
La proteïna viral gD	
Interacció gD-HveA	
Interacció gD-HveC	
gD podria ser una viroquina	
<b>Treball 1:</b> Inhibició de la unió de gD d'Herpes Simplex Virus i limfotoxina- a HveA per pèptids antagonistes. ....	<b>37</b>
<b>Treball 2:</b> Unió diferencial de LIGHT i LT- a HveA. ....	<b>55</b>
<b>Treball 3:</b> Aïllament d'un pèptid que s'uneix als dos principals receptors del virus de l'herpes simplex, HveA, i HveC. ....	<b>69</b>
<b>4. PART II: El receptor de complement 2 (CR2, CD21); el virus de l'Epstein Barr.</b> ..	<b>79</b>
<b>Introducció al virus de l'Epstein Barr.</b> .....	<b>81</b>
Característiques generals	
Entrada de l'EBV a la cèl·lula de l'hoste	
El sistema de complement	
El receptor de complement 2, CR2 (CD21)	
Interacció C3-CR2	
La proteïna viral gp350/220	
<b>Treball 4</b> Expressió, purificació i marcatge de les proteïnes CR2, CR2-BCCP, gp350(470t), C3, C3d, i iC3b. ....	<b>99</b>

<b>Treball 5:</b>	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.....	<b>121</b>
<b>5. Conclusions i discussió general.</b>	.....	<b>135</b>
<b>6. Referències.</b>	.....	<b>141</b>
<b>7. Agraïments.</b>	.....	<b>161</b>

## 1. INTRODUCCIÓ GENERAL

### 1.1 El sistema immunològic

L'origen de la immunologia com a ciència s'atribueix a Edward Jenner, que l'any 1796 va descobrir que la malaltia de "cowpox" o vaccinia protegien contra la infecció per "smallpox", que era una malaltia fatal en humans. Jenner va anomenar aquest fenomen vacunació. Però el concepte de microorganisme responsable de malaltia, o patologia, no va aparèixer fins a finals del segle XIX, quan Robert Koch va demostrar que les malalties infeccioses són causades per microorganismes, cadascun responsable d'una patologia diferent. Aquests descobriments i d'altres (Louis Pasteur desenvolupà una vacuna contra la còlera l'any 1880; Emil von Behring i Shibasaburo Kitasato describien els anticossos per primer cop l'any 1890), van promoure la recerca del mecanisme de protecció contra la infecció i el desenvolupament de la ciència de la immunologia.

En l'actualitat sabem que la resposta immunològica és complexa, i inclou diferents mecanismes tant no específics (immunitat innata), com específics (immunitat adquirida). La resposta innata consisteix en el reconeixement de patrons generals moleculars com carbohidrats o altres modificacions posttranslacional presents en la superfície del patogen o de la cèl·lula infectada. Els eosinòfils, monòcits, macròfags, natural killer cells (NK), i mediadors solubles (com el sistema de complement) formen part d'aquesta resposta, l'activació de la qual causa l'eliminació directa del patogen i/o la modulació de la resposta adaptiva. Aquesta està formada per elements cel·lulars i humorals. Mitjançant els receptors d'antigen específics, les cèl·lules B i T interactuen amb els patògens o fragments derivats, que són presentats per les cèl·lules presentadores d'antigen. Les cèl·lules B produeixen anticossos, estimulats generalment per les cèl·lules T i les interleucines que aquestes secreten. Els anticossos serveixen per a marcar els patògens que seran destruïts per cèl·lules especialitzades. Les cèl·lules infectades poden també ser marcades i destruïdes per cèl·lules NK o limfòcits T citotòxics (Janeway, 1999).

## 1.2 Virus

Les partícules virals es diferencien dels altres agents infecciosos per la seva estructura relativament simple, la mida petita (20-450nm de diàmetre), i per la seva dependència en proteïnes cel·lulars per la infecció i replicació. Així doncs, són paràsits intracel·lulars obligats. Existeixen a hores d'ara més de 70 famílies de virus reconegudes, les quals infecten una gran varietat d'hostes, tant eucariotes com procariotes.

L'origen evolutiu dels virus és desconegut. Tot i així, se n'han formulat dues hipòtesis; 1) Els virus podrien originar de components de la cèl·lula de l'hoste que esdevingueren autònoms, 2) Els virus van evolucionar d'organismes unicel·lulars.

Tot i diferir altament en estructura, totes les partícules virals, anomenades virions, contenen un genoma de DNA o RNA, que conté la informació necessària per programar la cèl·lula infectada per sintetitzar un nombre de macromolècules específiques que assegurin la producció de la progènie viral. Associades al material genètic també es poden trobar un nombre variable de proteïnes que tenen funcions relacionades amb la infecció o la replicació.

Les partícules virals poden estar o no embolcallades. Els virions no embolcallats estan rodejats per una càpside, de geometria generalment icosaèdrica, formada per múltiples còpies de proteïnes codificades per el virus. En els virus embolcallats, la càpside està rodejada d'una membrana de doble capa lipídica, adquirida de la cèl·lula infectada. Per tant, la seva composició tindrà les característiques de la membrana de la cèl·lula hoste. Les proteïnes de la càpside (generalment glicosilades), o ancorades a la membrana externa, determinen l'especificitat de la interacció d'un virus amb la cèl·lula de l'hoste.

La classificació de les diferents famílies de virus es basa en diferents propietats d'aquests, principalment: 1) tipus d'àcid nucleic: RNA o DNA; de cadena única o doble; estratègia de replicació i 2) mida i morfologia. Altres paràmetres són les propietats immunològiques, els mètodes de transmissió, tropisme, patologia i simptomatologia.

Els virus han desenvolupat una gran varietat d'estratègies per aconseguir multiplicar-se dins la cèl·lula de l'hoste. Tot i així, se'n pot descriure un patró similar de cicle vital, que inclou tres processos essencials: 1) unió a la cèl·lula, penetració i separació de la càpside de l'àcid nucleic, 2) síntesi de components virals, i 3) morfogènesi i alliberament.

### **1.3 Els virus manipulen i s'escapen de la resposta immunològica de l'hoste**

Durant els darrers anys, els investigadors han començat a desxifrar com els virus s'escapen, anul·len i manipulen l'arsenal agressiu de defenses immunològiques generades per l'hoste en reacció a una infecció patogènica. La co-evolució dels virus amb el sistema immunològic sota una pressió selectiva constant durant milenis ha provocat que aquests desenvolupessin les seves pròpies defenses per contraatacar una gran varietat de molècules antivirals que d'altra manera haguessin impedit la seva propagació en l'hoste.

Així doncs, els virus són potser els patògens humans amb més èxit per diferents raons; 1) L'habilitat de replicar els confereix la possibilitat de variar antigènicament, a través de successives mutacions, especialment en el cas dels virus de RNA, escapant d'aquesta manera les defenses específiques. 2) A excepció dels darrers processos en la replicació viral, o durant el trànsit entre cèl·lules, els antígens virals són intracel·lulars, és a dir, inaccessibles a l'acció dels anticossos i del sistema de complement. 3) Els virus han desenvolupat de una gran varietat de mecanismes per poder escapar de la resposta immunològica. Així, múltiples estratègies d'evasió immunològica han estat descrites en diferents virus, que inclouen, mecanismes de camuflatge i l'adquisició o expressió de proteïnes reguladores del sistema immunològic de l'hoste (1996; 1997; Alcami and Koszinowski, 2000; Cooper, 1991; Doherty et al., 1994; Gooding, 1992; Janeway, 1999; Sahu et al., 1998). Aquests patògens aconseguixen d'aquesta manera interferir tant amb la resposta innata, per exemple inactivant del sistema de complement, com amb la resposta adaptiva, per exemple interferint amb el processament d'antígens i presentació en els complexos d'histocompatibilitat (MHC). A la taula 1 presentem alguns exemples de mecanismes d'evasió immunològica per part de diferents virus.

**Taula 1:** Mecanismes d'evasió immunològica per diferents virus\*

Estratègia	Mecanisme específic	Resultat	Ex. Virus (Proteïna)
Inhibició de la resposta humoral	Receptor Fc codificat per el virus	Inhibeix les funcions efectores dels anticossos units a les cèl·lules infectades	Herpes simplex (gE) MHV (Proteïna S)
	Receptor de complement codificat per el virus	Inhibeix l'activació de complement	Herpes simplex (gC)
	Complement control protein codificada per el virus	Inhibeix l'activació de complement	Vaccinia (VCP)
Inhibició de la resposta inflamatòria	Receptor soluble de citoquines expressat per el virus, per exemple, homòlegs dels receptors de IL-1, TNF i IFN-	Bloqueja l'efecte de les citoquines inhibint la seva interacció amb els receptors cel·lulars de l'hoste	Vaccinia (B15R) Cowpox (Crm)
	Modulació de l'expressió de molècules d'adhesió, per exemple LFA-3 i ICAM-1	Bloqueja l'adhesió de limfòcits a cèl·lules infectades	Epstein Barr
Bloqueig del processament i presentació d'antígens	Inhibició de l'expressió de MHC I	Impedeix el reconeixement de cèl·lules infectades per les cèl·lules T citotòxiques	Herpes simplex Citomegalovirus
	Inhibició del transport de pèptids per TAP	Bloqueja l'associació de pèptids amb MHC I	Herpes Simplex

\* Adaptat de (Janeway, 1999)

A més a més, alguns patògens utilitzen receptors cel·lulars que participen en la resposta immunològica per infectar les cèl·lules de l'hoste. A la taula 2 mostrem una llista de virus que ho exemplifiquen.

**Taula 2:** Proteïnes virals que s'uneixen a receptors cel·lulars que participen en la resposta immunològica\*

Família de virus	Virus	Producte	Receptor/s cel·lular
Herpesvirus	Herpes simplex 1-2	gD	HveA (TNFR)
	Epstein Barr virus	gp350/220	CR2 (complement)
Paramixovirus	Measles virus	Proteïna H	CD46 (complement)
Retrovirus	HIV	gp120	CD4 (Ig R)
Picornavirus	Poliovirus		CD155 (Ig R)
	Rhinovirus		CD54 (IgR)
	Echovirus 7		CD55 (complement)

\* Adaptat de (Janeway, 1999)



Es postula que a part de facilitar l'entrada a la cèl·lula, en alguns casos la unió de la proteïna viral al receptor cel·lular podria beneficiar al patogen en manipular i interferir amb la resposta immunològica de l'hoste. És a dir, competint amb el lligand natural, i/o modificant la transmissió de senyals intracel·lulars, el patogen podria regular la resposta immunològica. A continuació presentem un cas que ho exemplifica. En aquesta tesi se'n treballaran dos exemples més.

El virus del xarampió (measles virus), inicia la infecció de cèl·lules epitelials, fibroblasts, i limfàtiques unint-se al receptor de complement CD46, altrament anomenat MCP (membrane cofactor protein) (Karp et al., 1996; Nanche et al., 1993). Anticossos monoclonals contra CD46 inhibeixen la infecció, i cèl·lules no permissives transfectades amb el gen del receptor esdevenen susceptibles a la infecció. La proteïna viral hemaglutinina (proteïna H) media la unió al receptor (Nussbaum et al., 1995). MCP forma part de la família de reguladors del complement (CCP, Complement Control Protein), expressats en les cèl·lules de l'hoste per protegir-les del possible efecte detrimental que l'activació de complement podria tenir contra elles (Lambris et al., 1999). Els lligands naturals de MCP, C3b i C4b, són productes de l'activació del sistema de complement (Lambris et al., 1999).

El virus del xarampió provoca una gran supressió de la resposta cel·lular immunològica en l'hoste. La interleucina 12 (IL-12) és crítica per a la formació d'aquesta resposta, participant en diferents processos; per exemple, indueix la producció de IFN- $\gamma$  per les cèl·lules NK i T, i augmenta la capacitat citotòxica de les cèl·lules NK (Karp, 1999). Els principals productors d'IL-12 són els monòcits i els macròfags. S'ha observat que la infecció amb el virus del xarampió de cultius primaris de monòcits fa que aquests disminueixin la síntesi d'IL-12. Aquesta davallada també s'observa amb el "cross-linking" de MCP amb anticossos monoclonals o amb C3b, el lligand natural del receptor. La interacció de la proteïna viral (Hemaglutinina H) amb MCP imita, doncs la interacció C3b-MCP. Per tant es postula que el virus del xarampió, durant el procés d'entrada a la cèl·lula, suprimiria la resposta immunològica de l'hoste a través de la interacció amb el receptor cel·lular MCP (Karp et al., 1996).

## 1.4 Els herpesviridae

El nom d'aquesta família de virus prové del grec "Herpein", que vol dir arrossegar-se, en referència a la manera com s'estenen les lesions cutànies que aquests causen. Més de 100 espècies d'herpesviridae han estat fins ara caracteritzades, de les quals vuit infecten els humans. Aquestes estan dividides en tres subfamílies:

### **Alphaherpesviridae:**

Simplexvirus: Herpes Simplex Virus 1 i 2 (HSV-1, HSV-2)

Varicellovirus: Varicella-Zoster Virus (VZV)

### **Betaherpesviridae:**

Citomegalovirus: citomegalovirus humà (HCMV)

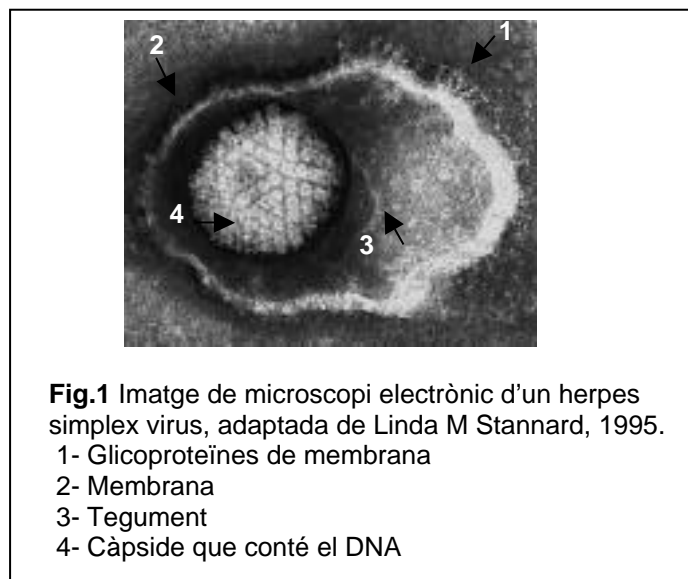
Roseolovirus: herpesvirus humà 6 i 7 (HHV6 i HHV7)

### **Gammapherpesviridae:**

Lymphocryptovirus: Epstein-Barr Virus (EBV)

Rhadinovirus: herpesvirus humà 8 (HHV8).

Els Herpesvirus, doncs, constitueixen una gran família, i difereixen força en quant a seqüència genòmica i proteica, però tot i així mantenen una estructura similar. El virió està format per quatre elements, de dins a enfora: un centre opac al microscopi electrònic que conté el DNA, una càpside icosaedraedra, un tegument amorf i una membrana lipídica externa, que serveix de punt d'ancoratge de diverses glicoproteïnes (Figura 1).



El DNA dins el virió és lineal i de doble cadena. Els herpesvirus es caracteritzen per contenir grans genomes (de 130 a 235 kb).

Cal remarcar quatre característiques biològiques dels membres d'aquesta família:

1. Tots els herpesvirus contenen en el seu genoma una gran quantitat d'enzims que participen en el metabolisme dels àcids nucleics (per exemple, la timidina kinasa, dUTPasa, ribonucleòtid reductasa, etc), síntesi de DNA (DNA polimerasa, helicasa) i segurament el processament de proteïnes (per exemple protein kinasa). L'organització i presència d'aquests components varia d'un herpesvirus a l'altre.
2. La síntesi de DNA viral i encapsulació esdevé en el nucli.
3. La producció de la progènie de virus infecciosos té com a conseqüència la lisi de les cèl·lules infectades.
4. Tots els herpesvirus estudiats fins ara estableixen latència en l'hoste. En les cèl·lules que contenen virus latents, el genoma viral pren una forma circular tancada, i només un nombre molt reduït de gens en són expressats.

Tot i compartir aquestes característiques, existeixen trets molt diferencials entre els membres de la família. Per exemple, l'espectre d'hostes que són capaços d'infectar, l'eficiència de multiplicat, i la rapidesa en destruir les cèl·lules infectades. També cal tenir en compte que el tipus de cèl·lula on s'estableix latència varia d'herpesvirus en herpesvirus. Per exemple, s'observa HSV latent en cèl·lules neuronals, mentre que l'EBV latent es detecta en limfòcits B. Una altra gran diferència la constitueixen les manifestacions clíniques de les malalties que causen.

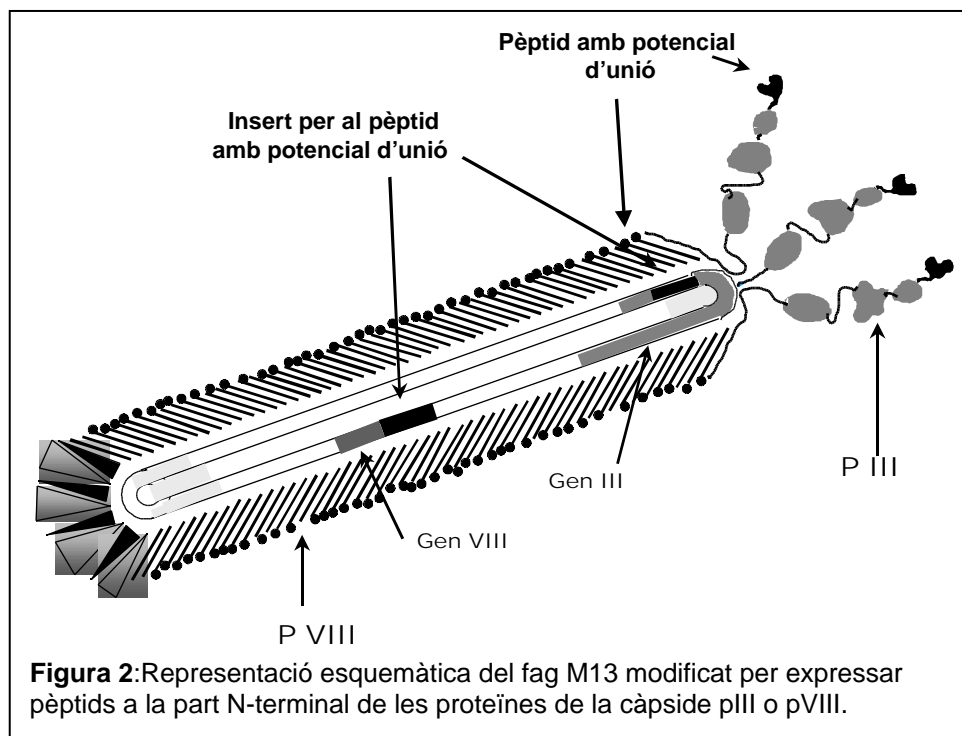
## 1.5 Les llibreries aleatòries de pèptids

### *Introducció*

En dos dels treballs que constitueixen aquesta tesi s'ha utilitzat l'escreeing de llibreries aleatòries de pèptids per aïllar noves molècules que s'uneixin als receptors cel·lulars de l'Herpes Simplex Virus. Per aquest motiu hem cregut convenient fer una petita introducció a aquesta tècnica, i descriure'n les possibilitats que ofereix a l'investigador tant de recerca bàsica com farmacològica.

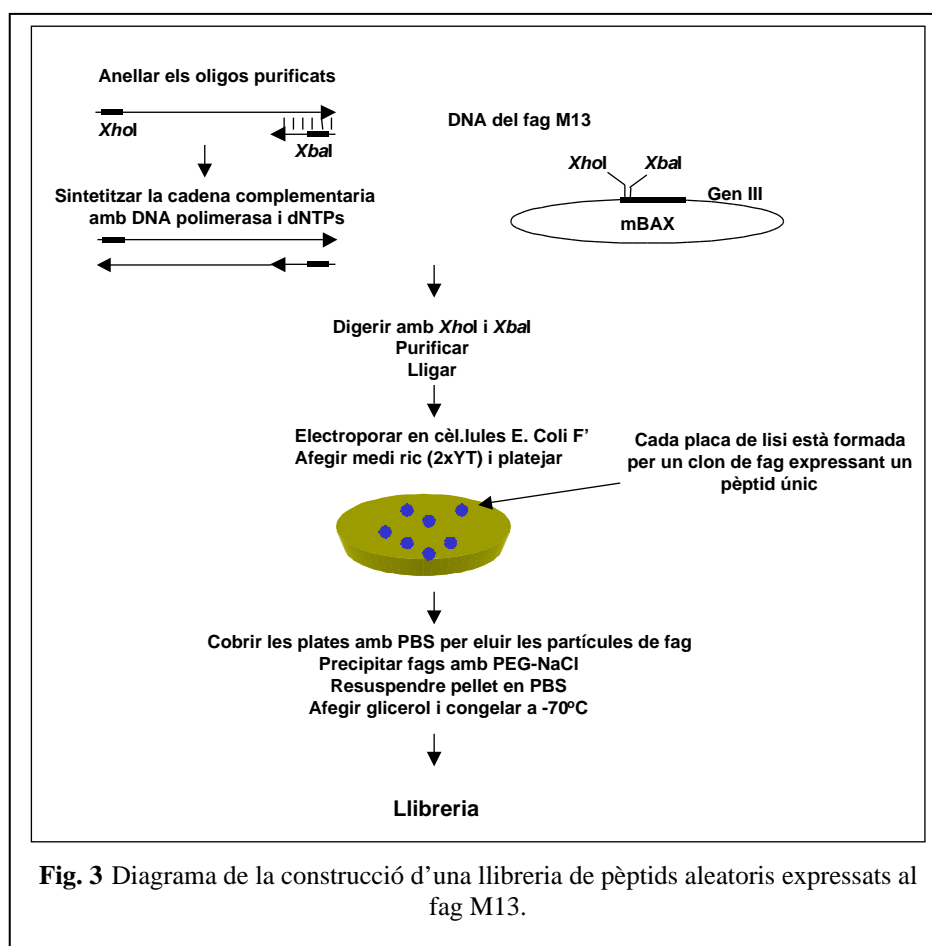
Les llibreries aleatòries de pèptids constitueixen una font molt rica de diversitat molecular, i s'han fet servir per aïllar lligands d'una gran varietat de molècules, amb l'objectiu de mapejar les interaccions entre proteïnes i anticossos, i receptors cel·lulars - o proteïnes intracel·lulars-, i els seus lligands (Adey, 1996; Johnsson and Ge, 1999; Kay B. K., 1998).

Les llibreries es poden generar de diverses maneres, entre les quals l'expressió de pèptids en bacteriòfags o bacteris han estat les més utilitzades. En el cas dels bacteriòfags, els pèptids estan fusionats a una de les proteïnes de la càpside del fag, fent-los així accessibles a les interaccions amb altres molècules. Aquests pèptids estan codificats per oligonucleòtids degenerats, i poden ser expressats a la part N-terminal de les proteïnes de la càpside del bacteriòfag M13 pVIII o pIII, exposant-ne 2500 còpies, i de tres a cinc còpies, respectivament (Figura 2) (Adey, 1996; Kay B. K., 1998).



Les llibreries consisteixen generalment de  $10^8$  a  $10^{10}$  fags recombinants diferents, i es construeixen de la següent manera (Figura 3): 1) se sintetitza una barreja d'oligonucleòtids a partir d'una seqüència degenerada. Els oligonucleòtids contindran a més a més als extrems 3' i 5' les seqüències de tall de dos enzims de restricció diferents; 2) mitjançant una reacció en presència de polimerasa se sintetitza la cadena

complementaria de cada oligonucleòtid; 3) es digereixen amb els dos enzims de restricció tant la barreja d'oligonucleòtids com el DNA del fag M13; 4) es clona cada oligonucleòtid en un DNA del fag M13, mitjançant una reacció en presència de lligassa, obtenint una barreja de DNAs del fag, en la que cada molècula de DNA del fag contindrà un oligonucleòtid diferent; 5) els múltiples DNAs del fag s'introdueixen en cèl·lules d'*Escherichia Coli* per electroporació. Subseqüentment, el DNA del fag dirigirà la síntesi de totes les proteïnes necessàries per iniciar el seu cicle lític, que acabarà amb la secreció de partícules del fag al medi de cultiu (Adey, 1996; Kay B. K., 1998).



