

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 537 274**

51 Int. Cl.:

C07K 14/21 (2006.01)

A61K 39/104 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.08.2006** **E 06769599 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.12.2014** **EP 1913019**

54 Título: **Interacción de Moraxella catarrhalis con células epiteliales, proteínas de la matriz extracelular y el sistema del complemento**

30 Prioridad:

10.08.2005 US 706745 P

11.08.2005 US 707148 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

05.06.2015

73 Titular/es:

ARNE FORSGREN AB (100.0%)

SOTHÖNSVÄGEN 4 B

230 11 FALSTERBO, SE

72 Inventor/es:

FORSGREN, ARNE y

RIESBECK, KRISTIAN

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 537 274 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Interacción de *Moraxella catarrhalis* con células epiteliales, proteínas de la matriz extracelular y el sistema del complemento

Campo técnico de la invención

- 5 La presente invención se refiere a *Moraxella catarrhalis* y a su capacidad para interaccionar con las células epiteliales a través de proteínas de la matriz extracelular tales como fibronectina y laminina, y también a su capacidad para inhibir el sistema del complemento. La interacción con estas proteínas extracelulares es útil en la preparación de vacunas.

Técnica anterior

- 10 La capacidad de unirse a células epiteliales es de gran importancia para diversas especies bacterianas. Por ejemplo, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes* poseen proteínas que se unen a la fibronectina (FnBP) con una organización de secuencia relacionada. Estas FnBP son conocidas como componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de adhesión de la matriz (MSCRAMMs). Explotan la estructura modular de la fibronectina formando estructuras en cierre beta, extendidas en tándem en su unión a la fibronectina [27, 39, 47, 73]. La función es mediar en la adhesión bacteriana y en la invasión de las células hospedadoras.

El agente patógeno relevante de la mucosa, *Moraxella catarrhalis*, es la tercera causa bacteriana principal de otitis media aguda en niños, después de *Streptococcus pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* [14, 40, 55]. *M. catarrhalis* es también una de las poblaciones más comunes en la faringe de niños sanos.

- 20 Por otra parte, *M. catarrhalis* también es una causa común de sinusitis y de infecciones del tracto respiratorio inferior en adultos con enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) [74]. El desarrollo de esta especie en pacientes con EPOC está relacionado probablemente en parte a su gran repertorio de adhesinas.

- En los últimos años, la investigación se ha enfocado hacia las proteínas de la membrana externa y sus interacciones con el hospedador humano [6, 48, 56]. Algunas de estas proteínas de la membrana externa parecen tener funciones adhesivas que incluyen entre otras, la proteína que se une a IgD de *M. catarrhalis* (MID, también designada Hag), la proteína CD, la proteína de adherencia de *M. catarrhalis* (McaP) y las proteínas de superficie ubicuas (Usp) [1, 22, 33, 48, 61, 81, 84].

Compendio de la invención

- Debido a que se ha descubierto que *M. catarrhalis* es una causa principal de infecciones en las vías respiratorias superiores e inferiores, existe una necesidad actual de desarrollar vacunas que se puedan utilizar contra *M. catarrhalis*.

El objetivo de la presente invención ha sido, por tanto, averiguar en qué manera *M. catarrhalis* interacciona con las células epiteliales en el organismo y cómo afecta al sistema inmune. De esta manera, se pueden desarrollar sustancias que pueden actuar como vacunas contra *M. catarrhalis*.

- 35 En este estudio, con el uso de mutantes de *M. catarrhalis* obtenidos a partir de cepas aisladas clínicas, los inventores han sido capaces de mostrar que tanto UspA1 como A2 se unen a la fibronectina y la laminina. Además, los inventores han sido capaces de mostrar que *M. catarrhalis* interfiere con la vía clásica del sistema del complemento, y también de aclarar de qué manera interfiere.

- Muchas bacterias se adhieren a las células epiteliales a través de MSCRAMMs que se unen a fibronectina [54, 77]. *Pseudomonas aeruginosa* tiene una FnBP que se une a la fibronectina asociada a la célula en células epiteliales nasales [69]. El bloqueo de las interacciones proteicas entre bacterias-fibronectina puede ayudar al tejido del hospedador a superar la infección. De hecho, se ha mostrado que anticuerpos contra una FnBP de *S. aureus* produjeron una rápida eliminación de las bacterias en ratones infectados [71].

- Proteínas UspA1/A2 truncadas recombinantes, junto con fragmentos más pequeños que abarcan toda la molécula, se han sometido a ensayo de acuerdo con la presente invención para estudiar la unión a fibronectina. Tanto UspA1 como A2 se unían a la fibronectina y se encontró que los dominios de unión a la fibronectina estaban localizados dentro de UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸. Estas dos proteínas truncadas inhiben la unión de *M. catarrhalis* a las células epiteliales conjuntivales Chang en un grado similar a los anticuerpos anti-fibronectina. Las observaciones realizadas muestran que tanto UspA1 como A2 de *M. catarrhalis* están implicadas en la adherencia a las células epiteliales a través de fibronectina asociada a la célula. Por tanto, se sugiere que los sitios biológicamente activos dentro de UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸, son candidatos potenciales para ser incluidos en una vacuna contra *M. catarrhalis*.

Además, los inventores han estudiado y caracterizado la unión de *M. catarrhalis* a laminina. *M. catarrhalis* es una causa común de agravamientos de la infección en pacientes con EPOC. El desarrollo de esta especie en pacientes con EPOC está probablemente relacionado en parte con su gran repertorio de adhesinas. Además, hay cambios pa-

tológicos tales como la pérdida de integridad epitelial con exposición de la membrana basal, en donde la misma capa de laminina está engrosada en los fumadores [4]. Algunos agentes patógenos han mostrado ser capaces de unirse a la laminina y esto puede contribuir a su capacidad para adherirse a tales superficies mucosas dañadas y denu-
 5 dadas. Estos incluyen agentes patógenos conocidos por causar una enfermedad significativa en las vías respiratorias, tales como *S. aureus* y *P. aeruginosa* entre otros [7, 63]. Los presentes inventores han sido capaces de mostrar que la proteína de superficie ubicua (Usp) A1 y A2 de *M. catarrhalis* también se une a la laminina. Los dominios de unión a laminina de UspA1 y A2 se encontraron, entre otros, dentro de las mitades N-terminales de UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ y UspA2³⁰⁻³⁵¹. Estos dominios también contienen los dominios de unión a fibronectina. Sin embargo, los fragmentos más pequeños que se unían a fibronectina, UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸, no se unieron a laminina de una manera
 10 apreciable. Fragmentos más pequeños que la mitad N-terminal de UspA1 (UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹) pierden toda su capacidad de unión a la laminina, mientras que con UspA2, solo UspA2³⁰⁻¹⁷⁰ se unía a laminina, aunque a un nivel menor que la proteína recombinante completa (UspA2³⁰⁻⁵³⁹). Estos hallazgos sugieren que diferentes partes de la molécula pueden tener diferentes funciones. Se encontró que UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ también tenía propiedades de unión a laminina.

Sin embargo, comparando las regiones más pequeñas que se unen a laminina de UspA1 y A2, encontramos que por
 15 medio de homología de aminoácidos hay poca similitud entre UspA2³⁰⁻¹⁷⁰ y UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ (datos no mostrados). Esto no es sorprendente ya que es un hecho conocido que ambas proteínas tienen una estructura de cabeza globular en forma de "piruleta", a pesar de tener solo un 22% de identidad en ambas mitades N-terminales [2, 32].

Se sugieren como posibles candidatos para ser incluidos en una vacuna contra *M. catarrhalis* los sitios biológicamente activos dentro de UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹.

Por último, los inventores han estudiado la interacción entre proteínas de la superficie ubicuas A1 y A2 de *M. catarrhalis* y el sistema inmune innato, y han encontrado que *M. catarrhalis* interfiere con el sistema del complemento. El sistema del complemento es una de las primeras líneas de defensa innata contra microorganismos patógenos, y la activación de este sistema produce una cascada de depósito de proteínas sobre la superficie bacteriana, lo que da
 25 como resultado la formación del complejo de ataque de la membrana o la opsonización del agente patógeno seguida de fagocitosis [85, 86]. Una de las proteínas del complemento más importantes es C3, que está presente en la circulación en una concentración similar a algunas inmunoglobulinas (1-1,2 mg/ml). C3 no solo tiene un papel crucial como opsonina, sino que también es el enlace común entre la vía clásica, de lectina y alternativa de la activación del complemento. Las funciones de la vía alternativa, como bucle de amplificación para las vías clásica y de lectina, también se pueden activar de forma espontánea mediante la fijación covalente de C3 a la superficie de un microbio
 30 en ausencia de inhibidores del complemento. El depósito de C3 requiere la presencia de un enlace tioéster interno, formado en la proteína natural mediante la proximidad de un grupo sulfhidrilo (Cys¹⁰¹⁰) y un glutamilo carbonilo (Gln¹⁰¹²) en la cadena α de C3 [76]. La escisión proteolítica de un péptido de 77 residuos desde el extremo aminoterminal de la cadena α de C3, genera C3a (anafilatoxina) y C3b. La fijación de C3b se lleva a cabo entonces a través de un enlace covalente entre el grupo carbonilo del tioéster metaestable y, o bien grupos -NH₂ o grupos -OH
 35 de proteínas o estructuras de carbohidratos en la superficie del activador [36, 37]. Se ha encontrado que UspA1 y A2 de *M. catarrhalis* se unen de forma no covalente y de una manera dependiente de la dosis al tercer componente del complemento (C3) procedente de suero tratado con EDTA y a C3 tratado con metilamina (C3met). Se ha encontrado que UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ se unen a C3 y C3met. Se encontró que la región que se une a C3 para UspA2 estaba localizada principalmente en UspA2²⁰⁰⁻⁴⁵⁸. Sin embargo, se ha encontrado que UspA1 tiene un papel menor en las interacciones. Los sitios biológicamente activos dentro de UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ se sugieren como posibles
 40 candidatos para ser incluidos en una vacuna contra *M. catarrhalis*.

La familia de UspA consiste en UspA1 (88 kDa de peso molecular), UspA2 (62 kDa) y la proteína híbrida UspA2H (92 kDa) [2, 43]. Estas proteínas migran como complejos de peso molecular elevado en SDS-PAGE, están relativamente conservadas y, por lo tanto, son importantes candidatos a vacuna. Las secuencias de aminoácidos de UspA1
 45 y A2 tienen una identidad del 43% y tienen 140 residuos de aminoácidos que son idénticos en un 93% [2]. En una serie de 108 cepas aisladas nasofaríngeas de *M. catarrhalis* procedentes de niños pequeños con otitis media, los genes *uspA1* y *uspA2* se detectaron en 107 (99%) y 108 (100%) de las cepas aisladas, respectivamente. Veintiún por ciento se identificaron por tener el gen de la variante híbrida *uspA2H* [50]. Además, se sabe que los anticuerpos adquiridos de forma natural contra UspA1 y A2 son bactericidas [15].

Se han atribuido diversas funciones a la familia UspA de proteínas. La expresión de UspA1 es esencial para la fijación de *M. catarrhalis* a células epiteliales conjuntivales Chang y a células del epitelio de la laringe Hep-2 [43, 49]. En un estudio más reciente, se ha mostrado que UspA1 se une a moléculas de adhesión celular relacionadas con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM), expresadas en la línea de células epiteliales de pulmón A549 [31]. UspA1
 50 purificada también se ha observado que se une a fibronectina en experimentos de transferencia de puntos, mientras que UspA2 purificada no se unía [49]. Tanto UspA1 como A2 pueden tener funciones importantes para la resistencia al suero de *M. catarrhalis* [1, 5, 58, 60].

La presente invención muestra que tanto UspA1 como A2 son determinantes para la unión de *M. catarrhalis* a la fibronectina y la laminina en cepas aisladas clínicas de *M. catarrhalis* BBH18 y RH4. Curiosamente, UspA1 y A2 recombinantes obtenidas a partir de *M. catarrhalis* Ac5, se unieron ambas a fibronectina en la misma medida. Los dominios de unión a fibronectina se encontraron dentro de los residuos de aminoácidos 299 a 452 de UspA1 y 165 a 318 de UspA2. Estos dos dominios comparten 31 residuos de aminoácidos con identidad de secuencia. Es importan-
 60

te destacar que fragmentos de proteínas truncadas que contenían estos residuos en UspA1 y UspA2, eran capaces de inhibir la unión de *M. catarrhalis* a las células epiteliales de Chang, lo que sugiere que las interacciones con estas células eran a través de fibronectina asociada a la célula.

5 Los dominios de unión para la laminina se encontraron dentro de los residuos de aminoácidos mencionados anteriormente. Los ensayos de unión con proteínas recombinantes revelaron que las principales regiones de unión estaban localizadas en las partes N-terminales, en donde ambas proteínas forman una cabeza globular.

10 Los factores bacterianos que median en la adhesión al tejido y a componentes de la matriz extracelular (MEC), se agrupan en una sola familia llamada "componentes de la superficie microbiana que reconocen moléculas de adhesión de la matriz" (MSCRAMMs). Puesto que UspA1/A2 ambas se unen a la fibronectina y la laminina, estas proteínas se pueden denominar MSCRAMMs.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un péptido que consiste en el ID de secuencia nº 2 o el ID de secuencia nº 3.

15 De acuerdo con otro aspecto, la invención proporciona además un ligando que comprende un dominio de unión a fibronectina, consistiendo dicho ligando en una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en el ID de secuencia nº 2 y el ID de secuencia nº 3,

Además, la presente invención proporciona un medicamento que comprende uno o varios ligandos de acuerdo con la invención y uno o varios adyuvantes, vehículos, excipientes, aglutinantes, soportes o conservantes farmacéuticamente aceptables.

20 La presente invención proporciona además una vacuna que comprende uno o varios ligandos de acuerdo con la presente invención y uno o varios adyuvantes, vehículos, excipientes, aglutinantes, soportes o conservantes farmacéuticamente aceptables.

Finalmente, la presente invención también proporciona una secuencia de ácido nucleico que codifica un ligando, una proteína o un péptido de la presente invención, así como homólogos, polimorfismos, productos de degeneración y variantes por corte y empalme del mismo que tienen actividad de unión a fibronectina.

25 Una descripción adicional de los objetos, problemas, soluciones y características de la presente invención será evidente a partir de la siguiente descripción detallada de la invención, haciendo referencia a los dibujos y las reivindicaciones adjuntas.

30 El ligando de expresión tal y como se utiliza en el presente documento se entiende que designa tanto la molécula completa que se une al receptor como cualquier parte de la misma que incluye el dominio de unión al receptor, de tal manera que conserva la propiedad de unirse al receptor. Los ligandos que comprenden dominios equivalentes que se unen al receptor, también se incluyen en la presente invención.

Las expresiones fragmento, homólogo, equivalente funcional y derivado se refieren a variantes, modificaciones y/o partes de los péptidos y fragmentos de proteínas de acuerdo con la invención que conservan las propiedades de unión a fibronectina, laminina, C3 o C3met deseadas.

35 Un homólogo de UspA1 de acuerdo con la presente invención se define como una secuencia que tiene al menos 72% de identidad de secuencia, como se puede observar en la tabla 1 a continuación.

Un fragmento de acuerdo con la presente invención se define como cualquiera de las secuencias homólogas que están truncadas o ampliadas con 1, 2, 5, 10, 15, 20 aminoácidos en el extremo N-terminal y/o truncadas o ampliadas con 1, 2, 5, 10, 15, 20 aminoácidos en el extremo C-terminal.

40 Las expresiones productos de degeneración, hidroxilación, sulfonación y glicosilación u otros productos de procesamiento secundario se refieren a variantes y/o modificaciones de los péptidos y fragmentos de proteínas de acuerdo con la invención que se han alterado, en comparación con el péptido o el fragmento de proteína original, mediante degeneración, hidroxilación, sulfonación o glicosilación, pero que conservan las propiedades de unión a fibronectina, laminina, C3 o C3met deseadas.

45 La presente invención se refiere especialmente a infecciones causadas por *Moraxella catarrhalis*. Un péptido de acuerdo con la presente invención se puede utilizar para el tratamiento o la profilaxis de la otitis media, sinusitis o infecciones del tracto respiratorio inferior.

50

Tabla 1: Alineación múltiple de secuencias de proteínas de UspA1 de longitud completa, porcentajes de identidad asociados

	O12E	O35E	O46E	P44	TTA24	TTA37	V1171
ATCC25238	81	75	83	83	84	79	84
O12E		74	77	83	76	72	75
O35E			72	74	83	73	78
O46E				81	81	82	80
P44					81	75	77
TTA24						76	84
TTA37							78

Tabla 2: Análisis Pileup de UspA2 - cepas y secuencias utilizadas

	<u>acc</u>	Cepa	<u>des</u>	<u>sl</u>
☐ <u>TREMBL:O54407 MORCA</u>	O54407	O35E	Proteína de superficie ubicua A2.	576
☐ <u>TREMBL:Q58XP4 MORCA</u>	Q58XP4	MC317	UspA2.	650
☐ <u>TREMBL:Q848S1 MORCA</u>	Q848S1	E22	Proteína de superficie ubicua A2H	877
☐ <u>TREMBL:Q848S2 MORCA</u>	Q848S2	V1122	Proteína de superficie ubicua A2.	616
☐ <u>TREMBL:Q8GH86 MORCA</u>	Q8GH86	P44	UspA2.	668
☐ <u>TREMBL:Q9L961 MORCA</u>	Q9L961	TTA37	USPA2H.	889
☐ <u>TREMBL:Q9L962 MORCA</u>	Q9L962	O46E	USPA2H.	894
☐ <u>TREMBL:Q9L963 MORCA</u>	Q9L963	O12E	UspA2 (Proteína de superficie ubicua A2).	684
☐ <u>TREMBL:Q9XD51 MORCA</u>	Q9XD51	V1171	UspA2.	674
☐ <u>TREMBL:Q9XD53 MORCA</u>	Q9XD53	TTA24	UspA2.	613
<u>TREMBL:Q8RTB2 MORCA</u>	Q8RTB2	SP12-5	UspA2	686
☐ <u>TREMBL:Q9XD55 MORCA</u>	Q9XD55	ATCC25238	UspA2.	630
Forsgren_UspA2			UspA2.	630

- 5 Por consiguiente, la presente invención proporciona un ligando aislado a partir de la proteína de la membrana externa de *Moraxella catarrhalis* que se une a laminina y/o fibronectina y/o C3, en donde dicho ligando es un polipéptido que consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en SEQ ID NO: 2-3 que se obtiene a partir de las secuencias de longitud completa de UspA1 y UspA2 de *Moraxella catarrhalis* BC5, mostradas a continuación.
- 10 UspA1 de longitud completa procedente de la cepa BC5 de *Moraxella catarrhalis* (SEQ ID NO: 32):

MNKIYKVKKN AAGHLVACSE FAKGHTKKAV LGSLLIVGIL GMATTASAQK
 VGKATNKISG GDNNTANGTY LTIGGGDYNK TKGRYSTIGG GLFNEATNEY
 STIGSGGYNK AKGRYSTIGG GGYNEATNQY STIGGGDNNT AKGRYSTIGG
 GGYNEATIEN STVGGGGYNQ AKGRNSTVAG GYNNEATGTD STIAGGRKNQ
 ATGKGSFAAG IDNKANADNA VALGNKNTIE GENSVAGSN NTVKKGQQNV
 FILGSNTDTT NAQNGSVLLG HNTAGKAATI VNSAEVGGLS LTGFAGASKT
 GNGTVSVGKK GKERQIVHVG AGEISDTSTD AVNGSQLHVL ATVVAQNKAD
 IKDLDDDEVGL LGEEINSLEG EIFNNQDAIA KNQADIKTLE SNVEEGLLDL
 SGRLLDQKAD IDNNINNIYE LAQQQDQHSS DIKTLKNNVE EGLLDLSGRL
 IDQKADLT KD IKALESNVEE GLLDLSGRLI DQKADIAKNQ ADIAQNQTDI
 QDLAAYNELQ DAYAKQTEA IDALNKASSA NTDRIATAEL GIAENKKDAQ
 IAKAQANENK DGIKQADIA QLHDKKITNL GILHSMVARA VGNNTQGVAT
 NKADIAKNQA DIANNIKNIY ELAQQQDQHS SDIKTLAKVS AANTDRIAKN
 KAEADASFET LTKNQNTLIE QGEALVEQNK AINQELEGFA AHADVQDKQI
 LQNQADITTN KTAIEQNINR TVANGFEIEK NKAGIATNKQ ELILQNDRLN
 RINETNNHQD QKIDQLGYAL KEQGQHFNRR ISAVERTAG GIANAIAT
 LPSPSRAGEH HVLFGSGYHN GQAAVSLGAA GLSDTGKSTY KIGLSWSDAG
 GLSGGVGGSY RWK

UspA2 de longitud completa procedente de la cepa BC5 de *Moraxella catarrhalis* (SEQ ID NO: 33):

MKTMKLLPLK IAVTSAMIIG LGAASTANAQ AKNDITLEDL PYLIKIDQN
 ELEADIGDIT ALEKYLALSQ YGNILALEEL NKALEELDED VGWNQNDIAN
 LEDDVETLTK NQNAFAEQGE AIKEDLQGLA DFVEGQEGKI LQNETSIKKN
 TQRNLVNGFE IEKNKDAIAK NNESIEDLYD FGHEVAESIG EIAHNEAQN
 ETLKGLITNS IENTNNITKN KADIALENN VVEELFNLSG RLIDQKADID
 NNINNIYELA QQDQHQSSDI KTLKKNVEEG LLELSDHIID QKTDAQNQA
 NIQDLATYNE LQDQYAQKQT EAIDALNKAS SENTQNIEDL AAYNELQDAY
 AKQQTEAIDA LNKASSENTQ NIEDLAAYNE LQDAYAKQQA EAIDALNKAS
 SENTQNIKAK QADIANNITN IYELAQQQDK HRSDIKTLAK TSAANTDRIA
 KKNADDDASF ETLTKNQNTL IEKDKEHDKL ITANKTAIDA NKASADTKFA
 ATADAFTKNG NAITKNAKSI TDLGTVKVDGF DSRVTALDTK VNAFDGRITA
 LDSKVENGMA AQAALSGLFQ PYSVGKFNAT AALGGYGSKS AVAIGAGYRV
 NPNLAFKAGA AINTSGNKKG SYNIGVNYEF

