

BIBLIOTECA UCM



5305324809

T 577.27

ANT
int

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INTERACCIÓN ENTRE EL TERCER COMPONENTE (C3)

DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO HUMANO

E INMUNOCOMPLEJOS

TESIS DOCTORAL

DIRECTOR:
FERNANDO VIVANCO MARTÍNEZ



LUIS C. ANTÓN CANTO

Madrid, 1992

R. 21.848

A mi madre

HAN INTERVENIDO

Fernando dirigió esta Tesis e hizo posible, con todos esos años de contacto, que pudiera aprenderlo todo del Sistema del Complemento y de la vida diaria en un laboratorio. También es de agradecer su actitud, siempre tolerante, y la prontitud y el esfuerzo realizado durante estos últimos días de frenesí al leerse innumerables veces (¿cuántas fueron?) los borradores de este trabajo.

El Dr. Ortiz ha puesto mucho para que el Departamento de Inmunología funcione y sólo por ello merecería agradecimiento. Pero su disposición, siempre colaboradora, y su inmejorable carácter han hecho de mi estancia algo digno de recordar.

A Susana la incluyo aquí por infinidad de razones. La primera, y fundamental, por estar ahí. Además, esta Tesis no estaría ahora encuadrada si ella no me hubiera animado en los momentos más difíciles, que no faltaron. Hemos compartido la dura lucha contra unos enemigos feroces: las tareas domésticas. Y hay mucho más...

Mis colegas del Lab son dignos de recuerdo. A Chema le agradezco la colaboración científica prestada, desde los remotos tiempos de la Facultad, hasta que se informatizó totalmente. En especial también su amistad y buen humor, así como nuestra recién recobrada memoria. Pilar fue una gran compañera, y eso que nos abandonó por los SCRs. Guillermo merece recuerdo especial por muchos motivos: por su colaboración, por su capacidad de poner técnicas a punto que luego todos hemos utilizado (siempre pidió derechos de autor, pero nunca le hicimos caso), por estas últimas semanas de locura compartida y, por qué no, por su bien traída pedantería. Con Elena y con Sol trabajé estrechamente durante unos meses y, como siempre, aprendí más de lo que enseñé (Sol además sufrió la lectura de mi Introducción: una víctima inocente más). Ángel, durante muchos años, y Maite han contribuido al buen ambiente del cuatro.

Con el resto del personal del Departamento he pasado muy buenos ratos, que han permitido, incluso dentro del Lab, olvidar la Inmunología. José-Luis y Kiko me ayudaron en ocasiones con el trabajo. Especial mención merecen los que además se han convertido en amigos, como Miguel (¿impertinente yo?), Ángel (sobrevivió a mi Introducción) y Raúl ("Nasío pa matá").

En el Departamento de Bioquímica de la Complutense encontré siempre facilidades para realizar algunos de los trabajos que aparecen en este escrito, y otros muchos que no se recogen. En la Protein Chemistry Unit del Basel, con la ayuda de John Lambris, David Avila e Inma Esparza, aprendí algunas de las técnicas utilizadas.

También agradezco la labor del personal de Banco de Sangre, del Servicio de Fotografía y de Valentín, de la Biblioteca de la Fundación.

Finalmente, gracias a mi madre, a mi padre, que nunca podrá ver este ejemplar, a Jose y a Ángeles, por todo.

1.- INTRODUCCIÓN	1
<u>1.1.- EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO</u>	1
<u>1.2.- LAS VÍAS DE ACTIVACIÓN</u>	2
1.2.1.- LA VÍA CLÁSICA	5
<u>1.2.1.1.- LOS COMPONENTES</u>	5
<u>1.2.1.2.- ACTIVACIÓN Y REGULACIÓN</u>	8
1.2.2.- LA VÍA ALTERNATIVA	9
<u>1.2.2.1.- LOS COMPONENTES</u>	9
<u>1.2.2.2.- ACTIVACIÓN Y REGULACIÓN</u>	10
1.2.3.- LA FASE DE ATAQUE	11
<u>1.2.3.1.- LOS COMPONENTES</u>	11
<u>1.2.3.2.- ACTIVACIÓN Y REGULACIÓN</u>	12
<u>1.3.- RECEPTORES</u>	12
<u>1.4.- GENÉTICA</u>	14
<u>1.5.- ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO</u>	15
<u>1.6.- EL TERCER COMPONENTE DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO</u>	17
1.6.1.- ESTRUCTURA	17
1.6.2.- EL GEN DE C3	19
<u>1.6.2.1.- ESTRUCTURA DEL GEN Y SÍNTESIS DE C3</u>	19
<u>1.6.2.2.- BASES MOLECULARES DEL POLIMORFISMO Y DE LA DEFICIENCIA DE C3</u>	20
1.6.3.- ACTIVIDAD	21
<u>1.6.3.1.- EL PROCESO DE ACTIVACIÓN</u>	21
<u>1.6.3.2.- EL ENLACE TIOÉSTER DE C3, C4 Y α_2-MACROGLOBULINA</u>	23
1.6.4.- INACTIVACIÓN Y FUNCIONALIDAD DE LOS	

FRAGMENTOS GENERADOS	26
<u>1.7.- EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO E INMUNOCOMPLEJOS</u>	27
1.7.1.- LA MOLÉCULA DE ANTICUERPO Y LA FORMACIÓN DE INMUNOCOMPLEJOS	28
1.7.2.- INTERACCIÓN ENTRE INMUNOCOMPLEJOS Y EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO	30
<u>1.7.2.1.- SOLUBILIZACIÓN DE INMUNOCOMPLEJOS</u>	30
<u>1.7.2.2.- INHIBICIÓN DE LA PRECIPITACIÓN</u>	31
<u>1.7.2.3.- ELIMINACIÓN DE INMUNOCOMPLEJOS DEL TORRENTE SANGUÍNEO</u>	32
1.7.3.- FORMACIÓN DE COMPLEJOS COVALENTES ENTRE C3 E INMUNOCOMPLEJOS	34
2.- OBJETIVOS	37
3.- MATERIALES Y MÉTODOS	38
<u>3.1.- MATERIALES</u>	38
<u>3.2.- MÉTODOS GENERALES</u>	38
3.2.1.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA	38
3.2.2.- PREPARACIÓN DE SOPORTES PARA CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD	39
3.2.3.- PREPARACIÓN DE INMUNOCOMPLEJOS	39
<u>3.2.3.1.- OBTENCIÓN DE ANTISUEROS</u>	39
<u>3.2.3.2.- PREPARACIÓN DE IgG ESPECÍFICA</u>	40
<u>3.2.3.3.- CURVA DE PRECIPITINAS</u>	40
3.2.4.- ENSAYOS HEMOLÍTICOS	40
3.2.5.- MARCAJE RADIOACTIVO	41
3.2.6.- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)	41
3.2.7.- ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS	42
3.2.8.- SECUENCIACIÓN DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS	42

<u>3.2.8.1.- TRANSFERENCIA A MEMBRANAS DE PVDF A PARTIR DE GELES DE EGPA-SDS</u>	42
<u>3.2.8.2.- ANÁLISIS DE LAS FENILTIOHIDANTOÍNAS</u>	44
<u>3.2.8.3.- SECUENCIA RADIOQUÍMICA</u>	44
<u>3.2.8.4.- NUMERACIÓN DE RESIDUOS EN LAS SECUENCIAS DE IgG Y C3</u>	44
<u>3.3.- AISMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS</u>	45
3.3.1.- AISLAMIENTO DE C3	45
3.3.2.- PREPARACIÓN DE ¹⁴ C-C3(NH ₂ OH)	45
3.3.3.- FACTOR D	46
3.3.4.- C1q	46
<u>3.4.- INTERACCIÓN ENTRE C3 E INMUNOCOMPLEJOS</u>	47
3.4.1.- FUENTES DE COMPLEMENTO	47
3.4.2.- ENSAYOS DE UNIÓN DE C3 A INMUNOCOMPLEJOS	47
<u>3.5.- DELIMITACIÓN DE LOS PUNTOS DE UNIÓN DE C3 A LOS INMUNOCOMPLEJOS</u>	48
<u>3.5.1.- REDUCCIÓN Y AMINOETILACIÓN DE LOS COMPLEJOS</u>	48
3.5.2.- DIGESTIÓN CON TRIPSINA Y PAPAÍNA DE LOS COMPLEJOS	49
3.5.3.- DIGESTIÓN DE LOS COMPLEJOS CON PEPSINA	49
3.5.4.- INMUNOPRECIPITACIÓN CON ANTI-Fc-SEPHAROSE	50
3.5.5.- CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD EN ANTI-F(ab') ₂ - Y PROTEÍNA A-SEPHAROSE	50
3.5.6.- TRATAMIENTO CON HIDROXILAMINA	51
3.5.7.- CROMATOGRAFÍA EN BIO-GEL P-4 Y P-6 Y EN SEPHADEX G-25	51
3.5.8.- DIGESTIÓN CON PEPSINA DE COMPLEJOS ENTRE C3 Y EL Fc	52
<u>3.6.- ESTUDIO DE LA POSIBLE UNIÓN DE C3 A LA REGIÓN BISAGRA DE LA IgG</u>	53

3.6.1.- REDUCCIÓN, AMINOETILACIÓN Y DIGESTIÓN TRÍPTICA DE F(ab') ₂ ANTI-OVA	53
<u>3.7.- EFECTO DE LA UNIÓN DE C1q A INMUNOCOMPLEJOS SOBRE LA UNIÓN DE C3</u>	54
3.7.1.- CUANTIFICACIÓN DE LA UNIÓN DE LOS COMPONENTES	54
3.7.2.- EFECTO DE LA PRESENCIA DE C1q SOBRE LA UNIÓN AL DOMINIO C _γ 3	54
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	55
<u>4.1.- AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS</u>	55
4.1.1.- AISLAMIENTO DE C3	55
4.1.2.- FACTOR D	55
<u>4.2.- FORMACIÓN DE COMPLEJOS COVALENTES ENTRE C3 E IgG</u>	55
<u>4.3.- UNIÓN DE C3 A LOS FRAGMENTOS Fd Y Fc DE LA CADENA PESADA DEL ANTICUERPO</u>	60
4.3.1.- DIGESTIÓN TRÍPTICA DE IgG ANTI-OVA REDUCIDA Y AMINOETILADA	60
4.3.2.- DIGESTIÓN TRÍPTICA DE COMPLEJOS (¹⁴ C)C3-IC REDUCIDOS Y AMINOETILADOS	63
4.3.3.- DIGESTIÓN CON PAPAÍNA DE INMUNOCOMPLEJOS E IDENTIFICACIÓN DEL N-TERMINAL DEL Fc	67
4.3.4.- DIGESTIÓN CON PAPAÍNA DE LOS COMPLEJOS (¹⁴ C)C3-IC	70
4.3.5.- SENSIBILIDAD A NH ₂ OH DE LOS COMPLEJOS	72
4.3.6.- NATURALEZA DEL FRAGMENTO DE C3 UNIDO AL Fc Y AL Fd	74
<u>4.4.- FORMACIÓN DE COMPLEJOS COVALENTES ENTRE C3 Y EL DOMINIO C_γ3</u>	76
4.4.1.- DIGESTIÓN CON PEPSINA DE LOS COMPLEJOS (¹⁴ C)C3-IC	76
4.4.2.- PRESENCIA DE C1q EN LOS COMPLEJOS	78
4.4.3.- INMUNOPRECIPITACIÓN DE LOS COMPLEJOS pFc'-3kDa CON ANTI-Fc-SEPHAROSE	80

4.4.4.- SENSIBILIDAD A NH ₂ OH DE LOS COMPLEJOS	80
4.4.5.- NATURALEZA DEL FRAGMENTO DE C3 UNIDO AL pFc' Y AL Fd	81
4.4.6.- DIGESTIÓN CON PEPSINA DE COMPLEJOS ENTRE C3 Y EL Fc	87
<u>4.5.- ESTUDIO DE LA POSIBLE UNIÓN DE C3 A LA REGIÓN BISAGRA DE LA IgG</u>	91
<u>4.6.- RELACIÓN ENTRE LA UNIÓN DE C3 Y C1q A IC</u>	99
4.6.1.- CUANTIFICACIÓN DE LA UNIÓN DE LOS COMPONENTES	99
4.6.2.- EFECTO DE LA PRESENCIA DE C1q SOBRE LA UNIÓN AL DOMINIO C _γ 3	100
5.- DISCUSIÓN GENERAL	102
<u>5.1.- FORMACIÓN DE COMPLEJOS COVALENTES ENTRE C3 Y LOS FRAGMENTOS Fab Y Fc</u>	102
<u>5.2.- UNIÓN DE C3 AL DOMINIO C_γ3</u>	104
<u>5.3.- UNIÓN DE C3 A LA REGIÓN BISAGRA</u>	105
<u>5.4.- EFECTO DE LA PRESENCIA DE C1q SOBRE LA UNIÓN DE C3 A INMUNOCOMPLEJOS</u>	107
<u>5.5.- UNIÓN COVALENTE DE C3 A INMUNOCOMPLEJOS: ¿UNO O MÚLTIPLES PUNTOS DE UNIÓN?</u>	108
6.- CONCLUSIONES	111
<u>7.- BIBLIOGRAFÍA</u>	112

ABREVIATURAS EMPLEADAS

AE-Cys	S-(2-aminoetil)cisteína.
AF-S	Inmunoadsorbente anti-F(ab') ₂ -Sepharose CL4B.
Ag-Ab	Interacción entre antígeno y anticuerpo.
A2M	α ₂ -macroglobulina.
2BEA	2-bromoetilamina.
C3b*	C3b que aún conserva el carbonilo reactivo.
CAPS	Ácido 3-ciclohexilamino-1-propanosulfónico.
CM	Carboximetilo.
(¹⁴ C)C3-IC	Complejos covalentes entre C3 e inmunocomplejos obtenidos en presencia de iodo[1- ¹⁴ C]acetamida.
¹⁴ C-C3(NH ₂ OH)	C3 purificado, tratado con hidroxilamina y carboxamidometilado con iodo[1- ¹⁴ C]acetamida.
DAP	1,3-diaminopropano.
DEAE	Dietilaminoetilo.
DTT	Ditiotreitol.
EBV	Virus de Epstein-Barr
EDTA	Ácido etiléndiamin-tetracético (sal disódica).
EGPA-SDS	Electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS.
FPLC	Cromaografía líquida de proteínas de alta resolución.
Gdn/HCl	Hidrocloreuro de guanidinio.
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución.
IA	Iodoacetamida.
IC	Inmunocomplejos.
IC-IgG	Inmunocomplejos preparados con IgG.

IC-F(ab') ₂	Inmunocomplejos preparados con el fragmento F(ab') ₂ .
IG-BE	IgG a-OVA reducida y aminoetilada.
IG-IA	IgG a-OVA reducida y carboxamidometilada.
IP	Inhibición de la precipitación inmune mediada por complemento.
MAC	Complejo de ataque a la membrana.
NaPi	Fosfato sódico.
OVA	Ovoalbúmina.
PA-S	Adsorbente Proteína A-Sepharose CL4B.
PBS	Tampón fosfato sódico 10mM pH 7,2 que contiene NaCl 140mM.
PTH	Feniltiohidantofna.
RD	Suero humano del que se ha eliminado el factor D.
SBTI	Inhibidor de tripsina de semilla de soja.
SCN	Suero de conejo normal.
SDS	Dodecil sulfato sódico.
SHN	Suero humano normal.
SHN-Chelex	Suero humano normal en el que los iones divalentes se han eliminado por filtración en una resina Chelex 100.
SHN-EDTA	Suero humano normal en presencia de EDTA.
SOL	Solubilización de inmunocomplejos mediada por complemento.
TBS	Tampón 10mM Tris/HCl pH 7,2 que contiene 145mM NaCl.
TFA	Ácido trifluoroacético.
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano.
UV	Ultravioleta.

1.- INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

El Sistema del Complemento constituye uno de los sistemas efectores de la defensa inmune frente a microorganismos. Su activación tiene lugar de forma secuencial, a través de la generación de enzimas complejas a partir de zimógenos inactivos. Esto produce una cascada, en la que la enzima de un paso es capaz de generar un gran número de moléculas activas del siguiente. Tal y como es de esperar en sistemas de activación de este tipo, la regulación de estos procesos es muy estricta, lo que restringe dicha activación a los focos donde se inició e impide el daño tisular que se podría generar [1, 2]. Así, es el conjunto completo de proteínas, que incluye a las directamente implicadas en la activación y a las reguladoras, el responsable de la discriminación entre activadores y no activadores, definiéndose a un activador como aquel que es capaz de eludir los sistemas de control. Estas dos necesidades, la de amplificación y la de un control estricto, hacen del Complemento un sistema de gran complejidad.

La paternidad oficial del Sistema del Complemento se atribuye a Jules Bordet. No obstante, los trabajos previos de Nuttall (1888) y de Buchner (1889) definieron la existencia en suero de un factor bactericida termolábil, al que Buchner denominó *alexina* [3-6]. Pero fue Bordet el que distinguió dos actividades distintas en estos sueros: una termoestable, específica y que aumentaba con las inmunizaciones, y otra termolábil e inespecífica, a la que identificó con la alexina de Buchner. El bautismo le fue dado por Ehrlich, quien denominó *amboceptor* al componente específico (el anticuerpo) y *complemento* al inespecífico [3, 5]. Los pasos siguientes, dados independientemente por Ferrata y Brand en la primera década de este siglo, y que van asociados al descubrimiento de lo que hoy conocemos como vía clásica [4], definieron el carácter secuencial del proceso de activación. La vía alternativa no aparecería en el escenario hasta 1954, y lo hizo de forma polémica y con trágicas consecuencias para su descubridor, Louis Pillemer [7]. La fase final de activación del Sistema del Complemento, la Fase de Ataque, en la que se producen las lesiones de membrana causantes de la lisis celular, debe su descripción en gran medida a Mayer y sus colaboradores, especialmente con la hipótesis del impacto único [8, 9], por la cual la lisis de un eritrocito requiere una única lesión por complemento. Esta hipótesis permitió

un gran avance en el diseño de ensayos funcionales de la actividad del Sistema del Complemento y de sus componentes individuales [6]. El veloz avance que adquirieron las técnicas de Bioquímica a partir de los años 60 supuso un fuerte impulso para la caracterización de los componentes individuales y de las enzimas, de gran complejidad, generadas durante la activación. La revolución provocada por el fulgurante advenimiento de las técnicas de Biología Molecular a partir de finales de los 70, ha afectado también al Sistema del Complemento y nos ha llevado al panorama actual, que difiere en muchos aspectos del que se tenía hace tan sólo diez años.

Son, por tanto, cien años de trabajo intenso que han hecho posible el esclarecimiento de los complejos mecanismos que rigen el Sistema del Complemento, y que nos permiten establecer, entre otras cosas, que constituye mucho más que algo que se añade, acompañado de anticuerpos específicos, a cultivos celulares para eliminar de ellos poblaciones no deseadas. La definición de estos mecanismos, su regulación y sus relaciones con el Sistema Inmune es lo que se pretende en esta INTRODUCCIÓN.

1.2.- LAS VÍAS DE ACTIVACIÓN

La activación del Sistema del Complemento tiene lugar a través de dos vías: la vía clásica y la vía alternativa (Figura 1.1). No se trata de vías independientes, sino que se encuentran interconectadas, y confluyen en la generación de las enzimas multimoleculares responsables de la activación del tercer componente, C3, denominadas C3 convertasas. La composición molecular de las C3 convertasas de las dos vías es distinta, pero las proteínas que las integran son, como veremos, muy homólogas. Esta confluencia lleva a la etapa final de activación de los componentes de la Fase de Ataque, y a la generación de las lesiones de membrana. Una lista de los componentes del Sistema del Complemento y algunas de sus características se recoge en la Tabla 1.I. Los receptores y las proteínas reguladoras de este sistema se incluyen en la tabla 1.II.

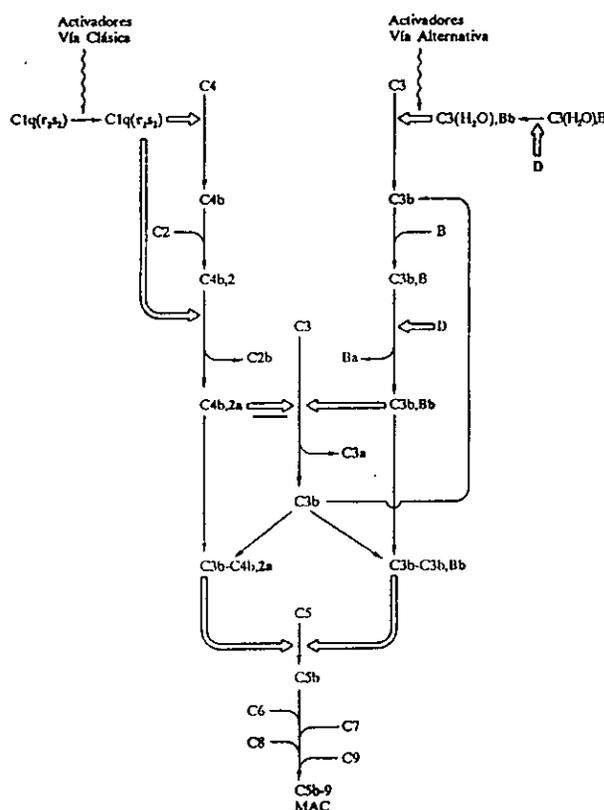


Figura 1.1 Esquema de la activación del Sistema del Complemento [330].

TABLA 1.I. Componentes implicados en la activación del Sistema del Complemento.

	PM kDa	Núm. de cadenas	PM de cadenas	Crom.*	Concentra- ción µg/mL	Activ. Enzim.
VÍA CLÁSICA						
C1 ^b	784			-	- ^c	+
C1q	462	6xA 6xB 6xC	A: 26,5 B: 26,5 C: 24,0	1p 1p 1p	80	-
C1r	83	1		12p	50	+
C1s	83	1		12p	50	+
C4	205	3	α: 97 β: 75 γ: 33	6p	600	-
C2	102	1		6p	20	+
C3	185	2	α: 115 β: 75	19q	1300	-
VÍA ALTERNATIVA						
D	24	1			2	+
B	92	1		6p	210	+
C3	185	2	α: 110 β: 75	19q	1300	-
FASE DE ATAQUE						
C5	190	2	α: 115 β: 75	9q	70	-
C6	120	1		5	64	-
C7	110	1		5	56	-
C8	150	3	α: 64 β: 64 γ: 22	1p 1p 9q	55	-
C9	71	1		5p	59	-

*: Localización cromosómica del gen.

^b: C1 está integrado por C1q:C1r:C1s en la proporción 1:2:2.

^c: En plasma, alrededor de un 70% de C1 está como complejo; el resto, disociado.

Son tres los posibles mecanismos de iniciación [10]. Primero, a través de un "zimógeno activo"; responde al hecho de que algunos zimógenos, que normalmente requieren ser activados proteolíticamente, pueden adquirir actividad enzimática aún como precursores. A este tipo corresponde la vía clásica. Segundo, el mecanismo denominado "tickover" o "ralentí"; responde

TABLA I.II. Proteínas reguladoras y receptores de membrana del Sistema del Complemento.

	PM kDa	Núm. de cadenas	PM de cadenas	Crm.	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$) ^a	Especifi- cidad	Función ^b
PROTEÍNAS PLASMÁTICAS							
C1-inh	105	1		11q	200	C1r,C1s	M-
Factor J	5,9	1		NC ^d	NC	NC	M-
C4BP	500	7 α 1 β	α : 70 β : 45	1q	250	C4b	M-
Factor H	150	1		1q	480	C3b	M-
Factor I	90	2	46 39	4q	35	C3b,C4b	M-
AI ^e	310	2		NC	35	C3a C4a C5a	M-
Properdina	220 [*]	Varia [*]	53	Xp	20	C3bBb	M+
Proteína S	80	1		NC	500	C5b-7	M-
PROTEÍNAS DE MEMBRANA							
CR1	160-250	1		1q	E,B,G,M ^d	C3b,C4b	M-,R
CR2	145	1		1q	B	C3d,g iC3b	R
MCP	45-70	1		1q	Amplio	C3b,C4b	M-
DAF	70	1		1q	Amplio	C4b,2a C3b,Bb	M-
CR3	160	2	α : 165 β : 95	16p 21q	G,M, ϕ	iC3b	R
CR4	145	2	α : 150 β : 95	NC 21	G,M, ϕ	iC3b	R
C3aR	80	NC		NC	G,A	C3a,C4a	R
C5aR	45	1		NC	G,A,M, ϕ ,P	C5a	R
CD59	20	1		NC	Amplio	C8,C9	M-
HRF	65	1		NC	E	C8,C9	M-
C1qR	65			NC	B,M, ϕ ,P,D	C1q	R
H-R	100	2	50	NC	B,M,G	H	R

^a: En las proteínas de membrana se indica la distribución celular; E, eritrocitos; B, linfocitos B; T, linfocitos T; M, monocitos; ϕ , macrófagos; G, granulocitos; N, neutrófilos; L, leucocitos; P, plaquetas; A, mastocitos; D, células endoteliales; *Amplio* se refiere a aquellas que se han encontrado en tejidos muy diversos.

^b: M +/- se refiere a moduladores, potenciadores o inhibidores, respectivamente; R, receptores.

^c: Inactivador de anafilatoxinas.

^d: NC: no conocido.

^e: La properdina es una mezcla heterogénea de monómeros, dímeros, trímeros y oligómeros. Así, el peso molecular dado corresponde al tetrámero.

a una activación continua, sin efectos visibles, pero que puede dispararse en determinadas circunstancias. Aquí es donde se encuadra la vía alternativa. Tercero, la presencia de enzimas exógenas al Sistema del Complemento, que pueden emular su acción, iniciando la activación. Tal es el caso de la activación del Sistema del Complemento cuando se activa el de la Coagulación.

1.2.1.- LA VÍA CLÁSICA

Fue la primera en ser descubierta y a su activación se deben las primeras actividades descritas del Sistema del Complemento. Salvo excepciones, su activación requiere la presencia de anticuerpos, formando parte de complejos inmunes.

1.2.1.1.- LOS COMPONENTES

C1. El primer componente del complemento, C1, es un complejo multimolecular formado por la asociación, dependiente de Ca^{2+} , de los subcomponentes C1q, C1r y C1s, en la proporción 1:2:2. Estos subcomponentes constituyen dos entidades diferenciadas: C1q es responsable de la interacción con inmunocomplejos y activadores, C1r₂-C1s₂ es el portador de la actividad enzimática [4, 11, 12]. C1q es una proteína con una estructura muy peculiar, tomando el aspecto de un ramo de seis tulipanes [13,14] cada uno formado por tres cadenas, A, B y C que tienen estructura colagénica en los tallos. Las cabezas globulares son responsables de la interacción con inmunocomplejos, mientras que los tallos colagénicos albergan los sitios de unión con C1r₂-C1s₂ [4, 11, 12] y con los receptores celulares [15]. C1r₂-C1s₂ constituyen la subunidad catalítica de C1; tienen ambas actividad enzimática del tipo de las serín proteasas, y están presentes como zimógenos. C1r es capaz de activarse, y activar a C1s, siendo éste el que activa a C4 y C2 [4].

C4. C4 es una glicoproteína sérica que consta de tres cadenas polipeptídicas, α , β y γ , unidas por enlaces disulfuro. Codificada dentro del sistema principal de histocompatibilidad (MHC) [16], en humanos presenta dos isotipos C4A y C4B [17], codificados por dos genes próximos. Es el primer sustrato de C1 tras su activación. Aunque carece de actividad enzimática, presenta en su cadena α un enlace tioéster interno que tras la activación genera un carbonilo altamente reactivo, capaz de formar enlaces covalentes con superficies aceptoras, inmunocomplejos [18], membranas celulares [19], etc. Esta capacidad de unión covalente tiene una duración muy corta. En el caso de C3, que se activa de forma similar, es del orden de μ segundos.

C2. Es una glicoproteína que consta de una única cadena de unos 100kDa de peso molecular [20]. Es sustrato de C1, posterior a la activación de C4. Es una serín proteasa, altamente homóloga al factor B de la vía alternativa [20], estando ambos genes fuertemente ligados dentro del MHC, y próximos al de C4 [21]. Igual que factor B, constituye un tipo de serín proteasa distinto, y más complejo, de los conocidos [20].

C3. El tercer componente del Sistema del Complemento está formado por dos cadenas polipeptídicas, α y β , unidas por un puente disulfuro. Presenta homologías estructurales con C4, lo que incluye la presencia de un tioéster interno. La estructura y la función de C3 se verán en detalle más adelante (su estructura aparece esquematizada en la Figura 1.2).

Existe, además un grupo de proteínas reguladoras, tanto solubles como de membrana, que afectan a todos los pasos de activación. *C1 inhibidor (C1INH)* es un regulador de C1. Pertenece, estructural y funcionalmente, al grupo de las serpinas (inhibidores de serín proteasas) [22]. Cumple dos funciones fundamentales: por un lado, inactiva C1, uniéndose de forma covalente a C1r y C1s, disociándolos de C1q. Por otro lado interacciona con C1 no activado, impidiendo la autoactivación de éste. *Factor I* es una serín proteasa [23], que inactiva por proteólisis tanto a C3b como a C4b, los fragmentos activos de C3 y C4 respectivamente, requiriendo para ello la unión previa a estos de un cofactor [24]. *C4 binding protein (C4bp)* es una compleja proteína plasmática, compuesta por ocho cadenas, siete de ellas idénticas y una séptima diferente, que toma el aspecto al microscopio electrónico de una estrella de mar. Es cofactor del factor I para la inactivación de C4b [25] y favorece el decaimiento de la C3 convertasa de la vía clásica. *CRI* (CD35), receptor de complemento tipo 1, es una proteína de membrana, que actúa como receptor de C3b y C4b [26]; además de ello, favorece el decaimiento de las convertasas de las dos vías de activación, y actúa como cofactor del factor I en la degradación de C4b y C3b [27]. *DAF*, factor acelerador del decaimiento, es también una proteína de membrana [28]; favorece el decaimiento de las convertasas de ambas vías, pero no actúa como receptor ni como cofactor del factor I. Su anclaje a la membrana es a través de un glicolípido por unión covalente [28]. *MCP* (CD46), proteína cofactora de membrana, también está presente en superficies celulares, y presenta actividad de cofactor del factor I, aunque carece de capacidad de acelerar el decaimiento de las convertasas [29].

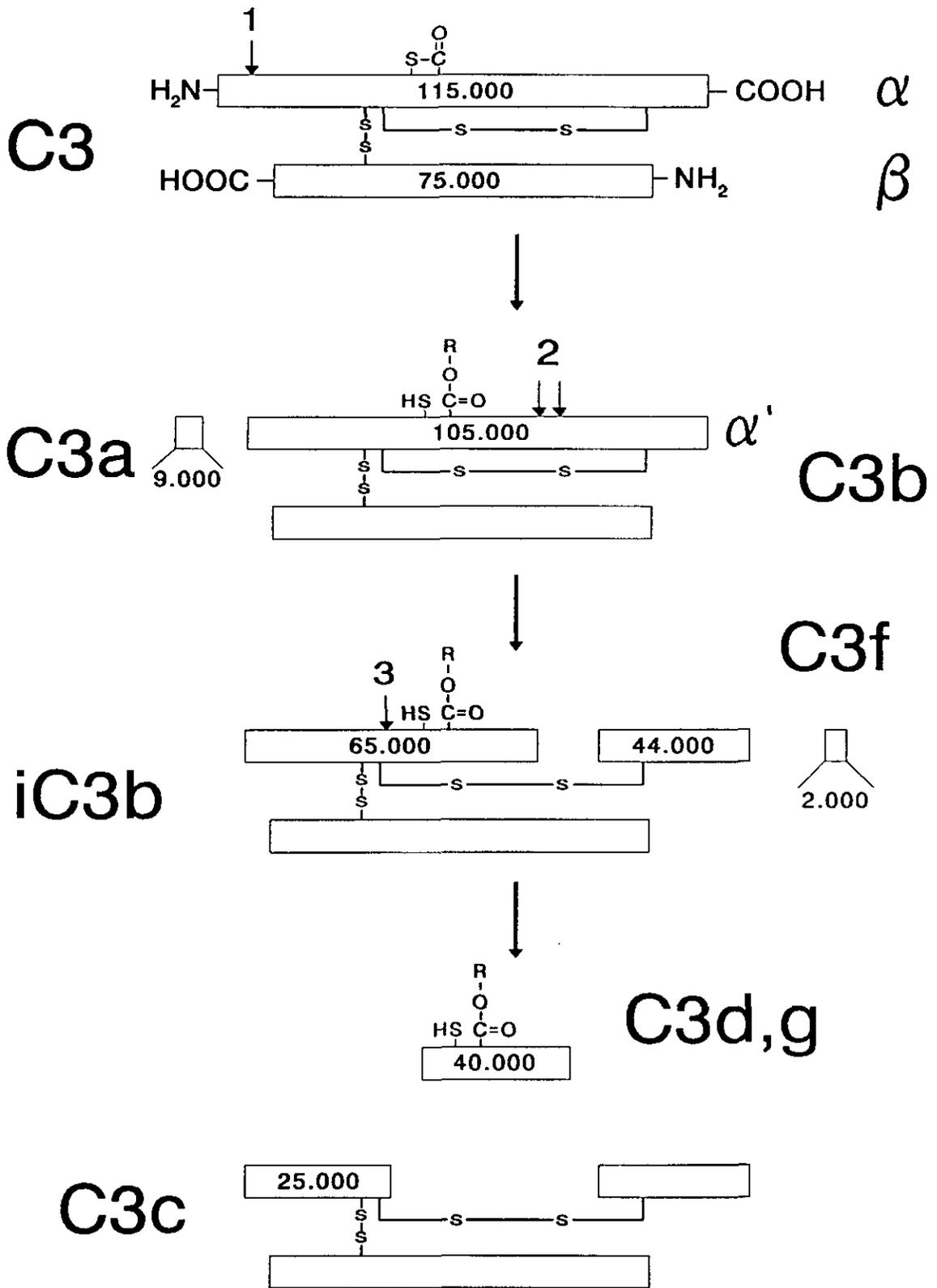


Figura 1.2 Esquema de la estructura de C3 y de la degradación proteolítica. 1: C3 convertasa. 2: factor I en presencia de H o CR1. 3: factor I y CR1.

1.2.1.2.- ACTIVACIÓN Y REGULACIÓN

La vía clásica es activada por inmunocomplejos formados por IgG o IgM, cuyo ejemplo más característico es el de eritrocitos de carnero sensibilizados con anticuerpos específicos (abreviado como EA), [30], así como por algunos virus, lipopolisacáridos y porinas de algunas bacterias Gram-negativas, polianiones, o la proteína C-reactiva [31]. El primer paso consiste en la unión de C1 al activador, haciéndolo a través de las cabezas globulares del subcomponente C1q. Estas se unen al dominio C γ 2 de la IgG o al C μ 3 de IgM, ambos en la región Fc [4, 12]. Para que la activación tenga lugar, se requiere que estén involucradas al menos dos de las cabezas globulares [4]. Tras la unión, C1r se activa, generando C1 \bar{r} , que hidroliza un enlace en C1s, dando como resultado final C1 \bar{i} .

Esta enzima, a través de C1s, actúa como activador de C4, por la hidrólisis de un enlace peptídico en su cadena α , lo que da lugar a dos fragmentos: C4a, de unos 9kDa y C4b de 195kDa. Este último es capaz de unirse covalentemente a superficies celulares o a proteínas, incluyendo al propio anticuerpo. La unión covalente de este fragmento tiene lugar en las proximidades de C1 [32], lo que permite que éste active a C2, ya que dicho paso requiere la proximidad entre C1 y C4b [33]. Ello tiene lugar por hidrólisis de un enlace peptídico generando dos fragmentos: C2a de 70kDa y C2b de 30kDa [33]. El primero de ellos es el portador de la actividad proteolítica, y es capaz de unirse, de forma no covalente y sí dependiente de Mg $^{2+}$, a C4b, generando la enzima denominada C3 convertasa, C4b2a [33], enzima con un decaimiento, por disociación de C4b y C2a, $k_{decaim.}$ de 2,0 min $^{-1}$ [34]. Esta enzima activa a C3; esta activación, de forma similar a la de C4, genera C3a (9kDa) y C3b (176kDa), siendo este último capaz de unirse covalentemente a superficiesceptoras. La convertasa activa numerosas moléculas de C3, que se depositan alrededor de ésta [32]. Algunas de ellas pueden unirse covalentemente a moléculas de C4b depositadas previamente, formando dímeros, sobre los que se puede unir C2a, generando la C5 convertasa de la vía clásica, C4b3b2a [35]. No obstante, en ausencia de C3, dímeros covalentes de C4b pueden desempeñar la misma función [36]. Esta enzima activa a C5, iniciándose la fase de ataque a la membrana.

Cada uno de estos pasos está controlado por proteínas reguladoras, que impiden que la activación se extienda, y que protegen a las células autólogas del ataque por su propio Sistema del Complemento. Así, deficiencias de alguno de los componentes reguladores están asociadas a procesos de daño tisular y de consumo descontrolado del complemento. Existen, además, otros mecanismos de retroalimentación negativa, como el efecto inhibitorio de los fragmentos activados

de C3 y C4 sobre la activación de C1 [37].

1.2.2.- LA VÍA ALTERNATIVA

Descubierta en los años 50, no fue definitivamente aceptada hasta que se demostró su actividad con componentes aislados [38]. Es activada por una gran diversidad de estímulos, incluyendo inmunocomplejos, paredes de bacterias Gram negativas o de levadura (como el zimósán) [39], algunos virus o, en el caso del complemento humano, los eritrocitos de conejo [40].

1.2.2.1.- LOS COMPONENTES

Factor D es una serín proteasa que, contra lo que es habitual en nuestro sistema, está presente en plasma como enzima activa, y exhibe una alta especificidad por el sustrato (factor B) [41]. Tiene un peso molecular de 24kDa, y en su secuencia están incluidas las posiciones características de las serín proteasas.

C3 es el elemento en el que confluyen las dos vías. En la alternativa juega un papel central, ya que es parte integrante de la C3 convertasa. El papel del enlace tioéster, como veremos, es doble en el proceso de activación.

Factor B es el segundo integrante de la C3 convertasa. La molécula es estructural y funcionalmente homóloga a C2 [20], formando con él un nuevo tipo de serín proteasas, y es el sustrato del factor D una vez que se ha unido, de forma no covalente, a C3b.

Igual que en la vía clásica, existen además proteínas reguladoras. Muchas de ellas son comunes a ambas vías, como es el caso de factor I, CR1, DAF y MCP. Existen, además, otros que son exclusivos de esta vía. *Properdina* es un potenciador de la vía alternativa, constituyendo en ocasiones un requisito imprescindible para la activación efectiva. En plasma está constituida por una mezcla heterogénea de oligómeros del monómero de 53kDa [41]. Estabiliza la C3 y la C5 convertasas aumentando su vida media. Presente en dos formas, nativa y activada, esta última está formada por complejos C3-P [42]. *Factor H* es cofactor del factor I en la inactivación de C3b, además de acelerar el decaimiento de la C3 y de la C5 convertasas y competir con factor B por su unión a C3b. Su unión a C3b se ve afectada por las estructuras presentes en la superficie a la que éste se ha unido [43].

Existen, además otros reguladores, que aparecen en circunstancias patológicas, como *C3NEF*, factor nefrítico, anticuerpo que reconoce a la C3 convertasa, estabilizándola, y protegiéndola de la acción de factor H [44], o *CoVF*, un factor presente en veneno de cobra, y que consume eficientemente la vía alternativa; se trata de un fragmento de una proteína muy semejante a C3 de cobra, y que se une a B, formando una C3 convertasa que no es sensible a la acción de factor H y que tiene una vida media muy elevada (25200 seg.)(45).

1.2.2.2.- ACTIVACIÓN Y REGULACIÓN

La iniciación de la activación tiene lugar merced a la hidrólisis espontánea del tioéster de C3, sin que medie activación proteolítica alguna [46, 47]. La molécula resultante, C3(H₂O), presenta algunas de las características funcionales de C3b que están ausentes en C3 nativo [48], como la de unir factor B, que puede entonces activarse por D, generando dos fragmentos Ba de 33kDa y Bb de 60kDa; este último es el portador de la actividad enzimática [41]. Así se obtiene la C3 convertasa de iniciación, $\overline{C3(H_2O)Bb}$, complejo unido por fuerzas no covalentes y dependiente de Mg²⁺. Esta hidrólisis del tioéster de C3 se produce de forma constante en la sangre [47], manteniendo una concentración baja pero permanente de C3(H₂O) [49], siendo esto responsable de la activación permanente, con baja eficiencia, de esta vía [10]. La convertasa de iniciación activa a algunas moléculas de C3 que pueden quedar en solución, inactivándose por los factores H e I, o unirse covalentemente a superficiesceptoras (membranas celulares, inmunocomplejos, etc.). Es en este punto en el que se discrimina entre activadores y no activadores: si se une a una superficie no activadora, los factores H e I actúan conjuntamente para inactivar C3; en caso contrario, la superficie inhibe la unión del factor H a C3b, impidiendo su inactivación, y permitiendo la unión de factor B y la generación de la C3 convertasa de amplificación $\overline{C3bBb}$ [41]. Esta enzima, depositada en la superficie de los activadores, tiene una vida media de unos 90 seg. [45]. Puede activar una gran cantidad de moléculas de C3, algunas de las cuales se unirán a la superficie y generarán más C3 convertasas [50]. Es ésta la denominada fase de amplificación. Finalmente, algunas de las moléculas de C3b unidas servirán de receptoras para otras nuevas, dando lugar a dímeros C3b-C3b, que uniendo factor B, que es activado por factor D, generará la C5 convertasa, $\overline{C3b3bBb}$ [51].

Esta vía también puede iniciarse con el aporte, producido por la vía clásica, de moléculas de C3b unidas a la superficie, lo que supone un incremento en la velocidad y eficiencia de la vía alternativa [52]. Por otra parte, C4b puede servir de receptor para la unión covalente de C3b; ello, además de generar la C5 convertasa de la vía clásica, crea un entorno protector a C3b de la

acción de factor H, actuando así como superficie activadora [53]. El efecto opuesto lo ejerce C1q, del que se ha comprobado que actúa como inhibidor de la activación de la vía alternativa [54].

1.2.3.- LA FASE DE ATAQUE

Es la fase final de la activación del Sistema del Complemento, y tiene sentido cuando la activación tiene lugar sobre células. Su primer paso, la activación de C5, constituye el último paso enzimático de la cascada; a partir de ahora, tendrán lugar tan sólo interacciones proteína-proteína y cambios conformacionales. Estos se caracterizan por ser transiciones hidrofílicas-anfifílicas [9], esto es, cambios que generan, a partir de proteínas solubles, formas con capacidad de insertarse en membranas lipídicas, produciendo finalmente las lesiones en la membrana, denominadas MAC (complejo de ataque a la membrana).

1.2.3.1.- LOS COMPONENTES

C5 es una glicoproteína sérica, altamente homóloga a C4 y C3 y, como esta última, consta de dos cadenas unidas por puentes disulfuro. Tras su activación presenta un sitio de unión metaestable específico de C6 de una vida media de 2,3 min [55], aunque en este caso la interacción no es covalente, dado que C5 carece del enlace tioéster de C3 y C4 [19].

C6 y C7 son proteínas altamente homólogas, y sus genes están fuertemente ligados. Presentan, además, cierto grado de homología con C8 y C9 [56].

C8 consta de tres cadenas polipeptídicas, de las que α y γ están unidas por puentes disulfuro y β por fuerzas no covalentes [57], estando esta última codificada por un gen diferente [56].

C9 es la proteína que forma las estructuras cilíndricas que atraviesan la membrana lipídica, y que constituyen las lesiones propias del MAC. Estructuralmente es homóloga a la perforina, la proteína de células T citotóxicas implicada en la lisis de las células diana.

Existen además proteínas reguladoras. La *Proteína S* es el único regulador soluble de la fase de ataque; se une a C5b-7, impidiendo su inserción en la membrana, y formando un complejo soluble SC5b-7 [58]. *HRF*, factor de restricción homólogo o C8bp, es una proteína de membrana que confiere resistencia a las células frente al complemento autólogo [59]. *CD59*, es también una

proteína de membrana. Se une a C8 y C9, impidiendo el cambio conformacional de esta última. HRF y CD59 se encuentran ligadas a la membrana por la misma estructura que el DAF [60, 59].

1.2.3.2.- ACTIVACIÓN Y REGULACIÓN

La C5 convertasa de cualquiera de las dos vías activa C5 escindiendo un enlace peptídico de su cadena α , liberando dos fragmentos, C5a de 9kDa y C5b de 105kDa. Este último presenta transitoriamente capacidad de unir C6. La unión de C6 da lugar a un cambio conformacional, que provoca la aparición de un sitio de unión de C7. Una vez formado el complejo C5b-7, aparece en este la capacidad de unirse a membranas; cuando lo hace, actúa de receptor de C8, que al unirse experimenta una transición hidrofóbica-anfifóbica [8, 61], insertándose en la membrana, siendo este complejo, C5b-8, el primero que atraviesa totalmente la membrana, y confiere cierta permeabilidad a moléculas pequeñas. A este complejo se puede unir una molécula de C9, que sufre un tipo de transición como el de C8, tras lo cual sirve de aceptor para más moléculas de C9, que dan lugar al poro cilíndrico característico, formado por C5b-8(9)_n, donde n oscila entre 1 y 18 [8].

Las células nucleadas oponen mayor resistencia a la lisis que los eritrocitos, bien por las proteínas reguladoras de membrana, o por procesos metabólicos, en los que tiene lugar síntesis lipídica, con intervención de Ca²⁺ y cAMP, así como de consumo de energía [62, 63]. Uno de estos mecanismos se basa en la eliminación de los MAC, bien por vesiculación o por internalización [62]. Algunos de estos mecanismos, no obstante, también pueden ser compartidos por eritrocitos.

1.3.- RECEPTORES

El Sistema del Complemento es un mediador de procesos inflamatorios y de opsonización (proceso consistente en recubrir partículas con ciertas proteínas séricas, y que favorece el proceso de fagocitosis). Estos procesos involucran a diferentes tipos celulares. Como tal los componentes de este sistema y los fragmentos derivados de su activación, tienen receptores específicos en algunas de estas células [64]. Los más conocidos, en lo que se refiere a su función y estructura, son los específicos de los fragmentos de C3 que permanecen unidos a los activadores.

CR1 (CD35). Reconoce principalmente a los fragmentos C3b y C4b, si bien también une, aunque con menor afinidad, a iC3b [65]. Actúa tanto de receptor como de regulador de la

activación del complemento [27], tal y como se vió anteriormente. En lo que respecta a su acción cofactora del factor I, se diferencia de factor H en su mayor eficiencia, y en que, en el proceso de inactivación, los fragmentos terminales de C3 son C3c y C3d,g, este último portador del sitio de unión covalente, mientras que con H sólo se degrada hasta iC3b [26]. La afinidad de CR1 por C3b aumenta cuando interacciona con dímeros de éste, en vez de con monómeros. Ello concuerda con la existencia de dos sitios distintos de unión de C3b en CR1, diferentes, a su vez, del único de C4b. Su polimorfismo genético da lugar a cuatro variantes que difieren en peso molecular, siendo las diferencias entre una y otra de 30kDa [26]. El aporte sanguíneo mayoritario de CR1 lo realizan los eritrocitos [26].

CR2 (CD21). Reconoce a iC3b y a C3d,g [65], y es receptor, además, del virus Epstein-Barr (EBV) [66] y del interferón α [67]. No participa en la regulación de la activación del complemento, pero sí es cofactor del factor I cuando el sustrato es iC3b, dando lugar C3d,g [26]. Es abundante en, y casi exclusivo de, linfocitos B, y es responsable del tropismo del EBV. Los sitios de unión de C3d,g y EBV solapan, si bien no son completamente idénticos [68]. En linfocitos B aparece asociado a CD19 y, a través de éste, a otras proteínas implicadas en transducción de señales [69].

CR3. Reconoce a iC3b [70]. Consta de dos cadenas polipeptídicas, α (CD11b) y β (CD18), unidas por fuerzas no covalentes. Pertenece a la familia de las integrinas, y comparte cadena β con LFA-1 y p150,95 (CR4) [71]. Su unión a los fragmentos de C3 es dependiente de cationes divalentes. Además de ser receptor de iC3b, participa en procesos de adhesión celular [72]. Es el principal mediador de opsonización y fagocitosis mediada por C3 [70].

CR4. Une también iC3b, y pertenece a la misma familia que CR3. Igual que él, está formado por dos cadenas, α (CD11c) y β (CD18). Su función real como receptor de iC3b está aún por demostrar, dada la baja afinidad de la interacción. Su función parece estar más bien en procesos de adhesión celular [70].

Existen otros receptores específicos de fragmentos procedentes de C3 y otros componentes, que intervienen en procesos de opsonización, como el receptor de C1q [15]. También participan en la regulación local de la activación del complemento, como el receptor del factor H, que tras interactuar con su ligando libera factor I [73]. También intervienen en procesos inflamatorios, como es el caso de los receptores de anafilatoxinas. Estas incluyen a C3a, C4a y C5a, los fragmentos liberados al activarse C3, C4 y C5, respectivamente. C3a y C4a tienen

un receptor común, mientras que el de C5a es diferente [74]. La actividad de estas anafilatoxinas es diferente, tanto en potencia (siendo su orden C5a > C3a > > C4a; de hecho, la actividad en condiciones fisiológicas de C4a es dudosa) como en función. Su grupo activo incluye un residuo de Arg en el C-terminal, que es el blanco del inactivador de anafilatoxinas (AI), que tiene actividad carboxipeptidasa. Participan en procesos inflamatorios, mediando la liberación de histamina, y en procesos de quimiotaxis (sólo C5a) [74, 75].

1.4.- GENÉTICA

El estudio del Sistema del Complemento ha permitido establecer la existencia de distintas familias de proteínas, que presentan homologías estructurales y/o funcionales; en algunos casos dichas homologías van asociadas también genéticamente [56]. Ha permitido asimismo identificarlas como proteínas "mosaico" [76], constituidas a base de módulos, homólogos a los presentes en otras proteínas, con funciones no necesariamente comparables a las de éstas, así como abundar en la correlación existente entre los exones y unidades estructurales y/o funcionales de proteínas [77].

Los genes que codifican a las proteínas asociadas a las C3 convertasas de ambas vías, excluyendo a C3, se encuentran dentro del MHC, entre los genes de clase I y los de clase II [21]. Los genes de C2 y factor B están fuertemente ligados. Los de C4, que presenta dos isotipos [17], C4A y C4B, están algo alejados, y cada uno asociado a uno de los isotipos de la enzima 21-hidroxilasa.

Los genes de las proteínas que interactúan con C3b y C4b se encuentran también asociados formando un grupo de ligamiento [78], denominado RCA (Regulators of Complement Activation). Este grupo presenta una homología estructural fuerte, al constar casi íntegramente de secuencias homólogas repetidas, de unos 60 aminoácidos [79], que reciben el nombre de SCR (Short Consensus Repeats). Este grupo de ligamiento incluye a CR1, CR2, DAF, MCP, factor H, C4bp (α y β), además del factor XIIb del Sistema de la Coagulación, que también consta íntegramente de estos SCR [80, 81]. Estas unidades, de estructura tridimensional conocida por espectroscopía de resonancia magnética nuclear [82], dan lugar al alinearse, a estructuras elongadas, cuya longitud depende del número de SCR. Estos SCR también se encuentran, aunque constituyen tan sólo una parte de la molécula, en otras proteínas del complemento, como factor B, C2, C1r y C1s, o en proteínas no relacionadas, como el receptor de interleuquina 2 o la β_2 -glicoproteína I [1].

Otro grupo lo constituyen las proteínas integrantes de la fase de ataque, que, a excepción de C5, presentan homología entre ellas, y son claros ejemplos de proteínas "mosaico" [1, 56], compartiendo algunas de sus unidades con la properdina. En el caso de C6 y C7, esta homología es especialmente notable, y va acompañada por un fuerte ligamiento de sus genes.

Un cuarto grupo lo constituyen C3, C4 y C5, homólogas entre sí y a otras proteínas, de las que el representante más notable es la α_2 -macroglobulina (A2M), un inhibidor sérico de proteasas [1, 56]. Con excepción de C5, todas tienen en común la presencia de un tioéster interno, que les confiere la capacidad de unión covalente a determinados sustratos. Las tres proteínas muestran cierta semejanza en cuanto a su actividad: todas presentan, tras su activación proteolítica, una capacidad de unión metaestable a ligandos, lo que comparten con la A2M; el péptido liberado tras su activación (C3a, C4a y C5a), tiene actividad de anafilatoxina, lo que les diferencia del inhibidor. Todas tienen un origen común, que probablemente sea el ancestro de la A2M [76, 83]. Resulta destacable, desde esta perspectiva, la descripción en el artrópodo *Limulus polyphemus* de una A2M, con tioéster y que participa en un sistema hemolítico de este animal [84].

1.5.- ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

Como sistema efector del Sistema Inmune, el complemento participa en diferentes mecanismos encaminados a la mejor destrucción de los agentes patógenos. Ello incluye su intervención en procesos inflamatorios, en la opsonización y fagocitosis de agentes patógenos, en la regulación de la respuesta inmune y en el procesamiento y eliminación de los inmunocomplejos generados durante dicha respuesta. Un mal funcionamiento del Sistema del Complemento, bien por deficiencias genéticas de alguno de los componentes o por activación en situaciones no deseables, constituye un factor importante en la aparición o agravamiento de determinadas patologías. Algunas de estas se relacionan más o menos claramente con funciones conocidas del complemento, mientras que el origen de otras permanece aún oscuro.