D'aquesta manera s'han construït llibreries que exposen pèptids de 6 a 43 aminoàcids de llargada. Aquestes llibreries tan sols contenen una fracció reduïda de les permutacions matemàtiques que resultarien de la combinació dels vint aminoàcids, (Taula 3). Per exemple, en una llibreria de pèptids de 43 amino àcids, s'esperaria

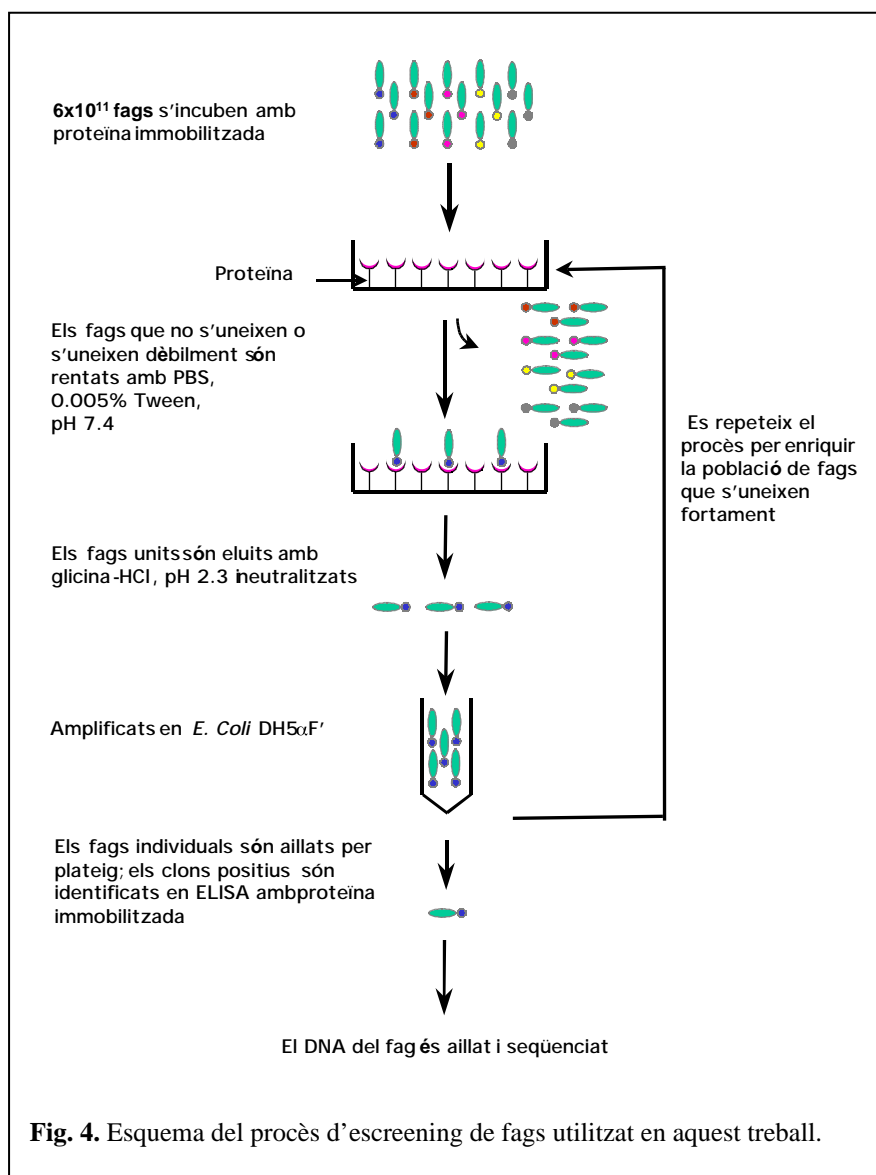
obtenir  $20^{43}$  bacteriòfags, cadascun expressant un pèptid diferent. Tot i així, la complexitat fins ara aconseguida varia de  $10^8$  a  $10^{10}$ . La síntesi dels oligonucleòtids, el clonatge en el vector M13, i la poca viabilitat biològica d'alguna de les seqüències possibles en són els motius principals. Malgrat tot, aquestes llibreries ofereixen una gran diversitat molecular, i constitueixen una eina ràpida, barata i efectiva en l'aïllament de noves molècules amb possibles funcions biològiques.

**Taula 3:** exemple del nombre de pèptids diferents que teòricament es poden crear en llibreries aleatòries del fag M13.

Nombre d'aminoàcids aleatoris en la llibreria	Combinacions possibles
2	$20^2 = 4 \times 10^2$
3	$20^3 = 8 \times 10^3$
4	$20^4 = 16 \times 10^4$
5	$20^5 = 32 \times 10^5$
12	$20^{12} = 4096 \times 10^{12}$
26	$20^{26} = 6710 \times 10^{33}$
43	$20^{43} = 8796 \times 10^{52}$

### *El procés d'escreening*

L'escreening de les llibreries es fa mitjançant la selecció per afinitat. El procés utilitzat en aquest treball ha estat el següent (Figura 4): s'immobilitza la proteïna a pous de plates d'ELISA, i s'incuba amb una alíquota de la llibreria. Després de diversos rentats, les partícules del fag unides es recuperen amb una desnaturalització per pH. Cal remarcar que el fag M13 és resistent a pHs de 2 a 12, i és infecciós un cop el pH del medi ha estat neutralitzat. A continuació els fags que es recuperen són amplificats infectant bacteris. Aquest procés de selecció per afinitat es repeteix tres cops, per assegurar que la majoria dels fags aïllats siguin específics. L'amplificació en bacteris facilita la seqüenciació del DNA del fag, de la qual se'n pot deduir la seqüència d'aminoàcids dels pèptids seleccionats en l'escreening.



Altres mètodes d'escreening inclouen la utilització de proteïnes marcades amb biotina, i la recuperació dels fags units mitjançant pous d'ELISA o partícules magnètiques que contenen estreptavidina (Smith and Scott, 1993). Val a dir que la gran estabilitat del fag M13 ha permès poder fer escreenings en monocapes cel·lulars (Goodson et al., 1994), matrius de columnes (Bradbury et al., 1993), o fins i tot després d'injectar-los en ratolins (Pasqualini and Ruoslahti, 1996).

Una característica important d'aquests pèptids és l'habilitat que aquests semblen tenir en "acomodar-se" en les regions actives o biològicament importants de les proteïnes amb les que es fa l'escreening. Les llibreries de pèptids contenen un nombre

força elevat d'estructures diferents, i per tant, haurien de tenir el potencial de reconèixer diferents aspectes de la proteïna amb la qual es fa l'escreeing. Tot i així, generalment només se'n reconeixen uns pocs dominis, i, el que és més important, aquests dominis coincideixen generalment amb la part activa o llocs d'unió a lligands. Diferents hipòtesis que podrien explicar aquest fenomen han estat plantejades (Kay B. K., 1998):

- 1) Moltes proteïnes interactuen amb altres proteïnes, i els pèptids de les llibreries aleatòries actuarien com a lligands alternatius. A més a més, tot i que dues proteïnes que interaccionin entre elles poden ser de mida molt gran, el nombre d'amino àcids que participen directament en aquestes interaccions és reduït (de tres a deu, generalment). Així doncs, un pèptid pot contenir aquest nombre de residus.
- 2) Quan un pèptid s'uneix a la proteïna, en molts casos desplaça l'aigua de les cavitats que aquesta conté en la seva estructura; aquestes cavitats predominen en el lloc actiu o el lloc d'unió dels lligands.
- 3) El mètode d'escreeing de selecció per afinitat condiciona l'aïllament dels fags que s'uneixen al lligand amb una força suficient com per resistir els rentats. De fet, el valor de les afinitats de pèptids aïllats amb aquesta tècnica, sintetitzats i provats en solució, varia generalment entre 20 $\mu$ M i 10nM.

Aquestes característiques, unit a la gran varietat i nombre que ofereixen les llibreries en el fag M13, han incitat els investigadors a utilitzar-les també com a eines per a trobar pèptids amb fins terapèutics.

#### *Els pèptids com a base per al desenvolupament de medicaments*

L'aïllament de pèptids que s'uneixen a una molècula determinada pot servir per estudiar el comportament d'aquesta molècula, i les interaccions amb els seus lligands. Depenent de l'estudi, un pèptid que inhibeixi la funció biològica de la molècula podria servir també com a base per al desenvolupament de medicaments (Lowman, 1997). En el cas de receptors cel·lulars, per exemple, és possible que alguns pèptids es puguin fer servir directament com a antagonistes o agonistes d'aquesta molècula. Tot i així, cal tenir en compte que generalment la vida mitja dels pèptids en sèrum és molt reduïda, degut a la presència de proteases. Així doncs, aquests pèptids podrien servir només per a tractar problemes de salut aguts. A més a més, els pèptids s'haurien d'injectar directament a la sang, mètode que no és molt acceptat.



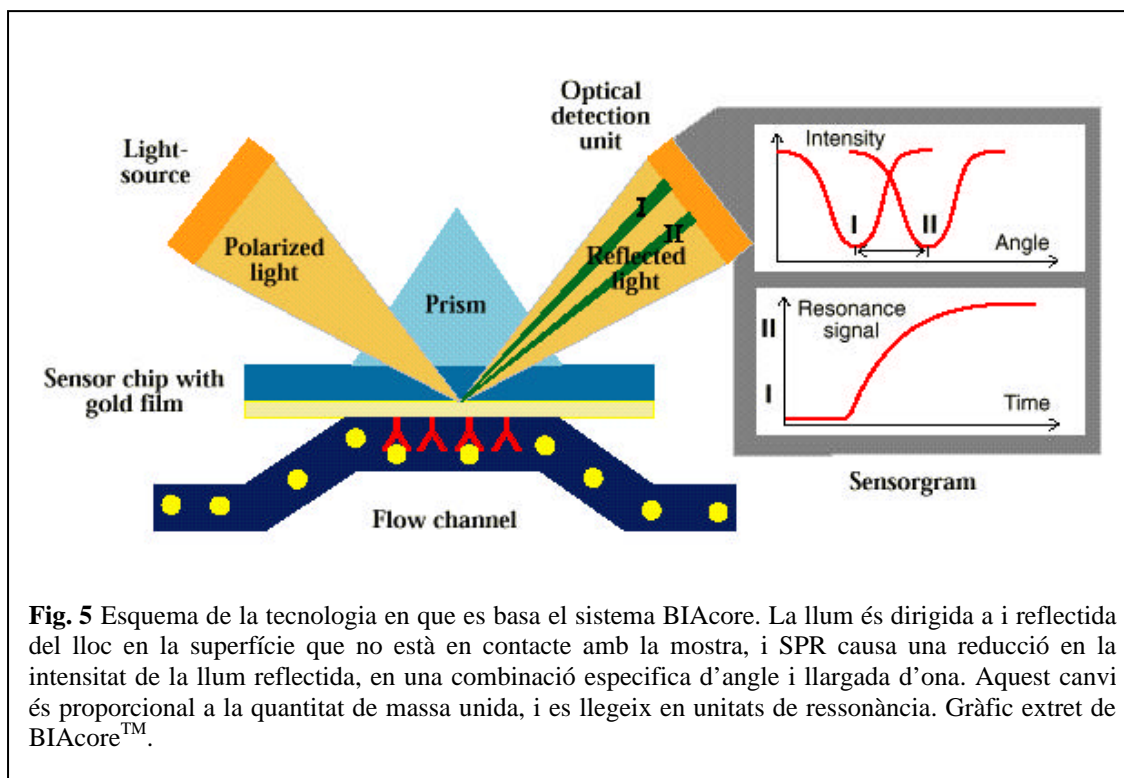
La manera com se solucionen aquests problemes és generalment la següent: primer, un cop aïllat el pèptid, se n'intenta reduir la mida al màxim, conservant-ne l'activitat, mitjançant la síntesi química d'anàlegs (Sahu et al., 1996), o la construcció de noves llibreries que conservin els residus importants per mantenir-ne l'activitat (Kay B. K., 1998). Segon, s'intenta aconseguir que el pèptid tingui una estructura rígida, generalment amb la presència de residus de cisteïnes, perquè la unió al lligand és generalment més forta en els pèptids cíclics. Finalment, els pèptids aïllats poden servir com a model estructural per a dissenyar compostos químics més adequats a les necessitats farmacològiques (Eichler et al., 1995).

### **1.5 Utilització de l'espectroscòpia de surface plasmon resonance fent servir la tecnologia de BIAcore™ per l'anàlisi de la interacció entre proteïnes**

L'anàlisi amb BIAcore està esdevenint ràpidament un sistema estàndard per estudiar la interacció entre biomolècules en temps real (Fivash et al., 1998; Lakey and Raggett, 1998; Morton and Myszkka, 1998; Myszkka, 1997; Panayotou, 1998). Aquesta tècnica es pot fer servir tant per a obtenir dades qualitatives, -comprovar si dues molècules interactuen-, com quantitatives, -obtenció de constants cinètiques i d'equilibri-. Altres aplicacions són el mapeig d'epítops, l'aïllament de nous lligands, o l'escreeing de molècules petites. En els estudis quantitius, les interaccions més estudiades fins ara fent servir BIAcore són les d'antígen-anticòs, i lligand-receptor. Tot i així, també es troben a la literatura estudis d'altres tipus d'interacció, com proteïna-àcid nucleic, proteïna-proteïna, virus-receptors, entre d'altres (Lin and Eisenstein, 1996; Sahu et al., 2000; Shen et al., 1996; Tamamura et al., 1996). Les avantatges principals d'aquest sistema són la facilitat d'ús, la relativa poca quantitat de mostra que es necessita, i que aquesta no s'ha de marcar. En la segona part d'aquesta tesi utilitzarem aquesta tecnologia per analitzar les interaccions entre el receptor de complement CR2 i els seus lligands.

Aquesta tecnologia es basa en el fenomen de surface plasmon resonance (SPR), que s'esdevé quan ones de plasmon de superfície són excitades en una interfase de metall i líquid. La llum és dirigida a, i reflectida del lloc en la superfície que no està en contacte amb la mostra, i SPR causa una reducció en la intensitat de la llum reflectida en una combinació específica d'angle i llargada d'ona. És a dir, l'instrument BIAcore és un

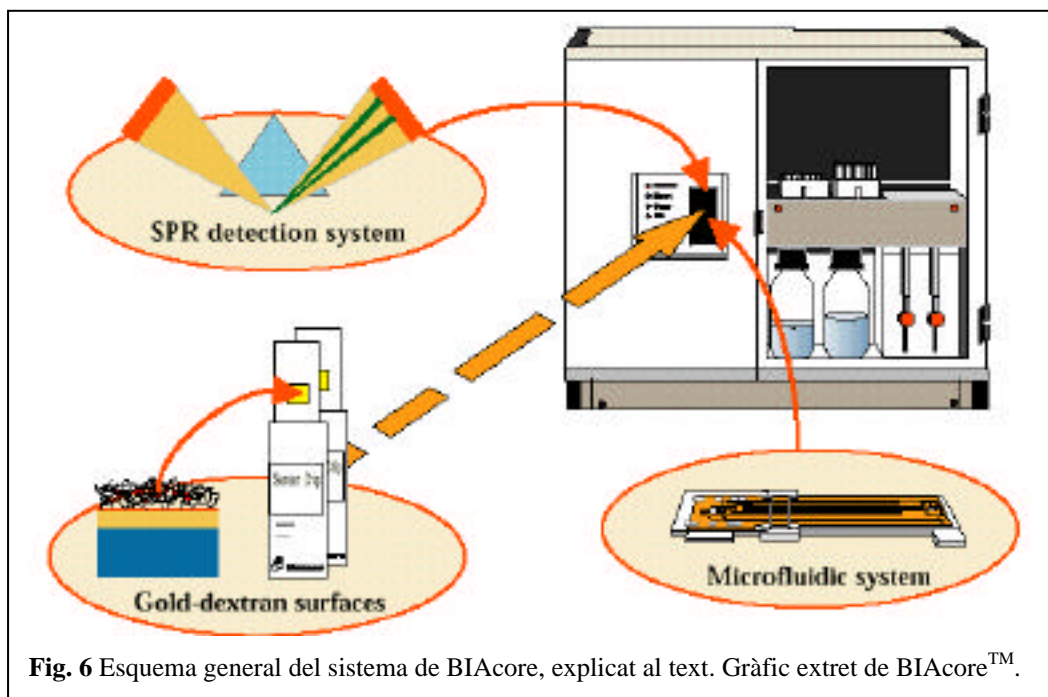
aparell òptic que pot mesurar a temps real canvis en l'índex de refracció prop d'una superfície plana (Figura 5).



L'experiment consisteix en:

1) La immobilització d'una de les molècules objecte d'estudi en una superfície, un xip d'or amb una capa de dextran carboxi-metilat. El xip es munta a una interfase òptica i un sistema de microfluids formant 4 canals diferents (anomenats cèl·lules de flux) (Fig. 6). Cada cèl·lula de flux es pot modificar independentment mitjançant diferents reaccions químiques, i diferents densitats d'una molècula s'hi poden unir covalentment. La unió covalent d'una molècula permet la regeneració de la superfície i així es poden fer mesures repetides de la unió del lligand. La reacció química més utilitzada quan es treballa amb proteïnes per la immobilització és la unió de la proteïna a la superfície del xip mitjançant els enllaços amida. Això resulta però, en una distribució irregular de les molècules al xip, i fins i tot en pot causar la inactivació. En el nostre treball, hem escollit immobilitzar les molècules en el xip d'una manera orientada. És a dir, n'hem marcat un sol residu amb biotina, i hem utilitzat xips que continguin avidina. Com l'afinitat de la interacció biotina-avidina és de l'ordre de  $10^{-14}$ , això assegura que la

nostra molècula quedarà fermament unida al xip. En el capítol 4 d'aquesta tesi presentem el marcatge d'aquestes proteïnes, que ha estat clau per a l'obtenció dels resultats del capítol 5.

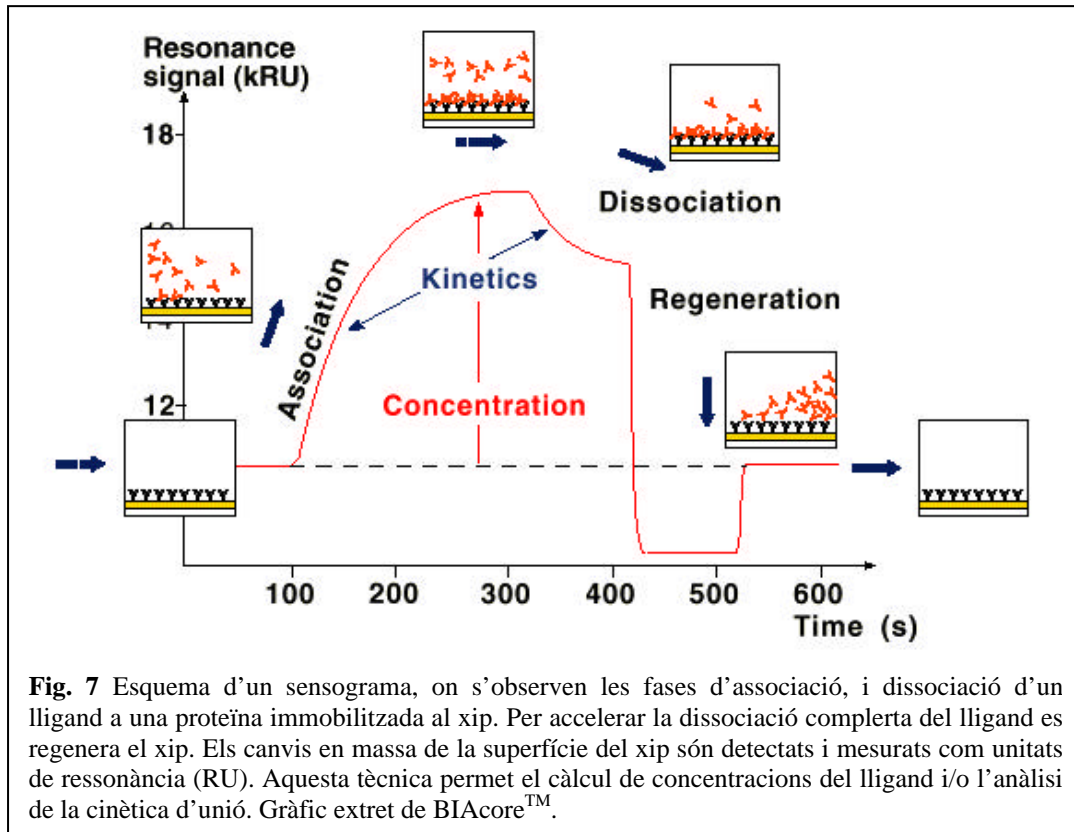


**Fig. 6** Esquema general del sistema de BIAcore, explicat al text. Gràfic extret de BIAcore™.

2/ Un cop la molècula ha estat immobilitzada, s'injecten diferents concentracions del lligand en solució. La unió del lligand causarà canvis en l'índex de refracció a la superfície del xip, que seran detectats com a canvis en el senyal de SPR. En cada injecció, el lligand forma un complex amb la molècula immobilitzada al xip (fase d'associació), i es permet que el complex es dissociï (fase de dissociació). Posteriorment es renta el xip amb la mateixa solució en què es produeix la reacció. Si el lligand no s'ha dissociat completament, se n'indueix la dissociació total injectant una solució amb un increment de la concentració de sal o una variació del pH. Aquesta solució s'anomena solució de regeneració, i, evidentment, no pot malmetre la molècula immobilitzada al xip.

En general, la relació entre el canvi de concentració de massa amb el canvi d'índex de refracció és pràcticament el mateix per a totes les proteïnes i pèptids, i similar per a glicoproteïnes, lípids i àcids nucleics. El senyal que s'obté en BIAcore és mesurat en unitats de ressonància (RU); 1000 RUs equivalen a 1 ng de massa per  $\text{mm}^2$ . Com el sistema està integrat a un ordinador que recull totes les dades, cada canvi es pot

observar a temps real en un gràfic derivat, anomenat sensograma (Fig. 7). A més a més, el sistema està acompanyat d'un software (Biaevaluation 3.0) que permet l'estimació de la constant d'associació ( $k_{on}$ ) i dissociació ( $k_{off}$ ) i la constant d'equilibri ( $K_{eq}$  o  $K_D$ ).



## 2. OBJECTIUS DEL TREBALL

L'estudi de la utilització del sistema immunològic de l'hoste pels virus com a patògens per al seu propi benefici és el principal objectiu d'aquest treball. La recerca de la interacció entre un virus i el sistema immunològic enriqueix el coneixement d'aquest sistema i, d'altra banda, proporciona informació necessària per a la protecció contra la invasió viral.

Concretament, en aquest treball de tesis ens centrarem en l'anàlisi de dues espècies d'herpesvirus virulents en humans, l'Herpes Simplex Virus-1 (HSV-1) i l'Epstein Barr Virus (EBV). L'entrada d'ambdós virus a les cèl·lules és mediada per receptors del sistema immunològic. Estudiarem la interacció dels respectius receptors cel·lulars, Herpes Virus Entry mediator A (HveA), i el receptor de complement 2 (CR2), amb les glicoproteïnes virals que s'hi uneixen, i amb llurs lligands naturals, els quals participen en la defensa de l'hoste.

Els diferents aspectes que s'estudiaran són:

- 1) Es caracteritzarà la interacció dels receptors HveA i CR2 amb els seus lligands fent servir proteïnes recombinants o purificades de sèrum; en el cas de HveA ens centrarem en la localització del lloc d'unió de cada lligand al receptor. En el cas de CR2, analitzarem la cinètica d'unió dels seus lligands. Per a ambdós receptors, s'analitzarà si la unió de la proteïna viral al receptor podria interferir i/o modular-ne la unió dels seus lligands naturals. Els resultats s'analitzaran dins del marc de la resposta immunològica de l'hoste mediada pel receptor cel·lular, i en relació al possible paper modificador d'aquesta resposta per part de la proteïna viral.
- 2) Per a facilitar el nostre estudi sobre HveA, cercarem nous lligands peptídics d'aquest receptor, utilitzant llibreries aleatòries de pèptids. A més, s'analitzarà la capacitat d'aquests pèptids per inhibir l'entrada del virus a les cèl·lules, és a dir, com a possibles agents terapèutics.



**3. PART I:**

**El receptor herpes virus entry mediator A (HveA, TNFR14)  
El virus de l'Herpes Simplex-1**

### 3.1 Introducció ‡

#### 3.1.1 Característiques generals i estructura dels HSV

HSV-1 i HSV-2 pertanyen al supgrup neurotròpic (alphaherpesviridae) dels *Herpesviridae*, i van ser els primers herpesvirus humans en ser descoberts. De fet, les primeres descripcions d'éssers humans infectats daten de l'antiga Grècia. La seva habilitat de causar diferents tipus d'infeccions, de mantenir-se en latència en l'hoste de per vida, i reactivar-se per causar lesions recurrents, han fet que fossin objecte d'intens estudi.