- 5 El término ligando se utiliza en la presente memoria para designar tanto la molécula completa que se une a laminina y/o fibronectina y/o C3 como a cualquier parte de la misma que incluye un dominio de unión a laminina y/o fibronectina y/o C3 de modo que conserva la propiedad de unión respectiva. Por tanto, "ligando" incluye moléculas que consisten solo en el dominio de unión a laminina y/o fibronectina y/o C3, es decir, la región o regiones del péptido requeridas para la unión.
- 10 Las propiedades de unión a laminina, fibronectina o C3 de un polipéptido se pueden determinar del modo siguiente:
- Las propiedades de unión a laminina, fibronectina o C3 de un polipéptido se pueden determinar del modo siguiente: los polipéptidos se pueden marcar con ¹²⁵yodo u otros compuestos radiactivos y someterlos a ensayo para estudiar la unión en radioinmunoensayos (RIA) como fase fluida o sólida (por ejemplo, transferencias de puntos). Además, en los polipéptidos se puede analizar la unión con ensayos de inmunoabsorción ligados a enzimas (ELISA) o citometría de flujo, utilizando anticuerpos y sistemas de detección apropiados. Las interacciones entre los polipéptidos y laminina, fibronectina o C3 se pueden examinar adicionalmente mediante resonancia de plasmón superficial (Biacore). Ejemplos de métodos se ejemplifican con detalle en la sección de Materiales y Métodos.
- 15

El polipéptido [o el polipéptido truncado en comparación con un polipéptido de tipo silvestre] comprende o consiste

en al menos una de las secuencias conservadas dentro de SEQ ID NO: 1-10 que se identifican en la alineación que se muestra en el presente documento. Por lo tanto, en esta realización, el polipéptido [o el polipéptido truncado en comparación con un polipéptido de tipo silvestre] comprende o consiste en al menos uno de:

- 5 A partir de UspA1 (fragmentos conservados procedentes del dominio de unión a fibronectina - 'I' separando opciones alternativas de un aminoácido en una posición)
G T/V V S V G S/K Q/E/K/A G/N K/N/G/H/S E R Q I V N/H V G A
G Q/N/E/K I S/R A/D T/D S T D A V N G S Q L H/Y A L A S/K/T
T/A/V I/V (SEQ ID NO: 34)
STDAVNGS QL (SEQ ID NO: 35)
L L N/D L S G R L L/I D Q K A D I D N N I N N/H I Y E/D L A
Q Q Q D Q H S S D I K T L K (SEQ ID NO: 36)
D Q K A D I D N N I N (SEQ ID NO: 37)
10 LA Q Q Q D Q H S S D I K T L K (SEQ ID NO: 38)
A partir de UspA2 (fragmentos conservados procedentes del dominio de unión a fibronectina - 'I' separando opciones alternativas de un aminoácido en una posición)
K A D I D N N I N N/H I Y E L A Q Q Q D Q H S S D (SEQ ID NO: 39)
I K/Q T/A L K/E K/N/S N V/I E/V E G/E L L/F E/N L S D/G H/R
I/L I D Q K T/A D I/L A/T Q/K N/D (SEQ ID NO: 40)
15 A partir de UspA2 (fragmentos conservados procedentes del dominio de unión a C3 - 'I' separando opciones alternativas de un aminoácido en una posición)
I E/Q D L A A Y N E L Q D A Y A K Q Q A/T E A I D A L N K A
S S E N T Q N I A K N Q A D I A N N I T/N N I Y E L A Q Q Q
D K/Q H R/S S D I K T L A K T/A S A A N T D/N R I (SEQ ID NO: 41)
D L A A Y N E L Q D A Y A K Q Q (SEQ ID NO: 42)
E A I D A L N K A S S E N T Q N I A K N Q A D I A N N I (SEQ ID NO: 43)
20 Se entenderá que los ligandos de polipéptidos pueden comprender un dominio o una secuencia que se une a laminina y/o fibronectina y/o C3 indicada en el presente documento que está modificada por la adición o delección de residuos de aminoácidos para o de las secuencias citadas en el presente documento, en cualquiera de los extremos N-terminal o C-terminal o ambos, cuyos péptidos modificados conservan la capacidad de unirse a laminina y/o fibronectina y/o C3, respectivamente.
25 Los ligandos de polipéptidos descritos en este documento se pueden obtener a partir de las proteínas conocidas UspA1 o UspA2 de *Moraxella catarrhalis* mediante el truncamiento en cualquiera o en ambos extremos N- y C-terminales. Las formas truncadas no son moléculas UspA1 o UspA2 naturales de longitud completa.

Tabla 3. Posibles combinaciones de truncamientos de los extremos N y C-terminales de la proteína UspA1 de tipo silvestre

Nº de aminoácidos de que carecen, al menos o exactamente:																											
Desde el extremo N-terminal		Desde el extremo C-terminal																									
0	X	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	340	360	380	400	420	440	450
20	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
30	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
40	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
50	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
60	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
70	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
80	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
100	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
120	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
140	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
160	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
180	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
200	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
220	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
240	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
260	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
280	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450
298	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	320	240	360	380	400	420	440	450

Tabla 4. Posibles combinaciones de truncamientos de los extremos N y C-terminales de la proteína UspA2 de tipo silvestre

Nº de aminoácidos de que carecen, al menos o exactamente																				
Desde el extremo N-terminal		Desde el extremo C-terminal																		
0	X	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
20	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
30	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
40	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
50	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
60	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
70	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
80	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
100	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
120	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
140	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
160	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312
164	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260	280	300	312

La forma truncada conserva la función de unión a laminina (opcionalmente también se une a fibronectina y/o C3). Posibles formas truncadas se pueden seleccionar a partir de las que se muestran en la siguiente tabla, estando todas ellas dentro del alcance de la invención.

Tabla 5. Posibles combinaciones de formas truncadas en los extremos N- y C-terminales de la proteína UspA2 de tipo silvestre

Nº de aminoácidos que faltan, al menos o exactamente:							
Desde el extremo C-terminal	Desde el extremo N-terminal						
0	X	5	10	15	20	25	29
20	0	5	10	15	20	25	29
30	0	5	10	15	20	25	29
40	0	5	10	15	20	25	29
50	0	5	10	15	20	25	29
60	0	5	10	15	20	25	29
70	0	5	10	15	20	25	29
80	0	5	10	15	20	25	29
100	0	5	10	15	20	25	29
120	0	5	10	15	20	25	29
140	0	5	10	15	20	25	29
160	0	5	10	15	20	25	29
180	0	5	10	15	20	25	29
200	0	5	10	15	20	25	29
220	0	5	10	15	20	25	29
240	0	5	10	15	20	25	29
260	0	5	10	15	20	25	29
280	0	5	10	15	20	25	29
300	0	5	10	15	20	25	29
320	0	5	10	15	20	25	29
340	0	5	10	15	20	25	29
360	0	5	10	15	20	25	29

Nº de aminoácidos que faltan, al menos o exactamente:							
Desde el extremo C-terminal	Desde el extremo N-terminal						
380	0	5	10	15	20	25	29
400	0	5	10	15	120	25	29
420	0	5	10	15	20	25	29
440	0	5	10	15	20	25	29
453	0	5	10	15	20	25	29

La forma truncada conserva la función de unión a C3 (opcionalmente también se une a fibronectina y/o laminina). Posibles formas truncadas se pueden seleccionar a partir de las que se muestran en la siguiente tabla, estando todas ellas dentro del alcance de la invención.

- 5 Tabla 6. Posibles combinaciones de formas truncadas en los extremos N- y C-terminales de la proteína UspA2 de tipo silvestre

Nº de aminoácidos que faltan, al menos o exactamente:														
Desde el extremo C-terminal	Desde el extremo N-terminal													
0	X	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172	
20	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172	
30	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172	
40	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172	
50	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172	
60	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172	
70	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172	
80	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172	
100	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172	
120	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172	
140	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172	
160	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172	
180	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172	
200	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172	
220	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172	

Nº de aminoácidos que faltan, al menos o exactamente:														
Desde el extremo C-terminal	Desde el extremo N-terminal													
240	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172	
260	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172	
280	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172	
290	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172	
301	0	20	30	40	50	60	70	80	100	120	140	160	172	

Las secuencias de UspA1 de tipo silvestre conocidas que se pueden truncar de esta manera son las de las cepas ATCC25238 (MX2; GenBank nº de orden AAD43465), P44 (AAN84895), O35E (AAB96359), TTA37 (AAF40122), O12E (AAF40118), O46E (AAF36416), V1171 (AAD43469), TTA24 (AAD43467) (véase la Tabla 1/Figura 19); o BC5 (véase más arriba). Secuencias de UspA2 de tipo silvestre conocidas que se pueden truncar de esta manera son las de las cepas O35E (GenBank nº de orden 04407), MC317 (GenBank nº de orden Q58XP4), E22 (GenBank nº de orden Q848S1), V1122 (GenBank nº de orden Q848S2), P44 (GenBank nº de orden Q8GH86), TTA37 (GenBank nº de orden Q9L961), O46E (GenBank nº de orden Q9L962), O12E (GenBank nº de orden Q9L963), V1171 (GenBank nº de orden Q9XD51), TTA24 (GenBank nº de orden Q9XD53), SP12-5 (GenBank nº de orden Q8RTB2), ATCC25238 (GenBank nº de orden Q9XD55) (véase la Tabla 2/Figura 20); o BC5 [Forsgren_UspA2] (véase más arriba).

La forma truncada de UspA1 o UspA2 de esta realización consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 2-3

A partir de UspA1 (fragmentos conservados procedentes del dominio de unión a fibronectina - '/' separando opciones alternativas de un aminoácido en una posición)

G T/V V S V G S/K Q/E/K/A G/N K/N/G/H/S E R Q I V N/H V G A
G Q/N/E/K I S/R A/D T/D S T D A V N G S Q L H/Y A L A S/K/T
T/A/V I/V (SEQ ID NO: 44)

STDAVNGSQL (SEQ ID NO: 45)

L L N/D L S G R L L/I D Q K A D I D N N I N N/H I Y E/D L A
Q Q Q D Q H S S D I K T L K (SEQ ID NO: 46)
D Q K A D I D N N I N (SEQ ID NO: 47)

L A Q Q Q D Q H S S D I K T L K (SEQ ID NO: 48)

A partir de UspA2 (fragmentos conservados procedentes del dominio de unión a fibronectina - '/' separando opciones alternativas de un aminoácido en una posición)

K A D I D N N I N N/H I Y E L A Q Q Q D Q H S S D (SEQ ID NO: 49)
I K/Q T/A L K/E K/N/S N V/I E/V E G/E L L/F E/N L S D/G H/R
I/L I D Q K T/A D I/L A/T Q/K N/D (SEQ ID NO: 50)

A partir de UspA2 (fragmentos conservados procedentes del dominio de unión a C3 - '/' separando opciones alternativas de un aminoácido en una posición)

I E/Q D L A A Y N E L Q D A Y A K Q Q A/T E A I D A L N K A
S S E N T Q N I A K N Q A D I A N N I T/N N I Y E L A Q Q Q
D K/Q H R/S S D I K T L A K T/A S A A N T D/N R I (SEQ ID NO: 51)

D L A A Y N E L Q D A Y A K Q Q (SEQ ID NO: 52)

E A I D A L N K A S S E N T Q N I A K N Q A D I A N N (SEQ ID NO: 53).

Puede ser conveniente producir proteínas de fusión que contienen ligandos de polipéptidos tal y como se describe en el presente documento. Por consiguiente, en una realización adicional, la invención proporciona proteínas de fusión que comprenden ligandos de polipéptidos de acuerdo con la invención. Preferiblemente, una proteína de fusión

de acuerdo con esta realización tiene una identidad menor del 50% con cualquier secuencia conocida de longitud completa a lo largo de toda su longitud. Tales fusiones pueden constituir un derivado de los polipéptidos de la invención. Otros derivados pueden ser el uso de los polipéptidos de la invención como un vehículo para acoplar covalentemente restos peptídicos o de sacárido. Se pueden acoplar, por ejemplo, a oligosacáridos o polisacáridos capsulares de neumococos o a lipooligosacáridos de *Moraxella catarrhalis* o a lipooligosacáridos no tipificables de *Haemophilus influenzae*.

Los péptidos homólogos se pueden identificar mediante la comparación de secuencias. Los péptidos homólogos tienen preferiblemente una identidad de al menos 60%, más preferiblemente de al menos 70%, 80%, 90%, 95% o 99% en orden ascendente de preferencia, con la secuencia peptídica descrita en este documento o fragmentos de la misma o formas truncadas de la invención, a lo largo de toda su longitud. Preferiblemente, el péptido homólogo conserva la capacidad de unirse a fibronectina y/o laminina y/o C3; y/o de provocar una respuesta inmune contra las secuencias peptídicas descritas en este documento o un fragmento de las mismas.

Las Figuras 19 y 20 muestran una alineación de secuencias peptídicas de UspA1 y UspA2 de origen diferente que indica regiones de la secuencia que son capaces de ser modificadas para formar secuencias homólogas, mientras que la función se conserva (es decir, la capacidad de unirse a fibronectina y/o laminina y/o C3). Péptidos homólogos a los péptidos de SEQ ID NO: 1-10 de BC5 son, por ejemplo, aquellas secuencias que se corresponden a la secuencia BC5 de otras cepas en las Figuras 19 y 20.

Vacunas de la invención

Los péptidos de la invención se deberían formular idealmente como una vacuna que comprende una cantidad eficaz de dicho(s) componente(s) y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Las vacunas de la invención se pueden utilizar para administrarlas a un paciente para la prevención o el tratamiento de una infección u otitis media o sinusitis o infecciones del tracto respiratorio inferior con *Moraxella catarrhalis*. Se pueden administrar de cualquier forma conocida, incluyendo la vía intramuscular, parenteral, mucosa e intranasal.

Vacunas de combinación de la invención

Las vacunas de la presente invención se pueden combinar con otros antígenos de *Moraxella catarrhalis* para la prevención o el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente.

Los presentes inventores han encontrado, en particular, que *Moraxella catarrhalis* tiene al menos 2 medios para obstaculizar que el sistema inmune del hospedador ataque al organismo. Además de la interacción con C3 (y C4BP) mencionada en los Ejemplos a continuación, *M. catarrhalis* tiene una fuerte afinidad hacia la IgD humana soluble y unida a la membrana, a través de la proteína MID (también conocida como OMP106). La unión de IgD a linfocitos B dependiente de *Moraxella*, da como resultado una síntesis de inmunoglobulinas policlonales que pueden prohibir la producción de anticuerpos monoclonales específicos anti-moraxella. El hecho de que *M. catarrhalis* obstaculice el sistema inmunitario humano de varias maneras, podría explicar por qué *M. catarrhalis* es una población común de este tipo del tracto respiratorio.

Los inventores creen que la combinación de antígenos implicados en la función de unión a IgD (MID) y la función de unión a C3 (UspA1 y/o UspA2) puede proporcionar una composición inmunógena, proporcionando al anfitrión unas capacidades mejoradas de defensa contra la capacidad de *Moraxella* para obstaculizar el sistema inmune humano, proporcionando de este modo una mayor disminución de la colonización de *M. catarrhalis* sobre las superficies mucosas.

En esta memoria se describe una composición de vacuna que comprende una cantidad eficaz de UspA1 y/o UspA2 (particularmente la última) (por ejemplo, péptidos de la invención tal y como se describen en el presente documento, preferiblemente que conservan una función de unión a C3) en combinación con una cantidad eficaz de proteína MID (por ejemplo, polipéptidos de longitud completa o polipéptidos/péptidos/dominios funcionales/homólogos/fragmentos/formas truncadas/derivados de los mismos, preferiblemente que conservan una función de unión a IgD humana), y un excipiente farmacéuticamente aceptable.

La proteína MID, y sus homólogos/fragmentos/formas truncadas que se unen a IgD, se describe en el documento WO 03/004651. Fragmentos particularmente adecuados para este fin son un polipéptido que comprende (o consiste en) el fragmento F2 descrito en el documento WO 03/004651, o secuencias con una identidad de al menos 60, 70, 80, 90, 95, 99% con el mismo que conservan preferiblemente la actividad de unión a IgD humana.

Los componentes MID y UspA de esta vacuna de combinación se pueden separar uno de otro, o se pueden fusionar entre sí convenientemente por técnicas de biología molecular conocidas.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra trece cepas de *M. catarrhalis* sometidas a ensayo para estudiar la unión a fibronectina. (A) Una fuerte unión a fibronectina se correlacionaba con expresión de UspA1/A2 como se detectó mediante el AcP anti-

UspA1/A2. (B-I) Los perfiles de la citometría de flujo de *M. catarrhalis* BBH18 de tipo silvestre y de mutantes carentes de UspA1/A2 muestran una unión dependiente de UspA1/A2 a la fibronectina soluble. Se muestran los perfiles de una cepa aislada clínica de tipo silvestre (B y F) y los correspondientes mutantes carentes de UspA1 (C y G), o UspA2 (D y H), y mutantes dobles (E e I) que carece tanto de UspA1 como de UspA2. Las bacterias se incubaron con anticuerpo de conejo anti-UspA1/A2 o fibronectina seguido de un AcP anti-fibronectina. Posteriormente se añadió AcP de conejo conjugado con FITC, seguido por un análisis de citometría de flujo. Se muestra un experimento típico de cada tres con la intensidad media de la fluorescencia (IMF) para cada perfil.

La Figura 2 muestra que los mutantes de *M. catarrhalis* RH4 que carecen de UspA2 no se unen a fibronectina marcada con 125 I. *E. coli* BL21 se incluyó como control negativo que no se une a fibronectina. Las bacterias se incubaron con fibronectina marcada con 125 I seguido de varios lavados y se analizaron en un contador gamma. La unión a fibronectina del tipo silvestre RH4 que expresaba tanto UspA1 como A2 se estableció como el 100%. Se muestran los valores medios de tres experimentos independientes. Las barras de error representan desviaciones estándar (DE). Se obtuvieron resultados similares con *M. catarrhalis* BBH18.

La Figura 3 muestra imágenes que verifican que los mutantes de *M. catarrhalis* que carecen de UspA1 y UspA2 no se unen a la fibronectina inmovilizada. *M. catarrhalis* de tipo silvestre era capaz de adherirse con densidad elevada sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con fibronectina (A). El mutante *M. catarrhalis* Δ uspA1 también conservaba una alta densidad (B), mientras que los mutantes dobles *M. catarrhalis* Δ uspA2 y Δ uspA1/A2 tenían poca adherencia (C y D). Los portaobjetos de vidrio se recubrieron con fibronectina y se incubaron con *M. catarrhalis* RH4 y sus correspondientes mutantes UspA1/A2. Después de varios lavados, las bacterias se tiñeron con Gram.

La Figura 4 es un gráfico que muestra que UspA1 y A2 recombinantes se unen a la fibronectina de una manera dependiente de la dosis. La unión específica a fibronectina se muestra para UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹. Ambas proteínas UspA (40 nM) se recubrieron sobre placas de microtitulación y se incubaron con concentraciones crecientes de fibronectina, seguido de una detección con AcP (anticuerpo policlonal) de conejo anti-fibronectina humana y AcP anti-conejo conjugado con HRP. Se muestran los valores medios de tres experimentos distintos y las barras de error indican la DE.

Figura 5. Los dominios activos que se unen a fibronectina de UspA1 y UspA2 se encuentran entre los aminoácidos 299 a 452 y 165 a 318, respectivamente. Se muestran las proteínas truncadas obtenidas a partir de UspA1 (A) y UspA2 (B). Todos los fragmentos fueron sometidos a ensayo para estudiar la unión a fibronectina en ELISA. Cuarenta nM de cada fragmento truncado se recubrieron sobre placas de microtitulación y se incubaron con 80 μ g/ml y 120 μ g/ml de fibronectina para UspA1 y UspA2, respectivamente. La fibronectina unida se detectó con AcP de conejo anti-fibronectina seguido de AcP anti-conejo conjugado con HRP. Los resultados son representativos de tres grupos de experimentos. Las barras de error representan la DE.

La Figura 6 muestra la secuencia de acuerdo con el ID de secuencia n° 1, y la homología entre secuencias entre UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² (SEQ ID NO: 2) y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ (SEQ ID NO: 3). Los 31 residuos de aminoácidos idénticos están entre corchetes.

La Figura 7 muestra que los fragmentos truncados UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ y UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² inhiben competitivamente la unión a fibronectina dependiente de UspA de *M. catarrhalis*. Los mutantes dobles Δ uspA1/A2 de *M. catarrhalis*, que no se unen a fibronectina, se incluyeron como controles negativos. Las proteínas recombinantes UspA1 se preincubaron con 2 mg/100 ml de fibronectina antes de la incubación con *M. catarrhalis*. Se muestran los valores medios de la fluorescencia (IMF) de *M. catarrhalis* con fibronectina unida detectada por FITC conjugado con AcP anti-fibronectina en citometría de flujo. UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ y UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² dieron como resultado 95% y 63% de inhibición, respectivamente. Las barras de error representan la media $\pm$ DE de tres experimentos independientes.