Una de las propiedades intrínsecas del Sistema del Complemento es la de generar moléculas que permanecen unidas firmemente a la superficie activadora. Ello hace de éste un sustrato idóneo para la participación en procesos de opsonización [65]. Así lo hace, utilizando para ello receptores específicos presentes en las células fagocíticas, y que median procesos de internalización siempre que la célula esté activada [85]. Este proceso sucede sin la liberación de metabolitos de oxígeno o del ácido araquidónico, como en el caso de los receptores de Fc [86].

Esta peculiaridad es utilizada por algunos microorganismos para entrar en las células que infectan. Éste es sólo un ejemplo de los varios en los que la estrategia de supervivencia de los patógenos implica al Sistema del Complemento. No obstante, la mayoría de ellos suponen sistemas de evasión de la activación o de los efectos de ésta, tales como la lisis, la neutralización o la opsonización [87]. Esto incluye la presencia de protefnas, propias de la bacteria o parásito, o adquiridas del huésped, que regulan la activación. El caso más conocido de interacción entre complemento y patógenos es el del EBV, que infecta a linfocitos B utilizando a CR2 como receptor [66]. Este receptor también parece participar en la infección por el virus HIV-1 [88].

La participación del complemento en la respuesta inmune ha sido, y sigue siendo, materia de controversia [89]. Podemos hablar de dos niveles: uno local, en el que fragmentos de activación, como las anafilatoxinas, pueden afectar a determinadas respuestas celulares [90]; y un nivel más amplio, dentro del cual se incluyen dos actividades. Por un lado, las respuestas mediadas por CR2 cuya interacción con su ligando tiene efectos considerables sobre la activación de células B [91]. Esto lo corroboran, además de la interacción con C3d,g (o C3d), la interacción con EBV, activador bien conocido de células B, así como la identificación de CR2 como posible transductor de señales [69], y su sinergismo con el receptor de antígeno [92]. Por otra parte tenemos la intervención de C3 en la generación de células B de memoria. Así, C3 se uniría a los inmunocomplejos, que quedarían retenidos en los folículos linfoides por las células foliculares dendríticas (FDC), que expresan CR1, CR2 y CR3. En estos folículos, el antígeno sería un estimulador de linfocitos B [64]. El estudio de las deficiencias genéticas [93], y en ocasiones su manipulación [94], ha permitido establecer la existencia de anomalías de la respuesta secundaria de anticuerpos en dichos casos, si bien éstas no siempre son profundas.

Las deficiencias genéticas son una de las causas de las patologías del Sistema del Complemento. Los efectos pueden ser diversos, desde individuos asintomáticos (las primeras deficiencias fueron descritas en dos inmunólogos sanos [95]) hasta muertes fulminantes o infecciones recurrentes, o patologías mediadas por inmunocomplejos. Existe una cierta correlación entre las deficiencias individuales y la patología asociada. Así, las deficiencias de componentes de la vía clásica están asociadas a enfermedades mediadas por inmunocomplejos, como el lupus eritematoso sistémico (LES) [96]. Las deficiencias de la vía alternativa, se asocian fundamentalmente a infecciones recurrentes [96, 97]. Las de C3 pueden estar asociadas a ambas [98, 99]. Las de la fase de ataque a infecciones recurrentes, con especial relevancia por *Neisseria meningitidis* [97]. Las deficiencias de componentes reguladores dan lugar a patologías como la hemoglobinuria paroxística nocturna, deficiencia de CD59 [59], o el angioedema hereditario,

deficiencia de CIINH [60]. Otro aspecto es el de la participación del complemento en procesos en los que inicialmente no está implicado. Tal es el caso del infarto de miocardio, en el que la muerte celular inicial libera restos celulares capaces de activar el complemento, produciendo la lisis de células colindantes [100] y aumentando el daño inicial. Se ha comprobado que inyectando una molécula de CR1 soluble, que tiene una gran capacidad inhibidora de la activación, reduce la superficie necrosada en un 44% [101].

1.6.- EL TERCER COMPONENTE DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

C3 es una β -glicoproteína sérica [102], presente a una concentración de alrededor de 1 mg/mL. Constituye el eje funcional alrededor del cual gira todo el Sistema del Complemento, dado que es esencial para las dos vías de activación, al ser el punto en el que ambas confluyen. Lo es también en virtud a su multifuncionalidad, que se refleja por su interacción con un gran número de proteínas, tanto solubles como de membrana.

1.6.1.- ESTRUCTURA

C3 consta de dos cadenas polipeptídicas [103, 104] unidas por un puente disulfuro [105, 106]. Su estructura se recoge en la Figura 1.2, que incluye los fragmentos derivados de su activación y posterior procesamiento, que serán objeto de sucesivos capítulos. C3 se ha identificado en varias especies de vertebrados, incluyendo los ciclóstomos, los vertebrados vivos más primitivos. En humanos, tiene un peso molecular de 185kDa, siendo los de las dos cadenas 115 y 75kDa para α y β , respectivamente [107], conteniendo ambas oligosacárido [108]. Se conoce la secuencia, total o parcial, de C3 humano [109], de ratón [110, 111], conejo [112], cobaya [113], *Xenopus laevis* [114], del ciclóstomo *Eptatretus burgeri* [115] y de la lamprea *Lampetra japonica* [116]. La homología de estas secuencias con la de C3 humano oscila entre un 30% de *E. burgeri* y el 78% de ratón.

Lamentablemente, se desconoce la estructura tridimensional por difracción de rayos X de la molécula completa, aunque sí se conoce la del fragmento C3a generado en el proceso de activación. Se trata de un polipéptido de 77 aa, con estructura muy compacta, estabilizada por tres puentes disulfuro y que consta de dos hélices α conectadas por un bucle [117].

Los datos de que se dispone de estructura secundaria de C3, por difracción circular, muestran una proteína con un 35% de estructura β y un 10% de hélice α [118]. En lo referente

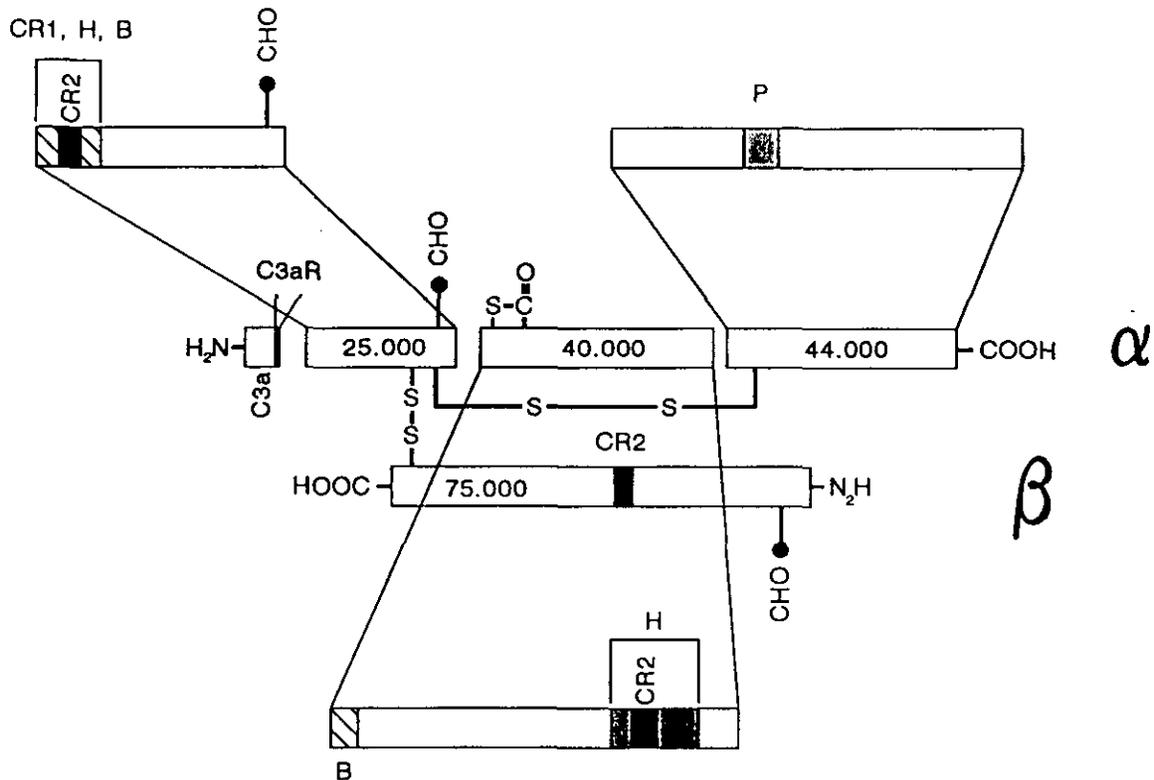


Figura 1.3 Localización de los diferentes sitios conocidos de interacción de C3 con sus ligandos.

a su forma, datos obtenidos por microscopía electrónica [119] o por dispersión de neutrones, presentan a una molécula que consta de dos dominios, de forma similar a C4 y C5, donde el dominio mayor corresponde a C3c y el menor a C3d [120].

La localización de las regiones de C3 responsables de la interacción con distintos ligandos, se ha realizado utilizando fragmentos de la proteína, péptidos sintéticos, y en algunos casos por mutagénesis dirigida. Algunos de estos datos se apoyan también en la comparación de las secuencias de C3 de distintas especies, dado que muchas de las regiones asignadas están altamente conservadas [121]. De estos estudios, resumidos en la Figura 1.3, se deduce, por un lado, que algunos de los ligandos de C3 tienen varios puntos de interacción con la molécula. Por otra parte, existen regiones de C3 en las que coinciden los sitios de unión de varios de estos ligandos en áreas muy próximas, aunque no necesariamente coincidentes [122]. Tal es el caso de la región N-terminal de α', donde confluyen los sitios de unión de CR1 y los factores H y B. Esto es apoyado por la existencia de homologías internas en la secuencia de C3 [121], algunas de las cuales coinciden con sitios de interacción, como el caso de CR2 [123]. También se ha sugerido un segundo sitio de unión con factor B, los residuos 955-964, por comparación de C3c, inactivo, con el fragmento activo semejante de C3 generado por una proteasa de cobra, que es capaz de

formar la C3 convertasa. Aún se mantiene, no obstante, la incógnita de los puntos de interacción de algunos ligandos, como C5, o el caso de CR3. En este último, se sugirió inicialmente al segmento que comprende los residuos 1383-1399, según la numeración de la referencia [109], que contiene la secuencia Arg-Gly-Asp [124], característica de los ligandos de varias integrinas. No obstante, estudios recientes de mutagénesis dirigida, en los que se reemplazó esta secuencia y otros residuos próximos, parecen desmentir esta hipótesis [125].

Finalmente, en la molécula de C3 existe un enlace tioéster, formado entre los residuos del fragmento C3d Cys¹⁰¹⁰ y Gln¹⁰¹³; este último está codificado como Gln, pero pierde el grupo -NH₂ durante la síntesis del tioéster.

1.6.2.- EL GEN DE C3

1.6.2.1.- ESTRUCTURA DEL GEN Y SÍNTESIS DE C3

La síntesis mayoritaria de C3 tiene lugar en el hígado [126], siendo los hepatocitos los responsables. También monocitos, y células endoteliales y epiteliales son importantes a este respecto [126]. C3 es una proteína cuya concentración sérica llega a incrementarse en un 50% en la fase aguda de procesos inflamatorios [126]. Los factores que pueden incidir en este aumento incluyen a interleuquina-1, factor de necrosis tumoral (TNF), glucocorticoides, interleuquina-6 o interferón- γ [127].

C3 es sintetizado como un precursor de una sola cadena, denominado pre-pro-C3. Éste incluye el péptido señal, de 22 aa, y su estructura está ordenada NH₂- β - α -COOH [128]. Entre las cadenas β y α presenta cuatro residuos de Arg; éstos, igual que el péptido señal, son eliminados durante el proceso de maduración de la proteína. La existencia de estos precursores de cadena sencilla es común a otras proteínas del complemento, como C4, C5 o factor I [56]. El procesamiento del precursor también incluye la síntesis del tioéster, realizada por una enzima específica, ausente en células en las que no hay síntesis de C3 [129], y que se ha sugerido que sea una transglutaminasa [130]. Se ha propuesto también que la conformación de C3 favorecería la generación espontánea del enlace, lo que se ha visto ratificado, al demostrarse que la hidrólisis de este enlace por amoníaco, que genera de nuevo la Gln, es reversible [131].

El gen de C3 en humanos se encuentra en el brazo corto del cromosoma 19 [145], y está ligado a los grupos sanguíneos LW y Lutheran, a los genes de la distrofia miotónica, al de la

peptidasa D [132] y a los de proteínas implicadas en el transporte lipídico plasmático [133]. En ratón el gen de C3 se encuentra en el cromosoma 17, igual que el sistema H-2, pero fuera de él [134].

La estructura del gen de C3 humano se ha caracterizado recientemente [135-137]. El gen está compuesto por 41 exones, que oscilan entre 52 y 312 pares de bases. Los intrones son de tamaños muy variables, entre 82 y 4400 bp. Se han identificado secuencias posiblemente implicadas en la regulación de la expresión, incluyendo "TATA-" y "CAAT-boxes", y potenciadores de la transcripción ("enhancers"). En ratón existen varias "TATA-boxes", aunque al parecer sólo una es funcional [138], además de elementos muy similares a los que constituyen los sitios de unión de factores de transcripción, como NF κ B o C/EBP, y que son responsables del efecto de las interleuquinas 1 y 6 sobre la expresión de C3 [138]. La distribución de los exones coincide adecuadamente con los sitios de unión sobre la proteína; así el punto de hidrólisis de la C3 convertasa coincide con el punto de unión de los exones 17 y 18, mientras que otros sitios de unión, incluyendo al tioéster, se han localizado generalmente en exones individuales. La distribución de los exones es notablemente similar a las de C4 y C5, y algo menos a la de la A2M [126]. Esta correlación entre los exones y los distintos sitios de unión apoya la hipótesis de que los exones codifican unidades funcionales de las proteínas [77].

1.6.2.2.- BASES MOLECULARES DEL POLIMORFISMO Y DE LA DEFICIENCIA DE C3

C3 es una proteína polimórfica, con dos alotipos predominantes C3S y C3F, y otras variantes minoritarias [139]. Estas variantes se han definido por su movilidad electroforética, denominándose según su movilidad relativa a la distancia entre C3S y C3F1, que se toma como unidad [140]. De los alotipos mayoritarios, C3S es el más abundante, alrededor de 0,8 de frecuencia en caucásicos, 0,95 en negros y prácticamente 1 en asiáticos [139]. Recientemente también se ha definido un nuevo polimorfismo con un anticuerpo monoclonal, sin que se aprecien diferencias de carga; una sustitución de T por C en el exón 9, que cambia una Leu por una Pro en la cadena β es responsable de la diferente reactividad con este anticuerpo [141]. Entre C3S y C3F la única diferencia está en un cambio de C a G en el exón 3, cambiando el residuo Arg de C3S por uno de Gly en C3F [141]. Por lo demás, no parece que haya diferencias apreciables entre los distintos alotipos en cuanto a su actividad hemolítica [142].

En la actualidad se han descrito 19 casos de deficiencias genéticas de C3 humano [97]. Ninguno de ellos está libre de infecciones recurrentes [143], de patologías mediadas por

inmunocomplejos [99, 144] o de ambas [146]. Las infecciones más frecuentes están provocadas por *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*. Estos cuadros clínicos son similares a los que presentan deficiencias genéticas de factor H o de factor I, y que dan lugar a deficiencias secundarias de C3, debidas a un consumo incontrolado de la vía alternativa [97]. El papel central de C3 en la activación del Sistema del Complemento, así como los efectos de los fragmentos producidos durante su activación sobre la respuesta inmune, la fagocitosis y eliminación de patógenos y el procesamiento de inmunocomplejos, explican porqué la deficiencia de C3 tiene efectos tan dramáticos. También se han identificado deficiencias genéticas de C3 en cobayas, conejos y perros [147].

En el caso de algunos pacientes se ha detectado en suero actividad hemolítica de C3 residual [147]. Es posible que en estos casos el defecto esté en la regulación de la síntesis, pues se ha visto que monocitos de dos pacientes deficientes producían C3 a una velocidad del 20 al 30% de lo normal [147]. Una explicación alternativa sería que, dado que dímeros covalentes de C4b, en ausencia de C3, pueden generar actividad de C5 convertasa [36], y como los ensayos realizados en estos estudios utilizan la vía clásica, estos dímeros sean responsables de la aparente actividad de C3.

La base molecular de la deficiencia de C3 en un paciente, cuyo gen no estaba ausente, resultó tener lugar en el sitio donador en 5' para el procesamiento del RNA (se reemplaza el par GT por un AT no funcional). El resultado es un mRNA que carece de un fragmento de 61 nucleótidos correspondientes a este exón, y que contiene una señal de terminación de la transcripción [148]. Ello concuerda con la ausencia total de C3 en este paciente. También en cobayas se ha estudiado la base molecular de una deficiencia si bien los resultados son sorprendentes, dado que la secuencia es completamente normal; el defecto radica en la incapacidad de sintetizar el tioéster interno, lo que genera una molécula inactiva y muy sensible a la degradación proteolítica [113]. Curiosamente estas cobayas tienen niveles funcionales normales de C4 y A2M.

1.6.3.- ACTIVIDAD

1.6.3.1.- EL PROCESO DE ACTIVACIÓN

La activación de C3 por las convertasa de cualquiera de las dos vías se produce por la escisión de un enlace peptídico: el Arg⁷⁴⁸-Ser⁷⁴⁹ [104]. Ello da lugar a C3a, que contiene los 77

aa del N-terminal de la cadena α , y C3b, que consta de la cadena β intacta y del resto de la α , denominada ahora α' (Figura 1.2) [103]. Merced a esta hidrólisis, se producen una serie de cambios en la conformación de la molécula, que son responsables de la adquisición de las funciones propias de C3b, funciones inexistentes en C3 nativo. Entre estas funciones se incluye la de unión covalente a superficies aceptoras por la aparición de un grupo carbonilo reactivo, fruto de la hidrólisis del tioéster producida como consecuencia de la activación. También aparece la capacidad de interacción con factor B, C5, factor H y CR1, entre otros. Estas funciones también las adquiere cuando se hidroliza el tioéster de C3 nativo, sin que tenga lugar ningún ataque proteolítico.

Estos cambios no se reflejan apenas en el contenido de estructura secundaria, tal y como se estima por dicroísmo circular en el ultravioleta (UV) lejano [118]. Los cambios de estructura terciaria son más apreciables, según dicroísmo en UV próximo [149]. La activación también supone la exposición en la superficie de regiones hidrofóbicas, no expuestas en C3, tal y como se demuestra por el aumento de la fluorescencia del ácido 1-anilino-8-naftalénsulfónico (ANS) y por espectroscopía de diferencia en UV [149], así como por su retención en una columna de fenil-Sepharose [150]. Por estudios de dispersión de rayos X o de neutrones también se han detectado cambios en la forma de la molécula, en donde C3 tratado con metilamina, que hidroliza el tioéster, tiene una forma más elongada que C3, aunque la magnitud de estos cambios es controvertida [151, 152].

Los cambios conformacionales producidos al hidrolizar el tioéster, por tratamiento con agentes nucleófilos, y que son similares a los que se producen al activar C3, se han correlacionado con la adquisición de las propiedades funcionales semejantes a las de C3b [48]. Los cambios de estructura tridimensional son más lentos en el caso de hidrólisis nucleófila del tioéster que en el de activación proteolítica. Lo que es más interesante, en especial en lo que se refiere al papel de C3(H₂O) en la activación de la vía alternativa, es que en estos cambios se adquiere primero la capacidad de unir factor B ($t_{1/2} = 5,45$ min.), mucho antes que la de unión de factor H ($t_{1/2} = 35-40$ min.). Así, existe un intermediario, con una vida media de 30 min., que puede unir factor B y no factor H, lo que implica la existencia de una C3 convertasa de iniciación, no inhibible por factor H, durante un tiempo suficientemente largo como para iniciar eficientemente la vía alternativa [48].

La utilización de antisueros policlonales y anticuerpos monoclonales ha permitido una mayor caracterización de estos cambios conformacionales [153]. Mediante esta técnica, además,

se ha podido estudiar la conformación de los fragmentos de C3 unidos a superficiesceptoras, en comparación con los mismos fragmentos solubles, algo que no se puede hacer por las técnicas anteriores. La exposición en C3b de regiones ocultas en la molécula nativa se ha comprobado al demostrar que anticuerpos monoclonales que reconocen a fragmentos de C3, y que no unen a la molécula nativa, sí lo hacen a C3(H₂O) [154]. También anticuerpos, poli- y monoclonales, obtenidos frente a C3 desnaturalizado, no interaccionan con C3 y sí con C3b o fragmentos de degradación de éste [155]. Algunos de los determinantes reconocidos por estos anticuerpos se han asignado a regiones funcionalmente relevantes de C3b [153]. Más importante, existen diferencias entre los fragmentos solubles y los unidos a superficiesceptoras. Así, por ejemplo, C3b unido conserva el determinante B, presente en la proteína nativa, pero ausente del fragmento soluble [156]. También algunos anticuerpos monoclonales, obtenidos frente a C3 desnaturalizado, reconocen a los fragmentos unidos pero no a los solubles [157].

1.6.3.2.- EL ENLACE TIOÉSTER DE C3, C4 Y α_2 -MACROGLOBULINA

Cuando C3 es activado por una C3 convertasa fijada sobre una superficie, se genera C3b que es capaz de unirse covalentemente a dicha superficie. La sensibilidad a hidroxilamina de este enlace, y la cinética de esta hidrólisis, llevaron a proponer que sería un éster [158, 159]. También la actividad hemolítica de C3 es sensible a este reactivo nucleófilo [160], por lo que se propuso que la reacción sería de transesterificación, lo que implicaba la existencia de un enlace éster dentro de C3 [159]. En efecto, durante la activación de C3, aparte de los cambios conformacionales indicados, se produce la hidrólisis de un enlace tioéster dentro de la molécula, que genera un grupo carbonilo altamente reactivo; esta forma de C3b se denomina C3b*. La vida media de este carbonilo es extremadamente corta, del orden de 60 μ seg [161]. Este carbonilo puede reaccionar con el agua circundante, dando lugar a C3b soluble, o puede hacerlo con grupos -OH de superficiesceptoras, para formar un enlace éster; aunque en menor medida, también puede reaccionar con grupos -NH₂ para formar enlaces amida [162, 163].

La existencia del tioéster se sugirió por varios motivos: por una parte al activarse C3, o al inactivarlo con reactivos nucleófilos, se liberaba en la molécula un grupo -SH, ausente en la forma nativa [164, 165]. Dicha hidrólisis presentaba una dependencia de pH semejante a la de tioésteres sintéticos [166], y generaba tras tratamiento con NH₂OH un derivado del ácido hidroxámico [167]. Además, este sulfidrilo estaba próximo en la secuencia, dentro del fragmento C3d, al grupo carbonilo que participaba en la reacción de transesterificación (Figura 1.4) [168]. También se observó que al incubar C3 a elevadas temperaturas, y en presencia de agentes

desnaturalizantes, se producía una hidrólisis del enlace peptídico entre el residuo Glu anterior al que aporta el carbonilo del tioéster y éste que, después de la reacción, quedaba como ácido piroglutámico [169]. Dicha reacción es compatible con este tipo de enlace [170]. Estas reacciones también tienen

	1002	* *	1126
C3 ^{HU}	HLIVTPSGCGEQNMIGMTP	[...]	DAPVIH
C3 ^{MU}	-----A-----	[...]	-G----
C3 ^{CN}	-----G-----A--H	[...]	-----
C3 ^{GP}	---I-----	[...]	-G----
C3 ^{EB}	N--LRL-R-----MYTSI	[...]	SK--V-
C3 ^{LJ}	N--QI-T-----K-A-	[...]	-G----
C4A ^{HU}	S-LRL-R-----T--YLA-	[...]	PC--LD
C4B ^{HU}	S-LRL-R-----T--YLA-	[...]	SI----
C4 ^{MU}	S-LRL-Q--A--T--YLA-	[...]	PC----
S1p ^{MU}	S-LRL-RS-A--T--YLA-	[...]	PC----
A2M ^{HU}	N-LQM-Y-----VLFA-	[...]	SGSLLN
C5 ^{HU}	I-THL-K-SA-AELMSVV-	[...]	NSQYQP

Figura 1.4 Secuencias de C3, C4, C5 y A2M de diversas especies que incluyen el tioéster y que participan en su reactividad. El * marca los dos residuos que forman el enlace.

lugar en C4 y en la A2M [171], para las que se sugirió igualmente la existencia de un tioéster. Las tres proteínas presentan homología estructural, especialmente en esta región de la molécula [172]. También se ha comprobado que enzimas que forman enlaces tioéster como intermediarios de la reacción, como es el caso de las CoA transferasas, sufren fragmentación autocatalítica, de forma similar a C3, cuando se somete al intermediario a temperaturas elevadas en presencia de agentes desnaturalizantes [173]. La síntesis de una tiolactona de 15 eslabones, que incluye la secuencia de C3, ha confirmado que esta región es compatible con la existencia de un enlace tioéster [174]. Finalmente, reducción con borohidruro sódico del enlace de C3 dió lugar a productos característicos de un enlace tioéster del tipo β -Cys- γ -Glu [175].

La reactividad del tioéster de C3 es notablemente distinta de la de tioésteres sintéticos. En la molécula nativa, el enlace es altamente estable, con una velocidad de hidrólisis a 37°C de 0,2-0,4%/hora [47], mientras que los sintéticos tienen una vida media mucho más baja, del orden de 10 minutos [176]. Sin embargo, cuando C3 es activado, la forma C3b* es altamente inestable, con una vida media de tan sólo 60 μ segundos [161]. Se ha sugerido que en la molécula nativa el tioéster está oculto, en un entorno hidrofóbico, que lo protegería de la hidrólisis [161]. Tras la activación, los cambios conformacionales que acaecen llevarían a la exposición de este enlace, que sería ahora sensible a ataques nucleófilos [161]. Para explicar su alta reactividad, se ha sugerido la presencia de una cadena lateral en las proximidades, que actuaría como catalizador. Dado que los grupos imidazoles aceleran la hidrólisis de tioésteres sintéticos [177], se ha propuesto que esta cadena lateral sería el grupo imidazol de una histidina [175]. Precisamente un residuo de His parece implicado en la selectividad del enlace formado por C3 y C4B (His¹¹²⁶ en la Figura 1.4). Las proteínas que forman enlaces éster (C3 y C4B), presentan His en esta

posición, mientras que en las que forman enlaces amida, C4A [178] y A2M [179] está reemplazada por otro residuo [180]. Mutagénesis de C4B en esta posición, reemplazando el residuo His por el Asp de C4A o por Ala, dió como resultado moléculas que, tras activarse, formaban enlaces amida [181]. La A2M presenta un residuo Asn en esta posición, y forma predominantemente enlaces amida [179]. Esta His también se ha implicado en la supuesta actividad esterasa de C3b, por la cual el propio C3b catalizaría su liberación de la superficie aceptora merced a la actividad "catalítica" de este residuo [182]. También se ha implicado al residuo Glu¹⁰¹², que precede al de Gln que aporta el carbonilo del tioéster, en la reactividad de éste [183]; estudios recientes por mutagénesis dirigida del tioéster de C3 han demostrado que la sustitución de este Glu por Gln supone la incapacidad de la molécula de sintetizar el enlace [184]. Otra particularidad de C3 radica en su interacción con Ser libre. Dicha reacción tiene lugar en dos pasos, en el primero de los cuales se forma un enlace éster con el hidroxilo de la cadena lateral. En el segundo, tiene lugar un cambio O→N, formando finalmente un enlace amida [185].

El tioéster forma una tiolactona de 15 eslabones [170], incluida en una cavidad hidrofóbica de 12-20 Å de profundidad [171], y que parece estar formando parte de un giro brusco, teniendo una estructura plana (Figura 1.5) [168, 175]. El tioéster también interviene en el mantenimiento de la estructura tridimensional de la molécula. No obstante, los cambios conformacionales son más lentos cuando se produce la hidrólisis del tioéster que en el

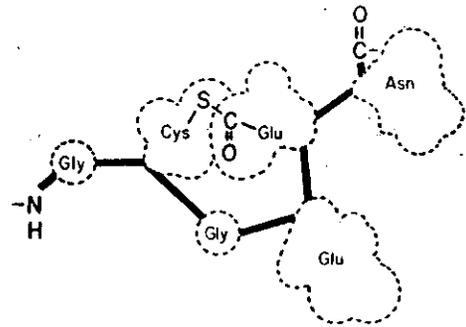


Figura 1.5 Estructura del enlace tioéster [168].

proceso de activación proteolítica [48] y, en el caso de A2M, no se completan hasta que no se produce ataque proteolítico [3]. La relación entre la estructura nativa y el tioéster se ha comprobado con la A2M, en la que la estructura nativa se congeló por reacción con agentes de entrecruzamiento; cuando se activó proteolíticamente, no se produjo la hidrólisis del tioéster hasta que no se destruyeron los entrecruzamientos [3]. No obstante, existen datos que sugieren que el tioéster puede no ser indispensable para mantener la conformación nativa de la molécula. Por un lado, C5, que carece de tioéster, presenta una estructura similar a la de C3, y se activa de forma análoga [186]. Por otra parte, estudios de mutagénesis dirigida de C3, en los que se eliminó el tioéster, dieron lugar a moléculas de estructura similar a C3, y que eran sustratos de la C3 convertasa, algo exclusivo de C3 nativo, lo que ha replanteado de nuevo el papel del tioéster en la conformación nativa de C3 [184].

1.6.4.- INACTIVACIÓN Y FUNCIONALIDAD DE LOS FRAGMENTOS GENERADOS

Al igual que ocurre con cada una de las etapas de activación del Sistema del Complemento, C3b, y de forma semejante C3(H₂O), está sujeto a fuertes sistemas de control. Todos se basan en la degradación proteolítica de la cadena α' , generando fragmentos hemolíticamente inactivos [187, 188]. La excepción a la regla la constituye la liberación espontánea de C3b de las superficiesceptoras a la que nos hemos referido anteriormente [182], y que no implica degradación proteolítica alguna.

El primer paso supone la ruptura de dos enlaces peptídicos de la cadena α' (Figura 1.2) [188], liberando un fragmento de 2kDa, C3f. El resto de la molécula, iC3b, contiene el grupo carbonilo y queda, por tanto, unido a la superficie aceptora. Consta de la cadena β y de dos fragmentos de la cadena α' , uno de 65kDa ($\alpha 65$), el *N*-terminal, y otro de 44kDa ($\alpha 44$). Esta ruptura la lleva a cabo factor I, utilizando como cofactor al factor H o a CR1 [189]. La segunda ruptura afecta a un enlace peptídico situado hacia el *N*-terminal del tioéster, generando dos fragmentos. Uno de ellos, C3d,g, de unos 40kDa, contiene el carbonilo, y permanece unido a la superficie aceptora [190]. El otro fragmento, C3c, se libera de la superficie y consta de la cadena β , y los fragmentos $\alpha 44$, común a iC3b, y otro de 25kDa ($\alpha 25$), todos unidos por puentes disulfuro. Esta ruptura es realizada por factor I, utilizando como cofactor a CR1 [26]. También pueden actuar como cofactores factor H, aunque a baja fuerza iónica, CR2 y el virus de Epstein-Barr [26]. Posteriores degradaciones, como la escisión de C3d,g en C3d y C3g, por escisión de un enlace peptídico 9 residuos hacia el *N*-terminal de la Cys¹⁰¹⁰, sólo se han descrito *in vitro*, con tripsina por ejemplo, no en condiciones fisiológicas [191]. No obstante, en situaciones patológicas, se podrían generar fragmentos activos distintos a los vistos.

La degradación proteolítica de C3b supone la pérdida de su funcionalidad hemolítica. Dicha pérdida viene acompañada por cambios conformacionales, detectados por variaciones en la antigenicidad de la molécula [157], en su movilidad electroforética [192] y en los parámetros espectroscópicos [193]. La inactivación incluye la desaparición y aparición de sitios de interacción de algunos de los ligandos de C3. Un caso especialmente ilustrativo lo constituyen los sitios de factor H y CR2. Ambas moléculas presentan múltiples sitios de unión. En la región comprendida entre los residuos 1209-1271, coinciden uno de factor H y otro de CR2; el primero es discontinuo, incluyendo en su discontinuidad al segundo. Se ha sugerido que en C3b el sitio de factor H es funcional, mientras que el de CR2 está oculto; la aparición de iC3b desplegaría esta región, desbaratando el sitio de factor H, y haciendo accesible el de CR2 [194].

La inactividad hemolítica de los fragmentos generados no implica que éstos sean inertes. Se ha tratado anteriormente del papel de C3b e iC3b en procesos de opsonización, o del de C3d,g como regulador de la respuesta inmune [195]. También la anafilatoxina C3a tiene un papel bien caracterizado en la respuesta inflamatoria [74, 75] y en la regulación de la respuesta inmune [90], papel corroborado por su conservación a lo largo de la evolución, puesto que está presente en C3 de ciclóstomos [115]. Aparte de éstos, existen otros fragmentos derivados de C3 para los que se han identificado funciones específicas, C3e y C3f.

C3e se identificó como un fragmento de C3c, de unos 11kDa, que inducía leucocitosis en conejos [196]. Posteriormente se identificó un fragmento, denominado C3d-K, obtenido por digestión con kalikreína de iC3b, que tenía propiedades semejantes, además de inhibir la respuesta proliferativa de células T, y que difería de C3d,g en la presencia de un nonapéptido procedente del fragmento $\alpha 25$. Un péptido sintético con esta secuencia provocaba la misma respuesta. Es probable que esta secuencia constituya el principio activo, que sería común a C3d-K y a C3e [197]. Su funcionalidad está avalada por la incapacidad de algunos individuos deficientes de C3 de inducir leucocitosis [143], y por su presencia en el suero de pacientes con activación del Sistema del Complemento [197]. Recientemente se ha identificado a C3f como agente espasmogénico, que utilizaría como receptor al de C3a e, igual que éste, se inactivaría al eliminar la Arg C-terminal [198]. También recientemente se ha identificado a la cadena β de C3 como el inhibidor sérico de la citotoxicidad de eosinófilos [199]. Dicha actividad, que es la única conocida de la cadena β , aparte de su papel estructural en la molécula de C3, sólo la exhibe la cadena β , y no cualquier fragmento, como C3c, que contenga restos de la cadena α [199].

1.7.- EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO E INMUNOCOMPLEJOS

La interacción entre un anticuerpo y un antígeno específico desencadena una serie de respuestas efectoras, respuestas que no tienen lugar cuando el anticuerpo está libre. Una de éstas respuestas es la activación del Sistema del Complemento. Ésta puede tener lugar a través de las dos vías de activación. La clásica es activada por IgM e IgG, mientras que la alternativa lo es por IgG e IgA, si bien esta última con baja eficiencia.

1.7.1.- LA MOLÉCULA DE ANTICUERPO Y LA FORMACIÓN DE INMUNOCOMPLEJOS

Una representación de la estructura de la IgG se recoge en la Figura 1.6, donde se incluyen también algunas de las rupturas proteolíticas más relevantes. Esta estructura es generalizable a otras clases, aunque el número de dominios de la región constante, y la ausencia o presencia, así como el tamaño, de la región bisagra ("hinge") varía de unas a otras. Todas las clases constan de dos cadenas pesadas y dos ligeras. Por digestiones proteolíticas, la molécula se dividió en dos fragmentos. Uno el Fab, del que hay dos por molécula de anticuerpo, y que contiene el sitio antígeno combinante (región variable); consta de la cadena ligera y del Fd, compuesto por los dominios variable (V_H) y $C\gamma_1$, primer dominio constante, de la cadena pesada. El segundo fragmento se denominó F_c , del que existe uno por molécula, en el que se localizan las funciones efectoras: los sitios de interacción con receptores celulares, con C1q y con la proteína A de *Staphylococcus aureus*. Consta de un dímero de los dominios $C\gamma_2$ y $C\gamma_3$, incluyendo el primero un carbohidrato, que se interpone en la región de contacto entre los dos $C\gamma_2$. La región bisagra constituye el nexo flexible que une estos dos fragmentos, y en el que se

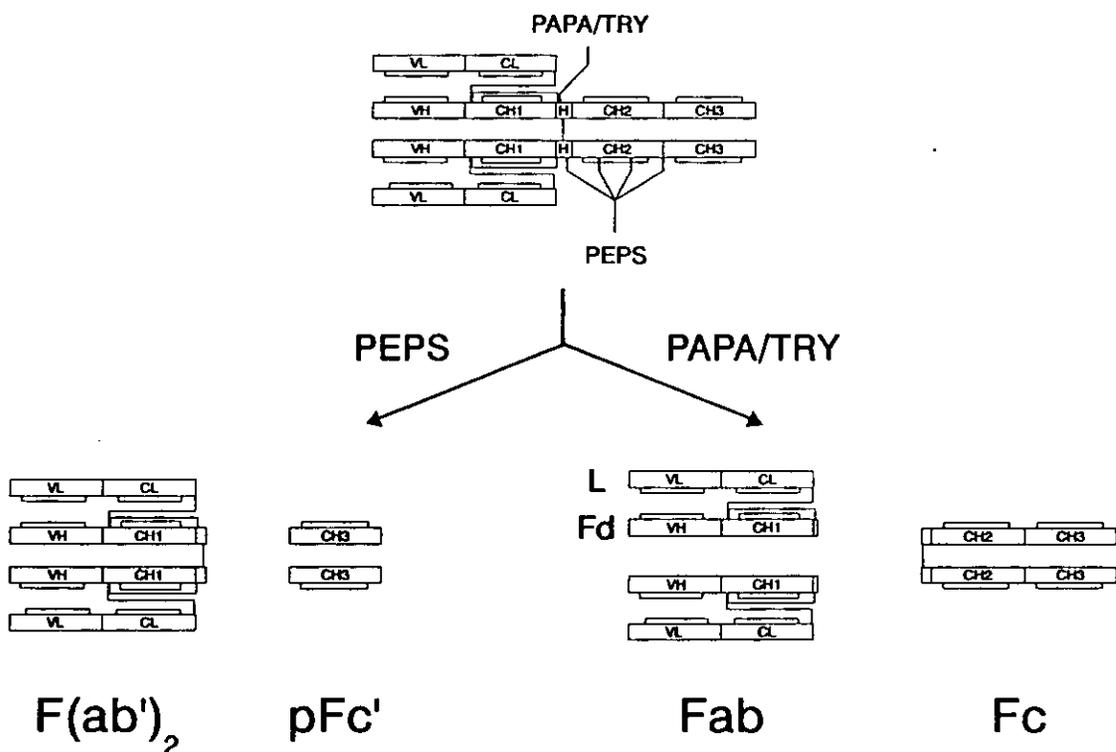


Figura 1.6 Esquema general de la estructura de la IgG, incluyendo algunas rupturas proteolíticas de interés.

encuentran las Cys responsables de la unión por disulfuro entre las dos cadenas pesadas. Esta región consta de tres partes: alta, media y baja [200]. La bisagra media contiene los residuos de Cys que forman los puentes disulfuro antes aludidos y es muy rígida; en el caso de IgG de conejo, esta región consta de una única Cys. La baja es la más próxima al Fc y es flexible. La alta bisagra es la próxima a las regiones Fab, y es la región más flexible. En la molécula se han identificado zonas hidrofóbicas expuestas, que se ha sugerido que participan en las interacciones específicas de los anticuerpos [201]. Cada uno de los dominios aludidos presentan un patrón de plegamiento común, que consiste de dos hojas β apiladas y giradas, unidas covalentemente por un puente disulfuro intracatenario [202].

El antígeno es el segundo componente de los inmunocomplejos (IC). El único punto en común que existe entre los distintos tipos de antígenos es el de su capacidad de unir anticuerpos, respondiendo a su definición etimológica de aquella sustancia capaz de producir una respuesta de anticuerpos. Incluye esta definición a bacterias, células eucariotas, partículas virales, ADN o proteínas. La interacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ab) presenta una serie de características de interés. Al considerar éstas, así como la activación de respuestas efectoras, es necesario tener en cuenta que dicha interacción no supone cambios conformacionales profundos ni en antígeno ni en anticuerpo [203]. En el caso de proteínas la interacción supone, en un determinado intervalo de relación molar Ag/Ab, la precipitación de los complejos [204]. Existe un punto en que la totalidad de Ag y Ab precipitan, denominado punto de equivalencia; fuera de él, en exceso de antígeno o de anticuerpo, parte de éstos queda en el sobrenadante. Otro punto relevante es el de máxima precipitación, producido en un ligero exceso de Ag, en el que, para una cantidad constante de anticuerpo, la cantidad de precipitado formado es máximo [204]. La precipitación se debe, en buena medida, a interacciones de carácter hidrofóbico distintas de las Ag-Ab y en las que interviene el Fc [205, 206]. La reacción tiene lugar en tres etapas, que responden a dos mecanismos de precipitación [207]: en la primera se forman los IC por la combinación de Ag y Ab. En la segunda, se forman precipitados debidos exclusivamente a estas interacciones (primer mecanismo). En la tercera etapa se forman grandes precipitados mediados por interacciones Fc-Fc, también denominadas interacciones secundarias (segundo mecanismo). Los IC formados con IgG utilizan ambos mecanismos, mientras que los formados con el fragmento divalente $F(ab')_2$, que carece de Fc, utilizan sólo el primero. Se ha propuesto que una región hidrofóbica expuesta en la interfase de los dominios $C\gamma_2/C\gamma_3$ participaría en esta reacción [208].

1.7.2.- INTERACCIÓN ENTRE INMUNOCOMPLEJOS Y EL SISTEMA DEL COMPLEMENTO

Cuando el complemento es activado por IC, algunos componentes de este sistema se unen a los complejos. En función del isotipo integrante de los IC, estos pueden activar por la vía clásica, por la alternativa, o por ambas. La activación por la vía clásica supone la unión no covalente de C1 y la covalente de C3 y C4 a los complejos. Cuando es la vía alternativa la activada, sólo tiene lugar la unión de C3. Además de éstas, otros componentes se unen a los IC a través de los componentes mencionados, como properdina, Bb, factor H, C2a, y otras proteínas séricas, como la fibronectina y la α_2 -macroglobulina [209].

El resultado fisiológico final es la eliminación de estos IC del torrente sanguíneo, fundamentalmente en hígado y, con interés funcional, en bazo. Ello elimina el potencial patológico de estos IC, manifestado en las enfermedades en las que esta eliminación es defectuosa [210, 211]. En el tubo de ensayo, los efectos del complemento se manifiestan en dos reacciones: la de inhibición de la precipitación de complejos Ag-Ab formados en presencia del complemento (IP) y el de solubilización de IC preformados (SOL). Ambas reacciones tienen en común, además de la producción de IC solubles, que ésta es debida a la unión covalente de componentes del complemento, fundamentalmente C3 [212].

1.7.2.1.- SOLUBILIZACIÓN DE INMUNOCOMPLEJOS

De los dos procesos experimentales, fue el primero en ser descrito. En 1975 Miller y Nussenzweig [213] demostraron que IC incubados con suero fresco a 37°C eran solubilizados, y que esta solubilización dependía exclusivamente de la vía alternativa. Dado que los complejos solubles presentaban C3 unido, y que fragmentos Fab (monovalentes) que reconocían al anticuerpo integrante del IC producían el mismo efecto, propusieron que la incorporación de componentes del complemento, monovalentes en su interacción con el anticuerpo, como lo es C3, serían los responsables de la solubilización. Es lo que se denominó hipótesis de la intercalación. Apoyando dicha hipótesis, se comprobó que fragmentos de anticuerpos específicos de las regiones Fab o Fc de la inmunoglobulina integrante del IC tenían un comportamiento diferente según fueran monovalentes (Fab o Fab' solubilizan) o divalentes ($F(ab')_2$ inhibe la solubilización) [214]. El carácter indispensable de la vía alternativa en este proceso se ha demostrado por varios métodos; de ellos, el más contundente fue el que demostró la solubilización a partir de los componentes (C3, factores B, D, H e I y properdina) purificados [215]. Se ha comprobado

también que la properdina es esencial para la culminación del proceso de solubilización [216, 217]. En cuanto al papel de la vía clásica se ha comprobado que, si bien no es indispensable, aumenta la velocidad del proceso [214] y la cantidad total de IC solubilizados [218]. Ello es debido a que su activación, más rápida, aporta las primeras moléculas de C3b unido al IC, que sirven de sustrato para la fase de amplificación de la vía alternativa [216]. Este efecto es particularmente importante en exceso de antígeno, donde la solubilización es menos efectiva [219]. La solubilización tiene lugar en tres etapas [217]. La primera de ellas, dependiente de complemento, supone la formación de la C3 convertasa de la vía alternativa sobre los IC. La segunda, también dependiente del complemento, corresponde a la fase de amplificación, incluyendo la fijación de grandes cantidades de C3 sobre el IC. En la tercera etapa, independiente de complemento y espontánea, se produce la reorganización de los IC que conduce a su solubilización.

Las interacciones que se ven afectadas por la unión de C3 parecen ser las dos presentes en los IC. Por una parte los IC preparados con IgG son solubilizados con mayor eficiencia que los preparados con F(ab')₂, que carece de la región Fc. C1q y proteína A, que se unen al Fc de forma polivalente, actúan inhibiendo la solubilización, al entrecruzar las moléculas de anticuerpo [220]. Por otra parte IC en los que el Ag y el Ab están unidos por enlaces covalentes no son solubilizados por complemento, por lo que este proceso también implica la destrucción de uniones Ag-Ab [221]. También hay que tener en cuenta que cuanto mayor es la afinidad del anticuerpo integrante de los IC, mayor es la dificultad para solubilizarlos [214].

1.7.2.2.- INHIBICIÓN DE LA PRECIPITACIÓN

Esta reacción fue descrita en 1980 por Schifferli, Bartolotti y Peters [222]. Cuando Ag y Ab, en una relación Ag/Ab en la que se produciría precipitación, se mezclaban en presencia de un suero fresco, no se producía precipitación. Esta inhibición tenía lugar en ausencia de la vía alternativa, pero era absolutamente dependiente de la vía clásica [223]. Esto último también se ha demostrado con componentes purificados [224]. Cuando la incubación continuaba a tiempos largos, la vía alternativa se hacía esencial para el mantenimiento de la solubilidad de los complejos, entrando en juego, con toda probabilidad, el fenómeno de solubilización. La IP, al igual que SOL, está mediada fundamentalmente por la unión covalente de C3, quedando la de C4 exclusivamente como factor necesario para la generación de la C3 convertasa [224, 225]. Este proceso atraviesa por diferentes etapas. En la primera tiene lugar un suceso paradójico: C1 actúa en las primeras fases manteniendo la solubilidad de los complejos [224]. Ésto contrasta con el

efecto de C1q, tanto aquí como en SOL, que favorece la precipitación. En la segunda etapa, la unión de C4 permite la formación de la C3 convertasa y la incorporación de C3 a los complejos. Finalmente, la vía alternativa entra en escena, solubilizando los complejos insolubles que se forman al final del proceso [222].

El proceso de IP tiene, con toda probabilidad, mayor relevancia fisiológica que el de SOL. En condiciones normales Ag y Ab siempre entran en contacto en presencia del complemento. La excepción la constituyen los casos de deficiencias de componentes de la vía clásica, con elevada frecuencia asociados a patologías mediadas por IC [226]. También es significativo que la IP produce menor cantidad de anafilatoxinas que SOL, en especial C5a, la de mayor potencia. Por ello, su poder inflamatorio es menor [227]. Se puede ver, de esta forma, a IP como el mecanismo normal de procesamiento de IC, y al de SOL como una salida de emergencia con mayor potencial patológico, y que serviría para eliminar IC persistentes o refractarios al proceso de IP.

Los complejos generados por cualquiera de los dos procesos son de un tamaño menor que el de partida, aunque heterogéneo [218, 228], y han perdido la capacidad de activar las dos vías [218], si bien son capaces aún de unirse a receptores específicos de fragmentos de C3 [229] y en, el caso de IP, también a proteína A [229].

1.7.2.3.- ELIMINACIÓN DE INMUNOCOMPLEJOS DEL TORRENTE SANGUÍNEO

El mecanismo fisiológico de eliminación de IC del torrente sanguíneo permanece aún oscuro, aunque aparentemente responde a dos mecanismos distintos, que parecen basarse cada uno de ellos en las reacciones de IP y de SOL. Se sabe lo que ocurre *in vivo* cuando se inyectan IC preformados en humanos [230] y en primates no humanos [231]. Estos IC activan el complemento, como consecuencia de lo cual se unen a la superficie de los eritrocitos, a través del receptor de C3b CR1. Estos IC son eliminados de forma eficiente fundamentalmente en hígado y bazo. No obstante, existe un porcentaje elevado de IC que no se unen a los eritrocitos y que son eliminados por el hígado con gran rapidez y en órganos específicos [232]. Se ha comprobado que en casos en los que los IC no pueden unirse a eritrocitos, como el caso de IC formados con IgA [233] o en pacientes de LES que tienen reducido el número de CR1 [230], estos IC son eliminados con mayor rapidez. Sin embargo, además de hígado y bazo, que continúan siendo los órganos mayoritarios de captación, se depositan en órganos como riñón, pulmón y cerebro, donde tienen un potencial patogénico evidente. El mismo efecto se ha visto en primates cuyo complemento se había inactivado [234]. Por el contrario, cuando se inyectan antígeno y anticuerpo

por separado, no se detecta unión de los IC a eritrocitos. Sin embargo, son eliminados con normalidad, sin depositarse en tejidos donde tendrían un potencial patogénico.

Como reflejo de estos hechos, se ha comprobado *in vitro* que inmunocomplejos solubilizados se unen con gran eficiencia a eritrocitos, mientras que complejos solubles formados en presencia del complemento no se unen a estas células [235]. Esto puede relacionarse con la mayor cantidad de C3 presente en los primeros [212], y con la distribución en grupos de CR1 sobre la superficie celular [236]. Por ello, el primer mecanismo de eliminación se basaría en el proceso de SOL, mientras que el segundo lo haría en el de IP.

También se ha comprobado que IC sobre los que se ha unido C3 son fagocitados más eficientemente por células fagocitarias que IC no incubados con complemento, dependiendo en gran medida de los receptores de C3, no sólo de los receptores Fc [237, 238]. También se ha observado *in vitro* que los eritrocitos que transportan IC ceden su carga a células fagocitarias [239]. El mecanismo de esta transferencia parece ser pasivo, y se basa en la mayor densidad de receptores de C3 (CR1 y CR3), además de la presencia de receptores de Fc, en las células fagocíticas [240- 242]. Otro proceso observado es aquel por el cual IC unidos a eritrocitos son procesados en la membrana del eritrocito; en esta acción, los IC son liberados por la acción de factor I utilizando a CR1 como cofactor, para volver a unirse a través de otras moléculas de C3b que se unen al IC [243, 244]. El resultado final serán IC solubles y de menor tamaño, y con menor poder inflamatorio. Un resumen de estos procesos se recoge en la Figura 1.7.

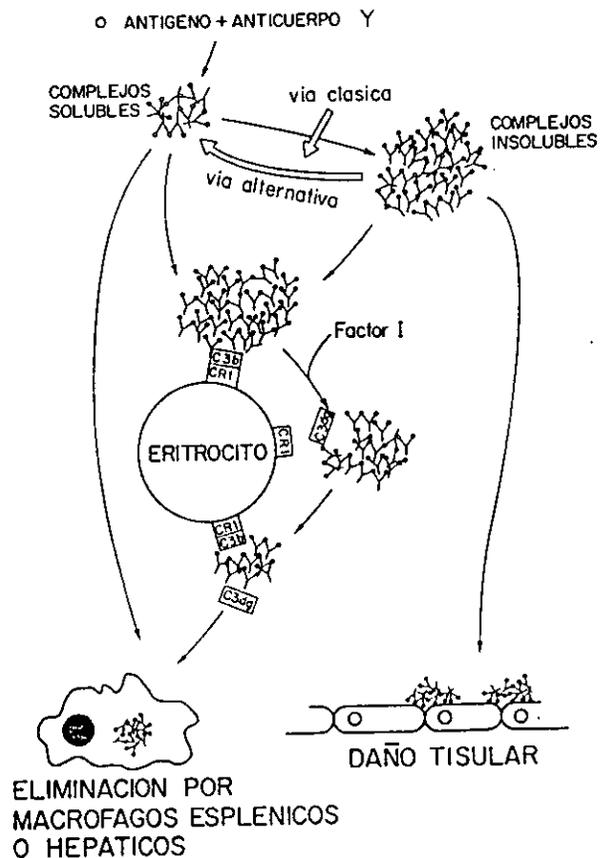


Figura 1.7 Procesamiento y eliminación de inmunocomplejos mediados por el Sistema del Complemento [330].

El resultado final serán IC solubles y de menor tamaño, y con menor poder inflamatorio. Un resumen de estos procesos se recoge en la Figura 1.7.