Les manifestacions més comunes de la malaltia són lesions mucocutànies de la boca, la cara, els ulls o els genitals. HSV es presenta en dues soques, HSV-1 i HSV-2, les quals crosreaccionen antigènica, però tenen diferents patrons de neutralització i tendeixen a produir diferents símptomes clínics. HSV-1 s'associa principalment a infeccions de la part superior del cos, mentre que HSV-2 generalment causa malalties genitals. Tant l'HSV-1 com l'HSV-2 estableixen infeccions latents en les neurones dels ganglis perifèrics i poden reactivar-se i causar lesions recurrents. En rares ocasions, el virus s'escampa al sistema nerviós central i causa meningitis o encefalitis. A més a més, la infecció latent en cèl·lules del sistema nerviós central podria estar associada al desenvolupament de la malaltia d'alzheimer. Cal remarcar que la infecció per herpes simplex és quasi universal, és a dir, molts adults són seropositius.

Tot i que l'hoste principal és l'ésser humà, aquests virus poden també infectar diversos animals, incloent rosegadors. Els darrers han esdevingut, doncs, els models animals principals per estudiar l'HSV.

HSV és el prototip d'herpesvirus. Els seu genoma té una llargada de 150 Kb, i codifica uns 70 polipèptids, dels quals no tots han estat encara completament caracteritzats.

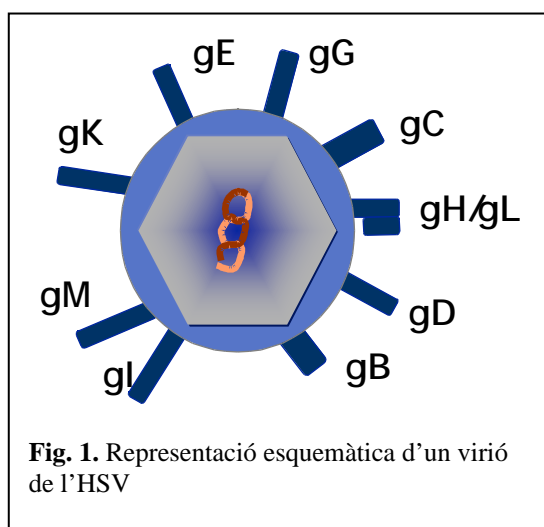
---

‡ (1996; 1997)



Els DNAs de l'HSV-1 i HSV-2 difereixen en llocs de tall de certs enzims de restricció, però són molt similars (85% similars). Per tant, les proteïnes virals d'ambdues soques mantenen un alt nivell d'identitat.

Una de les característiques dels HSV que cal remarcar en el context d'aquesta tesi és la presència de deu glicoproteïnes associades a la membrana, anomenades gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gK, gL i gM (Figura 1).



### 3.1. 2 Entrada dels HSV a la cèl·lula de l'hoste

El procés d'entrada a la cèl·lula és força complex i no ha estat encara completament caracteritzat. Cal tenir en compte que durant el seu cicle normal de vida, els HSV infecten i es repliquen dins de tipus cel·lulars molt diferents: epitelials, neuronals, i diferents tipus cel·lulars que participen en la resposta immunològica, com cèl·lules dendrítiques i cèl·lules T citotòxiques.

Estudis fets en cultius cel·lulars demostren que de les deu glicoproteïnes de membrana conegudes, cinc (gB, gC, gD, gH i gL) són indispensables per a l'entrada del virus (G., 1993). L'entrada a la cèl·lula hoste la podem dividir en dues fases:

1) Unió a la superfície cel·lular: les glicoproteïnes gC i/o gB interactuen amb els glicosaminoglicans de la superfície cel·lular.

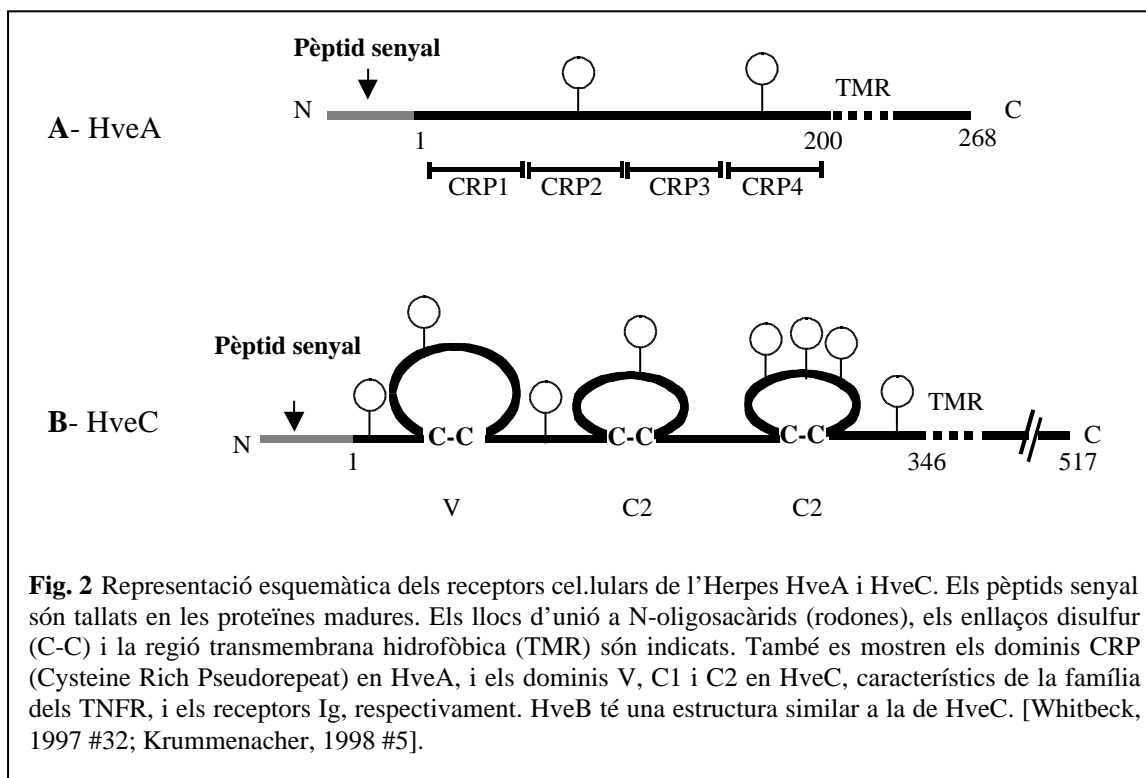
2) Penetració: la glicoproteïna gD s'uneix a un receptor cel·lular, donant lloc a una fusió independent de pH de la membrana viral i la cel·lular. En aquest darrer procés intervenen individualment o en combinació les glicoproteïnes gD, gB, i gH-gL.

Els primers receptors cel·lulars del virus van ser identificats recentment per Montgomery et al. Aquest grup va aïllar diferents gens de la línia cel·lular HeLa que quan eren expressats en cèl·lules no permissives (CHO, Chinese Hamster Ovary), permetien l'entrada de l'HSV. Fins ara, quatre gens han estat caracteritzats, tres dels quals codifiquen per a tres receptors cel·lulars de característiques diferents, anomenats Herpes Virus Entry Mediator A, B i C (HveA, HveB i HveC, respectivament) (Geraghty et al., 1998; Montgomery et al., 1996; Warner et al., 1998) (Taula 1 i Figura 2). Mentre que HveA és un membre de la família de receptors de necrosi tumoral, HveB i HveC (altrament anomenats PRR2 i PRR1, respectivament) pertanyen a la superfamília d'immunoglobulines. S'ha pogut observar que aquestes tres proteïnes medien l'entrada de diferents soques i espècies d'alphaherpesvirus en cèl·lules no permissives CHO transformades amb el gen de cada receptor (Taula 1). HveC sembla ser el principal mediador de l'entrada del virus a cèl·lules epitelials de la mucosa i la posterior disseminació a les cèl·lules del sistema nerviós (Geraghty et al., 1998).

El quart receptor ha estat descrit més recentment i va ser aïllat per el mateix grup i fent servir la mateixa tècnica que va resultar en el clonatge de HveA-C. Es tracta d'un o més llocs específics generats en el grup heparan sulfat per l'acció de glucosaminil 3-O-sulfotransferases, concretament les isoformes 3-OST-3<sub>B</sub> i 3-OST-3<sub>A</sub>, en humans (Shukla et al., 1999). En aquest treball es mostra com cèl·lules CHO, resistents a l'entrada de l'HSV, esdevenen susceptibles per l'acció d'aquests enzims en els grups heparan sulfat de la superfície cel·lular, facilitant la unió de la gD viral. És a dir, en l'absència dels tres receptors mencionats anteriorment (HveA-C), les cèl·lules resistents es poden fer susceptibles a l'entrada de l'HSV-1 però no a l'entrada de HSV-2, PRV o BHV-1 si se les transfecta amb el gen d'una d'aquestes dues sulfotransferases.

**Taula 1:** Resum de les característiques principals dels HveA, HveB i HveC

	HveA	HveB	HveC
<b>Família de proteïnes</b>	TNFR	Immunoglobulines	Immunoglobulines
<b>Expressat en</b>	- molts òrgans, teixits limfoides, principalment - absent en teixits neuronals	- molts teixits - present en teixits neuronals	- molts teixits - present en teixits neuronals
<b>Soques de virus als quals facilita l'entrada en cèl·lules CHO transformades amb el gen del receptor</b>	. HSV-1 . HSV-2	.HSV-1 mutants: HSV-1 (KOS) Rid1, Rid2, ANG . Alguns HSV-2	. HSV-1 . HSV-2 . PRV . BHV-1
<b>Localització cromosomal (humans)</b>	cromosoma 1	cromosoma 19	cromosoma 11
<b>Unió a glicoproteïna viral</b>	gD	gD	gD
<b>Lligands extracel·lulars de l'hoste coneguts</b>	. LT- . LIGHT		HveC



### 3.1.3 El receptor cel·lular HveA

HveA ha estat denominat de maneres diferents a la literatura: TNSFR14, HVEM, LIGHTR, TR2 o ATAR (Hsu et al., 1997; Kwon et al., 1999; Kwon et al., 1997; Montgomery et al., 1996). HveA és una proteïna integral tipus I, de 268 aminoàcids, i conté un motiu de quatre seqüències pseudorepetitives, riques en cisteïnes, característiques dels TNFR, anomenades CRP (Montgomery et al., 1996) (Figura 2).

HveA és expressat en diversos teixits humans, sent més abundant en teixits limfoides, com la medul·la i els leucòcits de sang perifèrica. En cultius primaris cel·lulars, l'ARN missatger de HveA ha estat detectat en cèl·lules T CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> tant en repòs com activades, en cèl·lules B CD19<sup>+</sup>, i en monòcits (Kwon et al., 1999).

La unió d'HveA a diferents membres de la família dels factors associats als TNFR (TRAF) causa l'activació de reguladors de la transcripció cel·lular, com ara NF-κB, i AP-1 (Marsters et al., 1997). Per altra banda, els lligands extracel·lulars de HveA descrits fins ara són la limfotoxina (LT-) i a la proteïna recentment identificada LIGHT (Mauri et al., 1998).

Totes aquestes dades suggereixen que HveA podria jugar un paper en l'activació del sistema immunològic de l'hoste, probablement un efecte estimulador de les cèl·lules T. Per exemple, la unió d'anticossos monoclonals a HveA en cèl·lules T CD4<sup>+</sup> n'impedeix una proliferació normal, la producció de citoquines (com IL-2, IL-4, TNF- i IFN- ), i l'expressió de receptors marcadors de l'activació (com CD71, i CD25) (Harrop et al., 1998).

Finalment, cal mencionar un estudi recent realitzat amb cèl·lules altament resistents a l'entrada de l'HSV, però no en esdeveniments posteriors de la infecció. En aquest estudi es va observar que l'expressió transitòria del gen de HveA inhibia aquesta resistència, i es demostrava que HveA pot facilitar l'entrada de virus lliure i alhora mediar la disseminació de cèl·lula a cèl·lula del virus (Roller and Rauch, 1998).

### 3.1.4 Els lligands naturals de HveA: la limfotoxina $\alpha$ i LIGHT

La limfotoxina  $\alpha$ , o LT- $\alpha$ , és una citoquina produïda per les cèl·lules B i T, i forma part del grup de citoquines que s'uneixen als receptors de la família de factors de necrosi tumoral (TNF), els quals participen en diferents fases de la resposta immunològica i el desenvolupament d'òrgans limfoides (Gruss and Dower, 1995; Korner and Sedgwick, 1996; Kwon et al., 1999; Smith et al., 1994; Ware et al., 1995).

LT- $\alpha$  es troba a la superfície cel·lular formant heterotrímers amb la limfotoxina  $\beta$  (LT- $\beta$ ), o en solució, formant homotrímers. Aquests homotrímers estan formats de subunitats amb una conformació de fulles  $\beta$ -antiparal·leles, en els quals el lloc d'unió a receptors cel·lulars es troba a la regió present entre les diferents subunitats del trímer (Banner et al., 1993; Ware et al., 1992; Ware et al., 1995).

Estudis de la funció *in vivo* de la LT- $\alpha$ , fent servir la tecnologia de “gene targeting” per crear animals deficients en aquesta proteïna han demostrat que LT- $\alpha$  juga un paper central en la formació d'òrgans limfoides secundaris durant el desenvolupament. Aquesta proteïna també controla la formació de centres germinals necessaris per al canvi d'isotipus d'immunoglobulina durant la resposta immunològica en adults (Ware et al., 1995).

La limfotoxina  $\alpha$  soluble s'uneix a tres receptors, els receptors de necrosi tumoral I i II (TNFR1 i TNFR2), que són presents en quasi tots els tipus cel·lulars, i a HveA. La unió de LT- $\alpha$  a TNFR1 causa citotoxicitat cel·lular i defensa de l'hoste anti viral i anti bacterial, mentre que la unió a TNFR2 provoca proliferació de les cèl·lules T (Kwon et al., 1999). Per altra banda, la unió de LT- $\alpha$  a HveA ha estat descrita recentment i el seu efecte en les cèl·lules és desconegut.

LIGHT, per altra banda, va ser identificada com a nou lligand del receptor HveA, que s'expressa en les cèl·lules T quan aquestes són activades amb PMA (phorbol myristate acetate) i  $\text{Ca}^{2+}$  ionófor. L'especificitat de la unió de LIGHT amb HveA va ser corroborada quan, en presència d'un excés de formes recombinants solubles de HveA o

gD en el medi de cultiu, aquestes proteïnes inhibien la interacció HveA-LIGHT (Mauri et al., 1998).

LIGHT va ser subseqüentment clonada. És una proteïna transmembrana de 29 kDa, amb un lloc per la incorporació de N-oligosacàrids (aminoàcid 102). Aquesta proteïna presenta homologia de seqüència amb la regió C-terminal de la LT- i el factor de necrosi tumoral (TNF, 27%), el lligand de Fas (31%) i altres proteïnes de la família dels TNF. Aquesta regió està involucrada amb la unió als receptors de TNF. L'RNA missatger de LIGHT es detecta majoritàriament a la medul·la, però també en el cervell, els teixits limfoides perifèrics, el cor, la placenta, el fetge, el pulmó i el ronyó (Mauri et al., 1998).

A més a més d'unir-se a HveA, LIGHT també interactua amb un altre TNFR, el receptor de limfotoxina beta, LT<sub>R</sub>. La unió de LIGHT a TN<sub>R</sub> induïx l'apoptosi de cèl·lules tumorals. Per altra banda, s'ha proposat que la unió a HveA podria participar en l'organització de teixit limfoide (Rooney et al., 2000).

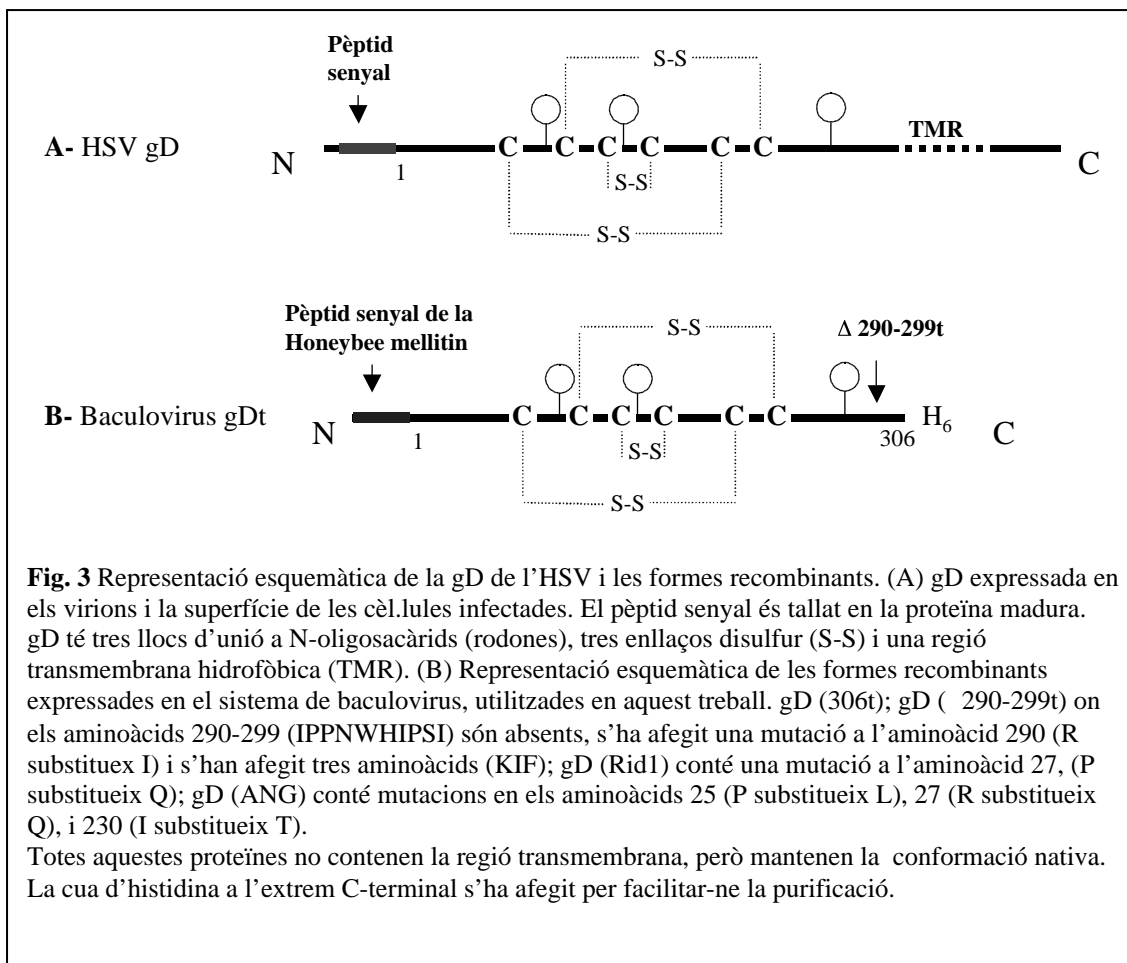
### 3.1.5 Els receptors cel·lulars HveB i HveC

Els gens que codifiquen aquestes proteïnes havien estat clonats anteriorment a la seva identificació com a receptors del virus de l'herpes, i havien estat anomenades poliovirus receptor-related protein 1 (PRR1), i poliovirus receptor-related protein 2 (PRR2) (Eberle et al., 1995). Ambdues són membres de la superfamília de receptors d'immunoglobulines (Ig), relacionada amb el receptor de poliovirus (Pvr). Basant-se en la seva habilitat en permetre l'entrada dels virus de l'herpes a les cèl·lules, se'ls va canviar el nom a HveC (PRR1) i HveB (PRR2) (Geraghty et al., 1998). La transfecció del gen de HveC a cèl·lules CHO les fa susceptibles a l'entrada de tots els alphaherpesvirus estudiats fins ara (HSV-1, HSV-2, PRV, i BHV-1), mentre que el gen de HveB facilita l'entrada d'un nombre de virus mutants (HSV-1 rid1, rid2, ANG), algunes soques d'HSV-2, i PRV (Geraghty et al., 1998) (Taula 1 i Figura 3).

HveC i HveB són glicoproteïnes de membrana de tipus I, de 518 i 479 aminoàcids, respectivament, i els seus RNA missatgers semblen ser expressats en tots els teixits i línies cel·lulars examinats fins ara. Les molècules pertanyents a la família de les immunoglobulines es caracteritzen per la presència d'un motiu semblant al que es va identificar primer en les immunoglobulines. Així doncs, els dominis extracel·lulars de HveB i HveC consisteixen en tres dominis Ig, classificats V-C2-C2, des de la part més distal a la part més propera a la membrana (Figura 2). La funció cel·lular d'ambdós receptors és força desconeguda. Tot i així, un treball recent suggereix que HveC i HveB funcionen com molècules d'adhesió cel·lular i per tant es localitzen a les unions intercel·lulars (Takahashi et al., 1999).

### 3.1.6 La proteïna viral gD

La glicoproteïna gD és una proteïna integral de membrana del tipus I. És una proteïna de 319 aminoàcids, amb tres llocs per la unió de N-oligosacàrids i sis cisteïnes que formen tres enllaços disulfur. La funció de gD depèn de la seva conformació nativa, però no del nivell de glicosilació (Dean et al., 1995; Johnson and Spear, 1989; Sodora et al., 1991; Tal-Singer et al., 1994). L'expressió de gD i formes mutants d'aquesta en el sistema de baculovirus ha servit per estudiar les característiques de la proteïna. Algunes mutacions en la proteïna fan que aquesta perdi l'habilitat de bloquejar la infecció viral, mentre d'altres, com gD-1( 290-299t), l'incrementen remarcadament (Johnson et al., 1990; Nicola et al., 1997; Nicola et al., 1998; Nicola et al., 1996) (Figura 3).



Diferents estudis en el passat indicaven que gD s'unia directament a un receptor cel·lular. Per exemple, virions de l'herpes inactivats amb llum ultravioleta (UV) són capaços de bloquejar la infecció per HSV, però aquesta qualitat es perd quan els virions no contenen gD. A més, l'HSV no és capaç d'infectar cèl·lules que expressen gD. Aquesta interferència mediada per gD es produeix a nivell de penetració i és dependent de l'estructura de gD en el virus (Johnson and Spear, 1989). Finalment, les cèl·lules que han estat incubades amb gD són resistents a la infecció. Totes aquestes observacions recolzaven la teoria que la gD no-viral o dels virus inactivats amb UV s'uneix a un (o més) receptor/s cel·lular/s, i això n'impedeix la unió de la gD viral.

### 3.1.7 Interacció entre gD i HveA

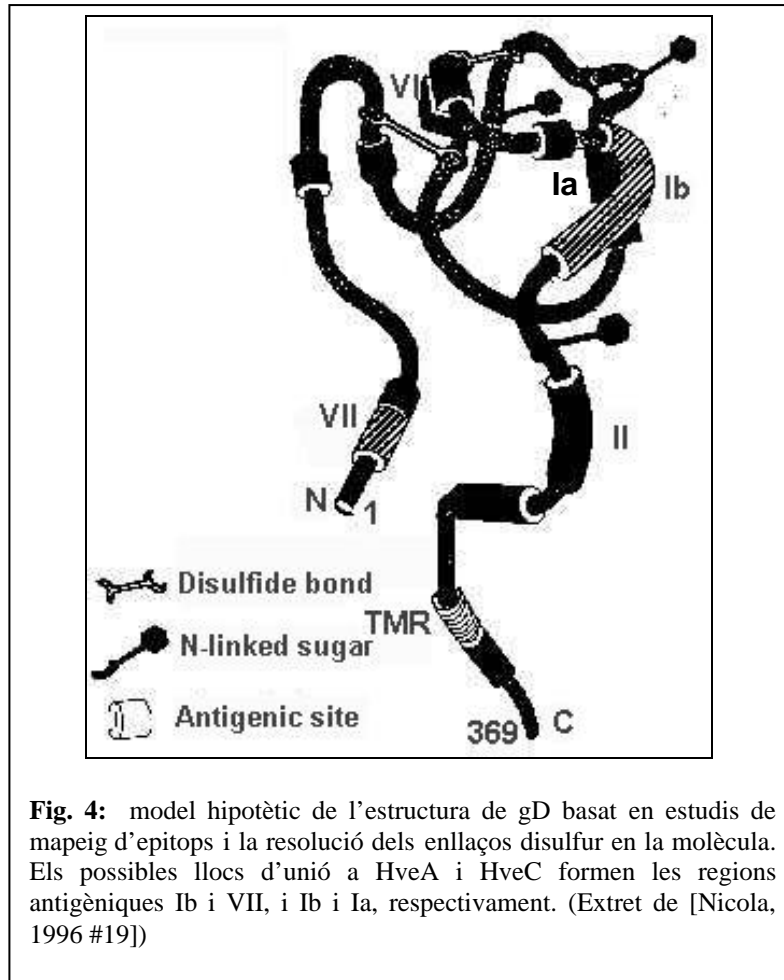
Els estudis fets en gD mencionats anteriorment indicaven que aquesta era la proteïna candidata d'unió a un receptor cel·lular. Efectivament, Whitbeck et al. van



demostrar que de totes les glicoproteïnes virals, gD era l'única que s'unia directament a HveA (Whitbeck et al., 1997). Aquests resultats suggerien que la interacció entre aquestes dues proteïnes permet l'entrada de l'HSV a cèl·lules que expressen el receptor. La interacció gD/HveA és depenent de la conformació de gD, i no dels nivells de glicosilació de la proteïna viral, observació que concorda amb els estudis anteriors fets sobre gD (Whitbeck et al., 1997). A més a més, formes recombinants de gD inhibeixen l'entrada del virus a diferents tipus cel·lulars que expressen HveA: cèl·lules Vero (African green monkey kidney), cèl·lules CHO-HveA (cèl·lules Chinese Hamster Ovary transfectades amb el gen per HveA), (Whitbeck et al., 1997). Nicola et al. aportaren més evidència d'aquesta interacció, demostrant que virions purificats de la soca KOS de HSV-1 s'uneixen directament a una forma recombinant soluble de HveA. A més a més, anticossos específics per gD, i no per altres glicoproteïnes del virus, inhibien aquesta interacció (Nicola et al., 1998).