La Figura 8 muestra que UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ inhiben la adherencia de *M. catarrhalis* a células conjuntivales Chang a través de fibronectina asociada a las células. Las células epiteliales Chang expresaban fibronectina en la superficie como se mostró con un AcP anti-fibronectina y citometría de flujo. (A) La preincubación con las proteínas que se unen a fibronectina UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵², UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ o AcP anti-fibronectina daba como resultado una reducción significativa de la unión de *M. catarrhalis* RH4, en comparación con proteínas recombinantes de control (UspA1⁴³³⁻⁵⁸⁰ y UspA2³⁰⁻¹⁷⁷) y un anticuerpo de control (AcMo anti-ICAM1). (B) $P < 0,05$ en la prueba de la t de Student de dos colas. Se muestran los valores medios de tres experimentos distintos y las barras de error indican la DE.

La Fig. 9A muestra la unión de *M. catarrhalis* RH4 a laminina a través de UspA1 y A2. *M. catarrhalis* RH4 de tipo silvestre (wt) se unía fuertemente a laminina inmovilizada con una DO media de 1,27. RH4 Δ uspA1 mostraba una DO media de 1,14 (89,8% del tipo silvestre). RH4 Δ uspA2 y el mutante doble RH4 Δ uspA1/A2 tenían una DO media de 0,19 y 0,23 respectivamente (15,0% y 18,1% del tipo silvestre). Esto no era significativamente diferente de la adhesión residual a placas recubiertas con seroalbúmina bovina. Se recubrieron placas de microtitulación con treinta μ g/ml de laminina o de seroalbúmina bovina. Se bloquearon, después se incubaron con una suspensión de bacterias y finalmente se lavaron. Las bacterias unidas se detectaron con AcP anti-MID y AcP anti-conejo conjugado con HRP. Se muestran los resultados medios de 3 experimentos representativos. Las barras de error representan las desviaciones estándar (DE).

La Fig. 9B muestra la unión de UspA1 y A2 recombinante a laminina de una manera dependiente de la dosis. La unión específica a laminina se muestra para UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹. Se recubrieron placas de microtitulación con ambas proteínas UspA (40 nM) y se incubaron con concentraciones crecientes de laminina seguido por la detección con AcP de conejo anti-laminina y AcP anti-conejo conjugado con HRP. Se muestran los valores medios de tres ex-

perimentos distintos y las barras de error indican la DE. Las Fig. 10A y B muestran que los dominios activos que se unen a laminina de UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ (A) y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ (B) están situados en las mitades N-terminales. Se recubrieron placas de microtitulación con cuarenta nM de UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes junto con las proteínas truncadas y se incubaron con 20 µg/ml de laminina seguido por la detección con AcP de conejo anti-laminina y AcP anti-conejo conjugado con HRP. Se muestran los valores medios de tres experimentos distintos y las barras de error indican la DE.

La Fig. 11 es una ilustración esquemática de C3, C3b unido covalentemente y C3met. (A) La molécula C3 en suero se compone de una cadena α y una cadena β. (B) La cadena α contiene un sitio tioéster interno que después de la activación se puede fijar covalentemente a una superficie microbiana. (C) El C3 ha sido tratado con metilamina, con lo que se une covalentemente al tioéster.

La Fig. 12 ilustra que *M. catarrhalis* contrarresta las vías clásica y alternativa del sistema del complemento mediante las proteínas de la membrana externa UspA1 y A2. (A) *M. catarrhalis* RH4 de tipo silvestre (wt), los mutantes ΔuspA1, ΔuspA2 o ΔuspA1/A2 se incubaron en presencia de 10% de SHN. (B) El mutante ΔuspA1/A2 se incubó con 10% de SHN complementado con EDTA o Mg-EGTA. Las bacterias se recogieron en los momentos indicados. Después de una incubación durante la noche, se contaron las unidades formadoras de colonias (ufc). El número de bacterias al inicio de los experimentos se definió como 100%. Se muestran los valores medios de tres experimentos distintos y las barras de error indican la DE. (A) Los valores medios después de 5 min para los mutantes ΔuspA1, ΔuspA2 o ΔuspA1/A2 eran diferentes significativamente de los de tipo silvestre (P < 0,05). (B) Los valores medios después de 5 min para el mutante ΔuspA1/A2 y después de 10 min para el mutante ΔuspA1/A2 incubado con Mg-EGTA eran diferentes significativamente de los de tipo silvestre (P < 0,05).

La Fig. 13 ilustra que *Moraxella catarrhalis* se une a C3 en el suero, independientemente de la activación del complemento. Perfiles de citometría de flujo que muestran la unión de C3 a (A) *M. catarrhalis* RH4 o (B) *Streptococcus pneumoniae*. Las bacterias se incubaron con SHN o SHN pretratado con EDTA. A continuación, se añadieron AcP de conejo anti-C3d humano y como capa secundaria un AcP de cabra anti-conejo conjugado con FITC, seguido por análisis con citometría de flujo. Las bacterias en ausencia de SHN, pero en presencia de ambos AcP, se definieron como fluorescencia de la señal de fondo. Se muestra un experimento representativo de cada tres.

La Fig. 14 ilustra que *M. catarrhalis* se une de forma no covalente a C3 purificado tratado con metilamina de una forma dependiente de la dosis, y que la unión se basa en interacciones iónicas. Los perfiles de la citometría de flujo muestran (A) la unión con concentraciones crecientes de C3met. (B) Se muestra la intensidad de la fluorescencia media (imf) de cada perfil en el panel (A). (C) La unión de RH4 a C3met disminuye con concentraciones crecientes de NaCl. Las bacterias se incubaron con C3met con o sin NaCl como se indica. La unión a C3met se midió por citometría de flujo como se describe en la Figura 3. Las barras de error indican la DE. * P ≤ 0,05, ** P ≤ 0,01, *** P ≤ 0,001.

La Fig. 15 ilustra que los perfiles de la citometría de flujo de *M. catarrhalis* RH4 de tipo silvestre y los mutantes que carecen de UspA1/A2 muestran una unión a C3met/C3 dependiente de UspA1/UspA2. Se muestran los perfiles de una cepa clínica aislada de tipo silvestre (A, F, K) y los correspondientes mutantes carentes de la proteína MID (B, G, L), UspA1 (C, H, M), UspA2 (D, I, N), o ambas UspA1 y UspA2 (E, J, O). Las bacterias se incubaron con C3met (A-E), SHN-EDTA (F-J) o SHN (K-O) y se detectaron como se indica en la Figura 3. Se muestra un experimento típico de cada tres con la intensidad media de fluorescencia (imf) para cada perfil.

La Fig. 16 ilustra que C3met se une a UspA2³⁰⁻⁵³⁹ purificada recombinante, mientras que solo se observa una unión débil de C3met a UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰. Además, la región que se une a C3met de UspA2 se determinó que se encuentra localizado entre los residuos de aminoácidos 200 a 458. (A) UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes se inmovilizaron sobre una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó con C3met marcado con [¹²⁵I] durante una noche y la proteína unida se visualizó con un Personal FX (Bio-Rad) utilizando pantallas intensificadoras. La proteína recombinante MID⁹⁶²⁻¹²⁰⁰ se incluyó como control negativo. (B) Se recubrieron placas de microtitulación con UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰, UspA2³⁰⁻⁵³⁹ y una serie de proteínas UspA2 truncadas y se incubaron con C3met, seguido de incubación con AcP de cabra anti-C3 humano y AcP anti-cabra conjugado con HRP. Se muestran los valores medios de tres experimentos. La unión de la señal de fondo se restó de todas las muestras. Las barras de error se corresponden a la DE. * P ≤ 0,05, ** P ≤ 0,01, *** P ≤ 0,001.

La Fig. 17 ilustra que la adición de UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes al suero inhibe el depósito de C3b y la destrucción de *M. catarrhalis* a través de la vía alternativa. Los perfiles de la citometría de flujo muestran el depósito de C3b sobre RH4ΔuspA1/A2 después de la incubación con (A) SHN o SHN preincubado con UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes (rec.), o (B) SHN-Mg-EGTA o SHN-Mg-EGTA preincubado con UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹. Después de la adición de las diversas combinaciones de SHN, se analizaron las bacterias tal y como se describe en la Figura 13. (C) RH4ΔuspA1/A2 se incubó con 10% de SHN o SHN-Mg-EGTA. Para la inhibición, el SHN-Mg-EGTA

se incubó con UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y/o UspA2³⁰⁻⁵³⁹ 100 nM antes de la adición de las bacterias. Las bacterias se recogieron en los momentos indicados. El número de bacterias al inicio de los experimentos se definió como el 100%. Se muestran los valores medios de tres experimentos distintos y las barras de error indican la DE. Los momentos 10, 20 y 30 min para el mutante *ΔuspA1/A2* preincubado con proteínas recombinantes eran diferentes significativamente del mutante *ΔuspA1/A2* incubado con Mg-EGTA solo ($P < 0,05$).

La Fig. 18 ilustra que UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes disminuyen la hemólisis de eritrocitos de conejo mediante la inhibición de la vía alternativa. SHN se incubó con o sin UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y/o UspA2³⁰⁻⁵³⁹ 100 nM a 37°C durante 30 min. A continuación, se añadió SHN a las concentraciones indicadas, a eritrocitos de conejo. Después de incubar durante 30 min, las suspensiones se centrifugaron y los sobrenadantes se midieron mediante espectrofotometría. La hemólisis máxima en cada experimento se definió como el 100%. Se muestran los valores medios de tres experimentos distintos y las barras de error se corresponden a la DE. Los resultados obtenidos con SHN + UspA2³⁰⁻⁵³⁹ y SHN + UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰/UspA2³⁰⁻⁵³⁹ a concentraciones de SHN de 2, 3 y 4%, fueron diferentes significativamente del control SHN ($P < 0,05$).

La Fig. 19 ilustra un análisis “pileup” de UspA1 para ocho cepas diferentes, para mostrar la homología de diferentes partes de UspA1 (SEQ ID NOs: 11-18 se describen, respectivamente, por orden de aparición).

La Fig. 20 ilustra un análisis pileup de UspA2 para trece cepas diferentes para mostrar la homología de diferentes partes de UspA2 (SEQ ID NOs: 19-31 se describen, respectivamente, por orden de aparición).

La Fig. 21 ilustra el % de identidad en regiones identificadas en la secuencia Forsgren, calculado como la relación entre el número de coincidencias exactas y la longitud de la alineación de la región, en donde la alineación de la región es la parte de la alineación total anterior que contiene la región Forsgren.

Materiales y métodos

Interacción entre *M. catarrhalis* y cepas bacterianas de fibronectina y condiciones de cultivo

Las fuentes de las cepas clínicas de *M. catarrhalis* se muestran en la tabla 7. Los mutantes de *M. catarrhalis* BBH18 y RH4 se construyeron como se ha descrito anteriormente [23, 58]. Las cepas de *M. catarrhalis* se cultivaron de forma rutinaria en caldo de cultivo líquido para infusión cerebro corazón (BHI) o en placas de agar BHI a 37°C. Los mutantes carentes de UspA1 se cultivaron en BHI complementado con 1,5 µg/ml de cloranfenicol (Sigma, St. Louis, MO), y los mutantes carentes de UspA2 se incubaron con 7 µg/ml de zeocina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Tanto el cloranfenicol como la zeocina se utilizaron para el crecimiento de los mutantes dobles.

Tabla 7. Cepas clínicas de *M. catarrhalis* utilizadas en el presente estudio

Cepa	Fuente Clínica	Referencia
BBH18	Espudo	[53]
D1	Espudo	[53]
Ri49	Espudo	[53]
C10	Espudo	[10]
F16	Espudo	[10]
Bro2	Vías respiratorias	[53]
Z14	Faringe	[10]
S6-688	Nasofaringe	[23]
Ac5	Nasofaringe	[20]
RH4	Sangre	[53]
RH6	Sangre	[53]
R14	Desconocida	[10]

Cepa	Fuente Clínica	Referencia
R4	Desconocida	[10]
SÖ-1914	Aspirado de la cavidad timpánica	[23]

Nota: Las cepas C10, R4 no tenían el gen *uspA1*, mientras que F16, R14, Z14 carecían del gen *uspA2* [10]. Las cepas restantes contenían ambos genes *uspA1* y *A2* (datos no mostrados).

Método de ADN

Para detectar la presencia de los genes *uspA1*, *A2* y *A2H* en aquellas cepas en las que esto se desconocía, se emplearon cebadores y condiciones de PCR tales como las que se describen en Meier et al. [50]. La secuenciación parcial también se llevó a cabo con los cebadores 5' y 3' de *UspA1*²⁹⁹⁻⁴⁵² y *UspA2*¹⁶⁵⁻³¹⁸ de los genes respectivos *uspA1* y *uspA2* de RH4 y BBH18. La confirmación de la presencia de los residuos de aminoácidos "DQKADIDNNINNI-YELAQQQDQHSSDIKTLK" (SEQ ID NO: 1) también se realizó mediante PCR con un cebador (5'-CAAAGCTGACATCCAAGCACTTG-3') (SEQ ID NO: 54) diseñado desde el extremo 5' de esta secuencia y cebadores 3' para *uspA1* y *A2* como describen Meier et al. [50].

Construcción y expresión de proteínas recombinantes

*UspA1*⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y *UspA*²³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes que están desprovistas de su extremo C-terminal hidrófobo, han sido descritas recientemente [58]. El ADN genómico se extrajo a partir de *M. catarrhalis* Bc5 utilizando un kit de tejido DNeasy (Qiagen, Hilden, Alemania). Además, las proteínas recombinantes correspondientes a regiones múltiples que abarcaban *UspA1*⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y *UspA2*³⁰⁻⁵³⁹ también se construyeron por el mismo método. Los cebadores utilizados se muestran en la tabla 8. Todas las estructuras artificiales fueron secuenciadas de acuerdo con métodos convencionales. La expresión y la purificación de las proteínas recombinantes se realizaron como se ha descrito anteriormente [59]. Las proteínas se purificaron usando columnas que contenían una resina de níquel (Novagen) según las instrucciones del fabricante para condiciones naturales. Las proteínas recombinantes se analizaron en SDS-PAGE como se ha descrito [21].

Tabla 8. Cebadores usados en el presente estudio (los cebadores 5' se describen como SEQ ID NOS 55-69, respectivamente, por orden de aparición; los cebadores 3' se describen como SEQ ID NOS 70-84, respectivamente, por orden de aparición)

Proteína	cebador 5'	cebador 3'
<i>UspA1</i> ⁵⁰⁻⁷⁷⁰	gcgtctgcggatccagtaggcaaggcaacc	ccctgaagcttagtgcataacctaattg
<i>UspA1</i> ⁵⁰⁻⁴⁹¹	gcgtctgcggatccagtaggcaaggcaacc	ttgagcaagcttagcttggttttagcg
<i>UspA1</i> ⁵⁰⁻¹⁹⁷	gcgtctgcggatccagtaggcaaggcaacc	acctgtggcaagcttctctctgcc
<i>UspA1</i> ⁵⁰⁻³²¹	gcgtctgcggatccagtaggcaaggcaacc	
	gggtgcactaagcttacctgcaccaacatgaac	
<i>UspA1</i> ²⁹⁹⁻⁴⁵²	ggatttcaggtgcatcgatccttggaatggtact	gtctttgtaagatcaagctttgatcaat
<i>UspA1</i> ⁴³³⁻⁵⁸⁰	catagctctgatatggatccactaaaaaac	catgctgagaagcttacctagattgg
<i>UspA1</i> ⁵⁵⁷⁻⁷⁰⁴	gccaaagcacaagcgatccaaataaagac	ggcttattgtagtaagcttagcttggtttg
<i>UspA1</i> ⁶⁸⁰⁻⁷⁷⁰	gttgagcaaaaggatcccatcaatcaagag	ccctgaagcttagtgcataacctaattg
<i>UspA2</i> ³⁰⁻⁵³⁹	cgaatgcggatcctaaaaatgatataacttagagg	cattaagcttggtgtctaatgcagttac

Proteína	cebador 5'	cebador 3'
UspA2 ³⁰⁻¹⁷⁷	cgaatgcggatcctaaaaatgatataacttttagagg	ctcatgacccaaaatcaagcttatcttcgatagactc
UspA2 ¹⁰¹⁻²⁴⁰	gatattgcggatccggaagatgatgttgaac	gatcaataagcttaccgcttagattgaatgttcttc
UspA2 ¹⁰¹⁻³¹⁸	gatattgcggatccggaagatgatgttgaac	gtcaatcgcttcaagcttcttttgagcactactg
UspA2 ¹⁶⁵⁻³¹⁸	gagattgagaaggatccagatgctattgct	gtcaatcgcttcaagcttcttttgagcactactg
UspA2 ³⁰²⁻⁴⁵⁸	gctcaaaaccaagcggatccccaagatctg	ggtagcggttcaagctttgcatcagcatcggc
UspA2 ⁴⁴⁶⁻⁵³⁹	gcaagtgcctgcggatcctgatcgattgct	cattaagcttggtgtctaatagcagttac

Anticuerpos

Anticuerpos policlonales (AcP) de conejo anti-UspA1/A2 se han descrito recientemente con detalle [58]. Los otros anticuerpos utilizados eran AcP de conejo anti-fibronectina humana, AcP de cerdo anti-conejo conjugado con FITC, AcP de cerdo anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) y, finalmente, un anticuerpo monoclonal (AcMo) de ratón anti-CD54 humano (ICAM1). Los anticuerpos procedían de Dakopatts (Glostrup, Dinamarca).

Análisis por citometría de flujo

La expresión de la proteína UspA1/A2 y la capacidad de *M. catarrhalis* para unirse a la fibronectina se analizaron mediante citometría de flujo. Cepas de tipo silvestre de *M. catarrhalis* y mutantes carentes de UspA1/A2 se cultivaron durante una noche y se lavaron dos veces en solución salina tamponada con fosfato que contenía 3% de gelatina de pescado (PBS-gelatina). Las bacterias (10^8) se incubaron a continuación con el antisero anti-UspA1/A2 o 5 µg de fibronectina (Sigma, St Louis, MO). Después se lavaron y se incubaron durante 30 min a temperatura ambiente (TA) con AcP anti-conejo conjugado con FITC (diluido de acuerdo con las instrucciones del fabricante) o con una dilución 1/100 de AcP de conejo anti-fibronectina humana (si la fibronectina se había añadido primero) durante 30 min a TA antes de la incubación con el AcP anti-conejo conjugado con FITC. Después de tres lavados adicionales, las bacterias fueron analizadas mediante citometría de flujo (EPICS, XL-MCL, Coulter, Hialeah, FL). Todas las incubaciones se mantuvieron en un volumen final de 100 µl de PBS-gelatina y los lavados se realizaron con el mismo tampón. AcP anti-fibronectina y AcP anti-conejo conjugado con FITC se añadieron por separado como control negativo para cada cepa analizada. Se realizaron estudios de inhibición con fibronectina mediante la preincubación de 0,25 µmoles de fragmentos de UspA durante 1 h con 2 µg de fibronectina, antes de la incubación con bacterias de *M. catarrhalis* (10^8). La cantidad residual exenta de fibronectina que se unió a *M. catarrhalis* se determinó por citometría de flujo como se ha descrito anteriormente.

Unión de *M. catarrhalis* a fibronectina inmovilizada

Los portaobjetos de vidrio se recubrieron con partes alícuotas de 30 µl de fibronectina (1 mg/ml) y se secaron al aire a TA. Después de lavar una vez con PBS, los portaobjetos se incubaron en placas de Petri con bacterias refrigeradas previamente en fase exponencial tardía (densidad óptica (DO) a 600 nm = 0,9). Después de 2 h a TA, los portaobjetos de vidrio se lavaron una vez con PBS seguido por tinción de Gram.

Marcado de proteínas y radioinmunoensayo (RIA)

La fibronectina se marcó con ¹²⁵Iodo (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra) con gran actividad específica (0,05 mol de yodo por mol de proteína) con el método de cloramina T [21]. Las cepas de *M. catarrhalis* BBH18 y RH4, junto con sus mutantes correspondientes se cultivaron durante una noche en medio sólido y se lavaron en PBS con se-roalbúmina bovina al 2% (BSA). Las bacterias (10^8) se incubaron durante 1 h a 37°C con fibronectina marcada con ¹²⁵I (1600 kcpm/muestra) en PBS que contenía 2% de BSA. Después de tres lavados con PBS con 2% de BSA, la fibronectina marcada con ¹²⁵I unida a las bacterias se midió en un contador gamma (Wallac, Espoo, Finlandia).

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Las placas de microtitulación (Nunc-Immuno Module; Roskilde, Dinamarca) se recubrieron con 40 nM de proteínas UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes purificadas, en carbonato de sodio 75 mM, pH 9,6 a 4°C durante una noche. Las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M, y 0,1% de Tween 20, pH 7,5) y se bloquearon durante 2 h a TA con tampón de lavado que contenía 3% de gelatina de pescado. Después de cuatro lavados adicionales, los pocillos se incubaron durante 1 h a TA con fibronectina (120 µg/ml) diluida tres veces en una etapa en 1,5% de gelatina de pescado (en tampón de lavado). A continuación, las placas se lavaron y se incubaron con AcP de conejo anti-fibronectina humana durante 1 h. Después de lavados adicionales, se añadió

AcP anti-conejo conjugado con HRP y se incubó durante 1 h a TA. Tanto el AcP anti-fibronectina humana como el anti-conejo conjugado con HRP se diluyeron 1:1000 en tampón de lavado que contenía 1,5% de gelatina de pescado. Los pocillos se lavaron cuatro veces y las placas se revelaron y se midieron a DO₄₅₀. Se realizaron ELISAs con proteínas truncadas que abarcaban UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ con dosis fijas de fibronectina a 80 µg/ml y 120 µg/ml, respectivamente.