El mecanismo general que parece desprenderse supone que cuando los IC se forman en la sangre, el complemento los mantiene solubles, y favorece su eliminación en órganos específicos. Cuando alguno de los IC precipita, la vía alternativa actúa, permitiendo su unión al eritrocito. El eritrocito toma el papel de portador de IC potencialmente patogénicos, impidiendo que se depositen riñón o pulmón, y que produzcan daño tisular [210]. El eritrocito sí permitirá la transferencia a células fagocíticas, como las células de Kupffer en el hígado. En el caso de otros animales, en los que los eritrocitos carecen de moléculas receptoras de C3, este papel parece estar desempeñado por las plaquetas, que sí poseen este tipo de receptores [245].

Una prueba del papel del CR1 presente en eritrocitos la constituye el bajo número de estos receptores en pacientes con patologías mediadas por IC. Esta reducción es consecuencia de la enfermedad, y suele estar asociada a sus fases agudas. Este descenso parece estar relacionado con la activación del complemento por los IC presentes en la superficie y, más concretamente, a la unión de C3 a la membrana del eritrocito, como consecuencia de esta activación [246].

Finalmente, los IC procesados por la acción del complemento, pueden participar en la localización del antígeno en los folículos linfoides. El proceso estaría mediado por las células foliculares dendríticas, que expresan receptores de C3 y unifican a los IC con C3, reteniéndolos. Es en estos folículos donde se generarían células B de memoria, cuya producción óptima se ha asociado a la presencia de un C3 funcional y a su asociación con IC [64].

1.7.3.- FORMACIÓN DE COMPLEJOS COVALENTES ENTRE C3 E INMUNOCOMPLEJOS

En los apartados anteriores se han expuesto los efectos de la activación del complemento sobre inmunocomplejos, atribuyendo estos efectos fundamentalmente a la formación de complejos covalentes con C3. Su unión tiene lugar por ambas vías, y se ha demostrado su presencia en complejos solubles producidos por SOL y por IP. En el caso de la vía clásica, su unión está precedida por la de C4, también de carácter covalente. De los dos isotipos de C4, es C4A el que presenta mayor eficiencia de unión a IC [247], para el caso de antígenos proteicos, formando enlaces amida con la cadena pesada del anticuerpo, en la región Fd [18], y con la cadena ligera [248]. De hecho C4A es más eficiente que C4B en el proceso de IP [249]. Cuando se trata de superficies celulares, C4B es más eficiente, pero forma enlaces éster con la membrana [247].

Cuando C3 es activado por la vía clásica, tiene un comportamiento semejante al de C4,

salvo por la formación de enlaces éster. Cuando se trata de un antígeno proteico, durante el proceso de IP forma enlaces covalentes con la cadena pesada del anticuerpo [250]. Cuando se trata de eritrocitos, C3 se une mayoritariamente a la célula, aunque también se fija al anticuerpo [251]. Cuando se trata de bacterias, C3 se une al anticuerpo, a través de las dos cadenas de éste, la pesada y la ligera [252].

En el caso de la vía alternativa, la situación es diferente. Como se vió al hablar de esta vía, la protección de las moléculas de C3b de la acción de los factores H e I es lo que hace de una determinada superficie un activador. En el caso de los IC, se ha descrito que complejos C3b-IgG son más resistentes a la inactivación que C3b soluble [253], mientras que esta protección es superada por CR1 [254], lo que tiene especial importancia en la eliminación de IC, como vimos en el apartado anterior. Ésto ha llevado a pensar que C3 interacciona con la molécula de anticuerpo a través de un único sitio, que sería responsable de la protección de C3b. La formación de complejos covalentes entre C3 y la cadena pesada de IgG, así como entre complejos $F(ab')_2$ y este componente [255], junto con la capacidad de este fragmento del anticuerpo de activar la vía alternativa [256], y de convertir a células no activadoras en activadoras [257], han llevado a sugerir que C3 se une al anticuerpo a través del Fd. En este sentido, se ha descrito recientemente que la interacción entre C3 e IgG1 humana agregada por calor tiene lugar en un segmento comprendido entre los 20 últimos residuos de la región V_H y los 20 primeros del dominio $C\gamma_2$ [258]. Una evidencia indirecta en favor de esta hipótesis la constituye la unión de C3b a C4b, que parece tener lugar a través de un único sitio [259], si bien ambas reacciones no son comparables en algunos aspectos. Mientras que los dímeros C4b-C3b, o C3b-C3b, tienen una función definida como C5 convertasa, que requiere una ordenación tridimensional concreta, la función del C3b unido al IC no requiere dicha ordenación. Según la hipótesis de la intercalación, C3 actuaría como inhibidor estérico de interacciones Ag-Ab y Fc-Fc. También se ha comprobado que mutantes de C4b incapaces de unir C3 covalentemente sí pueden formar la C5 convertasa por asociación no covalente, lo que ha sugerido la posibilidad de la existencia de una interacción específica no covalente previa a la formación del enlace éster [259]. Por otra parte, se ha demostrado la interacción no covalente entre C3 nativo y C3b formado previamente y los fragmentos Fab y Fc [260]. Esta interacción es capaz de mediar la inhibición de la precipitación, pero no la solubilización. Este hecho sintoniza con el hecho de que la cantidad de C3 unida necesaria sea mayor para alcanzar la solubilización que para inhibir la precipitación [212].

Por otra parte, se ha demostrado también la unión de C3, además de al anticuerpo, al antígeno [261, 262] en complejos formados con IgG y antígenos proteicos, ocurriendo igual en

procesos de solubilización [263]. En este caso, la forma de C3 presente en los complejos es mayoritariamente iC3b, uniéndose a aminoácidos del anticuerpo, y no a los azúcares [263]. En apoyo de la existencia de múltiples sitios de unión está el caso de la α_2 -macroglobulina, que se une a algunas de las proteasas que inactiva a través de diferentes residuos [264]. No hay que olvidar, finalmente, que la unión de C3 actúa como regulador negativo de la activación de C1 [37] y que en el proceso de solubilización, la destrucción de las interacciones Fc-Fc juega un papel primordial, por lo que la hipótesis de un único punto de unión, localizado en el Fd, no está cerrada.

2.- OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS

Dada la relevancia que la unión de C3 tiene sobre la solubilidad y destino final de los inmunocomplejos, nos planteamos el análisis molecular de esta interacción, con el fin de elucidar el mecanismo que subyace a los efectos mencionados. Para ello nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1) Determinar si la unión de C3 se produce exclusivamente en el fragmento Fd de la cadena pesada o si, por el contrario, otras regiones de la molécula, particularmente el Fc, son substratos de esta interacción.
- 2) Delimitar los dominios de la molécula de anticuerpo sobre los que C3 se une covalentemente tras la activación de la vía alternativa.
- 3) Identificar residuos que sean potenciales aceptores de C3 y estimar su importancia en los efectos estudiados.
- 4) Evaluar el posible efecto que la unión de C1q pueda tener sobre la unión de C3 sobre el anticuerpo, en particular sobre las regiones que se pueden ver afectadas por la unión de este subcomponente.

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.- MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.- MATERIALES

Los reactivos generales utilizados fueron habitualmente de Merck, Sigma o Fluka. El reactivo para la modificación de Cys (2-bromoetilamina) se compró a Fluka. La tripsina de páncreas bovino, el inhibidor de tripsina de soja, la papaína de *Papaya latex*, la pepsina de estómago porcino y la ovoalbúmina (Grade V) se adquirieron a Sigma. Los isótopos radioactivos se obtuvieron de Amersham: iodo[1-¹⁴C]acetamida (53-57 mCi/mmol) y ¹²⁵I (16,6mCi/mmol). Los líquidos de centelleo utilizados fueron FÓRMULA 989 y AQUASOL de New England Nuclear y ULTIMA GOLD, de Packard. Los reactivos para la electroforesis en geles de poliacrilamida fueron de Bio-Rad, salvo el β -mercaptoetanol y el Azul de Coomassie que se adquirieron a Sigma. Los geles de cromatografía se compraron a Pharmacia-LKB (CNBr-Sepharose CL-4B, Proteína A-Sepharose, Sephadex G-25, CM- y DEAE-Sephadex, Ultrogel AcA 54 y 44), y a BioRad (Bio-Gel P-2, P-4 y P-6, Bio-Rex 70, Chelex 100 y Cellex D). El FPLC y las columnas utilizadas (Mono S, Mono Q y Superdex 75) fueron de Pharmacia-LKB. El HPLC y las columnas (μ Bondapak C18 y Novapak C18), se obtuvieron de Waters-Millipore. Los reactivos del HPLC empleados, aquellos de calidad adecuada a este fin, fueron de Scharlau, Merck y Fluka. El agua utilizada en este caso se obtuvo de un sistema de filtración MILLI-Q (Millipore); para el resto el sistema fue un MILLI-RO, del mismo proveedor. Los reactivos del secuenciador se adquirieron a Applied Biosystems. El plasma destinado al aislamiento de proteínas se obtuvo del Banco de Sangre de la Fundación Jiménez Díaz.

3.2.- MÉTODOS GENERALES

3.2.1.- ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Las electroforesis en geles de poliacrilamida, en presencia de SDS (EGPA-SDS), se realizaron según el método de Laemmli [265], utilizando distintas concentraciones, homogéneas o en gradiente, de acrilamida. Las cubetas utilizadas fueron PROTEAN I, PROTEAN II y MIGHTY SMALL de BioRad y de Hoeffer. Las muestras se redujeron antes del desarrollo de la electroforesis; para ello, se hirvieron en presencia de β -mercaptoetanol al 3% (v/v). La electroforesis se desarrolló a corriente constante, de 20 mA durante el gel de concentración y

30mA en el de resolución. En casos en los que el desarrollo se realizó durante la noche, la intensidad fue de 6-8 mA. Los geles se tiñeron con azul Coomassie 0,014% , en peso, en ácido acético:metanol:agua (2:7:10) en volumen, y se destiñeron con ácido acético:metanol:agua (1:4:10). En los geles se incluyeron patrones de peso molecular conocido, con el fin estimar el peso molecular relativo (Mr) de las muestras. En las Figuras de RESULTADOS los valores de estos patrones, en kDa, se indican en los márgenes o entre las muestras. Los geles se secaron después de incubarlos durante 4 horas en una solución de metanol al 30% y glicerol al 3% en agua, ambas relaciones en volumen.

En caso de cargar muestras marcadas radioactivamente con ^{14}C , la fluorografía de los geles se realizó según el método de Bonner y Laskey [266], que incluye difeniloxazol (Carlo Erba) (PPO) como fluoróforo. Los geles, una vez secos, se revelaron en placas X-Omat S de Kodak, a -80°C durante períodos variables de tiempo.

3.2.2.- PREPARACIÓN DE SOPORTES PARA CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD

El método de preparación se escogió en función del volumen de lecho a preparar. Se utilizó CNBr-Sepharose CL-4B para volúmenes pequeños. Cuando los volúmenes eran grandes, se utilizó Sepharose CL-4B, que se activó con CNBr (Scharlau).

En el primero de los casos se siguieron las instrucciones del fabricante. La proteína a acoplar se lleva a una concentración de 6 mg/mL en el tampón de acoplamiento. Una vez finalizada la reacción, los grupos libres se saturaron con etanolamina 1 M pH 9,0. El nivel de incorporación fue siempre superior al 90% del material añadido. En el segundo caso, se siguió el método descrito [267], saturando la Sepharose CL-4B con Gly (BioRad) 1 M pH 8,0.

3.2.3.- PREPARACIÓN DE INMUNOCOMPLEJOS

Los inmunocomplejos utilizados en estos estudios se prepararon a partir de ovoalbúmina (OVA) e IgG específica anti-OVA.

3.2.3.1.- OBTENCIÓN DE ANTISUEROS

Los antisueros se obtuvieron en conejos New Zealand por inmunización intramuscular. El antígeno se inyecta en emulsión con adyuvante completo de Freund en las patas posteriores del

animal. Tras seis inyecciones, a razón de una por semana, en la séptima semana se sangra a los conejos de la vena marginal de la oreja. Para la obtención del suero, la sangre se incuba durante una hora a 37°C y toda la noche a 4°C, tras lo cual se retira el coágulo y se recoge el suero; los restos celulares se eliminan centrifugando a 2000xg durante 15 min. El proceso continúa después mediante inmunizaciones y sangrados en semanas alternas. Los antisueros se almacenan a -20°C.

3.2.3.2.- PREPARACIÓN DE IgG ESPECÍFICA

Los antisueros se precipitaron con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2M. El precipitado, resuspendido y dializado frente a fosfato sódico (NaPi) 20 mM pH 7,6, se cargó en una columna de 300 mL de Cellex D, equilibrada en el mismo tampón. Se recogió la fracción no retenida, que contiene el anticuerpo. La columna se regeneró con NaCl 1 M. La IgG específica se obtuvo por cromatografía de afinidad en una columna de OVA-Sepharose 4B, equilibrada en fosfato sódico (NaPi) 10 mM pH 8,0. El anticuerpo retenido se eluyó con trietilamina 100mM pH 11,5; con el fin de neutralizar el pH, a estas fracciones se les añade NaPi 1M pH 6,8 en una relación 1:5 (v:v), y se dializan inmediatamente frente a PBS. EL coeficiente de extinción a 280nm utilizado para la IgG fue un $E^{1\%}$ de 14,0.

3.2.3.3.- CURVA DE PRECIPITINAS

Los IC se prepararon en el punto de máxima precipitación. Para obtener este punto, se mezclaron cantidades crecientes de antígeno con cantidades constantes de anticuerpo. Los IC se lavaron con PBS (NaPi 10mM, NaCl 140mM pH 7,2), por centrifugación a 11900xg durante 5 min. Tras ello, se disuelven en NaOH 0,1 M, y se lee la absorbancia a 280 nm. La relación que da el nivel de absorbancia más alta se utiliza en la preparación de los IC para los ensayos. El coeficiente de extinción $E^{1\%}$ a 280nm de la OVA es de 7,35.

3.2.4.- ENSAYOS HEMOLÍTICOS

Los ensayos hemolíticos de C3 [268] y de factor D [269] se realizaron según métodos descritos. El primero de ellos por la vía clásica, con hematíes de carnero y hemolisina (antisuero específico de eritrocitos de carnero), mientras que el segundo por la alternativa, con hematíes de conejo.

En ambos casos se partió de sueros deficientes en el componente a detectar, denominados

RX, a los que se suplementaba con las muestras que se deseaba analizar. El suero R3, deficiente en C3, se obtuvo por incubación, repetidas veces, con zimósán, activador tradicional de la vía alternativa, y que deja la clásica inalterada, con la excepción de C3 [270]. La dilución de suero empleada en los ensayos se determinó previamente, y fue la menor que producía una lisis espontánea inferior al 5%. El suero RD, carente de factor D, se obtuvo por cromatografía de un suero, al que previamente se añade EDTA hasta una concentración 20mM, en Bio-Rex 70. La fracción no retenida se recogió, y fue la utilizada como RD. Este suero es también deficiente en C1q, si bien esto no afecta al ensayo hemolítico, dado que éste utiliza la vía alternativa. Esta circunstancia hizo de este suero una fuente de complemento en algunos experimentos de interacción de C3 con IC.

3.2.5.- MARCAJE RADIOACTIVO

Los marcajes con ^{125}I , tanto de C3 como de IgG y OVA, se realizaron según el método de McConahey y Dixon [271] y C1q por el que utiliza la peroxidasa [272]. La actividad específica obtenida de C3 fue de $5\text{-}8 \times 10^5$ cpm/ μg , de IgG anti-OVA 1×10^5 cpm/ μg , de OVA 5×10^4 cpm/ μg y de C1q $4\text{-}6 \times 10^5$ cpm/ μg . Previamente al marcaje C3 se repurificó por FPLC.

3.2.6.- CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

Algunas muestras se analizaron por HPLC de fase reversa, usando un equipo de Waters. Se utilizaron dos sistemas, ambos en una columna $\mu\text{BondaPak C18}$ (0,39x30 cm). En el primero, la columna se equilibró en acetato amónico pH 6,5. Tras el lavado, los péptidos se eluyeron con un gradiente lineal de 55 minutos, hasta alcanzar un 30% de acetonitrilo, con un caudal de 1,5 mL/min, recogiendo fracciones de 0,6 mL. Inmediatamente antes y después del gradiente, se recogieron 20 fracciones en las condiciones iniciales y finales, respectivamente. Finalmente, la columna se lavó con 100% de acetonitrilo, recogiendo otras veinte fracciones. Se contaron alcuotas de las fracciones con el fin de identificar los picos radioactivos.

El segundo sistema utilizado fue el siguiente: la columna se equilibró en ácido trifluoroacético (TFA) 0,16% (v/v), y los péptidos retenidos se eluyeron con un gradiente lineal, de 55 min, hasta un 60% de acetonitrilo, que contenía 0,1% de TFA, lavándose finalmente con un 100% de esta mezcla. El caudal fue en este caso de 1 mL/min, recogándose fracciones de 0,6 mL. Con el fin de identificar los picos se procedió de igual manera que en el caso anterior, contando alcuotas de las fracciones.

3.2.7.- ANÁLISIS DE AMINOÁCIDOS

Una alícuota (30 μ g, \sim 0,2nmol de proteína) de los experimentos en los que IgG (150kDa) se había reducido y aminoetilado o carboxamidometilado, se separó para realizar análisis de aminoácidos. Se pretendía así, cuantificar el número de aminoetil-Cys (AE-Cys) presentes en cada molécula de anticuerpo, y compararlo con el de 9,5 original obtenido por Givol [273]. El análisis se realizó según método descrito [274]. Previamente se inyectó en el analizador una muestra de AE-Cys (Sigma) que sirvió de patrón para identificar el tiempo de retención, que resultó ser idéntico al de la Lys. Para la cuantificación se asumió un factor de color de la AE-Cys inferior en un 9% al de Lys [275]. Para cuantificar la AE-Cys presente en la proteína modificada, los resultados obtenidos con IgG anti-OVA aminoetilada (IG-BE) se refirieron a los obtenidos con el mismo anticuerpo carboxamidometilado con iodoacetamida (IG-IA). Se promedió la relación IA/BE de todos los aminoácidos, a excepción de Pro, His, Met y Lys (ver resultados). La relación de Lys entre IG-IA e IG-BE se utilizó para calcular la AE-Cys en la IG-BE, según la fórmula:

$$AEC = (LYSBE - LYSIA / X) / 0,91$$

donde AEC corresponde a los nmoles de AE-Cys presentes en la IG-BE, LYSBE a la cantidad de Lys en IG-BE, LYSIA, a esta misma en IG-IA, X al promedio de las relaciones IA/BE, y el valor 0,91 es el valor del factor de la AE-Cys respecto al de Lys [275]. El valor AEC, referido a la cantidad de IG-BE nos da el número de residuos de AE-Cys por molécula de IgG.

3.2.8.- SECUENCIACIÓN DE PÉPTIDOS Y PROTEÍNAS

3.2.8.1.- TRANSFERENCIA A MEMBRANAS DE PVDF A PARTIR DE GELES DE EGPA-SDS

En algunos casos, la electroforesis se utilizó como paso previo a la determinación de la secuencia de aminoácidos, siguiendo básicamente, con diversas modificaciones, el método original de Matsudaira [276]. En primer lugar, el agente de entrecruzamiento, N,N'-Metilén-bis-acrilamida (MBA) fue reemplazado por piperazín diacrilamida (PDA), en la misma proporción en peso que aquella [277]. La utilización de dicho agente supone una mejora, tanto de la resolución como del rendimiento obtenido en la secuencia. Los geles se prepararon la tarde anterior al día en que se

desarrolló la electroforesis. Los geles se sometieron, antes de cargar las muestras, a 10mA durante 45-60 min, con el fin de eliminar restos de monómero [278]. Para el desarrollo, en el tampón de la cubeta superior se incluyó ácido tioglicólico (Merck) 0,002% como antioxidante [279]. La electroforesis se desarrolló en las condiciones especificadas en el apartado 3.2.1., utilizando minigeles.

Una vez concluida la electroforesis, los geles se transfirieron a membranas PROBLOTT™ (Applied Biosystems), del tipo de las de difluoruro de polivinilideno (PVDF) utilizadas habitualmente. Las membranas PROBLOTT™ presentan una mayor eficiencia de transferencia y mayor capacidad de la primera membrana (véase más adelante) que las de PVDF (IMMOBILON-P™, Millipore) [280]. La transferencia se realizó según el método semiseco, en un sistema NOVABLOTT™ (Pharmacia-LKB), con electrodos planos de grafito. El tampón de transferencia utilizado fue 10mM ácido 3-ciclohexilamino-1-propano-sulfónico (CAPS) (Pierce), pH 11,0 que contenía 10%, en volumen, de metanol. Este se preparó diariamente, a partir de una solución madre de CAPS 100 mM pH 11,0. Los geles se sumergieron en el tampón de transferencia durante 10-15 minutos. En este tiempo, se acoplaron sobre el electrodo positivo 7 hojas de papel Whatmann 3MM, de un tamaño ligeramente superior al del gel y previamente humedecidas en el tampón de transferencia. Dos membranas PROBLOTT™, de un tamaño idéntico al del gel, que se habían sumergido previamente en metanol puro y se habían incubado después durante 5 minutos en tampón de transferencia, se colocaron sobre los papeles Whatmann. Sobre éstas se situó el gel, y sobre él, otras siete hojas de papel Whatmann 3MM. Una vez finalizada esta operación, se montó el sistema de transferencia, y se realizó ésta, aplicando una intensidad de 0,8mA/cm².

Finalizada la transferencia, las membranas se sumergieron en metanol y se tiñeron, durante 1 minuto, con azul de Coomassie R-250 0,1% (en peso) en metanol al 40% y ácido acético al 1%, ambos en volumen. Tras ello, se destiñeron con metanol al 50%. Finalmente, las membranas se lavaron extensivamente con agua, se sometieron a vacío en un desecador, durante 30 minutos, y se almacenaron así durante una noche. Las bandas de interés, se cortaron con un bisturí, y se guardaron a -20°C en tubos Eppendorf, en los casos en los que no se secuenciaron inmediatamente. Todas las soluciones se prepararon con agua Milli-Q y con reactivos de HPLC.

La secuencia se llevó a cabo en un secuenciador de fase gaseosa [281], modelo 470A (Applied Biosystems), que automatiza la degradación de Edman. Para la secuencia, la membrana de fibra de vidrio (GFF), se trató con polibreno, y se sometieron a tres ciclos de lavado (programa 03RPRE del fabricante) antes de cargar las membranas. Las bandas de proteína

transferida se cortaron en trozos pequeños (del orden de 2x4mm) y se depositaron formando una monocapa, evitando que solapen unos sobre otros, entre la pieza superior del cartucho del secuenciador y el GFF, tal y como se recoge en la Figura 3.1. El cartucho completo se instaló en el secuenciador, y se llevó a cabo la secuencia, según el programa 03RPTH del fabricante. Este programa se modificó periódicamente, para ajustar los volúmenes de solventes y tiempos de secado a los apropiados para la secuencia.

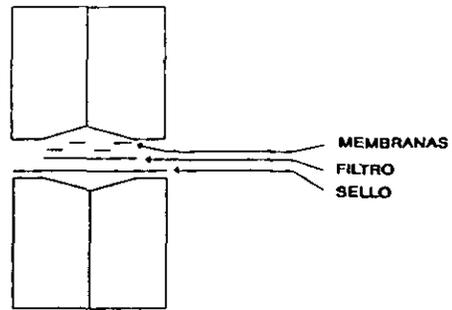


Figura 3.1 Disposición en el cartucho del secuenciador de las membranas de ProBlott.

En estas mismas condiciones del secuenciador se analizaron algunas muestras procedentes de cromatografías de HPLC.

3.2.8.2.- ANÁLISIS DE LAS FENILTIOHIDANTOÍNAS

Las feniltiohidantofnas (PTH) obtenidas del secuenciador se analizaron en un cartucho NOVAPACK™ C18 (0,39x15 cm), detectando a 254 nm, y siguiendo el método de Hunkapiller [282].

3.2.8.3.- SECUENCIA RADIOQUÍMICA

Algunos de los picos radioactivos, procedentes del marcaje de C3 con iodo[1-¹⁴C]acetamida obtenidos en cromatogramas de HPLC o de penetrabilidad, se secuenciaron en el secuenciador 470A, siguiendo, igual que con membranas, el programa 03RPTH del fabricante. En aquellos casos en los que el péptido a secuenciar se encontraba en cantidades muy bajas, se añadieron a la muestra 5-10 nmoles de OVA, como "carrier". Las fracciones obtenidas para cada uno de los ciclos se cuentan con el fin de identificar la posición, respecto del N-terminal, en que se encuentra la Cys en la que se incorporó el marcaje.

3.2.8.4.- NUMERACIÓN DE RESIDUOS EN LAS SECUENCIAS DE IgG Y C3

En el caso de C3 se siguió la numeración de preproC3, según la secuencia de aminoácidos deducida a partir de la de nucleótidos del cDNA [109]. En el de la IgG la numeración siguió la

de EU, un mieloma IgG1 humano, tomado habitualmente como referencia [283]. Esta secuencia presenta en la región bisagra algunos residuos ausentes en la IgG de conejo, lo que explica algunos saltos en la numeración de las secuencias identificadas en los resultados.

3.3.- AISMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Durante los procesos de aislamiento, la proteína se identificó por ensayo hemolítico e inmunodifusión, según el método de Ouchterlony [284], utilizándose como criterios de pureza inmunoelectroforesis y EGPA-SDS.

3.3.1.- AISLAMIENTO DE C3

C3 se purificó a partir de plasma fresco, según el método de Sim *et al.* [161]. Posteriormente, las formas activas e inactivas de C3 se fraccionaron por FPLC, [285]. La purificación consistió, brevemente, en precipitación fraccionada con polietilenglicol (PEG 4000), cromatografías sucesivas en DEAE-Sephadex A50 y CM-Sephadex C50, y un paso final de purificación por FPLC en una columna de Mono Q HR 5/5.

C3 se almacenó a -80°C hasta su utilización. La concentración se calculó por absorbancia a 280 nm, utilizando un $E^{1\%}$ de 9,7 [107].

3.3.2.- PREPARACIÓN DE ^{14}C -C3(NH₂OH)

Las muestras de C3, antes del marcaje con iodo[1- ^{14}C]acetamida, se repurificaron por FPLC según el apartado anterior. Tras ello, se siguió el método de Janatova *et al.* [164]. Brevemente, las muestras se dializaron frente a NaPi 0,1M pH 7,0, tras lo cual se añadió NH₂OH 1M en el mismo tampón, en una relación 1:1 en volumen, y iodocacetamida (IA), a una concentración final de 10mM, y que incluía 12,5 μCi de iodo[1- ^{14}C]acetamida. La mezcla se incubó durante 1 hora a 37°C . La IA caliente se eliminó por diálisis inicial frente a PBS que contenía IA fría 20mM, y posterior diálisis frente al tampón requerido. La actividad específica obtenida fue $2\text{-}3 \times 10^5$ dpm/mg, y la proteína presentaba marcaje exclusivamente en su cadena α .

3.3.3.- FACTOR D

Factor D se purificó por una modificación del método de Lesavre *et al.* [269], y se repurificó por FPLC. Se siguió, brevemente, el siguiente esquema: el sobrenadante de una precipitación de suero humano normal con 1,3-diaminopropano (DAP) se cargó en una columna de Bio-Rex 70. Tras eluir con un gradiente de fuerza iónica, se cargó la mezcla de fracciones que contenían factor D en una columna de Ultrogel AcA 54. Las fracciones que presentaban actividad hemolítica, se repurificaron finalmente por FPLC. La columna utilizada fue una Mono S HR 5/5, equilibrada en Tris [Tris(hidroximetil)aminometano]/HCl 20mM pH 7,4, que contenía NaCl 100mM. El factor D se eluyó con un gradiente lineal de NaCl, hasta una concentración final de 500mM.

Este método comparte el primer paso con el aislamiento de C1q: el precipitado obtenido tras la diálisis frente a DAP se utilizó para la obtención de este subcomponente. Las fracciones procedentes del BioRex 70 se concentraron por un sistema de ultrafiltración de Amicon, utilizando membranas PM10, hasta 30 mL. Tras ello se ultracentrifugaron a 19000xg en un rotor SW50.1 (Beckman) para eliminar el exceso de lipoproteínas, y se concentraron finalmente hasta 2 mL por presión negativa. Las fracciones de factor D procedentes de la columna de Mono S se dializaron frente al tampón del Ultrogel AcA 54, y se almacenaron a 4°C, siendo estable en estas condiciones durante meses. El EDTA presente en la muestra no interfirió con los ensayos funcionales, dado que el volumen de factor D añadido, en relación al volumen total del ensayo, era muy pequeño. La concentración de factor D se calculó por $A^{280\text{nm}}$, utilizando un coeficiente $E^{1\%} = 10,9$ [286].

3.3.4.- C1q

Este componente fue obtenido por Guillermo Marqués, siguiendo el protocolo descrito [271]. Brevemente, el precipitado del DAP del apartado anterior se resuspendió y se cargó en un BioRex 70. Tras un gradiente, las fracciones que contenían C1q se concentraron y se cargaron en una columna de Bio-Gel A.5m. Finalmente, se eliminaron los contaminantes restantes por FPLC en Mono S. El C1q obtenido de esta forma se almacenó a -80°C. El coeficiente utilizado de C1q fue $E^{1\%} = 6,9$ [287].

3.4.- INTERACCIÓN ENTRE C3 E INMUNOCOMPLEJOS

3.4.1.- FUENTES DE COMPLEMENTO

Para los ensayos de interacción entre C3 e IC, la fuente de complemento fueron sueros humanos normales procesados de la siguiente forma: primero se incubaron, durante 1 hora con agitación, con Chelex 100, resina quelante de iones divalentes; tras la incubación, se separó la resina, se neutralizó el pH del suero, que se alcalinizó durante la incubación, y se añadió $MgCl_2$ hasta una concentración final de 2-3 mM. A estos sueros se les denominará de aquí en adelante SHN-Chelex. En algunos experimentos, se utilizó suero de conejo como fuente de complemento, en cuyo caso el proceso fue idéntico. En otras situaciones la fuente de complemento fue RD, al que se suplementó con factor D purificado y, en algunos experimentos, también con C1q.

3.4.2.- ENSAYOS DE UNIÓN DE C3 A INMUNOCOMPLEJOS

En los ensayos de interacción, los IC se lavaron con un tampón 10mM Tris/HCl pH 7,2 que contenía 145mM NaCl y que se había quelado en una columna de Chelex 100 (TBS). Tras ello, alcuotas de éstos que contenían 100 μg de anticuerpo, se incubaron con 800 μL de SHN-Chelex, a 37°C durante 15 min. Después de este tiempo se les añadió PBS a 0°C con el fin de detener la activación, y se lavaron repetidas veces con PBS.

En algunos experimentos, se añadió a los IC 5 μCi de iodo[1- ^{14}C]acetamida previamente a la adición de suero. Esto nos permitió marcar C3 radioactivamente en el residuo de Cys¹⁰¹⁰ cuyo grupo -SH forma parte del tioéster interno, y que se rompe al activarse este componente. En estos casos, los IC tras la incubación con SHN-Chelex se lavaron inicialmente con PBS que contenía 40mM de iodoacetamida fría. A los complejos obtenidos de esta forma se les denominará de aquí en adelante (^{14}C)C3-IC.

En aquellos experimentos en los que al suero se añadía previamente ^{125}I -C3, la actividad específica final de C3 fue de 400-500 cpm/ μg . Cuando el suero contenía ^{125}I -C1q, la actividad fue de 400-500 cpm/ μg . En el caso de IC que contienen ^{125}I -OVA o ^{125}I -IgG, la actividad específica fue de 200 cpm/ μg de IC y de 700 cpm/ μg de IC, respectivamente.

Cuando la fuente de complemento utilizada fue un suero RD, a este suero se le añadió factor D hasta alcanzar una concentración final igual a la fisiológica, en ausencia o en presencia

de C1q exógeno.

Los complejos obtenidos se analizaron por EGPA-SDS, generalmente en geles en gradiente de acrilamida del 5 al 15%, y/o cuantificando la radioactividad incorporada, debida a la unión de C3. En otros casos, los complejos se digirieron con enzimas proteolíticas, tal y como se indica en los apartados siguientes.

3.5.- DELIMITACIÓN DE LOS PUNTOS DE UNIÓN DE C3 A LOS INMUNOCOMPLEJOS

3.5.1.- REDUCCIÓN Y AMINOETILACIÓN DE LOS COMPLEJOS

La reducción de IgG con ditioneitol (DTT) y posterior aminoetilación con etilénimina de los residuos de Cys, se ha utilizado para obtener aminoetil-Cys (véase Figura 3.2), sensible a tripsina, si bien la velocidad de hidrólisis es menor que la de Arg o Lys [275]. Esto ha servido para generar en la IgG de conejo, tras digestión con tripsina, los fragmentos Fc y Fab [273, 288]. Se siguió este procedimiento, pero reemplazando la etilénimina, de elevado potencial cancerígeno, por 2-bromoetilamina (2BEA) [289]. La alternativa, iodoetil-trifluoroacetamida, requería condiciones de reacción extremas de pH y temperatura (2 horas, pH 8,6 y 50°C) [290], no recomendables para la estabilidad del aducto C3-IgG.

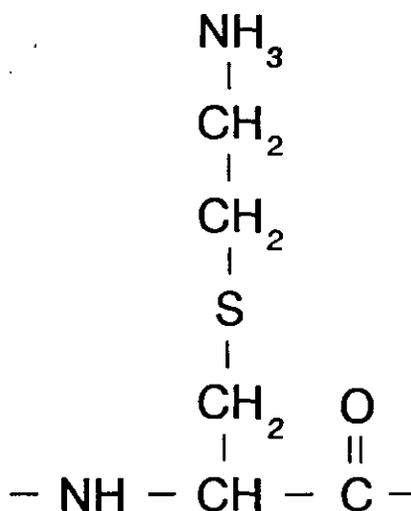


Figura 3.2 Fórmula de la aminoetil-Cys.

La modificación se llevó a cabo de la siguiente forma: IgG purificada, o IC (con o sin C3 unido) se llevaron a una concentración de 1 mg/mL en un tampón Tris/HCl 0,55M pH 8,6 que contenía 5,25mM de EDTA. Se añadió DTT hasta una concentración final de 5mM y se incubó a 25°C durante 1 hora; tras ello se añadió 2BEA, a partir de una solución madre de concentración 2M preparada inmediatamente antes, hasta una concentración de 40mM; como

control, algunas alícuotas se carboxamidometilaron con iodoacetamida 40mM. La reacción se llevó a cabo durante 1 hora, también a 25°C. Tras ello, las muestras solubles se dializaron frente a PBS; los IC o C3-IC se lavaron con este tampón.

Las muestras aminoetiladas, en PBS, se digirieron con tripsina (1 mg/mL en HCl 1 mM), en una relación enzima:substrato (E:S), en peso, de 1:100 ó 1:50, según fueran muestras solubles o IC, respectivamente. Se incubaron durante 90 min a 37°C, tras lo cual se añadió de nuevo tripsina, ahora en una relación 1:100 en todos los casos, y se incubó durante 30 minutos más. La reacción se detuvo con inhibidor de tripsina de soja (SBTI). En los experimentos iniciales se incluyeron controles de digestión trípica de IgG reducida y carboxamidometilada. Los digeridos se analizaron por EGPA-SDS en geles al 12%.

3.5.2.- DIGESTIÓN CON TRIPSINA Y PAPAÍNA DE LOS COMPLEJOS

Los complejos (¹⁴C)C3-IC, equilibrados en PBS y a una concentración de anticuerpo de 1 mg/mL, se digirieron con tripsina, en condiciones idénticas a las del apartado 3.5.1. En estas condiciones, en ausencia de aminoetilación, C3 es sensible a la digestión, mientras que el anticuerpo es resistente. Tras la digestión, el precipitado se lavó con TBS y se equilibró en este tampón, a una concentración de anticuerpo de 2 mg/mL. Se añadió DTT hasta una concentración final de 2mM y se incubó la mezcla durante 15 min a 37°C. Esta incubación se realizó para evitar el efecto negativo que los restos de iodoacetamida de los lavados habrían tenido sobre la actividad de la papaína. Tras ello, se añadió la enzima en una relación E:S en peso de 1:40. La digestión se llevó a cabo durante 30 min a 37°C, tras lo cual la digestión se inhibió con iodoacetamida, a una concentración final de 40mM, incubando otros 15 min, a temperatura ambiente y en obscuridad. El producto de la reacción, en virtud de la monovalencia del Fab, era soluble.

3.5.3.- DIGESTIÓN DE LOS COMPLEJOS CON PEPSINA

Complejos (¹⁴C)C3-IC se equilibraron en un tampón de acetato sódico 0,1M, pH 4,6, y se les añadió pepsina a una relación E:S 1:50 en peso. La cantidad de enzima añadida se corrigió en los ensayos, incluyendo en la cantidad de sustrato el C3 incorporado. Se incubaron 24 horas a 37°C, tras lo cual se detuvo la digestión elevando el pH con Tris sólido. La digestión con pepsina se ha utilizado para la obtención del fragmento F(ab')₂, que es divalente en lo que se refiere a su capacidad de interacción con el antígeno. Esta digestión genera también el fragmento pFc', correspondiente al dímero del dominio Cγ3, y péptidos pequeños, procedentes de la

digestión del C γ 2 [257, 291].

Tras la digestión, se separaron por centrifugación sobrenadante y precipitado; en el primero se encontraban el pFc' (dominio C γ 3) y otros fragmentos procedentes de la digestión de C3 y del dominio C γ 2; en el segundo, se encontraban el F(ab') $_2$, restos de IgG no digerida, y el antígeno. Ambos se cargaron por separado en geles de EGPA-SDS en gradiente de acrilamida del 10 al 15 %.

3.5.4.- INMUNOPRECIPITACIÓN CON ANTI-Fc-SEPHAROSE

Sobrenadantes de digeridos con pepsina de los complejos (14 C)C3-IC se inmunoprecipitaron con anti-Fc-Sepharose, preparada a partir de la fracción γ de un antisuero anti-Fc γ de conejo (Biodiagnostic S.A.). Después de detener la digestión con Tris 1M (8 μ L de Tris por cada 50 μ L de tampón), se separaron sobrenadante y precipitado. El sobrenadante se dividió en alícuotas de 15 μ L, a las que se añadieron 35 μ L de PBS pH 7,2. Una alícuota se cargó directamente en un gel de EGPA-SDS. A una segunda se le añadieron 100 μ L de anti-Fc-Sepharose, en el mismo tampón, y a la tercera, 100 μ L de IgG-Sepharose como control. Se incubaron 1 hora a 37°C con agitaciones frecuentes, tras lo cual se centrifugaron a 11600xg durante 10 min, y se retiraron los sobrenadantes. Los precipitados se lavaron dos veces con PBS, tras lo cual se resuspendieron en 150 μ L de tampón de muestra de electroforesis, al que se añadió β -mercaptoetanol y azul de bromofenol, se hirvieron durante 5 min, y se cargaron los sobrenadantes en un gel de EGPA-SDS en gradiente del 10 al 15%.

3.5.5.- CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD EN ANTI-F(ab') $_2$ - Y PROTEÍNA A-SEPHAROSE

Los productos de la digestión de los complejos (14 C)C3-IC con tripsina, tras aminoetilación, y de digestión con papaína se sometieron a cromatografía de afinidad. Se utilizaron dos tipos de absorbentes: 1) Proteína A-Sepharose (PA-S), que se une específicamente a la región Fc; y 2) anti-(Fab') $_2$ -Sepharose (AF-S), preparada a partir de un antisuero específico de F(ab') $_2$ de conejo (Pierce) y CNBr-Sepharose. Las columnas se montaron en jeringas de insulina, con un volumen final de 200-300 μ L.

La columna de proteína A se equilibró en 0,1 M NaPi pH 8,0. La fracción no retenida se eluyó lavando con el tampón inicial. La proteína retenida se eluyó con 0,1 M citrato sódico,

pH 3,5. Finalmente, la columna se lavó con ácido cítrico 0,1 M. Se recogieron fracciones de dos gotas ($\sim 65\mu\text{L}$). La radioactividad se detectó contando alícuotas de 5 ó 10 μL , según los casos. Con la columna de anti-F(ab')₂-Sepharose, se procedió de forma semejante. En este caso, el tampón de equilibrado fue NaPi 10 mM pH 8,0, tampón que también se utilizó para eluir el material no retenido. El de elución de la fracción retenida fue Gly 0,1 M pH 2,5. El volumen de fracción y de alícuota contada fue el mismo que en la proteína A. En el caso de análisis por EGPA-SDS, las fracciones de cada paso se mezclaron y se precipitaron con 5 volúmenes de acetona, incubando 20 min a -20°C , y centrifugando después durante 20 min a 2000xg.

3.5.6.- TRATAMIENTO CON HIDROXILAMINA

En algunos casos, los complejos digeridos se trataron con hidroxilamina (Merck), según los siguientes protocolos. En el caso de las digestiones con pepsina, el precipitado se resuspendió en 200 μL de un tampón NaHCO₃ 0,1 M pH 9,6 que contenía cloruro de guanidinio (Gdn/HCl) 2,5M y NH₂OH 1M; el sobrenadante del mismo experimento se mezcló con un volumen igual de un tampón NaHCO₃ 0,2M pH 9,6 que contenía Gdn/HCl 5M, y con doble volumen de NH₂OH 2 M. Ambas se incubaron 2 horas a 37°C, tras lo cual se dializaron frente a NH₄HCO₃ 100mM, sobre filtros de 0,025 μm , (tipo VS Millipore), en placas Petri, durante 90 minutos, a temperatura ambiente; posteriormente, se liofilizaron, y se resuspendieron en tampón de muestra para EGPA-SDS. Los dializados se liofilizaron igualmente, y procesaron tal y como se especifica en el siguiente apartado.

Las muestras de digestión con papaína, y fraccionadas previamente por cromatografía de afinidad, se precipitaron con 5 volúmenes de acetona, y se resuspendieron en un tampón idéntico al utilizado en el caso de los precipitados de la digestión con pepsina. A partir de aquí, el proceso fue idéntico a éste. También en este caso se almacenaron los dializados del tratamiento con NH₂OH una vez liofilizados.

3.5.7.- CROMATOGRAFÍA EN BIO-GEL P-4 Y P-6 Y EN SEPHADEX G-25

Los dializados del tratamiento con NH₂OH del apartado anterior de la digestión con pepsina de los complejos, se cargaron en una columna de Bio-Gel P-4 (0,9x60 cm), equilibrada en NH₄HCO₃ 100 mM, a un caudal de 1 mL/hora, recogiendo fracciones de 0,5 mL. Se contaron alícuotas de las fracciones, se mezclaron las radioactivas, y se liofilizaron. De igual forma, preparaciones de ¹⁴C-C3(NH₂OH), se digirieron con pepsina, en dos relaciones E:S (1:100 y

1:50), y se cargaron en la misma columna de Bio-Gel P-4. La columna se calibró con suero, DNP-Lys y glucagón. Algunas de estas fracciones se mezclaron, y se repurificaron por HPLC, en el sistema de acetato/acetonitrilo. En algún caso, la muestra sufrió un tercer paso de purificación, recurriendo al sistema TFA/TFA-acetonitrilo.

Los dializados de la digestión con papaína se cargaron en una columna de Bio-Gel P-6 (1,4x125cm), equilibrada con un tampón NH_4HCO_3 100mM, a un caudal de 10 mL/hora, y recogiendo fracciones de 1,67mL. Se contaron alícuotas de las fracciones y se liofilizaron las correspondientes a los picos radioactivos. En esta columna se cargó también una muestra de ^{14}C -C3(NH_2OH) aminoetilado y digerido con tripsina, en condiciones similares a las empleadas en el apartado 3.5.1. para IgG; antes de cargar en la columna, se le añadieron 500 μg de un digerido tróptico de OVA. Las fracciones radioactivas se liofilizaron; tras ello, se resuspendieron en TBS, que contenía 500 μg de OVA digerida y se digirieron con papaína, en una relación sobre la OVA de 1:40, tras lo que se volvieron a cargar en la columna. Igual que en los otros casos se contaron alícuotas y se liofilizaron las fracciones radioactivas.

En un caso, el sobrenadante de una digestión de complejos con pepsina, se cargó en una columna de Sephadex G-25 (Medium) de 1x45cm, equilibrada en el mismo tampón que los casos anteriores, a un caudal de 1,8mL/hora, recogiendo fracciones de 700 μL . El gel se saturó con SHN, calibrando el volumen total (V_t) con DNP-Lys. Se contaron alícuotas de las fracciones, mezclándose aquellas que tenían radioactividad. La mezcla se liofilizó y se trató con NH_2OH , en las condiciones utilizadas con los precipitados en el apartado anterior, y se volvió a cargar en la misma columna, en las mismas condiciones.

3.5.8.- DIGESTIÓN CON PEPSINA DE COMPLEJOS ENTRE C3 Y EL Fc

Complejos (^{14}C)C3-IC de seis ensayos que se habían digerido con tripsina y papaína, se separaron, por la columna de anti-F(ab')₂-Sephrose, recogiendo el material no retenido. Tras ello, éste se repurificó en la columna de Proteína A-Sephrose recogiendo en este caso las fracciones retenidas y eluidas con Gly. Estas se dializaron durante 1 hora y 30 min frente a 100 mL de acetato sódico 0,1M pH 4,6 en filtros de 0,025 μm , (tipo VS), tras lo cual se almacenaron a 4°C durante la noche. Al día siguiente se les añadió pepsina, en relación 1:50 en peso. Después de 24 horas a 37°C se detuvo la reacción con Tris sólido. Tras ello, las muestras se llevaron a unos 70-80 μL por centrifugación en vacío, en un SPEED VAC CONCENTRATOR (Savant). Después de centrifugar a 11600xg durante 15 min, se analizaron 50 μL por FPLC en una columna de

filtración Superdex 75. En ella se cargó previamente el sobrenadante de una digestión con pepsina de 300 μg de IC. La columna se había calibrado con anterioridad con una mezcla de IgG (150kDa), albúmina humana (HSA, 65kDa), OVA (45kDa), SBTI (21,5kDa), citocromo c (12,3kDa) y aprotinina (6,5kDa). El cromatograma se desarrolló a un caudal de 0,5mL/min, recogiendo fracciones de 0,4mL. En la muestra de los complejos se contó el volumen total de cada fracción.

3.6.- ESTUDIO DE LA POSIBLE UNIÓN DE C3 A LA REGIÓN BISAGRA DE LA IgG

3.6.1.- REDUCCIÓN, AMINOETILACIÓN Y DIGESTIÓN TRÍPTICA DE F(ab')₂ ANTI-OVA

F(ab')₂ a-OVA (45 mg), obtenido por digestión con pepsina y cromatografía en Ultrogel AcA 44 [257], se repurificó por cromatografía en una columna de 5 mL de PA-S. Tras ello, se sometió a reducción y aminoetilación y, después de dializar frente a PBS, a digestión trípica (tripsina 10mg/mL en HCl 1 mM) en condiciones idénticas a las utilizadas en experimentos anteriores. La mezcla de la digestión se centrifugó en un CENTRICON 3™ (tamaño de poro efectivo de \sim 3kDa), a 3000xg en un rotor JA-20, a 4°C, durante unas 8 horas (el volumen total era de 8 mL). El filtrado se liofilizó, y se desaló en una columna de Bio-Gel P-2 (0,9x12,5cm), tras lo cual, después de volver a liofilizar, se purificó por HPLC, utilizando el sistema de TFA/TFA-acetonitrilo. La detección se llevó a cabo a 280 y 214 nm. Una alícuota del material retenido en los centricones se cargó en un gel de EGPA-SDS al 12%.

Por otra parte, seis ensayos de interacción se mezclaron y se digirieron con pepsina durante 24 horas a 37°C. Tras ello, se separó un tercio, que se sometió a reducción y carboxamidometilación con IA. Las dos terceras partes restantes se redujeron y aminoetilaron. Los productos de ambas reacciones, ahora solubles, se sometieron a cromatografía de afinidad en la columna de proteína A-Sepharose, con el fin de eliminar los restos de cadena pesada del anticuerpo que resisten la digestión. El material no retenido se dializó durante 1 hora y 30 min frente a 100mL de PBS. Tras la diálisis, los complejos aminoetilados se dividieron en dos alícuotas. Una de ellas, igual que el complejo carboxamidometilado, se digirió con tripsina (1mg/mL en HCl 1mM) en la misma relación E:S de experimentos anteriores. La restante se incubó en las mismas condiciones, añadiendo el mismo volumen de HCl 1mM, pero sin enzima. La digestión se detuvo con SBTI. Aproximadamente una tercera parte de cada una de las muestras, junto con un control con SHN-EDTA que se había aminoetilado y digerido con tripsina,

se cargaron en un gel de EGPA-SDS al 12,5% de acrilamida. El resto se cargó en la columna de anti-F(ab')₂-Sepharose. La radioactividad se detectó contando la totalidad de cada una de las fracciones.

3.7.- EFECTO DE LA UNIÓN DE C1q A INMUNOCOMPLEJOS SOBRE LA UNIÓN DE C3

3.7.1.- CUANTIFICACIÓN DE LA UNIÓN DE LOS COMPONENTES

Para estos experimentos se realizaron ensayos de interacción utilizando 25µg de IC y 200µL de SHN-Chelex o RD. En ellos, RD suplementado con factor D purificado y con cantidades crecientes de 0 a 20µg de C1q exógeno, se incubó con los IC durante 15 min a 37°C en presencia de iodo[1-¹⁴C]acetamida. Estos experimentos se realizaron por duplicado. Los controles de este experimento incluyeron RD no suplementado con factor D, o suplementados con este después de una incubación previa del RD y los IC de 15 min en presencia o ausencia de 15µg de C1q. Este experimento se realizó con el fin de que C1q estuviera unido al IC cuando se activase la vía alternativa. También se incluyó un ensayo con SHN-Chelex, y un control con SHN-EDTA. Tras lavar los ensayos con PBS-IA y con PBS, se resuspendieron en 100µL de tampón de muestra de electroforesis y se cuantificó la radioactividad.

Como control de los experimentos anteriores, se realizaron otros idénticos, pero en estos casos los IC utilizados se habían preparado con ¹²⁵I-OVA (200cpm/µg de IC), y no se añadió iodo[1-¹⁴C]acetamida. Los datos de este control nos permitieron establecer la cantidad de IC conservados después de los ensayos. Los datos finales del experimento se normalizaron con estos valores.

3.7.2.- EFECTO DE LA PRESENCIA DE C1q SOBRE LA UNIÓN AL DOMINIO C_γ3

Complejos (¹⁴C)C3-IC generados con 100µg de IC y 800µL de RD suplementado con factor D y en presencia o ausencia de C1q exógeno (83µg), junto con controles preparados con SHN-Chelex, se digirieron con pepsina durante 24 horas, tras lo que se cargaron en un gel de EGPA-SDS en gradiente del 10 al 15% de acrilamida. El control con SHN-Chelex se realizó con 50µg de IC y 400µL de suero.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

4.1.1.- AISLAMIENTO DE C3

La Figura 4.1A recoge el paso del CM-Sephadex C50, último correspondiente a la purificación de C3. En la Figura 4.1B, se presenta el gel de EGPA-SDS al 7,5% de acrilamida de las fracciones indicadas de la cromatografía, en las que se aprecian bandas correspondientes a C5 y factor H, contaminantes de C3 hasta este paso. El C3 de las fracciones iniciales de este cromatograma (130-150) resulta homogéneo por EGPA-SDS, como se comprueba en esta Figura, y hemolíticamente activo. Las muestras de C3 se almacenan a -80°C , procediéndose, previamente a su utilización, a cromatografía de FPLC en Mono Q.

4.1.2.- FACTOR D

La Figura 4.2A recoge el paso final del aislamiento de factor D en una columna de Mono S. En la Figura 4.2B se recoge un gel de EGPA-SDS al 12% de las muestras correspondientes a los picos procedentes de la Mono S. De un litro de plasma se obtuvieron, tras el último paso, 200-250 μg de factor D, lo que supone alrededor de un 10% del material de partida.