Ambdós HveA i gD formen dímers en solució, i interaccionen amb una estequiometria de 2:1. La interacció entre gD i HveA segueix el model d'unió de Languimir de 1:1, és a dir, dos dímers de HveA podrien formar una unitat d'unió per interaccionar amb un dímer de gD, que formaria la segona unitat d'unió (Willis et al., 1998).

Les regions de gD que interaccionen amb el receptor han estat mapejades amb l'ajut d'anticossos monoclonals i l'expressió de formes mutants de gD. Degut a la manca de dades estructurals per a aquesta proteïna, se n'ha fet un model basat en estudis de mapeig d'epítops (Nicola et al., 1998; Nicola et al., 1996), i la resolució dels enllaços disulfur en la molècula. Les dades experimentals suggereixen que les regions de gD que interaccionen amb HveA comprenen els aminoàcids 11 a 19, i 222 a 252 de la proteïna viral (Figura 4).



En el moment d'escriure aquest treball no existeix cap dada publicada que descrigui quins són els dominis d'unió de HveA a gD.

Cal remarcar que gD no només interacciona amb HveA, sinó que també s'uneix als altres dos receptors de HSV, HveB i HveC (Taula 1). Els dominis de gD que medien la unió a aquests receptors comprenen regions d'unió a HveA a més a més d'altres regions en la glicoproteïna viral .

Un altre fet que cal mencionar és que, com s'ha mostrat anteriorment, tot sembla indicar que els receptors de l'HSV-1 aïllats fins ara també permeten l'entrada d'altres alphaherpesvirus, com l'HSV-2, BHV-1, i PRV. En tots els casos, aquesta entrada està mediada per la interacció gD viral-receptor.

### 3.1.8 Interacció gD-HveC

Mitjançant l'expressió de formes recombinants de HveC i gD, Krummenacher et al., van demostrar que gD és també l'única proteïna viral que s'uneix a HveC (Krummenacher et al., 1998). En aquest treball es demostrava que HveC i diferents formes de gD s'unien de forma específica i saturable en assaigs d'unió directa (ELISA). A més a més HveC s'uneix a la gD en virions de l'HSV purificats.

Com en el cas de HveA-gD, la interacció gD-HveC és independent del nivell de glicosilació de gD i dependent de l'estructura nativa de gD. Existeixen, però, diferències en la reactivitat d'ambdós receptors amb la glicoproteïna viral. Diferents formes recombinants mutants de gD semblen unir-se amb afinitat diferent per ambdós receptors, i possiblement formant complexos d'estequiometria diferent (HveA podria unir menys gD en el complex que HveC)(Krummenacher et al., 1998). A més a més, estudis amb anticossos monoclonals contra gD han demostrat que la regió N-terminal de gD (amino acids 11-19, regió VII) és important per a la unió amb HveA, però no amb HveC, mentre que la regió que compren els amino acids 222-252 (regió Ib) de gD sembla interactuar amb ambdós receptors. Per altra banda, anticossos contra la regió formada per amino acids 216-234 de gD (regió Ia) afecten només la interacció HveC-gD (Krummenacher et al., 1998; Whitbeck et al., 1999) (Figura 4).

Mitjançant l'expressió de formes recombinants quimèriques del receptor, i estudiant la seva unió a gD en ELISA, i alhora la seva capacitat de facilitar l'entrada del virus a les cèl·lules, s'ha demostrat que gD s'uneix al domini V de HveC (Cocchi et al., 1998; Krummenacher et al., 1999)(Figura 2).

### 3.1.9 gD podria ser una viroquina

Per viroquina s'entén tota proteïna viral capaç de fer funcions similars a una citoquina. Dues observacions suggereixen que gD podria ser una viroquina: 1) gD i la proteïna del sistema immunològic LIGHT competeixen per la unió a HveA i 2) LIGHT és capaç de bloquejar l'entrada de l'HSV en cèl·lules que expressen HveA (Mauri et al.,

1998). Així doncs, es postula que durant el procés d'entrada del virus, gD podria modificar l'activitat d'HveA.

Un altre fet que cal tenir en compte és que l'expressió de gD a la superfície de les cèl·lules infectades és molt anterior a l'alliberament dels virions madurs. Així doncs la gD expressada en aquestes cèl·lules podria interactuar amb les cèl·lules T o B que expressen HveA, produint una modulació de la resposta immunològica. Per provar aquesta possibilitat, recentment dos grups han estudiat l'activitat immunoreguladora de l'herpes simplex virus en dos tipus cel·lulars de la resposta immunològica, els quals expressen HveA, les cèl·lules T citotòxiques i les cèl·lules dendrítiques (Raftery et al., 1999; Salio et al., 1999). Les cèl·lules T citotòxiques infectades amb HSV-1 són anòmalament reconegudes per les cèl·lules del mateix tipus no infectades, i eliminades. Així, es proposa que l'HSV eliminaria el blocatge que protegeix les cèl·lules T citotòxiques de malmetre's les unes a les altres, mecanisme que indirectament protegiria de la resposta cel·lular les cèl·lules epitelials infectades (Raftery et al., 1999). Per altra banda s'ha observat que l'HSV impedeix la maduració, la producció de citoquines, i la resposta a estímuls migratoris de les quemoquines a cèl·lules dendrítiques (Salio et al., 1999). Els mecanismes específics utilitzats per l'HSV per interferir amb aquests processos immunològics són encara força desconeguts.

### 3.2 Treball 1:

## **“Inhibició de la unió de gD d’Herpes Simplex Virus i limfotoxina- $\alpha$ a HveA per pèptids antagonistes”**

**(Sarrias et al., 1999)**

### **Resum**

La proteïna herpesvirus entry mediator A (HveA) forma part de la família dels receptors dels factors de necrosi tumoral (TNFR), i media l’entrada de la majoria de soques del virus de l’herpes simplex-1 (HSV-1) a cèl·lules de mamífer. Els estudis de la interacció entre HSV-1 i HveA han demostrat que de totes les proteïnes virals que intervenen en l’entrada del virus, només gD s’uneix directament a HveA, i que aquesta unió facilita l’entrada del virus a les cèl·lules. A més a més, HveA interacciona amb dos lligands dels TNFR, la limfotoxina i una proteïna associada a membrana anomenada LIGHT. Amb l’objectiu d’estudiar la relació entre HveA, els seus lligands naturals, i la proteïna viral involucrada en l’entrada de l’HSV a les cèl·lules, hem fet un screening de dues llibreries de pèptids aleatoris per trobar pèptids que s’uneixin a una forma recombinant de HveA. Experiments de selecció per afinitat han resultat en l’aïllament de dos pèptids, BP-1 i BP-2 que bloquegen la interacció entre gD i HveA. Dels dos pèptids, només BP-2 inhibeix l’entrada de l’HSV a cèl·lules CHO transfectades amb un plàsmid que expressa HveA. Quan hem analitzat la capacitat dels pèptids per bloquejar la interacció de HveA amb la limfotoxina, hem observat que BP-1 inhibeix aquesta interacció. Així doncs, hem disseccionat els llocs d’interacció entre el receptor cel·lular, els lligands naturals LT- i LIGHT,, i gD, la principal proteïna viral que participa en l’entrada del virus de l’HSV a les cèl·lules.

## Materials i mètodes

### *Productes químics i solucions*

Tots els productes químics i solucions fets servir per a la síntesi de pèptids van ser comprats a Applied Biosystems (Foster City, Calif.), excepte els aminoàcids F-moc (9-fluorenylmethoxycarbonyl), que procedien de Nova Biochem. (San Diego, Calif.).

### *Expressió de proteïnes*

La producció i purificació de HveA (200t), HveA (120t), gD-1(306t), gD-1( 290-299t), i LT- a partir de cèl·lules infectades amb baculovirus recombinant ha estat descrita abans (Crowe et al., 1994; Nicola et al., 1998; Nicola et al., 1996; Sisk et al., 1994; Tessier et al., 1991; Whitbeck et al., 1997; Williams-Abbott et al., 1997). Breument, el cDNA d'interès va ser amplificat amb PCR per a cada proteïna, amb cinc o sis codons His a la part C-terminal, i un codó stop va ser afegit a l'encebador 5'. La cua d'Histidines va ser afegida com a lloc d'unió d'una resina de níquel-nitroacètic 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 substituint la de les pròpies proteïnes.

Els constructes que en van resultar van ser recombinats amb el virus de baculovirus (*Autographa Californica*) per cotransfecció amb Baculogold DNA (Pharmlingen, San Diego).

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). Les proteïnes van ser purificades amb la columna de níquel-nitroacètic àcid i eluides 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. Les proteïnes van ser llavors dialitzades amb PBS i concentrades.

### *Anticossos*

L'anticòs policlonal R140 contra HveA va ser generat immunitzant un conill amb la proteïna HveA (200t) produïda en baculovirus, com ha estat descrit prèviament (Terry-

Allison et al., 1998; Whitbeck et al., 1997). L'anticòs policlonal contra gD, R7, es va produir contra la proteïna gD-2 aïllada de cèl·lules infectades amb el virus, com s'ha descrit anteriorment (Isola et al., 1989). La producció de l'anticòs monoclonal contra la LT- (AG9) ha estat descrita abans (Browning et al., 1995).

#### *Cèl·lules i virus*

Les cèl·lules CHO van créixer en medi Ham's F-12 suplementat amb sèrum fetal boví (FBS). Les cèl·lules CHO-K1 que expressen HveA (CHO-HveA) i les cèl·lules CHO-K1 que expressen HveC van créixer en medi Ham F-12 suplementat amb 10% FCS i 200 µg de G418 per ml. El virus KOS-*hrR3* és un virus KOS mutant en el que el gen d' *Escheríchia coli lacZ* substitueix el locus de la subunitat major de la ribonucleòtid reductasa (ICP6), i està sota el control transcripcional del promotor ICP6. Aquest virus va ser propagat en cèl·lules African green monkey kidney (Vero), les quals expressen la subunitat major de la ribonucleòtid reductasa de HSV-1 (Goldstein and Weller, 1988). Les cèl·lules Vero van créixer en medi mínim essencial Dulbecco's, suplementat amb 5% FCS, a 37°C.

#### *Construcció i escreening de les llibreries de pèptids*

La llibreria de 27 residus consistia en  $2 \times 10^8$  recombinants, cadascun expressant la seqüència  $SR X_{12} (S, P, T, \text{ o } A) A (V, A, D, G, \text{ o } E) X_{12} SR$  a la part N-terminal de pIII. La llibreria va ser construïda unint i estenent dos llargs encebadors degenerats, amb una regió complementària a la part 3' (Kay et al., 1993). Els sis nucleòtids que formen la part complementària corresponen a la seqüència SacII, i codifiquen els tripèptids (S/P/T/A) A (V/A/D/E/G) (Adey, 1996). La llibreria de 12 residus consistia en  $10^8$  recombinants, cadascun expressant la seqüència  $X_{12}$  a la part N-terminal de pIII.

Els aminoàcids aleatoris d'ambdues llibreries estaven codificats per NNK, on N representa proporcions equimolars d'A, C, T, o G, i K representa G o T. L'esquema NNK utilitza 32 codons per codificar 20 aminoàcids. La freqüència de cada aminoàcid és un cop (C, D, E, F, H, I, K, M, N, Q, W, Y), dos cops (A, G, P, V, T) i tres cops (L, R, S) per codó.

Els fags que s'unien a HveA van ser aïllats fent un escrinig de les llibreries tal i com s'ha descrit anteriorment (Adey, 1996; Kay et al., 1993; Sahu et al., 1996). Breument, les plates d'ELISA (Nunc, Inc. Naperville, Ill.) van ser incubades a 22°C amb 500ng d'HveA (200t) i bloquejades amb PBS-1% d'albúmina de sèrum boví (BSA) durant una hora a 22°C.  $6 \times 10^{11}$  unitats formadores de plaques (pfu) van ser afegides a cada pou i incubades durant una hora a 22°C. Els pous van ser rentats dos cops amb PBS-Tween-20 0.05%. Els fags units a HveA (200t) van ser eluïts amb 100 mM glicina-HCl, pH 2.3 i neutralitzats immediatament amb 200 mM fosfat de sodi, pH 7.4. Posteriorment van ser amplificats en *Escherichia Coli* DH5 F', i tot el procés de biopanning va ser repetit dos cops de la mateixa manera. La barreja de fags amplificats obtinguda durant la tercera ronda d'amplificació va ser platejada, i els fags positius van ser identificats confirmant la seva unió a HveA (200t) en ELISA. En aquest experiment els fags units van ser detectats amb un anticòs anti-M13 marcat amb peroxidasa (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N. J.). El DNA dels fags positius va ser aïllat i seqüenciat pel mètode de Sanger, com s'ha descrit prèviament (Sanger et al., 1977).

#### *Síntesi i purificació de pèptids*

Tots els pèptids van ser sintetitzats en un sintetitzador de pèptids d'Applied Biosystems (model 431 A), fent servir la resina d'amida F-moc. Els grups protectors de les cadenes laterals foren: Cys (Trt), Cys(Acm), Arg(Pmc), Ser(tBu), i Tyr(tBu).

Els pèptids BP-2 cíclic i BP-2 barrejat van ser ciclats a la resina, mitjançant el tractament amb 1.5 equivalents de talli III trifluoroacetat en dimetilformamida, durant 3 h a 22°C. Llavors, la mescla de pèptid-resina va ser rentada amb dimetilformamida, metanol, i metanol-diclorometà (60:40) i secada al buit. Els pèptids van ser tallats de la resina mitjançant el tractament amb 87.5% àcid trifluoroacètic (TFA), 5% fenol, 5% aigua, i 2.5 % triisopropilsilà durant 3h a 22°C, i separats de la mescla de reacció amb filtració i precipitació amb èter fred. Els pèptids precipitats van ser rentats tres cops amb èter fred, i dissolts en una solució d'acetonitril al 50% que contenia 0.1% TFA, i les mostres es van liofilitzar.



L'oxidació de l'enllaç disulfur en el pèptid BP-1 es va realitzar després de tallar-lo de la resina barrejant una solució 0.15 mM de pèptid en 0.1 M de bicarbonat d'amoni (pH 8.0), i borbolejant amb oxigen a 22<sup>0</sup>C durant 48h. El pèptid lineal BP-1 manté els grups protectors de les cadenes laterals dels residus Cís (Acm).

Tots els pèptids van ser dissolts en una solució 10% d'acetonitril amb 0.1% TFA i purificats amb cromatografia líquida de fase reversa en un sistema automatitzat (Prep-LC 4000; Waters, Milford, Mass.), amb una columna C<sub>18</sub> (Vydac, Western Analytical Products, INC. Murrieta Calif.). La columna va ser equilibrada inicialment amb solució A al 5% (0.1% TFA en aigua) durant 15 min. amb un flux de 20 ml/min., i les fraccions de pèptid van ser eluides amb un gradient lineal de solució B (0.1 % TFA en acetonitril), de 5 a 90%, amb el mateix flux. L'elució dels pèptids va ser monitoritzada mitjançant detecció per UV a 230 nm, i el pic més gran, que contenia el pèptid desitjat, va ser recollit i liofilitzat. Per analitzar la puresa dels productes finals, es van utilitzar la cromatografia líquida analítica i espectrometria de masses, fent servir un espectrofotòmetre de masses (Micro-Mass TofSpec; Micromass Inc., Beverly, Mass.) (Moore, 1993; Moore, 1997)

#### *Assaigs d'ELISA*

Per analitzar les interaccions entre HveA, els pèptids aïllats, gD i LT- , es van realitzar diverses ELISAs. En aquests assaigs, HveA(200t), factor H humà, C3 de complement de truita, BSA, llet o ovoalbúmina van ser immobilitzats durant 2 h a 22<sup>0</sup>C en els pous de la plata. La unió no específica als pous va ser bloquejada amb una solució de PBS que contenia 1% BSA, durant 1h a 22<sup>0</sup>C. Per anàlisi de competició, dilucions seriadades de gD-1(306t), gD-1(290-299t), HveA (200t), BSA, pèptid BP-1 o BP-2, o un pèptid cíclic control (ICVVQDWGHRCT), es va afegir a cada pou i incubar durant 30 min. a 22<sup>0</sup>C. Les proteïnes recombinants gD-1(306t)-a 0.4 µg/ml-, gD-1( 290-299t) - 0.1µg/ml-, o LT- -20nM-, o sobrenedant del fag van ser afegides a cada pou i incubades durant 1h a 22<sup>0</sup>C. Els pous es van rentar dos cops amb PBS que contenia Tween-20 al 0.05% i incubats amb (i) una dilució 1:1000 d'un anticòs anti-M13 marcat amb peroxidasa, (ii) una dilució 1:400 d'un anticòs policlonal anti-gD (R7), (iii) AG9, un anticòs monoclonal anti-LT- , a una concentració 1µg/ml, durant 1h a 22<sup>0</sup>C. 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 conill conjugat amb peroxidasa (per a detectar anticòsos policlonals), o anti-immunoglobulina G de ratolí conjugat amb peroxidasa (per a detectar anticòsos monoclonals) (Bio-Rad laboratories, Richmond, Calif.). Les plates es van incubar durant 30 mins. a 22<sup>0</sup>C. 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 405 nm.

#### *Assaigs d'entrada de l'HSV*

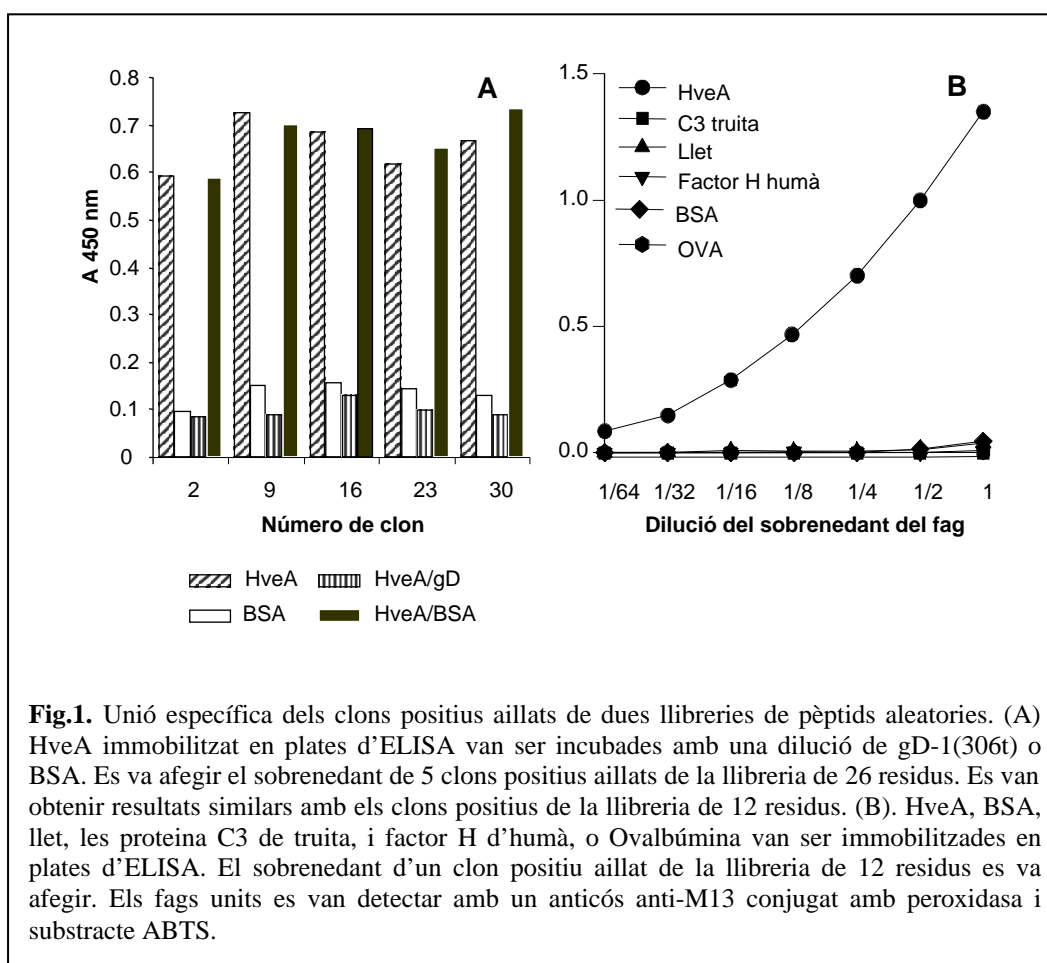
Les cèl·lules CHO-HveA, CHO-HveC, o Vero van ser platejades en plates de 96 pous i incubades tota la nit. Les cèl·lules van ser refredades a 4<sup>0</sup>C durant 10 min. i el medi va ser substituït per Ham's F-12, (cèl·lules CHO-HveA i CHO-HveC), o medi DMEM (Vero), 10% FBS 10 mM HEPES, que contenien diferents concentracions de pèptid. Els pèptids havien estat prèviament filtrats amb un filtre de 0.2 micres (Corning Glass Works, Corning, N. Y.), i la seva concentració mesurada amb l'espectrofotòmetre a 280 nm. Les plates van ser sacsejades suaument a 4<sup>0</sup>C durant 90 mins. En aquest moment es van afegir 5x10<sup>5</sup> pfu/ pou del virus KOS-*hrR3*, que es va incubar durant 90 min més a 4<sup>0</sup>C. Posteriorment es van incubar les plates a 37<sup>0</sup>C durant 5h. Les cèl·lules van ser lisades amb Nonidet P-40 i es va afegir el substrate (o-nitrofenil- -glucopiranòsid) a cada pou. L'activitat -galactosidasa (unitats de densitat miili-òptiques per minut) va ser mesurada a diferents temps amb un llegidor d'ELISA Spectromax 250 a 560nm.

## Resultats

### *Aïllament i caracterització dels fags que s'uneixen a HveA*

Amb l'objectiu d'aïllar fags que s'unissin al domini extracel·lular d'HveA, vam fer un screening de dues llibreries del fag M13 que expressaven pèptids de seqüència aleatòria de 27 i 12 aminoàcids de llargada, respectivament. Els fags que expressaven pèptids que s'uneixen a HveA van ser seleccionats per afinitat incubant-los amb HveA(200t), que estava immobilitzat en un plat d'ELISA .

Després de tres rondes de biopanning, els clons seleccionats van ser aïllats i es va comprovar la seva unió a HveA en ELISA. 70 de 96 clons s'unien a HveA. Aquesta unió semblava ser específica, perquè els clons no es van unir a les proteïnes C3 de complement de truita, BSA, ovoalbúmina, o factor H humà (Figura 1A). A més a més, gD-1(306t) en solució era capaç de competir amb la unió del fag a HveA immobilitzat al plat d'ELISA (Figura 1B).