Ensayo de inhibición de la adherencia de líneas celulares

Células conjuntivales Chang (ATCC CCL 20.2) se cultivaron en medio RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Escocia) complementado con 10% de suero de ternera fetal, L-glutamina 2 mM y 12 µg de gentamicina/ml. El día anterior a los experimentos de inhibición de la adherencia, las células se recogieron, se lavaron dos veces en RPMI 1640 exento de gentamicina, y se añadieron a placas de cultivo de tejido de 96 pocillos (Nunc) hasta tener una concentración final de 10⁹ células/pocillo en 200 µl de medio de cultivo exento de gentamicina. Posteriormente, las células se incubaron durante una noche a 37°C en una atmósfera humidificada de 5% de CO₂ y 95% de aire. El día de los experimentos, la inhibición de la adhesión de *M. catarrhalis* se llevó a cabo mediante una concentración creciente de preincubación de las proteínas UspA1/A2 truncadas recombinantes que contenían los dominios de unión a fibronectina (UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸) o AcP de conejo anti-fibronectina humana (diluido 1:50) durante 1 h. Las proteínas recombinantes que no se unían a fibronectina (UspA1⁴³³⁻⁵⁸⁰ y UspA2³⁰⁻¹⁷⁷) se utilizaron como controles. Se sabe que las células epiteliales Chang expresan ICAM1 [18]. Por lo tanto se usó un anticuerpo anti-ICAM1 para diferenciar si el efecto inhibidor del anticuerpo anti-fibronectina era secundario al impedimento estérico. Posteriormente, se inoculó *M. catarrhalis* RH4 (10⁶) en PBS-gelatina sobre las monocapas confluentes. En todos los experimentos, las placas de cultivo de tejidos se centrifugaron a 3.000 x g durante 5 min y se incubaron a 37°C en 5% de CO₂. Después de 30 min, las monocapas infectadas se enjuagaron varias veces con PBS-gelatina para eliminar las bacterias no adherentes y después se trataron con tripsina-EDTA (0,05% de tripsina y EDTA 0,5 mM) para liberar las células Chang del soporte de plástico. Posteriormente, la suspensión de células/bacterias resultante se sembró en dilución sobre placas de agar que contenían BHI y se incubaron durante una noche a 37°C en 5% de CO₂.

Determinación de la expresión de fibronectina en células epiteliales conjuntivales Chang

Las células epiteliales conjuntivales Chang se recogieron mediante raspado seguido de una resuspensión en PBS-gelatina. Las células (1 x 10⁶/ml) se marcaron con AcP de conejo anti-fibronectina humana, seguido por lavado e incubación con un AcP anti-conejo conjugado con FITC. Después de tres lavados adicionales, las células se analizaron mediante citometría de flujo como se ha descrito anteriormente.

Interacción entre *M. catarrhalis* y cepas bacterianas de laminina y condiciones de cultivo

Las cepas clínicas de *M. catarrhalis* BBH18 y RH4 y sus correspondientes mutantes se han descrito anteriormente [58]. Ambas cepas tienen una expresión relativamente elevada de UspA2 en comparación con UspA1 [58]. Los mutantes expresaban igual cantidad de proteína que se une a IgD de *M. catarrhalis* (MID) en comparación con las cepas de tipo silvestre. Las bacterias se cultivaron rutinariamente en caldo de cultivo de infusión cerebro corazón (BHI) o en placas de agar BHI a 37°C. Los mutantes carentes de UspA1, UspA2 y los mutantes dobles fueron cultivados en BHI complementado con antibióticos, como se ha descrito [58].

Construcción de proteínas recombinantes y expresión recombinante

Se prepararon UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹, que están desprovistas de sus extremos C-terminales hidrófobos [58]. Además, se emplearon proteínas recombinantes correspondientes a regiones múltiples que abarcaban UspA1⁵⁰⁻⁷⁷ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ [78].

Anticuerpos

Se utilizaron anticuerpos policlonales (AcP) de conejo anti-UspA1/A2 y anti-MID [22, 58]. El AcP de conejo anti-laminina era de Sigma (St Louis, MO, EE.UU.). El AcP de cerdo anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) era de Dakopatts (Glostrup, Dinamarca).

Unión de *M. catarrhalis* a laminina inmovilizada

Las placas de microtitulación (Nunc-Immuno Module; Roskilde, Dinamarca) se recubrieron con laminina de sarcoma de ratón Engelbreth-Holm-Swarm (Sigma, Saint Louis, EE.UU.) o albúmina de suero bovino (BSA) (30 µg/ml) en Tris-HCl, pH 9,0 a 4°C durante una noche. Las placas se lavaron con solución salina tamponada con fosfato y 0,05% de Tween 20, pH 7,2 (PBS-Tween) y posteriormente se bloquearon con 2% de BSA en PBS + 0,1% de Tween 20, pH 7,2. *M. catarrhalis* RH4 y BBH18 (10⁸) en 100 µl se añadieron después, seguido de incubación durante 1 h. Las bacterias no unidas se eliminaron lavando 3 veces con PBS-Tween. Las bacterias unidas residuales se detectaron por medio de un AcP anti-MID, seguido por la detección con AcP anti-conejo conjugado con HRP. Las placas se revelaron y se midieron a DO₄₅₀ de acuerdo con un protocolo convencional.

Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Las placas de microtitulación (Nunc-Immuno Module) se recubrieron con 40 nM de proteínas UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes purificadas en carbonato de sodio 75 mM, pH 9,6 a 4°C. Las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM, NaCl 0,15 M y 0,1% de Tween 20, pH 7,5) y se bloquearon a TA con tampón de lavado que contenía 3% de gelatina de pescado. Después de lavados adicionales, los pocillos se incubaron durante 1 h a TA con laminina con diferentes diluciones como se ha indicado, en 1,5% de gelatina de pescado (en tampón de lavado). A continuación, las placas se lavaron y se incubaron con AcP de conejo anti-laminina. Después de lavados adicionales, se añadió AcP anti-conejo conjugado con HRP y se incubó a TA. Tanto el AcP anti-laminina como el anti-conejo conjugado con HRP se diluyeron 1:1000 en tampón de lavado que contenía 1,5% de gelatina de pescado. Los pocillos se lavaron y las placas se revelaron y se midieron a DO₄₅₀. Los pocillos no recubiertos incubados con diluciones idénticas de laminina se utilizaron como controles de la señal de fondo. Los ELISAs con proteínas truncadas que abarcaban UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ se realizaron con dosis fijas de laminina (20 µg/mL).

Interacción entre *M. catarrhalis* y C3 y C3met, Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas aisladas clínicas de *M. catarrhalis* y subespecies relacionadas han sido descritas recientemente con detalle [21, 53]. Las cepas tipo eran de la Colección de Cultivos de la Universidad de Gotemburgo (CCUG; Departamento de Bacteriología Clínica, Hospital Sahlgrenska, Gotemburgo, Suecia) o la American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA); *Neisseria gonorrhoeae* CCUG 15821, *Streptococcus pyogenes* CCUG 25570 y 25571, *Streptococcus agalactiae* CCUG 4208, *Streptococcus pneumoniae* ATCC 49619, *Legionella pneumophila* ATCC 33152, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 y, finalmente, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Las cepas restantes de la Tabla 9 eran cepas aisladas clínicas procedentes de Microbiología Médica, Departamento de Medicina de Laboratorio, Hospital Universitario de Malmö, Universidad de Lund, Suecia.

Tabla 9. *M. catarrhalis* es una bacteria particular que se une a C3/C3met. Subespecies relacionadas de *Moraxella* y otros agentes patógenos humanos comunes no se unen a C3/C3met (imf < 2,0). Después de la incubación con SHN tratado con EDTA o C3met, las bacterias se analizaron por citometría de flujo utilizando un AcP de conejo anti-C3d y un AcP de cabra anti-conejo conjugado con FITC.

Especies	SHN-EDTA (imf)	C3met (imf)
<i>Moraxella catarrhalis</i> RH4	8,7	22,1
<i>M. osloensis</i>	<2,0	<2,0
<i>M. bovis</i>	<2,0	<2,0
<i>M. caniculi</i>	<2,0	<2,0
<i>M. nonliquefacie</i>	<2,0	<2,0
<i>N. pharyngis</i>	<2,0	<2,0
<i>N. sicca</i>	<2,0	<2,0
<i>N. flava</i>	<2,0	<2,0
<i>N. subflava</i>	<2,0	<2,0
<i>Oligella ureolytica</i> (n = 2)	<2,0	<2,0
<i>Haemophilus influenzae</i> (n = 7)	<2,0	<2,0
<i>Streptococcus pneumoniae</i> (n = 11)	<2,0	<2,0
<i>Legionella pneumophila</i> (n = 2)	<2,0	<2,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (n = 2)	<2,0	<2,0
<i>Listeria monocytogenes</i>	<2,0	<2,0

Especies	SHN-EDTA (imf)	C3met (imf)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<2,0	<2,0
<i>Staphylococcus aureus</i> (n = 3)	<2,0	<2,0
<i>Streptococcus pyogenes</i> (n = 2)	<2,0	<2,0
<i>Streptococcus agalactia</i>	<2,0	<2,0
<i>Enterococcus faecalis</i>	<2,0	<2,0
<i>Helicobacter pylori</i>	<2,0	<2,0
<i>Escherichia coli</i> (n = 2)	<2,0	<2,0
<i>M. ovis</i>	<2,0	<2,0
<i>M. caviae</i>	<2,0	<2,0
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	<2,0	<2,0
<i>N. meningitidis</i>	<2,0	<2,0
<i>N. mucosa</i>	<2,0	<2,0

Las diferentes especies que no eran *Moraxella*, se cultivaron en medio de cultivo estándar adecuado. Las cepas de *M. catarrhalis* se cultivaron de forma rutinaria en caldo de cultivo líquido de infusión cerebro corazón (BHI) o en placas de agar BHI a 37°C. Los mutantes de *M. catarrhalis* BBH18 y RH4 se prepararon tal y como se ha descrito anteriormente [22, 23, 58]. Los mutantes carentes de MID se cultivaron en BHI que contenía 50 µg/ml de kanamicina. Los mutantes carentes de UspA1 se cultivaron en BHI complementado con 1,5 µg/ml de cloranfenicol (Sigma, St. Louis, MO), y los mutantes carentes de UspA2 se incubaron con 7 µg/ml de zeocina (Invitrogen, Carlsbad, CA). Tanto el cloranfenicol como la zeocina se utilizaron para el crecimiento de los mutantes dobles UspA1/A2.

Anticuerpos

Se inmunizaron conejos por vía intramuscular con 200 µg de UspA1 recombinante de longitud completa emulsionada en adyuvante completo de Freund (Difco, Becton Dickinson, Heidelberg, Alemania), y se dieron dosis de refuerzo los días 18 y 36 con la misma dosis de proteína en adyuvante incompleto de Freund [22]. La sangre fue extraída 3 semanas más tarde. Para aumentar la especificidad, el antisuero anti-UspA1 se purificó por afinidad con UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ recombinante conjugada con sefarosa [58]. El antisuero se unía igualmente a UspA1 y a UspA2 y por tanto se denominó AcP anti-UspA1/A2. El AcP de conejo anti-C3d humano y el AcP de cerdo anti-conejo conjugado con FITC fueron adquiridos en Dakopatts (Glostrup, Dinamarca), y el de cabra anti-C3 humano era de Advanced Research Technologies (San Diego, CA). El AcP de burro anti-cabra conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) se obtuvo de Serotec (Oxford, GB).

Proteínas y marcado con yodo

La preparación de UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes, que están desprovistas de sus extremos C-terminales hidrófobos, se ha descrito recientemente [23]. Las proteínas UspA1 y UspA2 truncadas se prepararon tal como se describe con detalle en Tan et al. [78]. C3b se adquirió de Advanced Research Technologies. C3(H₂O) se obtuvo mediante congelación y descongelación de C3 purificado. La molécula similar a C3b (C3met) se preparó mediante incubación de C3 purificado con metilamina 100 mM (pH 8,0) durante 2 horas a 37°C, seguido de diálisis frente a Tris-HCl 100 mM (pH 7,5), NaCl 150 mM. Para los estudios de la unión, C3met se marcó con ¹²⁵I 0,05 mol (Amersham, Buckinghamshire, Inglaterra) por mol de proteína, utilizando el método de cloramina T [25].

Análisis por citometría de flujo

La unión de C3 a *M. catarrhalis* y a otras especies se analizó por citometría de flujo. Las bacterias se cultivaron en medio sólido durante una noche y se lavaron dos veces en PBS que contenía 2% de BSA (Sigma) (PBS-BSA). A continuación, las bacterias (10⁸ unidades formadoras de colonias; ufc) se incubaron con C3met, C3b, C3(H₂O) o 10% de SHN con o sin EDTA 10 mM o MgCl₂ 4 mM y EGTA 10 mM (Mg-EGTA) en PBS-BSA durante 30 min a

37°C. Después de los lavados, las bacterias se incubaron con AcP anti-C3d humano durante 30 min sobre hielo, seguido de lavados e incubación durante otros 30 min sobre hielo con AcP de cabra anti-conejo conjugado con FITC. Después de tres lavados adicionales, las bacterias se analizaron mediante citometría de flujo (EPICS, XL-MCL, Coulter, Hialeah, FL). Todas las incubaciones se mantuvieron en un volumen final de 100 µl de PBS-BSA y los lavados se realizaron con el mismo tampón. El AcP anti-C3d humano y el AcP anti-conejo conjugado con FITC se añadieron por separado como control negativo para cada cepa analizada. En los estudios de inhibición, el suero se preincubó con 100 nM de las proteínas UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes durante 30 min a 37°C. Para analizar las características de la interacción entre *M. catarrhalis* y C3, se añadieron concentraciones crecientes de NaCl (0 - 1,0 M) a las bacterias y C3met. Para analizar la expresión de UspA1/A2, se incubaron bacterias (10⁸ ufc) con el AcP anti-UspA1/A2 y se lavaron como se ha descrito anteriormente. Un AcP de cabra anti-conejo conjugado con FITC, diluido de acuerdo con las instrucciones del fabricante, se utilizó para la detección. Para asegurar que el EDTA no destruyera las proteínas UspA1 y UspA2 de la membrana externa, *M. catarrhalis* se incubó con o sin EDTA seguido por una detección de la expresión de UspA1/A2. EDTA, a las concentraciones utilizadas en los experimentos con SHN-EDTA, no cambiaba la densidad de UspA1/A2.

15 Suero y ensayo bactericida en suero

El suero humano normal (SHN) se obtuvo a partir de cinco voluntarios sanos. La sangre se dejó coagular durante 30 min a temperatura ambiente y después se incubó sobre hielo durante 60 min. Después de la centrifugación, los sueros se reunieron, se dividieron en partes alícuotas y se almacenaron a -70°C. Para inactivar las vías tanto clásica como alternativa, se añadió EDTA 10 mM. En contraste, Mg-EGTA se incluyó para inactivar la vía clásica. El suero humano carente de C4BP se preparó pasando suero de nuevo aporte a través de una columna HiTrap (Amersham Biosciences) junto con AcMo 104, un AcMo de ratón dirigido contra CCP1 de la cadena α de C4BP [41]. El flujo a través se recogió y el suero agotado se almacenó en partes alícuotas a -70°C. El suero agotado de C1q se obtuvo a través de la primera etapa de purificación de C1q [79], utilizando cromatografía de intercambio iónico Biorex 70 (Bio-Rad, Hercules, CA). Los sueros resultantes mostraron una actividad hemolítica normal. El factor D y el suero carente de properdina fueron proporcionados amablemente por el Dr. Anders Sjöholm (Departamento de Microbiología Médica de la Universidad de Lund, Lund, Suecia). Las cepas de *M. catarrhalis* se diluyeron en tampón Veronal 2,5 mM, pH 7,3 que contenía 0,1% (peso/vol) de gelatina, MgCl₂ 1 mM, CaCl₂ 0,15 mM y 2,5% de dextrosa (DGV⁺⁺). Las bacterias (10⁵ ufc) se incubaron junto con 10% de SHN y EDTA o Mg-EGTA con un volumen final de 100 µl. Las bacterias/SHN se incubaron a 37°C y en varios momentos, se retiraron 10 µl de partes alícuotas y se extendieron sobre placas de agar BHI. En los estudios de inhibición, 10% de suero se incubó con 100 nM de las proteínas UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes durante 30 min a 37°C antes de añadir las bacterias.

25 Ensayos de transferencia de puntos

UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes purificadas diluidas por triplicado en etapas (1,9 a 150 nM) en 100 µl de Tris-HCl 0,1 M, pH 9,0 se aplicaron a membranas de nitrocelulosa (Schleicher & Schull, Dassel, Alemania), utilizando un dispositivo de transferencia de puntos. Después de la saturación, las membranas se incubaron durante 2 h con PBS-Tween que contenía 5% de leche en polvo a temperatura ambiente y se lavaron cuatro veces con PBS-Tween. A continuación, C3met marcado con 5 kcpm de [¹²⁵I] en PBS-Tween con 2% de leche en polvo, se añadió durante una noche a 4°C. La proteína unida se visualizó con un Personal FX (Bio-Rad) utilizando pantallas intensificadoras.

35 Resonancia de plasmón superficial (Biacore)

La interacción entre UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ o UspA2³⁰⁻⁵³⁹ y C3 se analizó adicionalmente empleando resonancia de plasmón superficial (Biacore 2000; Biacore, Uppsala, Suecia) como se ha descrito recientemente para la interacción UspA1/2-C4BP [58]. La *K_D* (la constante de disociación en equilibrio) se calcula a partir de una curva de unión que muestra la respuesta en equilibrio representada frente a la concentración utilizando un modelo de afinidad en estado estacionario proporcionado por el programa informático Biaevaluation (Biacore).

45 Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)

Las placas de microtitulación (Nunc-Immuno Module; Roskilde, Dinamarca) se recubrieron con tripletes de UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰, UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes purificadas, o los fragmentos truncados de UspA1 y UspA2 (40 nM en carbonato sódico 75 mM, pH 9,6) a 4°C durante una noche. Las placas se lavaron cuatro veces con tampón de lavado (PBS con 0,1% de Tween 20, pH 7,2) y se bloquearon durante 2 horas a temperatura ambiente con tampón de lavado complementado con 1,5% de ovoalbúmina (tampón de bloqueo). Después de los lavados, los pocillos se incubaron durante una noche a 4°C con 0,25 µg de C3met en tampón de bloqueo. A continuación, las placas se lavaron y se incubaron con anticuerpo de cabra anti-C3 humano en tampón de bloqueo durante 1 h a TA. Después de lavados adicionales, se añadieron AcPs de burro anti-cabra conjugados con HRP durante 1 hora a TA. Los pocillos se lavaron cuatro veces y las placas se revelaron y se midieron a DO₄₅₀.

55 Ensayo hemolítico

Los eritrocitos de conejo se lavaron tres veces con tampón Veronal 2,5 mM enfriado con hielo, pH 7,3 que contenía 0,1% (peso/vol) de gelatina, MgCl₂ 7 mM, EGTA 10 mM y 2,5% de dextrosa (Mg⁺⁺EGTA), y se resuspendieron hasta

tener una concentración de $0,5 \times 10^9$ células/ml. Los eritrocitos se incubaron con diversas concentraciones (0 a 4%) de suero diluido en Mg^{++} EGTA. Después de 1 h a 37°C, los eritrocitos se centrifugaron y la cantidad de eritrocitos lisados se determinó por medición espectrofotométrica de la hemoglobina liberada a 405 nm. Para la inhibición con UspA1 y UspA2, 10% de suero se preincubó con 100 nM de proteínas UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y/o UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes durante 30 min a 37°C, y posteriormente se añadió a los eritrocitos de 0 a 4%.

Aislamiento de leucocitos polimorfonucleares y fagocitosis

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) humanos se aislaron a partir de sangre fresca de voluntarios sanos, utilizando macrodex (Pharmalink AB, Upplands Väsby, Suecia). Los PMN se centrifugaron durante 10 min a 300 g, se lavaron en PBS y se resuspendieron en medio RPMI 1640 (Life Technologies, Paisley, Escocia). La suspensión bacteriana ($0,5 \times 10^8$) se opsonizó con 3% de SHN o SHN-EDTA, o 20 µg de C3met purificado durante 15 min a 37°C. Después de los lavados, las bacterias se mezclaron con PMN (1×10^7 células/ml) en una proporción de bacterias/PMN de 10:1 seguido de incubación a 37°C con rotación de extremo a extremo. Las bacterias supervivientes después de 0, 30, 60 y 120 minutos de incubación se determinaron mediante recuentos de microorganismos viables. El número de bacterias fagocitadas tratadas con SHN se comparó con el de bacterias fagocitadas en ausencia de SHN. *S. aureus* opsonizado con SHN se utilizó como control positivo.

Ejemplos y resultados

Interacción entre *M. catarrhalis* y fibronectina

M. catarrhalis carente de UspA1 y A2 no se une a fibronectina soluble o inmovilizada.

Se seleccionó una serie aleatoria de cepas clínicas de *M. catarrhalis* (n = 13) (tabla 7) y se sometieron a ensayo para estudiar la unión a fibronectina en relación con su expresión de UspA1/A2 mediante un análisis por citometría de flujo. Una expresión elevada de UspA1/A2 según se determinó por una intensidad media de fluorescencia elevada (IMF), se correlacionó con la expresión de UspA1/A2 (coeficiente de correlación de Pearson 0,77, $P < 0,05$) (figura 1A). Sin embargo, distinguir entre la expresión de UspA1 y de A2 no era posible con nuestro AcP anti-UspA1/A2. Además, la presencia de la proteína UspA2H contribuyendo a la unión, era poco probable ya que el gen *uspA2H* no se encontró en las cepas utilizadas en este estudio (datos no mostrados).

Dos cepas aisladas de *M. catarrhalis* (BBH18 y RH4) y sus mutantes específicos que carecen de UspA1, UspA2 o ambas proteínas, también se analizaron por citometría de flujo. *M. catarrhalis* BBH18 se unía fuertemente a fibronectina con una intensidad media de fluorescencia (IMF) de 96,1 (Figura 1F). Por el contrario, BBH18 Δ uspA1 mostraba una disminución de la unión a fibronectina con una IMF de 68,6 (figura 1G). La unión de fibronectina a BBH18 Δ uspA2 y al mutante doble BBH18 Δ uspA1/A2 reveló una IMF de solo 10,7 y 11,5, respectivamente (Figura 1H, 1I). Se obtuvieron resultados similares con mutantes UspA1/A2 de la cepa clínica *M. catarrhalis* RH4. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que UspA1 y A2 se unen a fibronectina y que la capacidad de las bacterias para unirse a la fibronectina dependía en gran medida de la expresión de UspA1/A2.