4.2.- FORMACIÓN DE COMPLEJOS COVALENTES ENTRE C3 E IgG

Los ensayos se realizaron en las condiciones especificadas en MATERIALES Y MÉTODOS, utilizando SHN-Chelex, SCN-Chelex, o RD, suplementado este último con factor D purificado y, en determinados experimentos, con C1q, componente del que también carecen los sueros RD. Los complejos se obtuvieron en presencia de iodo[1- ^{14}C]acetamida, con el fin de marcar radioactivamente el grupo -SH que forma parte del tioéster y que, por tanto, está muy próximo al grupo carbonilo reactivo (ver Figura 1.4 de la INTRODUCCIÓN). Los resultados de estos ensayos se analizaron por EGPA-SDS, con geles en gradiente de acrilamida del 5 al 15%. Las Figuras 4.3 (SCN) y 4.4 (RD) recogen el resultado de estos experimentos, incluyendo el gel (4.3A y 4.4A) y la fluorografía correspondiente (4.3B y 4.4B) a cada uno de éstos. En cada una de estas Figuras se incluyen ensayos realizados con SHN-Chelex. Cuando C3 se une al

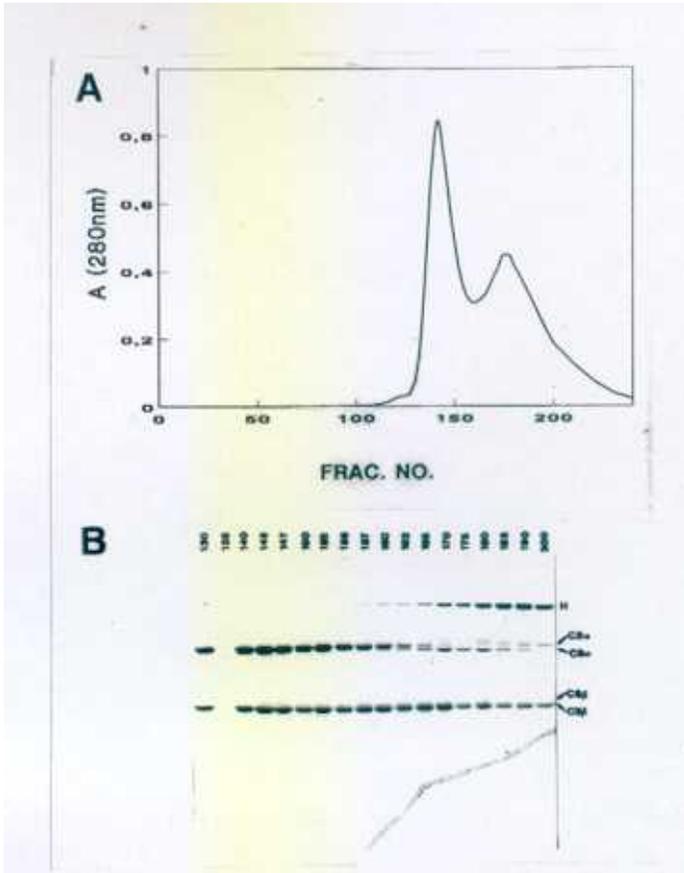


Figura 4.1 A) Cromatografía en CM-Sephadex C50, último paso en la purificación de C3. B) EGPA-SDS al 7,5% de fracciones de este cromatograma.

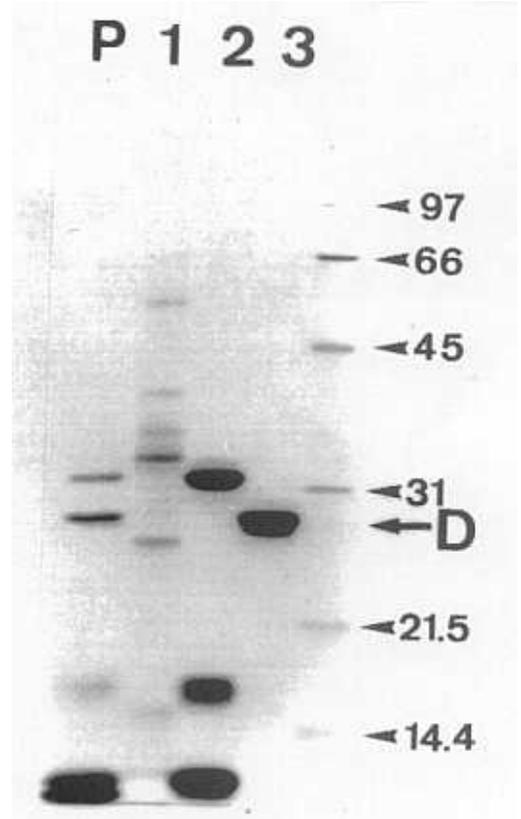
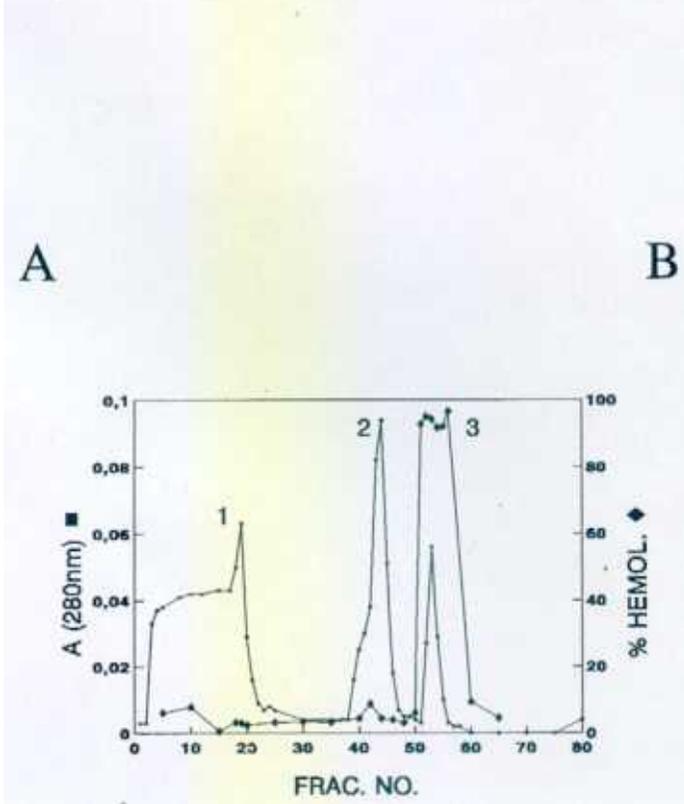


Figura 4.2 A) Perfil de elución de la columna de Mono S donde se indica, además de la A_{280nm} (-) el resultado del ensayo hemolítico de las fracciones (\diamond). B) EGPA-SDS al 12% de los picos señalados en el cromatograma. P se refiere a la mezcla previa a la separación.

anticuerpo integrante del IC, lo hace a las cadenas pesadas (H), mayoritariamente, y a las ligeras (L), según se describe en la INTRODUCCIÓN, formando complejos covalentes C3b-IgG. Posteriormente otras moléculas de C3b se unen a estos complejos, formando aductos C3b-C3b-IgG. La cadena α' de la primera molécula queda, por tanto, unida a la pesada del anticuerpo (complejos α' -H) y la α' de la segunda de C3b se une a la α' de la primera (complejos C3 α' -C3 α'). Posteriormente, la cadena α' de C3b es degradada en suero por los reguladores según el esquema descrito en la Figura 1.2 de la INTRODUCCIÓN, produciendo finalmente complejos iC3b-iC3b-IgG. Al analizar estos complejos covalentes por EGPA-SDS en condiciones reductoras se obtienen bandas de alto Mr señaladas como 1 y 2 en las Figuras 4.3 y 4.4. Estas dos bandas corresponden a complejos C3 α 65-cadena pesada del anticuerpo (H) y C3 α 65-C3 α 44, respectivamente, procedentes estos últimos de los dímeros de C3 formados sobre el IC [263, 291, 292]. La composición de los dímeros sería iC3b²-iC3b¹-IgG, en donde iC3b², la segunda molécula en incorporarse, se une directamente a iC3b¹ a través del fragmento C3 α 44 de ésta [292] (ver Figura 4.3C). Al reducir estos dímeros, liberan: la cadena β de las dos moléculas de iC3b (marcada como C3 β en la Figura 4.3A); la cadena pesada no unida covalentemente a iC3b y las dos ligeras del anticuerpo (la primera marcada como H, coincidiendo la segunda, muy heterogénea, con el patrón de 31kDa). De la molécula iC3b² se liberaría el fragmento C-terminal de la cadena α , el C3 α 44 (identificado como banda 3 en la Figura 4.3A). Finalmente, se liberarían los dos complejos: 1) el fragmento C3 α 65 de iC3b², que contiene el carbonilo procedente del tioéster¹, unido covalentemente al C-terminal, C3 α 44, de iC3b¹ (banda 2) y 2) el C3 α 65 de iC3b¹ unido covalentemente a la cadena pesada (banda 1). En la banda 2 también existen complejos con el antígeno, cuyo Mr coincide con el de los complejos C3 α 65-C3 α 44 [292]. Las bandas de más alto peso molecular, que aparecen en la autorradiografía y en el gel, incluyen complejos C3 α' -H (serían, por tanto complejos C3b-IgG) y otros que corresponden a complejos cuya identidad no se ha determinado, y que contienen tanto a C3 como al anticuerpo [291, 292]. Las autorradiografías (Figuras 4.3B y 4.4B) muestran que las bandas 1 y 2 son altamente radioactivas, al igual que las de Mr superior, demostrando la presencia en todas ellas de la cadena α' de C3, o de un fragmento de ésta que contiene el carbonilo reactivo. La banda radioactiva con un Mr de unos 120kDa corresponde probablemente a complejos entre C3 α 65 y la cadena ligera del anticuerpo.

No existen diferencias cualitativas apreciables en el patrón obtenido con los tres tipos de suero en cuanto a la unión de C3. La única excepción hace referencia al tamaño del fragmento C3 α 44 (banda 3) en conejo y, por tanto, a los complejos C3 α 65-C3 α 44 (banda 2). Este fragmento de la cadena α de conejo aparece con un Mr ligeramente menor que su homólogo humano.

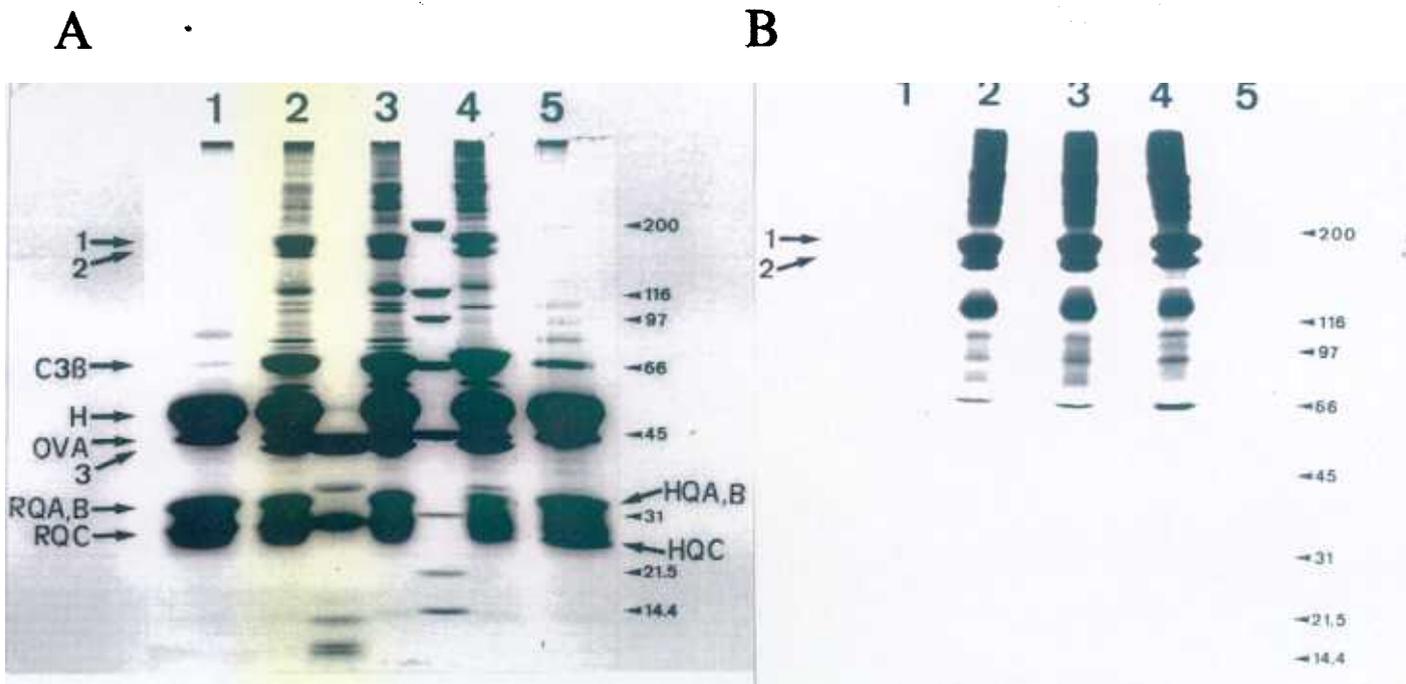


Figura 4.3 A) EGPA-SDS en gradiente del 5 al 15% de acrilamida de ensayos interacción entre C3 e IC. Calle 1: control con SCN-EDTA; calles 2 y 3: ensayos con SCN-Chelex de dos conejos; calle 4: ensayo con SHN-Chelex; calle 5: control con SHN-EDTA. Entre las calles 3 y 4 se encuentran los marcadores de Mr cuyos valores, en kDa, se muestran a la derecha. B) Resultado de la fluorografía del gel. C) Esquema del dímero de C3 sobre el anticuerpo y de la procedencia de las bandas 1 y 2. (-) representa el enlace éster y (-) representa los puentes disulfuro. (Extraído de la ref. P545).

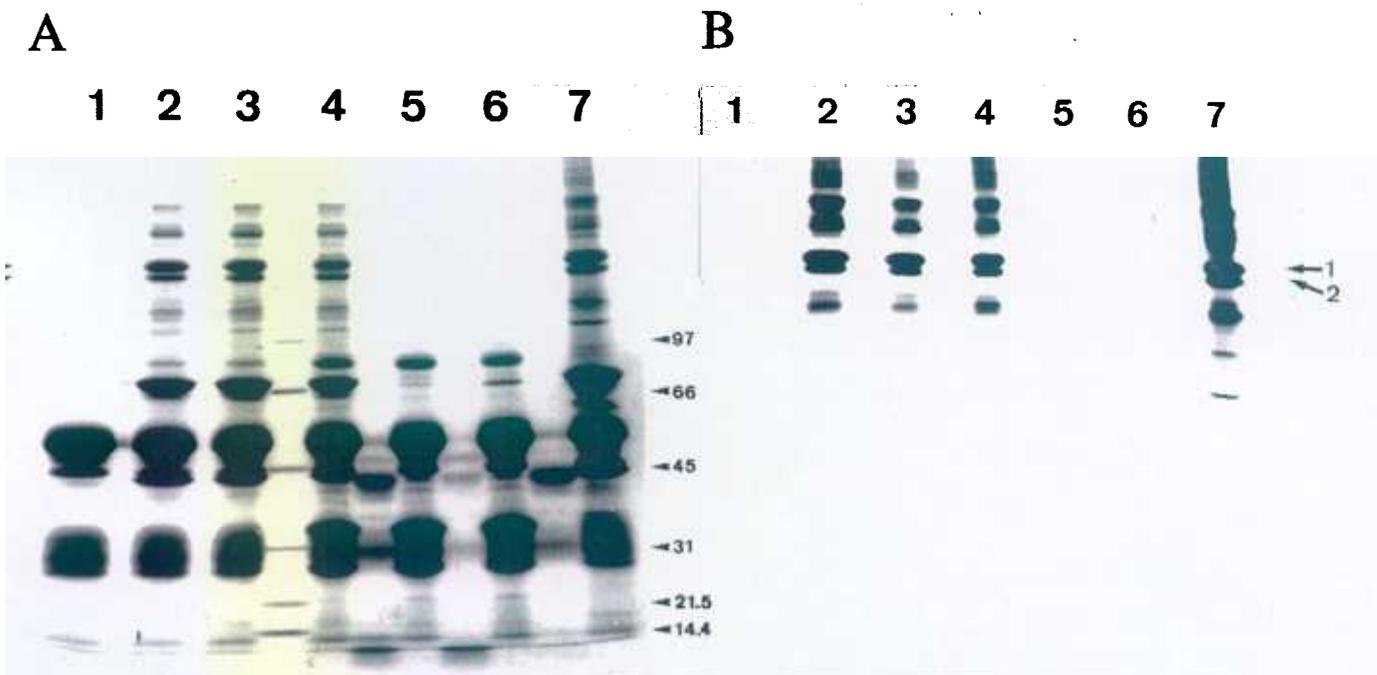


Figura 4.4 A) EGPA-SDS en gradiente del 5 al 15% de ensayos de interacción entre C3 e IC. Calle 1: RD; calle 2: RD en presencia de factor D; calle 3: RD con factor D al que se añadió el mismo tampón en el que se encuentra C1q; calle 4: RD, con factor D y C1q; calle 5: lo mismo que en la calle 4, pero en presencia de EDTA; calle 6: control con SHN-EDTA; calle 7: ensayo con SHN-Chelex. Entre las calles 3 y 4 se incluyen los patrones de Mr. El resto de calles no numeradas corresponden a muestras no relacionadas. B) Fluorografía de este gel.

Resulta destacable que todas las bandas identificadas como complejos tienen un Mr mayor del esperado de la suma de sus componentes. Este comportamiento anormal responde probablemente a la geometría de los complejos, y desaparece en geles al 4,5% [292] o en geles en condiciones no reductoras [263], excluyendo la posibilidad de que estuvieran compuestas por complejos formados por un mayor número de componentes de los identificados.

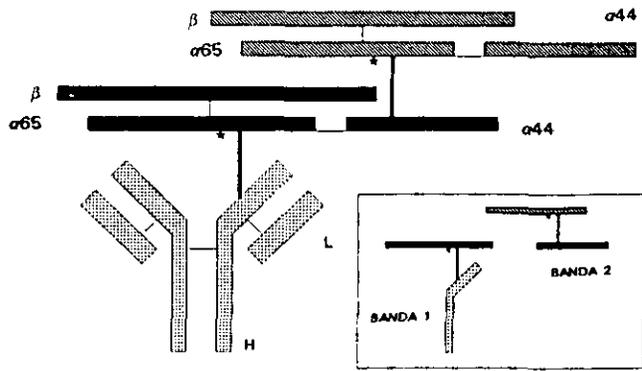


Figura 4.3C (Continuación).

Si existen diferencias en los geles cuando se analizan bandas debidas a proteínas diferentes de C3 y el anticuerpo o el antígeno. Las más llamativas son las bandas marcadas en la Figura 4.3 como RQA,B y RQC en SCN (calles 1-3) y como HQA,B y HQC en SHN (calles 4 y 5) que corresponden presumiblemente a las cadenas A, B y C de C1q. Su asignación se basa en tres hechos. Por un lado el peso molecular de la cadena C es mayor en C1q de conejo que en C1q humano [293], lo que coincide con el mayor Mr de las bandas RQC respecto a las HQC en los geles. En segundo lugar, en la Figura 4.4 estas bandas están ausentes en los experimentos realizados con RD que no se han suplementado con C1q exógeno (calles 1-3), apareciendo en los que se ha añadido este componente (calles 4 y 5), además de en los experimentos realizados con SHN-Chelex (calles 6 y 7). Por otro lado, experimentos con ¹²⁵I-C1q, que se describen más adelante, demuestran la presencia de C1q en los complejos. Se puede observar en el caso de SHN-Chelex, que la cantidad de C1q presente es notablemente menor en los ensayos (calle 4 de la Figura 4.3A y calle 7 de la 4.4A) que en los controles con SHN-EDTA (calle 5 de la Figura 4.3A y calle 6 de la 4.4A).

La cuantificación de la incorporación de C3 en los ensayos con SHN-Chelex es comparable cuando se realiza con ¹²⁵I-C3 o con iodo[1-¹⁴C]acetamida: unos 30-35μg de C3 por cada 100μg de IC (una molécula de C3 por cada cuatro de anticuerpo), mientras que en los controles no pasó de 3μg. No obstante, experimentos que se muestran más adelante, en los que se cuantificó la cantidad de IC presente después de los ensayos, sugieren que la relación entre C3 y el anticuerpo es mayor (una molécula de C3 por cada dos de anticuerpo).

4.3.- UNIÓN DE C3 A LOS FRAGMENTOS F_d Y F_c DE LA CADENA PESADA DEL ANTICUERPO

4.3.1.- DIGESTIÓN TRÍPTICA DE IgG ANTI-OVA REDUCIDA Y AMINOETILADA

IgG anti-OVA que se había reducido y aminoetilado (IG-BE) se dializó frente a PBS. De forma paralela se procesó el mismo anticuerpo reducido y carboxamidometilado (IG-IA). Una alícuota de estos anticuerpos, alrededor de 30µg, se separó para realizar análisis de aminoácidos. El resto se digirió con tripsina. El resultado del análisis de aminoácidos se recoge en la tabla 4.I. Las cantidades de Met y Pro obtenidas en IG-BE, en relación a las obtenidas en IG-IA, son más bajas que las del resto de los aminoácidos. Se han descrito modificaciones de Met durante la aminoetilación, que dan cuenta del descenso apreciado en la proteína modificada [294]; igualmente existe precedente en el caso de la Pro [289]. Por el contrario, no se detectó pérdida de His, que también puede modificarse por la 2-BEA [294], sino que los valores fueron ligeramente superiores en la proteína aminoetilada, posiblemente por modificación de estos residuos por la IA en las muestras de IG-IA [295]. Por estos motivos, estos tres aminoácidos se excluyeron del cálculo del promedio de la relación IA/BE. También se excluyó el de Lys, cuyo tiempo de retención coincidió con el de AE-Cys, utilizándose el valor de Lys para cuantificar el número residuos de Cys modificados. Finalmente, el tratamiento de los datos dio el cálculo de 11,9 residuos AE-Cys por molécula de IgG. Este dato es superior al

TABLA 4.I. Análisis de aminoácidos de IgG anti-OVA reducida y aminoetilada, y de la misma IgG carboxamidometilada como control.

AA	nmol de AA		
	IG-BE	IG-IA	IA/BE
Asx	23,785	23,597	0,992
Thr	34,863	34,651	0,994
Ser	30,601	30,294	0,99
Glx	28,545	28,265	0,99
Pro	25,04	25,55	1,02
Gly	24,993	24,736	0,99
Ala	19,343	19,228	0,994
Val	28,912	28,729	0,994
Met	2,871	3,083	1,074
Ile	10,613	10,526	0,992
Leu	20,982	20,874	0,995
Tyr	13,287	13,201	0,993
Phe	10,744	10,65	0,991
His	5,929	5,748	0,97
Lys*	18,073	15,495	0,857
Arg	9,794	9,725	0,993

*: En la IgG aminoetilada, el pico de AE-Cys coincide con el de Lys.

La digestión trípica de IG-IA demostró el efecto de la modificación sobre la sensibilidad de la IgG a la tripsina (Figura 4.5)

G-BE e IG-IA demostró el efecto de la modificación sobre la sensibilidad de la IgG a la tripsina (Figura 4.5)

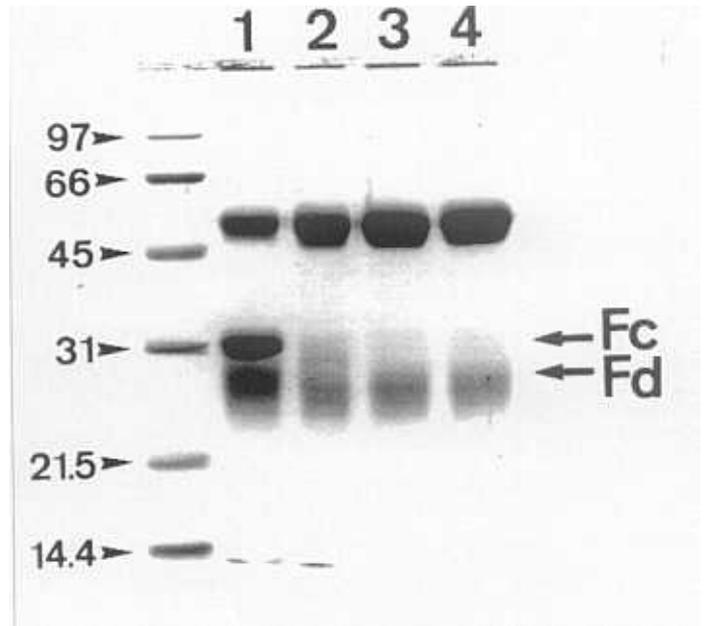


Figura 4.5 EGPA-SDS al 12% de la digestión trípica de IG-BE e IG-IA. Calle 1: IG-BE digerida; calle 2: IG-IA digerida; calle 3: IG-BE no digerida; calle 4: IG-IA no digerida. La banda marcada como Fd incluye también a la cadena ligera.

(Figura (AF-S) nera de ne a las ntan la

os de IgG no digerida y el Fc (calle 1 de la Figura 4.6) mientras (calle 2 de la misma figura). En los resultados de la Figura 4.5 se

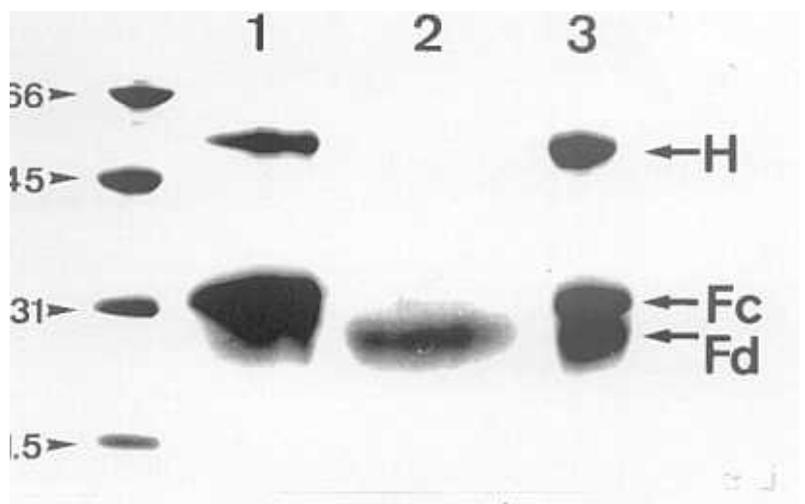


Figura 4.6 EGPA-SDS de la cromatografía en PA-S de IgG aminoetilada digerida con tripsina. Calle 1: proteínas retenidas en la columna; calle 2: proteínas no retenidas; calle 3: mezcla de la digestión previa a la cromatografía. Igual que en el caso anterior, la banda marcada como Fd incluye a la cadena ligera.

la aminoetilada sí es sensible

correspondientes a Fc y Fab

La asignación se realizó co

TABLA 4.II. Secuencia N-terminal del Fc aminoetilado y digerido con tripsina.

PTH	CICLO NO. (pmol de PTH)									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Asp	23,0	16,7	15,6	12,7	18,0	19,1	19,7	21,6	19,6	31,2
Asn	11,3	3,3	4,4	7,3	13,9	9,0	15,2	35,4	17,6	39,2
Ser ^a	43,7	3,4	1,3	1,5	6,0	6,7	7,5	8,2	8,7	10,0
Gln	3,3	2,8	3,0	4,7	12,1	26,3	22,5	14,3	12,9	19,8
Thr ^a	3,1	2,6	2,8	29,5	25,5	18,0	21,7	15,7	11,7	14,6
Gly	5,0	3,3	6,9	7,7	10,2	11,5	15,5	18,7	19,9	26,6
Glu	1,2	2,4	5,1	3,1	8,9	11,6	14,7	14,7	69,4	51,7
His	-	-	-	-	1,1	-	-	2,9	3,6	3,4
Ala	72,9	11,	11,9	13,2	15,2	21,7	24,1	24,2	48,3	46,0
Arg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tyr	3,4	9,3	4,4	4,3	14,8	12,0	35,0	21,2	13,8	17,5
Pro	3,7	6,7	86,5	36,9	70,0	119,5	141,8	170,4	93,3	78,5
Met	2,6	2,4	3,0	29,8	30,6	9,8	9,6	17,1	10,0	17,5
Val	9,2	36,2	75,4	37,3	42,5	36,5	41,7	59,8	50,8	74,2
Trp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phe	1,5	5,9	2,6	4,5	4,8	6,8	7,2	10,6	10,9	12,2
Ile	2,4	31,7	16,8	7,8	11,3	17,0	16,7	16,3	19,0	20,8
Lys	1,0	130,3	15,0	5,2	3,3	6,8	8,1	8,9	12,0	13,0
Leu ^b	2,4	-	16,4	19,1	107,5	48,2	34,4	31,8	38,4	142,1
Fc	Ser	Lys	Pro	Thr	AEC	Pro	Pro	Pro	Glu	Leu
L	Ala	Val Ile	Val	Met Tyr	Pro Met Tyr	Gln Ala	Asn Tyr	Asn Met Val	Ala	Asn Met Val

^a: El rendimiento de la PTH-Ser fue bajo debido a la existencia de un derivado, procedente de dehidroalanina, y que eluye después de la PTH-Ala. Con PTH-Thr ocurre algo parecido, sus rendimientos del orden de un 20-25% respecto a otros residuos, se debe a la presencia de cuatro derivados, que aparecen alrededor de la PTH-Tyr.

^b: La PTH-AE-Cys eluye en la misma posición que la PTH-Leu, asignándose a aquella PTH la Leu del ciclo 5 (AEC en la tabla).

durante la modificación, y no por la acción de la tripsina.

En un experimento paralelo, IC reducidos y aminoetilados se digirieron con tripsina, se cargaron en un minigel de EGPA-SDS al 12% y se transfirieron a membranas de ProBlott. Las

bandas correspondientes al Fc, y en las que estaba presente en cantidades apreciables cadena ligera, se cortaron y se secuenciaron. El resultado se recoge en la Tabla 4.II, y confirma el sitio de ruptura previamente descrito [273, 288], entre Cys²²⁰ y Ser²²¹ (numeración EU [283]), dentro de la secuencia

...STCSKPTCPPPELL...

donde la Cys aminoetilada responsable de la ruptura se resalta en negrita. Esta secuencia está localizada dentro de la región bisagra, formando esta Cys²²⁰ un puente disulfuro con la Cys¹³², perteneciente a C γ 1 [296]. Se ha descrito previamente [297] que este puente disulfuro se aminoetila en condiciones suaves de reducción, lo que se ha utilizado para el aislamiento del dominio V_H. Ello se basa en que también se aminoetila la Cys¹³¹, que forma el disulfuro con la cadena ligera, generando dos residuos contiguos de AE-Cys, que son un buen sustrato de la enzima cathepsina B. También se ha descrito la aminoetilación de la Cys²²⁹, que aparece en la secuencia como AE-Cys. La secuencia de fondo en la Tabla 4.II, heterogénea, coincide razonablemente bien con la de la región variable de la cadena ligera κ [283].

4.3.2.- DIGESTIÓN TRÍPTICA DE COMPLEJOS (¹⁴C)C3-IC REDUCIDOS Y AMINOETILADOS

Los complejos (¹⁴C)C3-IC, obtenidos a partir de 3 ensayos de interacción, se redujeron y aminoetilaron tras lo que se digirieron con tripsina. Una parte de estos complejos, ahora solubles al ser monovalente el fragmento Fab generado, se cargaron en la columna de AF-S. La Figura 4.7 recoge el perfil de radioactividad de este cromatograma, en el que el material no retenido incluye al Fc y a los péptidos producidos por la digestión trípica del resto de las proteínas presentes en los IC, y que se especificaron en el apartado 4.2. Las proteínas retenidas incluyen al Fab y a los restos de IgG no digerida. Las fracciones indicadas en la Figura 4.7 se mezclaron, se precipitaron con acetona y se cargaron en un gel de EGPA-SDS al 12,5%. La Figura 4.8 recoge este resultado en el que las proteínas no retenidas se cargaron en la calle 2 y las retenidas en la 3. La mezcla de la digestión no fraccionada se cargó en la calle 4, y un control con SHN-EDTA en la 5. En la calle 2 de la Figura 4.8A se detectaron dos bandas, una correspondiente al Fc y otra, también presente en la mezcla de la digestión del ensayo (calle 4), con un Mr superior al de la cadena H del anticuerpo. Esta banda procede probablemente de la cadena β de C3, cuya digestión trípica genera un fragmento de este tamaño [298]. Como se aprecia en la fluorografía (Figura 4.8B), se detectan tres bandas radioactivas, denominadas I, II y III. Aparte de éstas, existen otras de alto Mr, que pueden representar complejos no digeridos.

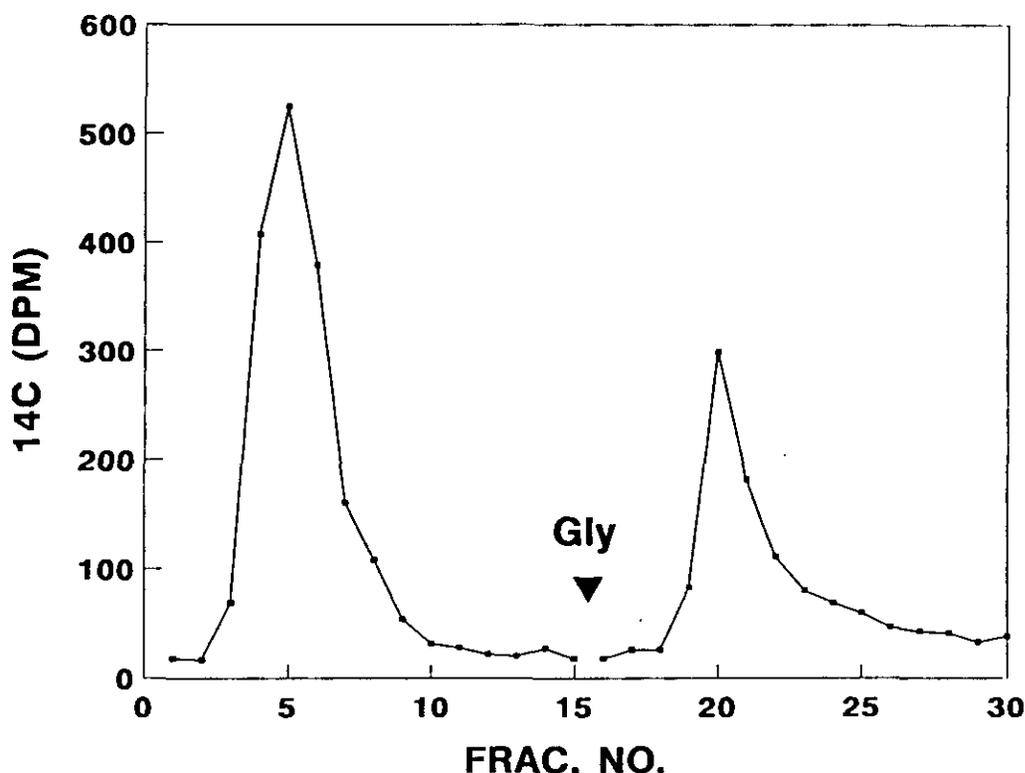
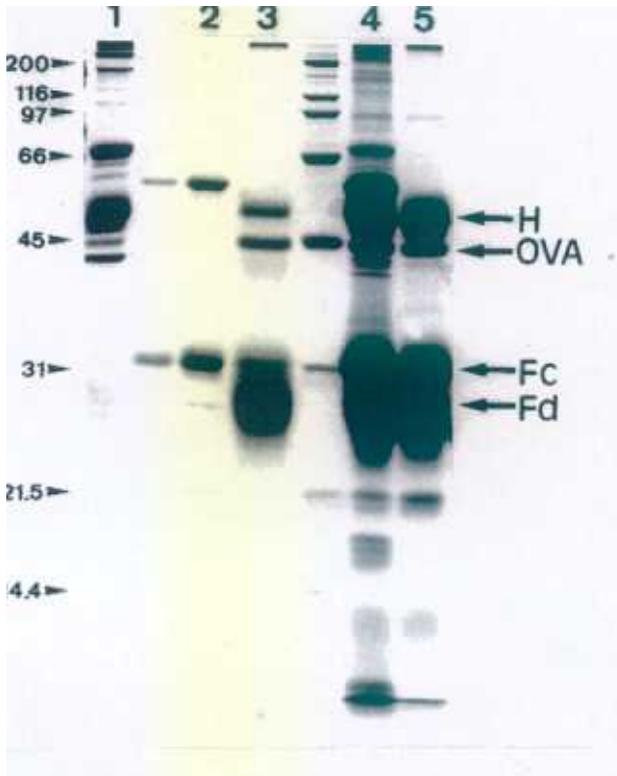


Figura 4.7 Perfil de radioactividad en la columna de AF-S de complejos aminoetilados y digeridos con tripsina. Las fracciones 3-9 del material no retenido y 19-25 del retenido, se concentraron por precipitación con acetona.

De las identificadas, la banda denominada I no es retenida en la columna de AF-S (calle 2, Fig. 4.8B), al igual que el Fc (calle 2, Fig. 4.8A). Por el contrario, la banda II sí se retiene (calle 3, Fig. 4.8B), al igual que el Fd (calle 3, Fig. 4.8A). Este comportamiento permite sugerir su identidad como complejos entre el fragmento Fc y un fragmento de unos 4kDa de C3 (banda I) y entre el Fd y el mismo fragmento de C3 (banda II). La banda que aparece como III correspondería a complejos entre restos no digeridos de cadena pesada y el fragmento de C3, compatible con su comportamiento en el inmunoabsorbente (queda retenida).

Un control de estos experimentos se recoge en la autorradiografía de la Figura 4.9. En él se aprecia el resultado de una digestión trípica de complejos (^{14}C)C3-IC sin modificar (calle 3) y el sobrenadante de otros complejos después de la reducción y aminoetilación (calle 2). El resultado de la calle 3 muestra que una parte apreciable de los complejos continúa apareciendo como bandas de alto Mr. En el resto la digestión del C3 integrante de estos complejos produce bandas que aparecen a Mr ligeramente superiores a los de la cadena pesada (H) (banda 1) y de

A



B

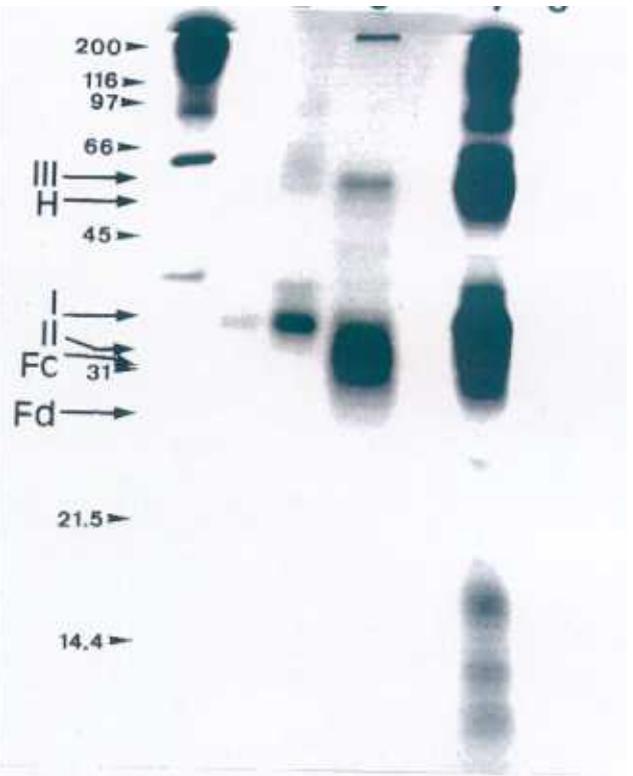
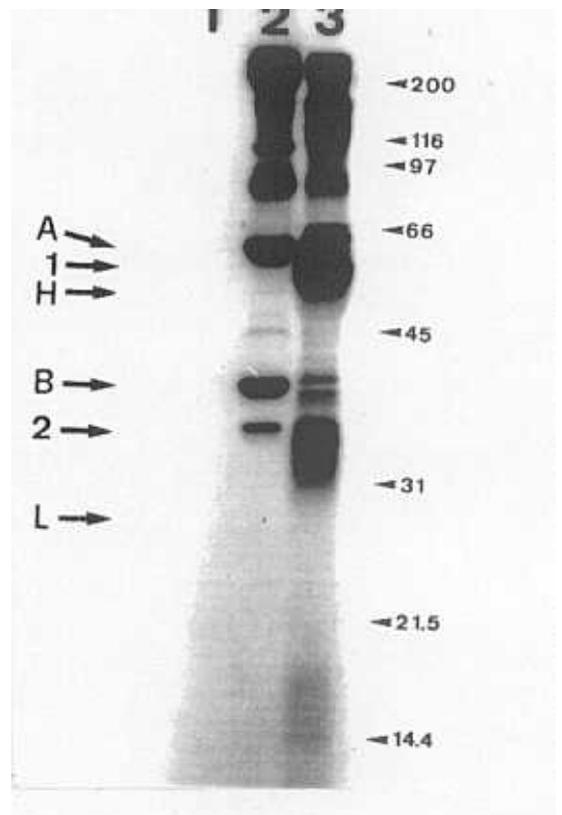


Figura 4.8 A) EGPA-SDS al 12,5% correspondiente al cromatograma de la Figura 4.7. Calle 1: ensayos con SHN-Chelex no digeridos; calle 2: material no retenido en la columna de AF-S; calle 3: material retenido; calle 4: los complejos aminoetilados digeridos, antes de la cromatografía; calle 5: control con SHN-EDTA, también aminoetilado y digerido. B) Fluorografía de este gel.

Figura 4.9 Fluorografía de un gel al 12,5% en el que se cargaron: calle 1: IC control incubados con SHN-EDTA y digeridos con tripsina sin aminoetilación; calle 2: sobrenadante obtenido después de aminoetilar complejos ^{14}C C3-IC y separar el precipitado; calle 3: complejos ^{14}C C3-IC digeridos con tripsina sin aminoetilar. L y H se refieren a la posición en el gel de las dos cadenas del anticuerpo.



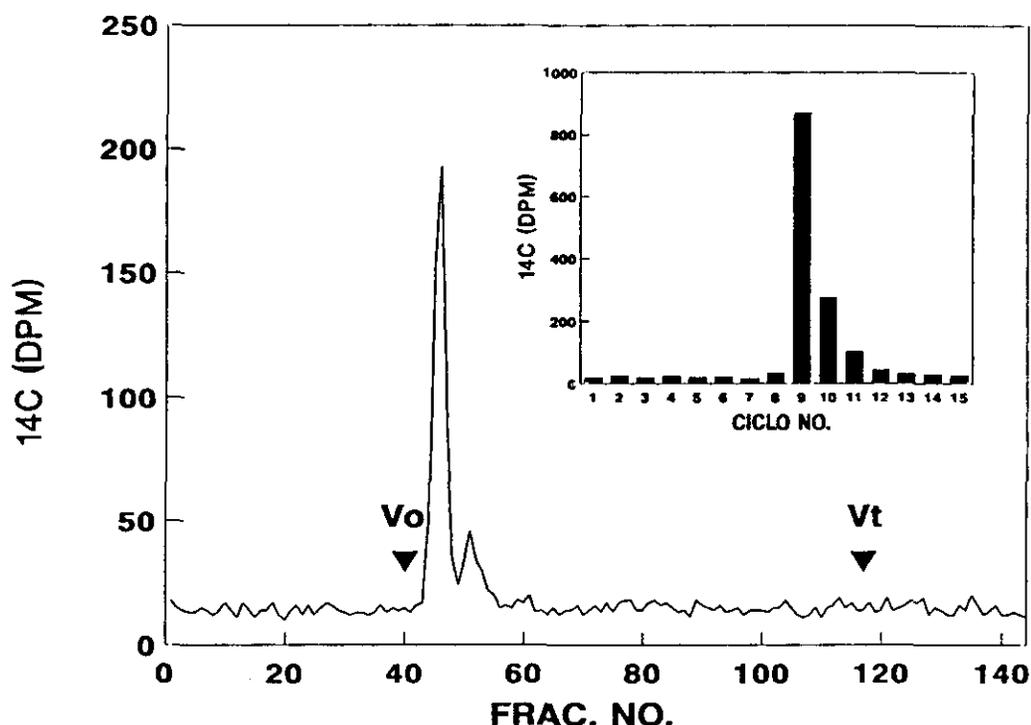


Figura 4.10 Cromatografía en Bio-Gel P-6 de ^{14}C -C3(NH₂OH) aminoetilado y digerido con tripsina. V₀ y V_t se refieren al volumen de exclusión y al total, respectivamente. Se incluye también la secuencia radioquímica de este péptido.

la ligera (L) (banda 2). Su asignación como complejos del fragmento de C3 de 4kDa y ambas cadenas del anticuerpo parece la explicación más directa de este patrón. El caso de la cadena pesada está ya suficientemente demostrada en la bibliografía [212]. La interacción con la cadena ligera ya se ha sugerido previamente para el caso de la activación de la vía clásica sobre bacterias [252]. La identificación de la banda 2 como estos complejos se apoya, aparte de en su Mr (superior al de la cadena L), en su carácter difuso, muy similar al que presenta esta cadena en los geles. Este resultado sugiere que la interacción de C3 tiene lugar tanto a través de la cadena pesada como de la ligera. El resultado mostrado en la calle 2 de la Figura 4.9 indica que una elevada proporción de los complejos, tras la reducción y aminoetilación, se hidrolizan, liberando dos fragmentos radioactivos procedentes del C3 presente en estos complejos, uno marcado como banda A, que probablemente corresponde al C3 α 65 de iC3b, y otro como banda B, probablemente C3d,g.

El tamaño del fragmento de C3 esperable por digestión trípica, de acuerdo con la secuencia [109], coincide con el obtenido en el experimento anterior (que es de unos 4-5kDa). Con el fin de comprobar este extremo, ^{14}C -C3(NH₂OH) reducido y aminoetilado se digirió con tripsina, y se cargó en una columna de Bio-Gel P-6. El perfil de radioactividad se recoge en la

Figura 4.10, en la que el volumen de elución concuerda con un peso molecular de unos 4kDa. Previamente, la mezcla de la digestión se había sometido a secuencia radioquímica, y su resultado se recoge en la misma Figura. La radioactividad en el ciclo 9, y su tamaño molecular (4kDa) coinciden con lo esperado, según la secuencia de C3:

HLIVTPSGC*GEQNMIGMTPTVIAVHYLDETEQWEKFGLEKR

donde los posibles sitios de ruptura C-terminales se presentan en negrita. La Cys¹⁰¹⁰ que porta el marcaje se indica con un asterisco.

4.3.3.- DIGESTIÓN CON PAPAÑA DE INMUNOCOMPLEJOS E IDENTIFICACIÓN DEL N-TERMINAL DEL Fc

La elevada hidrólisis de los complejos producida durante la aminoetilación, mostrada en el apartado anterior, llevó a la búsqueda de un método diferente para obtener Fc y Fab. Para ello se acudió a la digestión con papaña, método habitual de obtención de estos fragmentos [296]. Se digirieron con papaña 300µg de IC. Tras ello, se sometieron a dos pasos cromatográficos sucesivos. El primero fue en la columna de AF-S, recogiendo el material no retenido, en el que se incluiría el Fc, además de la papaña y de algún fragmento liberado durante la digestión. Con éste material se realizó el segundo paso, en la columna de PA-S, recogándose ahora las fracciones retenidas y eluidas con citrato sódico, en las que debería estar presente el Fc (los restos de IgG no digerida que pudieran quedar en la mezcla de reacción se eliminaron en la columna de AF-S). La mezcla de estas fracciones, después de precipitar con acetona, se cargó en un minigel de EGPA-SDS al 12,5% de acrilamida y se transfirió a membranas de ProBlott. La única banda, a una altura que corresponde al Fc (datos no mostrados), presentaba cierta heterogeneidad: una banda principal, homogénea (A), y otra, de peso molecular ligeramente superior, y heterogénea (B); esta característica se puede apreciar en Figuras posteriores (véase por ejemplo la Figura 4.12A). Ambas bandas se cortaron y se secuenciaron por separado. Las secuencias, mostradas en las tablas 4.III (banda A) y 4.IV (banda B), revelan cierta contaminación entre ambas muestras. El punto de ruptura de la banda A se encuentran entre Thr²²⁴ y Cys²²⁹ (tal y como se mencionó en el apartado 3.2.8.4, la numeración EU incluye cuatro residuos ausentes en la IgG de conejo, y que están localizados entre los equivalentes a estos dos). La banda B tiene su ruptura entre Cys²²⁰ y Ser²²¹, la misma obtenida con tripsina después de la aminoetilación. Ambos sitios se incluyen en la secuencia

STCSKPTCPPPEL

donde los dos residuos *N*-terminales resultantes figuran en negrita. Ambos coinciden con puntos descritos previamente [299]. La Cys²²⁹ forma el puente disulfuro que une a las dos cadenas pesadas del anticuerpo. Los alotipos d11 y d12 difieren en el aminoácido en posición 224 [296]: Met en el primero y Thr en el segundo. Nos encontramos, por tanto ante IgG del alotipo d12. La presencia de la Thr²²⁴, implica la existencia en suero de un 30% de moléculas que, de forma asimétrica, presentan un carbohidrato unido a este residuo, dando como resultado que un 15%

TABLA 4.III. Secuencia *N*-terminal de la banda A del Fc obtenido con papaína.

PTH	CICLO NO. (pmol de PTH)									
	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Asp	2,4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asn	3,9	2,3	-	2,7	5,3	3,4	1,6	3,2	2,6	3,7
Ser	?	2,3	-	2,7	5,3	3,4	1,6	3,2	2,6	3,7
Gln	-	1,7	5,7	2,1	3,7	3,2	2,7	4,6	5,3	8,5
Thr	4,1	2,3	4,3	2,8	3,8	3,7	3,5	4,2	3,8	4,8
Gly	7,9	3,8	4,0	6,3	7,2	6,9	7,4	59,9	62,5	35,1
Glu	2,6	3,0	4,2	5,6	49,1	18,1	10,5	13,2	15,4	18,2
Ile	-	-	2,1	-	-	-	-	4,6	-	-
Ala	12,0	8,3	6,3	2,8	17,4	22,3	23,6	21,0	19,6	15,6
Arg	3,9	1,5	-	2,0	2,7	5,5	5,3	3,8	4,9	4,5
Tyr	-	1,3	1,6	1,8	2,9	4,8	5,6	6,0	6,1	6,7
Pro	3,8	82,2	84,7	96,2	61,8	50,3	40,4	46,8	34,8	89,7
Met	1,9	1,7	3,9	6,9	9,5	8,6	6,2	7,9	6,6	7,4
Val	8,1	6,3	12,6	11,7	25,1	26,9	23,5	29,5	27,1	35,2
Trp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phe	3,1	1,9	5,9	3,7	9,4	7,3	6,0	8,6	8,0	10,3
Ile	2,0	2,2	7,4	7,0	17,7	17,0	14,0	14,8	14,9	16,1
Lys	2,1	11,2	3,3	2,7	5,3	4,6	4,2	5,9	4,4	6,9
Leu	5,7	6,1	8,2	10,4	16,9	99,1	95,1	55,6	32,2	41,1
A	Cys	Pro	Pro	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
(B)	?	Lys	?	?	Cys	?	?	?	?	?

*: En el ciclo 1, aparece un pico, inmediatamente posterior al de PTH-Glu, y que puede ser atribuible a la PTH de la carboxamidometil-Cys. Esto mismo ocurre en el ciclo 5, en el que este derivado de la Cys es aportado por la contaminación de la banda B.

TABLA 4.IV. Secuencia N-terminal de la banda B del Fc obtenido con papaína.

PTH	CICLO NO. (pmol de PTH)									
	1 ^a	2	3	4	5 ^b	6	7	8 ^c	9	10
Asp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,5
Asn	2,7	2,5	-	1,0	1,0	1,7	2,5	0,9	-	-
Ser	3,1	-	-	-	2,1	2,2	1,5	-	-	-
Gln	-	-	-	-	0,9	1,0	1,1	1,1	0,9	1,3
Thr	-	-	-	1,3	1,2	1,4	1,5	1,8	1,6	-
Gly	1,5	1,5	1,5	2,2	2,0	2,8	3,5	-	3,7	3,4
Glu	-	1,0	-	1,3	2,7	2,6	2,7	-	4,7	5,1
His	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ala	2,2	1,9	2,5	2,6	2,8	4,5	6,6	3,8	3,7	1,2
Arg	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tyr	-	-	-	-	-	1,1	1,3	-	-	-
Pro	-	2,5	13,2	9,9	7,2	18,4	27,5	17,8	12,2	11,7
Met	-	1,2	1,2	1,9	2,5	2,3	2,7	2,0	1,8	1,7
Val	1,4	3,3	7,2	8,0	9,6	12,0	12,9	9,4	8,2	9,6
Trp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phe	1,3	7,9	7,8	9,5	9,7	12,3	10,0	11,9	8,0	10,6
Ile	-	4,7	6,8	6,3	7,8	8,9	9,0	7,9	7,1	9,1
Lys	-	12,0	5,4	2,6	3,2	3,0	2,8	2,4	2,3	2,8
Leu	1,9	4,3	7,2	5,9	6,3	8,8	11,1	8,1	5,9	15,7
A	Ser?	Lys	Pro	Thr?	Cys	Pro	Pro	Pro	Glu	Lys
(B)	Cys?	Pro	?	?	Glu?	Leu	Leu	?	?	?

^a: En el ciclo 1, la integración de las PTHs a partir de Met fue distinta a la del resto de los ciclos, dando cuenta del incremento de estas PTHs en los ciclos posteriores.

^b: En este ciclo la PTH correspondiente a carboxamidometil-Cys eluye inmediatamente después de la de Glu.

^c: En este ciclo se produjo un descenso general del rendimiento de todas las PTHs.

de las cadenas pesadas de IgG tienen este azúcar [300]. Esta circunstancia es responsable de la resistencia del enlace Thr-Cys a papaína en las cadenas que portan dicho carbohidrato [299], y puede dar cuenta de la heterogeneidad de la banda B. Según este criterio el residuo N-terminal del Fc será la Cys²²⁹ en aquellas moléculas que carecen del carbohidrato. En las moléculas que lo poseen, la ruptura será asimétrica, siendo la Ser²²¹ en la cadena que lo posee y la Cys²²⁹ en la que no está presente [300].