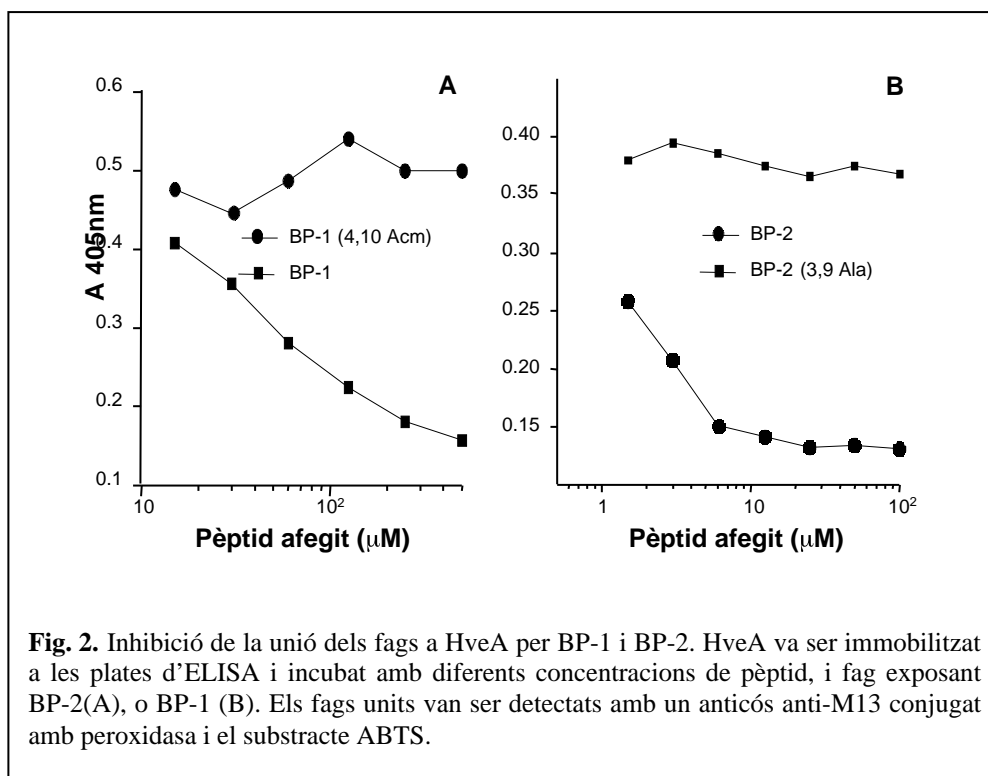


El DNA d'alguns clons positius va ser aïllat i seqüenciat. Per a cada llibreria de les dues que vam utilitzar, tots els clons compartien la mateixa seqüència. Això ens indica que els dos únics clons aïllats eren específics i van ser amplificats durant la segona i tercera ronda de biopanning. La seqüència d'aminoàcids que deduïm per a cadascun dels clons és: S I S C S R G L V C L L P R L T N E S G N D R F D S (BP-1), per la llibreria de 27 residus, i S C D G F R V C Y M H (BP-2) per la llibreria de 12 residus (Taula 1). La seqüència d'aminoàcids dels clons positius de la llibreria de 27 residus no segueix el disseny original de la llibreria,  $X_{12}(S/P/T/A)A(V/A/D/E/G)X_{12}$ . La seqüència central del pèptid en aquesta regió era PR enloc de (S/P/T/A)A(V/A/D/E/G). Així doncs, el pèptid BP-1 conté 26 aminoàcids i no 27.

<b>Taula 1</b> Seqüència d'aminoàcids dels pèptids que s'uneixen a HveA i les seves variants	
<i>Pèptid</i>	<i>Seqüència d'aminoàcids</i>
BP-1	S I S C S R G L V C L L P R L T N E S G N D R F D S
BP-1 (4,10 Acm)	S I S C S R G L V C L L P R L T N E S G N D R F D S (Acm)                      (Acm)
BP-2	G S C D G F R V C Y M H
BP-2 (3,9 Ala)	G S A D G F R V A Y M H
Scrambled BP-2	Y M C R F V D G C H G S

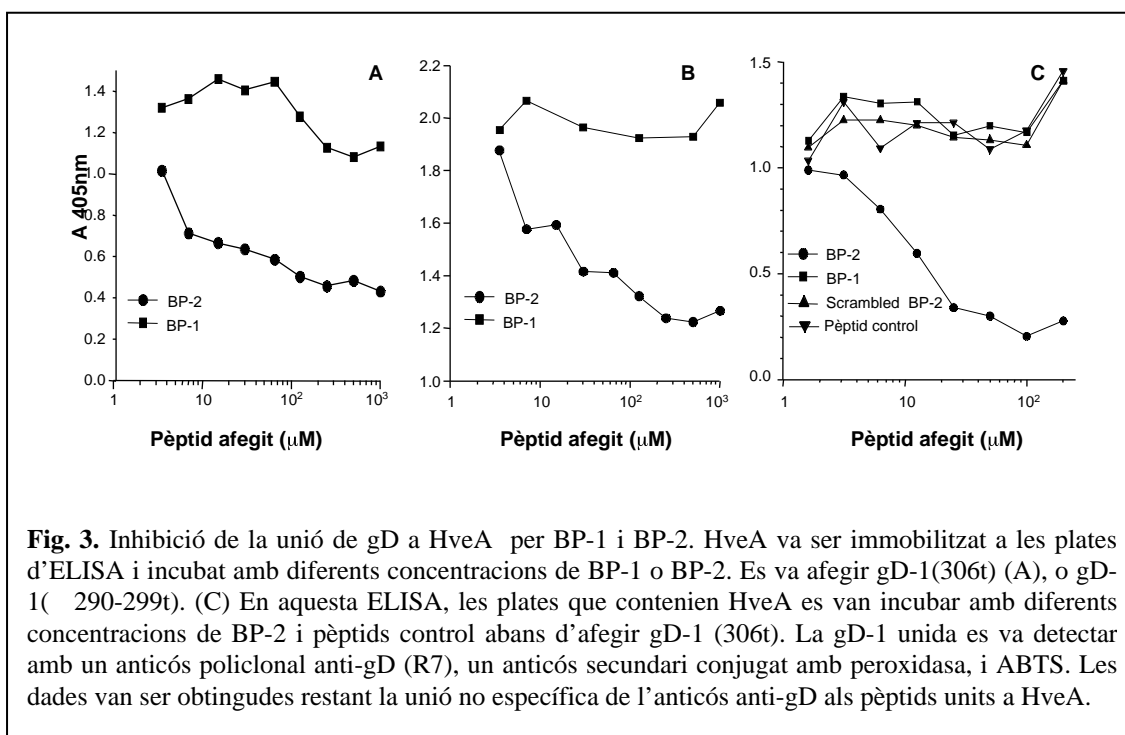
Vam buscar seqüències similars a BP-1 i BP-2 a les bases de dades GenBank (DNA) i SwissProt (proteïnes), fent servir BlastP, BlastN i BlastX, i no en vam trobar cap de significativa.

Per estudiar més a fons les característiques d'unió dels clons aïllats, vam sintetitzar dos pèptids, que corresponien a la seqüència d'amino àcids deduïda dels pèptids expressats pels fags. Cal remarcar que malgrat que els dos clons aïllats són completament diferents en seqüència, la unió dels fags que expressaven BP-1 va ser inhibida en ELISA per el pèptid BP-2, i a la inversa (Figura 2).



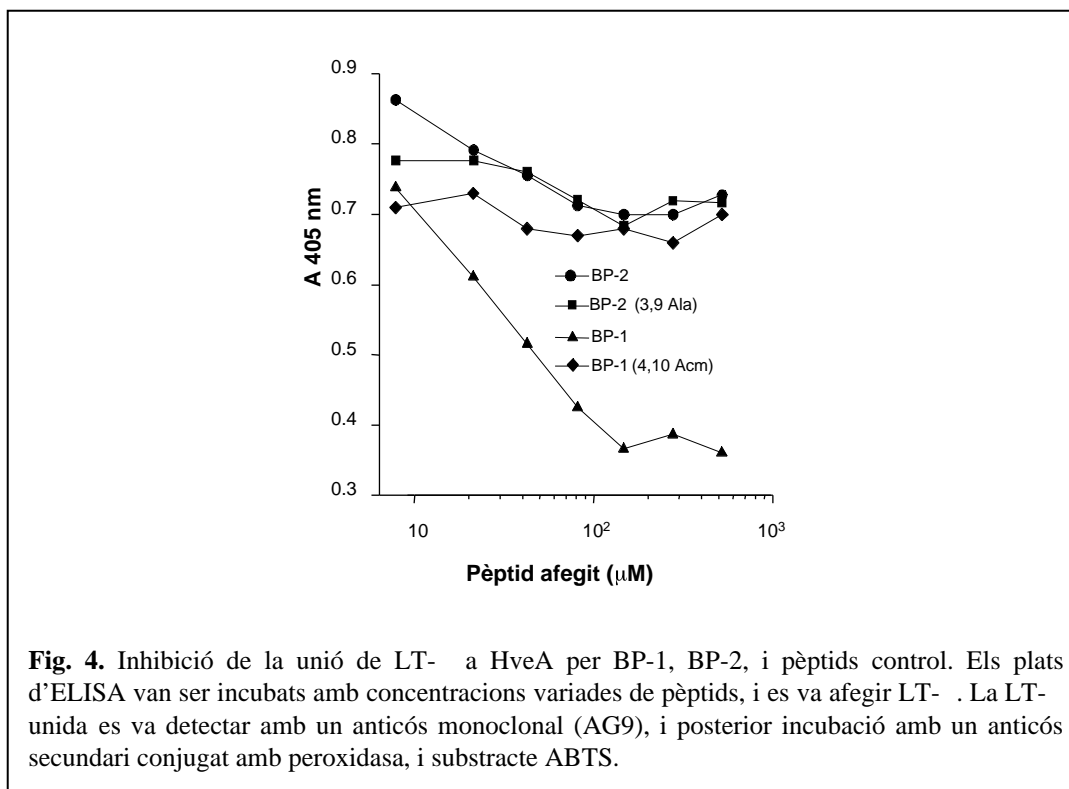
### *Inhibició de la unió de gD a HveA*

A continuació, es va examinar la capacitat dels dos pèptids sintètics BP-1 i BP-2 per competir la unió de gD-1 al receptor HveA (Figura 3). La unió de la forma salvatge de gD-1 (306t) a HveA immobilitzats al plat es va reduir fins a un 80% en presència de BP-2 i fins a un 20% en presència de BP-1, a una concentració de pèptid de 0.5 mM (Figura 3A). La unió de la forma mutant de gD-1, gD-1( 290-299t), que té una afinitat 100 vegades més gran per HveA, va ser inhibida fins a un 40% per BP-2 (Figura 3B). Com a contrapartida, no es va observar cap efecte inhibitori amb els pèptids BP-1 (4,10 Acm), que té les cisteïnes bloquejades, BP-2 (3,9 Ala) que té l'aminoàcid Ala substituint Cis, un pèptid amb la seqüència de BP-2 barrejada, o un pèptid cíclic amb una seqüència totalment diferent (Figura 3C). Com que aquests resultats negatius inclouen els pèptids BP-1 (4,10 Acm) i BP-2 (3,9 Ala), en els quals no existeix cap enllaç disulfur, sembla ser que la formació d'enllaç disulfur és important per a mantenir l'activitat inhibidora ambdós BP-1 i BP-2.



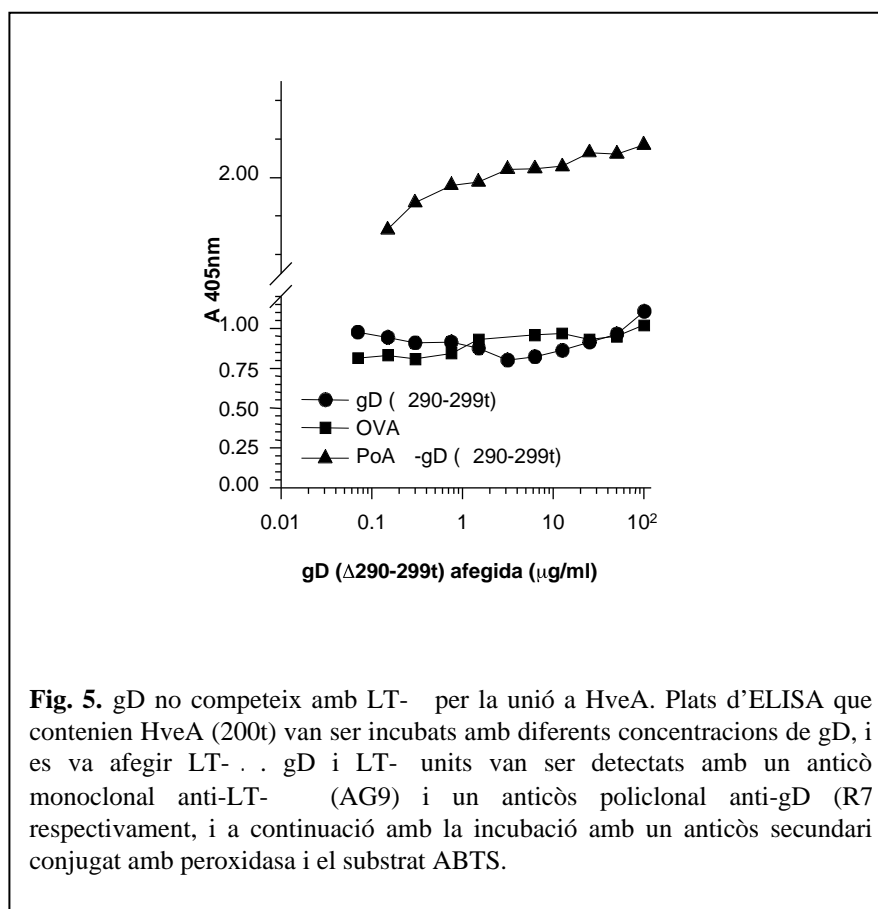
#### *Inhibició de la unió de LT- $\alpha$ a HveA*

L'efecte dels pèptids sintètics BP-1 i BP-2 sobre la unió de LT- $\alpha$  a HveA es va analitzar amb ELISA. HveA es va immobilitzar en els pous d'una placa d'ELISA i incubat amb diferents concentracions de pèptid i LT- $\alpha$  (20nM), i la quantitat de LT- $\alpha$  unida al receptor va ser detectada amb un anticòs monoclonal. Com es pot observar a la figura 4, la unió de LT- $\alpha$  a HveA va ser inhibida per BP-1, mentre que ni BP-2 ni els pèptids control van demostrar cap efecte inhibidor. Aquest assaig indica un altre cop que el pèptid BP-1 necessita ser cíclic per unir-se a HveA. Per altra banda, BP-2 no va inhibir la unió de LT- $\alpha$  al receptor, suggerint que BP-1 i BP-2 s'uneixen a diferents llocs al receptor.



#### *gD no inhibeix la unió de LT- $\alpha$ a HveA*

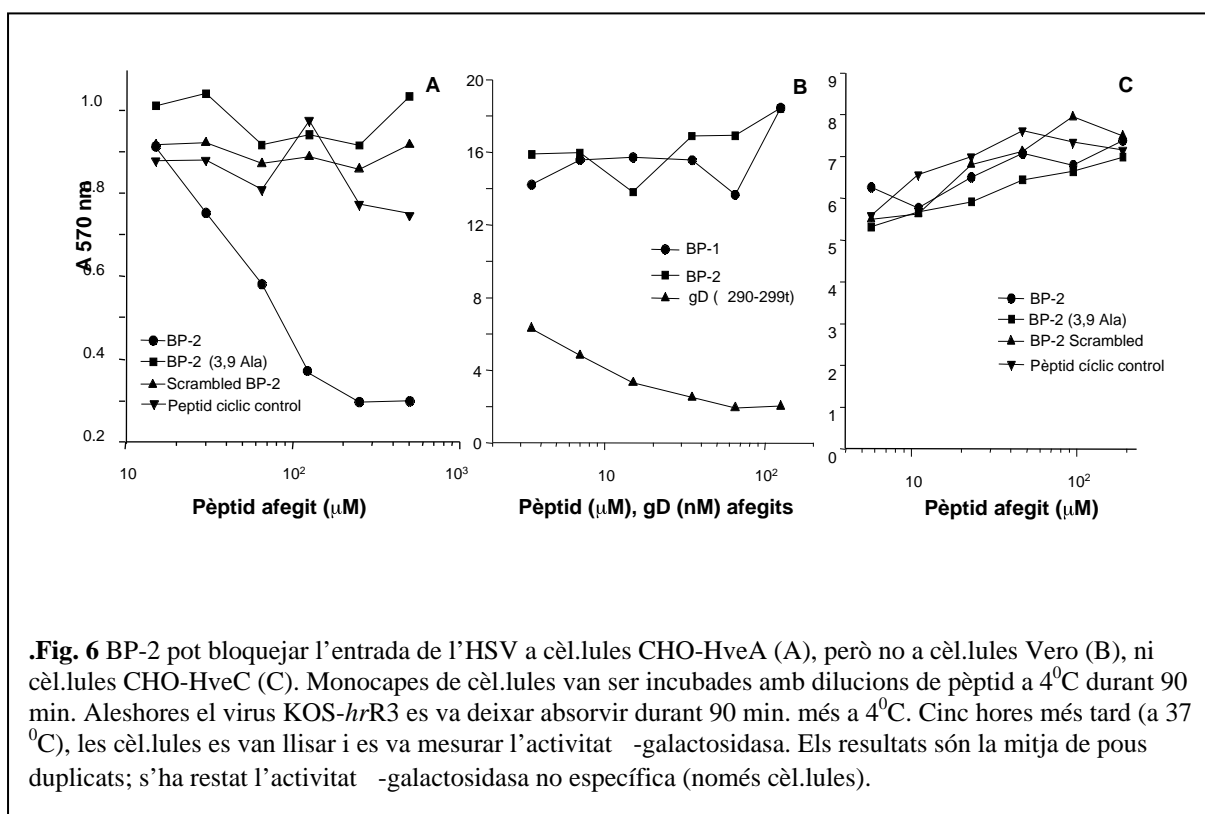
Com que vam descobrir que semblava que els pèptids s'unissin a dos llocs diferents a HveA, vam investigar si gD i LT- $\alpha$  competien per la unió a HveA (Figura 5). Es va dissenyar una ELISA per comparar les unions de gD i LT- $\alpha$  a HveA. En aquest assaig, HveA es va immobilitzar al plat i va ser incubat amb una quantitat constant de LT- $\alpha$ , junt amb diferents quantitats de gD. La quantitat de LT- $\alpha$  unida a HveA va ser detectada amb un anticòs monoclonal contra LT- $\alpha$  (AG9). Per confirmar que gD seguia unit a HveA després de totes les rentades, gD unit a HveA va ser detectat amb R7, un anticòs policlonal, en pous separats a la mateixa plata d'ELISA. Vam observar la quantitat de LT- $\alpha$  unida a HveA es mantenia constant, fos quina fos la quantitat de gD afegida. Per tant, gD no va tenir cap efecte inhibitori sobre la unió de LT- $\alpha$  al receptor, la qual cosa suggereix que aquestes proteïnes no competeixen pel mateix lloc d'unió a HveA.



#### *Inhibició de l'entrada de l'HSV-1 a diferents tipus cel·lulars*

L'observació que BP-2 inhibia la unió de gD-1 a HveA plantejava la pregunta de si aquest pèptid tenia algun efecte en l'entrada del virus a cèl·lules de mamífer. Per provar aquesta possibilitat, vam examinar l'efecte d'aquest pèptid en l'entrada de l'HSV-1 a cèl·lules CHO-HveA, CHO-HveC, i Vero. Monocapes de cèl·lules van ser incubades amb pèptid a 4<sup>0</sup>C durant 90 min. i després infectades amb el virus KOS-*hrR3*. BP-2 va bloquejar l'entrada de l'HSV a cèl·lules CHO-HveA; en canvi, ni BP-1 (dades no mostrades) ni cap pèptid control va bloquejar l'entrada del virus (Figura 6A). Cap dels pèptids va tenir efecte en l'entrada del virus a cèl·lules Vero (Figura 6B), i CHO-HveC (Figura 6C). Així doncs, tot que ambdós BP-1 i BP-2 s'uneixen a HveA, tant sols BP-2 és capaç d'inhibir la unió gD-HveA d'una manera prou efectiva com per bloquejar l'entrada del virus a les cèl·lules CHO-HveA. Aquest resultat és consistent amb les dades de la figura 3, que demostraven que només BP-2 va bloquejar amb eficiència la unió de gD al receptor.





## Discussió

Recentment s'han aïllat diversos receptors que faciliten l'entrada del virus de l'herpes a les cèl·lules. El primer en ser caracteritzat fou HveA, una proteïna membre de la família de receptors de TNF, la qual facilita l'entrada de la majoria de soques de HSV a les cèl·lules altrament no permissives CHO (Montgomery et al., 1996). Es va demostrar que aquest procés és mediat per la unió directa de la glicoproteïna viral gD a HveA (Nicola et al., 1998; Whitbeck et al., 1997). A més a més d'unir-se a gD, aquest receptor interactua amb diverses proteïnes de l'hoste, com LT- $\alpha$ , LIGHT, i les proteïnes de la família TRAF (Hsu et al., 1997; Marsters et al., 1997; Mauri et al., 1998).

En aquest estudi hem fet servir dues llibreries combinatòries de pèptids exposades al fag M13 per identificar pèptids que s'unissin a HveA i que afectessin la interacció del receptor amb els seus lligands. Hem disseccionat la interacció entre les proteïnes gD, LT- $\alpha$  i HveA en el context de l'entrada viral.

Després de tres rondes de biopanning, s'han aïllat diversos clons de cada llibreria que s'uneixen específicament a HveA (200t). Aquests clons no s'unien a altres proteïnes, com C3 de complement de truita, factor H humà, ovalbúmina, i llet. Aquesta especificitat es va corroborar amb el fet que la gD-1 (306t) en solució inhibia la unió dels fags a HveA. Sorprenentment, tots els clons positius de cada llibreria contenien la mateixa seqüència. Aquest resultat suggereix que els clons positius van ser amplificats durant la segona i tercera ronda del biopanning. Cal remarcar que tot i que els dos pèptids identificats difereixen en la seva estructura primària, ambdós contenen dos residus Cis. Els experiments en els quals les Cis van ser substituïdes per Ala, o les seves cadenes laterals van ser bloquejades, demostren que l'enllaç disulfur intramolecular és necessari per a que els pèptids s'uneixin a HveA. Es va observar que ambdós BP-1 i BP-2 perdien la capacitat d'inhibir la unió de LT- $\alpha$  i gD a HveA, respectivament, quan els seus residus Cis no estaven units per enllaç disulfur. Aquests resultats suggereixen que l'enllaç disulfur és essencial per a mantenir l'activitat inhibidora i d'unió a HveA en els dos pèptids. La unió dels clons del fag a HveA suggereix que l'enllaç disulfur en els pèptids és també present quan aquests estan expressats a la superfície dels fags;

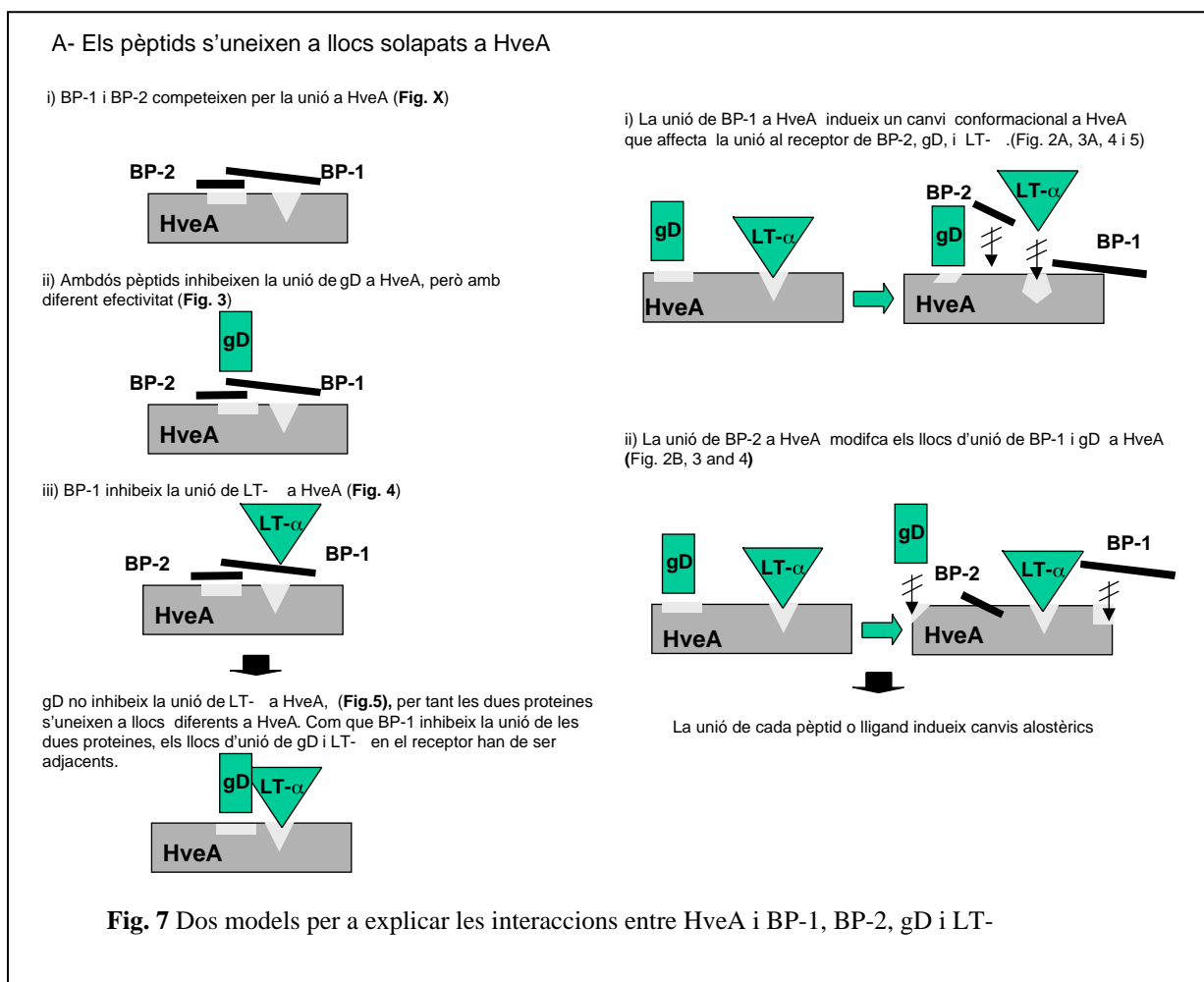
l'ambient oxidant del periplasma bacterià permet la formació d'enllaços disulfur entre residus Cis en els pèptids exposats per els fags (Kremser and Rasched, 1994).