Con el fin de analizar la interacción entre fibronectina y *M. catarrhalis*, fibronectina marcada con ¹²⁵I se incubó con dos cepas clínicas aisladas de *M. catarrhalis* (BBH18 y RH4) y sus respectivos mutantes. *M. catarrhalis* RH4 de tipo silvestre se unía fuertemente a ¹²⁵I-fibronectina, mientras que el mutante correspondiente Δ uspA1 mostraba 80% de unión de la de tipo silvestre. En contraste, Δ uspA2 y el mutante doble se unían a ¹²⁵I-fibronectina con 14% y 12%, respectivamente, que era justo por encima de los niveles de señal de fondo (5,0 a 10%) (figura 2). Se obtuvieron resultados similares con *M. catarrhalis* BBH18 y los mutantes correspondientes UspA1/A2. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que tanto UspA1 como A2 son necesarias para la unión máxima de *M. catarrhalis* a fibronectina soluble.

Para investigar la fijación bacteriana a fibronectina inmovilizada, *M. catarrhalis* RH4 y sus correspondientes mutantes Δ uspA1/A2 se aplicaron sobre portaobjetos de vidrio recubiertos con fibronectina. Después de 2 h de incubación, los portaobjetos se lavaron y, posteriormente, se realizó una tinción de Gram. Se encontró que *M. catarrhalis* de tipo silvestre y el mutante Δ uspA1 se adherían fuertemente a los portaobjetos de vidrio recubiertos con fibronectina (figura 3A y 3B). En contraste, Δ uspA2 y los mutantes dobles Δ uspA1/A2 de *M. catarrhalis* se adherían débilmente a la lámina de vidrio recubierta con fibronectina, quedando solo una pocas bacterias después del lavado (figura 3C y 3D, respectivamente). Los experimentos con otra cepa clínica aislada de *M. catarrhalis* (BBH18) y sus mutantes derivados mostraron un patrón similar lo que indica que UspA2 tenía una gran importancia para la unión de *M. catarrhalis* a fibronectina inmovilizada.

Los dominios de unión a fibronectina incluyen residuos de aminoácidos situados entre 299 y 452 de UspA1 y entre 165 y 318 de UspA2

Con el fin de analizar adicionalmente las interacciones de UspA1 y A2 con fibronectina, UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ truncadas fueron producidas de forma recombinante en *E. coli*, se recubrieron placas de microtitulación y se incubaron con concentraciones crecientes de fibronectina. La fibronectina unida se detectó con un AcP anti-fibronectina humana seguido de incubación con un AcP anti-conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante. Tanto UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ como UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes se unían a fibronectina soluble y las interacciones eran dependientes de

la dosis (figura 4).

Para definir el dominio de unión a fibronectina de UspA1, se prepararon proteínas recombinantes que incluían toda la molécula de UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰. La fibronectina se incubó con los fragmentos de proteínas UspA1 inmovilizadas y las interacciones se cuantificaron mediante ELISA. UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ se unía a fibronectina casi de forma tan eficaz como UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ lo que sugiere que el dominio de unión estaba dentro de esta parte de la proteína. Entre los otros fragmentos truncados, UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² se unía de manera eficaz a la fibronectina (figura 5A). Paralelamente, se analizaron las interacciones entre fibronectina y varios fragmentos de UspA2 recombinante que incluían los aminoácidos UspA2³⁰⁻⁵³⁹. Los dos fragmentos UspA2¹⁰¹⁻³¹⁸ y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ se unían fuertemente a la fibronectina (figura 5B). Nuestros hallazgos proporcionan una evidencia significativa de que los dominios de unión incluyen residuos que se encuentran dentro de UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸. Una comparación de las secuencias entre estos dos fragmentos de unión reveló que los 31 residuos de aminoácidos "DQKADIDNNINNIYELAQQDQHSSDIKTLK" (SEQ ID NO: 1) eran idénticos para UspA1 y A2 (figura 6). Además, esta secuencia repetida también se encontró en el gen *uspA1* y A2 de *M. catarrhalis* BBH18 y RH4 (datos no mostrados).

Los fragmentos UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ y UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² inhiben competitivamente la unión de *M. catarrhalis* a fibronectina

Con el fin de validar nuestros hallazgos sobre los dominios de unión entre fibronectina y UspA1/A2, las proteínas UspA1 truncadas recombinantes se sometieron a ensayo para determinar su capacidad para bloquear la unión a fibronectina de *M. catarrhalis*. La fibronectina (2 µg) se preincubó con 0,25 µmoles de fragmentos de UspA1 recombinante y, posteriormente, se incubó con *M. catarrhalis*. Finalmente, la unión de fibronectina dependiente de UspA con *M. catarrhalis* se midió por citometría de flujo. La preincubación con UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ y UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² dio como resultado una disminución de la unión a fibronectina con una reducción del 95% para UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ y una reducción del 63% para UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² (figura 7). Cuando la fibronectina se preincubó con UspA2¹⁰¹⁻³¹⁸ truncada, se obtuvo una inhibición del 50%.

Por lo tanto, los dominios de unión a fibronectina de UspA1 y A2 bloquean las interacciones entre la fibronectina y *M. catarrhalis*.

UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ inhiben la adherencia de *M. catarrhalis* a las células epiteliales Chang

Las células epiteliales son conocidas por expresar fibronectina y muchas bacterias se fijan a las células epiteliales a través de fibronectina asociada a las células [46, 54, 69, 77]. Estudios anteriores han mostrado que *M. catarrhalis* se adhiere a las células epiteliales [43, 49]. Se analizaron las células conjuntivales Chang, que con frecuencia se han utilizado en experimentos de adhesión con agentes patógenos respiratorios. Las células Chang expresaban fuertemente fibronectina según se mostró por análisis de citometría de flujo (figura 8A).

Para analizar si la unión a fibronectina dependiente de UspA era importante para la adhesión bacteriana, las células epiteliales Chang se preincubaron con AcP anti-fibronectina humana, o las proteínas recombinantes UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸. A continuación, se añadió *M. catarrhalis* RH4 y se analizó la adhesión bacteriana. La adherencia relativa (medida por el número de unidades formadoras de colonias) después de la preincubación con 0,4 µmoles por 200 µl de UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵², UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ o un AcP anti-fibronectina humana era de 36%, 35% y 32%, respectivamente. Mayores concentraciones de péptidos recombinantes no dieron como resultado una inhibición adicional. Por el contrario, los fragmentos UspA1⁴³³⁻⁵⁸⁰ y UspA2³⁰⁻¹⁷⁷ que no se unían a fibronectina no inhibían las interacciones entre *M. catarrhalis* y las células epiteliales Chang (Figura 8B). Por lo tanto, la fibronectina en las células epiteliales Chang puede actuar como un receptor para *M. catarrhalis* y los residuos de aminoácidos 299-452 de UspA1 y 165-318 de UspA2 contienen el ligando responsable de las interacciones.

Interacción entre *M. catarrhalis* y laminina, *M. catarrhalis* se une a laminina a través de UspA1 y A2

Se analizaron dos cepas aisladas clínicas de *M. catarrhalis* (BBH18 y RH4) y sus mutantes específicos que carecían de UspA1, UspA2 o de ambas proteínas, mediante un ELISA de células completas. *M. catarrhalis* RH4 se unía fuertemente a laminina inmovilizada (figura 9A). Por el contrario, el mutante *uspA1* de *M. catarrhalis* RH4 (RH4ΔuspA1) mostraba una unión a laminina que era el 89,9% de la de tipo silvestre. El mutante *uspA2* de *M. catarrhalis* RH4 (RH4ΔuspA2) y el mutante doble *RH4ΔuspA1/A2* mostraban el 15,2% y el 18,1% de la capacidad de unión del tipo silvestre, respectivamente. Esto no era significativamente diferente de la adhesión residual a placas recubiertas con BSA. Se obtuvieron resultados similares con mutantes UspA1/A2 procedentes de la cepa clínica *M. catarrhalis* BBH18. En estas dos cepas (BBH18 y RH4), UspA2 es la proteína expresada de forma predominante en comparación con UspA1, lo que explica la diferencia mínima en la unión entre el tipo silvestre y RH4ΔuspA1. En conjunto, estos resultados muestran que UspA1 y A2 se unen a laminina.

Con el fin de analizar adicionalmente la unión entre UspA1/A2 y laminina, UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ truncadas se produjeron en *E. coli*. Las placas de microtitulación se recubrieron con las proteínas recombinantes y se incubaron con concentraciones crecientes de laminina. La laminina unida se detectó con AcP de conejo anti-laminina seguido de incubación con un AcP anti-conejo conjugado con HRP. Tanto UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ como UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes se unían fuertemente a la laminina soluble y la unión era dependiente de la dosis y saturable (figura 9B).

Para definir los dominios de unión a laminina, se prepararon UspA1 y A2 recombinantes que abarcaban las moléculas

las completas. La laminina se incubó con fragmentos de UspA1 y A2 truncadas inmovilizadas y a continuación se realizó una cuantificación mediante ELISA. UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ se unía a laminina casi tan eficazmente como UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ lo que sugiere que el dominio de unión estaba dentro de esta parte de la proteína. Sin embargo, entre los otros fragmentos truncados que abarcaban esta región, ningún otro fragmento parecía unirse a laminina. La parte N-terminal, UspA2³⁰⁻³⁵¹, era capaz de conservar 44,7% de la capacidad de unión, en comparación con la proteína de longitud completa. La proteína más corta UspA2³⁰⁻¹⁷⁷ mostraba una capacidad de unión del 43,7% (figura 10B). Estos resultados muestran que los dominios de unión incluyen residuos que se encuentran dentro de los extremos N-terminales tanto de UspA1 como de UspA2.

Interacción entre *M. catarrhalis* y C3 y C3met, las proteínas de membrana externa UspA1 y UspA2 de *M. catarrhalis* inhiben tanto la vía clásica como la vía alternativa de la cascada del complemento

La expresión en superficie de UspA2 es crucial para la supervivencia de *M. catarrhalis* en suero humano normal (SHN) [1, 58], es decir, los mutantes de Moraxella que carecen de UspA2 mueren rápidamente cuando se exponen a SHN. Hemos observado recientemente que tanto UspA1 como A2 se unen a C4BP y por lo tanto pueden inhibir la vía clásica de activación del complemento [58]. Para aclarar más las interacciones de *M. catarrhalis* con el sistema del complemento, se estudió la supervivencia de mutantes dobles UspA1/A2 en suero tratado con EGTA con adición de MgCl₂ (Mg-EGTA) o EDTA. Mg-EGTA inhibe las vías clásica y de lectina y por lo tanto permite el análisis por separado de la vía alternativa. En contraste, EDTA inhibe todas las vías del complemento mediante la absorción de cationes divalentes (Mg²⁺ y Ca²⁺). *M. catarrhalis* RH4 de tipo silvestre sobrevivía después de 30 minutos de incubación, mientras que el mutante doble RH4ΔuspA1/A2 era destruido por SHN intacto después de 10 min (Fig. 12). Cuando se inhibía la vía clásica (SHN + Mg-EGTA), el mutante RH4ΔuspA1/A2 sobrevivía durante un período de tiempo significativamente más largo, en comparación con SHN sin ningún quelante, pero no tanto tiempo como la bacteria de tipo silvestre. Además, cuando las vías tanto clásica como alternativa se bloqueaban con EDTA, *M. catarrhalis* RH4ΔuspA1/A2 sobrevivía. Un patrón similar se obtuvo con la cepa aislada *M. catarrhalis* BBH18 y los mutantes correspondientes ΔuspA1/A2 de BBH18 (no se muestra). De forma paralela, experimentos con suero que carecía de C1q y factor D/properidina mostraron que tanto la vía clásica como la alternativa estaban inhibidas por *M. catarrhalis* (no se muestra). Por lo tanto, *M. catarrhalis*, un agente patógeno que coloniza con frecuencia el tracto respiratorio humano, no solo contrarresta la vía clásica, sino también la vía alternativa del sistema del complemento a través de las proteínas de la membrana externa UspA1 y A2.

M. catarrhalis absorbe C3 a partir de suero inactivado con EDTA

C3b se une covalentemente a la superficie de un microbio y por lo tanto induce la vía alternativa (Fig. 11B). Para analizar si *M. catarrhalis* puede interactuar con C3, nuestra cepa RH4 de tipo silvestre se incubó con SHN o SHN tratado con EDTA. La unión o el depósito (a través de un enlace covalente) de C3/C3b en la superficie bacteriana de *M. catarrhalis* RH4 se detectó mediante análisis por citometría de flujo con un anticuerpo policlonal (AcP) dirigido contra C3d que reconocía tanto C3 como C3b. La incubación de las bacterias con SHN que contenía complemento intacto condujo al depósito de C3 (Fig. 13). Curiosamente, cuando la cascada del complemento se inactivaba en presencia de EDTA, *M. catarrhalis* RH4 seguía uniéndose a C3 (Fig. 13A). *Streptococcus pneumoniae* que se incluyó a modo de comparación, no absorbía C3 a partir del suero tratado con EDTA (Fig. 13B). En contraste con los neumococos, *M. catarrhalis* se unía de este modo a C3, independientemente de la activación del complemento. El tioéster interno de C3 se hidroliza espontáneamente en fase fluida a C3(H₂O). Por lo tanto, C3 intacto o C3(H₂O) eran las formas más probables de C3 que interactuaban con *M. catarrhalis*. Ya que *M. catarrhalis* también se une a C4BP [58], hemos querido excluir que C4BP participara en la unión a C3 y para ello hemos utilizado suero agotado para C4BP. *M. catarrhalis* absorbía C3 a partir del suero agotado para C4BP en la misma medida que a partir de SHN (no se muestra).

La unión de C3met a *M. catarrhalis* es dependiente de la dosis y no covalente

Nuestros experimentos implicaban que C3 se unía a la superficie de *M. catarrhalis* con independencia de la activación del complemento. Por lo tanto, analizamos si C3 convertido, que no es funcional, podía unirse a las bacterias. C3 natural se purificó a partir de suero humano y se trató con metilamina, que convierte C3 en una molécula C3met equivalente a C3b pero sin la capacidad de unirse covalentemente a los microbios (Fig. 11C). Análisis por citometría de flujo mostraron que la cepa de tipo silvestre de *M. catarrhalis* RH4 se unía con eficacia a C3met en una manera dependiente de la dosis y saturable (Fig. 14A y B). Esta interacción no estaba mediada por la parte C3a de la molécula de C3 ya que C3b y C3(H₂O) también se unían a *M. catarrhalis* (no se muestra). La unión entre *M. catarrhalis* RH4 y C3met se basaba en gran medida en interacciones iónicas ya que concentraciones crecientes de NaCl inhibían la interacción (Fig. 14C). Se obtuvieron resultados similares con la cepa de tipo silvestre de *M. catarrhalis* BBH18 (no se muestra).

Para determinar si la unión de C3 es una característica general de todas las cepas de *M. catarrhalis*, se seleccionó una serie aleatoria de cepas clínicas aisladas (n = 13) y se analizó su capacidad para unirse a C3met. Todas las cepas de *M. catarrhalis* se unían a C3met como se mostró en un análisis por citometría de flujo con un AcP antiC3d. Los valores de imf variaban de 4 a 39. Sin embargo, *S. pneumoniae* y *E. coli* que se incluyeron a modo de comparación, no se unieron a C3met.

M. catarrhalis es una bacteria particular que se une a C3 y C3met

Para ampliar nuestro análisis de la absorción bacteriana de C3 a partir de SHN, se incubaron subespecies relacionadas con *Moraxella* (n = 13), así como agentes patógenos humanos comunes (n = 13) en presencia de SHN-EDTA. Curiosamente, entre todas las especies bacterianas sometidas a ensayo, *M. catarrhalis* era la única bacteria que se unía a C3 en suero con el complemento inactivado (Tabla 9). También se analizaron todas las cepas de *Moraxella* relacionadas, así como los demás agentes patógenos humanos para estudiar la unión de C3met. De forma paralela a la unión de C3, *M. catarrhalis* era la única especie que se unía a C3met. Resumiendo, *M. catarrhalis* tiene una característica particular para unirse fuertemente a C3 y C3met de una manera no covalente.

M. catarrhalis se une a C3met a través de las proteínas UspA1 y UspA2 de la membrana externa

Para determinar la proteína de *M. catarrhalis* responsable de la unión a C3, se sometió a ensayo una serie de mutantes bacterianos carentes de las proteínas de la membrana externa MID, UspA1 y/o UspA2 [22, 58]. Curiosamente, la unión de C3met se correlacionaba significativamente con la expresión de Usp (Fig. 15). *M. catarrhalis* RH4Δmid se unía a C3met con la misma intensidad que el homólogo de tipo silvestre (Fig. 15A-B). El mutante RH4ΔuspA1 solo mostraba una ligera disminución de la unión, mientras que RH4ΔuspA2 era un aglutinante más débil en comparación con el homólogo de tipo silvestre (Fig. 15C-D). De forma paralela, la unión de C3met al mutante doble RH4ΔuspA1/A2 estaba completamente erradicada (Fig. 15E). Además, cuando se realizaron los mismos experimentos utilizando SHN-EDTA, se observó el mismo patrón (Fig. 15F-J). Cuando se utilizó suero humano normal, todos los mutantes mostraron una cantidad similar de C3 en su superficie, ya que era una mezcla de un depósito covalente y la unión de C3 (Fig. 15K-O). Se obtuvieron resultados similares con la cepa aislada de *M. catarrhalis* BBH18 y los mutantes de BBH18 correspondientes.

Con el fin de analizar adicionalmente la interacción entre C3 y UspA1/A2, se produjeron UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ en *E. coli* y se purificaron. Las proteínas recombinantes se sometieron a transferencia de puntos sobre una membrana de nitrocelulosa seguida de incubación con C3met marcado con yodo. MID⁹⁶²⁻¹²⁰⁰ recombinante que se obtiene a partir de la proteína de la membrana externa MID de *M. catarrhalis* [59], se incluyó como control negativo. Se detectó una unión débil a UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰, mientras que [¹²⁵I]-C3met se unía fuertemente a UspA2³⁰⁻⁵³⁹ (Fig. 16A). Estos hallazgos se reforzaron aún más empleando resonancia de plasmones superficiales (es decir, Biacore). UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ se inmovilizaron sobre la superficie de un chip CM5 usando un acoplamiento amino y C3met se inyectó hasta que se alcanzó la saturación. La *K_D* para la interacción entre C3met y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ o UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ era 3 y 14 μM, respectivamente. En conclusión, se encontró que UspA2 era la principal proteína que se unía a C3met de *M. catarrhalis*, mientras que UspA1 contribuía a la unión en menor medida.

Un dominio de unión a C3 se encuentra localizado entre los residuos de aminoácidos 200 y 458 de UspA2.

Para definir el dominio que se unía a C3 de UspA2, se prepararon proteínas recombinantes que abarcaban la molécula completa de UspA2³⁰⁻⁵³⁹. C3met se incubó con UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰, UspA2³⁰⁻⁵³⁹ de longitud completa inmovilizadas y una serie de proteínas UspA2 truncadas. A continuación, las interacciones se cuantificaron con ELISA. De acuerdo con los experimentos de transferencia de puntos (Fig. 16A), UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ se unía a C3met en el ELISA en una medida mucho menor que en comparación con UspA2³⁰⁻⁵³⁹ (Fig. 16B). Entre los fragmentos de proteínas truncadas, UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸, UspA2²⁰⁰⁻⁵³⁹ y UspA2³⁰²⁻⁴⁵⁸ se unían eficazmente a C3met, lo que sugiere que había un dominio de unión dentro de los residuos de aminoácidos 200 y 458.

UspA1/A2 recombinante neutraliza la actividad de C3

Con el fin de examinar con detalle el papel de la inhibición dependiente de UspA1/A2 de la vía alternativa, se realizó una serie de experimentos de citometría de flujo con bacterias incubadas con 10% de SHN o suero que se había preincubado con UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes 100 nM. Curiosamente, se observó una disminución significativa del depósito/unión de C3 en la superficie de *M. catarrhalis* RH4ΔuspA1/A2 cuando SHN se trataba previamente con UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ (Fig. 17A). Cuando la vía clásica se detenía con Mg-EGTA, se obtuvieron resultados similares (Fig. 17B). Por lo tanto, las proteínas recombinantes UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ absorbían C3 a partir de SHN e inhibían el depósito/unión de C3.

Para determinar si la absorción de C3 a través de UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes aumentaba la supervivencia bacteriana, el mutante doble *M. catarrhalis* RH4ΔuspA1/A2 se incubó con suero complementado con UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ seguido de la determinación del número de bacterias supervivientes. Mg-EGTA se incluyó en las reacciones con el fin de inhibir la vía clásica. Curiosamente, la adición de UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes a SHN impidió la destrucción de *M. catarrhalis* carente de UspA1/A2 (Fig. 17C). UspA2³⁰⁻⁵³⁹ era más eficaz en la inhibición de la destrucción bacteriana, en comparación con UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰. Cuando ambas proteínas recombinantes se complementaban entre sí, no se detectó una inhibición adicional de la vía alternativa. Diez % de SHN se corresponden a aproximadamente C3 600 nM. Para investigar si más moléculas UspA1 podrían neutralizar la actividad de C3, se añadió UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ y/o UspA2³⁰⁻⁵³⁹ hasta 600 nM. Sin embargo, concentraciones más elevadas de las proteínas recombinantes no aumentaron más la inhibición (no se muestra).