4.3.4.- DIGESTIÓN CON PAPAÍNA DE LOS COMPLEJOS (^{14}C)C3-IC

Cinco ensayos de interacción entre C3 e IC se digirieron con tripsina y, posteriormente con papaína, en un volumen final de 250 μL . Tras detener la digestión con IA, los complejos se procesaron de tres formas. Una parte (100 μL), se cargó en la columna de PA-S. Otros 100 μL se cargaron en la columna de AF-S. El resto, unos 50 μL , se almacenaron para ser analizados por EGPA-SDS. Se contaron alcuotas de los dos cromatogramas, cuyo resultado se recoge en la Figura 4.11. Las fracciones no retenidas en la PA-S corresponden al Fab y a la papaína; el material retenido corresponde al Fc y a restos, si los hubiere, de IgG no digerida (no obstante, los datos obtenidos muestran que la digestión con papaína es muy eficiente en cuanto a la generación de Fc y Fab). En la columna de AF-S el material no retenido está compuesto por el Fc y por la papaína, mientras que el retenido consta del Fab y de los posibles restos de IgG. Cuando se evalúa el porcentaje del total que queda retenido en cada una de las columnas, éste

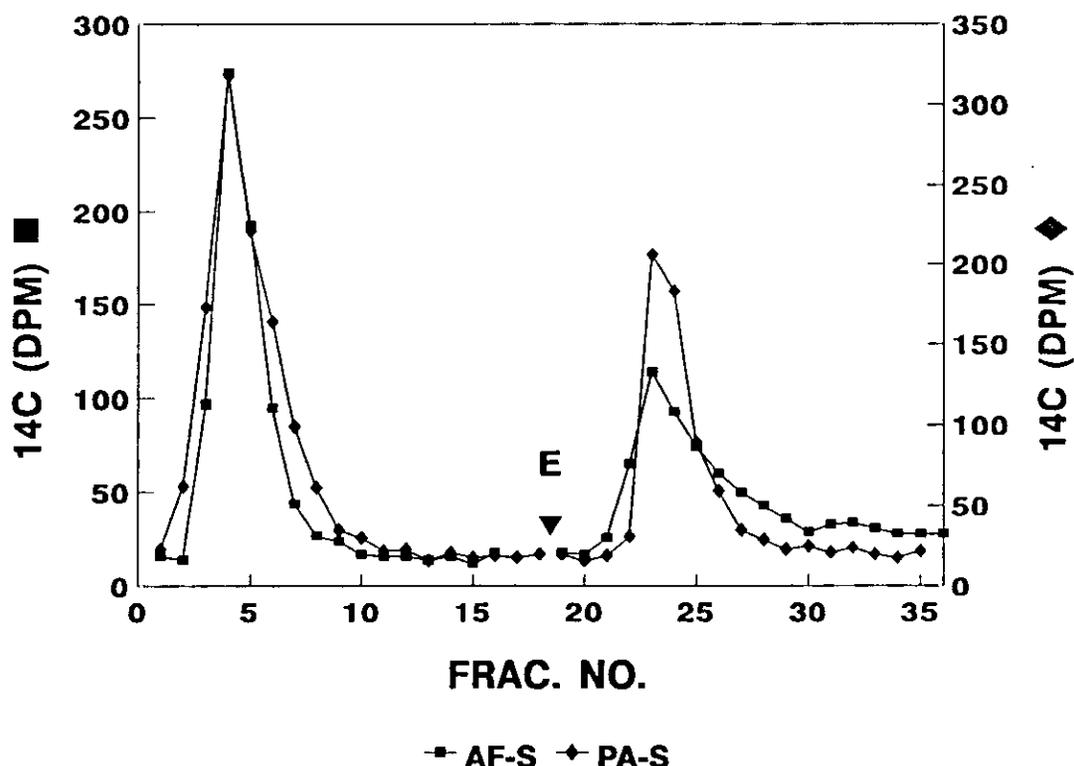


Figura 4.11 Perfiles radioactivos de los cromatogramas en AF-S y PA-S de complejos (^{14}C)C3-IC digeridos con papaína. E se refiere al punto donde se inició la elución del material retenido en cada columna. Se mezclaron las fracciones 3-7 (no retenido) y 21-32 (retenido) en la AF-S y 3-8 (no retenido) y 23-26 (retenido) en la PA-S.

resultó ser de un 45% en la de AF-S y de un 35,5% en la de PA-S, lo que quiere decir que una parte de la radioactividad no queda retenida en ninguna de las columnas (se volverá a este extremo más adelante). Hay que recordar que el resultado de la Figura 4.9 sugirió que C3 se uniría también a la cadena ligera, por lo que parte de la radioactividad retenida en la columna de AF-S sería debida a estos complejos, y no al Fd, lo que podría explicar en parte la mayor cantidad de radioactividad retenida en la columna de AF-S que en la de PA-S. La elución del material retenido en la columna de AF-S presentó un patrón diferente del de la de PA-S, en el sentido de que el máximo fue menor, pero la cola se extendió por un mayor número de fracciones.

Se mezclaron las fracciones correspondientes a las proteínas retenidas y no retenidas en ambas columnas, indicadas en el pie de la Figura 4.11, se precipitaron con acetona, y se analizaron por EGPA-SDS, incluyendo en el mismo la mezcla de la digestión no fraccionada. En este gel también se incluyó un control con SHN-EDTA digerido con papaína. Este gel y su correspondiente fluorografía se recoge en la Figura 4.12. En el gel (Fig. 4.12A) se aprecia la heterogeneidad del fragmento Fc aludida en el apartado anterior (véase, por ejemplo, la calle 3 en donde se alude a ellas con la misma nomenclatura: A y B). En esta Figura se observa el comportamiento esperado del Fc y del Fab en estas columnas. El Fc queda retenido en la columna de PA-S (calle 2) y eluye libremente en la de AF-S (calle 4), mientras que el Fab eluye en la primera (calle 1) y se retiene en la segunda (calle 3). En la autorradiografía (Figura 4.12B) aparecen tres bandas radioactivas en los ensayos, que no aparecen en el control (calle 6), marcadas de I a III. Las bandas I y III tienen un comportamiento idéntico en las dos columnas: se retienen en PA-S y eluyen libremente en AF-S. La banda II, por el contrario, no se retiene en la primera, y sí lo hace en la segunda. Estos comportamientos, y los Mr de las bandas correspondientes, sugieren la siguiente asignación:

- La banda I estaría formada por complejos entre el Fc y un fragmento de unos 2kDa de C3.
- La banda II se compondría del mismo fragmento de C3 unido ahora al Fd.

En cuanto a la banda III, su asignación resulta más complicada. Su Mr es compatible con que se trate de complejos entre restos de cadena pesada no digerida y el fragmento de C3. No obstante, no se aprecian restos de cadena pesada en los geles (Figura 4.12A) y, en cualquier caso, de tratarse de cadena pesada, debería quedar retenida en la columna de AF-S, cosa que no ocurre. Por otra parte, su Mr y los experimentos de tratamiento con NH_2OH del siguiente apartado son

compatibles con que se trate de un complejo entre el Fc y un fragmento de C3 de unos 30-35kDa, que sería similar o idéntico a C3d.

Un resultado destacado que se obtiene de la Figura 4.12 es que C3 parece unirse tanto al Fab como al Fc (manifestado como la radioactividad presente en las bandas I y II) y, lo que es más importante, en proporciones similares, según se estima por la intensidad de ambas bandas. Este punto se discutirá más adelante.

4.3.5.- SENSIBILIDAD A NH₂OH DE LOS COMPLEJOS

Dada la sensibilidad de los complejos entre C3 e IgG a NH₂OH [263, 291], se comprobó la sensibilidad a este reactivo de los complejos del apartado anterior, con el fin de confirmar la presencia de C3 como causa de la radiactividad. Se prepararon cinco ensayos de interacción, para obtener complejos (¹⁴C)C3-IC, además de un control. Ambos se digirieron con tripsina y con papaína, (en el caso de los ensayos en un volumen final de 250 μL). El control y 10 μL de los ensayos se almacenaron sin procesar para un gel de EGPA-SDS. Otros 40 μL de los ensayos se trataron con NH₂OH y se guardaron tras la diálisis para cargar en el gel. El resto de los ensayos se fraccionó en la columna de AF-S. Las fracciones correspondientes al material retenido y no retenido se mezclaron por separado, y tres cuartas partes de cada una se trataron con NH₂OH antes de cargar en el gel, mientras que el resto se cargó en el gel sin procesar. Finalizado el tratamiento todas las muestras se analizaron por EGPA-SDS al 12,5% de acrilamida, cuyo resultado se recoge en la Figura 4.13. Los datos de la fluorografía (Figura 4.13B) demuestran que las bandas radioactivas presentes en estos experimentos son sensibles a tratamiento con NH₂OH. Otra explicación posible a la desaparición de las bandas radioactivas en las muestras tratadas con este reactivo, podría ser que, como consecuencia de los pasos seguidos con estas muestras hasta el gel, la cantidad de proteína recuperada fuera notablemente inferior a la de los controles no tratados. Sin embargo, la comparación de la cantidad de proteína de estas muestras en el gel (Fig. 4.13A) y en de la radioactividad en la autorradiografía (Fig. 4.13B) confirman esta sensibilidad. Esta característica ratifica su asignación como complejos entre un fragmento de C3 y el Fc o el Fd. La presencia de una banda radioactiva con un Mr de unos 30-35kDa, ligeramente superior al de la banda I, en las calles 4 y 8 (mezcla de digestión y material no retenido en la columna de AF-S tratados con NH₂OH, respectivamente), así como la desaparición de la mayoría de la banda III (las mismas calles), es compatible con la asignación de ésta realizada en el apartado anterior, dado que el Mr de C3d es de unos 35kDa [109].

A

B

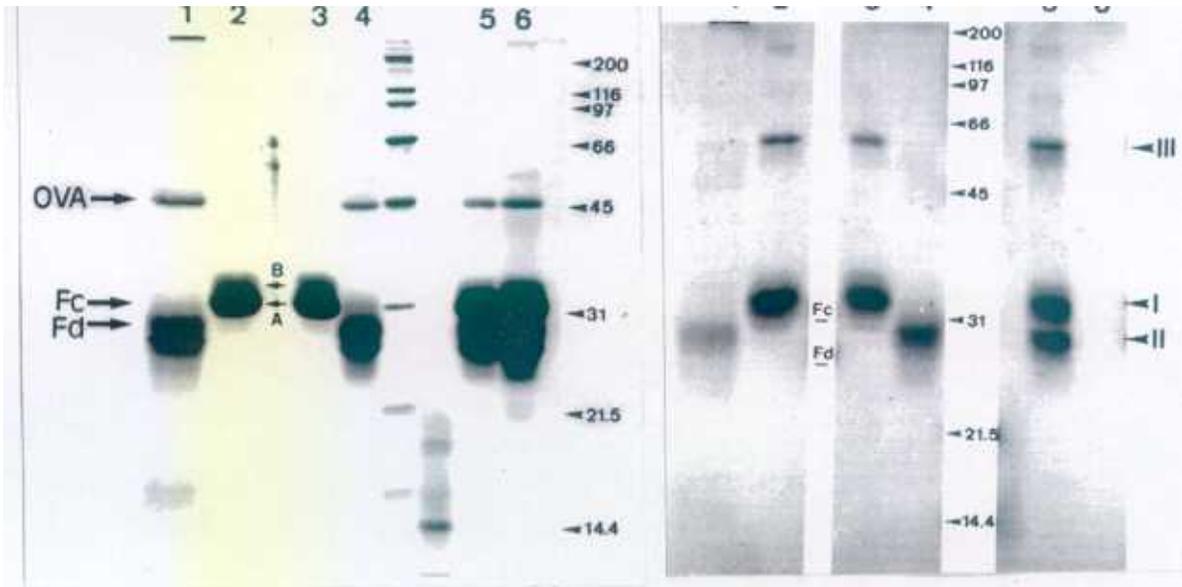


Figura 4.12 A) EGPA-SDS al 12,5% correspondiente a los cromatogramas de la Figura 4.11. Calle 1: material no retenido en PA-S; calle 2: material retenido en esta columna; calle 3: material no retenido en AF-S; calle 4: material retenido en la misma; calle 5: mezcla de digestión de los ensayos; calle 6: mezcla de digestión de un control con SHN-EDTA. B) Fluorografía correspondiente a este gel.

A

B

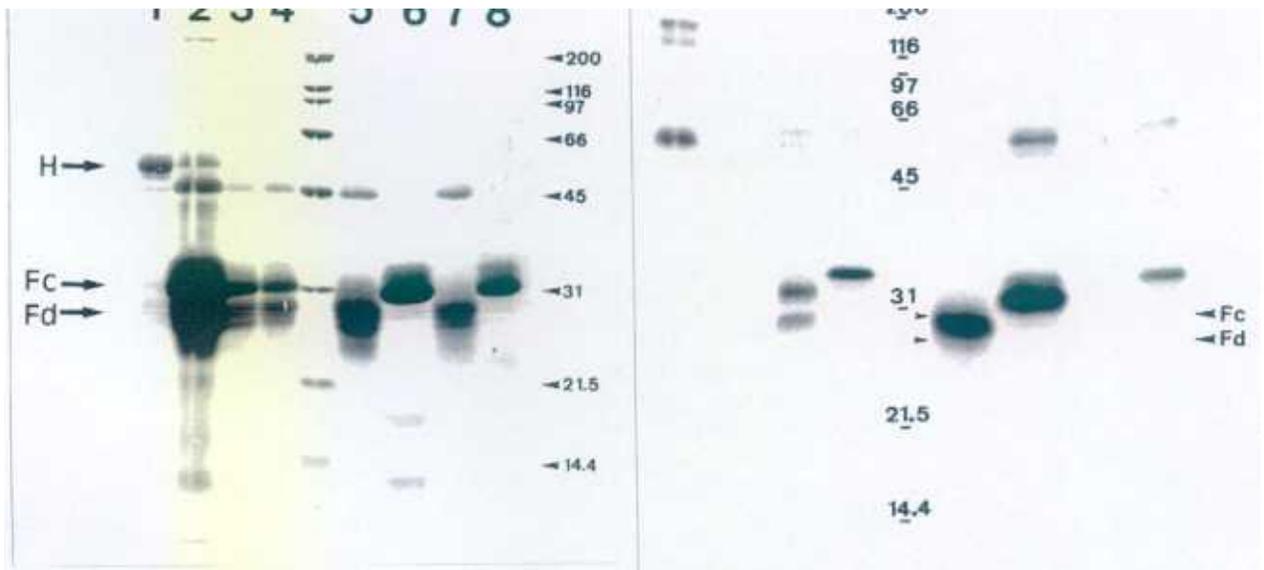


Figura 4.13 A) EGPA-SDS de un experimento de tratamiento con NH_2OH de complejos digeridos con papaína. Calle 1: complejos (^{14}C)C3-IC digeridos con tripsina; calle 2: control con SHN-EDTA digerido con papaína; calle 3: complejos digeridos con papaína; calle 4: los mismos complejos tratados con NH_2OH ; calle 5: material procedente de los complejos digeridos con papaína y retenido en la columna de AF-S; calle 6: material no retenido en ésta columna; calle 7: la misma muestra de la calle 5, tratada con NH_2OH ; calle 8: la misma de la calle 6, tratada con NH_2OH . B) Fluorografía de este gel.

4.3.6.- NATURALEZA DEL FRAGMENTO DE C3 UNIDO AL Fc Y AL Fd

Con el fin de confirmar que C3 es el causante de la radioactividad presente en los geles, se digirió con papaína el fragmento de ^{14}C -C3(NH₂OH) previamente digerido con tripsina (apartado 4.3.2). El digerido se analizó recromatografiándolo en el Bio-Gel P-6. El perfil radioactivo se muestra en la Figura 4.14. En ella se recoge también la secuencia radioquímica obtenida previamente al cromatograma. En la Figura 4.15 se presentan los cromatogramas obtenidos al cargar los dializados de los tratamientos con NH₂OH (procedente del Fc en 4.15A y de una mezcla de Fc y Fd en 4.15B). En esta Figura se presentan también las secuencias radioquímicas obtenidas de los distintos picos. Como se ve en estas Figuras, tanto por el patrón cromatográfico, como por las secuencias obtenidas, la digestión con papaína de C3 es heterogénea. La secuencia mayoritaria presenta como residuo *N*-terminal a la Cys¹⁰¹⁰ marcada. Minoritariamente, también se detecta radioactividad en el ciclo 5. El rendimiento de la secuencia donde la radioactividad se encontraba en el ciclo 1 fue, en general, muy bajo (4-16%). Se ha descrito previamente el bloqueo parcial del *N*-terminal cuando éste es un residuo de carboximetil-

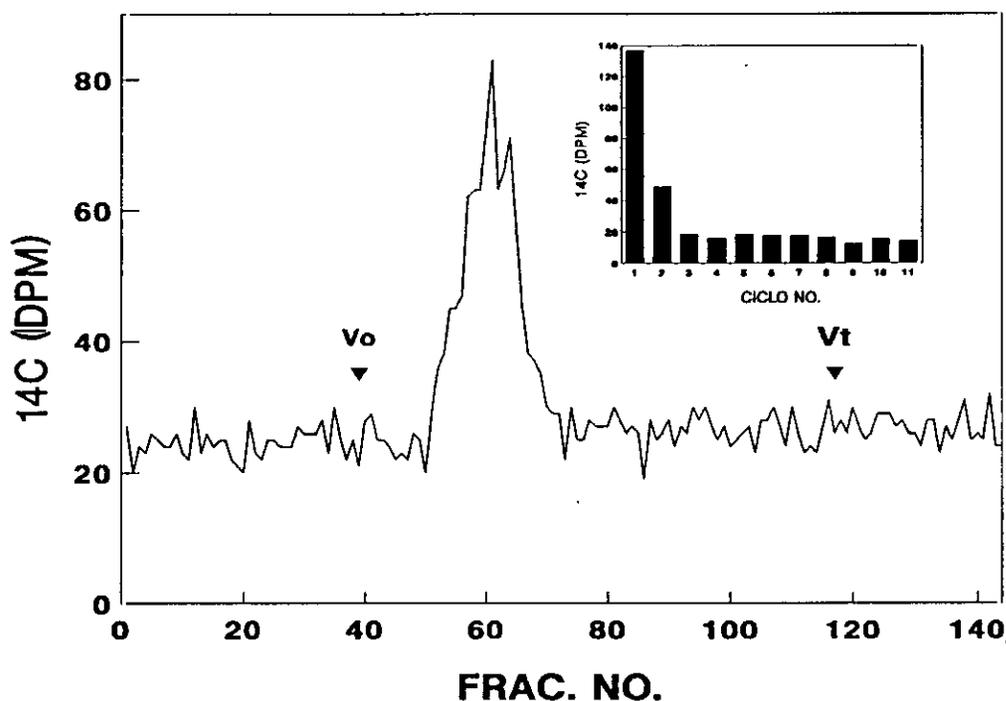


Figura 4.14 Cromatografía en el Bio-Gel P-6 de una muestra de ^{14}C -C3(NH₂OH) digerida con tripsina y con papaína. Se incluye también, en el recuadro interior, la secuencia radioquímica previa al cromatograma.

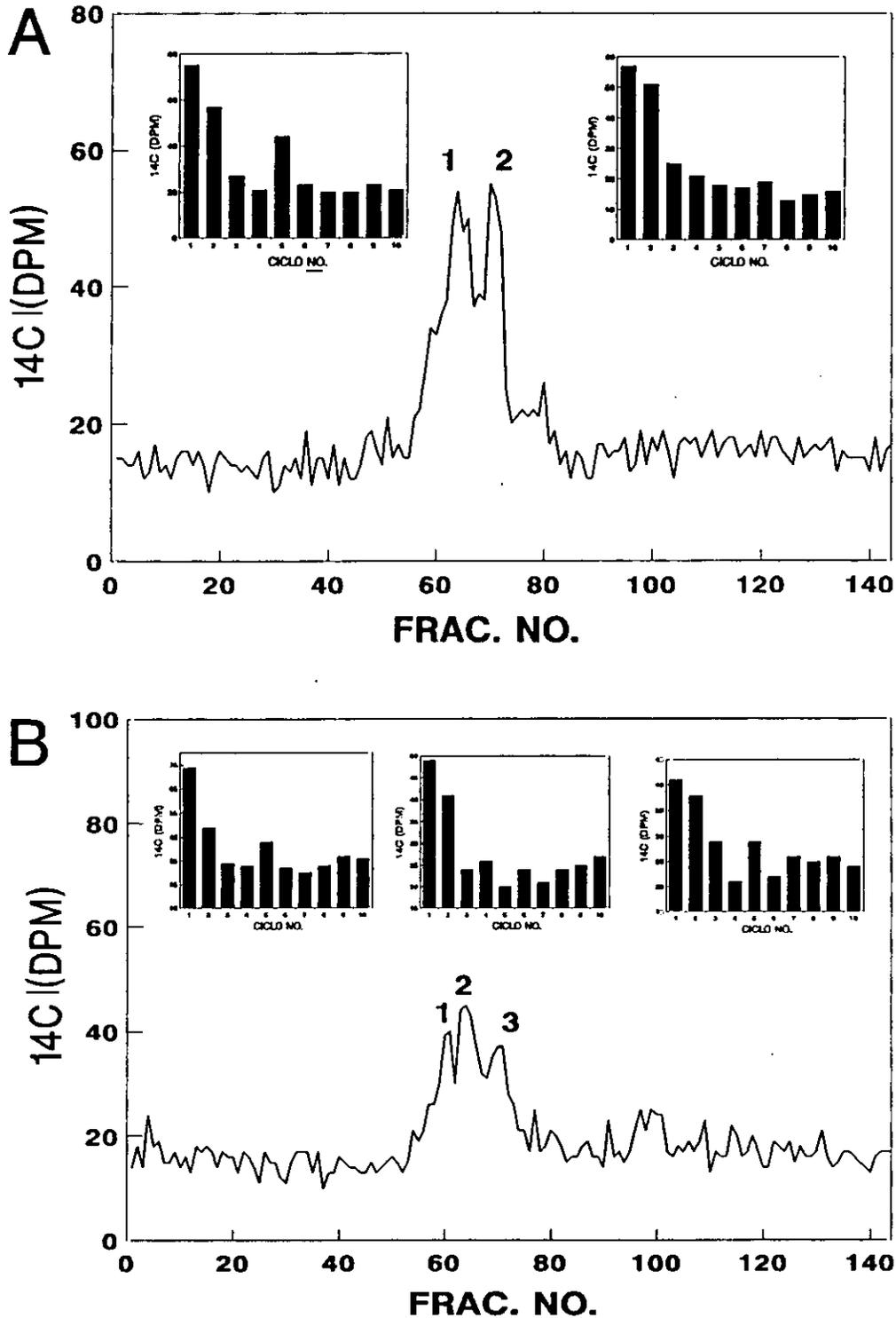


Figura 4.15 Cromatografía en el Bio-Gel P-6 del material radioactivo eluido de complejos digeridos con papaína por tratamiento con NH_2OH . A) Procedente del material no retenido en la columna de AF-S (compuesto por Fc). B) Procedente de una mezcla del material retenido y del no retenido en esta columna. Se incluyen en cada caso las secuencias radioquímicas obtenidas, en orden, de los picos numerados.

Cys [299], lo que puede dar cuenta del bajo rendimiento obtenido de la radioactividad en el primer ciclo. Este bloqueo puede, sin embargo, aumentar el rendimiento relativo del ciclo 5, llevando a una sobrevaloración de su representación en la muestra. Ello sugiere que la digestión parcial que deja a Cys¹⁰¹⁰ en posición 5 está representada minoritariamente en la muestra.

Estos datos, comparando la secuencia obtenida de C3 purificado con la del material eluido de los complejos con NH₂OH, así como su volumen de elución en el Bio-Gel P-6, confirman que un fragmento de C3 es el componente radioactivo de los complejos con Fc y Fd, y que éste es liberado cuando los complejos son tratados con NH₂OH. Existen varias causas posibles para explicar la heterogeneidad de estas digestiones. La más probable se refiere a heterogeneidad en la región C-terminal, además de la N-terminal que da lugar a secuencias con la radioactividad en los ciclos 1 y 5. Existen otras posibles causas, que se discutirán más adelante en el caso de las digestiones con pepsina (apartado 4.4.5).

4.4.- FORMACIÓN DE COMPLEJOS COVALENTES ENTRE C3 Y EL DOMINIO C γ 3

4.4.1.- DIGESTIÓN CON PEPSINA DE LOS COMPLEJOS (¹⁴C)C3-IC

Complejos (¹⁴C)C3-IC se digirieron con pepsina. Tras la digestión se separaron por centrifugación sobrenadante y precipitado. Este último contiene al F(ab')₂ que, merced a su divalencia, permanece precipitado en presencia del antígeno; se encuentran aquí, además, restos de IgG no digerida. En el sobrenadante se encuentran el pFc', péptidos del C γ 2, y los producidos por la digestión de C3, y de los dímeros C3-C3 presentes en los IC [292]. Finalmente, se cargaron en geles de EGPA-SDS en gradiente del 10 al 15% y los geles se sometieron a fluorografía. El resultado de este experimento se recoge en la Figura 4.16: 4.16A corresponde al gel teñido, y 4.16B a la fluorografía. La comparación de las calles 6 y 7, precipitado y sobrenadante de los ensayos, con las correspondientes a las de los controles, calles 8 y 9, de la Figura 4.16A, revela dos diferencias importantes entre ambos. Por una parte, la presencia de la cadena β de C3 en los ensayos, especialmente en el sobrenadante, y que está ausente en los controles. Por otro lado, en los ensayos queda una cantidad apreciable de cadena pesada del anticuerpo no digerida, mientras que en los controles la digestión es prácticamente total. Hay que tener en cuenta que, a la hora de calcular la relación E:S se tomó en consideración la cantidad de C3 unido, según el cálculo del apartado 4.2. Ello excluye la posibilidad de un descenso de la relación E:S como causa de la mayor resistencia de la cadena pesada en los ensayos.

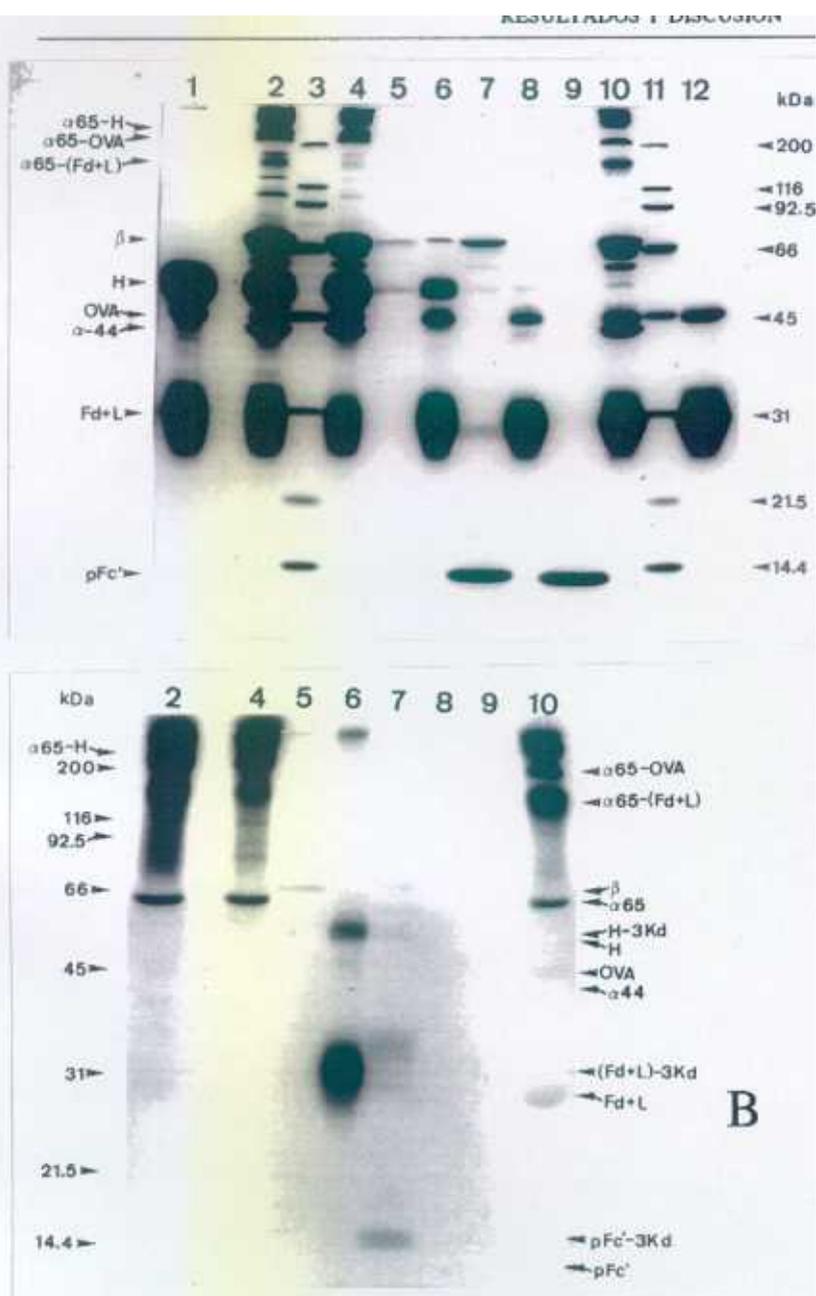
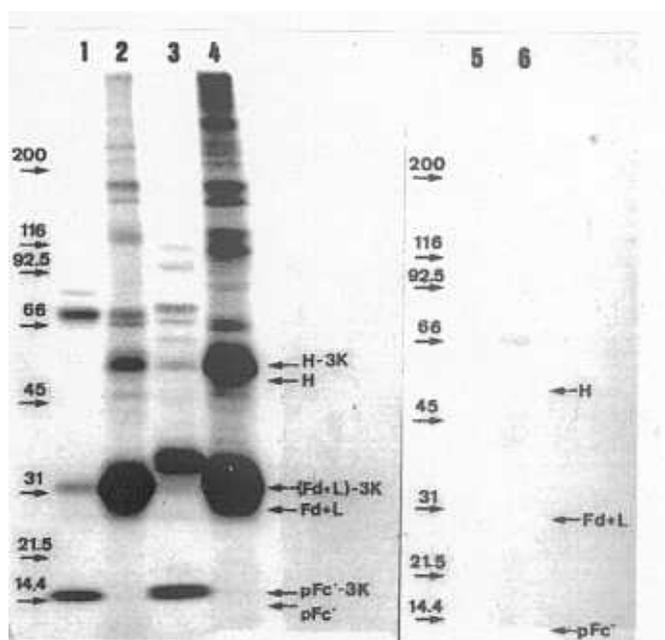


Figura 4.16 A) EGPA-SDS en gradiente 10-15% de ensayos digeridos con pepsina. Calle 1: IC control; calle 2: complejos ^{125}I -C3-IC no digeridos; calles 3 y 4: patrones de peso molecular digeridos; calle 4: complejos como los de la calle 2 incubados en las mismas condiciones que la gestión, pero sin enzima; calle 5: sobrenadante de esta incubación; calle 6: precipitado de los complejos digeridos con pepsina; calle 7: sobrenadante de estos ensayos; calle 8: precipitado de los controles con SHN-EDTA digeridos con pepsina; calle 9: sobrenadante de estos controles; calle 10: ensayos obtenidos con $\text{C}3\text{-F(ab')}_2$; calle 12: IC- F(ab')_2 control. B) Fluorografía de este gel. En los márgenes de A y B se indican, además de los patrones de peso molecular, la composición de alguna de las bandas.

Figura 4.17 Fluorografía de un gel de EGPA-SDS en gradiente 10-15% de ensayos preparados con suero humano o de conejo digeridos con pepsina. Calle 1: sobrenadante de complejos con SCN-Chelex digeridos; calle 2: precipitado de esta digestión; calle 3 y 4: sobrenadante y precipitado de la digestión de complejos obtenidos con SHN-Chelex; calles 5 y 6: sobrenadante y precipitado de controles con SCN-EDTA digeridos.



La fluorografía de este gel (Figura 4.16B) muestra diferencias aún más palpables. Mientras que en los controles no se aprecia ninguna banda marcada, en los ensayos sí se detectan. En el precipitado, se identifican dos mayoritarias, la principal a la altura de la posición de Fd + L, aunque con un Mr del orden de 3kDa superior al de éstas. La banda minoritaria aparece 3kDa por encima de la cadena pesada (H) del anticuerpo. En el sobrenadante se identifica una banda que aparece con un Mr ligeramente superior al del pFc'. Estos datos sugieren que un fragmento de C3, que contiene el grupo carbonilo, permanece unido, tras la digestión, a la cadena H, al Fd (y probablemente también a la ligera) y al pFc'. Dicho fragmento tendría un peso molecular de unos 3kDa.

Cuando la fuente de complemento es suero de conejo, para buscar un sistema autólogo en el que anticuerpo y complemento procedan de la misma especie, el resultado es idéntico, y se recoge en la fluorografía de la figura 4.17. En este caso, la banda radioactiva correspondiente a los complejos aparece con un Mr ligeramente inferior al equivalente humano. Ello puede explicarse si el fragmento péptico de C3 que contiene el punto de unión es de menor tamaño en el caso de conejo que en el de C3 humano.

4.4.2.- PRESENCIA DE C1q EN LOS COMPLEJOS

La resistencia de una parte considerable de la cadena H a la digestión se puede explicar de diversas formas. Una de ellas podría ser que el C γ 2 también sirviera de sustrato a la unión covalente de C3, y que su unión protegiera a este dominio de la acción de la pepsina. Otra posibilidad la constituye la posible presencia de C1q en los complejos, tal y como se sugirió en el apartado 4.2. C1q está presente en el SHN-Chelex y se une a la IgG a través del C γ 2. Por ello podría participar en la protección de este dominio de la acción de la pepsina, siempre y cuando estuviese presente en los complejos C3-IC y no en los controles. Para comprobar esta segunda posibilidad, se realizaron ensayos de interacción entre C3 e IC utilizando SHN-Chelex a los que se añadió ^{125}I -C1q, con una actividad específica final de 4300 cpm/ μg . Los complejos resultantes se analizaron en un gel de EGPA-SDS en gradiente 10-15% del que se obtuvo una autorradiografía, que se recoge en la Figura 4.18. De estos experimentos se desprende que C1q está presente en los IC, tanto en los ensayos como en los controles. Incluso la radioactividad incorporada es mayor en los controles (calles 4 y 5), tal y como era de esperar a tenor de los experimentos mostrados en la Figura 4.3. Sin embargo, la digestión de la cadena pesada de los ensayos, en IC preparados con ^{125}I -IgG, es más ineficiente que la de los controles (compárense



Figura 4.18 Autorradiografía de ensayos realizados con ^{125}I -C1q o ^{125}I -IgG. Calle 1: corresponde a una tira del gel teñido, donde se cargó el ^{125}I -C1q; calle 2: autorradiografía de la calle 1; calle 4: controles con SHN-EDTA en presencia de ^{125}I -C1q; calle 5: ensayos en presencia de ^{125}I -C1q; calle 6: ^{125}I -IC; calles 7 y 8: precipitado y sobrenadante, respectivamente, de ensayos con ^{125}I -IC digeridos con pepsina; calles 9 y 10: las mismas muestras obtenidas ahora con controles con SHN-EDTA. A, B, y C corresponden a las tres cadenas de C1q.

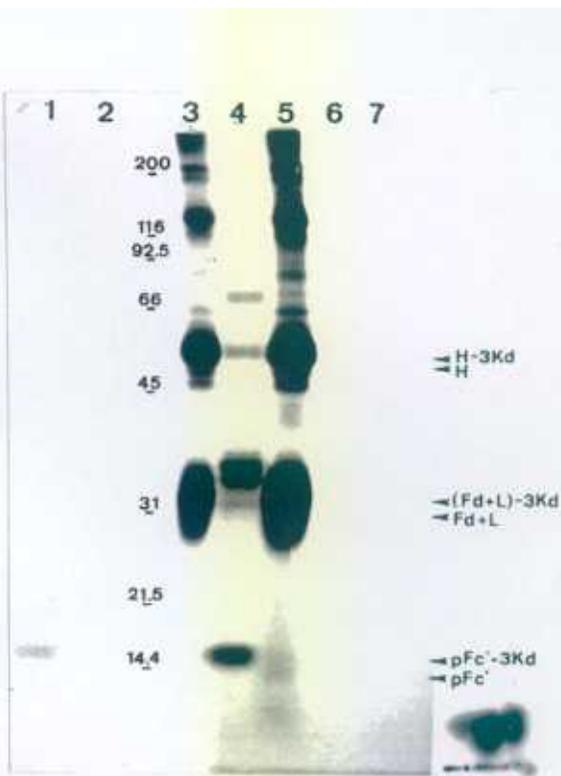


Figura 4.19 Fluorografía de un gel de SDS-PAGE en gradiente 10-15%. Calle 1: inmunoprecipitación con anti-Fc-Sepharose del sobrenadante de la digestión con pepsina de complejos (^{14}C)C3-IC; calle 2: el mismo digerido, precipitado ahora con IgG-Sepharose; calle 3 y 5: precipitados de estas digestiones con pepsina; calle 4: sobrenadante de estas digestiones no sometido a inmunoprecipitación; calles 6 y 7: sobrenadante y precipitado de la digestión de un control con SCN-EDTA.

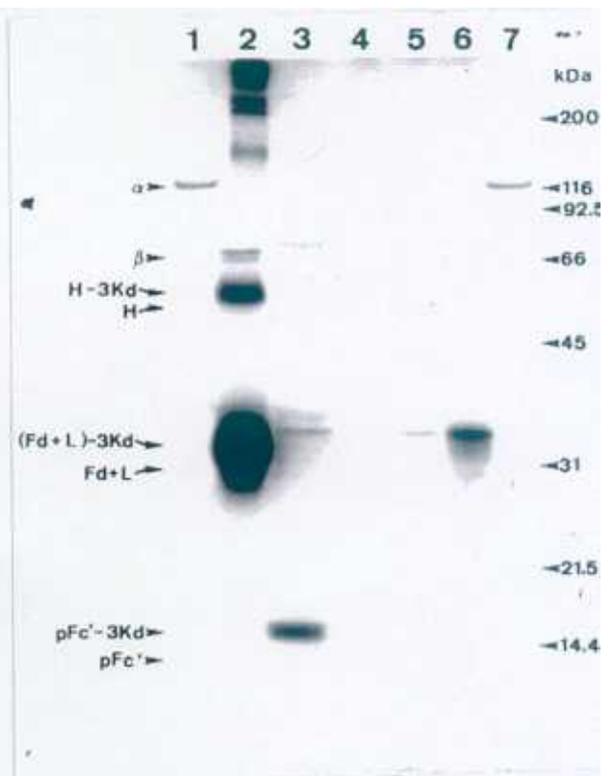


Figura 4.20 Fluorografía de un gel de SDS-PAGE en gradiente 10-15%. Carriles 1 y 7: ^{14}C -C3(NH_2OH); calles 2 y 3: precipitado y sobrenadante de ensayos de interacción digeridos con pepsina; calles 5 y 6: sobrenadante y precipitado de la misma digestión, después de tratamiento con NH_2OH .

las calles 7 y 9). De ello se desprende que C1q no es responsable de la mayor resistencia a la pepsina de los complejos C3-IC frente a los controles, dejando abierta la posibilidad que asignaba a C3 ese efecto. Recordemos que un posible descenso en la relación E:S como consecuencia de la presencia de C3 ya se excluyó en el apartado anterior.

4.4.3.- INMUNOPRECIPITACIÓN DE LOS COMPLEJOS pFc'-3kDa CON ANTI-Fc-SEPHAROSE

El sobrenadante de la digestión con pepsina de (¹⁴C)C3-IC se incubó con anti-Fc-Sepharose, o con IgG-Sepharose, como control. Tras cargar el material retenido en los dos casos en un gel de EGPA-SDS (10-15%) y someter éste a fluorografía, se obtiene el resultado recogido en la Figura 4.19. La inmunoprecipitación del complejo del sobrenadante con inmunoabsorbente específico del Fc (calle 1), y su ausencia en el control con IgG inespecífica (calle 2), confirma la interpretación de estos complejos como un aducto entre un fragmento de 3kDa de C3 y el pFc'. Con este experimento se desecha la posibilidad de que, suponiendo que el dominio Cγ1 sea el sitio aceptor mayoritario de C3 tal y como se ha propuesto [258], la digestión péptica generase un fragmento que incluyera este dominio y que tuviera un Mr similar al del pFc'. Aunque el rendimiento de este fragmento fuera muy bajo, podría dar cuenta de la radioactividad asignada a los complejos con el pFc'. De haber ocurrido ésto, ni el control con IgG-Sepharose, ni el inmunoprecipitado con a-Fc deberían haber precipitado ninguna banda radioactiva.

4.4.4.- SENSIBILIDAD A NH₂OH DE LOS COMPLEJOS

Los experimentos de las Figuras 4.16 y 4.17 sugieren que un fragmento de C3 de unos 3kDa está unido tanto al Fd como al pFc'. Con el fin de comprobarlo, los complejos entre este fragmento de C3 y el Fd y el pFc' se trataron con NH₂OH, según el protocolo especificado en MATERIALES Y MÉTODOS. Tras analizar en un gel de EGPA-SDS los productos de las

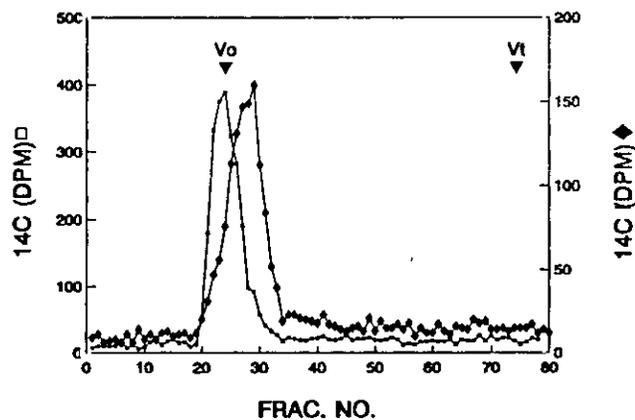


Figura 4.21 Cromatografía en Sephadex G-25 del sobrenadante de una digestión con pepsina antes (■) y después (◆) de tratamiento con NH₂OH.

digestiones, con o sin tratamiento con NH_2OH , y de someter el gel a fluorografía, el resultado obtenido es el que aparece en la Figura 4.20. Como se ve en esta Figura, el fragmento marcado incorporado a los complejos es sensible a NH_2OH , lo que concuerda con la asignación realizada en los apartados anteriores. En la Figura 4.21 se recoge el perfil de elución en una columna de Sephadex G-25 del sobrenadante de una digestión péptica de los complejos antes y después de tratamiento con NH_2OH . Como se puede observar, los complejos digeridos eluyen dentro del volumen de exclusión, mientras que tras el tratamiento, la mayoría de la radioactividad se desplaza a volúmenes de elución mayores, lo que implica la liberación, merced al tratamiento, de un péptido que entra ahora dentro del intervalo de resolución de la columna.

4.4.5.- NATURALEZA DEL FRAGMENTO DE C3 UNIDO AL pFc' Y AL Fd

Las muestras de ^{14}C -C3(NH_2OH) digeridas con pepsina y cargadas en la columna de Bio-Gel P-4 dan como resultado el perfil de radioactividad recogido en la Figura 4.22. El pico I, que corresponde al volumen de exclusión, da lugar, en función de la relación E:S utilizada, a 1 ó 2 bandas radioactivas en un gel de EGPA-SDS al 10% (calles 2 Y 3). El material radioactivo resuelto, picos II y III, no da ninguna banda en el mismo gel (calle 4 del inserto). La posición de elución del glucagón, de un peso molecular de 3,6kDa [301], permite asignar un peso molecular a los fragmentos del orden de 3-3,5kDa. Este valor encaja bien con el derivado del incremento del Mr de los complejos respecto al de los fragmentos del anticuerpo. La imposibilidad de detectar este fragmento en geles de EGPA-SDS puede ser debida a dos factores que impedirían su fijación en el gel: su pequeño tamaño y la poca cantidad, en peso, cargada en los geles.

Cuando en esta misma columna se cargan los dializados del tratamiento con NH_2OH , tanto del sobrenadante como de una mezcla de precipitado y sobrenadante, el resultado obtenido es el que se recoge en la Figura 4.23, donde el perfil A, línea continua, corresponde al sobrenadante, y el B, línea discontinua, a la mezcla. El volumen de elución de los picos mayoritarios (A-II y B-II) coincide con el del pico II de la digestión de ^{14}C -C3(NH_2OH) (Figura 4.22).

Los picos procedentes del Bio-Gel P-4 de la digestión péptica de ^{14}C -C3(NH_2OH) inyectados en HPLC dan lugar a los patrones cromatográficos recogidos en las Figuras 4.24 y 4.25, en los sistemas de acetato/acetonitrilo y TFA/TFA-acetonitrilo, respectivamente. En la Figura 4.26 se representan los de los eluidos del fragmento de C3 liberado de los complejos por NH_2OH . Los picos se numeraron después de comparar los perfiles de A-I (4.26A) con B-I

(4.26C) y A-II (4.26B) con B-II (4.26D), muchos de los cuales coinciden. En estas Figuras se muestran las secuencias radioquímicas obtenidas a partir de los picos indicados. Las secuencias revelan la heterogeneidad de estos péptidos en la región *N*-terminal, con dos posibles sitios de ruptura, que dejan a la Cys¹⁰¹⁰ marcada en posición 4 ó en posición 7. Esto corresponde a la secuencia:



donde las rupturas proteolíticas tendrían lugar en Leu¹⁰⁰³-Ile¹⁰⁰⁴ y en Thr¹⁰⁰⁶-Pro¹⁰⁰⁷ (Ile y Pro en negrita en la secuencia). Ambos son sitios de ruptura posibles dentro de los descritos para esta enzima, algunas de las cuales incluye a Pro en posición P1' [302]. De hecho, rupturas idénticas a éstas se han obtenido con C4 [303] y con α_2 -macroglobulina, [304], proteínas con secuencias muy homólogas a C3 en esta región (Figura 1.5 de la INTRODUCCIÓN).

Cuando los complejos generados con suero de conejo se procesan de forma similar a ésta, los resultados obtenidos también son comparables. La Figura 4.27 recoge los perfiles de elución del material radioactivo del Bio-Gel P-4 de complejos (Fd+L)-3kDa (línea discontinua) y pFc'-3kDa (línea continua) tratados con NH₂OH. El volumen de elución fue mayor que el del fragmento humano, lo que concuerda con el menor Mr de los complejos obtenidos con C3 de conejo (Fig. 4.17). En la Figura 4.28 se incluyen los perfiles de material radioactivo de cromatogramas de HPLC de estos fragmentos, y la secuencia obtenida de algunos de ellos. Igual que en el caso de C3 humano, el patrón de HPLC es heterogéneo y, por tanto, la ruptura también lo es. Genera dos tipos de fragmentos, en lo que se refiere al *N*-terminal, unos con radioactividad en el ciclo 4 y otros en el ciclo 7. De ello se concluye que la digestión es idéntica a la de C3 humano, en lo que se refiere al *N*-terminal, sugiriendo la probabilidad de que las proteínas con tioéster presenten un patrón de digestión péptica similar. Ello coincide con la homología de secuencia de estas proteínas y con su más que probable similitud de estructura tridimensional.

En estos cromatogramas contrasta la homogeneidad de los digeridos de ¹⁴C-C3(NH₂OH) (dos picos mayoritarios y otros dos minoritarios), frente a la heterogeneidad del material eluido de los complejos tras tratamiento con NH₂OH. Existen varias explicaciones posibles a este fenómeno. En primer lugar, podría tratarse de péptidos no procedentes de C3 y que coeluyeran en el Bio-Gel P-4 con los obtenidos a partir de ¹⁴C-C3(NH₂OH); esta posibilidad es incompatible con los datos obtenidos en éste y en apartados anteriores, en los que se muestra que la radioactividad incorporada a los complejos es exclusivamente debida a C3. También es

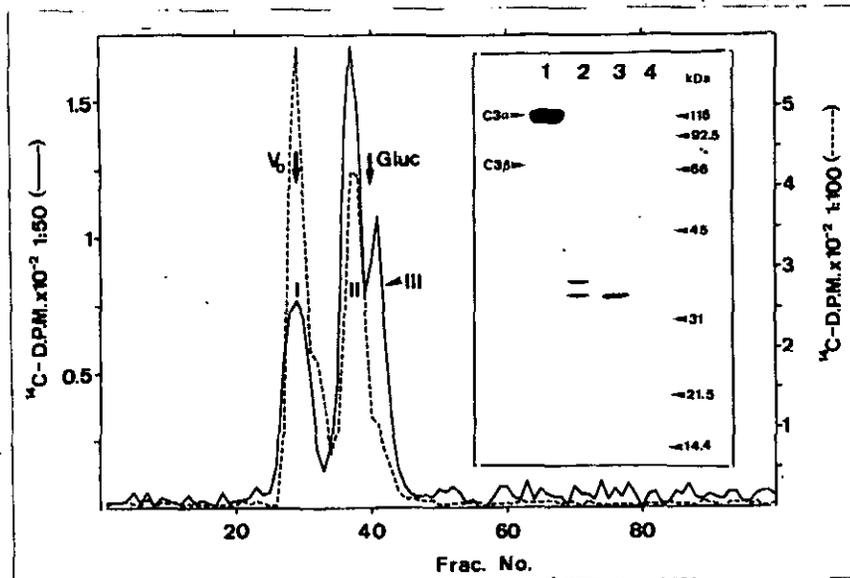


Figura 4.22 Cromatografía en Bio-Gel P-4 de dos muestras de ^{14}C -C3(NH₂OH) digeridas con pepsina en una relación E:S en peso de 1:50 (—) o 1:100 (---). Gluc indica la posición de elución del glucagón. Se incluye la fluorografía de un gel de EGPA-SDS al 10%. Calle 1: C3(NH₂OH); calle 2: pico I de la relación 1:100; calle 3: el mismo pico de la relación 1:50; calle 4: pico II de la relación 1:50.

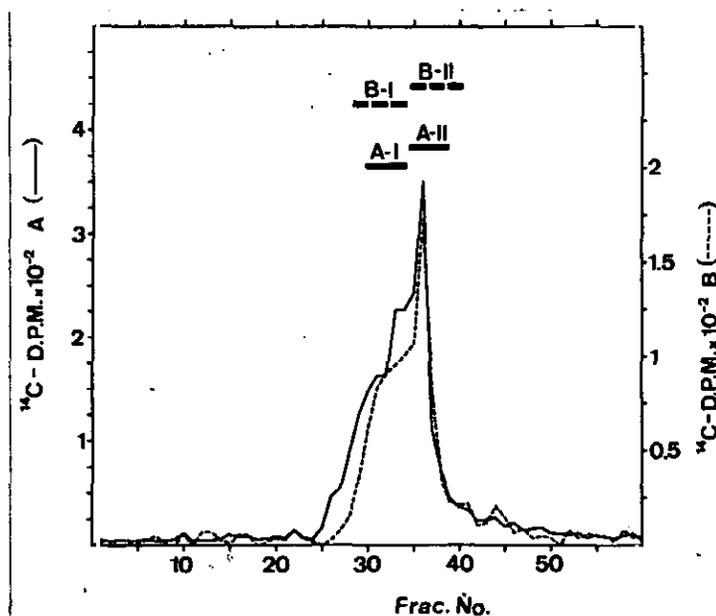


Figura 4.23 Perfil de elución de los fragmentos radioactivos eluidos con NH₂OH de complejos con el pFc' (—) o de una mezcla de complejos con pFc' y F(ab')₂ (---).

incompatible con los datos de secuencia obtenidos, que demuestran la procedencia de C3 de estos péptidos. Otra posibilidad es que C3 unido a la IgG se fragmente por la pepsina de forma diferente a como lo hace cuando está aislado; esta explicación es compatible con la mayor heterogeneidad del Bio-Gel P-4. Otra posibilidad, que no excluye a la anterior, se basa en la existencia de una porción de los complejos C3-C3 presentes en el IC que son resistentes a NH₂OH, y que estarían presentes en los sobrenadantes de las digestiones. Otro factor que puede contribuir a la heterogeneidad de la muestra la constituyen las modificaciones que produce la

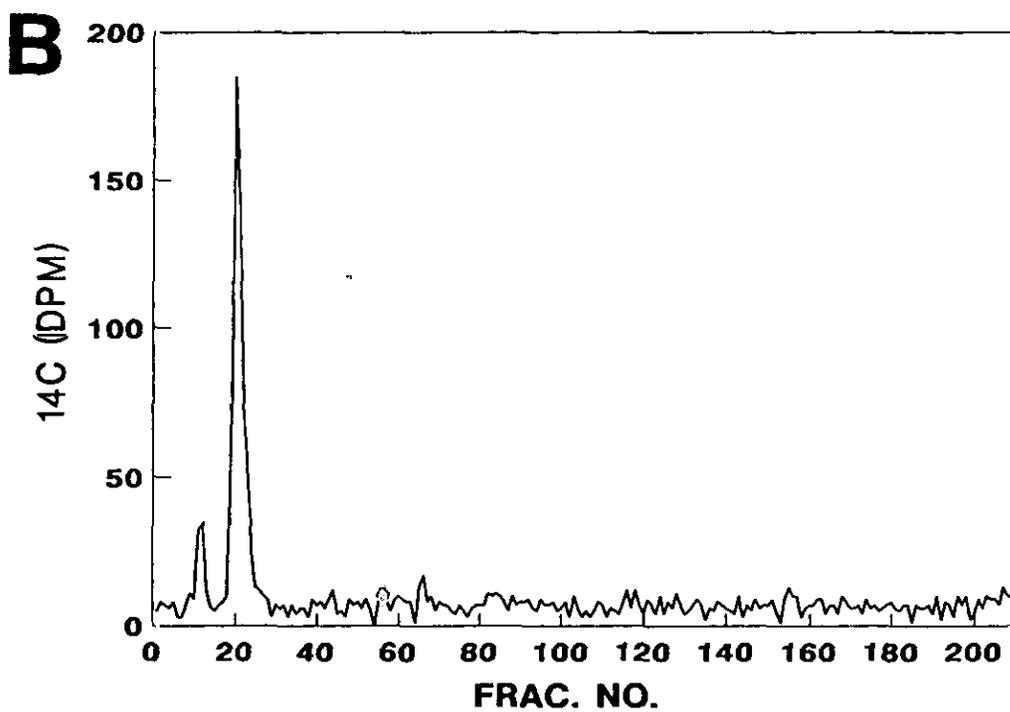
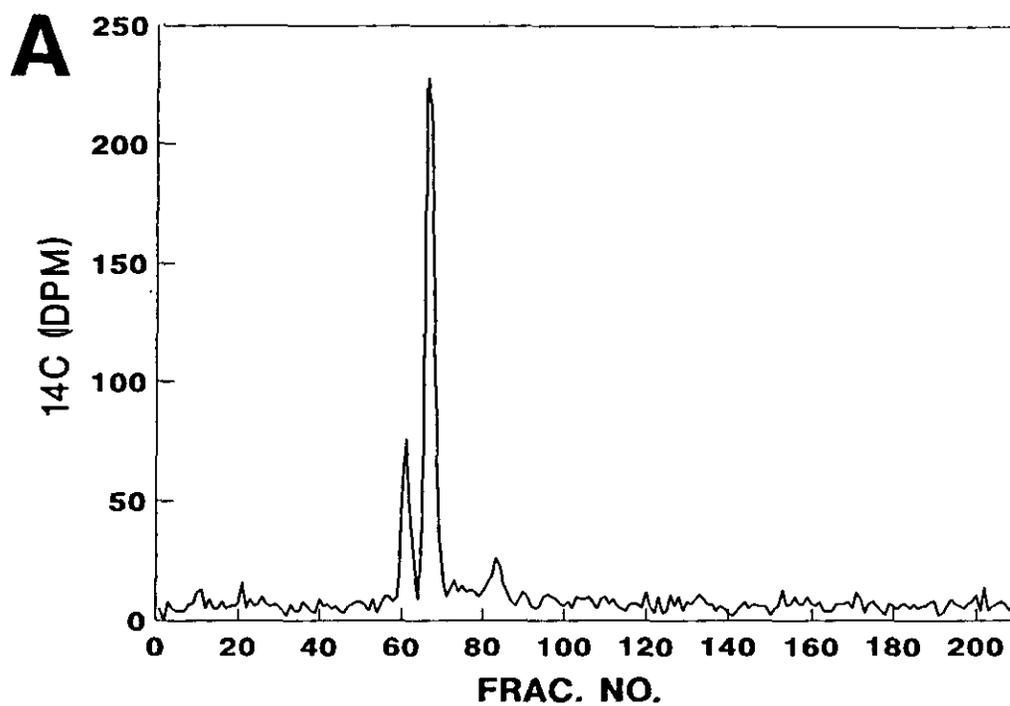


Figura 4.24 HPLC de fase reversa en el sistema de acetato/acetonitrilo de los picos procedentes de la Figura 4.22. A) Pico II de esa Figura. B) Pico III.