L'efecte marginal observat en la inhibició de la unió de gD en fase fluida a HveA per BP-1 es contrasta amb l'efecte observat per BP-2, el qual va inhibir la unió de la forma gD-1(306t) i fins i tot la unió de la gD-1 ( 290-299t), la qual té una afinitat 100 cops més alta per a HveA. A més a més, BP-2 va bloquejar l'entrada del virus a les cèl·lules CHO-HveA, la qual cosa no fou possible amb gD(306t) en estudis anteriors. És possible que BP-2 tingui una afinitat d'unió més alta per a HveA que la forma salvatge gD(306t), i per tant, es necessiten grans quantitats de gD (306t) per a aconseguir la inhibició. BP-2 és incapaç d'inhibir l'entrada a les cèl·lules CHO-HveC, suggerint que aquest pèptid és específic per a HveA. Com que BP-2 tampoc inhibeix l'entrada a les cèl·lules Vero, sembla ser que altres mediadors de l'entrada de l'HSV a més a més de HveA podrien estar expressats en aquestes cèl·lules. D'altra banda, podria ser que el lloc en HveA al qual el pèptid s'uneix no estigués conservat a l'homòleg de HveA a les cèl·lules Vero.

El fet que els dos pèptids inhibeixin diferencialment la unió de LT- i gD a HveA suggereix que BP-1 i BP-2 s'uneixen a diferents llocs a HveA. Com que la unió de BP-1 a HveA és inhibida per BP-2 i a l'inrevés, suggerim que o bé els pèptids s'uneixen a llocs sobreposats en el receptor, o la unió d'un dels pèptids a HveA indueix canvis conformacionals al receptor, la qual cosa influencia la unió de l'altre pèptid (Slepenkov and Witt, 1998) (Figura 7). En el primer model, BP-1 i BP-2 podrien compartir llocs d'unió en HveA i per tant competir per la unió a aquests llocs. Així, encara que només BP-1 va poder inhibir la unió de LT- , el lloc en HveA al qual gD s'uneix podria incloure elements estructurals que participen a la unió dels dos pèptids. D'aquesta manera, ambdós pèptids podrien afectar la interacció entre gD i HveA. Malgrat tot, BP-1 només inhibeix parcialment la unió de gD a HveA, així doncs sembla que el lloc d'unió de gD a HveA és més proper al lloc d'unió de BP-2 que al de BP-1. L'important efecte inhibidor de BP-2 sobre la unió de gD a HveA, que es traduí en la inhibició de l'entrada de l'HSV-1 a les cèl·lules CHO-HveA suggereix que BP-2 podria tenir una afinitat molt alta per al receptor. A més a més, és possible que BP-2 competeixi amb gD per més d'un lloc d'unió a HveA. Aquesta possibilitat és consistent amb els estudis

recents en gD, en els quals anticossos monoclonals que reconeixien dues regions diferents en gD, Ib (amino àcids 222 a 252) i VII (amino àcids 11 a 19), podien bloquejar la unió de l'HSV a HveA (Nicola et al., 1998). Si els pèptids s'unissin en llocs solapats en HveA, aleshores gD i LT- s'unirien en llocs adjacents al receptor.

Una segona interpretació de les nostres dades és que la unió dels pèptids al receptor causa canvis conformacionals en HveA. Així, la unió de BP-1 a HveA podria causar un canvi conformacional en HveA que interferiria amb la unió de BP-2, LT- i gD. D'altra banda, la unió de BP-2 a HveA podria alterar els llocs d'unió de BP-1 i gD al receptor.



**Fig. 7** Dos models per a explicar les interaccions entre HveA i BP-1, BP-2, gD i LT-

HveA no és l'únic mediador de l'entrada de l'HSV a les cèl·lules. Altres receptors de la superfície cel·lular han estat aïllats recentment i són objecte d'estudi (Geraghty et al., 1998; Warner et al., 1998); el paper i importància de cadascun d'aquests nous

---

receptors en l'entrada de l'HSV s'ha de determinar. L'entrada viral és un procés clau en la infecció. Nosaltres hem aconseguit aïllar un pèptid que bloqueja la interacció entre HveA i HSV *in vitro*. A més a més, hem identificat un lloc en HveA, on BP-2 s'uneix, que quan està ocupat prevé l'entrada del virus però no la unió del lligand cel·lular LT- . Així doncs, la recerca de llibreries de compostos químics que desplacin BP-2 però no BP-1 podria resultar en el desenvolupament d'un medicament útil per a prevenir la infecció per HSV. Concloem que tot i que es necessiten més estudis per a poder determinar la utilitat terapèutica de BP-2, creiem que ambdós BP-1 i BP-2 constitueixen eines prometedores per analitzar els mecanismes d'entrada viral a les cèl·lules i les interaccions i funcions HveA-lligand de l'hoste.



### 3.3 Treball 2:

#### “Unió diferencial de LIGHT i limfotoxina $\alpha$ a HveA”

(Sarrias et al., 2000)

##### Resum

L'Herpes Virus Entry Mediator A (HveA), un receptor de la família de factors de necrosi tumoral (TNF), interactua amb tres lligands diferents; les proteïnes TNF limfotoxina i LIGHT de l'hoste i la glicoproteïna gD del virus de l'herpes simplex (HSV). El lloc d'unió en HveA per gD ha estat localitzat en els dos dominis CRP N-terminals del receptor. A més a més, gD i LIGHT competeixen per la seva unió a HveA. Malgrat tot, es desconeix si aquests lligands interactuen amb el mateix o diferents llocs d'unió en el receptor.

Hem analitzat i comparat els llocs d'interacció entre HveA i els seus lligands TNF, fent servir dues formes recombinants del receptor, que consisteixen en l'ectodomini de HveA (HveA (200t)) i els seus dos primers dominis CRP (HveA (120t)). A més a més, hem utilitzat anticossos monoclonals que reconeixen HveA. Dos pèptids (BP-1 i BP-2) que inhibeixen de manera diferencial la unió de gD i LT- al receptor ens han ajudat a demostrar que gD, LIGHT i LT- s'uneixen en diferents llocs al receptor. Els nostres resultats suggereixen que la unió d'un lligand a HveA podria canviar-ne la conformació, afectant d'aquesta manera la seva interacció amb els seus altres lligands.

## Materials i mètodes

### *Productes químics i solucions*

Tots els productes químics i solucions fets servir per a la síntesi de pèptids van ser comprats a Applied Biosystems (Foster City, Calif.), excepte els amino àcids F-moc (9-fluorenylmethoxycarbonyl), que procedien de Nova Biochem. (San Diego, Calif.). PBS és 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 150 mM NaCl, pH 7.4.

### *Proteïnes recombinants*

La producció i purificació de HveA (200t), HveA (120t), gD-1 (290-299t), i LT- $\alpha$  a partir de cèl·lules infectades amb baculovirus recombinant ha estat descrita abans (Crowe et al., 1994; Nicola et al., 1998; Nicola et al., 1996; Sisk et al., 1994; Tessier et al., 1991; Whitbeck et al., 1997; Williams-Abbott et al., 1997). La proteïna LIGHT, en fusió amb l'epítot M2 es va produir en cèl·lules HEK293 i va ser purificada dels sobrenedants del cultiu, com s'ha descrit anteriorment.

### *Anticossos*

La producció d'anticossos monoclonals que reconeixen HveA (200t) ha estat descrita abans. Breument, els ratolins van ser immunitzat subcutaniament amb HveA (200t) expressat en baculovirus. L'anticòs policlonal contra gD, R7, es va produir contra la proteïna gD-2 aïllada de cèl·lules infectades amb el virus, com s'ha descrit anteriorment (Isola et al., 1989). La producció de l'anticòs monoclonal contra la LT- $\alpha$  (AG9) ha estat descrita abans (Browning et al., 1995).

### *Síntesi i purificació d'anticossos*

La síntesi i purificació dels pèptids BP-1, BP-1 (4,10 Acm), BP-2, i BP-2 (3,9 Ala) ha estat descrita en el treball 1 d'aquesta tesi. Les seqüències primàries dels pèptids BP-1 i BP-2 són: SISCSRGLVCLLPRLTNESGNDRFDS i GSCDGFRCYMH, respectivament.

### *Assaigs d'ELISA*

Per estudiar les interaccions entre HveA (120t), HveA (200t), gD, LIGHT, LT- $\alpha$ , BP-1 i BP-2 es van realitzar diferents assaigs d'ELISA. En aquests assaigs 40 ng de



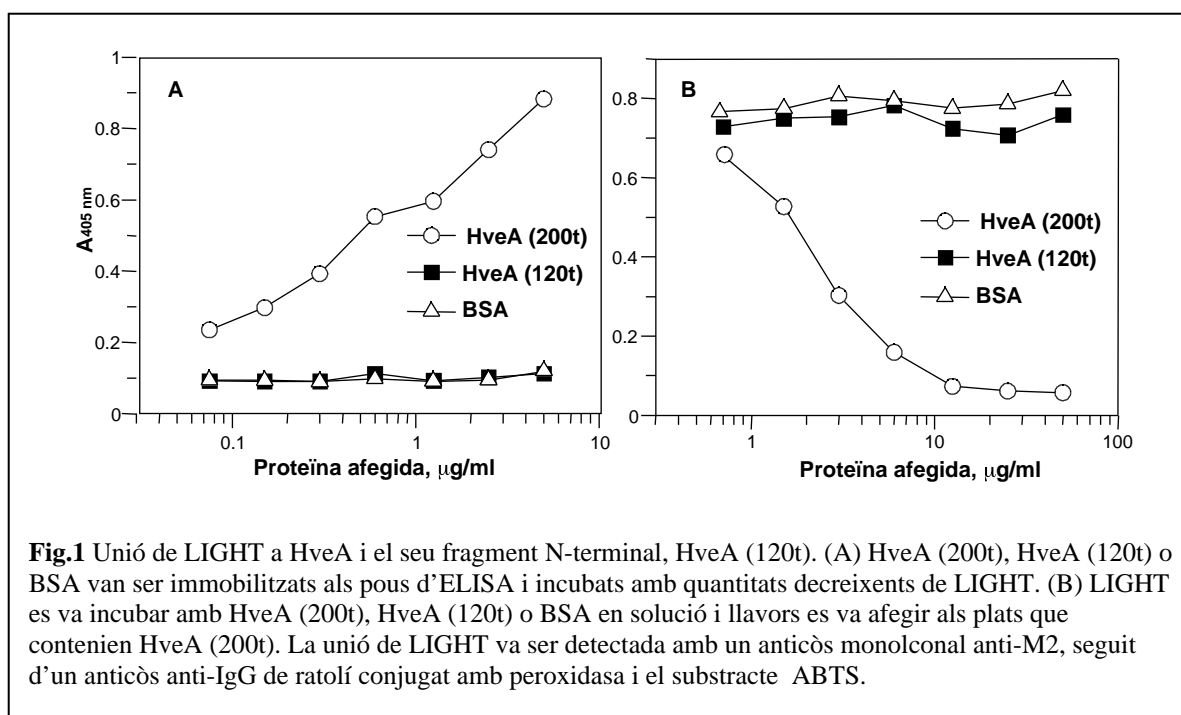
HveA (120t), HveA (200t) o BSA van ser immobilitzats als plats d'ELISA durant 2h a 22°C. La unió no específica als pous va ser bloquejada amb una solució de PBS que contenia 1% BSA, durant 1h a 22°C. Els assaigs d'ELISA es van produir de diferents maneres: 1) En assaigs de competició amb els pèptids BP-1 i BP-2 o els anticossos monoclonals anti-HveA (CW1, CW2, CW3, CW4, CW7 i CW8), dilucions seriades d'aquestes molècules es van afegir als pous i van ser incubades durant 30 min. a 22°C. Llavors, les proteïnes recombinants (LIGHT 1.5 nM o 12.5 nM LT- ) o sobredants del fag van ser afegides i incubades durant 1h a 22°C. 2) En assaigs de competició, on HveA(200t), HveA(120t) i LT- van ser provades en solució, dilucions seriades d'aquestes proteïnes van ser preincubades amb 12.5 nM LT- o 1.5 nM LIGHT durant 30 min a 22°C i posteriorment afegides als pous d'ELISA que contenien HveA immobilitzat. 3) Per l'assaig de dependència de sal, LT- (25nM), o LIGHT (3nM) van ser diluïdes en 10 mM solució de fosfat, pH 7.4, que contenia diferents quantitats de NaCl, i subseqüentment incubades amb HveA immobilitzat als pous durant 1h a 22°C. La solució de rentat en aquest assaig era 10 mM solució de fosfat, amb 50mM NaCl, i Tween-20 0.05%, pH 7.4.

Seguidament, els plats van ser rentats dos cops amb PBS que contenia 0.05% Tween-20 i incubades amb i) l'anticòs monoclonal AG9 (1µg/ml), ii) un anticòs monoclonal anti-M2 (2µg/ml; Stratagene), o anticòs anti-M2 biotinilitzat (2µg/ml; Sigma), durant 1h a 22°C. Les plates van ser rentades dos cops i incubades durant 30 min a 22°C amb una dilució 1:1000 dels anticossos següents conjugats amb peroxidasa i) anti-M13 (Pharmacia) per detectar els fags, ii) anti-immunoglobulina G de ratolí (Bio-Rad), per detectar anticossos monoclonals, iii) anti-immunoglobulina G de conill per detectar anticossos policlonals (Bio-Rad), iv) estraptavidina (Boehringer Mannheim) per detectar anticòs biotinilitzat. Després de dos rentats amb PBS-0.05% Tween-20, 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 405 nm.

## Resultats

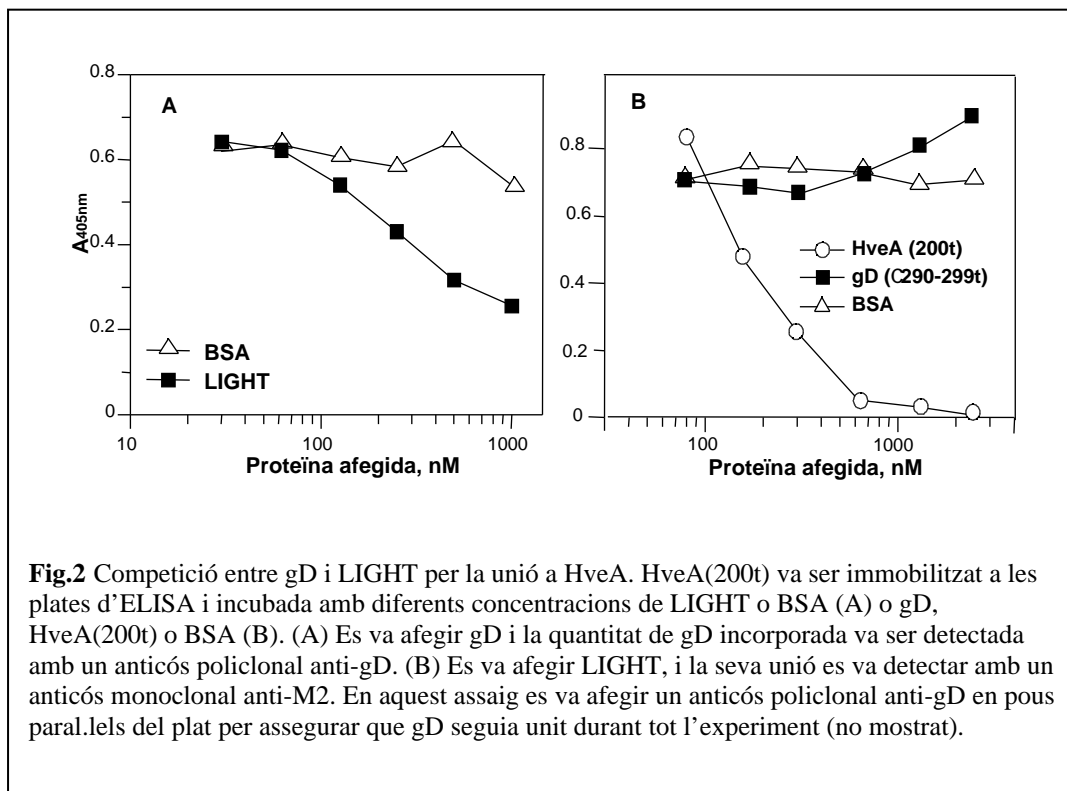
### *Unió de LIGHT a HveA (200t) i el seu fragment N-terminal HveA (120t)*

HveA(120t), una forma truncada de HveA(200t), consisteix en els dominis CRP-1 i CRP-2 i s'uneix a la proteïna viral gD amb la mateixa afinitat que HveA(200t) (Whitbeck, 2000). Per determinar si LIGHT també s'uneix a aquests dominis de HveA, vam realitzar dues ELISAs (Fig.1). En el primer assaig, HveA (120t), HveA(200t) i una proteïna control, BSA, van ser immobilitzades als pous de les plates d'ELISA i incubades amb diferents dilucions de LIGHT; la unió de LIGHT va ser aleshores detectada amb un anticòs monoclonal. En aquest assaig (Fig. 1A), LIGHT només es va unir a HveA (200t). Es va fer servir un altre assaig per comprovar que aquest resultat no era un artefacte relacionat amb la immobilització de les proteïnes al plat. En aquest assaig de competició (Fig.1B), LIGHT va ser preincubada amb dilucions seriades de HveA (120t), HveA (200t) o BSA i posteriorment incubada amb HveA (200t) immobilitzada al plat. D'acord amb l'assaig d'unió directa, HveA (120t) no va tenir cap efecte inhibitori en la unió de LIGHT a HveA (200t). Aquests resultats suggereixen que elements estructurals d'altres parts de HveA (aminoàcids 120 a 200) són necessaris per la seva interacció amb LIGHT.



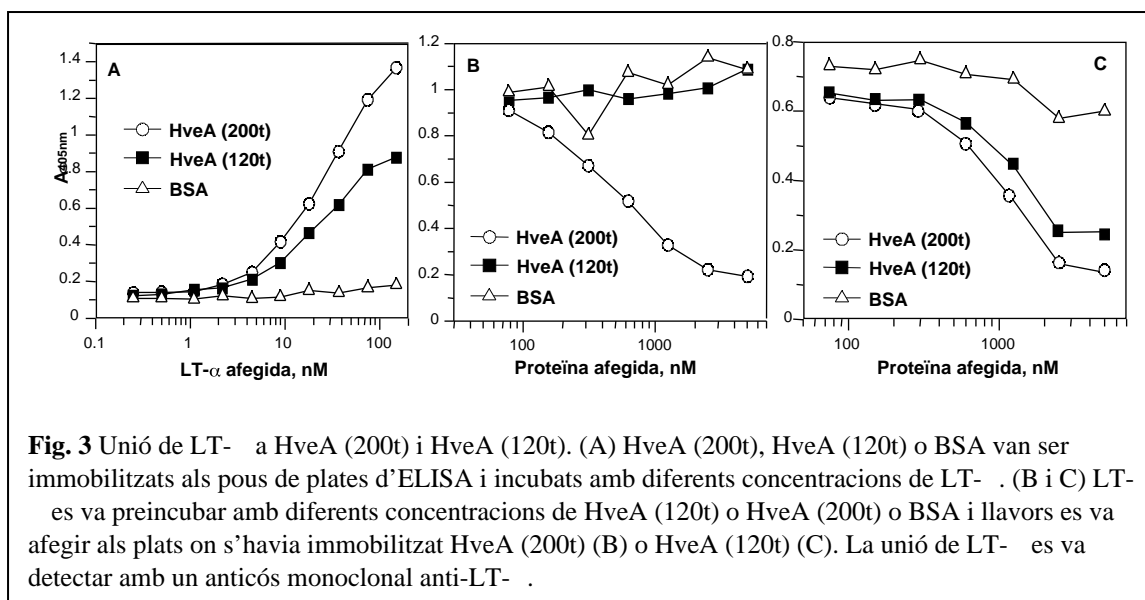
S'ha demostrat que gD s'uneix a HveA (120t) (Whitbeck, 2000) i alhora competeix amb LIGHT per la unió al receptor HveA a la superfície cel·lular (Mauri et al., 1998). Malgrat tot, els resultats obtinguts en l'experiment anterior (Fig.1) indicaven que LIGHT no s'uneix a HveA (120t). Aquest descobriment plantejava la qüestió de si gD i LIGHT competirien per la unió a HveA en un assaig d'ELISA. Per resoldre aquesta qüestió vam fer un assaig de competició en el qual HveA (200t) es va immobilitzar al plat d'ELISA, i llavors incubar amb diferents concentracions de LIGHT. Es va afegir gD, i la seva unió es va detectar amb un anticòs policlonal.

En efecte, vam observar una inhibició de la unió de gD a HveA (200t) en presència de LIGHT (Fig. 3A). Però, sorprenentment, quan vam provar si gD afectaria la interacció de LIGHT amb HveA immobilitzat al plat d'ELISA, no vam observar cap efecte inhibitori (Fig. 3B). Aquests resultats podrien ser indicadors de les diferents afinitats d'unió de LIGHT i gD per HveA, que són 3.9 nM (Rooney et al., 2000), i 3.2  $\mu$ M (Willis et al., 1998), respectivament.



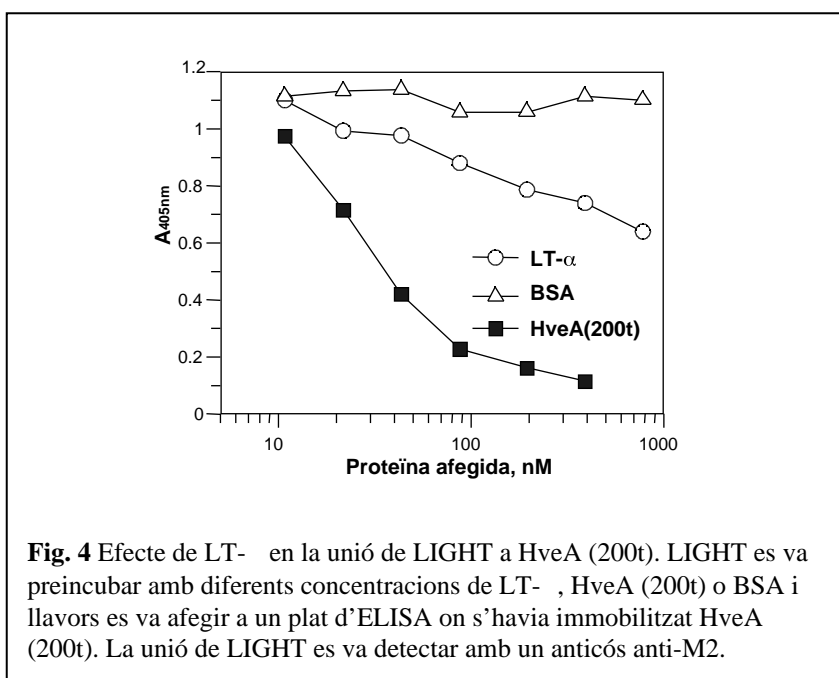
Unió de LT- $\alpha$  a HveA (200t) i HveA (120t)

Per comprovar si LT- $\alpha$  s'unia a HveA (120t), es van fer diferents assaigs d'ELISA (Fig.3). Primer vam investigar si LT- $\alpha$  s'uneix a HveA (120t) en un assaig d'unió directa, immobilitzant HveA (200t), HveA (120t) o BSA i després afegint diferents concentracions de LT- $\alpha$ . En aquest assaig (Fig. 3A), LT- $\alpha$  es va unir a ambdues formes del receptor. Aleshores vam analitzar aquesta interacció en solució: LT- $\alpha$  va ser preincubada amb diferents concentracions d'HveA (200t), HveA (120t) o BSA i afegida a plats d'ELISA que contenien HveA (200t) (Fig. 3A) o HveA (120t) (Fig. 3C). La quantitat de LT- $\alpha$  unida va ser detectada amb un anticòs monoclonal. La Fig. 3B mostra com HveA (120t) va ser incapaç de competir amb LT- $\alpha$  per la unió a HveA (200t). Tot i així, HveA (200t) i HveA (120t) inhibeixen la unió de LT- $\alpha$  a HveA (120t) d'una manera relativament similar. En resum, aquests resultats suggereixen que LT- $\alpha$  es pot unir als primers dos dominis de HveA (CRP-1 i CRP-2), però amb una afinitat menor que la HveA intacta. Així doncs, sembla que elements estructurals diferents dels que es troben a HveA (120t) també participen, directament o indirectament en la interacció del receptor amb LT- $\alpha$ .