También se incluyó un ensayo hemolítico de la vía alternativa que consistía en eritrocitos de conejo y SHN, con el fin

de establecer el papel de UspA1 y A2 como inhibidores de la vía alternativa. SHN se preincubó con UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰, UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes o ambas proteínas juntas, seguido de la adición a los eritrocitos. Después de 1 h de incubación, se determinó la cantidad de lisis de eritrocitos. Curiosamente, se observó una disminución significativa de la hemólisis cuando SHN se preincubaba con UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ o UspA2³⁰⁻⁵³⁹, en comparación con SHN sin tratar (Fig. 18).

5 De forma paralela al aumento de la supervivencia de las bacterias en presencia de UspA2³⁰⁻⁵³⁹ o UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ (Fig. 17C), la preincubación solo con UspA2³⁰⁻⁵³⁹ dio como resultado una inhibición más eficaz de la vía alternativa que en comparación con cuando SHN se preincubaba con UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰. En conclusión, UspA1⁵⁰⁻⁷⁷⁰ o UspA2³⁰⁻⁵³⁹ recombinantes interferían con la actividad de la vía alternativa debido a su capacidad para capturar C3.

Además de ser una molécula clave en la cascada del complemento, C3b depositado e iC3b (C3b inactivado) se dirigían a microbios diana para eliminarlos en el proceso de opsonofagocitosis. Para investigar si C3 o C3met que estaba unido de forma no covalente a la superficie de *M. catarrhalis*, todavía podría actuar como una opsonina, se realizó una serie de experimentos de fagocitosis. *M. catarrhalis* se preincubó con C3met, SHN o SHN tratado con EDTA seguido por la adición de leucocitos polimorfonucleares. Curiosamente, *M. catarrhalis* no era fagocitada en presencia de C3met, mientras que SHN favorecía mucho la fagocitosis (datos no mostrados). Sin embargo, cuando SHN se

10 trataba previamente con EDTA, *M. catarrhalis* no era fagocitada por los leucocitos polimorfonucleares. Por lo tanto, C3/C3met era inactivo en la superficie celular de *M. catarrhalis* y no actuaba como una opsonina.

Discusión

Interacción entre *M. catarrhalis* y fibronectina

UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ procedentes de la cepa clínica de *M. catarrhalis* Bc5 eran los fragmentos más cortos que todavía se unían a la fibronectina. Curiosamente, los fragmentos más largos que abarcaban la secuencia de aminoácido que se encuentra dentro de UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ mostraban una unión a la fibronectina más eficaz (Figura 5A y B). Esto puede significar que estas dos regiones representan dominios de unión parciales o que el sitio de unión es altamente dependiente de una estructura molecular específica. UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ comparten una secuencia de 31 residuos de aminoácidos idénticos, que incluyen los 23 residuos "NNINNIYELAQQQDQHSS-DIKTL" (SEQ ID NO: 85) (secuencia NNINNIY (SEQ ID NO: 86)). Esta secuencia contiene el epítipo para el anticuerpo monoclonal (AcMo) protector 17C7 para el cual existe una reactividad universal [2, 50, 30]. En un modelo de ratón, la inmunización pasiva con AcMo 17C7 proporcionaba protección y mejoraba la eliminación pulmonar de *M. catarrhalis* [30]. Por tanto, es aún más interesante que los dominios de UspA1/A2 que se unen a fibronectina contienen estos residuos y se defiende la importancia de esta región en la patogénesis de la infección del tracto respiratorio con *M. catarrhalis*.

M. catarrhalis BBH18 y RH4 que se unen a fibronectina empleadas en nuestros experimentos también son portadoras de los 31 residuos de aminoácidos en su proteína UspA1/A2. La mayoría de las *M. catarrhalis* tienen una parte de esta secuencia (es decir, la secuencia NNINNIY (SEQ ID NO: 86)). Sin embargo, cepas tales como O35E que tiene la secuencia NNINNIY (SEQ ID NO: 86) en su gen *uspA2*, no expresan una proteína UspA2 que se une a fibronectina [49]. Una explicación probable sería que variaciones en las regiones flanqueantes podrían afectar a la interacción con fibronectina. Además, la misma secuencia NNINNIY conservada (SEQ ID NO: 86) puede tener cambios menores de una base de aminoácidos [28]. Por tanto, es probable que la unión a fibronectina dependerá no solo de la expresión de UspA1/A2, sino también de la composición individual de cada proteína UspA. Curiosamente, una secuencia de aminoácidos casi idéntica se puede encontrar en la proteína híbrida UspA2H con propiedades adhesivas (*M. catarrhalis* TTA37 y O46E) [43]. Esto proporciona un apoyo a nuestros hallazgos de que la secuencia de 31 aminoácidos es importante en la adhesión.

En nuestra última serie de experimentos, se ha sometido a ensayo si la adherencia de *M. catarrhalis* a las células conjuntivales Chang podría estar inhibida por los fragmentos que se unen a fibronectina (UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸) (figura 8B). La preincubación con UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵², UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸ o un AcP anti-fibronectina dio como resultado una disminución de la unión a las células epiteliales Chang. Estos resultados confirman la importancia de estos dominios de unión en las interacciones de UspA1/A2 con células epiteliales Chang y además sugieren que la fibronectina es un receptor importante para UspA. Además, se sabe que FnBP facilita la adherencia de bacterias a las vías respiratorias indiferenciadas y lesionadas [54, 69]. La expresión de fibronectina en fibroblastos de pulmón también se incrementa por el extracto del humo de cigarrillos [87]. Por tanto, el papel de UspA1/A2 de *M. catarrhalis* en la unión a fibronectina MEC o a fibronectina asociada a las células epiteliales es de gran importancia en los pacientes con EPOC y puede explicar la aparición común de una infección con *M. catarrhalis* en este grupo de pacientes [40].

En conclusión, hemos mostrado que UspA1/A2 de *M. catarrhalis* BBH18, RH4 y Bc5 son FnBP cruciales. Tanto UspA1 como A2 recombinantes obtenidas a partir de Bc5, se unen a la fibronectina con un dominio de unión que comparte residuos de aminoácidos idénticos que incluyen la secuencia conservada NNINNIY (SEQ ID NO: 86). Además, una interacción de UspA1/A2 de *M. catarrhalis* con células epiteliales es a través de fibronectina asociada a las células. La definición de estos dominios de unión a fibronectina es por ello una etapa importante que fomenta el desarrollo de una vacuna contra *M. catarrhalis*.

Interacción entre *M. catarrhalis* y laminina

M. catarrhalis es una causa común de agravamiento infeccioso en pacientes con EPOC. El desarrollo de esta especie en pacientes con EPOC está relacionado probablemente en parte con su gran repertorio de adhesinas. Además, hay cambios patológicos tales como la pérdida de la integridad epitelial con exposición de la membrana basal, en donde la misma capa de laminina está engrosada en los fumadores [4]. Algunos agentes patógenos han mostrado ser capaces de unirse a la laminina y por lo tanto pueden contribuir a su capacidad para adherirse a este tipo de superficies mucosas dañadas y desnudas. Estos incluyen agentes patógenos conocidos por causar una enfermedad importante en las vías respiratorias, tales como *S. aureus* y *P. aeruginosa*, entre otros [7, 63].

Se ha mostrado recientemente que tanto UspA1 como A2 se unen a la fibronectina [78]. Los dominios de unión a fibronectina se encuentran dentro de UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸. En este estudio, las mitades N-terminales de UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ y UspA2³⁰⁻³⁵¹ (que contienen los dominios de fibronectina) también se unen a laminina. Sin embargo, los fragmentos más pequeños que se unían a la fibronectina, UspA1²⁹⁹⁻⁴⁵² y UspA2¹⁶⁵⁻³¹⁸, no se unían a la laminina en ninguna medida apreciable. De hecho, fragmentos más pequeños que la mitad N-terminal de UspA1 (UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹) pierden toda su capacidad de unión a la laminina, mientras que con UspA2, solo UspA2³⁰⁻¹⁷⁰ se une a la laminina aunque a un nivel inferior que la proteína recombinante completa (UspA2³⁰⁻⁵³⁹). Estos hallazgos sugieren que quizá diferentes partes de las moléculas pueden tener diferentes papeles funcionales.

Comparando las regiones más pequeñas que se unen a laminina de UspA1 y A2, encontramos que, sin embargo, existe poca similitud, mediante homología de aminoácidos, entre UspA2³⁰⁻¹⁷⁰ y UspA1⁵⁰⁻⁴⁹¹ (datos no mostrados). Esto no es sorprendente, ya que es un hecho conocido que ambas proteínas tienen una estructura de cabeza globular en forma de "piruleta", a pesar de tener solo una identidad del 22% en ambas mitades N-terminales [2, 32]. Postulamos que probablemente una estructura terciaria es responsable de las interacciones con laminina en la región de cabeza *in vivo*. La localización de los dominios de unión en el extremo N-terminal sería lógica ya que estarían más expuestos y en contacto con la membrana basal humana *in vivo*.

Los factores bacterianos que median en la adhesión al tejido y a componentes de la matriz extracelular (MEC) se agrupan en una sola familia llamada "componentes de la superficie de microbios que reconocen moléculas de la matriz adhesiva" (MSCRAMMs). Puesto que UspA1/A2 se unen tanto a la fibronectina como a la laminina, estas proteínas se pueden denominar MSCRAMMs. Nuestros resultados sugieren que UspA1 y A2 son adhesinas multifuncionales con diferentes dominios que interaccionan con diferentes ligandos en el tracto respiratorio. Se han descrito perfiles de unión similares de amplio espectro para otras proteínas bacterianas como YadA de *Yersinia enterocolitica*, para las que UspA1 y A2 tienen una relación estructural [45, 70]. YadA también se une a la fibronectina y la laminina [32].

Resumiendo, hemos mostrado que UspA1/A2 son cruciales para la interacción de *M. catarrhalis* con la glicoproteína laminina de la membrana basal y esto tendrá un papel importante en la patogénesis de infecciones en pacientes con EPOC [74].

Interacción entre *M. catarrhalis* y C3 y C3met

La resistencia al complemento es uno de los factores más importantes de la virulencia bacteriana [66]. La mayoría (89%) de las cepas aisladas de *M. catarrhalis* a partir de pacientes con infecciones de las vías respiratorias inferiores, son resistentes a la destrucción mediada por el complemento [34]. UspA1 y A2 de *M. catarrhalis* son cruciales para la supervivencia bacteriana en suero humano *in vivo* [1, 15], y hemos mostrado que estas dos proteínas de la membrana externa se unen al regulador en fase soluble del complemento de la vía clásica, C4BP [58]. En el presente estudio, hemos mostrado que *M. catarrhalis* puede inhibir la vía alternativa mediante la unión no covalente de C3 (Figs. 17 y 18). La unión de C3 lo más probable es que también inhiba la vía clásica. Esto, sin embargo, no se pudo analizar en detalle ya que *M. catarrhalis* también se une a C4BP. Curiosamente, la unión a C3 dependiente de *M. catarrhalis* es particular ya que varias subespecies de *Moraxella* relacionadas, así como bacterias patógenas humanas comunes no se unen a C3 (Tabla 9). Las interacciones con C3 y C3 tratado con metilamina están mediadas principalmente por UspA2, mientras que UspA1 tiene un papel menor (Figs. 15 y 16). La región que se une a C3 de UspA2 se ha localizado entre los residuos de aminoácidos 200 a 458. Esta región contiene un tramo de 140 residuos de aminoácidos que es idéntico en un 93% a una región en UspA1 [2]. Sin embargo, a pesar de esta similitud de la secuencia, UspA1 se une a C3 en un grado mucho menor. Esto podría ser debido a una diferencia específica en la conformación entre las proteínas. La discrepancia en la unión a C3 entre UspA1 y UspA2 contrasta con la interacción de UspA1/A2 con C4BP [58].

M. catarrhalis es igualmente resistente tanto a la vía clásica como a la alternativa (Fig. 12B). La bacteria se une a C4BP que inhibe la vía clásica [58] y en este trabajo se muestra una interacción con la vía alternativa a través de la unión de C3. Determinar cuál de estos mecanismos tiene mayor importancia para la resistencia sérica a *M. catarrhalis* en varias situaciones *in vivo* es difícil. Por ejemplo, la importancia de la vía clásica dependerá en gran medida del historial de infecciones con *M. catarrhalis* y de la capacidad para generar anticuerpos activadores del complemento. Sin embargo, cada mecanismo que proporciona protección contra el complemento es sin duda beneficioso para un agente patógeno. Puesto que C3 es una molécula clave en el sistema del complemento, la unión de C3 da probablemente como resultado una regulación de las tres vías de activación y puede contribuir de forma máxima a la resistencia sérica.

La importancia del sistema del complemento como mecanismo primario de defensa se refleja en el hecho de que los microbios han desarrollado diversas estrategias para interferir con y/o neutralizar los componentes del sistema del complemento [42, 35, 88]. Además de *M. catarrhalis*, *S. pyogenes*, *Bordetella pertussis*, *E. coli* K1, *Candida albicans* y *N. gonorrhoeae* expresan moléculas específicas de superficie que se unen a C4BP y, como consecuencia, protegen a las bacterias de la vía clásica del complemento [8, 9, 52, 58, 64, 65, 80]. Además de la inhibición de la vía clásica, diversas bacterias (por ejemplo, *C. albicans*, *N. meningitidis*, *S. pyogenes* y *S. pneumoniae*: para una revisión véase [68, 89], se unen al factor H y a una molécula similar al factor H y, por tanto, están parcialmente protegidas frente a la vía alternativa del complemento.

UspA1 y A2 absorben C3 a partir del suero y, lo más probable, de este modo inhiben la activación del complemento. Del mismo modo, la Proteína A de la superficie neumocócica (PspA) parece inhibir la vía alternativa tanto *in vitro* como *in vivo*. PspA es un factor de virulencia importante para *S. pneumoniae*. Cepas de neumococos que carecen de PspA son eliminadas fácilmente de la sangre, mientras que las cepas que expresan PspA sobreviven [82]. Además, en un modelo murino de bacteremia, neumococos carentes de PspA tienen una virulencia reducida significativamente en comparación con neumococos que expresan PspA [11]. Se ha demostrado que se deposita más C3b sobre neumococos negativos para PspA que en positivos para PspA [67, 82]. Por lo tanto, la expresión de PspA reduce el aclaramiento mediado por el complemento y la fagocitosis de *S. pneumoniae* mediante la limitación de la opsonización a través de C3b [12, 67]. Neumococos que carecen de PspA que no son virulentos en ratones normales se vuelven virulentos en ratones que carecen de C3 y del factor B [82].

Según nuestra información, solo hay dos ejemplos de proteínas bacterianas que se unen de forma no covalente a C3 y, por lo tanto, interfieren con la función del complemento. La primera de ellas es la proteína extracelular que se une al fibrinógeno (Efb) de *Staphylococcus aureus*, que se encontró que se une a C3b [44]. Efb inhibe tanto la vía clásica como la alternativa independientemente de la conformación tioéster, es decir, la unión a C3b es no covalente. El segundo ejemplo es la proteína neumocócica que se une a colina (CbpA), que se ha observado que se une a C3 tratado con metilamina, lo que sugiere una interacción no covalente que no es dependiente de la activación del complemento [16]. CbpA es un componente de la pared de la célula neumocócica, pero solo se puede unir a C3 cuando se secreta CbpA. Con el fin de analizar esta hipótesis, que no está firmemente establecida en la bibliografía, se analizaron once cepas aisladas diferentes de neumococos para estudiar la unión a C3 (C3 tratado con metilamina o SHN-EDTA) por citometría de flujo (Fig. 12B y Tabla 9). No se pudo detectar C3 unido en la superficie de *S. pneumoniae*. Cuando se analizaron lisados de *S. pneumoniae* y material sobrenadante de cultivos en transferencias Western usando C3 tratado con metilamina seguido de un AcP anti-C3 humano, se confirmaron los resultados de Cheng y colaboradores [16] (no se muestra). Teniendo en cuenta Efb y CbpA, que son ambas proteínas que se unen a C3 secretadas por dos bacterias Gram-positivas, *M. catarrhalis* Gram-negativa es una especie particular con proteínas ancladas a la membrana que se unen a C3 e inhiben la vía alternativa en la superficie de la bacteria.

Se ha mostrado que la levadura *Candida albicans* se une a C3b, iC3b y C3d. Sin embargo, C3b se une con una afinidad considerablemente menor que iC3b y C3d [29]. Se ha encontrado una gran diferencia entre la unión a C3 de *M. catarrhalis* y *C. albicans* (no se muestra); a pesar de que la cándida se une a C3met (56% de células positivas), la intensidad media de fluorescencia (imf) era solo <2,0 en comparación con una imf de 36,9 para *M. catarrhalis*. Además, no se observó una unión detectable cuando *C. albicans* se incubaba con suero tratado con EDTA. Dos proteínas que se unen a C3d se han aislado a partir de *C. albicans* y la proteína más caracterizada es una manoproteína de 60 kDa que era reconocida inicialmente por un anticuerpo dirigido contra el receptor 2 del complemento humano (CD21) [13]. Sin embargo, UspA1 y A2 de *M. catarrhalis* no fueron reconocidas por un anticuerpo policlonal dirigido contra CD21 (no se muestra). De forma paralela con estafilococos y neumococos [52, 64], una proteína que se une a C3d secretada procedente de *C. albicans* también existe [72]. Finalmente, se ha aislado un receptor de iC3b en *C. albicans* y es estructuralmente similar al CR3 humano (CD11b) [3]. Los mecanismos por los que estos receptores pueden participar en la patogénesis no se conocen completamente.

Los ejemplos anteriores de agentes patógenos que se unen a C3 son notablemente diferentes de *M. catarrhalis* porque estas especies son frecuentemente cepas aisladas del torrente sanguíneo. *M. catarrhalis* es un agente patógeno de la mucosa con raros casos de infecciones con bacteremia. Por lo tanto, la unión y la inactivación de C3 es más probable que ocurra en la superficie de la mucosa. Esto se apoya en el hecho de que existe una fuerte activación del complemento en curso y una inflamación consiguiente en estados de enfermedades tales como otitis media aguda [57]. Las proteínas del complemento se cree que son transportadas a la superficie de la mucosa debido a una exudación del plasma [26, 62]. En efusiones del oído medio (MEEs), por ejemplo, de niños, también se pueden encontrar concentraciones muy elevadas de productos de C3 [51]. Además, factores del complemento en el líquido MEEs han mostrado ser importantes en la actividad bactericida contra otros agentes de la mucosa tales como *H. influenzae* no tipificable [75]. *M. catarrhalis* es un agente patógeno estrictamente humano. No causa enfermedades como otitis media o neumonía en animales. Un modelo de aclaramiento pulmonar en ratón y un modelo de otitis media con chinchilla se han utilizado en varias ocasiones. Sin embargo, no se desarrolla otitis media ni neumonía y las bacterias se eliminan rápidamente [19, 83]. Por tanto, es difícil someter a ensayo la importancia biológica de la unión a C3 de bacterias *in vivo*. Ya que UspA1 y A2 son proteínas multifuncionales [1, 15, 31, 43, 58, 78], sería imposible relacionar cualquier diferencia en el aclaramiento de *M. catarrhalis* con la unión a C3. En particular, el hecho de que UspA1 sea una adhesina importante de *M. catarrhalis* y se una tanto a CEACAM1 como a fibronectina [31, 78] lo más probable es que afecte al aclaramiento. Sin embargo, debido a la fuerte activación del complemento en estados de

enfermedad tales como otitis media, la unión de C3 dependiente de *Moraxella* puede representar una vía importante para defender la mucosa.

El hecho de que *M. catarrhalis* obstaculice el sistema inmune humano de varias maneras, podría explicar por qué *M. catarrhalis* es un habitante común de tales vías respiratorias [73]. En conclusión, *M. catarrhalis* ha desarrollado unas vías sofisticadas para combatir tanto el sistema inmune humoral como innato. Los datos actuales muestran que *M. catarrhalis* tiene una capacidad particular para unirse a C3 en la superficie celular bacteriana que no se puede encontrar en otras especies bacterianas.