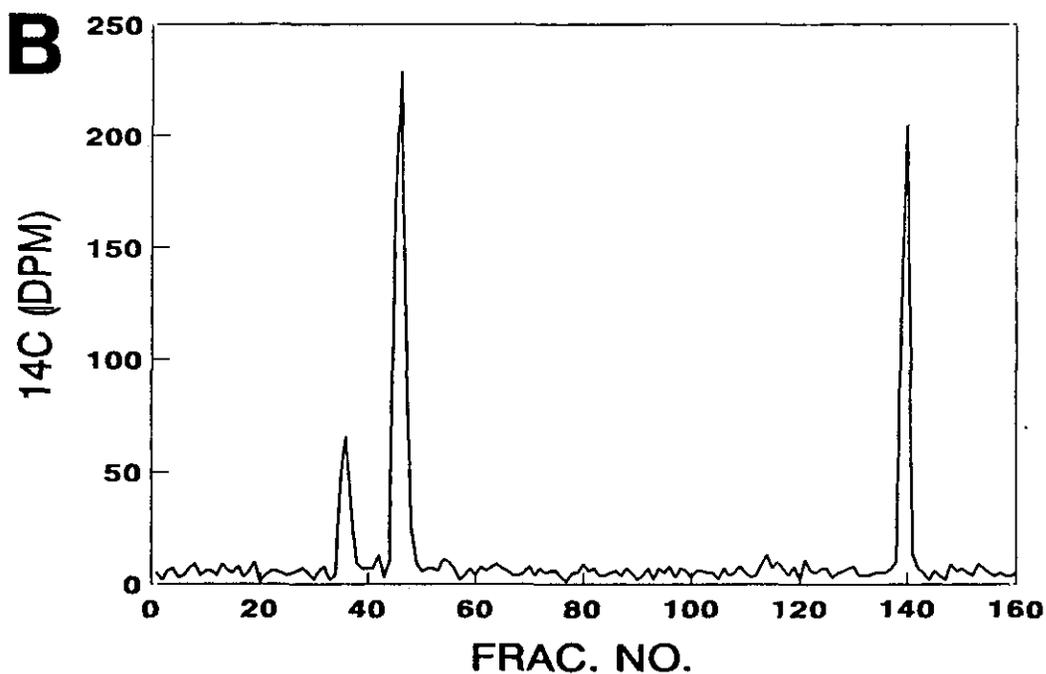
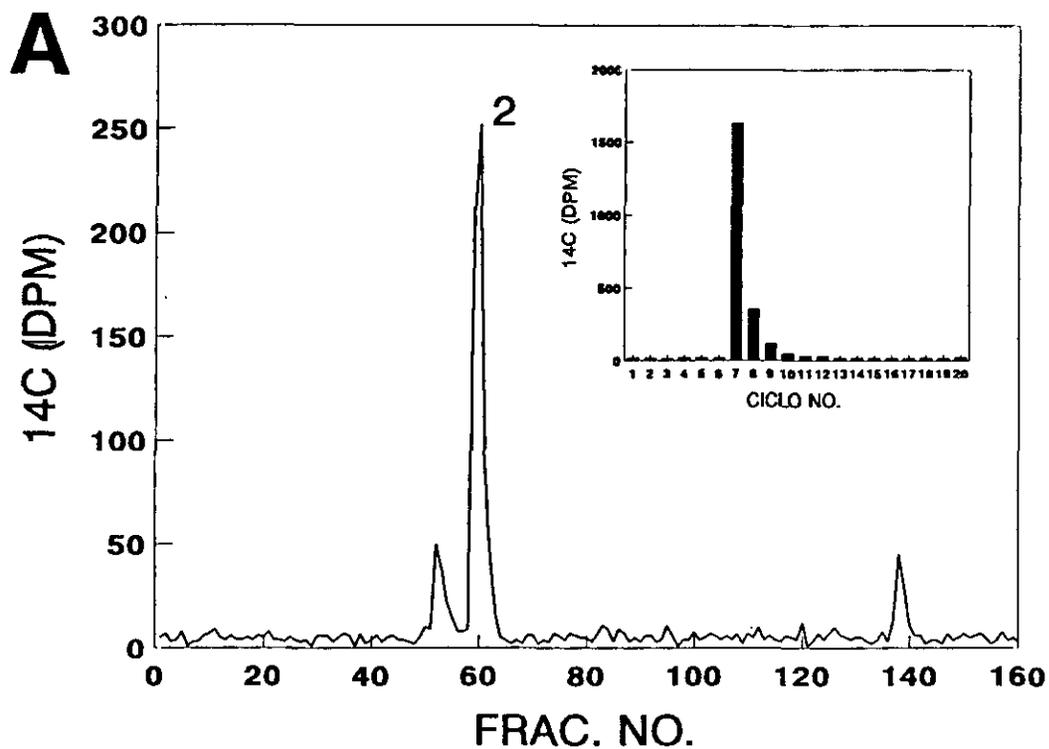


Figura 4.25 HPLC de fase reversa en el sistema TFA/TFA-acetonitrilo de los picos mayoritarios de la Figura 4.23. A) Procedente del pico II del P-4. Aquí se incluye la secuencia del pico mayoritario (2). B) Del pico III de esta columna.

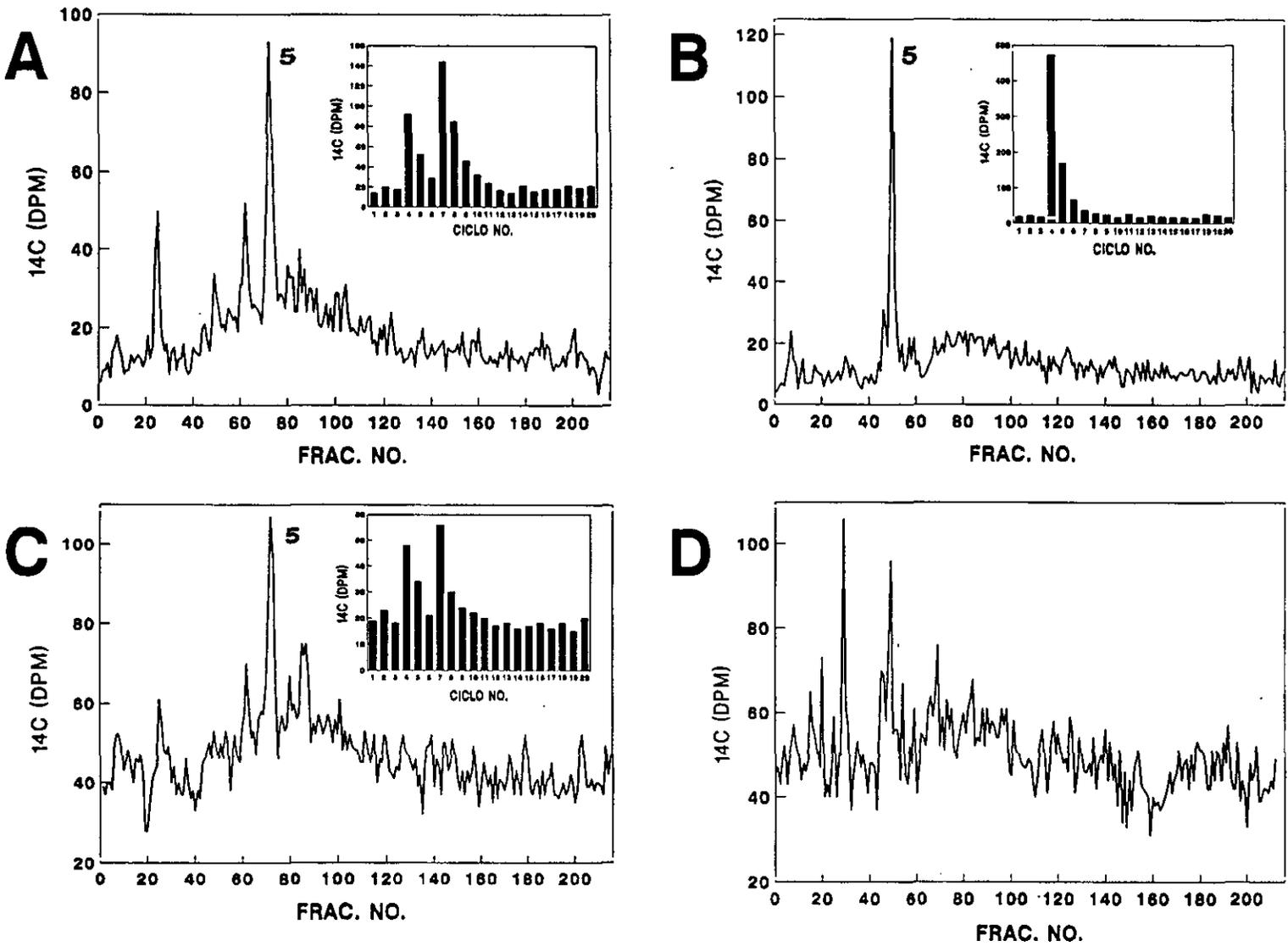


Figura 4.26 HPLC de fase reversa en el sistema de acetato/acetoniitrilo de los picos procedentes de la Figura 4.23. **A)** Procedente del pico A-I. **B)** Del pico A-II. **C)** Del pico B-I. **D)** Del pico B-II. Se incluyen también las secuencias de los picos numerados en cada cromatograma.

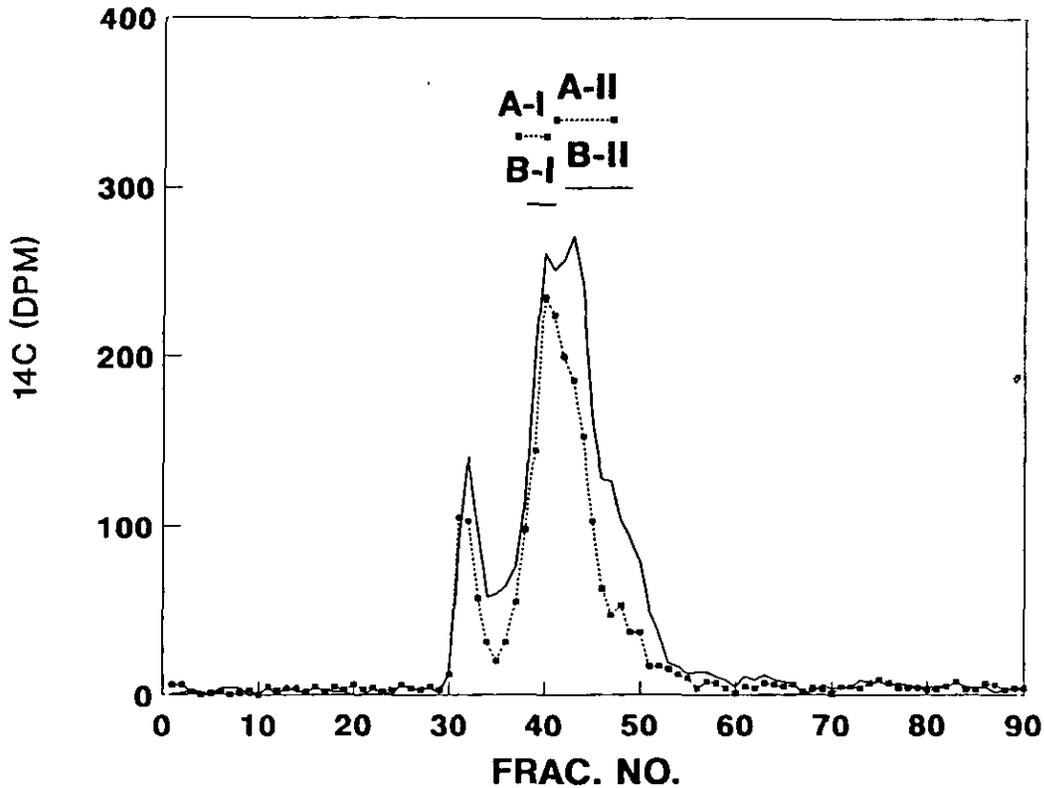


Figura 4.27 Cromatografía en el Bio-Gel P-4 de los péptidos radioactivos eluidos por tratamiento con NH_2OH de complejos con pFc' (---) y con $\text{F(ab}')_2$ (...) de C3 de conejo.

NH_2OH en los residuos de Gln y Asn, quedando tras su acción como hidroxamatos [305]. En este péptido de C3 existe un residuo de Asn^{1014} y, probablemente uno de Gln^{1033} . El tratamiento con NH_2OH de C3 purificado se realiza en condiciones menos drásticas (NH_2OH 0,5 M, pH 7,0) que las de los complejos (NH_2OH 1M, pH 9,6), y que las de [305] (5-6 horas, 45°C , NH_2OH 2M, en un tampón Tris/HCl pH 9,6 que contiene EDTA 1mM y 10% de etanol), y por lo que cabe la posibilidad de que esta modificación no tenga lugar en la muestra de C3 purificado y sí en las procedentes de los complejos.

4.4.6.- DIGESTIÓN CON PEPSINA DE COMPLEJOS ENTRE C3 Y EL Fc

La Figura 4.29 muestra los perfiles de elución de las columnas de AF-S (4.29A) y PA-S (4.29B) de un digerido de complejos (^{14}C)C3-IC con tripsina y papaína. El material no retenido en la primera columna, en el que estaba presente el Fc, se cargó en la segunda, recogiendo ahora el material retenido. Esta muestra contendrá, por tanto, el fragmento Fc y los complejos que lo tengan como substrato (este sistema fue el que se utilizó en el apartado 4.3.3 para obtener el Fc

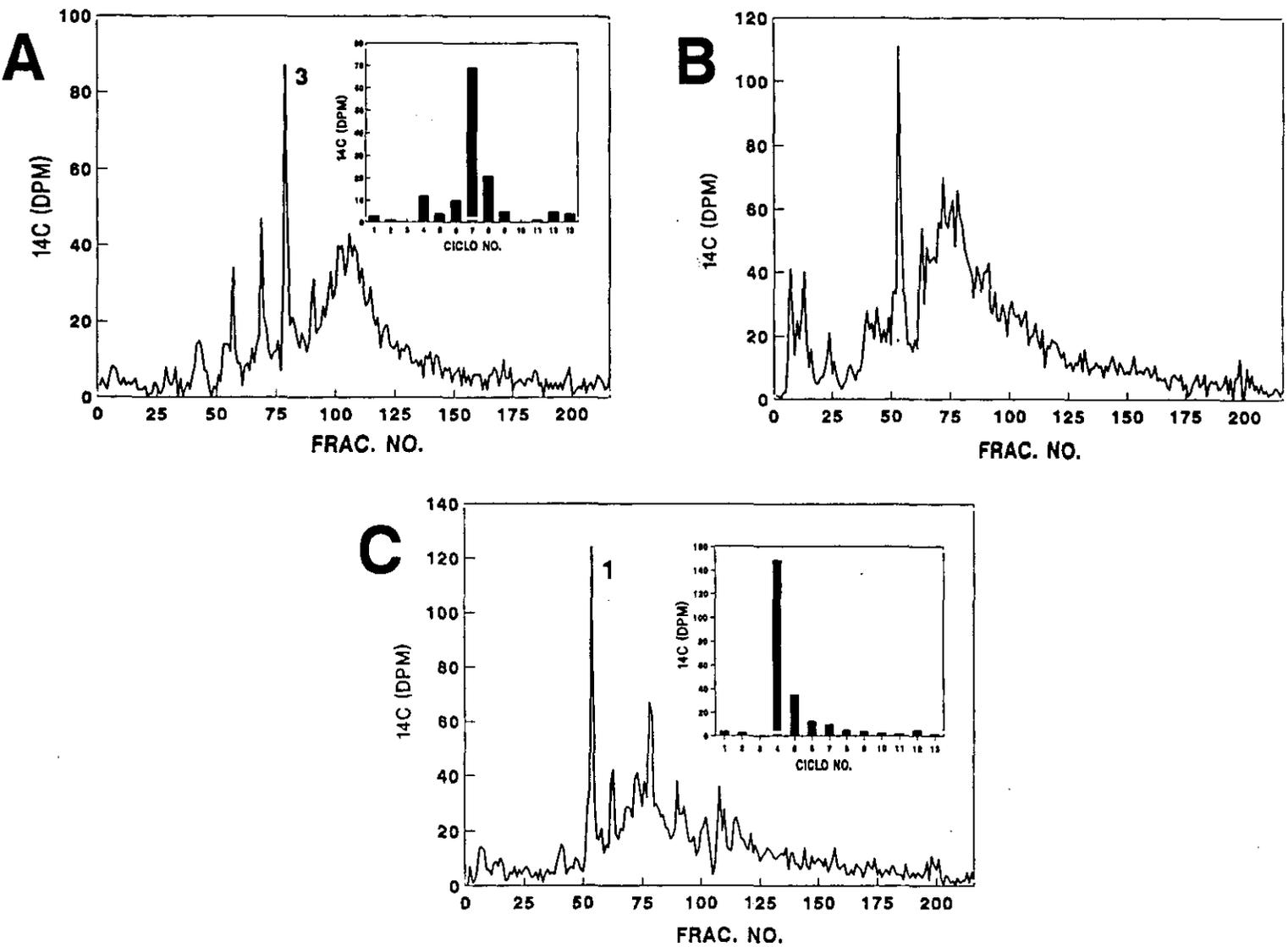


Figura 4.28 HPLC de fase reversa en el sistema de acetato/acetoniitrilo de los picos procedentes de la Figura 4.27. A) Procedente del pico A-I. B) Del pico A-II. C) Del pico B-II. Se incluyen en esta figura las secuencias radioquímicas obtenidas de los picos indicados.

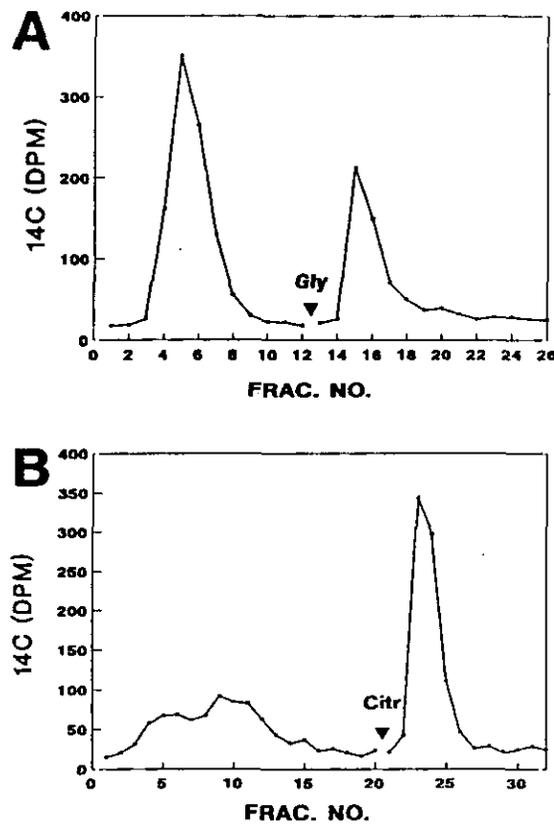


Figura 4.29 A) Cromatografía en AF-S de complejos (^{14}C)C3-IC digeridos con papaína. Se mezclaron las fracciones 3-11 del material no retenido. B) Cromatografía en PA-S de estas fracciones. Se recogieron las fracciones 23-25.

cuya secuencia *N*-terminal fue estudiada). En la Figura 4.30 se representa el cromatograma obtenido en la columna de Superdex 75 después de cargar el digerido con pepsina de los complejos obtenidos según la Figura 4.29B. Se incluye también el perfil de elución del sobrenadante de IC digeridos con pepsina. El pico cuyo máximo aparece en la fracción 28 corresponde a pFc', apareciendo a un peso molecular en esta columna de aproximadamente 30kDa. Ello se debe a que este fragmento está presente como dímero no covalente [306]. La Figura 4.31 recoge un gel de EGPA-SDS en gradiente del 10 al 15% de acrilamida en el que se incluye esta fracción (calle 2), donde el pFc' aparece a un Mr de unos 15kDa, correspondiente al monómero. En esta fracción del Superdex 75 eluye también el máximo del perfil radioactivo del digerido del complejo. Ello confirma la existencia de complejos entre un fragmento de C3 y el dominio C γ 3 del anticuerpo. En cuanto al segundo pico radioactivo, su volumen de elución excluye su asignación como fragmento de C3 liberado del anticuerpo durante la digestión. De ser así, debería aparecer en un volumen superior al de la aprotinina (patrón de 6,5kDa, con el número 6 en la Figura 4.30). Este hecho, junto con la heterogeneidad del pico, sugiere que se trata de péptidos procedentes del C γ 2 unidos al fragmento de C3.

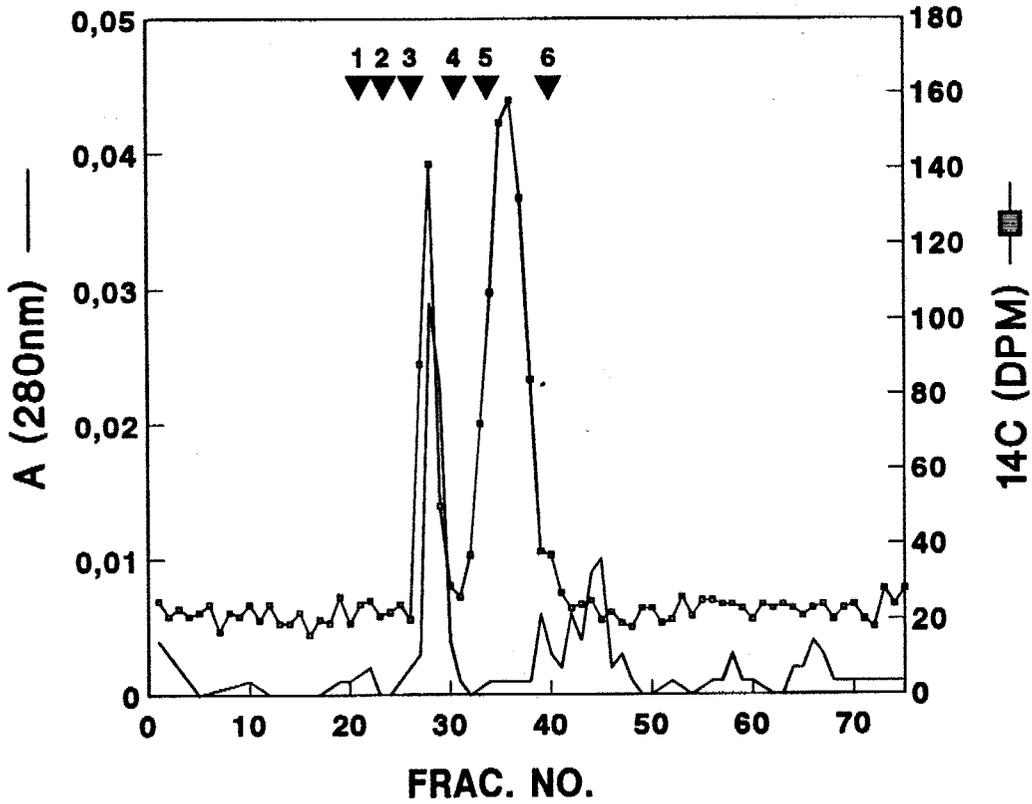


Figura 4.30 FPLC en una columna de Superdex 75 del material de la Figura 4.29B tras digestión con pepsina. La radioactividad (□) corresponde a la digestión de este material. La A_{280} (—) corresponde al sobrenadante de IC control digeridos. Los patrones de Mr son los indicados en MATERIALES Y MÉTODOS: Sus pesos moleculares son 1: 150kDa; 2: 65kDa; 3: 45kDa; 4: 21,5kDa; 5: 12,3kDa; 6: 6,5kDa.

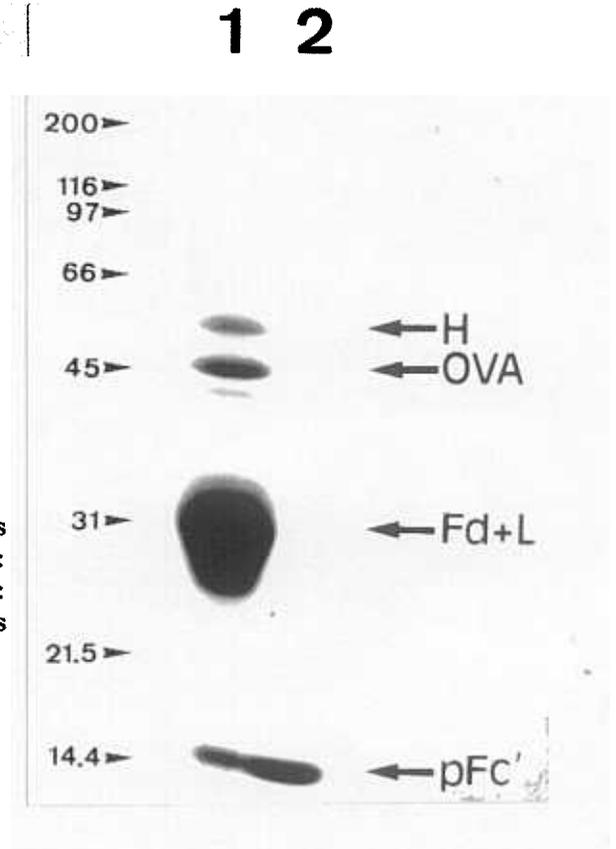


Figura 4.31 EGPA-SDS en gradiente 10-15% de las muestras procedentes de la Figura 4.30. Calle 1: precipitado de la digestión de los IC control. Calle 2: alícuota procedente de la fracción 28 del Superdex 75 de los mismos IC control.

4.5.- ESTUDIO DE LA POSIBLE UNIÓN DE C3 A LA REGIÓN BISAGRA DE LA IgG

Cuando llegados a este punto se compara la distribución de radioactividad entre el Fab y el Fc en las digestiones con tripsina, en la muestra aminoetilada (Figura 4.8B), y papaína (Figura 4.12B) con la del F(ab')₂ y del pFc' (Figura 4.16B) resulta llamativo que mientras en este último la mayoría de la radioactividad se sitúa en el F(ab')₂, en aquéllas la distribución es similar, sino favorable al Fc. Estos datos se podrían explicar si la diferencia en los puntos de ruptura para generar los fragmentos incluyera un sitio aceptor de C3 al que éste se uniera con gran eficiencia. La secuencia C-terminal del F(ab')₂ obtenido por digestión con pepsina es conocida [288] y se recoge en la Figura 4.32, donde la Leu²³⁴ ocupa la posición C-terminal. Este residuo está muy próximo a los puntos de ruptura de tripsina, en el anticuerpo aminoetilado, y de papaína obtenidos en la presente Tesis, y que también se incluyen en la Figura 4.32. Como vemos, dentro de esta secuencia existen tres residuos potencialmente aceptores de la unión covalente de C3: la Ser²²¹, la Lys²²² y la Thr²²⁴, donde el primer residuo constituye el N-terminal del fragmento tróptico y de una parte de los de papaína (de aquellos que llevan el carbohidrato en posición 224). Según este

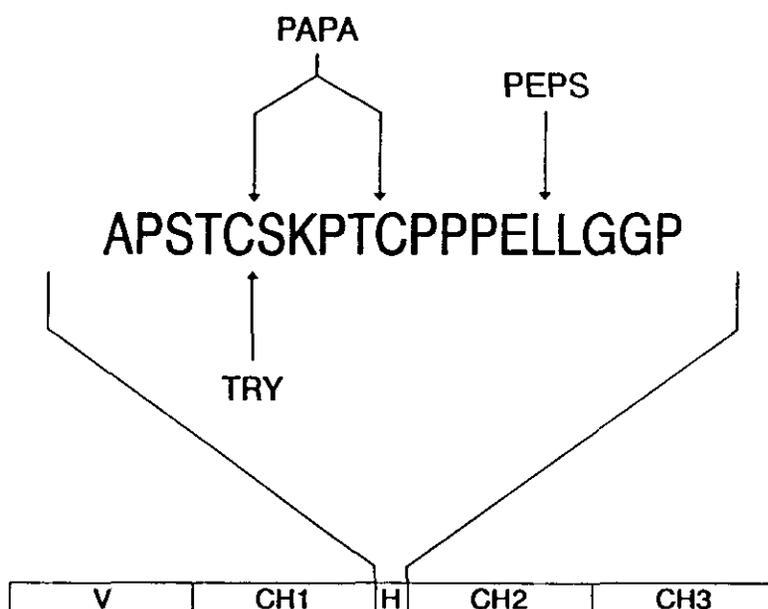


Figura 4.32 Secuencia de la región bisagra de la IgG de conejo. Se incluye el sitio de ruptura más N-terminal de pepsina (PEPS). Se incluyen los puntos de ruptura de papaína (PAPA) y tripsina de este trabajo (TRY).

patrón proteolítico representado en la Figura 4.32, la digestión del $F(ab')_2$ con tripsina, después de reducción y aminoetilación, produciría la liberación de un decapeptido cuyo residuo *N*-terminal sería la Ser²²¹ y el *C*-terminal Leu²³⁴ (la numeración de EU empleada incluye, como vimos, cuatro residuos no presentes en la de conejo entre la Thr²²⁴ y la Cys²²⁹).

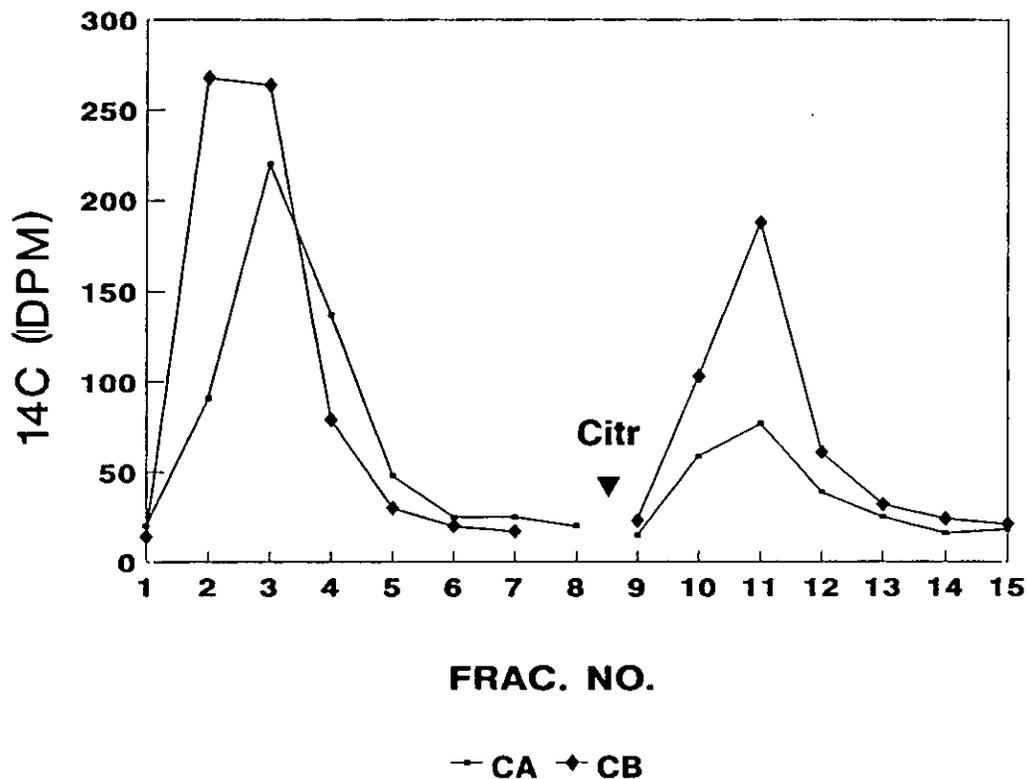


Figura 4.33 Cromatogramas en PA-S del precipitado de la digestión con pepsina de los complejos (¹⁴C)C3-IC, después de reducción y carboxamidometilación (CA) o aminoetilación (CB).

Con el fin de comprobar esta posibilidad, el precipitado de (¹⁴C)C3-IC digeridos con pepsina, que contiene los complejos entre el $F(ab')_2$ (y restos de IgG no digerida) y un fragmento marcado de C3, se digirió con tripsina, después de reducir y aminoetilar, según el protocolo descrito en MATERIALES Y MÉTODOS. Como controles se introdujeron muestras de los mismos complejos reducidas y carboxamidometiladas y digeridas con tripsina, o las mismas muestras aminoetiladas, pero sin añadir tripsina. Las muestras se separaron en la columna de PA-S, recogiendo el material no retenido (Figura 4.33), que corresponde a los complejos entre el $F(ab')_2$ y el fragmento de C3. La cromatografía en esta columna se hizo necesaria puesto que, como se vio anteriormente, la digestión con pepsina de los complejos no es total, quedando cantidades apreciables de cadena pesada no digerida; esta cadena, después de aminoetilada, se



Figura 4.34 A) EGPA-SDS de las digestiones tríplicas del material no retenido de la Figura 4.33. Calle 1: material retenido en la columna de PA-S; calle 2: control con SHN-EDTA aminoetilado y digerido con tripsina; calle 3: patrones de Mr; calle 4: complejos carboxamidometilados y digeridos; calle 5: complejos aminoetilados y digeridos; calle 6: complejos aminoetilados no digeridos. Se indican la identificación de las bandas correspondientes a la enzima y al inhibidor. B) Fluorografía de este gel.

digeriría, dando lugar a Fc y Fd, que interferirían con el resultado del experimento al no quedar retenido el primero en la columna de AF-S. Una alícuota de la proteína retenida en la columna de PA-S se cargó en el gel de EGPA-SDS al 12,5% el mismo en el que se cargó el resto del experimento, y que se recoge en la Figura 4.34A (calle 1). En él se aprecia que una parte considerable del $F(ab')_2$ queda retenido en la columna. Ello se debe, presumiblemente, a que éstas moléculas quedan unidas a través del antígeno a las de IgG, y a través de éstas a la columna. Las Figuras 4.34 y 4.35 recogen el resultado de la digestión tríplica de los complejos aminoetilados y de los controles. De la comparación de la intensidad de las bandas del gel y de la autorradiografía, se desprende que, mientras que la cantidad de Fd de la muestra aminoetilada y digerida (calle 5, Fig. 4.34A) es comparable a la de la misma muestra no digerida (calle 6, Fig. 4.34A), la cantidad de radioactividad es notablemente inferior (calles 5 y 6, Fig. 4.34B). En el caso de los complejos carboxamidometilados y digeridos, la cantidad de Fd en el gel teñido es menor (calle 4, Fig. 4.34A) que en la muestra aminoetilada y digerida (calle 5), mientras que la radioactividad es muy similar (calles 4 y 5, Fig. 4.34B). También se aprecia una reducción del Mr, tanto en la tinción como en la autorradiografía, de las muestras aminoetiladas y digeridas respecto a las otras dos. El Mr de las muestras carboxamidometiladas y digeridas es mayor aún

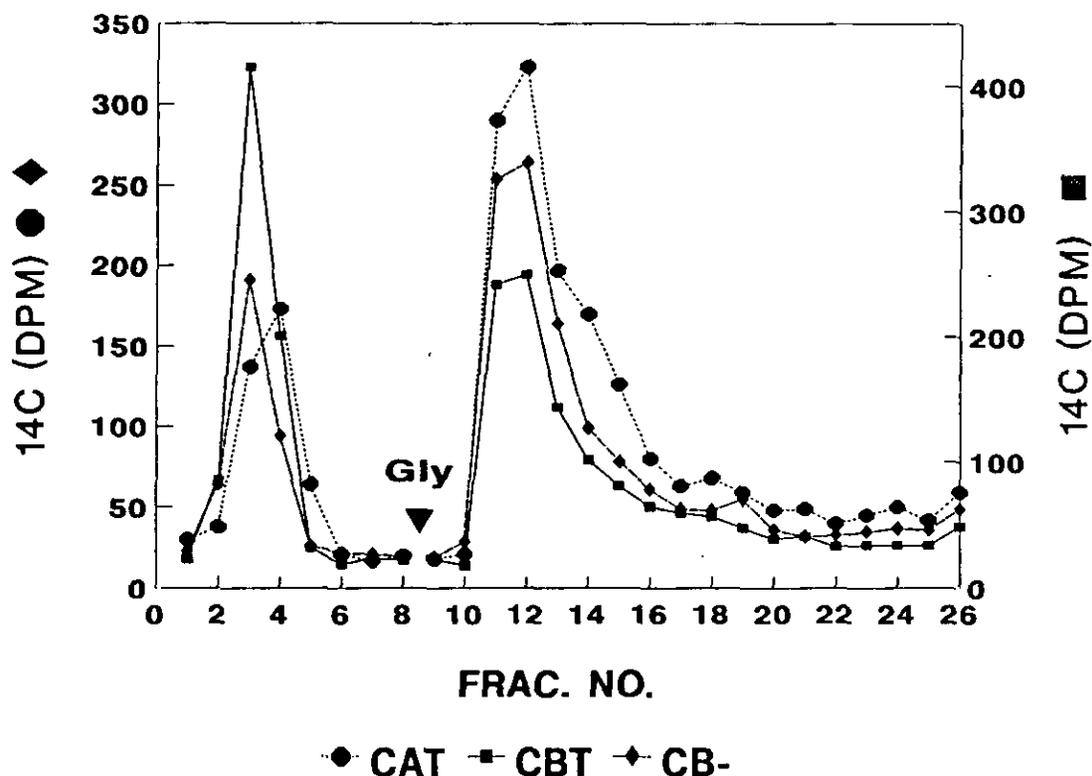


Figura 4.35 Cromatografía en la columna de AF-S de las mismas muestras de la Figura 4.34. CAT: complejos carboxamidometilados y digeridos; CBT: complejos aminoetilados y digeridos; CB-: complejos aminoetilados no digeridos.

que el de las aminoetiladas y no digeridas. El que no haya una reducción del Mr de las muestras carboxamidometiladas al digerirlas con tripsina es esperable, dada la resistencia de la IgG a esta enzima. Lo que no resulta fácil de explicar es que su Mr sea mayor. Si bien no lo explica, la OVA presente en los IC sufrió un desplazamiento similar. Como control de la especificidad de la digestión del Fd aminoetilado, se puede comprobar que la OVA no sufre ninguna reducción en su Mr al digerirla con tripsina después de aminoetilar (calles 5 y 6, Figura 4.34A). En cualquier caso, la reducción del Mr de las muestras aminoetiladas y digeridas con tripsina frente a las no digeridas, es consecuente con la liberación del decapeptido propuesto.

El resultado de la cromatografía en la columna de AF-S de los digeridos se recoge en la Figura 4.35. La idea de este experimento es que, en caso de que C3 se uniera a un residuo incluido dentro del péptido liberado por este tratamiento, ello produciría una disminución de la radioactividad retenida en esta columna, en relación a los controles de digestión. El resultado

parece apoyar esa idea. De hecho, mientras que en los controles la radioactividad liberada era de un 20% (complejos carboxamidometilados y digeridos) y de un 22,5% (complejos aminoetilados y no digeridos), en el aminoetilado y digerido ésta alcanzó un 40%. Esto, sumado a la menor radioactividad, en comparación con la cantidad de proteína apreciada en los geles, sugiere fuertemente que este decapeptido, cuya secuencia es

SKPTCPPPEL,

incluye un sitio aceptor de la unión de C3. La reducción del Mr de los complejos con el Fd sugiere, por otro lado, que éste no es el único sitio aceptor, puesto que al eliminarlo no se pierde totalmente la radioactividad.

Si comprobamos de nuevo en este punto el resultado de los cromatogramas de la Figura 4.11, correspondientes a dos digeridos de complejos con papaína cargados en las columnas de PA-S y AF-S, se aprecia un dato ilustrativo. En ambas columnas, el material radioactivo retenido (45% en AF-S y 35,5% en PA-S) es inferior al eluido libremente. Ello quiere decir que existe una cierta cantidad de péptidos marcados que no se retiene en estas columnas. Smyth y Utsumi [299] describieron que la IgG de conejo digerida con papaína, a pH 8,0 durante 24 horas a 37°C en una relación 1:100, fragmentaba la cadena pesada produciendo la liberación de péptido que incluían esta secuencia, por lo que el Fc y el Fd obtenidos carecían de esta región. Aunque las condiciones empleadas en los experimentos de esta Tesis no son tan drásticas, los datos de que disponemos no excluyen la liberación, durante la digestión con papaína, de péptidos de la región bisagra que incluyan esta secuencia. De ser así, su liberación explicaría el resultado antes aludido de los cromatogramas de la Figura 4.11, siempre y cuando este fragmento de la región bisagra llevara unido un fragmento de C3. Otra posibilidad que explicaría este fenómeno la constituiría una posible digestión de la papaína entre el residuo Cys¹⁰¹⁰ marcado y la Gln¹⁰¹³ de C3, donde tiene lugar la unión, lo que liberaría la radioactividad sin desprender el fragmento de C3; sin embargo, el comportamiento tanto de ¹⁴C-C3(NH₂OH) como del fragmento eluido de los complejos en el Bio-Gel P-6 (Figuras 4.14 y 4.15), sugiere que este no es el caso. De ser así el fragmento esperado tendría un tamaño máximo de 1,5kDa (proceden ambos de una digestión tróptica previa que deja la Cys¹⁰¹⁰ marcada en posición 9 respecto al N-terminal), y debería haber eluido con el volumen total de la columna. Por supuesto, el resultado de esta Figura también podría explicarse si acudimos a la hidrólisis del enlace éster entre C3 y la IgG que puede producirse durante las digestiones.

Con el fin de confirmar que la aminoetilación y posterior digestión triptica es capaz de liberar el péptido propuesto, se trató de la misma forma $F(ab')_2$ a-OVA. De éste se habían eliminado previamente los restos de IgG no digerida por cromatografía en PA-S (Figura 4.36). Una parte de la proteína retenida se cargó en el gel en el que se incluyó el resto del experimento (Figura 4.37, calle 1). Los digeridos, junto con muestras aminoetiladas previas a la digestión, se cargaron en un gel de EGPA-SDS al 12,5%,

que se recoge en la Figura 4.37. En este caso también se aprecia la reducción en el Mr de las muestras digeridas (calles 4 y 6) respecto a los controles no digeridos (calles 3 y 5). La Figura 4.38A recoge el cromatograma de HPLC del material filtrado en un Centricon 3, después de digerir el $F(ab')_2$ aminoetilado, y que corresponde a péptidos de tamaño inferior a ~3kDa. El pico 10, mayoritario, no presenta A_{280} , lo que es compatible con la secuencia del péptido. El integrador del HPLC identificó este pico como doble, lo que puede deberse a la presencia de carbohidrato en algunas de las moléculas (este péptido contiene la Thr²²⁴ sobre la que se puede asentar dicho carbohidrato). La Figura 4.38B recoge un control de este experimento, en el que se cargó una muestra de $F(ab')_2$, y filtrada en Centricon 3, tras lo que se inyectó en HPLC en las mismas condiciones de los picos numerados del 1 al 18 de la figura 4.38A, con la excepción del pico 10, también presente en este control. La tabla 4.V recoge el resultado de la secuenciación de una alícuota del máximo del pico 10 (60µL), y que

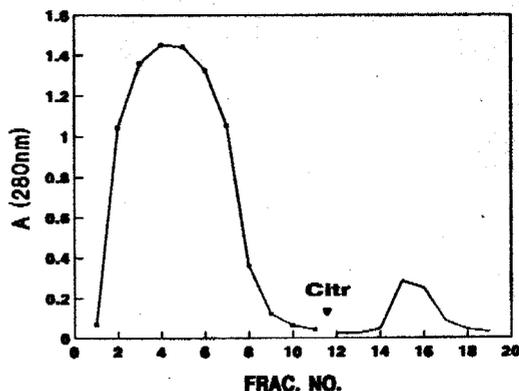


Figura 4.36 Cromatografía en PA-S de $F(ab')_2$ anti-OVA. Se recogieron las fracciones 2-7 del material no retenido.

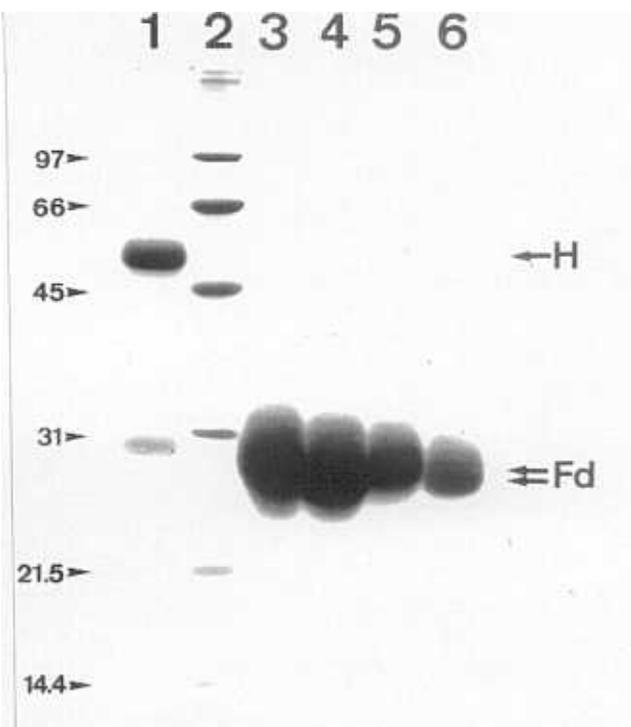


Figura 4.37 EGPA-SDS al 12,5% de muestras de $F(ab')_2$ aminoetiladas, con o sin digestión triptica. Calle 1: proteína retenida en la columna de PA-S de la Figura 4.36; calle 2: fracciones de Mr; calles 3 y 5: $F(ab')_2$ aminoetilado no digerido; calles 4 y 6: la misma muestra digerida con tripsina.

generada con tripsina y SBTI, en ausencia de tripsina. Se inyectó en HPLC en las mismas condiciones de los picos numerados del 1 al 18 de la figura 4.38A, con la excepción del pico 10, también presente en este control. La tabla 4.V recoge el resultado de la secuenciación de una alícuota del máximo del pico 10 (60µL), y que

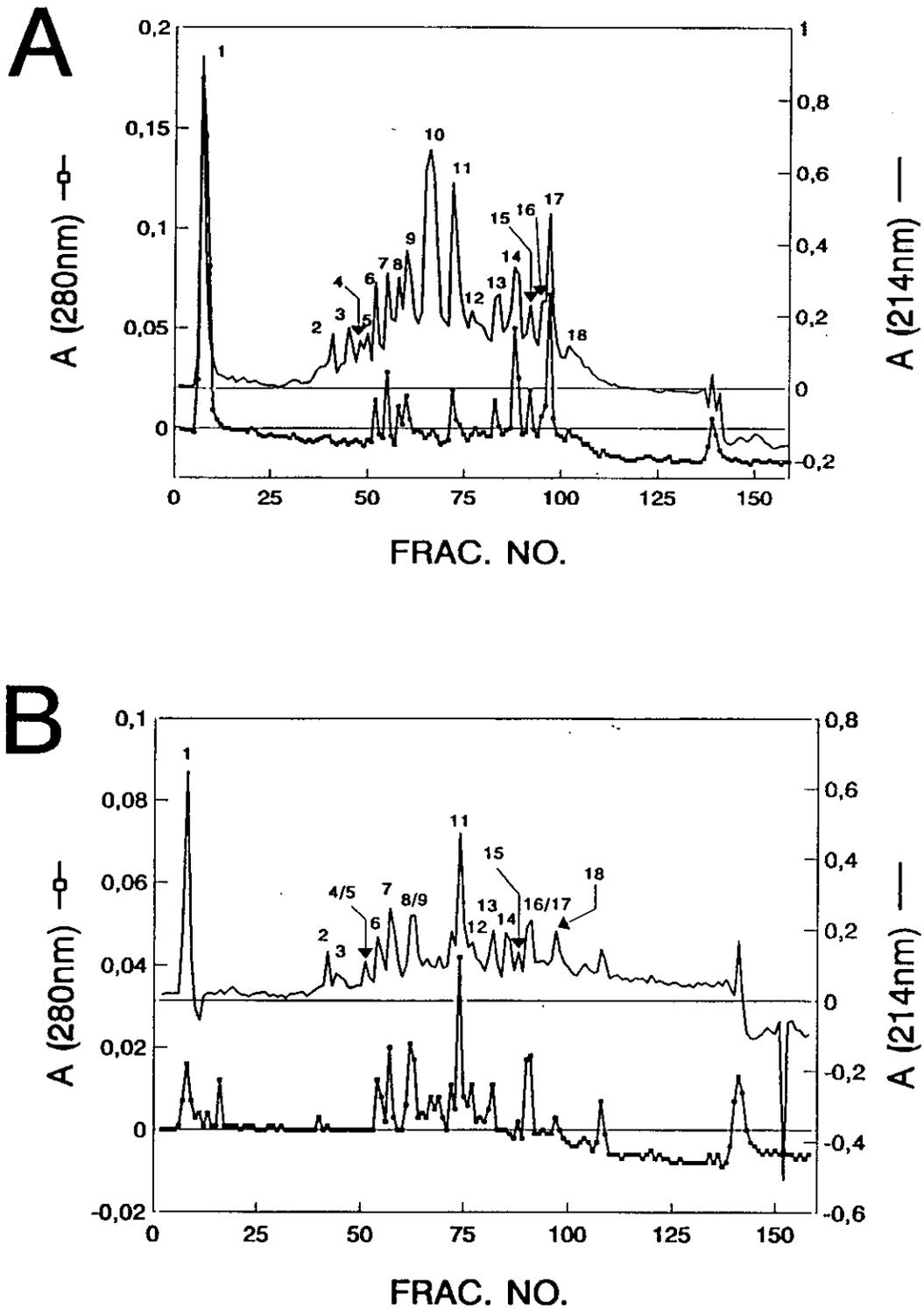


Figura 4.38 A) HPLC en fase reversa, sistema TFA/TFA-acetonitrilo, del péptido liberado por tripsina del F(ab')₂ aminoetilado. B) Control con enzima e inhibidor, en ausencia de F(ab')₂.