*LT- $\alpha$  competeix amb LIGHT per la unió a HveA (200t)*

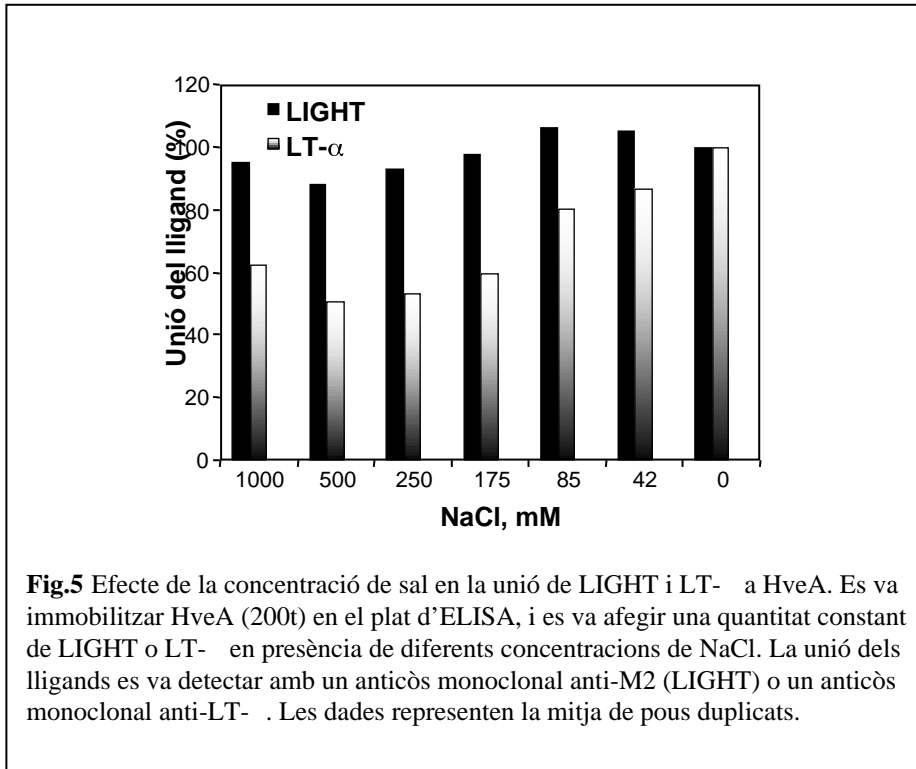
Com que LT- $\alpha$  i LIGHT són proteïnes homologues (Mauri et al., 1998), ens vam plantejar si interaccionen amb HveA d'una manera similar i per tant competeixen per la seva unió a HveA. Vam realitzar una ELISA en la qual es va immobilitzar HveA(200t) en els pous de la plata, la qual va ser incubada amb diferents concentracions de LT- $\alpha$ , HveA (200t) o BSA. Llavors es va afegir LIGHT, i la seva unió es va detectar amb un anticòs monoclonal anti-M2. En aquest assaig la LT- $\alpha$  va ser capaç d'inhibir la unió de LIGHT al receptor (Fig. 4), indicant que aquestes Proteïnes competeixen per la interacció amb HveA. Malgrat tot, l'efecte inhibidor de LT- $\alpha$  sobre la unió de LIGHT a HveA és aparentment parcial, si es compara amb l'efecte observat amb HveA (200t) en solució.



*Efecte de la concentració de sal en la unió de la LT- $\alpha$  i LIGHT a HveA*

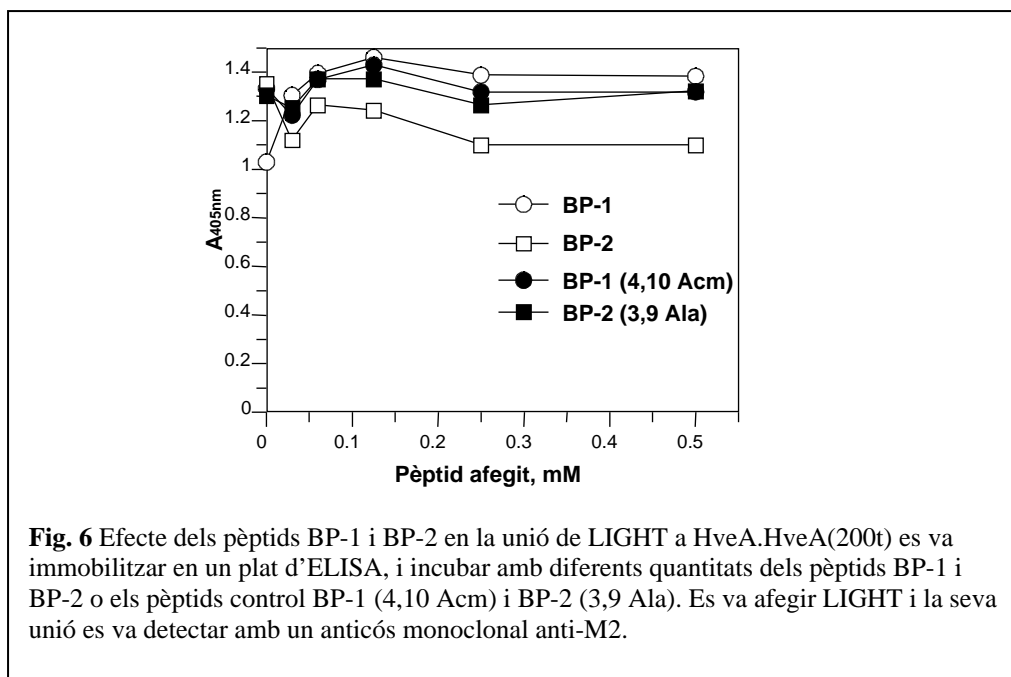
Seguidament vam examinar si la presència de quantitats en augment de sal afectarien la unió de HveA als seus lligands. La incubació de LT- $\alpha$  i LIGHT amb HveA (200t) immobilitzat al plat es va fer en una solució amb NaCl (de 0 a 1000 mM). La unió de LT- $\alpha$  i LIGHT va ser detectada amb els anticossos monoclonals anti-LT- $\alpha$  (AG9) i anti-M2, respectivament. Mentre que quantitats en augment de sal van afectar dramàticament la unió de LT- $\alpha$  a HveA, la unió de LIGHT al receptor fou relativament

insensible a la concentració de sal. Aquestes dades confirmen la conclusió que la interacció de HveA amb LIGHT és diferent que la del receptor amb LT- $\alpha$ .



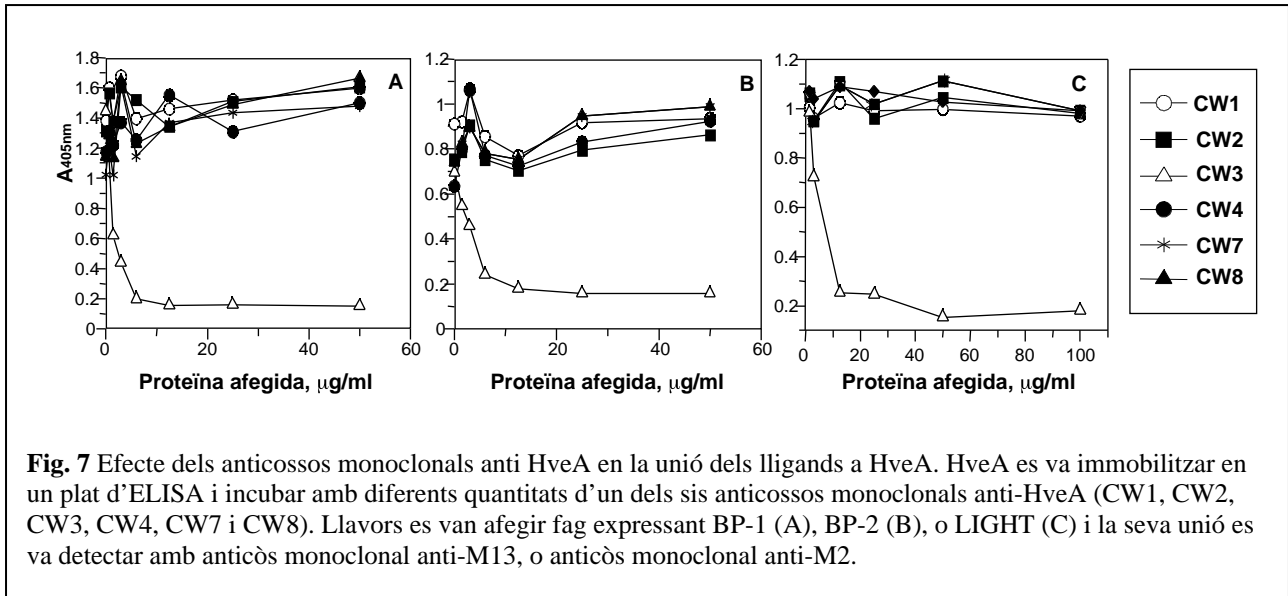
#### *Els pèptids BP-1 i BP-2 no inhibeixen la unió de LIGHT a HveA*

Vam demostrar anteriorment que els pèptids sintètics BP-1 i BP-2 s'uneixen a HveA, i inhibeixen selectivament la unió de LT- $\alpha$  i gD al receptor (Sarrias et al., 1999). Vam realitzar una ELISA per determinar si BP-1 i BP-2 afectaven la unió de LIGHT a HveA. HveA(200t) es va immobilitzar als pous d'una plata d'ELISA i es va incubar amb diferents concentracions de BP-1 i BP-2 o els pèptids control BP-1 (4, 10 Acm) i BP-2 (3,9 Ala) en presència de 1.3 nM LIGHT, i la unió de LIGHT es va detectar amb un anticòs monoclonal. La unió de LIGHT a HveA no va ser inhibida ni per BP-1 ni per BP-2 (Fig. 6A). Vam realitzar un assaig paral·lel en el qual BP-1 i BP-2, però no els seus controls [BP-1 (4, 10 Acm) i BP-2 (3,9 Ala)] van inhibir la unió a HveA (200t) de fag que expressava BP-2, com s'ha presentat anteriorment (dades no mostrades). També vam comprovar si la unió de LIGHT a HveA afectaria la unió de BP-1 o BP-2 al receptor, preincubant diferents concentracions de LIGHT amb HveA immobilitzat a la plata d'ELISA, abans d'afegir fag expressant BP-1 o BP-2. Vam observar que LIGHT no afectava la unió de cap dels fags (dades no mostrades).



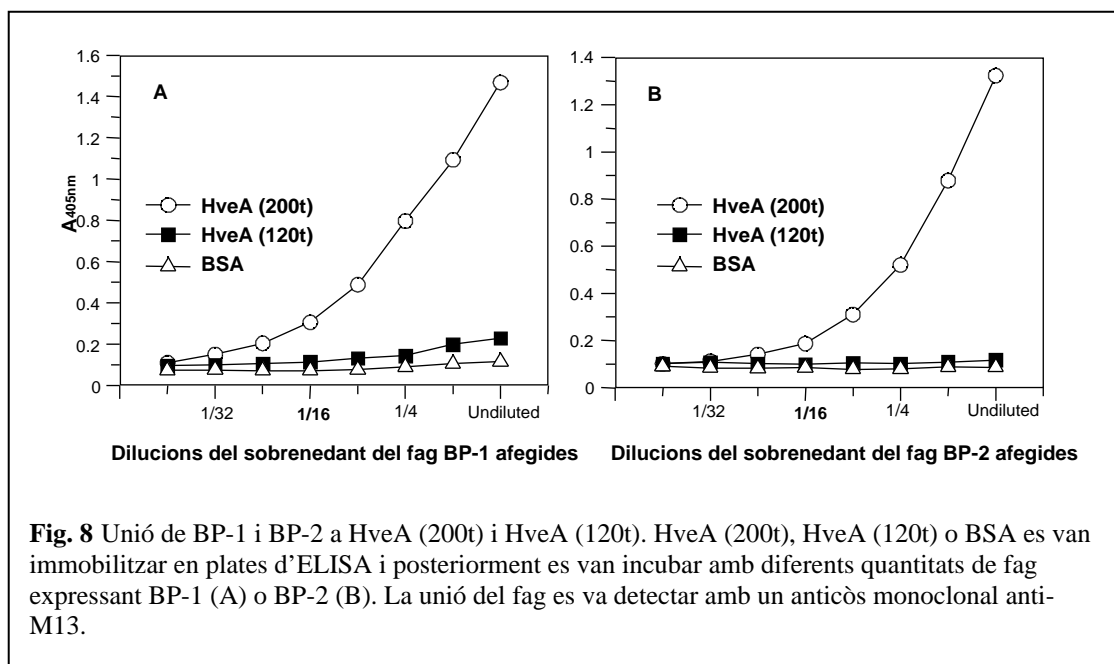
#### *Efecte dels anticossos monoclonals anti-HveA en la unió dels seus lligands*

Per analitzar l'efecte de sis anticossos monoclonals anti-HveA en la unió al receptor de LIGHT i fags expressant BP-1 i BP-2 es va realitzar un assaig de competició. HveA es va immobilitzar en els plats d'ELISA i es va incubar amb diferents concentracions de cada anticòs monoclonal. Llavors es van afegir la proteïna LIGHT o fags expressant BP-1 o BP-2, i la seva unió es va detectar afegint un anticòs anti-M2 marcat amb biotina, seguit d'estreptavidina marcada amb peroxidasa (per detectar LIGHT), o un anticòs anti-M13 marcat amb peroxidasa (per detectar la unió dels fags). Dels sis anticossos, només CW3 va ser capaç d'inhibir la unió de LIGHT i fags expressant BP-1 i BP-2 a HveA. (Fig. 7A-C). Aquest anticòs s'uneix a un epítop en HveA (120t), i inhibeix la unió de la gD viral al receptor (Whitbeck, 2000).



*Localització del lloc d'unió dels pèptids BP-1 i BP-2 a HveA*

Per determinar si BP-1 o BP-2 s'uneixen a la part N-terminal de HveA, HveA (120t), es va realitzar un assaig d'ELISA (Fig.8), en el qual HveA (200t) o HveA (120t) es van immobilitzar en els pous i es van incubar amb dilucions de sobrenedants de fag que expressaven BP-1 (Fig. 8A) o BP-2 (Fig. 8B). Ni el fag que expressava BP-1 ni el que expressava BP-2 es van unir a HveA (120t), suggerint que HveA (120t) no conté tots els elements estructurals necessaris per la interacció del receptor amb cap dels pèptids. Aquest resultat també ens indica que els llocs d'unió de BP-1 i BP-2 en el receptor són diferents al de gD.





## Discussió

En aquest estudi hem investigat les interaccions de LT- , LIGHT, gD, i dos pèptids que s'uneixen a HveA, els seu receptor comú. Entendre millor aquestes interaccions ens ajudaria a entendre les relacions estructurals i funcionals d'aquestes proteïnes, algunes de les quals juguen papers importants en la resposta immunològica de l'hoste. Concretament, ens vam plantejar si LT- i LIGHT interactuen amb el mateix lloc d'unió a HveA.

Els nostres resultats suggereixen que LIGHT i LT- s'uneixen a llocs sobreposats en el receptor. Malgrat tot, les zones reconegudes per les dues proteïnes no són idèntiques, i la manera com interactuen amb el receptor sembla ser diferent. Hem analitzat la seva unió a HveA utilitzant sis anticossos monoclonals anti-HveA, junt amb dos pèptids que s'uneixen a HveA (BP-1 i BP-2) que vam aïllar prèviament de llibreries de fag M13 (Sarrias et al., 1999). També hem fet servir una forma truncada del receptor, HveA (120t), que no conté els dos dominis CRP C-terminal. La glicoproteïna gD s'uneix a aquesta molècula truncada amb la mateixa afinitat amb que s'uneix al receptor sencer, indicant que el lloc d'unió de gD es localitza en els dos primers dominis CRP del receptor (Whitbeck, 2000). Aquesta troballa també ens suggereix que el fet d'eliminar dos dominis CRP no ha afectat l'estructura global de HveA (120t).

Els nostres assaigs d'unió directa i de competició amb HveA (200t) i HveA (120t) ens han indicat que LIGHT no s'uneix a HveA (120t) (Fig.1). Com gD s'uneix a aquesta part del receptor (Whitbeck, 2000), i LIGHT i gD competeixen per la seva unió a HveA (Mauri et al., 1998), caldria tenir en compte la possibilitat de que el fet de truncar el receptor pot haver afectat la conformació local dels residus de HveA que interactuen amb LIGHT. Una altra possibilitat seria que la unió de LIGHT a HveA causés un canvi conformacional en el receptor, alterant així la seva habilitat d'unir-se a gD. Per altra banda, la LT- interactuà amb la part N-terminal del HveA [HveA (120t)] en un assaig d'unió directa (Fig. 3). Malgrat tot, HveA (120t) va ser incapaç d'inhibir la interacció entre LT- i la forma sencera del receptor [HveA (200t)] (Fig. 3B), suggerint que elements estructurals no presents en HveA (120t) participen en la interacció del receptor amb LT- . De fet, és possible que la interacció de LT- i HveA s'assembli a la

de LT- amb el TNFR1: estudis de co-cristal·litització d'aquestes molècules indiquen que LT- s'uneix als dominis CRP 2 i 3 del TNFR1 (Banner et al., 1993).

Altres dades obtingudes en aquest estudi recolzen la nostra conclusió que la interacció de LIGHT i LT- amb HveA és diferent. Per exemple, vam observar que tot i que LT- podia inhibir la interacció entre LIGHT i HveA, aquesta inhibició era parcial, si es comparava amb l'efecte inhibitor molt més elevat de HveA (200t) soluble. A més a més, quan vam investigar l'efecte de la concentració de sal en la unió de LT- i LIGHT al receptor, vam observar diferències significatives entre els dos lligands (Fig. 6). La presència de concentracions de sal elevades (fins a 1M) redueix les interaccions electrostàtiques entre proteïnes, sense afectar significativament els ponts d'hidrògen o els contactes de van der Waals. La LT- va ser susceptible a quantitats en augment de sal en la solució, (Fig.5), indicant que forces electrostàtiques participen en la seva unió a HveA. Malgrat tot, com que no vam poder aconseguir una supressió total de la seva unió a HveA ni amb 1M de NaCl, sembla que altres tipus d'interaccions participen en la seva unió a HveA. La unió de LIGHT a HveA, per altra banda, no es va veure massa afectada per la presència de grans quantitats de sal, suggerint que la interacció LIGHT-HveA podria estar formada principalment per contactes hidrofòbics i ponts d'hidrogen.

Vam demostrar anteriorment que els dos pèptids BP-1 i BP-2 utilitzats en aquest estudi els quals s'uneixen a HveA, inhibeixen diferencialment la unió de LT- i gD al receptor (Sarrias et al., 1999). La nostra observació de que no tenen cap efecte inhibitor en la unió de LIGHT a HveA (Fig. 6) és una altra indicació que els tres lligands del receptor, LT- , LIGHT i gD, s'uneixen en diferents llocs a HveA. Aquests resultats també indiquen que BP-1 afecta exclusivament la interacció de HveA i LT- . Com que diferents TNFR que s'uneixen a LT- poden ser expressats a la superfície cel·lular, sovint és difícil estudiar la interacció entre proteïnes TNF específiques i els seus receptors. Així, BP-1 ofereix una eina ideal per investigar el paper específic de la interacció LT- i HveA en el sistema immunològic de l'hoste.

Per caracteritzar millor les interaccions entre HveA i els seus lligands, vam fer servir sis anticossos monoclonals anti-HveA i vam comprovar la seva habilitat d'inhibir la unió dels lligands de HveA al receptor (Fig. 7). El lloc d'unió d'aquests anticossos ha estat mapejat per Whitbeck et al.: CW1, CW2, CW3 i CW4 s'uneixen a la regió N-

terminal de HveA (HveA (120t)), mentre que CW7 i CW8 s'uneixen als dominis C-terminals CRP3 i CRP4 (Whitbeck, 2000). Ens va sorprendre descobrir que només l'anticòs CW3 fou capaç d'inhibir la unió de BP-1, BP-2 i LIGHT al receptor. Cal remarcar que mentre que aquest anticòs s'uneix a la forma truncada de HveA, HveA (120t), ni LIGHT, ni BP-1, ni BP-2 semblen unir-se a aquesta part de la molècula (Figs. 1, 8A i 8B, respectivament). És important remarcar que aquest mateix anticòs és l'únic capaç d'inhibir la interacció gD-HveA. Totes aquestes dades recolzen el nostre model proposat anteriorment en el qual vam plantejar la hipòtesi que HveA podria sofrir un canvi conformacional en unir-se a un lligand, cosa que afectaria la seva interacció amb els seus altres lligands.

En resum, nosaltres proposem que LIGHT, LT- i gD interactuen amb diferents residus de HveA, tot i que podria haver-hi alguns residus de contacte en comú. El lloc d'unió de gD en HveA ha estat localitzat als dominis CRP 1 i 2. Basant-nos en els nostres resultats i en dades cristal·logràfiques anteriors de la interacció de LT- i TNFR1, suggerim que LIGHT i LT- podrien interactuar amb els dominis CRP 2 i 3 del receptor, però aquestes interaccions serien diferents. Les dades que hem obtingut amb els pèptids BP-1 i BP-2 recolzen les nostres conclusions.



### 3.4. Treball 3:

## **“Aïllament d’un pèptid que s’uneix a dos receptors del virus de l’herpes simplex, HveA, i HveC”**

### **Resum**

Els receptors cel·lulars HveA, i HveC (Herpes virus entry mediator A, i C, respectivament) faciliten l’entrada de la majoria de soques del virus de l’herpes simplex 1 i 2 (HSV-1 i -2) a la cèl·lula de l’hoste. HveA pertany a la família dels receptors de factors de necrosi tumoral (TNFR), mentre que HveC pertany a la família d’immunoglobulines. Tot i diferir en seqüència d’aminoàcids i estructura, els dos receptors medien l’entrada de l’HSV mitjançant la unió d’una única proteïna viral, la glicoproteïna gD. Malgrat tot, existeixen diferències en la interacció de gD amb cadascun dels receptors. Amb l’objectiu d’estudiar la relació entre HveA, HveC i la proteïna viral involucrada en l’entrada de l’HSV a les cèl·lules, hem fet un screening d’una llibreria de pèptids aleatoris per trobar pèptids que s’uneixin a una forma recombinant de HveC. Experiments de selecció per afinitat han resultat en l’aïllament d’un pèptid, C-6, que s’uneix als dos receptors, HveA i HveC. Quan hem analitzat la capacitat del pèptid per bloquejar la interacció de HveA i HveC amb gD, hem observat que C-6 no inhibeix aquesta interacció. Així doncs, hem aïllat un pèptid que, de la mateixa manera que gD, és capaç d’unir-se als dos receptors cel·lulars que medien l’entrada de la majoria de soques del virus de l’herpes simplex a la cèl·lula.

## Materials i mètodes

### *Productes químics i solucions*

Tots els productes químics i solucions fets servir per a la síntesi de pèptids van ser comprats a Applied Biosystems (Foster City, Calif.), excepte els amino àcids F-moc (9-fluorenylmethoxycarbonyl), que procedien de Nova Biochem. (San Diego, Calif.).