Referencias

1. Aebi C, Lafontaine ER, Cope LD, et al. Phenotypic effect of isogenic uspA1 and uspA2 mutations on *Moraxella catarrhalis* 035E. *Infect Immun* 1998; 66:3113-9.
2. Aebi C, Maciver I, Latimer JL, et al. A protective epitope of *Moraxella catarrhalis* is encoded by two different genes. *Infect Immun* 1997; 65:4367-77.
3. Alaei, S., C. Larcher, C. Ebenbichler, W. M. Prodingen, J. Janatova y M. P. Dierich. 1993. Isolation and biochemical characterization of the iC3b receptor of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 61:1395-1399.
4. Amin K, Ekberg-Jansson A, Lofdahl CG y Venge P. Relationship between inflammatory cells and structural changes in the lungs of asymptomatic and never smokers: a biopsy study. *Thorax* 2003; 58:135-42.
5. Attia AS, Lafontaine ER, Latimer JL, Aebi C, Syrogiannopoulos GA y Hansen EJ. The UspA2 protein of *Moraxella catarrhalis* is directly involved in the expression of serum resistance. *Infect Immun* 2005; 73:2400-10.
6. Bartos LC, Murphy TF. Comparison of the outer membrane proteins of 50 strains of *Branhamella catarrhalis*. *J Infect Dis* 1988; 158:761-5.
7. de Bentzmann S, Tristan A, Etienne J, Brousse N, Vandenesch F y Lina G. *Staphylococcus aureus* isolates associated with necrotizing pneumonia bind to basement membrane type I and IV collagens and laminin. *J Infect Dis* 2004; 190:1506-15.
8. Berggård, K., E. Johnsson, F.R. Mooi y G. Lindahl. 1997. *Bordetella pertussis* binds the human complement regulator C4BP: role of filamentous hemagglutinin. *Infect. Immun.* 65:3638-3643.
9. Blom, A. M., A. Rytönen, P. Vasquez, G. Lindahl, B. Dahlbäck y A. B. Jonsson. 2001. A novel interaction between type IV pili of *Neisseria gonorrhoeae* and the human complement regulator C4B-binding protein. *J. Immunol.* 166:6764-6770.
10. Bootsma HJ, van der Heide HG, van de Pas S, Schouls LM y Mooi FR. Analysis of *Moraxella catarrhalis* by DNA typing: evidence for a distinct subpopulation associated with virulence traits. *J Infect Dis* 2000; 181:1376-87.
11. Briles, D. E., J. Yother, L. S. McDaniel. 1988. Role of pneumococcal surface protein A in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Rev. Infect. Dis.* 10: (Supl. 2): S372.
12. Briles, D. E., S. K. Hollingshead, E. Swiatlo, A. Brooks-Walter, A. Szalai, A. Virolainen, L. S. McDaniel, K. A. Benton, P. White, K. Prellner, A. Hermansson, P. C. Aerts, H. Van Dijk y M. J. Crain. 1997. PspA and PspC: their potential for use as pneumococcal vaccines. *Microb. Drug Resist.* 3:401-408.
13. Calderone, R. A., L. Linehan, E. Wadsworth y A. L. Sandberg. 1988. Identification of C3d receptors on *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 56:252-258.
14. Catlin BW. *Branhamella catarrhalis*: an organism gaining respect as a pathogen. *Clin Microbiol Rev* 1990; 3:293-320.
15. Chen D, Barniak V, VanDerMeid KR y McMichael JC. The levels and bactericidal capacity of antibodies directed against the UspA1 and UspA2 outer membrane proteins of *Moraxella* (*Branhamella*) *catarrhalis* in adults and children. *Infect Immun* 1999; 67:1310-6.
16. Cheng, Q., D. Finkel y M. K. Hostetter. 2000. Novel purification scheme and functions for a C3-binding protein from *Streptococcus pneumoniae*. *Biochem.* 39:5450-5457.
17. Cope LD, Lafontaine ER, Slaughter CA, et al. Characterization of the *Moraxella catarrhalis* uspA1 and uspA2 genes and their encoded products. *J Bacteriol* 1999; 181:4026-34.
18. De Saint Jean M, Baudouin C, Di Nolfo M, et al. Comparison of morphological and functional characteris-

tics of primary-cultured human conjunctival epithelium and of Wong-Kilbourne derivative of Chang conjunctival cell line. *Exp Eye Res* 2004; 78:257-74.

19. Fulghum , R. S. y H. G. Marrow. 1996. Experimental otitis media with *Moraxella* (Branhamella) catarrhalis. *Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.* 105:234-241.

5 20. Forsgren, A. y A. Grubb. 1979. Many bacterial species bind human IgD. *J. Immunol* 122:1468-1472.

21. Forsgren A, Brant M, Mollenkvist A, et al. Isolation and characterization of a novel IgD-binding protein from *Moraxella catarrhalis*. *J Immunol* 2001; 167:2112-20.

22. Forsgren A, Brant M, Karamehmedovic M y Riesbeck K. The immunoglobulin D-binding protein MID from *Moraxella catarrhalis* is also an adhesin. *Infect Immun* 2003; 71:3302-9.

10 23. Forsgren A, Brant M y Riesbeck K. Immunization with the truncated adhesion moraxella catarrhalis immunoglobulin D-binding protein (MID764-913) is protective against *M. catarrhalis* in a mouse model of pulmonary clearance. *J Infect Dis* 2004; 190:352-5.

15 24. Gjörloff-Wingren, A., R. Hadzic, A. Forsgren y K. Riesbeck. 2002. A novel IgD-binding bacterial protein from *Moraxella catarrhalis* induces human B lymphocyte activation and isotype switching in the presence of Th2 cytokines. *J. Immunol.* 168:5582-5588.

25. Greenwood FC, Hunter WM y Glover JS. The Preparation of I-131-Labelled Human Growth Hormone of High Specific Radioactivity. *Biochem J* 1963; 89:114-23.

26. Greiff, D., I. Erjefält, C. Svensson, P. Wollmer, U. Alkner, M. Andersson y C. G. Persson. 1993. Plasma exudation and solute absorption across the airway mucosa. *Clin. Physiol.* 13: 219-233.

20 27. Hanski E, Caparon M. Protein F, a fibronectin-binding protein, is an adhesin of the group A streptococcus *Streptococcus pyogenes*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:6172-6.

28. Hays JP, van der Schee C, Loogman A, et al. Total genome polymorphism and low frequency of intra-genomic variation in the *uspA1* and *uspA2* genes of *Moraxella catarrhalis* in otitis prone and non-prone children up to 2 years of age. Consequences for vaccine design? *Vaccine* 2003; 21:1118-24.

25 29. Heidenreich, F. y M. P. Dierich. 1985. *Candida albicans* and *Candida stellatoidea*, in contrast to other *Candida* species, bind iC3b and C3d but not C3b. *Infect. Immun.* 50:598-600.

30. Helminen ME, Maciver I, Latimer JL, et al. A large, antigenically conserved protein on the surface of *Moraxella catarrhalis* is a target for protective antibodies. *J Infect Dis* 1994; 170:867-72.

30 31. Hill DJ, Virji M. A novel cell-binding mechanism of *Moraxella catarrhalis* ubiquitous surface protein UspA: specific targeting of the N-domain of carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecules by UspA1. *Mol Microbiol* 2003; 48:117-29.

32. Hoiczky E, Roggenkamp A, Reichenbecher M, Lupas A y Heesemann J. Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J* 2000; 19:5989-99.

35 33. Holm MM, Vanlerberg SL, Foley IM, Sledjeski DD y Lafontaine ER. The *Moraxella catarrhalis* porin-like outer membrane protein CD is an adhesin for human lung cells. *Infect Immun* 2004; 72:1906-13.

34. Hol, C., C. M. Verduin, E. E. Van Dijke, J. Verhoef, A. Fleer, H. van Dijk. 1995. Complement resistance is a virulence factor of *Branhamella* (*Moraxella*) *catarrhalis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 11:207-211.

35. Hornef, M. W., M. J. Wick, M. Rhen, y S. Normark. 2002. Bacterial strategies for overcoming host innate and adaptive immune responses. *Nat. Immunol.* 3:1033-1040.

40 36. Hostetter, M. K., M. L. Thomas, F. S. Rosen y B. F. Tack. 1982. Binding of C3b proceeds by a transesterification reaction at the thiolester site. *Nature* 298:72-75.

37. Hostetter, M. K., R. A. Krueger y D. J. Schmeling. 1984. The biochemistry of opsonization: central role of the reactive thiolester of the third component of complement. *J. Infect. Dis.* 150:653-661.

45 38. Joh D, Wann ER, Kreikemeyer B, Speziale P y Hook M. Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. *Matrix Biol* 1999; 18:211-23.

39. Joh HJ, House-Pompeo K, Patti JM, Gurusiddappa S y Hook M. Fibronectin receptors from gram-positive bacteria: comparison of active sites. *Biochemistry* 1994; 33:6086-92.

40. Karalus R, Campagnari A. *Moraxella catarrhalis*: a review of an important human mucosal pathogen. *Mi-*

crobes Infect 2000; 2:547-59.

41. Kask, L., L.A. Trouw, B. Dahlback y A. M. Blom. 2004. The C4b-binding protein-protein S complex inhibits the phagocytosis of apoptotic cells. J. Biol. Chem. 279:23869-23873.

42. Lachmann, P. J. 2002. Microbial subversion of the immune response. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 99:8461-8462.

43. Lafontaine ER, Cope LD, Aebi C, Latimer JL, McCracken GH, Jr. y Hansen EJ. The UspA1 protein and a second type of UspA2 protein mediate adherence of *Moraxella catarrhalis* to human epithelial cells in vitro. J Bacteriol 2000; 182:1364-73.

44. Lee, L. Y. L., M. Höök, D. Haviland, R. A. Wetsel, E. O. Yonter, P. Syribeys, J. Vernachio y E. L. Brown. 2004. Inhibition of complement activation by secreted *Staphylococcus aureus* protein. J. Infect. Dis. 190:571-579.

45. Mack D, Heesemann J y Laufs R. Characterization of different oligomeric species of the *Yersinia enterocolitica* outer membrane protein YadA. Med Microbiol Immunol (Berl) 1994; 183:217-27.

46. Maheshwari RK, Kedar VP, Bhartiya D, Coon HC y Kang YH. Interferon enhances fibronectin expression in various cell types. J Biol Regul Homeost Agents 1990; 4:117-24.

47. McGavin MJ, Gurusiddappa S, Lindgren PE, Lindberg M, Raucci G y Hook M. Fibronectin receptors from *Streptococcus dysgalactiae* and *Staphylococcus aureus*. Involvement of conserved residues in ligand binding. J Biol Chem 1993; 268:23946-53.

48. McMichael JC. Vaccines for *Moraxella catarrhalis*. Vaccine 2000; 19 Supl 1:S101-7.

49. McMichael JC, Fiske MJ, Fredenburg RA, et al. Isolation and characterization of two proteins from *Moraxella catarrhalis* that bear a common epitope. Infect Immun 1998; 66:4374-81.

50. Meier PS, Troller R, Grivea IN, Syrogiannopoulos GA and Aebi C. The outer membrane proteins UspA1 and UspA2 of *Moraxella catarrhalis* are highly conserved in nasopharyngeal isolates from young children. Vaccine 2002; 20:1754-60.

51. Meri, S., T. Lehtinen y T. Palva. 1984. Complement in chronic secretory otitis media. C3 breakdown and C3 splitting activity. Arch. Otolaryngol. 110:774-778.

52. Meri, T., A. M. Blom, A. Hartmann, D. Lenk, S. Meri, P. F. Zipfel. 2004. The hyphal and yeast forms of *Candida albicans* bind the complement regulator C4b-binding protein. Infect. Immun. 72:6633-6641.

53. Mollenkvist A, Nordstrom T, Hallden C, Christensen JJ, Forsgren A y Riesbeck K. The *Moraxella catarrhalis* immunoglobulin D-binding protein MID has conserved sequences and is regulated by a mechanism corresponding to phase variation. J Bacteriol 2003;185:2285-95.

54. Mongodin E, Bajolet O, Cutrona J, et al. Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* are involved in adherence to human airway epithelium. Infect Immun 2002; 70:620-30.

55. Murphy TF. *Branhamella catarrhalis*: epidemiology, surface antigenic structure, and immune response. Microbiol Rev 1996; 60:267-79.

56. Murphy TF, Brauer AL, Aebi C y Sethi S. Identification of surface antigens of *Moraxella catarrhalis* as targets of human serum antibody responses in chronic obstructive pulmonary disease. Infect Immun 2005; 73:3471-8.

57. Närkiö-Mäkelä, M., J. Jero y S. Meri 1999. Complement activation and expression of membrane regulators in the middle ear mucosa in otitis media with effusion. Clin. Exp. Immunol. 116:401-409.

58. Nordstrom T, Blom AM, Forsgren A y Riesbeck K. The emerging pathogen *Moraxella catarrhalis* Interacts with complement inhibitor C4b binding protein through ubiquitous surface proteins A1 and A2. J Immunol 2004; 173:4598-606.

59. Nordstrom T, Forsgren A y Riesbeck K. The immunoglobulin D-binding part of the outer membrane protein MID from *Moraxella catarrhalis* comprises 238 amino acids and a tetrameric structure. J Biol Chem 2002; 277:34692-9.

60. Nordstrom T, Blom AM, Tan TT, Forsgren A y Riesbeck K. Ionic binding of C3 to the human pathogen *Moraxella catarrhalis* is a unique mechanism for combating innate immunity. J Immunol 2005; MS#05-2213, en prensa.

61. Pearson MM, Lafontaine ER, Wagner NJ, St Geme JW, 3rd y Hansen EJ. A hag mutant of *Moraxella catarrhalis* strain O35E is deficient in hemagglutination, autoagglutination, and immunoglobulin D-binding activities. *Infect Immun* 2002; 70:4523-33.
- 5 62. Persson, C. G., I. Erjefält, U. Alkner, C. Baumgarten, L. Greiff, B. Gustafsson, A. Luts, U. Pipkorn, F. Sundler, C. Svensson et al. 1991. Plasma exudation as a first line respiratory mucosal defence. *Clin. Exp. Allergy* 21: 17-24.
63. Plotkowski MC, Tournier JM y Puchelle E. *Pseudomonas aeruginosa* strains possess specific adhesins for laminin. *Infect Immun* 1996; 64:600-5.
- 10 64. Prasadarao, N. V., A. M. Blom, B. O. Villoutreix y L. C. Linsangan. 2002. A novel interaction of outer membrane protein A with C4b binding protein mediates serum resistance of *Escherichia coli* K1. *J. Immunol.* 169:6352-6360.
65. Ram, S., M. Cullinane, A. M. Blom, S. Gulati, D. P. McQuillen, B. G. Monks, C. O'Connell, R. Boden, C. Elkins, M. K. Pangburn, B. Dahlback y P. A. Rice. 2001. Binding of C4b-binding protein to porin: a molecular mechanism of serum resistance of *Neisseria gonorrhoeae*. *J. Exp. Med.* 193:281-296.
- 15 66. Rautemaa, R. y S. Meri. 1999. Complement-resistance mechanisms of bacteria. *Microbes Infect.* 1:785-94.
67. Ren, B., A. J. Szalai, S. K. Hollingshead, D. E. Briles. 2004. Effects of PspA and antibodies to PspA on activation and deposition of complement on the pneumococcal surface. *Infect. Immun.* 72:114-122.
- 20 68. Rodriguez de Córdoba, S., J. Esparza-Gordillo, E. Goicoechea de Jorge, M. Lopez-Trascasa y P. Sanchez-Corral. 2004. The human complement factor H: functional roles, genetic variations and disease associations. *Mol. Immunol.* 41:355-367.
69. Roger P, Puchelle E, Bajolet-Laudinat O, et al. Fibronectin and alpha5beta1 integrin mediate binding of *Pseudomonas aeruginosa* to repairing airway epithelium. *Eur Respir J* 1999; 13:1301-9.
- 25 70. Roggenkamp A, Ackermann N, Jacobi CA, Truelzsch K, Hoffmann H y Heesemann J. Molecular analysis of transport and oligomerization of the *Yersinia enterocolitica* adhesin YadA. *J Bacteriol* 2003; 185:3735-44.
71. Rozalska B, Wadstrom T. Protective opsonic activity of antibodies against fibronectin-binding proteins (FnBPs) of *Staphylococcus aureus*. *Scand J Immunol* 1993; 37:575-80.
72. Saxena, A. y R. Calderone. 1990. Purification and characterization of the extracellular C3d-binding protein of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 58:309-314.
- 30 73. Schwarz-Linek U, Werner JM, Pickford AR, et al. Pathogenic bacteria attach to human fibronectin through a tandem beta-zipper. *Nature* 2003; 423:177-81.
74. Sethi, S. y T. F. Murphy. 2001. Bacterial infection in chronic obstructive pulmonary disease in 2000: a state-of-the-art review. *Clin. Microbiol. Rev.* 14:336-363.
- 35 75. Shimizu, T., T. Harada, Y. Majima y Y. Sakakura. 1988. Bactericidal activity of middle ear effusion on a single isolate of non-typable *Haemophilus influenzae*. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* 16:211-217.
76. Tack, B. F., R. A. Harrison, J. Janatova, M. L. Thomas y J. W. Prahl. 1980. Evidence for presence of an internal thiolester bond in third component of human complement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 5764-5768.
- 40 77. Talay SR, Valentin-Weigand P, Jerlstrom PG, Timmis KN y Chhatwal GS. Fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*: sequence of the binding domain involved in adherence of streptococci to epithelial cells. *Infect Immun* 1992; 60:3837-44.
78. Tan, T. T., T. Nordström, A. Forsgren y K. Riesbeck. 2005. The Respiratory Pathogen *Moraxella catarrhalis* Adheres to Epithelial Cells by Interacting with Fibronectin through Ubiquitous Surface Proteins A1 and A2. *J. Infect. Dis.*, MS# 33893, en prensa.
- 45 79. Tenner, A. J., P. H. Lesavre y N. R. Cooper. 1981. Purification and radiolabeling of human C1q. *J. Immunol.* 127:648-653.
80. Thern, A., L. Stenberg, B. Dahlbäck y G. Lindahl. 1995. Ig-binding surface proteins of *Streptococcus pyogenes* also bind human C4b-binding protein (C4BP), a regulatory component of the complement system. *J. Immunol.* 154:375-386.
81. Timpe JM, Holm MM, Vanlerberg SL, Basrur V y Lafontaine ER. Identification of a *Moraxella catarrhalis*

outer membrane protein exhibiting both adhesin and lipolytic activities. Infect Immun 2003; 71:4341-50.

82. Tu, A. H., R. L. Fulgham, M. A. McCrory, D. E. Briles, A. J. Szalai. 1999. Pneumococcal surface protein A inhibits complement activation by *Streptococcus pneumoniae*. Infect. Immun. 67:4720.

5 83. Unhanand, M., I. Maciver, O. Ramilo, O. Arencibia-Mireles, J. C. Argyle, G. H. McCracken Jr y E. J. Hansen. 1992. Pulmonary clearance of *Moraxella catarrhalis* in an animal model. J. Infect. Dis. 165:644-650.

84. Verduin CM, Hol C, Fleer A, van Dijk H y van Belkum A. *Moraxella catarrhalis*: from emerging to established pathogen. Clin Microbiol Rev 2002; 15:125-44.

85. Walport, M. J. 2001. Complement. First of two parts. N. Engl. J. Med. 344:1058-1066.

86. Walport, M. J. 2001. Complement. Second of two parts. N. Engl. J. Med. 344:1140-1144.

10 87. Wang H, Liu X, Umino T, et al. Effect of cigarette smoke on fibroblast-mediated gel contraction is dependent on cell density. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003; 284:L205-13.

88. Wurzner, R. 1999. Evasion of pathogens by avoiding recognition or eradication by complement, in part via molecular mimicry. Mol. Immunol. 36:249-260.

15 89. Zipfel, P. F., C. Skerka, J. Hellwage, S. T. Jokiranta, S. Meri, V. Brade, P. Kraiczy, M. Noris y G. Remuzzi. 2001. Factor H family proteins: on complement, microbes and human diseases. Biochem. Soc. Trans. 30:971-978.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> Arne Forsgren AB

<120> INTERACCIÓN DE MORAXELLA-CATARRHALIS CON CÉLULAS EPITELIALES...

20 <130> 21027432

<160> 10

<170> PatentIn versión 3.1

<210> 1

25 < 211> 31

< 212> PRT

< 213> fragmento de proteína de *Moraxella catarrhalis* (UspA1 405-435 o UspA2 244-274) o péptido sintético

<400> 1

Asp Gln Lys Ala Asp Ile Asp Asn Asn Ile Asn Asn Ile Tyr Glu Leu
1 5 10 15

Ala Gln Gln Gln Asp Gln His Ser Ser Asp Ile Lys Thr Leu Lys
20 25 30

30 <210> 2

< 211> 154

< 212> PRT

< 213> fragmento de proteína de *Moraxella catarrhalis* ((UspA1 299-452) o péptido sintético

<400> 2

Thr Gly Asn Gly Thr Val Ser Val Gly Lys Lys Gly Lys Glu Arg Gln
1 5 10 15

35 Ile Val His Val Gly Ala Gly Glu Ile Ser Asp Thr Asp Ala Val Asn
20 25 30

Gly Ser Gln Leu His Val Leu Ala Thr Val Val Ala Gln Asn Lys Ala
35 40 45

Asp Ile Lys Asp Leu Asp Asp Glu Val Gly Leu Leu Gly Glu Glu Ile
50 55 60

Asn Ser Leu Glu Gly Glu Ile Phe Asn Asn Gln Asp Ala Ile Ala Lys
65 70 75 80

Asn Gln Ala Asp Ile Lys Thr Leu Glu Ser Asn Val Glu Glu Gly Leu
85 90 95

Leu Asp Leu Ser Gly Arg Leu Leu Ser Thr Asp Gln Lys Ala Asp Ile
100 105 110

Asp Asn Asn Ile Asn Asn Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln Asp Gln
115 120 125

His Ser Ser Asp Ile Lys Thr Leu Lys Asn Asn Val Glu Glu Gly Leu
130 135 140

Leu Asp Leu Ser Gly Arg Leu Ile Asp Gln
145 150

<210> 3

<211> 154

<212> PRT

<213> fragmento de proteína de *Moraxella catarrhalis* (UspA2 165-318) o péptido sintético

<400> 3

Lys Asp Ala Ile Ala Lys Asn Asn Glu Ser Ile Glu Asp Leu Tyr Asp
1 5 10 15

Phe Gly His Glu Val Ala Glu Ser Ile Gly Glu Ile His Ala His Asn
20 25 30

Glu Ala Gln Asn Glu Thr Leu Lys Gly Leu Ile Thr Asn Ser Ile Glu
35 40 45

Asn Thr Asn Asn Ile Thr Lys Asn Lys Ala Asp Ile Gln Ala Leu Glu
50 55 60

Asn Asn Val Val Glu Glu Leu Phe Asn Leu Ser Gly Arg Leu Ile Asp
65 70 75 80

Gln Lys Ala Asp Ile Asp Asn Asn Ile Asn Asn Ile Tyr Glu Leu Ala
85 90 95

Gln Gln Gln Asp Gln His Ser Ser Asp Ile Lys Thr Leu Lys Lys Asn
100 105 110

Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Leu Ser Asp His Ile Ile Asp Gln Lys
115 120 125

Thr Asp Ile Ala Gln Asn Gln Ala Asn Ile Gln Asp Leu Ala Thr Tyr
130 135 140

Asn Glu Leu Gln Asp Gln Tyr Ala Gln Lys
145 150

<210> 4

<211> 721

<212> PRT

<213> fragmento de proteína de *Moraxella catarrhalis* (UspA1 50-770) o péptido sintético