TABLA 4.V. Secuencia del péptido liberado del F(ab')₂ aminoetilado por digestión trípptica.

PTH	CICLO NO. (pmol de PTH)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Asp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Asn	43,5	25,8	16,4	9,5	4,0	11,5	5,7	5,3	4,0	3,6	3,4
Ser	587,4	27,7	31,3	?	6,9	13,2	3,2	2,3	-	3,2	2,9
Gln	101,7	7,3	3,7	9,9	2,4	10,1	2,2	1,4	1,9	1,5	1,8
Thr	42,6	15,2	5,8	620,0	56,3	13,2	7,6	6,3	4,2	3,7	3,2
Gly	31,7	9,5	28,5	24,6	15,9	6,7	50,7	7,3	3,6	3,6	3,2
Glu	21,1	6,6	5,9	24,1	6,2	9,1	9,9	8,9	400,6	75,8	16,4
His	50,1	-	7,8	-	-	-	-	-	-	-	-
Ala	97,8	22,8	15,0	19,0	28,2	9,2	5,2	2,4	4,6	1,8	5,4
Arg	111,5	320,4	198,3	285,7	28,6	27,3	11,8	9,1	5,9	-	-
Tyr	52,7	10,2	9,9	?	12,4	10,7	4,3	36,7	11,5	5,0	2,8
Pro	18,8	19,5	1880,3	224,5	65,2	792,3	795,0	753,1	101,7	36,2	18,5
Met	-	8,0	?	57,3	39,0	7,9	7,1	2,7	1,6	-	-
Val	23,9	335,8	24,9	12,0	100,9	16,0	15,8	10,5	6,7	6,4	6,6
Trp	4,4	103,5	27,0	30,0	26,1	30,9	29,8	32,7	25,5	22,4	25,8
Phe	43,5	136,1	12,1	4,3	3,9	8,8	6,6	7,5	2,5	6,7	4,8
Ile	16,5	22,3	25,1	19,7	11,6	5,3	3,8	2,5	1,4	2,2	1,6
Lys	40,8	2562,7	162,0	9,4	-	5,2	9,7	6,1	3,6	5,0	5,6
Leu	31,1	-	40,8	133,1	2075,8	167,0	41,7	22,8	15,1	199,1	71,0
SEQ	Ser	Lys	Pro	Thr	AEC	Pro	Pro	Pro	Glu	Leu	(Leu)

corresponde a la de este péptido:

SKPTCPPPEL.

La drástica reducción del rendimiento en el décimo ciclo concuerda con el bajo rendimiento de los residuos de Leu, e hidrofóbicos en general, en el secuenciador [307].

También podría ocurrir que otra ruptura no identificada en un punto distinto del Fab, tanto en el Fd como en la cadena ligera, diera lugar al efecto visto en la columna de AF-S (Figura 4.35) y en los geles (Figura 4.34). Esta posibilidad, en lo que se refiere a la cadena ligera, no es compatible con el resultado de la Figura 4.34, puesto que las alteraciones de Mr se producen en una banda definida, bien distinta de la de la cadena ligera. En lo que se refiere al Fd, la única posibilidad es que este fragmento procediera del N-terminal, donde se encuentra la región variable. En su secuencia existe un residuo de Cys conservado que podría aminoetilarse, si bien no se encuentra entre los que lo hacen dentro de la cadena pesada [297]; no obstante, en el trabajo de Ehrlich *et al.* [297] se describían un total de diez residuos aminoetilados, dos menos que los obtenidos en nuestro caso, por lo que no se puede excluir que este disulfuro del dominio V_H se aminoetile. No obstante, su posición en la secuencia (Cys²²) daría lugar a un péptido de unos 2,5kDa, que debería dar cuenta de una variación mayor de los Mr de la Figura 4.33. De igual manera, en la cadena ligera, el residuo conservado de Cys en la región variable se encuentra en la posición 23, mientras que en la constante se encuentran el residuo Cys¹⁹⁴ y el Cys²¹⁴ [283], siendo éste el C-terminal, y el encargado de formar el enlace disulfuro que le une a la cadena pesada [296]. Por tanto, tampoco la cadena ligera daría lugar al descenso de Mr observado. Por todo lo expuesto, se puede concluir que la reducción, aminoetilación y digestión tróptica del F(ab')₂ libera el decapeptido propuesto. Los experimentos indican, además, que al liberarse este péptido de complejos entre un fragmento de C3 y el F(ab')₂, se libera también, de forma específica, radioactividad correspondiente a C3, por lo que se puede proponer que este decapeptido incluye en su secuencia un sitio aceptor de la interacción covalente de C3.

4.6.- RELACIÓN ENTRE LA UNIÓN DE C3 Y C1q A IC

4.6.1.- CUANTIFICACIÓN DE LA UNIÓN DE LOS COMPONENTES

En vista de los resultados obtenidos en las Figuras 4.3 y 4.4, por las cuales la presencia de C3 en los complejos afecta a la unión de C1q, se examinó si se daba la situación inversa, y que pudiera explicar el efecto inhibitor que se ha atribuido a este subcomponente sobre la activación de la vía alternativa [54]. Con ese fin se realizó el experimento que se recoge en la Figura 4.39. En él se utilizó un RD y se cuantificó la unión de C3 a los IC, calculado por la incorporación de iodo[1-¹⁴C]acetamida, en función de la cantidad de C1q añadida (la concentración fisiológica de este componente se alcanza con la adición de 15µg). Estos datos sugieren que, si bien parece haber unos efectos negativos de la presencia de C1q sobre la unión de C3, estos no parecen ser muy significativos en las condiciones empleadas en estos ensayos,

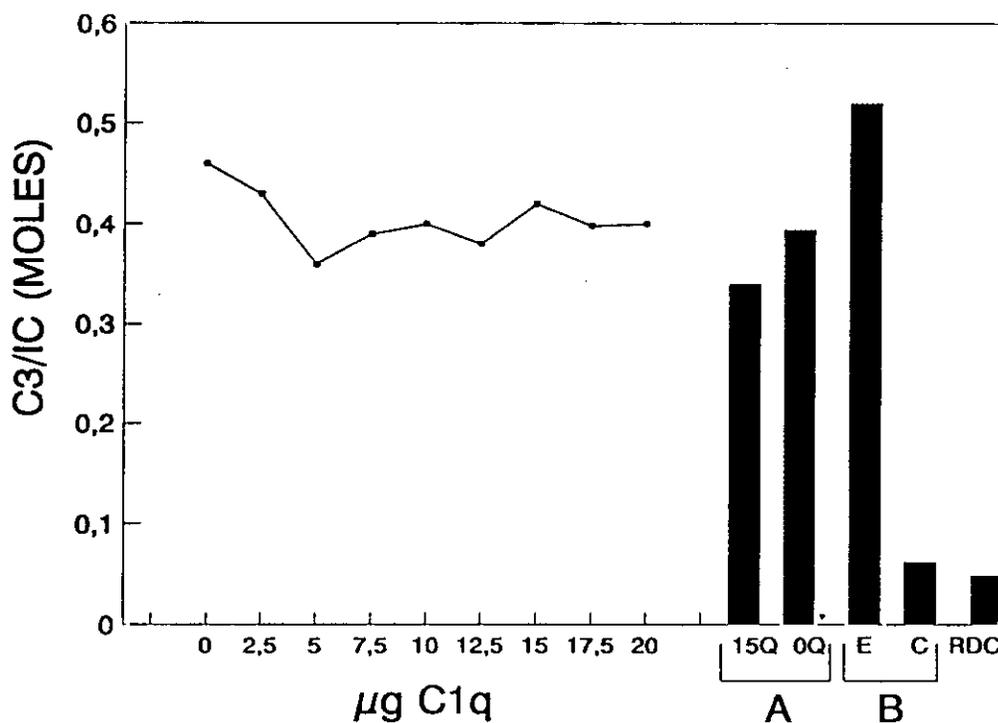


Figura 4.39 Unión de C3 a IC en presencia de cantidades crecientes de C1q. En ordenadas se presenta la relación en base molar entre el C3 incorporado y la IgG del IC. En abscisas, la cantidad añadida de C1q. A: ensayos en los que, previamente a la adición de factor D, RD e IC se incubaron 15 minutos en presencia (15 μg , 15Q) o ausencia (0Q) de C1q. B ensayos con SHN-Chelex (E) o SHN-EDTA (C). RDC es un control con RD en ausencia de factor D.

ni siquiera en un exceso de C1q respecto a la concentración fisiológica, que se alcanza con la adición de 15 μg . Estas diferencias no aumentan cuando se incuban RD, IC y 15 μg de C1q durante 15 minutos a 37°C, previamente a la adición de factor D (A-15Q, Figura 4.39) y se compara frente al mismo experimento, pero con la preincubación en ausencia de C1q (A-0Q en la misma Figura). Los datos presentados en esta Figura están referidos a la cantidad de IC presentes después de los ensayos. Como control, se presenta el resultado con SHN-Chelex (B-E), con SHN-EDTA (B-C) y con RD en ausencia de factor D y C1q (RDC).

2... EFECTO DE LA PRESENCIA DE C1q SOBRE LA UNIÓN AL DOMINIO C γ 3

La fluorografía presentada en la Figura 4.40 recoge el resultado del estudio del efecto de la presencia o ausencia de C1q en la unión de C3 al dominio C γ 3. En ella se aprecia que, tanto en presencia (calle 6) como en ausencia (calle 4) de C1q se forman los complejos entre C3 y este dominio. No parece existir una correlación evidente entre una mayor o menor unión al dominio C γ 3 y la presencia o ausencia del subcomponente C1q. Por lo expuesto, parece desprenderse que

la supuesta acción de C1q sobre la activación de la vía alternativa no se refleja en una menor unión de C3 a los IC, al menos en las condiciones empleadas que implican, entre otras cosas, la unión exclusivamente de C1q a los IC y no de C1, dada la ausencia de iones Ca.

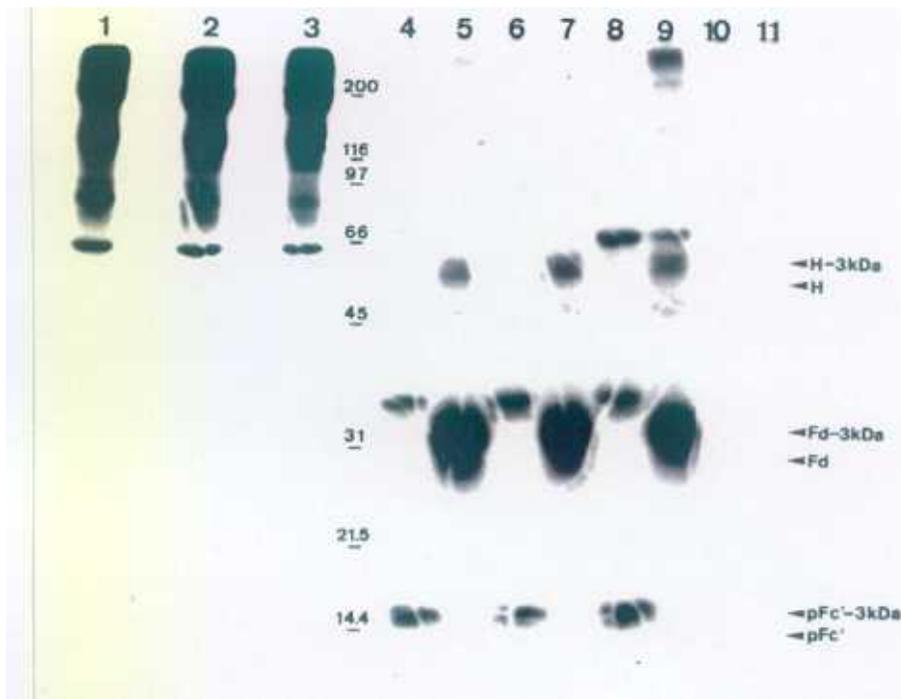


Figura 4.40 Fluorografía de EGPA-SDS en gradiente 10-15%. Calle 1: ensayo con SHN-Chelex (50 μ g de IC), incubado en las mismas condiciones que los digeridos, pero en ausencia de enzima; calle 2: como la anterior, pero con RD y factor D; calle 3: como la anterior, pero en presencia de C1q; calles 4 y 5: sobrenadante y precipitado de la digestión péptica de ensayos con RD y factor D; calles 6 y 7: igual que las anteriores, pero en presencia de C1q; calles 8 y 9: igual que las anteriores, pero con SHN-Chelex (50 μ g de IC); calles 10 y 11: sobrenadante y precipitado de la digestión del control con RD en ausencia de factor D. Salvo donde se indica, todos los ensayos llevaron 100 μ g de IC.

5.- DISCUSIÓN GENERAL

5.- DISCUSIÓN GENERAL

5.1.- FORMACIÓN DE COMPLEJOS COVALENTES ENTRE C3 Y LOS FRAGMENTOS

Fab Y Fc

Los experimentos presentados en esta Tesis demuestran que cuando inmunocomplejos formados por IgG de conejo y ovoalbúmina como antígeno activan la vía alternativa humana, C3 se une de forma covalente al anticuerpo. Los complejos formados tienen como aceptores a los fragmentos Fc y Fab de la IgG, interaccionando dentro de este último con sus dos componentes: el Fd y la cadena ligera. Esto se ha demostrado en virtud de la generación de estos dos fragmentos a partir de inmunocomplejos con C3 unido, mediante digestión con tripsina, tras aminoetilación, o con papaína; ambos exhiben péptidos de C3 unidos covalentemente. La presencia de los fragmentos de IgG en los complejos se verificó mediante el análisis de su comportamiento en columnas de afinidad, así como por su Mr en geles de poliacrilamida. La presencia de C3 se confirmó por la sensibilidad a hidroxilamina de estos complejos, por lo que responden a la reactividad general de C3, formando enlaces éster, así como por la semejanza de los fragmentos eluidos por este tratamiento con los generados a partir de C3 purificado y digerido con las mismas enzimas.

La unión de C3 a la cadena ligera ya se ha demostrado previamente, en el caso de la activación de la vía clásica sobre bacterias [252]. Sobre la unión al Fd existe ya una considerable evidencia previa. Como consecuencia de la activación de la vía alternativa, IC preparados con IgG o F(ab')₂ anti-OVA unen C3 covalentemente, a la cadena pesada los primeros y al Fd los segundos [255]. Esto mismo ocurre con complejos similares durante el proceso de solubilización [263]. Recientemente se ha demostrado que C3 se une a IgG1 humana termoagregada a través de algún punto localizado entre el final del V_H y los primeros residuos del C_γ2 [258]. Sin embargo, la evidencia de la unión de C3 al Fc era, hasta ahora, indirecta. Por una parte, existen datos que revelan una diferencia entre el comportamiento de IC con F(ab')₂ (IC-F(ab')₂) y con IgG (IC-IgG). Se ha demostrado que IC-F(ab')₂ presentan una mayor resistencia a la solubilización que sus equivalentes con IgG [213]. Estos resultados se explican por la participación del Fc en el proceso de precipitación inmune, por lo que es probable que la disposición tridimensional de ambos IC no sea idéntica. En este mismo sentido se ha demostrado que la degradación de C3 en suero es mayor cuando se encuentra unido a IC-F(ab')₂ que cuando lo hace a IC-IgG [291]. Otra

evidencia indirecta proviene de la reactividad de los complejos con ligandos específicos de Fc. En un caso, agregados de IgG que habían activado complemento eran degradados por macrófagos con mayor eficiencia que agregados control. Sin embargo, la degradación era menos eficaz cuando se inhibían los receptores de complemento, permitiendo tan sólo la acción de los receptores de Fc [308, 237]. Un fenómeno similar se ha descrito en la unión de IC a linfocitos [309], donde los autores ya propusieron la unión de algún componente del complemento, probablemente C3, al Fc. En este sentido, se ha demostrado que C3, al igual que C4, inhibe la activación de C1 [37]. También se han descrito problemas para inmunoprecipitar IC solubilizados con anticuerpos anti-Fc, lo que se atribuyó a que C3 bloquearía los determinantes del Fc [310], así como abolición del reconocimiento por proteína A [311]. Sin embargo, cuando la activación transcurre por la vía clásica durante la inhibición de la precipitación, los complejos generados conservan su capacidad de unirse a proteína A [229]. No obstante los procesos de solubilización y de inhibición de la precipitación dan lugar a IC de características diferentes [312], uniéndose mayor cantidad de C3 en el primer caso [212].

La activación de la vía alternativa sobre IC lleva, como paso final, a la solubilización de estos complejos. La demostración de que fragmentos monovalentes de anticuerpos específicos del Fc o del Fab de la IgG presente en los IC ejercen un efecto semejante, ha llevado a pensar que las dos interacciones que intervienen en la precipitación de los IC (antígeno-anticuerpo y Fc-Fc) se ven afectadas durante este proceso. La unión covalente de C3 a ambas regiones demostrada en el presente trabajo aporta una base molecular al efecto de este componente sobre la solubilidad de los IC, así como a las funciones efectoras del anticuerpo localizadas en el Fc, actuando como regulador negativo. En cualquier caso todos estos datos indirectos que atestiguan el efecto que la unión de C3 tiene sobre la accesibilidad del Fc deben tomarse con cautela, debido al tamaño de las dos moléculas: el de C3b (176kDa) es mayor que el de la IgG íntegra (150kDa), y más de tres veces mayor que cada uno de los fragmentos de ésta. Por este motivo los datos presentados también serían imaginables aunque la unión no tuviera lugar directamente sobre el dominio cuya funcionalidad se ve afectada.

La delimitación dentro del Fab de los sitios de unión de C3 no se ha realizado. La información existente en lo que concierne a la región responsable de la protección de C3 de la acción de factor H, parece apuntar al dominio C γ 1. Es precisamente esta protección la que diferencia a las superficies que activan la vía alternativa de las que no lo hacen. Inmunocomplejos obtenidos con F(ab')₂ activan la vía alternativa con una eficiencia parecida a la de IgG [255], generándose sobre los complejos actividad de C3 convertasa [313]. El C γ 1 es el único dominio

específico de clase de todos los que forman el Fab: la cadena ligera y el V_H pueden estar presentes en anticuerpos de otras clases no activadoras. También, por el mismo motivo, es el único común en el Fab a todos los anticuerpos distintos de la misma clase. El que este dominio sea el responsable de la protección de la acción de factor H no quiere decir que sea éste el único punto de unión: pueden existir otros puntos, estén o no protegidos de factor H. Incluso se puede concebir la posibilidad de que el anclaje de C3b tuviera lugar en un dominio diferente del $C\gamma 1$, resultando protegido por alguna estructura aportada por él. Los datos presentados en esta Tesis, en conjunto con otros publicados en la bibliografía, sugieren que C3 se une al dominio $C\gamma 1$ [258] y a la cadena ligera cuando se activa la vía alternativa sobre inmunocomplejos. Existe la incógnita sobre la unión al V_H , si bien estudios con anticuerpos monoclonales sugieren la existencia de una modulación por esta región de la activación del complemento por ambas vías [314, 315], así como en la interacción de IC con C3b unido y eritrocitos [316]. Dentro de la cadena ligera se desconoce cual o cuales son los puntos de anclaje.

5.2.- UNIÓN DE C3 AL DOMINIO $C\gamma 3$

Como se ha visto en el apartado anterior, C3 se une al Fc y al Fab. Respecto a este último ya se han discutido los posibles sitios aceptores. En cuanto al Fc nuestro estudio ha demostrado que al menos parte de esta unión tiene lugar en el dominio $C\gamma 3$, y se sugiere fuertemente que también ocurre en el $C\gamma 2$. Esto se ha demostrado de forma semejante a la seguida en el caso del Fc y Fab, mediante digestiones con pepsina. La verificación de la presencia de pFc' en los complejos se realizó en función del Mr de los complejos, de su comportamiento en una columna de Superdex 75, de su presencia exclusivamente en el sobrenadante de los complejos, de su inmunoprecipitación con un anticuerpo anti-Fc, así como su generación a partir de complejos de un fragmento de C3 con el Fc. En cuanto a la presencia de C3, se siguieron los mismos criterios del apartado anterior: sensibilidad a hidroxilamina y semejanza de los fragmentos eluidos por este tratamiento con los de C3 purificado digerido en las mismas condiciones.

El dominio $C\gamma 3$ juega un papel importante en la estructura del Fc. Los dominios integrantes de este dímero interactúan fuertemente entre sí, mientras que no existe tal contacto entre los dos $C\gamma 2$. Precisamente los contactos entre el $C\gamma 2$ y el $C\gamma 3$ modulan en cierta medida la disposición final del primero [209]. Justo en el espacio interdomino entre éstos es donde se ha identificado la región de interacción con proteína A [201]. También se le ha atribuido a esta región la responsabilidad de la interacción Fc-Fc que participa en la precipitación de IC [208]. Al dominio $C\gamma 3$ se le atribuye un papel en la interacción con receptores de Fc, aunque no

participe directamente en esta interacción, en la que sí parece jugar un papel primordial la región bisagra baja [200]. También se ha sugerido que este dominio jugaría un papel importante en la activación de C1, mediante interacción con la subunidad catalítica de este componente ($C1r_2s_2$) [317, 318]. Todas estas funciones se ven afectadas por la unión de C3 a IC cuando ésta tiene lugar por la vía alternativa. Por ello, no resulta sorprendente que C3 forme complejos covalentes con este dominio cuando se activa esta vía. No obstante conviene volver a recordar lo ya mencionado en el apartado anterior en lo concerniente al tamaño relativo de las dos moléculas y a que, por ello, es concebible que algunos, sino todos, los efectos descritos tuvieran lugar en el caso de que C3 interaccionara con otro dominio.

5.3.- UNIÓN DE C3 A LA REGIÓN BISAGRA

La región bisagra es la que sirve de nexo entre los dos brazos Fab y el Fc. Es un segmento que consta de una región central, rígida, rodeada por otras dos flexibles. A su movilidad se le ha atribuido la responsabilidad de que en estudios de difracción de rayos X de moléculas completas de IgG no se haya detectado densidad electrónica correspondiente al Fc [202]. Sólo se ha podido estudiar la estructura de IgG completa en el caso de mutantes que carecen de esta región [201]. En el caso de cristales de Fc γ humano, la región N-terminal carece de densidad electrónica, achacable a la movilidad de esta región en los cristales [319]. En esta Tesis se han presentado datos que indican que C3 se une covalentemente a esta región, más concretamente, lo hace en un decapeptido incluido en ella, comprendido entre las posiciones 221 y 234 (numeración EU). Su identificación se ha basado en la liberación de radioactividad de complejos aminoetilados entre C3 y F(ab')₂ después de digerir con tripsina, mientras que esta radioactividad no se libera en los mismos complejos no digeridos ni en complejos alquilados digeridos. En este decapeptido tan sólo existen tres residuos que potencialmente pueden servir de aceptores de C3b: Ser²²¹, Lys²²² y Thr²²⁴, todos dentro del segmento alto de la bisagra, el más flexible de esta región [200]. Teniendo en cuenta la sensibilidad a hidroxilamina de la mayoría de los complejos entre C3b y el anticuerpo [244, 291], parece improbable que la unión tenga lugar en la Lys²²², puesto que los enlaces formados con este residuo serían amidas, resistentes a este tratamiento. No obstante, su participación no puede ser excluida, dada la existencia de una fracción de complejos resistentes a hidroxilamina. La Thr²²⁴ es el residuo polimórfico que corresponde al alotipo d12 [296]. En d11 este está reemplazado por Met, no apto como aceptor de C3b. Es, además, donde se ancla el carbohidrato presente en un 30% de la molécula [300]. No se han realizado estudios que relacionen el alotipo con la activación de la vía alternativa, aunque no existen diferencias funcionales asociadas a los alotipos [320]. Por tanto, debido a estas

descrito recientemente [259]. La interacción covalente tiene lugar con alguna de las dos serinas en posiciones 1217 y 1219 (numeración de C4 humano). Es destacable que la secuencia adyacente a ésta hacia el C-terminal, el segmento de 16 aminoácidos entre los residuos 1224 y 1239, contiene siete prolinas, proponiendo los autores que, merced a estos residuos, esta región resultaría protuberante en la estructura de la molécula, facilitando así la unión covalente de C3. En el caso que nos ocupa, también existe una región rica en prolinas en las proximidades de la Ser²²¹ hacia el C-terminal, la Pro²²³ y la tres prolinas contiguas, Pro²³⁰, Pro²³¹ y Pro²³², integrantes estas últimas de la bisagra baja. Hacia el N-terminal de esta Ser²²¹ de la IgG existe otra Ser y una Thr en posiciones 218 y 219 contiguas, por tanto, a la Cys²²⁰, el punto de ruptura de la tripsina en la IgG aminoetilada. Estos datos sugieren la posibilidad de que existan sitios conformacionalmente favorables para servir como aceptores de C3b.

La unión de C3 a esta región puede reducir la movilidad de los brazos Fab alrededor del segmento bisagra y, de este modo, afectar a la solubilidad de los complejos, mediante la inducción de reorganizaciones moleculares en la malla formada por el IC, y la destrucción de algunas interacciones Ag-Ab. Los efectos pueden ser dramáticos si nos imaginamos a una proteína como C3b, de 176kDa unida a este segmento. También es conveniente recordar la asociación descrita entre la flexibilidad de los anticuerpos en esta región y la capacidad de activación de C1 [322, 323]. De esta forma, la unión de C3b a la región bisagra justificaría la inhibición descrita sobre la activación de C1 [37]. De cualquier forma, este sitio está a caballo entre el Fc y los brazos Fab, por lo que, dado el tamaño de C3b, podría afectar simultáneamente a la interacción antígeno-anticuerpo y a las interacciones Fc-Fc, así como a las funciones efectoras de ésta región.

5.4.- EFECTO DE LA PRESENCIA DE C1q SOBRE LA UNIÓN DE C3 A INMUNOCOMPLEJOS

Los datos presentados sugieren un efecto negativo de la unión de C3 a los inmunocomplejos sobre la unión a éstos del subcomponente C1q. Con el fin de averiguar si este efecto es recíproco y si la inhibición de la vía alternativa atribuida a C1q es debida a una reducción en la incorporación de C3, se estudió el efecto que tiene la presencia de C1q sobre esta incorporación. Estos estudios se realizaron en un intervalo de concentraciones que oscilan entre 0 y 100µg/mL, excediendo esta última la concentración fisiológica (80µg/mL). El efecto observado fue poco importante, apreciándose tan sólo en los primeros puntos, esto es, las diferencias sólo son detectables al comparar los valores obtenidos en ausencia de C1q con el resto. La presencia de C1q tampoco afecta a la unión de C3 al dominio Cγ3. Por tanto, podemos

concluir que en las condiciones utilizadas C1q no afecta a la unión de C3 a los inmunocomplejos. No se puede excluir, no obstante que en otras situaciones, como por ejemplo durante la solubilización o la interacción con superficies celulares, el efecto de C1q se haga palpable.

5.5.- UNIÓN COVALENTE DE C3 A INMUNCOMPLEJOS: ¿UNO O MÚLTIPLES PUNTOS DE UNIÓN?

La unión de C3 a superficiesceptoras tiene lugar a través de un mecanismo de transacilación, merced a la hidrólisis de un enlace tioéster que libera un grupo carbonilo transitoriamente reactivo. Las funciones desarrolladas por las moléculas de C3 covalentemente unidas son diversas, dependiendo en buena medida de la naturaleza del substrato. Dichas funciones incluyen las propias de la activación del complemento, formación de C3 y C5 convertasas o las de opsonización. Según la función desarrollada, los requerimientos de la unión son diferentes. Si se trata de activación del complemento la situación es distinta en la C3 y en la C5 convertasa. C3 participa en la C3 convertasa de la alternativa, formando parte del complejo C3bBb. Este complejo une C3 y, por medio del componente enzimático Bb, lo activa. La especificidad de la enzima no viene dada por la unión covalente de C3b a la superficie aceptora, sino por la interacción no covalente entre C3b y Bb. Esta enzima es activa tanto con C3b unido a superficiesceptoras como cuando C3b está soluble. La diferencia entre las superficies activadoras y las que no lo son no radica en la actividad de la enzima, sino en la regulación por los factores H e I. Los activadores de la vía alternativa son tan diversos que se hace difícil imaginar una estructura común a todos ellos que sirva de núcleo aceptor de moléculas de C3. En el caso de la opsonización, el único requerimiento existente es que C3b sea accesible a sus receptores específicos. El caso de la C5 convertasa, en la que C3 participa en ambas vías, es distinto, formando C3b complejos covalentes C4b-C3b (vía clásica) y C3b-C3b (vía alternativa), donde C3b es el que se une a las moléculas de C4b o C3b presentes previamente. En este caso sí se hace necesaria una especificidad en cuanto al sitio de anclaje covalente, tal y como se ha demostrado, puesto que la especificidad por la unión de C5 es aportada por el dímero covalente. De hecho se ha comprobado que mutantes de C4 sobre los que C3 no puede unirse covalentemente sí pueden generar una C5 convertasa activa formando dímeros no covalentes [259]. Se sugirió por ello que la especificidad de la unión covalente podría venir dada por una interacción, previa a ésta, entre C4b (o C3b) y C3b* [259]. Si esto es así, y una interacción no covalente previa puede dirigir la covalente, existe evidencia de que tanto C3 nativo como C3b interaccionan no covalentemente con los fragmentos Fc y Fab y que ello produce inhibición de la precipitación, aunque es incapaz de solubilizar IC preformados [260]. Esta interacción podría

dirigir al C3b con el carbonilo aún reactivo a unirse tanto al Fc como al Fab.

En el caso particular de inmunocomplejos, las funciones que desarrolla C3 son la de generación de una C3 convertasa y la del mantenimiento de la solubilidad de los IC, así como favorecer su eliminación del torrente sanguíneo. Estas funciones no requieren ninguna disposición particular del complejo IgG-C3b. En cuanto a la capacidad de los IC de activar la vía alternativa, caben dos posibilidades. En la primera supone que el IC actuaría como superficie activadora, independientemente, en mayor o menor medida, del punto por el que C3 interaccionara. En la segunda posibilidad, un único sitio del anticuerpo sería el que protegiese a las moléculas de C3b unidas de la acción del factor H. Asumiendo que este fuera el caso, tampoco sería necesario la unión exclusiva de C3 a este sitio. Esto es lo que ocurre con activadores como la inulina, donde existen moléculas de C3b con diferentes afinidades por factor H, debido a la unión de C3b sobre distintos puntos del carbohidrato [324]. También es necesario recordar que la formación de la C3 convertasa, protegida de la acción de factor H, no es la única función ni el único efecto de C3 sobre los IC. Para el resto de las funciones no es necesaria esta especificidad. Más aún, algunas se explican mejor cuando se concibe la existencia de varios sitios de unión.

En apoyo de la existencia de múltiples sitios de unión, conviene recordar el caso de la α_2 -macroglobulina. Este inhibidor sérico de proteasas ejerce su función de una forma parecida a como desempeña C3 algunas de sus funciones sobre los IC. El inhibidor se une covalentemente a la enzima inhibida, lo que provoca que existan impedimentos estéricos para el acceso de los substratos al centro activo [325]. Recientemente se ha demostrado que este inhibidor se une a diferentes proteasas a través de múltiples sitios de unión, habitualmente residuos de Lys, con la excepción de termolisina, con la que forma mayoritariamente enlaces éster [304]. El papel de C3 en el mantenimiento de la solubilidad de los IC sería similar al de la α_2 -macroglobulina en el sentido de que su acción sería la de crear impedimentos estéricos que bloquearían tanto interacciones antígeno-anticuerpo como Fc-Fc.

Como se mencionó en el apartado 5.3, recientemente se ha demostrado que la interacción de C3b con IgG1 humana termoagregada tiene lugar a través de una región de la cadena pesada comprendida entre los últimos 20 residuos del dominio V_H y los 20 primeros del C γ 2 [258]. En una comunicación preliminar posterior se ha acotado esta región a un péptido del C γ 1 comprendido entre los residuos 134 y 156 [321]. En este estudio no se descartó la posibilidad de que C3 interaccionase por otros puntos además del propuesto. Su sistema experimental presenta una diferencia fundamental respecto al empleado en esta Tesis, consistente en el estado de la IgG

presente en los ensayos. En su caso emplearon IgG1 humana agregada por calor. Es frecuente el uso de IgG en estas condiciones como alternativa al uso de inmunocomplejos, tanto en estudios de activación del complemento como de interacción con receptores. No obstante, los resultados obtenidos con este sistema no son comparables en todos los casos con los datos de inmunocomplejos. Se ha comprobado que la especificidad de especie en la interacción entre IgG y algunos receptores de Fc se pierde cuando los estudios se realizan con IgG agregada, por lo que se ha dudado de la utilidad de este reactivo en el estudio de los receptores de Fc [201]. Más pertinente a nuestro caso, se ha comprobado que existe una diferencia notable en la adherencia a eritrocitos, por medio del CR1, entre inmunocomplejos e IgG agregada que han unido C3b [326]. Mientras que cuando se trata de inmunocomplejos la unión está en función del número de CR1 por eritrocito [230], esta correlación desaparece cuando se trata de agregados de IgG [327]. Por tanto parecen existir diferencias entre la forma de unión de C3b a IgG cuando forma parte de inmunocomplejos o cuando está agregada por calor. También se ha comprobado que IgG agregada por calor fija complemento por la vía clásica con menor eficiencia que inmunocomplejos obtenidos con el mismo anticuerpo [328]. En este mismo trabajo se describió también una mayor sensibilidad del Fab a papaína en la IgG agregada que en el anticuerpo original [328]. El sistema utilizado en esta Tesis plantea el problema de tratarse de un sistema heterólogo. No obstante, los controles realizados en los que el suero utilizado fue de conejo, la misma fuente de los anticuerpos, demostraron que los resultados son idénticos a los obtenidos con suero humano. Por ello, es probable que la localización del sitio propuesta en los estudios con IgG termoagregada sea consecuencia de una alteración de la molécula, alteración que no está presente en la IgG integrante de inmunocomplejos.

Todo lo expuesto en este apartado sugiere, por tanto, que la interacción entre C3b e IC tras la activación de la vía alternativa tiene lugar a través de múltiples puntos del anticuerpo. Ello no excluye, no obstante, la existencia de puntos donde la unión sea mayoritaria.

6.- CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden extraer de la presente Tesis Doctoral son las siguientes:

- 1) El Tercer Componente del Sistema del Complemento Humano (C3) se une covalentemente a la IgG de conejo integrante de inmunocomplejos cuando tiene lugar la activación de la vía alternativa, y esta interacción acontece a través de la cadena pesada y de la cadena ligera del anticuerpo.
- 2) La unión covalente tiene lugar tanto en el fragmento Fab como en el Fc de la molécula de anticuerpo. La unión a ambas regiones es, en términos cuantitativos, de similar relevancia.
- 3) Dentro del Fc, C3 se une al dominio C γ 3 y existen evidencias indirectas de que el C γ 2 es también un sustrato de dicha interacción.
- 4) Los resultados presentados indican que, muy probablemente, la región bisagra, en su segmento alto, es también un aceptor de la unión covalente de C3. El candidato más probable de esta región lo constituye la Ser²²¹. Esta unión es especialmente importante, dado el papel que juega esta región en la flexibilidad de la molécula de anticuerpo.
- 5) No se ha podido identificar un efecto claro de la presencia de C1q sobre la unión de C3, tanto a los inmunocomplejos como, dentro de éstos, al dominio C γ 3. Por otra parte, la unión de C3 sí parece tener un efecto negativo sobre la unión de C1q.
- 6) Finalmente, y a modo de conclusión final, C3 se une a múltiples sitios de la IgG integrante de inmunocomplejos cuando tiene lugar la activación de la vía alternativa. Estas uniones aportan una base molecular a los efectos que el anclaje de C3 tiene sobre los inmunocomplejos.

7.- BIBLIOGRAFÍA

7.- BIBLIOGRAFÍA

1. Law, S.K.A. & K.B.M. Reid (1988) COMPLEMENT. IN FOCUS. IRL Press (Oxford).
2. Rother, K., & G.O. Till, Editores (1988) THE COMPLEMENT SYSTEM. Springer Verlag (Berlín).
3. Vivanco Martínez, F. (1990) Cien años de complemento. *Inmunología*, 2, 99-107.
4. Cooper, N.R. (1985) The classical complement pathway: Activation and regulation of the first complement component. *Adv. Immunol.* 37, 151-216.
5. Ross, G.D. (1986) Introduction and history of complement research. En IMMUNOBIOLOGY OF THE COMPLEMENT SYSTEM. AN INTRODUCTION FOR RESEARCH AND CLINICAL MEDICINE (Editor, G.D. Ross), pp. 1-19. Academic Press Inc. (Orlando).
6. Rapp, H.J., & T. Rapp (1970) MOLECULAR BASIS OF COMPLEMENT ACTION Appleton-Century-Crofts (Nueva York).
7. Pillemer, L., L. Blum, I.H. Lepow, O.A. Ross, E.W. Todd & A.C. Wardlaw (1954) The properdin system and immunity: I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science* 120, 279-285.
8. Müller-Eberhard, H.J. (1984) The membrane attack complex. *Springer Semin. Immunopathol.* 7, 93-141.
9. Mayer, M.M. (1984) Complement. Historical perspectives and some current issues. *Complement* 1, 2-26.
10. Lachmann, P.J. & N.C. Hughes-Jones (1984) Initiation of complement activation. *Springer Semin. Immunopathol.* 7, 143-162.
11. Colomb, M.G., G.J. Arlaud & C.L. Villiers (1984) Structure and activation of C1: Current concepts. *Complement* 1, 69-80.
12. Schumaker, V.N., P. Zavodszky & P.H. Poon (1987) Activation of the first component of complement. *Ann. Rev. Immunol.* 5, 21-42.
13. Müller-Eberhard, H.J. (1968) Chemistry and reaction mechanism of complement. *Adv. Immunol.* 8, 1-80.
14. Porter, R.R. & K.B.M. Reid (1978) The biochemistry of complement. *Nature* 275, 699-704.
15. Malhotra, R., R.B. Sim & K.B.M. Reid (1990) Interaction of C1q, and other proteins containing collagen-like domains, with the C1q receptor. *Biochem. Soc. Trans.* 18, 1145-1148.
16. Porter, R.R (1984) Complement polymorphism, the major histocompatibility complex and associated diseases.- A speculation. *Mol. Biol. Med.* 1, 161-168.

17. O'Neill, G.J., S.Y. Yang & B. Dupont (1978) Two *HLA*-linked loci controlling the fourth component of human complement. *Proc. Natnl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 5165-5169.
18. Campbell, R.D., A.W. Dodds & R.R. Porter (1980) The binding of human complement component C4 to antibody-antigen aggregates. *Biochem. J.* 189, 67-80.
19. Law, S.K., N.A. Lichtenberg, F.H. Holcombe & R.P. Levine (1980) Interaction between the labile binding sites of the fourth (C4) and fifth (C5) human complement proteins and erythrocyte cell membranes. *J. Immunol.* 125, 634-639.
20. Gagnon, J. (1984) Structure and activation of complement components C2 and factor B. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 306, 301-309.
21. Carroll, M.C., R.D. Campbell, D.R. Bentley & R.R. Porter (1984) A molecular map of the human major histocompatibility complex class III region linking complement genes C4, C2 and factor B. *Nature* 307, 237-241.
22. Davis III, A.E. (1988) C1 inhibitor and hereditary angioneurotic edema. *Ann. Rev. Immunol.* 6, 595-628.
23. Nilsson Ekdahl, K., U.R. Nilsson & B. Nilsson (1990) Inhibition of factor I by diisopropylfluorophosphate. Evidence of conformational changes in factor I induced by C3b and additional studies on the specificity of factor I. *J. Immunol.* 144, 4269-4274.
24. Pangburn, M.K., R.D. Schreiber & H.J. Müller-Eberhard (1977) Human complement C3b inactivator: Isolation, characterization, and demonstration of an absolute requirement for the serum protein β 1H for cleavage of C3b and C4b in solution. *J. Exp. Med.* 146, 257-270.
25. Fujita, T., I. Gigli & V. Nussenzweig (1978) Human C4-binding protein. II. Role in proteolysis of C4b by C3b-inactivator. *J. Exp. Med.* 148, 1044-1051.
26. Ahearn, J.M. & D.T. Fearon (1989) Structure and function of the complement receptors, CR1 (CD35) and CR2 (CD21). *Adv. Immunol.* 46, 183-219.
27. Iida, K. & V. Nussenzweig (1981) Complement receptor is an inhibitor of the complement cascade. *J. Exp. Med.* 153, 1138-1150.
28. Lublin, D.M. & J.P. Atkinson (1989) Decay-accelerating factor: Biochemistry, molecular biology and function. *Ann. Rev. Immunol.* 7, 35-58.
29. Liszewski, M.K., T.W. Post & J.P. Atkinson (1991) Membrane cofactor protein (MCP or CD46): Newest member of the Regulators of Complement Activation gene cluster. *Ann. Rev. Immunol.* 9, 431-455.
30. Loos, M. (1988) Reactivity in immune hemolysis. En *THE COMPLEMENT SYSTEM* (Editores, K. Rother & G.O. Till), pp. 136-262. Springer Verlag (Berlín).
31. Sim, R.B. & K.B.M. Reid (1991) C1: molecular interactions with activating systems. *Immunol. Today* 12, 307-311.
32. Mardiney, M.R., H.J. Müller-Eberhard & J.D. Feldman (1968) Ultrastructural localization of the third and fourth components of complement on complement-cell complexes. *Am. J. Pathol.* 53, 253-260.

33. Reid, K.B.M. & R.R. Porter (1981) The proteolytic activation systems of complement. *Ann. Rev. Biochem.* 50, 433-464.
34. Kerr, M.A. (1980) The human complement system: Assembly of the classical pathway C3 convertase. *Biochem. J.* 189, 173-181.
35. Takata, Y., T. Kinoshita, H. Kozono, J. Takeda, E. Tanaka, K. Hong & K. Inoue (1987) Covalent association of C3b with C4b within C5 convertase of the classical complement pathway. *J. Exp. Med.* 165, 1494-1507.
36. Masaki, T., M. Matsumoto, R. Yasuda, R.P. Levine, H. Kitamura & T. Seya (1991) A covalent dimer of complement C4b serves as a subunit of a novel C5 convertase that involves no C3 derivatives. *J. Immunol.* 147, 927-932.
37. Ziccardi, R.J. (1986) Control of C1 activation by nascent C3b and C4b: a mechanism of feedback inhibition. *J. Immunol.* 136, 3378-3383.
38. Schreiber, R.D., M.K. Pangburn, P.H. Lesavre & H.J. Müller-Eberhard (1978) Initiation of the alternative pathway of complement: Recognition of activators by bound C3b and assembly of the entire pathway from six isolated proteins. *Proc. Natnl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 3984-3952.
39. Götze, O. & H.J. Müller-Eberhard (1971) The C3-activator system: An alternate pathway of complement activation. *J. Exp. Med.* 134, 90s-108s.
40. Platts-Mills, T.A.E. & K. Ishizaka (1974) Activation of the alternate pathway of human complement by rabbit cells. *J. Immunol.* 113, 348-358.
41. Müller-Eberhard, H.J. (1988) Molecular organization and function of the complement system. *Ann. Rev. Biochem.* 57, 321-347.
42. Whiteman, L.Y., D.B. Purkall & S. Ruddy (1991) Association of activated properdin with complexes of properdin with C3. *J. Immunol.* 147, 1344-1351.
43. Vik, D.P., P. Muñoz-Cánoves, D.D. Chaplin & B.F. Tack (1990) Factor H. En THE THIRD COMPONENT OF COMPLEMENT. CHEMISTRY AND BIOLOGY (Editor, J.D. Lambris) *Current Top. Microbiol. Immunol.* 153, 147-162. Springer-Verlag (Berlfn).
44. Daha, M.R., D.T. Fearon & K.F. Austen (1976) C3 nephritic factor (C3NeF): Stabilization of fluid phase and cell-bound alternative pathway convertase. *J. Immunol.* 116, 1-7.
45. Pangburn, M.K. & H.J. Müller-Eberhard (1984) The alternative pathway of complement. *Springer Semin. Immunopathol.* 7, 163-192.
46. Pangburn, M.K. & H.J. Müller-Eberhard (1980) Relation of a putative thioester bond in C3 to activation of the alternative pathway and the binding of C3b to biological targets of complement. *J. Exp. Med.* 152, 1102-1114.
47. Pangburn, M.K., R.D. Schreiber & H.J. Müller-Eberhard (1981) Formation of the initial C3 convertase of the alternative complement pathway. Acquisition of C3b-like activities by spontaneous hydrolysis of the putative thioester bond. *J. Exp. Med.* 154, 856-857.
48. Isenman, D.E., D.I.C. Kells, N.R. Cooper, H.J. Müller-Eberhard & M. Pangburn (1981) Nucleophilic modification of human complement protein C3: correlation of conformational

- changes with acquisition of C3b-like functional properties. *Biochemistry* 20, 4458-4467.
49. Hack, E., J. Paardekooper & F. van Milligen (1990) Demonstration in human plasma of a form of C3 that has the conformation of "C3b-like C3". *J. Immunol.* 144, 4249-4255.
 50. Pangburn, M.K. (1986) The alternative pathway. En IMMUNOBIOLOGY OF THE COMPLEMENT SYSTEM. AN INTRODUCTION FOR RESEARCH AND CLINICAL MEDICINE (Editor, G.D. Ross), pp. 45-62. Academic Press Inc. (Orlando).
 51. Kinoshita, T., Y. Takata, H. Kozono, J. Takeda, K. Hong & K. Inoue (1988) C5 convertase of the alternative complement pathway: Covalent linkage between two C3b molecules within the trimolecular complex enzyme. *J. Immunol.* 141, 3895-3901.
 52. Newman, S.L. & L.K. Mikus (1985) Deposition of C3b and iC3b onto particulate activators of the human complement system. Quantitation with monoclonal antibodies to human C3. *J. Exp. Med.* 161, 1414-1431.
 53. Meri, S. & M.K. Pangburn (1990) A mechanism of activation of the alternative complement pathway by the classical pathway: Protection of C3b from inactivation by covalent attachment to C4b. *Eur. J. Immunol.* 20, 2555-2561.
 54. Fishelson, Z. & H.J. Müller-Eberhard (1987) Regulation of the alternative pathway of human complement by C1q. *Molec. Immunol.* 24, 987-993.
 55. Cooper, N.R. & H.J. Müller-Eberhard (1970) The reaction mechanism of human C5 in immune hemolysis. *J. Exp. Med.* 132, 775-793.
 56. Campbell, R.D., S.K.A. Law, K.B.M. Reid & R.B. Sim (1988) Structure, organization, and regulation of the complement genes. *Ann. Rev. Immunol.* 6, 161-195.
 57. Müller-Eberhard, H.J. (1986) The membrane attack complex of complement. *Ann. Rev. Immunol.* 4, 503-528.
 58. Podack, E.R. (1986) Assembly and functions of the terminal components. En IMMUNOBIOLOGY OF THE COMPLEMENT SYSTEM. AN INTRODUCTION FOR RESEARCH AND CLINICAL MEDICINE (Editor, G.D. Ross), pp. 115-137. Academic Press Inc. (Orlando).
 59. Lachmann, P.J. (1991) The control of homologous lysis. *Immunol. Today* 12, 312-315.
 60. Lachmann, P.J. (1990) Protection against complement lysis. *Biochem. Soc. Trans.* 18, 1159-1160.
 61. Podack, E.R. (1988) Assembly and structure of the membrane attack complex (MAC) of complement. En CYTOLYTIC LYMPHOCYTES AND COMPLEMENT: EFFECTORS OF THE IMMUNE SYSTEM (Editor, E.R. Podack) pp. 173-183. CRC Press (Boca Raton, Florida).
 62. Morgan, B.P. (1989) Complement membrane attack on nucleated cells: resistance, recovery and non-lethal effects. *Biochem. J.* 264, 1-14.
 63. Parker, C.M., Editor (1992) MEMBRANE DEFENSES AGAINST ATTACK BY COMPLEMENT AND PERFORINS *Current Top. Microbiol. Immunol.* Vol. 178 Springer Verlag (Berlín).
 64. Fearon, D.T. & W.W. Wong (1983) Complement ligand-receptor interactions that mediate biological responses. *Ann. Rev. Immunol.* 1, 243-271.

65. Ross, G.D. (1986) Opsonization and membrane complement receptors. En *IMMUNOBIOLOGY OF THE COMPLEMENT SYSTEM. AN INTRODUCTION FOR RESEARCH AND CLINICAL MEDICINE* (Editor, G.D. Ross), pp. 87-114. Academic Press Inc. (Orlando).
66. Fingeroth, J.D., J.J. Weis, T.F. Tedder, J.L. Strominger, P.A. Biro & D.T. Fearon (1984) Epstein-Barr virus receptor of human B lymphocytes is the C3d receptor CR2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81, 4510-4514.
67. Delcayre, A.X., F. Salas, S. Mathur, K. Kovats, M. Lotz & W. Lernhardt (1991) Epstein Barr virus/complement C3d receptor is an interferon α receptor. *EMBO J.* 10, 919-926.
68. Martin, D.R., A. Yuryev, K.R. Kalli, D.T. Fearon & J.M. Ahearn (1991) Determination of the structural basis for selective binding of Epstein-Barr virus to human complement receptor type 2. *J. Exp. Med.* 174, 1299-1311.
69. Matsumoto, A.K., J. Kopicky-Burd, R.H. Carter, D.A. Tuveson, T.F. Tedder & D.T. Fearon (1991) Intersection of the complement and immune systems: A signal transduction complex of the B lymphocyte-containing complement receptor type 2 and CD19. *J. Exp. Med.* 173, 55-64.
70. Rosen H. & S.K.A. Law (1990) The leukocyte cell surface receptor(s) for the iC3b product of complement. En *THE THIRD COMPONENT OF COMPLEMENT. CHEMISTRY AND BIOLOGY* (Editor, J.D. Lambris) *Current Top. Microbiol. Immunol.* 153, 99-122. Springer-Verlag (Berlin).
71. Sánchez-Madrid, F., J.A. Nagy, E. Robbins, P. Simon & T.A. Springer (1983) A human leukocyte differentiation antigen family with distinct α -subunits and a common β -subunit: The lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac1), and the p150,95 molecule. *J. Exp. Med.* 158, 1785-1803.
72. Rosen, H., & S. Gordon (1987) Monoclonal antibody to the murine type 3 complement receptor inhibits adhesion of myelomonocytic cells in vitro and inflammatory cell recruitment in vivo. *J. Exp. Med.* 166, 1685-1701.
73. Lambris, J.D., N.J. Dobson & G.D. Ross (1980) Release of endogenous C3b Inactivator from lymphocytes in response to triggering membrane receptors for β 1H globulin. *J. Exp. Med.* 152, 1625-1644.
74. Hugli, T.E. (1986) Biochemistry and biology of anaphylatoxins. *Complement* 3, 111-127.
75. Stimmler-Gerard, N.P. (1986) Immunopharmacology of anaphylatoxin-induced bronchoconstrictor responses. *Complement* 3, 137-151.
76. Doolittle, R.F. (1985) The genealogy of some recently evolved vertebrate proteins. *Trends Biochem. Sci.* 10, 233-237.
77. Traut, T.W. (1988) Do exons code for structural or functional units in proteins?. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85, 2944-2948.
78. Rodríguez de Córdoba, S., D.M. Lublin, P. Rubinstein & J.P. Atkinson (1985) Human genes for three complement components that regulate the activation of C3 are tightly linked. *J. Exp. Med.* 161, 1189-1195.
79. Reid, K.B.M., D.R. Bentley, R.D. Campbell, L.P. Chung, R.B. Sim, T. Kristensen & B.F.

- Tack (1986) Complement system proteins which interact with C3b or C4b. A superfamily of structurally related proteins. *Immunol. Today* 7, 230-234.
80. Hourcade, D., V.M. Holers & J.P. Atkinson (1989) The regulators of complement activation (RCA) gene cluster. *Adv. Immunol.* 45, 381-416.
81. Pardo-Manuel, F., J. Rey-Campos, A. Hillarp, B. Dahlbäck & S. Rodríguez de Córdoba (1990) Human genes for the α and β chains of complement C4b-binding protein are closely linked in a head-to-tail arrangement. *Proc. Natnl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 4529-4532.
82. Norman, D.G., P.N. Barlow, M. Baron, A.J. Day, R.B. Sim & I.D. Campbell (1991) Three-dimensional structure of a complement control protein module in solution. *J. Mol. Biol.* 219, 717-725.
83. Sottrup-Jensen, L., T.M. Stepanik, T. Kristensen, P.B. Lønblad, C.M. Jones, D.M. Wierzbicki, S. Magnusson, H. Domdey, R.A. Wetsel, Å. Lundwall, B.F. Tack & G.H. Fey (1985) Common evolutionary origin of α_2 -macroglobulin and complement components C3 and C4. *Proc. Natnl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 9-13.
84. Enghild, J.J., I.B. Thøgersen, G. Salvesen, G.H. Fey, N.L. Figler, S.L. Gonias & S.V. Pizzo (1990) α -Macroglobulin from *Limulus polyphemus* exhibits proteinase inhibitory activity and participates in a hemolytic system. *Biochemistry* 29, 10070-10080.
85. Griffin, F.M. (1988) Opsonization, phagocytosis, and intracellular microbial killing. En THE COMPLEMENT SYSTEM (Editores, K. Rother & G.O. Till), pp. 395-418. Springer Verlag (Berlín).
86. Wright, S.D. & F.M. Griffin Jr (1985) Activation of phagocytic cells' C3 receptors for phagocytosis. *J. Leuk. Biol.* 38, 327-339.
87. Joiner, K.A. (1988) Complement evasion by bacteria and parasites. *Ann. Rev. Microbiol.* 42, 201-230.
88. Tremblay, M., S. Meloche, R.-P. Saekaly & M.A. Wainberg (1990) Complement receptor 2 mediates enhancement of human immunodeficiency virus 1 infection in Epstein-Barr virus-carrying B cells. *J. Exp. Med.* 171, 1791-1796.
89. Egwang, T.G. & A.D. Befus (1984) The role of complement in the induction and regulation of immune responses. *Immunology* 51, 207-224.
90. Morgan, E.L. (1986) Modulation of the immune response by anaphylatoxins. *Complement* 3, 128-136.
91. Melchers, F., A. Erdei, T. Schulz & M.P. Dierich (1985) Growth control of activated, synchronized murine B cells by the C3d fragment of human complement. *Nature* 317, 264-267.
92. Carter, R.H., M.O. Spycher, Y.C. Ng, R. Hoffman & D.T. Fearon (1988) Synergistic interaction between complement receptor type 2 and membrane IgM on B lymphocytes. *J. Immunol.* 141, 457-463.
93. O'Neil, K.M., H.D. Ochs, S.R. Heller, L.C. Cork, J.M. Morris & J.A. Winkelstein (1988) Role of C3 in humoral immunity. Defective antibody production in C3-deficient dogs. *J. Immunol.* 140, 1939-1945.