### *Expressió de proteïnes*

La producció i purificació de HveA, i HveC, gD-1 (306t), gD-1 (290-299t), gD (280t) Hisless, gp350 (470t), gC, a partir de cèl·lules infectades amb baculovirus recombinant ha estat descrita abans (Nicola et al., 1996; Rux et al., 1996; Tessier et al., 1991; Whitbeck et al., 1997; Williams-Abbott et al., 1997). Una descripció general del mètode es pot trobar en la secció de materials i mètodes del treball 1 d'aquesta tesi. Cal remarcar que totes les proteïnes recombinants utilitzades en aquest treball contenen una cua d'histidines a la part C-terminal de la molècula per facilitar-ne la purificació, excepte gD (280t) Hisless.

### *Anticossos*

L' anticòs policlonal contra gD, R7, es va produir contra la proteïna gD-2 aïllada de cèl·lules infectades amb el virus, com s'ha descrit anteriorment (Isola et al., 1989).

### *Construcció i screening de la llibreria de pèptids*

La llibreria de 27 residus utilitzada en aquest treball és la mateixa que la utilitzada en el treball 1 d'aquesta tesi (Sarrias et al., 1999). La llibreria, doncs consistia en  $2 \times 10^8$  recombinants, cadascun expressant la seqüència  $SR X_{12} (S, P, T, \text{ o } A) A (V, A, D, G, \text{ o } E) X_{12} SR$  a la part N-terminal de pIII. Els aminoàcids aleatoris de la llibreria estaven codificats per NNK, on N representa proporcions equimolars d'A, C, T, o G, i K representa G o T. L'esquema NNK utilitza 32 codons per codificar 20 aminoàcids. La freqüència de cada aminoàcid és un cop (C, D, E, F, H, I, K, M, N, Q, W, Y), dos cops (A, G, P, V, T) i tres cops (L, R, S) per codó (Kay et al., 1993).

Els fags que s'unien a HveC van ser aïllats fent un screening de les llibreries tal i com s'ha descrit anteriorment (Kay et al., 1993; Sahu et al., 1996; Sarrias et al., 1999).

Breument, les plates d'ELISA (Nunc, Inc. Naperville, Ill.) van ser incubades a 22°C amb 500ng d'HveC i bloquejades amb PBS-1% d'albumina de sèrum boví (BSA) durant una hora a 22°C.  $6 \times 10^{11}$  unitats formadores de plaques (pfu) van ser afegides a cada pou i incubades durant una hora a 22°C. Els pous van ser rentats dos cops amb PBS-Tween-20 0.05%. Els fags units a HveC van ser eluïts amb 100 mM glicina-HCl, pH 2.3 i neutralitzats immediatament amb 200 mM fosfat de sodi, pH 7.4. Posteriorment van ser amplificats en *Escherichia Coli* DH5 F', i tot el procés de biopanning va ser repetit dos cops de la mateixa manera. La barreja de fags amplificats obtinguda durant la tercera ronda d'amplificació va ser platejada, i els fags positius van ser identificats confirmant la seva unió a HveC en ELISA. En aquest experiment els fags units van ser detectats amb un anticòs anti-M13 marcat amb peroxidasa (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N. J.). El DNA dels fags positius va ser aïllat i seqüenciat pel mètode de Sanger, com s'ha descrit prèviament (Sanger et al., 1977).

#### *Síntesi i purificació del pèptid C-6*

El pèptid C-6 va ser sintetitzat en un sintetitzador de pèptids d'Applied Biosystems (model 431 A), fent servir la resina d'amida F-moc. Els grups protectors de les cadenes laterals foren: Arg(Pmc), Ser(tBu), i Tyr(tBu). El procés de síntesi és el mateix que el descrit en el treball 1 d'aquesta tesi

Per analitzar la puresa dels productes finals, es van utilitzar la cromatografia líquida analítica i espectrometria de masses, fent servir un espectrofotòmetre de masses (Micro-Mass TofSpec; Micromass Inc., Beverly, Mass.) (Moore, 1993; Moore, 1997)

#### *Assaigs d'ELISA*

Per analitzar les interaccions entre HveC, HveA, els pèptids aïllats, i gD es van realitzar diversos assaigs d'ELISA. En aquests assaigs, HveA(200t), HveC, gC, gp350 (470t), C3 de complement, o llet van ser immobilitzats durant 2 h a 22°C en els pous de la plata. La unió no específica als pous va ser bloquejada amb una solució de PBS que contenia 1% BSA, durant 1h a 22°C. Per anàlisi de competició, dilucions seriadades de gD-1(306t), gD-1(280t), BSA, pèptid 6-C, o un pèptid control (ICVVQDWGHRCT), es va afegir a cada pou i incubar durant 30 min. a 22°C. Les proteïnes recombinants gD-1(306t)-a 0.4 µg/ml-, o sobrenedant del fag van ser afegides a cada pou i incubades

---

durant 1h a 22<sup>0</sup>C. Els pous es van rentar dos cops amb PBS que contenia Tween-20 al 0.05% i incubats amb (i) una dilució 1:1000 d'un anticòs anti-M13 marcat amb peroxidasa, (ii) una dilució 1:400 d'un anticòs policlonal anti-gD (R7). Els pous que contenien anticòs policlonal 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 conill conjugat amb peroxidasa (Bio-Rad laboratories, Richmond, Calif.). Les plates es van incubar durant 30 mins. a 22<sup>0</sup>C. 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 405 nm.

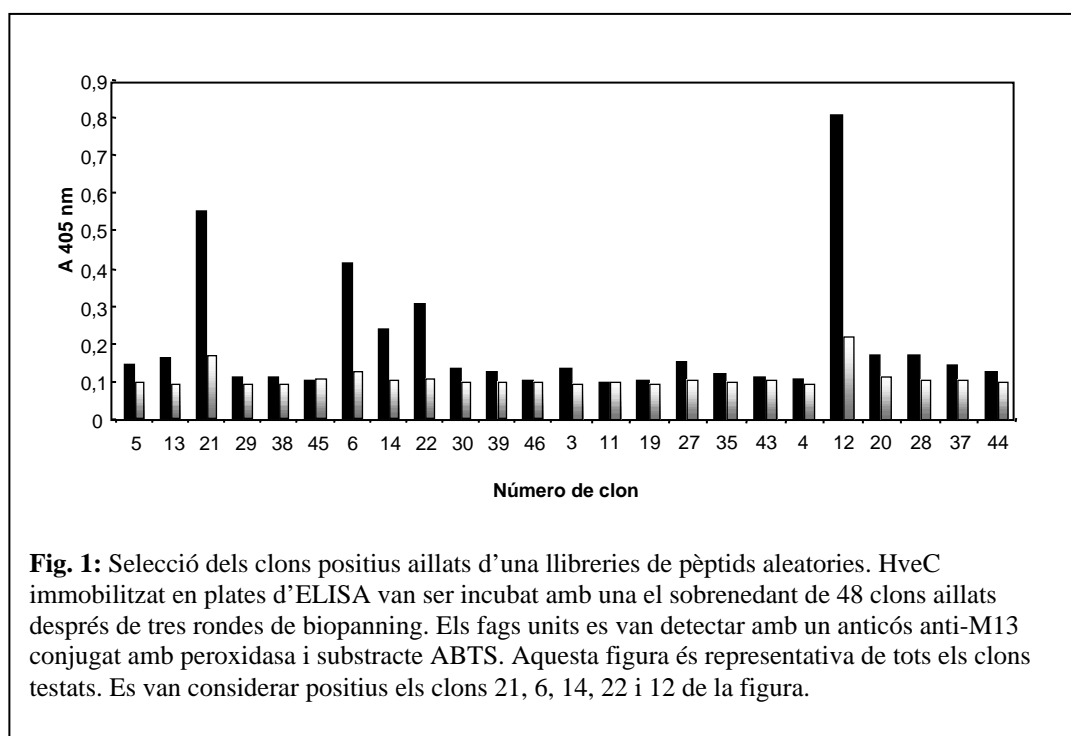


## Resultats

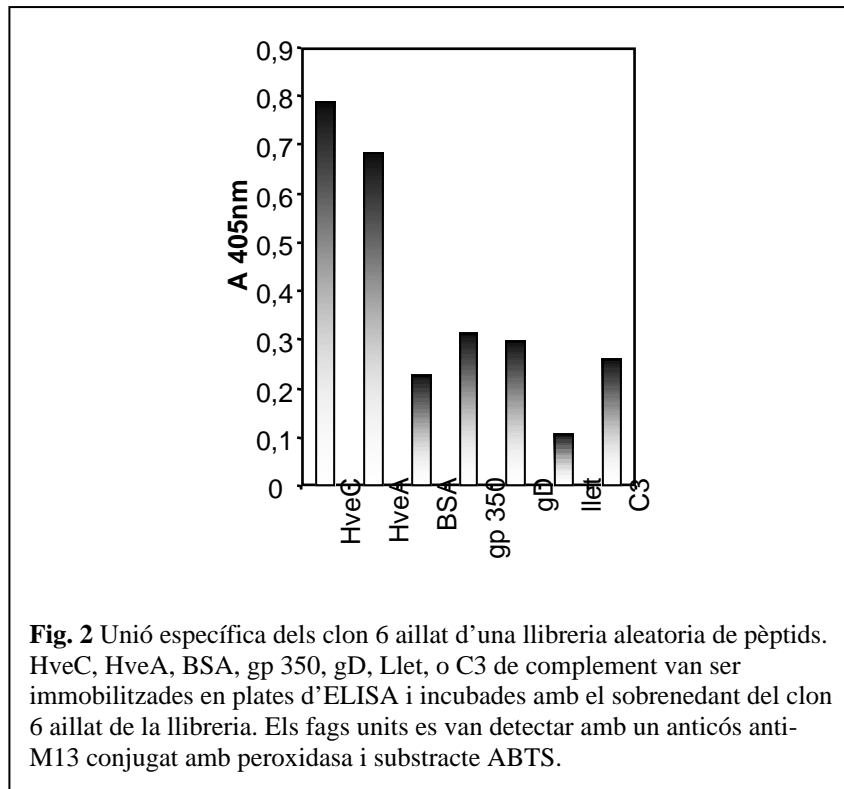
### *Aïllament i caracterització dels fags que s'uneixen a HveC*

Amb l'objectiu d'aïllar fags que s'unissin al domini extracel·lular de HveC, vam fer un screening d'una llibreria del fag M13 que expressava pèptids de seqüència aleatòria de 27 aminoàcids de llargada.

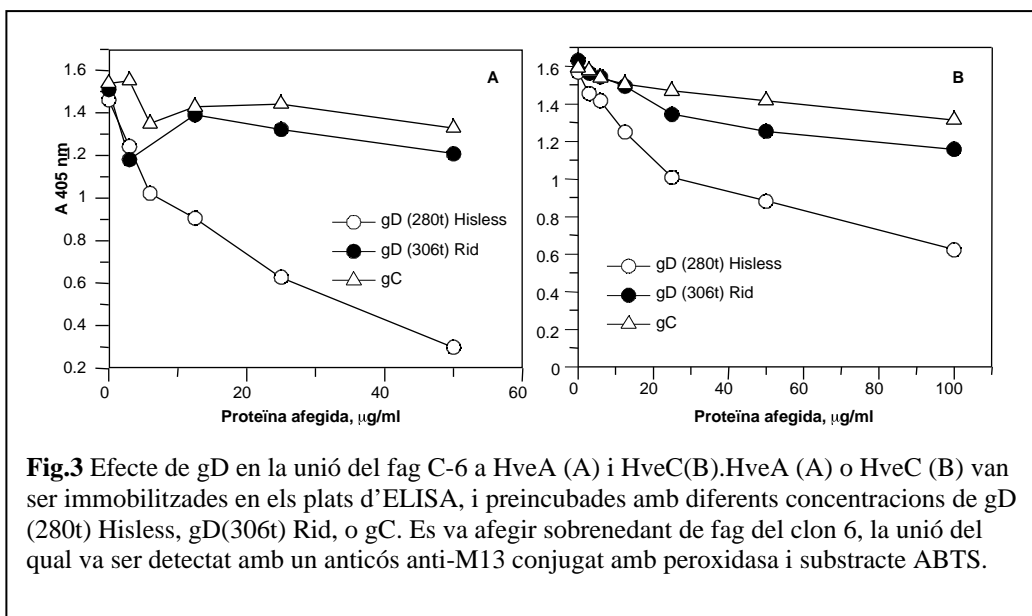
Els fags que expressaven pèptids que s'uneixen a HveC van ser seleccionats per afinitat incubant-los amb HveC que estava immobilitzat en un plat d'ELISA. Després de tres rondes de biopanning, els clons seleccionats van ser aïllats i es va comprovar la seva unió a HveC en ELISA. 6 de 48 clons s'unien a HveC (Figura 1).



Sorprenentment, el clon 6, que s'unia a HveC, també s'unia a HveA en ELISA. Aquesta unió semblava ser específica, perquè el clon no es va unir a altres proteïnes: C3 de complement, BSA, llet, gD, i gp350 (470t) (Figura 2). Cal remarcar que les proteïnes gD i gp350 (470t) han estat expressades en el mateix sistema que HveA, i HveC (baculovirus) i, de la mateixa manera que les formes recombinants dels receptors de l'Herpes, contenen una cua de sis histidines a la part C-terminal.



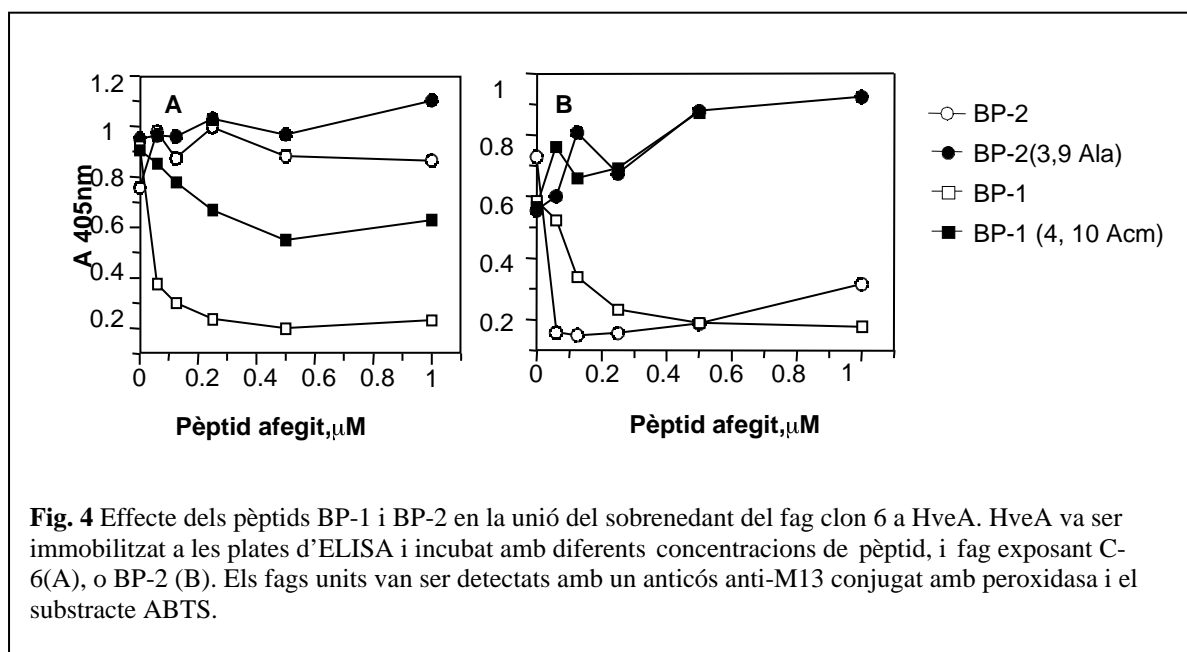
A més a més, la forma recombinant de gD, gD-1(280t) que no conté una cua d'histidines en solució era capaç de competir amb la unió del sobrenedant de fag del clon 6 a HveA i HveC immobilitzats al plat d'ELISA. Aquesta inhibició no es va observar en presència d'una forma mutant de gD, gD (306t) Rid, que no s'uneix als receptors, o la glicoproteïna gC d'Herpes Simplex Virus, ambdues expressades en el sistema de baculovirus, i que contenen una cua d'histidines a la part C-terminal. Això suggeria que la inhibició observada amb gD (280t) és específica. (Figura 3).



El DNA del clon 6 va ser aïllat i seqüenciat. La seqüència d'aminoàcids que deduïm per aquest clon és: TFGWSFLGQV EGAAATPLSNITWSRAG (clon 6, C-6). La seqüència d'aminoàcids d'aquest clon segueix el disseny original de la llibreria,  $X_{12}(S/P/T/A)A(V/A/D/E/G)X_{12}$ .

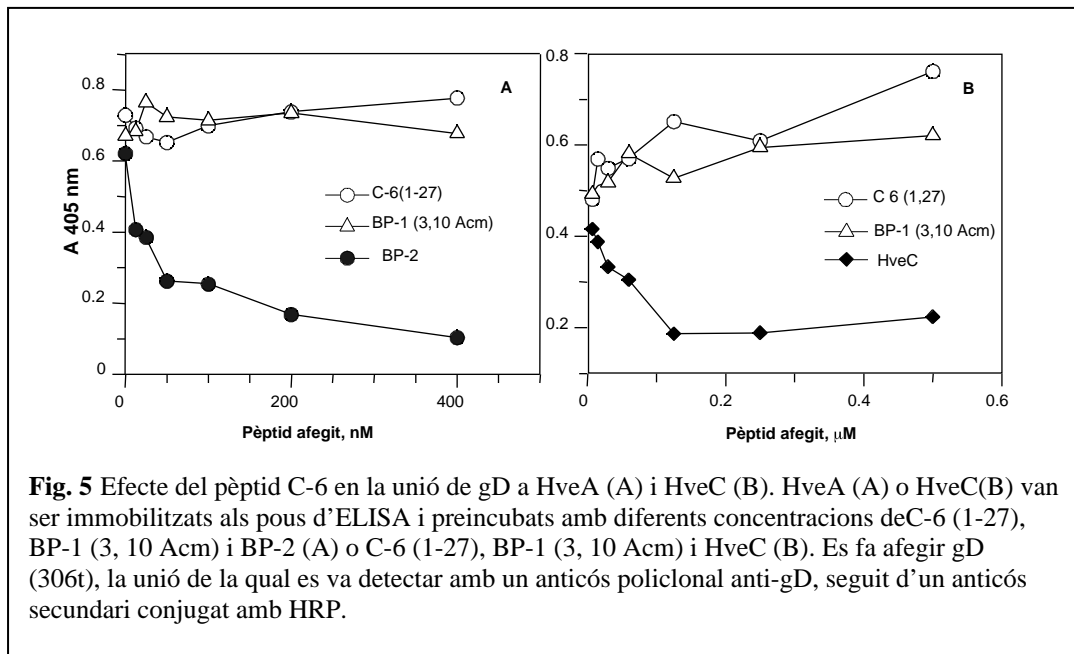
Vam buscar seqüències similars al pèptid C-6 a les bases de dades GenBank (DNA) i SwissProt (proteïnes), fent servir BlastP, BlastN i BlastX, i no en vam trobar cap de significativa. El pèptid C-6 tampoc contenia cap tipus de similaritat amb els pèptids BP-1 i BP-2 (Sarrias et al., 1999).

Per estudiar més a fons les característiques d'unió del clon 6, que semblava competir amb gD per la unió amb els receptors, vam sintetitzar un pèptid, que corresponia a la seqüència d'aminoàcids deduïda del pèptid expressat pels fags. Cal destacar que la unió d'aquest clon a HveA és inhibida per el pèptid BP-1, però no per el pèptid BP-2 (Figura 4). (BP-1 i BP-2 han estat descrits en els treballs 1 i 2 d'aquesta tesi, i s'uneixen a HveA, inhibint la unió de gD i LT- al receptor).



*Inhibició de la unió de gD a HveA i HveC*

A continuació es va examinar la capacitat del pèptid sintètic C-6 per competir la unió de gD-1 als receptors HveA, i HveC (Figura 5). La unió de la forma salvatge de gD-1 (306t) a HveA (Figura 5A) i HveC (Figura 5B) immobilitzats al plat no es va veure afectada per la presència del pèptid C-6, ni del control negatiu BP-1 (3,10Acm). En canvi, BP-2, inhibí la interacció gD-HveA, com ja havíem demostrat anteriorment (Treball 1). Com a control positiu de la inhibició gD-HveC s'utilitzà la forma soluble del mateix receptor. Els resultats de la figura 5 indiquen que el pèptid C-6 no té la capacitat d'inhibir la interacció entre gD i cap dels dos receptors.



## Discussió

L'entrada del virus de l'herpes simplex a les cèl·lules és un procés complex. Per exemple, diversos receptors cel·lulars han estat descrits, els quals medien l'entrada del virus a la cèl·lula de l'hoste. Els dos principals mediadors de l'entrada de la majoria de soques de l'HSV-1 a la cèl·lula són HveA i HveC (Herpes virus entry mediator A i C, respectivament). HveA forma part de la família de receptors de TNF, mentre que HveC forma part de la superfamília de les immunoglobulines. Tot i diferir en seqüència primària i estructura, ambdós receptors interactuen amb la mateixa proteïna viral, la glicoproteïna D.

En aquest estudi hem fet servir una llibreria combinatòria de pèptids exposades al fag M13 per identificar pèptids que s'unissin a HveC i que afectessin la interacció del receptor amb la proteïna viral gD. L'utilització d'aquesta tècnica va resultar prèviament efectiva en l'aïllament de pèptids que s'unissin a HveA i interferissin amb els seus lligands, la proteïna viral gD i el lligand de l'hoste LT- (Sarrias et al., 1999).

Després de tres rondes de biopanning, es van aïllar diversos clons que s'unien a HveC. Un d'aquests clons (el clon 6) no s'unia a altres proteïnes, com gp350, gD, BSA, C3 i llet. Sorprenentment, aquest clon s'unia també a HveA. Aquesta especificitat es va corroborar comprovant si la proteïna viral gD podia inhibir la unió del sobrenedant del clon 6 a HveA i HveC. Per a aquest assaig es va utilitzar la proteïna gD-1 (280t), que és una forma truncada al residu 280 de la forma salvatge de gD, gD(306t). gD-1 (280t) va ser expressada en el sistema de baculovirus i no conté cap cua d'histidines. La unió als dos receptors del clon 6 (C-6) va ser inhibida per gD-1 (280t), indicant que la unió d'aquest clon als receptors és específica. Com que ambdós receptors contenen una cua d'histidines ( $H_6$ ), aquest experiment també descartava la possibilitat de que el clon 6 s'unís a  $H_6$ .

També vam analitzar la capacitat dels pèptids BP-1 i BP-2 per competir amb el clon 6 per la unió a HveA. Aquests pèptids han estat descrits prèviament, i s'uneixen a HveA, interferint amb la seva unió amb els lligands LT- (BP-1) i gD (BP-2), respectivament. Vam observar que el pèptid BP-1 era capaç d'inhibir la interacció C-6-

HveA. Aquest pèptid conté dues cisteïnes formant un enllaç disulfur, que havíem demostrat important per a l'activitat del pèptid. És a dir, en experiments en què les cadenes laterals de les Cis de BP-1 van ser bloquejades (BP-1 lineal), el pèptid perdia la seva activitat. Sorprenentment, BP-1 lineal inhibeix parcialment la unió del clon C-6 a HveA, suggerint que altres residus en aquest pèptid tenen una participació important en el manteniment de la seva estructura.

Es va seqüenciar el clon C-6. La seqüència primària d'aquest clon segueix el disseny original de la llibreria,  $SR X_{12} (S, P, T, o A) A (V, A, D, G, o E) X_{12} SR$ , i no conté cap residu Cis.

El fet que la unió del clon 6 a ambdós receptors fos inhibida per gD va plantejar la qüestió de si el pèptid expressat per aquest clon consistia en un agonista de la proteïna viral gD. Per resoldre aquesta qüestió, vam sintetitzar un pèptid corresponent a la seqüència d'aminoàcids deduïda del pèptid expressat pel fag. A continuació, vam dissenyar un experiment de competició, on vam investigar si el pèptid C-6 era capaç de competir la unió de gD amb ambdós receptors, HveA i HveC. No es va observar cap efecte del pèptid C-6 en la unió de gD a HveA i HveC. És possible que aquest pèptid no tingui una afinitat suficient per als receptors com per competir amb gD.

Hem aconseguit aïllar un pèptid que s'uneix als dos principals receptors del virus de l'Herpes Simplex. Així doncs, la recerca dels aminoàcids importants per la interacció del pèptid C-6 amb HveA i HveC, junt amb un increment de l'afinitat d'aquest pèptid per a la unió amb els receptors, podria resultar en el desenvolupament d'un inhibidor universal de l'entrada del virus de l'HSV a la majoria de cèl·lules de l'hoste, molècula que seria essencial per a prevenir la infecció per HSV.