94. Finco, O., S. Li, M. Cuccia, F.S. Rosen & M.C. Carroll (1992) Structural differences between the two human complement C4 isotypes affect the humoral immune response. *J. Exp. Med.* 175, 537-543.
95. Alper, C.A. & F.S. Rosen (1984) Inherited deficiencies of complement proteins in man. *Springer Semin. Immunopathol.* 7, 251-261.
96. Agnello, V. (1978) Complement deficiency states. *Medicine* 57, 1-23.
97. Yu, C.Y., R.D. Campbell & R.R. Porter (1988) A structural model for the location of the Rodgers and the Chido antigenic determinants and their correlation with the human complement component C4A/C4B isotypes. *Immunogenetics* 27, 399-405.
98. Alper, C.A., H.R. Colten, F.S. Rosen, A.R. Rabson, G.M. Macnab & J.S.S. Gear (1972) Homozygous deficiency of C3 in a patient with repeated infections. *The Lancet* ii, 1179-1181.
99. Berger, M., J.E. Balow, C.B. Wilson & M.M. Frank (1983) Circulating immune complexes and glomerulonephritis in a patient with congenital absence of the third component of complement. *New Engl. J. Med.* 308, 1009-1012.
100. Schäffer, H., D. Mathey, F. Hugo & S. Bhakdi (1986) Deposition of the terminal C5b-9 complement complex in infarcted areas of human myocardium. *J. Immunol.* 137, 1945-1949.
101. Weisman, H.F., T. Bartow, M.K. Leppo, H.C. Marsh, Jr., G.R. Caeson, M.F. Concino, M.P. Boyle, K.H. Roux, M.L. Weisfeldt & D.T. Fearon (1990) Soluble human complement receptor type I: In vivo inhibitor of complement suppressing post-ischemic myocardial inflammation and necrosis. *Science* 249, 146-151.
102. Müller-Eberhard, H.J. & U. Nilsson (1960) Relation of a β_1 -glycoprotein of human serum to the complement system. *J. Exp. Med.* 111, 217-234.
103. Nilsson, U.R., R.J. Mandle Jr., & J.A. McConnell-Mapes (1975) Human C3 and C5: Subunit structure and modifications by trypsin and C42-C423. *J. Immunol.* 114, 815-822.
104. Tack, B.F., S.C. Morris & J.W. Prahil (1979) Third component of human complement: Structural analysis of the polypeptide chains of C3 and C3b. *Biochemistry* 18, 1497-1503.
105. Matsuda, T., T. Seya, & S. Nagasawa (1985) Location of the inter-chain disulfide bonds of the third component of human complement. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 127, 264-269.
106. Janatova, J. (1986) Detection of disulphide bonds and localization of interchain linkages in the third (C3) and the fourth (C4) components of human complement. *Biochem. J.* 233, 819-825.
107. Tack, B.F. & J.W. Prahil (1976) Third component of human complement: Purification from plasma and physicochemical characterization. *Biochemistry* 15, 4513-4521.
108. Hirani, S., J.D. Lambris & H.J. Müller-Eberhard (1986) Structural analysis of the asparagine-linked oligosaccharides of human complement component C3. *Biochem. J.* 233, 613-616.
109. de Bruijn, M.H.L. & G.H. Fey (1985) Human complement component C3: cDNA coding sequence and derived primary structure. *Proc. Natnl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 708-712.
110. Lundwall, Å., R.A. Wetsel, H. Domdey, B.F. Tack & G.H. Fey (1984) Structure of murine complement component C3. I. Nucleotide sequence of cloned complementary and genomic

- DNA coding for the β chain. *J. Biol. Chem.* 259, 13851-13856.
111. Wetsel, R.A., Å. Lundwall, F. Davidson, T. Gibson, B.F. Tack & G.H. Fey (1984) Structure of murine complement component C3. II. Nucleotide sequence of cloned complementary DNA coding for the α chain. *J. Biol. Chem.* 259, 13857-13862.
112. Kusano, M., N.-H. Choi, M. Tomita, K.-I. Yamamoto, S. Migita, T. Sekiya & S. Nishimura (1986) Nucleotide sequence of cDNA and derived amino acid sequence of rabbit complement component C3 α -chain. *Immunol. Invest.* 15, 365-378.
113. Auerbach, H.S., R. Burger, A. Dodds & H.R. Colten (1990) Molecular basis of complement C3 deficiency in guinea pigs. *J. Clin. Invest.* 86, 96-106.
114. Grossberger, D., A. Marcuz, L. Du Pasquier & J.D. Lambris (1989) Conservation of structural and functional domains in complement component C3 of *Xenopus* and mammals. *Proc. Natnl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 1323-1327.
115. Ishiguro, H., K. Kobayashi, M. Suzuki, K. Titani, S. Tomonaga & Y. Kurosawa (1992) Isolation of a hagfish gene that encodes a complement component. *EMBO J.* 11, 829-837.
116. Nonaka, M., M. Takahashi (1992) Complete complementary DNA sequence of the third component of complement of lamprey. Implication for the evolution of thioester containing proteins. *J. Immunol.* 148, 3290-3295.
117. Huber, R., H. Scholze, E.P. Páques & J. Deisenhofer (1980) Crystal structure analysis and molecular model of human C3a anaphylatoxin. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 361, 1389-1399.
118. Molenaar, J.L., A.W. Helder, M.A.C. Müller, M. Goris-Mulder, L.S. Jonker, M. Brouwer & K.W. Pondman (1975) Physico-chemical and antigenic properties of human C3. *Immunochem.* 12, 359-364.
119. Ikai, A., M. Nishigai, A. Saito, H. Sinohara, Y. Muto & Y. Arata (1990) Electron microscopic demonstration of a common structural motif in human complement factor C3 and rat α_1 -inhibitor 3 (murinoglobulin). *FEBS Lett.* 260, 291-293.
120. Sim, R.B. & S.J. Perkins (1990) Molecular modelling of C3 and its ligands. En THE THIRD COMPONENT OF COMPLEMENT. CHEMISTRY AND BIOLOGY (Editor, J.D. Lambris) *Current Top. Microbiol. Immunol.* 153, 147-162. Springer-Verlag (Berlín).
121. Becherer, J.D., J. Alsenz & J.D. Lambris (1990) Molecular aspects of C3 interactions and structural/functional analysis of C3 from different species. En THE THIRD COMPONENT OF COMPLEMENT. CHEMISTRY AND BIOLOGY (Editor, J.D. Lambris) *Current Top. Microbiol. Immunol.* 153, 45-72. Springer-Verlag (Berlín).
122. Becherer, J.D., J. Alsenz, I. Esparza, C.E. Hack & J.D. Lambris (1992) Segment spanning residues 727-768 of the complement C3 sequence contains a neoantigenic site and accommodates the binding of CR1, factor H, and factor B. *Biochemistry* 31, 1787-1794.
123. Esparza, I., J.D. Becherer, J. Alsenz, A. De la Hera, Z. Lao, C.D. Tsoukas & J.D. Lambris (1991) Evidence of multiple sites of interaction in C3 for complement receptor type 2 (C3d/EBV receptor, CD21). *Eur. J. Immunol.* 21, 2829-2838.
124. Wright, S.D., P.A. Reddy, M.T.C. Jong & B.W. Erickson (1987) C3bi receptor (complement

- receptor type 3) recognizes a region of complement protein C3 containing the sequence Arg-Gly-Asp. *Proc. Natnl. Acad. Sci. U.S.A.* 84, 1965-1968.
125. Taniguchi-Sidle, A. & D.E. Isenman (1992) Mutagenesis of the Arg-Gly-Asp triplet in human complement C3 does not abolish binding of iC3b to the leukocyte integrin complement receptor type III (CR3, CD11b/CD18). *J. Biol. Chem.* 267, 635-643.
126. Barnum, S.R., G. Fey & B.F. Tack (1990) Biosynthesis and genetics of C3. En THE THIRD COMPONENT OF COMPLEMENT. CHEMISTRY AND BIOLOGY (Editor, J.D. Lambris) *Current Top. Microbiol. Immunol.* 153, 23-43. Springer-Verlag (Berlin).
127. Colten, H.R. (1992) Tissue-specific regulation of inflammation. *J. Appl. Physiol.* 72, 1-7.
128. Goldberger, G., M.L. Thomas, B.F. Tack, J. Williams, H.R. Colten & G.N. Abraham (1981) NH₂-terminal structure and cleavage of guinea pig pro-C3, the precursor of the third component of complement. *J. Biol. Chem.* 256, 12617-12619.
129. Iijima, M., T. Tobe, T. Sakamoto & M. Tomita (1984) Biosynthesis of the internal thioester of the third component of complement. *J. Biochem.* 96, 1539-1546.
130. Wold, F. (1985) Reactions of the amide side-chains of glutamine and asparagine *in vivo*. *Trends. Biochem. Sci.* 10, 4-6.
131. Pangburn, M.K. (1992) Spontaneous reformation of the intramolecular thioester in complement protein C3 and low temperature capture of a conformational intermediate capable of reformation. *J. Biol. Chem.* 267, 8584-8590.
132. Sistonen, P. (1984) Linkage of the LW blood group locus with the complement C3 and Lutheran blood group loci. *Ann. Hum. Genet.* 48, 239-242.
133. Lusic, A.J., C. Heinzman, R.S. Sparkes, J. Scott, T.J. Knott, R. Geller, M.C. Sparkes & T. Mohandas (1986) Regional mapping of human chromosome 19: organization for genes for plasma lipid transport (APOC1, -C2, and -E and LDLR) and the genes C3, PEPD, and GPI. *Proc. Natnl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 3929-3933.
134. Ferreira, A. & V. Nussenzweig (1976) Control of C3 levels in mice during ontogeny by a gene in the central region of the H-2 complex. *Nature* 260, 613-615.
135. Barnum, S.R., P. Amiguet, F. Amiguet-Barras, G. Fey & B.F. Tack (1989) Complete intron/exon organization of DNA encoding the α' chain of human C3. *J. Biol. Chem.* 264, 8471-8474.
136. Fong, K.Y., M. Botto, M.J. Walport & A.K. So (1990) Genomic organization of human complement component C3. *Genomics* 7, 579-586.
137. Vik, D.P., P. Amiguet, G.J. Moffat, M. Fey, F. Amiguet-Barras, R.A. Wetsel & B.F. Tack (1991) Structural features of the human C3 gene: Intron/exon organization, transcriptional start site, and promoter region sequence. *Biochemistry* 30, 1080-1085.
138. Kawamura, N., L. Singer, R.A. Wetsel & H.R. Colten (1992) Cis- and trans-acting elements required for constitutive and cytokine-regulated expression of the mouse complement C3 gene. *Biochem. J.* 283, 705-712.
139. Rittner, C. & P.M. Schneider (1988) Genetics and polymorphism of the complement

- components. En THE COMPLEMENT SYSTEM (Editores, K. Rother & G.O. Till), pp. 80-135. Springer Verlag (Berlín).
140. Alper, C.A., G. Geserick, C. Rittner, E.A. Azen, H.W. Goedde & P. Teisberg (1973) Statement of the polymorphism of the third component of complement in man (C3). *Vox Sang.* 25, 18-20.
141. Botto, M., K.Y. Fong, A.K. So, C. Koch & M.J. Walport (1990) Molecular basis of polymorphisms of human complement component C3. *J. Exp. Med.* 172, 1011-1017.
142. Colten, H.R. & C.A. Alper (1972) Hemolytic efficiencies of genetic variants of human C3. *J. Immunol.* 108, 1184-1187.
143. Morgan, B.P., (1990) Complement deficiencies and disease. En COMPLEMENT. CLINICAL ASPECTS AND RELEVANCE TO DISEASE. pp.78-96. Academic Press (Londres).
144. Pussell, B.A., E. Bourke, M. Nayef, S. Morris & D.K. Peters (1980) Complement deficiency and nephritis. A report of a family. *The Lancet* i, 675-677.
145. Whitehead, A.S., E. Solomon, S. Chambers, W.F. Bodmer, S. Povey & G. Fey (1982) Assignment of the structural gene for the third component of human complement to chromosome 19. *Proc. Natnl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 5021-5025.
146. Borzy, M.S., A. Gewurz, L. Wolff, D. Houghton & E. Louvrien (1988) Inherited C3 deficiency with recurrent infections and glomerulonephritis. *Am. J. Dis. Child.* 142, 79-83.
147. Bitter-Suermann & R. Burger (1990) C3 deficiencies. En THE THIRD COMPONENT OF COMPLEMENT. CHEMISTRY AND BIOLOGY (Editor, J.D. Lambris) *Current Top. Microbiol. Immunol.* 153, 223-233. Springer-Verlag (Berlín).
148. Botto, M., K.Y. Fong, A.K. So, A. Rudge & M.J. Walport (1990) Molecular basis of hereditary C3 deficiency. *J. Clin. Invest.* 86, 1158-1163.
149. Isenman, D.E. & N.R. Cooper (1981) The structure and function of the third component of human complement- I. The nature and extent of conformational changes accompanying C3 activation. *Molec. Immunol.* 18, 331-339.
150. Fontaine, M., J.P. Aubert, F. Joisel & J.P. Lebreton (1982) Structure-function relations in the third component of human complement (C3)-I. Hydrophobic sites. *Molec. Immunol.* 19, 27-37.
151. Örsterberg, R., G. Eggertsen, Å. Lundwall & J.Sjöquist (1984) Conformational change of complement proteins C3 and C4 induced by methylamine: an X-ray scattering study. *Int. J. Biol. Macromol.* 6, 195-198.
152. Perkins, S.J. & R.B. Sim (1986) Molecular modelling of human complement component C3 and its fragments by solution scattering. *Eur. J. Biochem.* 157, 155-168.
153. Alsenz, J., J.D. Becherer, B. Nilsson & J.D. Lambris (1990) Structural and functional analysis of C3 using monoclonal antibodies. En THE THIRD COMPONENT OF COMPLEMENT. CHEMISTRY AND BIOLOGY (Editor, J.D. Lambris) *Current Top. Microbiol. Immunol.* 153, 235-248. Springer-Verlag (Berlín).
154. Hack, C.E., J. Paardekooper, R.T. Smeenk, J. Abbink, A.J.M. Eerenberg & J.H. Nuijens

- (1988) Disruption of the internal thioester bond in the third component of complement (C3) results in the exposure of neodeterminants also present on activation products of C3. An analysis with monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 141, 1602-1609.
155. Whaley, K. & U. Nilsson (1988) Use of antisera to the isolated alpha and beta subunits of C3 as probes to study functional sites present on particle-bound C3b but absent on native soluble forms of C3. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 86, 55-61.
156. Molenaar, J.L., A. ten Velde & K.W. Pondman (1973) Anti-C3a, anti-C3B (anti-B) and their reaction with the anaphylatoxic fragment C3a. *J. Immunol.* 110, 702-708.
157. Nilsson, B., D. Grossberger, K. Nilsson Ekdahl, P. Reigert, J.D. Becherer, U.R. Nilsson & J.D. Lambris (1992) Conformational differences between surface-bound and phluid-phase complement-component-C3 fragments. Epitope mapping by cDNA expression. *Biochem. J.* 282, 715-721.
158. Law, S.K. & R.P. Levine (1977) Interaction between the third complement protein and cell surface macromolecules. *Proc. Natnl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 2701-2705.
159. Law, S.-K.A., N.A. Lichtenberg & R.P. Levine (1979) Evidence for an ester linkage between the labile binding site of C3b and receptive surfaces. *J. Immunol.* 123, 1388-1394.
160. Budzko, D.B. & H.J. Müller-Eberhard (1969) Anaphylatoxin release from the third component of human complement by hydroxylamine. *Science* 165, 506-507.
161. Sim, R.B., T.M. Twose, D.S. Paterson & E. Sim (1981) The covalent-binding reaction of complement component C3. *Biochem. J.* 193, 115-137.
162. Law, S.-K.A., T.M. Minich & R.P. Levine (1981) Binding reaction between the third human complement protein and small molecules. *Biochemistry* 20, 7457-7463.
163. Hostetter, M.K., M.L. Thomas, F.S. Rosen & B.F. Tack (1982) Binding of C3b proceeds by a transesterification reaction at the thiolester site. *Nature* 298, 72-75.
164. Janatova, J., P.E. Lorenz, A.N. Schechter, J.W. Prahl & B.F. Tack (1980) Third component of human complement: Appearance of a sulfhydryl group following chemical or enzymatic inactivation. *Biochemistry* 19, 4471-4478.
165. Tack, B.F., R.A. Harrison, J. Janatova, M.L. Thomas & J.W. Prahl (1980) Evidence for presence of an internal thiolester bond in third component of human complement. *Proc. Natnl. Acad. Sci. U.S.A.* 77, 5764-5768.
166. Liu, T.-Y. (1977) The role of sulfur in proteins. En *THE PROTEINS VOL. III* (Editores, H. Neurath, R.L. Hill & C.-L. Boeder), pp. 239-402. Academic Press Inc. (Nueva York).
167. Noda, L.H., S.A. Kuby & H.A. Lardy (1953) Properties of thiolesters: kinetics of hydrolysis in dilute aqueous media. *J. Am. Chem. Soc.* 75, 913-917.
168. Thomas, M.L., J. Janatova, W.R. Gray & B.F. Tack (1982) Third component of human complement: localization of the internal thiolester bond. *Proc. Natnl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 1054-1058.
169. Sim, R.B. & E. Sim (1981) Autolytic fragmentation of complement components C3 and C4 under denaturing conditions, a property shared with α_2 -macroglobulin. *Biochem. J.* 193, 129-

- 141.
170. Khan, S.A. & B.W. Erickson (1982) An equilibrium model of the metastable binding sites of α_2 -macroglobulin and complement proteins C3 and C4. *J. Biol. Chem.* 257, 11864-11867.
171. Levine, R.P. & A.W. Dodds (1990) The thioester bond of C3. En *THE THIRD COMPONENT OF COMPLEMENT. CHEMISTRY AND BIOLOGY* (Editor, J.D. Lambris) *Current Top. Microbiol. Immunol.* 153, 73-82. Springer-Verlag (Berlin).
172. Harrison, R.A., M.L. Thomas & B.F Tack (1981) Sequence determination of the thiolester site of the fourth component of human complement. *Proc. Natnl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 7388-7392.
173. Howard, J.B., L. Zieske, J. Clarkson & L. Rathe (1986) Mechanism-based fragmentation of coenzyme A transferase. Comparison of α_2 -macroglobulin and coenzyme A transferase thiol ester reactions. *J. Biol. Chem.* 261, 60-65.
174. Khan, S.A. & B.W. Erickson (1981) Synthesis of macrocyclic peptide thiolactones as models of the metastable binding sites of α_2 -macroglobulin and complement protein C3b. *J. Am. Chem. Soc.* 103, 7374-7376.
175. Tack, B.F. (1983) The β -Cys- γ -Glu thiolester bond in human C3, C4 and α_2 -macroglobulin. *Springer Semin. Immunopathol.* 6, 259-282.
176. Fedor, L.R. & T.C. Bruice (1965) Nucleophilic displacement reactions at the thiol ester bond. IV. General base catalyzed hydrolysis of ethyl trifluorothiolacetate. Kinetic evidence for the formation of a tetrahedral intermediate. *J. Am. Chem. Soc.* 87, 4138-4147.
177. Bruice, T.C. (1959) Imidazole catalysis. VI. The intramolecular nucleophilic catalysis of the hydrolysis of an acyl thiol. The hydrolysis of *n*-propyl γ -(4-imidazolyl)-thiolbutyrate. *J. Am. Chem. Soc.* 81, 5444-5449.
178. Law, S.K.A., A.W. Dodds & R.R. Porter (1984) A comparison of the properties of two classes, C4A and C4B, of the human complement component C4. *EMBO J.* 3, 1819-1823.
179. Sottrup-Jensen, L. (1989) α -Macroglobulins: structure, shape, and mechanism of proteinase complex formation. *J. Biol. Chem.* 264, 11539-11542.
180. Dodds, A.W. & S.-K.A. Law (1988) Structural basis of the binding specificity of the thioester-containing proteins, C4, C3 and alpha-2-macroglobulin. *Complement* 5, 89-97.
181. Carroll, M.C., D.M. Fathallah, L. Bergamaschini, E.M. Alicot & D.E. Isenman (1990) Substitution of a single amino acid (aspartic acid for histidine) converts the functional activity of human complement C4B to C4A. *Proc. Natnl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 6868-6872.
182. Venkatesh, Y.P. & R.P. Levine (1988) The esterase-like activity of covalently bound human third complement protein. *Molec. Immunol.* 25, 821-828.
183. Davies, S.G. & R.B. Sim (1981) Intramolecular general acid catalysis in the binding reactions of α_2 -macroglobulin and complement components C3 and C4. *Biosci. Rep.* 1, 461-468.
184. Isaac, L. & D.E. Isenman (1992) Structural requirements for thioester bond formation in human complement component C3. Reassessment of the role of thioester bond integrity on the conformation of C3. *J. Biol. Chem.* 267, 10062-10069.

185. Law, S.-K.A., T.M. Minich & R.P. Levine (1984) Covalent binding efficiency of the third and fourth complement proteins in relation to pH, nucleophilicity, and availability of hydroxyl groups. *Biochemistry* 23, 3267-3272.
186. Law, S.K.A. & A.W. Dodds (1990) C3, C4 and C5: The thioester site. *Biochem. Soc. Trans.* 18, 1155-1159.
187. Harrison, R.A. & P.J. Lachmann (1980) Novel cleavage products of the third component of human complement. *Molec. Immunol.* 17, 219-228.
188. Davis III, A.E. & R.A. Harrison (1982) Structural characterization of factor I mediated cleavage of the third component of complement. *Biochemistry* 21, 5745-5749.
189. Sim, E., A.B. Wood, L.-M. Hsiung & R.B. Sim (1981) Pattern of degradation of human complement fragment, C3b. *FEBS Lett.* 132, 55-60.
190. Law, S.K., D.T. Fearon & R.P. Levine (1979) Action of the C3b-Inactivator on cell-bound C3b. *J. Immunol.* 122, 759-765.
191. Lachmann, P.J., M.K. Pangburn & R.G. Oldroyd (1982) Breakdown of C3 after complement activation. Identification of a new fragment, C3g, using monoclonal antibodies. *J. Exp. Med.* 156, 205-216.
192. West, C.D., N.C. Davis, J. Forristal, J. Herbst & R. Spitzer (1966) Antigenic determinants of human β_{1c} - and β_{1g} -globulins. *J. Immunol.* 96, 650-658.
193. Isenman, D.E. (1983) Conformational changes accompanying proteolytic cleavage of human complement protein C3b by the regulatory enzyme factor I and its cofactor H. Spectroscopic and enzymological studies. *J. Biol. Chem.* 258, 4238-4244.
194. Lambris, J.D., D. Avila, J.D. Becherer & H.J. Müller-Eberhard (1988) A discontinuous factor H binding site in the third component of complement as delineated by synthetic peptides. *J. Biol. Chem.* 263, 12147-12150.
195. Erdei, A., G. Füst & J. Gergely (1991) The role of C3 in the immune response. *Immunol. Today* 12, 332-337.
196. Ghebrehiwet, B. & H.J. Müller-Eberhard (1979) C3e: An acidic fragment of human C3 with leukocytosis-inducing activity. *J. Immunol.* 123, 618-621.
197. Davis III, A.E., R.A. Harrison & P.J. Lachmann (1984) Physiologic inactivation of fluid phase C3b: Isolation and structural analysis of C3c, C3d,g ($\alpha 2D$), and C3g. *J. Immunol.* 132, 1960-1966.
198. Ganu, V.S., H.J. Müller-Eberhard & T.E. Hugli (1989) Factor C3f is a spasmogenic fragment released from C3b by factors I and H: The heptadeca-peptide C3f was synthesized and characterized. *Molec. Immunol.* 26, 939-948.
199. Minkoff, M.S., W.W. Wong & D.S. Silberstein (1991) Identification of C3 β chain as the human serum eosinophil cytotoxicity inhibitor. *J. Exp. Med.* 174, 1267-1270.
200. Burton, D.R., & J.M. Woof (1992) Human antibody effector function. *Adv. Immunol.* 51, 1-84.

201. Burton, D.R. (1985) Immunoglobulin G: functional sites. *Molec. Immunol.* 22, 161-206.
202. Amzel, L.M., & R.J. Poljak (1979) Three-dimensional structure of Immunoglobulins. *Ann. Rev. Biochem.* 48, 961-997.
203. Davies, D.R., S. Sheriff & E.A. Padlan (1988) Antibody-antigen complexes. *J. Biol. Chem.* 263, 10541-10544.
204. Steward, M.W. & J. Stensgaard (1983) ANTIBODY AFFINITY: THERMODYNAMIC ASPECTS AND BIOLOGICAL SIGNIFICANCE. CRC Press, Florida.
205. Møller, N.P.H. (1979) Fc-mediated immune precipitation. I. A new role of the Fc-portion of IgG. *Immunology* 38, 631-640.
206. Rodwell, J.D., Lih-Heng-Tang & V.N. Schumacker (1980) Antigen valence and Fc-localized secondary forces in antibody precipitation. *Molec. Immunol.* 17, 1591-1597.
207. Møller, N.P.H. & J.F. Bak (1984) A general theory for the precipitin reaction based on Fc-mediated precipitation. *Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand. Sect. C* 92, 237-246.
208. Burton, D.R. (1990) Antibody: the flexible adaptor molecule. *Trends Biochem. Sci.* 15, 64-69.
209. Davies, D.R. & H. Metzger (1983) Structural basis of antibody function. *Ann. Rev. Immunol.* 1, 87-117.
210. Schifferli, J.A., Y.C. Ng & D.K. Peters (1986) The role of complement and its receptor in the elimination of immune complexes. *New Engl. J. Med.* 315, 488-495.
211. Hebert, L.A., F.G. Cosio & J.C. Neff (1991) Diagnostic significance of hypocomplementemia. *Kidney Int.* 39, 811-821.
212. Vivanco, F., E. Barrio, A. Sánchez, G. Marqués & L.C. Antón (1991) Processing of immune complexes through the covalent interaction of the third (C3) and fourth (C4) components of complement. *Immunol (Life Sci. Adv.)* 10, 113-123.
213. Miller, G.W. & V. Nussenzweig (1975) A new complement function: Solubilization of antigen-antibody aggregates. *Proc. Natnl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 418-422.
214. Czop, J. & V. Nussenzweig (1976) Studies on the mechanism of solubilization of immune precipitates by serum. *J. Exp. Med.* 143, 615-630.
215. Fujita, T., Y. Takata & N. Tamura (1981) Solubilization of immune precipitates by six isolated alternative pathway proteins. *J. Exp. Med.* 154, 1743-1751.
216. Takahashi, M., S. Takahashi, V. Brade & V. Nussenzweig (1978) Requirements for the solubilization of immune aggregates by complement. The role of the classical pathway. *J. Clin. Invest.* 62, 349-358.
217. Takahashi, M., B.F. Tack & V. Nussenzweig (1977) Requirements for the solubilization of immune aggregates by complement. Assembly of a factor B-dependent C3-convertase on the immune complexes. *J. Exp. Med.* 145, 86-100.
218. Takahashi, M., S. Takahashi & S.-I. Hirose (1980) Solubilization of antigen-antibody

- complexes: A new function of complement as a regulator of immune reactions. *Prog. Allergy* 27, 134-166.
219. Genin, C. & P. Lesavre (1983) Immune-complexes solubilization: effect of antigen-antibody ratio and relative role of alternative and classical complement pathways. *Molec. Immunol.* 20, 1069-1072.
220. Rajnavölgyi, E., G. Füst, J. Ember, G.A. Medgyesi & J. Gergely (1978) Evidences proving the intercalation hypothesis of the C-mediated complex release activity (CRA). *Immunochem.* 15, 335-337.
221. Johnston, A., G.R. Auda, M.A. Kerr, M.W. Steward & K. Whaley (1992) Dissociation of primary antigen-antibody bonds is essential for complement mediated solubilization of immune precipitates. *Molec. Immunol.* 29, 659-665.
222. Schifferli, J.A., S.R. Bartolotti & D.K. Peters (1980) Inhibition of immune precipitation by complement. *Clin. Exp. Immunol.* 42, 387-394.
223. Schifferli, J.A., P. Woo & D.K. Peters (1982) Complement-mediated inhibition of immune precipitation. I. Role of the classical and alternative pathways. *Clin. Exp. Immunol.* 47, 555-562.
224. Naama, J.K., A.O. Hamilton, A.C. Yeung-Laiwah & Whaley (1984) Prevention of immune precipitation by purified classical pathway complement components. *Clin. Exp. Immunol.* 58, 486-492.
225. Schifferli, J.A., G. Steiger & M. Schapira (1985) The role of C1, C1-inactivator and C4 in modulating immune precipitation. *Clin. Exp. Immunol.* 60, 605-612.
226. Esser, A.F. (1991) Big MAC attack: complement proteins cause leaky patches. *Immunol. Today* 12, 316-318.
227. Schifferli, J.A., G. Steiger & J.-P. Paccaud (1986) Complement mediated inhibition of immune precipitation and solubilization generate different concentrations of complement anaphylatoxins (C4a, C3a, C5a). *Clin. Exp. Immunol.* 64, 407-414.
228. Schifferli, J.A. & D.K. Peters (1982) Complement-mediated inhibition of immune precipitation. II. Analysis by sucrose density gradient ultracentrifugation. *Clin. Exp. Immunol.* 47, 563-569.
229. Schifferli, J.A. & D.K. Peters (1983) Immune adherence and staphylococcus protein A binding of soluble immune complexes produced by complement activation. *Clin. Exp. Immunol.* 54, 827-833.
230. Schifferli, J.A., Y.C. Ng, J. Estreicher & M.J. Walport (1988) The clearance of tetanus toxoid/anti-tetanus toxoid immune complexes from the circulation of humans. Complement- and erythrocyte complement receptor 1-dependent mechanisms. *J. Immunol.* 140, 899-904.
231. Cornacoff, J.B., L.A. Herbert, W.L. Smead, M.E. VanAman, D.J. Birmingham & F.J. Waxman (1983) Primate erythrocyte-immune complex-clearing mechanism. *J. Clin. Invest.* 71, 236-247.
232. Davies, K.A., V. Hird, S. Stewart, G.B. Sivolapenko, P. Jose, A.A. Epenetos & M.J. Walport (1990) A study of in vivo immune complex formation and clearance in man. *J.*

- Immunol.* 144, 4613-4620.
233. Waxman, F.J., L.A. Herbert, F.G. Cosio, W.L. Smead, M.E. VanAman, J.M. Taguian & D.J. Birmingham (1986) Differential binding of immunoglobulin A and immunoglobulin G1 immune complexes to primate erythrocytes in vivo. Immunoglobulin A immune complexes bind less well to erythrocytes and are preferentially deposited in glomeruli. *J. Clin. Invest.* 77, 82-89.
234. Waxman, F.J., L.A. Hebert, J.B. Cornacoff, M.E. VanAman, W.L. Smead, E.H. Kraut, D.J. Birmingham & J.M. Taguian (1984) Complement depletion accelerates the clearance of immune complexes from the circulation of primates. *J. Clin. Invest.* 74, 1329-1340.
235. Varga, L., E. Thiry & G. Füst (1988) BSA-anti-BSA immune complexes formed in the presence of human complement do not bind to autologous red blood cells. *Immunology* 64, 381-384.
236. Paccaud, J.-P., J.-L. Carpentier & J.A. Schifferli (1988) Direct evidence for the clustered nature of complement receptors type 1 on the erythrocyte membrane. *J. Immunol.* 141, 3889-3894.
237. Kijlstra, A., L.A. van Es & M.R. Daha (1979) The role of complement in the binding and degradation of immunoglobulin aggregates by macrophages. *J. Immunol.* 123, 2488-2493.
238. Fries, L.F., S.A. Siwik, A. Malbrán & M.M. Frank (1987) Phagocytosis of target particles bearing C3b-IgG covalent complexes by human monocytes and polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* 62, 45-51.
239. Emlen, W., G. Burdick, V. Carl & P.J. Lachmann (1989) Binding of model immune complexes to erythrocyte CR₁ facilitates immune complex uptake by U937 cells. *J. Immunol.* 142, 4366-4371.
240. Kimberly, R.P., J.C. Edberg, L.T. Merriam, S.B. Clarkson, J.C. Unkeless & R.P. Taylor (1989) In vivo handling of soluble complement fixing Ab/dsDNA immune complexes in chimpanzees. *J. Clin. Invest.* 84, 962-970.
241. Edberg, J.C., R.P. Kimberly & R.P. Taylor (1992) Functional characterization of non-human primate erythrocyte immune adherence receptors: implications for the uptake of immune complexes by the cells of the mononuclear phagocytic system. *Eur. J. Immunol.* 22, 1333-1339.
242. Emlen, W., V. Carl & G. Burdick (1992) Mechanism of transfer of immune complexes from red blood cell CR1 to monocytes. *Clin. Exp. Immunol.* 89, 8-17.
243. Medof, M.E., G.M. Prince & C. Mold (1982) Release of soluble immune complexes from immune adherence receptors on human erythrocytes is mediated by C3b inactivator independently of β 1H and is accompanied by generation of C3c. *Proc. Natnl. Acad. Sci. U.S.A.* 79, 5047-5051.
244. Medof, M.E. & G.M. Prince (1983) Alternative pathway-mediated rebinding of immune complexes to human red blood cells. *Immunology* 50, 1-9.
245. Manthei, U., M.W. Nickells, S.H. Barnes, L.L. Ballard, W.-Y. Cui & J.P. Atkinson (1988) Identification of a C3b/iC3 binding protein of rabbit platelets and leukocytes. A CR1-like candidate for the immune adherence receptor. *J. Immunol.* 140, 1228-1235.

246. Ross, G.D., W.J. Yount, M.J. Walport, J.B. Winfield, C.J. Parker, C.R. Fuller, R.P. Taylor, B.R. Myones & P.J. Lachmann (1985) Disease-associated loss of erythrocyte complement receptors (CR₁, C3b receptors) in patients with systemic lupus erythematosus and other diseases involving autoantibodies and/or complement activation. *J. Immunol.* 135, 2005-2014.
247. Kishore, N., D. Shah, V.M. Skanes & R.P. Levine (1988) The fluid-phase binding of human C4 and its genetic variants, C4A3 and C4B1, to immunoglobulins. *Molec. Immunol.* 25, 811-819.
248. Alcolea, J.M., L.C. Antón, G. Marqués, P. Sánchez-Corral & F. Vivanco (1987) Formation of covalent complexes between the fourth component of human complement and IgG immune aggregates. *Complement* 4, 21-32.
249. Schifferli, J.A., G. Steiger, J.-P. Paccaud, A.G. Sjöholm & G. Hauptmann (1986) Difference in the biological properties of the two forms of the fourth component of human complement (C4). *Clin. Exp. Immunol.* 63, 473-477.
250. Hong, K., Y. Takata, K. Sayama, H. Kozono, J. Takeda, Y. Nakano, T. Kinoshita & K. Inoue (1984) Inhibition of immune precipitation by complement. *J. Immunol.* 133, 1464-1470.
251. Ziccardi, R.J. (1988) Studies on the mechanism of C3b inhibition of immune complex induced C1 activation. *Molec. Immunol.* 25, 1339-1346.
252. Brown, E.J., M. Berger, K.A. Joiner & M.M. Frank (1983) Classical complement pathway activation by antipneumococcal antibodies leads to covalent binding of C3b to antibody molecules. *Infect. Immun.* 42, 594-598.
253. Fries, L.F., T.A. Gaither, C.H. Hammer & M.M. Frank (1984) C3b covalently bound to IgG demonstrates a reduced rate of inactivation by factors H and I. *J. Exp. Med.* 160, 1640-1655.
254. Fries, L.F., G.M. Prince, T.A. Gaither & M.M. Frank (1985) Factor I co-factor activity of CR₁ overcomes the protective effect of IgG on covalently bound C3b residues. *J. Immunol.* 135, 2673-2679.
255. Gadd, K.J., & K.B.M. Reid (1981) The binding of complement component C3 to antibody-antigen aggregates after activation of the alternative pathway in human serum. *Biochem. J.* 195, 471-480.
256. Reid, K.B.M. (1971) Complement fixation by the F(ab')₂-fragment of pepsin-treated rabbit antibody. *Immunology* 20, 649-658.
257. Albar, J.P., C. Juárez, F. Vivanco-Martínez, R. Bragado & F. Ortiz (1981) Structural requirements of rabbit IgG F(ab')₂ fragment for activation of the complement system through the alternative pathway-I. Disulfide bonds. *Molec. Immunol.* 18, 925-934.
258. Shohet, J.M., L. Bergamaschini, A.E. Davis & M.C. Carroll (1991) Localization of the human complement component C3 binding site on the IgG heavy chain. *J. Biol. Chem.* 266, 18520-18524.
259. Kim, Y.U., M.C. Carroll, D.E. Isenman, M. Nonaka, P. Pramoongjago, J. Takeda, K. Inoue & T. Kinoshita (1992) Covalent binding of C3b to C4b within the classical complement pathway C5 convertase. Determination of amino acid residues involved in ester linkage formation. *J. Biol. Chem.* 267, 4171-4176.

260. Kulics, J., E. Rajnavölgy, G. Füst & J. Gergely. (1983) Interaction of C3 and C3b with immunoglobulin G. *Molec. Immunol.* 20, 805-810.
261. Anh-Tuan, N., A. Falus, G. Füst, K. Merétey & S.R. Hollán (1984) Appearance of covalently bound antigen in immune complexes formed during the activation of complement. *J. Immunol. Meth.* 75, 257-263.
262. Garred, P., T.E. Michaelsen, A. Aase & T.E. Mollnes (1990) C3, C4, and the terminal complement complex differ from C1q by binding predominantly to the antigenic part of solid phase immune complexes. *J. Immunol.* 144, 198-203.
263. Takata, Y., N. Tamura & T. Fujita (1984) Interaction of C3 with antigen-antibody complexes in the process of solubilization of immune precipitates. *J. Immunol.* 132, 2531-2537.
264. Sottrup-Jensen, L., O. Sand, L. Kristensen & G.H. Fey (1989) The α -macroglobulin bait region. Sequence diversity and localization of cleavage sites for proteinases in five mammalian α -macroglobulins. *J. Biol. Chem.* 264, 15781-15789.
265. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
266. Bonner, W.M., & R.A. Laskey (1974) A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46, 83-88.
267. March, S.C., I. Parikh & P. Cuatrecasas (1974) A simplified method for cyanogen bromide activation of agarose for affinity chromatography. *Anal. Biochem.* 60, 149-152.
268. Sánchez-Corral, P., L.C. Antón, J.M. Alcolea, G. Marqués, A. Sánchez & F. Vivanco (1990) Proteolytic activity of the different fragments of factor B on the third component of complement (C3). Involvement of the N-terminal domain of Bb in magnesium binding. *Molec. Immunol.* 27, 891-900.
269. Lesavre, P.H., T.E. Hugli, A.F. Esser & H.J. Müller-Eberhard (1979) The alternative pathway C3/C5 convertase: Chemical basis for factor B activation. *J. Immunol.* 123, 529-534.
270. Whaley, K. (1985) Zymosan-treated serum (R3). En *METHODS IN COMPLEMENT FOR CLINICAL IMMUNOLOGISTS* (Editor K. Whaley), pp. 87-88. Churchill Livingstone (Edimburgo).
271. McConahey, P.J., & F.J. Dixon (1966) A method of trace iodination of proteins for immunologic studies. *Int. Archs. Allergy Appl. Immunol.* 29, 185-190.
272. Tenner, A.J., P.H. Lesavre & N.R. Cooper (1981) Purification and radiolabeling of human C1q. *J. Immunol.* 127, 648-653.
273. Givol, D. (1967) The cleavage of rabbit immunoglobulin G by trypsin after mild reduction and aminoethylation. *Biochem. J.* 104, 39c-40c.
274. Gómez, J. (1992) Antígeno de superficie del virus de la hepatitis B: Papel de los lípidos en el mantenimiento de las propiedades del componente proteico. Tesis Doctoral, Madrid, 1992.
275. Plapp, B.V., M.A. Raftery & R.D. Cole (1967) The tryptic digestion of S-aminoethylated ribonuclease. *J. Biol. Chem.* 242, 265-270.

276. Matsudaira, P. (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.* 262, 10035-10038.
277. Hocstrasser, D.F., A. Patchornik & C.R. Merrill (1988) Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining. *Anal. Biochem.* 173, 412-423.
278. Moos Jr, M., N.Y. Nguyen & T.-Y. Liu (1988) Reproducible high yield sequencing of proteins electrophoretically separated and transferred to an inert support. *J. Biol. Chem.* 263, 6005-6008.
279. Simpson, R.J., R.L. Moritz, G.S. Begg, M.R. Rubira & E.C. Nice (1989) Micropreparative procedures for high sensitivity sequencing of peptides and proteins. *Anal. Biochem.* 177, 221-236.
280. Applied Biosystems (1990) ProBlott™ applications in SDS-PAGE, electroblotting and protein sequencing. *Applied Biosystems' User Bulletin (Protein Sequencer)* Vol. 42.
281. Hewick, R.M., M.W. Hunkapiller, L.E. Hood & W.J. Dreyer (1981) A gas-liquid solid phase peptide and protein sequenator. *J. Biol. Chem.* 256, 7990-7997.
282. Hunkapiller, M.W. (1985) PTH amino acid analysis. *Applie Biosystems' User Bulletin (Protein Sequencer)* Vol 14.
283. Kabat, E.A., T.T. Wu, H.M. Perry, K.S. Gottesman & C. Foeller (1991) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institute of Health (Bethesda).
284. Ouchterlony, O. (1958) Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. *Prog. Allergy* 5, 1-78.
285. Sánchez-Corral, P., L.C. Antón, J.M. Alcolea, G. Marqués & F. Vivanco (1989) Separation of active and inactive forms of the third component of human complement, C3, by fast protein liquid chromatography (FPLC). *J. Immunol Meth.* 122, 105-113.
286. Johnson, D.M.A., J. Gagnon & K.B.M. Reid (1984) Amino acid sequence of human factor D of the complement system. Similarity in sequence between factor D and proteases of non-plasma origin. *FEBS Lett.* 166, 347-351.
287. Reid, K.B.M. (1976) Isolation by partial pepsin digestion of the three collagen-like present in subcomponent C1q of the first component of human complement. *Biochem. J.* 155, 5-17.
288. Givol, D. & F. De Lorenzo (1968) The position of various cleavages of rabbit immunoglobulin G. *J. Biol. Chem.* 243, 1886-1891.
289. Okazaki, K., H. Yamada & T. Imoto (1985) A convenient S-2-aminoethylation method of cysteinyl residues in reduced proteins. *Anal. Biochem.* 149, 516-520.
290. Schwartz, W.E., P.K. Smith & G.P. Royer (1980) N-(β-iodoethyl)trifluoroacetamide: A new reagent for the aminoethylation of thiol groups in proteins. *Anal. Biochem.* 106, 43-48.
291. Antón, L.C., J.M. Alcolea, G. Marqués, P. Sánchez-Corral & F. Vivanco (1986) Breakdown of C3 covalently bound to F(ab')₂ immune complexes after complement activation by the alternative pathway. *Complement* 3, 53-62.

292. Barrio, E., L.C. Antón, G. Marqués, A. Sánchez & F. Vivanco (1991) Formation of covalently linked C3-C3 dimers on IgG immune aggregates. *Eur. J. Immunol.* 21, 343-349.
293. Reid, KBM, D.M. Lowe & R.R. Porter (1972) Isolation and characterization of C1q, a subcomponent of the first component of complement, from human and rabbit sera. *Biochem. J.* 130, 749-763.
294. Cole, R.D. (1967) S-aminoethylation. *Meth. Enzymol* 11, 315-317.
295. Means, G.E., & R.E. Feeney (1971) Alkylating and similar reagents. CHEMICAL MODIFICATION OF PROTEINS, pp. 105-138. Holden-Day, Inc. (San Francisco).
296. Nisonoff, A., J.E. Hooper & S.B. Spring (1975) THE ANTIBODY MOLECULE. Academic Press, Inc. (Nueva York).
297. Ehrlich, P.H., G.R. Matsueda, M.N. Margolies, S.S. Husain & E. Haber (1980) Isolation of an active heavy-chain variable domain from a homogeneous rabbit antibody by cathepsin B digestion of the aminoethylated heavy chain. *Biochemistry* 19, 4091-4096.
298. Minta, J.O., D. Man & H.Z. Movat (1977) Kinetic studies on the fragmentation of the third component of complement (C3) by trypsin. *J. Immunol.* 118, 2192-2198.
299. Smyth, D.G., & S. Utsumi (1967) Structure of the hinge region in rabbit immunoglobulin G. *Nature* 216, 332-335.
300. Fanger, M.W., & D.G. Smyth (1972) The oligosaccharide units of rabbit immunoglobulin G. Asymmetric attachment of C2-oligosaccharide. *Biochem. J.* 127, 767-774.
301. Fasman, G.D., Editor (1989) PRACTICAL HANDBOOK OF BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY. CRC Press, Boca Ratón, Florida.
302. Fruton, J.S. (1971) Pepsin. En THE ENZYMES, VOL III (Editor P.D. Boyer), pp. 119-164. Academic Press Inc. (Nueva York).
303. Sánchez, A., L.C. Antón, G. Marqués, E. Barrio & F. Vivanco (1992) C4A and C4B bind covalently to the C_H3 domain of IgG immune aggregates during complement activation by the classical pathway. (Manuscrito en preparación).
304. Sottrup-Jensen, L., H.F. Hansen, H. Skak Pedersen & L. Kristensen (1990) Localization of ϵ -lysyl- γ -glutamyl cross-links in five human α_2 -macroglobulin-proteinase complexes. Nature of the high molecular weight cross-linked products. *J. Biol. Chem.* 265, 17727-17737.
305. Canova-Davis, E., M. Eng, V. Mukku, D.H. Reifsnyder, C.V. Olson & V.T. Ling (1992) Chemical heterogeneity as a result of hydroxylamine cleavage of a fusion protein of human insulin-like growth factor I. *Biochem. J.* 285, 207-213.
306. Utsumi, S., & F. Karush (1965) Peptic fragmentation of rabbit γ G-immunoglobulin. *Biochemistry* 4, 1766-1779.
307. Hunkapiller, M.W., & L.E. Hood (1978) Direct microsequence analysis of polypeptides using an improved sequenator, a nonprotein carrier (Polybrene), and high pressure liquid chromatography. *Biochemistry* 17, 2124-2133.
308. Daha, M.R. & L.A. van Es (1982) The role of cellular Fc and C3 receptors on the

- complement-dependent degradation of stable soluble immunoglobulin aggregates by normal and trypsin-treated peritoneal macrophages. *Immunology* 47, 203-209.
309. Eden, A., C. Bianco & V. Nussenzweig (1973) Mechanism of binding of soluble immune complexes to lymphocytes. *Cell. Immunol.* 7, 459-473.
310. Malasit, P., S.R. Bartolotti & J.H. Humphrey (1983) Molecular composition of complement-solubilized complexes and their fate *in vivo*. *Immunology* 48, 779-789.
311. Scharfstein, J., E.B. Correa, G.R. Gallo & V. Nussenzweig (1979) Human C4-binding protein. Association with immune complexes *in vitro* and *in vivo*. *J. Clin. Invest.* 63, 437-442.
312. Hidvégi, T., L. Varga, A. Falus, M. Kirschfink, M. Kókai, N. Ahn Tuan & G. Füst (1991) Differences in complement activation induced by preformed and nascent immune complexes. *Complement Inflamm.* 8, 43-49.
313. Fujita, T., M. Takiuchi, K. Iida, K. Nagaki & S. Inai (1977) The activation mechanism of the alternative pathway of the human complement system by the immune precipitate formed with F(ab')₂ of rabbit IgG antibody: The generation of C3- and C5-cleaving enzymes on the immune precipitate. *Immunochem.* 14, 25-30.
314. Johnson, A., S. Harkin, M.W. Steward & K. Whaley (1987) The effects of immunoglobulin isotype and antibody affinity on complement-mediated inhibition of immune precipitation and solubilization. *Molec. Immunol.* 24, 1211-1217.
315. Stewart, W.W., A. Johnson, M.W. Steward, K. Whaley & M.A. Kerr (1988) The activation of C3 and C4 in human serum by immune complexes containing mouse monoclonal antibodies of different isotype and affinity: Effects on solubilisation. *Molec. Immunol.* 25, 1355-1361.
316. Yokoyama, I. & F. Waxman (1992) Isotypic and clonal variations in the interactions between model monoclonal immune complexes and the human erythrocyte CR1 receptor. *Molec. Immunol.* 29, 935-947.
317. Okada, M., K. Ukada & S. Utsumi (1985) Co-operative interaction of subcomponents of the first component of complement with IgG: a functional defect of dimeric Fab from rabbit IgG. *Molec. Immunol.* 22, 1399-1406.
318. Okada, M. & S. Utsumi (1989) Role for the third constant domain of the IgG H chain in activation of complement in the presence of C1 inhibitor. *J. Immunol.* 142, 195-201.
319. Deisenhofer, J., P.M. Colman, O. Epp & R. Huber (1976) Crystallographic structural studies of a human Fc fragment. II. A complete model based on a Fourier map at 3.5 Å resolution. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 357, 1421-1434.
320. Lefranc, M.-P., & G. Lefranc (1990) Molecular genetics of immunoglobulin allotype expression. En THE HUMAN IGG SUBCLASSES. MOLECULAR ANALYSIS OF STRUCTURE, FUNCTION AND REGULATION (Editor F. Shakib). pp.43-78. Garland Press, Oxford.
321. Shohet, J.M., P. Pemberton & M.C. Carroll (1991) Localization of the covalent bonding site of C3 on the IgG heavy chain. *Complement Inflamm* 8, 222-223 (Abstract).
322. Dangl, J.L., T.G. Wensel, S.L. Morrison, L. Stryer, L.A. Herzenberg & V.T. Oi (1988) Segmental flexibility and complement fixation of genetically engineered human, rabbit and

- mouse antibodies. *EMBO J.* 7, 1989-1984.
323. Tann, L.K., R.J. Shopes, V.T. Oi & S.L. Morrison (1990) Influence of the hinge region on complement activation, C1q binding, and segmental flexibility in chimeric human immunoglobulins. *Proc. Natnl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 162-166.
324. Pangburn, M.K. (1989) Analysis of the mechanism of recognition in the complement alternative pathway using C3b-bound low molecular weight polysaccharides. *J. Immunol.* 142, 2759-2765.
325. Barrett, A.J. & P.M. Starkey (1973) The interaction of α_2 -macroglobulin with proteinases. Characteristics and specificity of the reaction, and a hypothesis concerning its molecular mechanism. *Biochem. J.* 133, 709-724.
326. Madi, N., G. Steiger, J. Estreicher & J.A. Schifferli (1992) Abnormal immune adherence and elimination of hepatitis B surface antigen/antibody complexes in patients with AIDS. *J. Immunol.* 148, 723-728.
327. Halma, C., M.R. Daha, R. van Furth, J.A. Camps, J.H. Evers-Schouten, E.K. Pauwels, S. Lobatto & L.A. van Es (1989) Elimination of soluble 125 I-labelled aggregates of human immunoglobulin G in humans: the effect of splenectomy. *Clin. Exp. Immunol.* 77, 62-66.
328. Dodds, A.W. & R.R. Porter (1979) The activation of complement components by aggregates of antibodies and their fragments. *Molec. Immunol.* 16, 1059-1062.
329. Poljak, R.J., L.M. Amzel & R.P. Phizackerley (1976) Studies on the three-dimensional structure of immunoglobulins. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 38, 67-93.
330. Rodríguez de Córdoba, S. & F. Vivanco (1991) Inmunología e Inmunopatología. Complemento. En *MEDICINA INTERNA (XII EDICIÓN)* (Editado por Farreras y Rozman). Volumen II, pp. 2633-2640. Doyma (Barcelona).

Finis coronat opus