5

<400> 4

Lys Val Gly Lys Ala Thr Asn Lys Ile Ser Gly Gly Asp Asn Asn Thr
1 5 10 15

Ala Asn Gly Thr Tyr Leu Thr Ile Gly Gly Gly Asp Tyr Asn Lys Thr
20 25 30

Lys Gly Arg Tyr Ser Thr Ile Gly Gly Gly Leu Phe Asn Glu Ala Thr
35 40 45

Asn Glu Tyr Ser Thr Ile Gly Ser Gly Gly Tyr Asn Lys Ala Lys Gly
50 55 60

Arg Tyr Ser Thr Ile Gly Gly Gly Gly Tyr Asn Glu Ala Thr Asn Gln
65 70 75 80

Tyr Ser Thr Ile Gly Gly Gly Asp Asn Asn Thr Ala Lys Gly Arg Tyr
85 90 95

Ser Thr Ile Gly Gly Gly Gly Tyr Asn Glu Ala Thr Ile Glu Asn Ser
100 105 110

Thr Val Gly Gly Gly Gly Tyr Asn Gln Ala Lys Gly Arg Asn Ser Thr
115 120 125

Val Ala Gly Gly Tyr Asn Asn Glu Ala Thr Gly Thr Asp Ser Thr Ile
130 135 140

Ala Gly Gly Arg Lys Asn Gln Ala Thr Gly Lys Gly Ser Phe Ala Ala
145 150 155 160

ES 2 537 274 T3

Gly Ile Asp Asn Lys Ala Asn Ala Asp Asn Ala Val Ala Leu Gly Asn
 165 170 175
 Lys Asn Thr Ile Glu Gly Glu Asn Ser Val Ala Ile Gly Ser Asn Asn
 180 185 190
 Thr Val Lys Lys Gly Gln Gln Asn Val Phe Ile Leu Gly Ser Asn Thr
 195 200 205
 Asp Thr Thr Asn Ala Gln Asn Gly Ser Val Leu Leu Gly His Asn Thr
 210 215 220
 Ala Gly Lys Ala Ala Thr Ile Val Asn Ser Ala Glu Val Gly Gly Leu
 225 230 235 240
 Ser Leu Thr Gly Phe Ala Gly Ala Ser Lys Thr Gly Asn Gly Thr Val
 245 250 255
 Ser Val Gly Lys Lys Gly Lys Glu Arg Gln Ile Val His Val Gly Ala
 260 265 270
 Gly Glu Ile Ser Asp Thr Ser Thr Asp Ala Val Asn Gly Ser Gln Leu
 275 280 285
 His Val Leu Ala Thr Val Val Ala Gln Asn Lys Ala Asp Ile Lys Asp
 290 295 300
 Leu Asp Asp Glu Val Gly Leu Leu Gly Glu Glu Ile Asn Ser Leu Glu
 305 310 315 320
 Gly Glu Ile Phe Asn Asn Gln Asp Ala Ile Ala Lys Asn Gln Ala Asp
 325 330 335
 Ile Lys Thr Leu Glu Ser Asn Val Glu Glu Gly Leu Leu Asp Leu Ser
 340 345 350
 Gly Arg Leu Leu Asp Gln Lys Ala Asp Ile Asp Asn Asn Ile Asn Asn
 355 360 365
 Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln Asp Gln His Ser Ser Asp Ile Lys
 370 375 380
 Thr Leu Lys Asn Asn Val Glu Glu Gly Leu Leu Asp Leu Ser Gly Arg
 385 390 395 400
 Leu Ile Asp Gln Lys Ala Asp Leu Thr Lys Asp Ile Lys Ala Leu Glu
 405 410 415
 Ser Asn Val Glu Glu Gly Leu Leu Asp Leu Ser Gly Arg Leu Ile Asp
 420 425 430

Gln Lys Ala Asp Ile Ala Lys Asn Gln Ala Asp Ile Ala Gln Asn Gln
435 440 445

Thr Asp Ile Gln Asp Leu Ala Ala Tyr Asn Glu Leu Gln Asp Ala Tyr
450 455 460

Ala Lys Gln Gln Thr Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn Lys Ala Ser Ser
465 470 475 480

Ala Asn Thr Asp Arg Ile Ala Thr Ala Glu Leu Gly Ile Ala Glu Asn
485 490 495

Lys Lys Asp Ala Gln Ile Ala Lys Ala Gln Ala Asn Glu Asn Lys Asp
500 505 510

Gly Ile Ala Lys Asn Gln Ala Asp Ile Gln Leu His Asp Lys Lys Ile
515 520 525

Thr Asn Leu Gly Ile Leu His Ser Met Val Ala Arg Ala Val Gly Asn
530 535 540

Asn Thr Gln Gly Val Ala Thr Asn Lys Ala Asp Ile Ala Lys Asn Gln
545 550 555 560

Ala Asp Ile Ala Asn Asn Ile Lys Asn Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln
565 570 575

Gln Asp Gln His Ser Ser Asp Ile Lys Thr Leu Ala Lys Val Ser Ala
580 585 590

Ala Asn Thr Asp Arg Ile Ala Lys Asn Lys Ala Glu Ala Asp Ala Ser
595 600 605

Phe Glu Thr Leu Thr Lys Asn Gln Asn Thr Leu Ile Glu Gln Gly Glu
610 615 620

Ala Leu Val Glu Gln Asn Lys Ala Ile Asn Gln Glu Leu Glu Gly Phe
625 630 635 640

Ala Ala His Ala Asp Val Gln Asp Lys Gln Ile Leu Gln Asn Gln Ala
645 650 655

Asp Ile Thr Thr Asn Lys Thr Ala Ile Glu Gln Asn Ile Asn Arg Thr
660 665 670

Val Ala Asn Gly Phe Glu Ile Glu Lys Asn Lys Ala Gly Ile Ala Thr
675 680 685

Asn Lys Gln Glu Leu Ile Leu Gln Asn Asp Arg Leu Asn Arg Ile Asn
690 695 700

Glu Thr Asn Asn His Gln Asp Gln Lys Ile Asp Gln Leu Gly Tyr Ala
705 710 715 720

Leu

<210> 5

<211> 443

<212> PRT

<213> fragmento de proteína de Moraxella catarrhalis (UspA1 50-491) o péptido sintético

ES 2 537 274 T3

<400> 5

Lys Val Gly Lys Ala Thr Asn Lys Ile Ser Gly Gly Asp Asn Asn Thr
1 5 10 15
Ala Asn Gly Thr Tyr Leu Thr Ile Gly Gly Gly Asp Tyr Asn Lys Thr
20 25 30
Lys Gly Arg Tyr Ser Thr Ile Gly Gly Gly Leu Phe Asn Glu Ala Thr
35 40 45
Asn Glu Tyr Ser Thr Ile Gly Ser Gly Gly Tyr Asn Lys Ala Lys Gly
50 55 60
Arg Tyr Ser Thr Ile Gly Gly Gly Gly Tyr Asn Glu Ala Thr Asn Gln
65 70 75 80
Tyr Ser Thr Ile Gly Gly Gly Asp Asn Asn Thr Ala Lys Gly Arg Tyr
85 90 95
Ser Thr Ile Gly Gly Gly Gly Tyr Asn Glu Ala Thr Ile Glu Asn Ser
100 105 110
Thr Val Gly Gly Gly Gly Tyr Asn Gln Ala Lys Gly Arg Asn Ser Thr
115 120 125
Val Ala Gly Gly Tyr Asn Asn Glu Ala Thr Gly Thr Asp Ser Thr Ile
130 135 140
Ala Gly Gly Arg Lys Asn Gln Ala Thr Gly Lys Gly Ser Phe Ala Ala
145 150 155 160
Gly Ile Asp Asn Lys Ala Asn Ala Asp Asn Ala Val Ala Leu Gly Asn
165 170 175
Lys Asn Thr Ile Glu Gly Glu Asn Ser Val Ala Ile Gly Ser Asn Asn

ES 2 537 274 T3

180	185	190
Thr Val Lys ₁₉₅ Lys Gly Gln Gln Asn Val Phe Ile Leu Gly ₂₀₅ Ser Asn Thr		
Asp Thr Thr ₂₁₀ Asn Ala Gln Asn ₂₁₅ Gly Ser Val Leu Leu ₂₂₀ Gly His Asn Thr		
Ala Gly Lys Ala Ala Thr ₂₃₀ Ile Val Asn Ser Ala ₂₃₅ Glu Val Gly Gly Leu ₂₄₀		
Ser Leu Thr Gly Phe ₂₄₅ Ala Gly Ala Ser Lys ₂₅₀ Thr Gly Asn Gly Thr ₂₅₅ Val		
Ser Val Gly Lys ₂₆₀ Lys Gly Lys Glu Arg ₂₆₅ Gln Ile Val His Val ₂₇₀ Gly Ala		
Gly Glu Ile ₂₇₅ Ser Asp Thr Ser Thr ₂₈₀ Asp Ala Val Asn Gly ₂₈₅ Ser Gln Leu		
His Val ₂₉₀ Leu Ala Thr Val Val ₂₉₅ Ala Gln Asn Lys Ala ₃₀₀ Asp Ile Lys Asp		
Leu Asp Asp Glu Val Gly ₃₁₀ Leu Leu Gly Glu Glu ₃₁₅ Ile Asn Ser Leu Glu ₃₂₀		
Gly Glu Ile Phe Asn ₃₂₅ Asn Gln Asp Ala Ile ₃₃₀ Ala Lys Asn Gln Ala ₃₃₅ Asp		
Ile Lys Thr Leu ₃₄₀ Glu Ser Asn Val Glu ₃₄₅ Glu Gly Leu Leu Asp ₃₅₀ Leu Ser		
Gly Arg Leu ₃₅₅ Leu Asp Gln Lys Ala ₃₆₀ Asp Ile Asp Asn Asn ₃₆₅ Ile Asn Asn		
Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln ₃₇₅ Gln Asp Gln His Ser ₃₈₀ Ser Asp Ile Lys		
Thr Leu Lys Asn Asn Val ₃₉₀ Glu Glu Gly Leu Leu ₃₉₅ Asp Leu Ser Gly Arg ₄₀₀		
Leu Ile Asp Gln Lys ₄₀₅ Ala Asp Leu Thr Lys ₄₁₀ Asp Ile Lys Ala Leu ₄₁₅ Glu		
Ser Asn Val Glu ₄₂₀ Glu Gly Leu Leu Asp ₄₂₅ Leu Ser Gly Arg Leu ₄₃₀ Ile Asp		
Gln Lys Ala ₄₃₅ Asp Ile Ala Lys Asn Gln Ala Asp		

<210> 6

<211> 510

<212> PRT

<213> fragmento de proteína de Moraxella catarrhalis (UspA2 30-539) o péptido sintético

<400> 6

Gln Ala Lys Asn Asp Ile Thr Leu Glu Asp Leu Pro Tyr Leu Ile Lys
1 5 10 15

Lys Ile Asp Gln Asn Glu Leu Glu Ala Asp Ile Gly Asp Ile Thr Ala
20 25 30

Leu Glu Lys Tyr Leu Ala Leu Ser Gln Tyr Gly Asn Ile Leu Ala Leu
35 40 45

Glu Glu Leu Asn Lys Ala Leu Glu Glu Leu Asp Glu Asp Val Gly Trp
50 55 60

Asn Gln Asn Asp Ile Ala Asn Leu Glu Asp Asp Val Glu Thr Leu Thr
65 70 75 80

Lys Asn Gln Asn Ala Phe Ala Glu Gln Gly Glu Ala Ile Lys Glu Asp
85 90 95

Leu Gln Gly Leu Ala Asp Phe Val Glu Gly Gln Glu Gly Lys Ile Leu
100 105 110

Gln Asn Glu Thr Ser Ile Lys Lys Asn Thr Gln Arg Asn Leu Val Asn
115 120 125

Gly Phe Glu Ile Glu Lys Asn Lys Asp Ala Ile Ala Lys Asn Asn Glu
130 135 140

Ser Ile Glu Asp Leu Tyr Asp Phe Gly His Glu Val Ala Glu Ser Ile
145 150 155 160

Gly Glu Ile His Ala His Asn Glu Ala Gln Asn Glu Thr Leu Lys Gly
165 170 175

Leu Ile Thr Asn Ser Ile Glu Asn Thr Asn Asn Ile Thr Lys Asn Lys
180 185 190

Ala Asp Ile Gln Ala Leu Glu Asn Asn Val Val Glu Glu Leu Phe Asn
195 200 205

Leu Ser Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Ala Asp Ile Asp Asn Asn Ile
210 215 220

ES 2 537 274 T3

Asn Asn Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln Asp Gln His Ser Ser Asp
 225 230 235 240
 Ile Lys Thr Leu Lys Lys Asn Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Leu Ser
 245 250 255
 Asp His Ile Ile Asp Gln Lys Thr Asp Ile Ala Gln Asn Gln Ala Asn
 260 265 270
 Ile Gln Asp Leu Ala Thr Tyr Asn Glu Leu Gln Asp Gln Tyr Ala Gln
 275 280 285
 Lys Gln Thr Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn Lys Ala Ser Ser Glu Asn
 290 295 300
 Thr Gln Asn Ile Glu Asp Leu Ala Ala Tyr Asn Glu Leu Gln Asp Ala
 305 310 315 320
 Tyr Ala Lys Gln Gln Thr Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn Lys Ala Ser
 325 330 335
 Ser Glu Asn Thr Gln Asn Ile Glu Asp Leu Ala Ala Tyr Asn Glu Leu
 340 345 350
 Gln Asp Ala Tyr Ala Lys Gln Gln Ala Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn
 355 360 365
 Lys Ala Ser Ser Glu Asn Thr Gln Asn Ile Ala Lys Asn Gln Ala Asp
 370 375 380
 Ile Ala Asn Asn Ile Thr Asn Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln Asp
 385 390 395 400
 Lys His Arg Ser Asp Ile Lys Thr Leu Ala Lys Thr Ser Ala Ala Asn
 405 410 415
 Thr Asp Arg Ile Ala Lys Asn Lys Ala Asp Asp Asp Ala Ser Phe Glu
 420 425 430
 Thr Leu Thr Lys Asn Gln Asn Thr Leu Ile Glu Lys Asp Lys Glu His
 435 440 445
 Asp Lys Leu Ile Thr Ala Asn Lys Thr Ala Ile Asp Ala Asn Lys Ala
 450 455 460
 Ser Ala Asp Thr Lys Phe Ala Ala Thr Ala Asp Ala Phe Thr Lys Asn
 465 470 475 480
 Gly Asn Ala Ile Thr Lys Asn Ala Lys Ser Ile Thr Asp Leu Gly Thr
 485 490 495
 Lys Val Asp Gly Phe Asp Ser Arg Val Thr Ala Leu Asp Thr
 500 505 510

<210> 7

<211> 322

<212> PRT

<213> fragmento de proteína de *Moraxella catarrhalis* (UspA2 30-351) o péptido sintético

ES 2 537 274 T3

<400> 7

Gln Ala Lys Asn Asp Ile Thr Leu Glu Asp Leu Pro Tyr Leu Ile Lys
1 5 10 15

Lys Ile Asp Gln Asn Glu Leu Glu Ala Asp Ile Gly Asp Ile Thr Ala
20 25 30

Leu Glu Lys Tyr Leu Ala Leu Ser Gln Tyr Gly Asn Ile Leu Ala Leu
35 40 45

Glu Glu Leu Asn Lys Ala Leu Glu Glu Leu Asp Glu Asp Val Gly Trp
50 55 60

Asn Gln Asn Asp Ile Ala Asn Leu Glu Asp Asp Val Glu Thr Leu Thr
65 70 75 80

Lys Asn Gln Asn Ala Phe Ala Glu Gln Gly Glu Ala Ile Lys Glu Asp
85 90 95

Leu Gln Gly Leu Ala Asp Phe Val Glu Gly Gln Glu Gly Lys Ile Leu
100 105 110

Gln Asn Glu Thr Ser Ile Lys Lys Asn Thr Gln Arg Asn Leu Val Asn
115 120 125

Gly Phe Glu Ile Glu Lys Asn Lys Asp Ala Ile Ala Lys Asn Asn Glu
130 135 140

Ser Ile Glu Asp Leu Tyr Asp Phe Gly His Glu Val Ala Glu Ser Ile
145 150 155 160

Gly Glu Ile His Ala His Asn Glu Ala Gln Asn Glu Thr Leu Lys Gly
165 170 175

Leu Ile Thr Asn Ser Ile Glu Asn Thr Asn Asn Ile Thr Lys Asn Lys
180 185 190

Ala Asp Ile Gln Ala Leu Glu Asn Asn Val Val Glu Glu Leu Phe Asn
195 200 205

Leu Ser Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Ala Asp Ile Asp Asn Asn Ile
210 215 220

Asn Asn Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln Asp Gln His Ser Ser Asp
225 230 235 240

Ile Lys Thr Leu Lys Lys Asn Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Leu Ser
245 250 255

Asp His Ile Ile Asp Gln Lys Thr Asp Ile Ala Gln Asn Gln Ala Asn
260 265 270

Ile Gln Asp Leu Ala Thr Tyr Asn Glu Leu Gln Asp Gln Tyr Ala Gln
275 280 285

Lys Gln Thr Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn Lys Ala Ser Ser Glu Asn
290 295 300

Thr Gln Asn Ile Glu Asp Leu Ala Ala Tyr Asn Glu Leu Gln Asp Ala
305 310 315 320

Tyr Ala

<210> 8

< 211> 148

< 212> PRT

< 213> fragmento de proteína de *Moraxella catarrhalis* (UspA2 30-177) o péptido sintético

<400> 8

Gln Ala Lys Asn Asp Ile Thr Leu Glu Asp Leu Pro Tyr Leu Ile Lys
1 5 10 15

Lys Ile Asp Gln Asn Glu Leu Glu Ala Asp Ile Gly Asp Ile Thr Ala
20 25 30

Leu Glu Lys Tyr Leu Ala Leu Ser Gln Tyr Gly Asn Ile Leu Ala Leu
35 40 45

Glu Glu Leu Asn Lys Ala Leu Glu Glu Leu Asp Glu Asp Val Gly Trp
50 55 60

Asn Gln Asn Asp Ile Ala Asn Leu Glu Asp Asp Val Glu Thr Leu Thr
65 70 75 80

Lys Asn Gln Asn Ala Phe Ala Glu Gln Gly Glu Ala Ile Lys Glu Asp
85 90 95

Leu Gln Gly Leu Ala Asp Phe Val Glu Gly Gln Glu Gly Lys Ile Leu
100 105 110

Gln Asn Glu Thr Ser Ile Lys Lys Asn Thr Gln Arg Asn Leu Val Asn
115 120 125

Gly Phe Glu Ile Glu Lys Asn Lys Asp Ala Ile Ala Lys Asn Asn Glu
130 135 140

Ser Ile Glu Asp
145

<210> 9

< 211> 340

ES 2 537 274 T3

< 212> PRT

< 213> fragmento de proteína de Moraxella catarrhalis (UspA2 200-539) o péptido sintético

<400> 9

```

Asn Glu Thr Leu Lys Gly Leu Ile Thr Asn Ser Ile Glu Asn Thr Asn
 1          5          10          15

Asn Ile Thr Lys Asn Lys Ala Asp Ile Gln Ala Leu Glu Asn Asn Val
          20          25          30

Val Glu Glu Leu Phe Asn Leu Ser Gly Arg Leu Ile Asp Gln Lys Ala
          35          40          45

Asp Ile Asp Asn Asn Ile Asn Asn Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln
 50          55          60

Asp Gln His Ser Ser Asp Ile Lys Thr Leu Lys Lys Asn Val Glu Glu
 65          70          75          80

Gly Leu Leu Glu Leu Ser Asp His Ile Ile Asp Gln Lys Thr Asp Ile
          85          90          95

Ala Gln Asn Gln Ala Asn Ile Gln Asp Leu Ala Thr Tyr Asn Glu Leu
          100          105          110

Gln Asp Gln Tyr Ala Gln Lys Gln Thr Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn
          115          120          125

Lys Ala Ser Ser Glu Asn Thr Gln Asn Ile Glu Asp Leu Ala Ala Tyr
          130          135          140

Asn Glu Leu Gln Asp Ala Tyr Ala Lys Gln Gln Thr Glu Ala Ile Asp

```

ES 2 537 274 T3

145		150		155		160
Ala Leu Asn Lys	Ala 165	Ser Ser Glu Asn Thr	Gln Asn Ile Glu	Asp 175	Leu	
Ala Ala Tyr Asn	Glu 180	Leu Gln Asp Ala	Tyr Ala Lys Gln	Gln 190	Ala Glu	
Ala Ile Asp	Ala 195	Leu Asn Lys	Ala 200	Ser Ser Glu Asn Thr	Gln Asn Ile	
Ala Lys Asn Gln	Ala Asp	Ile 215	Ala Asn Asn Ile	Thr 220	Asn Ile Tyr Glu	
Leu 225	Ala Gln Gln Gln	Asp 230	Lys His Arg Ser	Asp 235	Ile Lys Thr Leu	Ala 240
Lys Thr Ser Ala	Ala 245	Asn Thr Asp Arg	Ile 250	Ala Lys Asn Lys	Ala 255	Asp
Asp Asp Ala Ser	Phe 260	Glu Thr Leu Thr	Lys 265	Asn Gln Asn Thr	Leu Ile	
Glu Lys Asp	Lys 275	Glu His Asp	Lys 280	Leu Ile Thr Ala	Asn Lys Thr Ala	
Ile Asp Ala Asn	Lys Ala	Ser 295	Ala Asp Thr Lys	Phe 300	Ala Ala Thr Ala	
Asp 305	Ala Phe Thr Lys	Asn 310	Gly Asn Ala Ile	Thr 315	Lys Asn Ala Lys Ser	320
Ile Thr Asp Leu	Gly 325	Thr Lys Val Asp	Gly 330	Phe Asp Ser Arg Val	Thr 335	
Ala Leu Asp Thr	340					

<210> 10

<211> 157

<212> PRT

<213> fragmento de proteína de Moraxella catarrhalis (UspA2 302-458) o péptido sintético

<400> 10

Ile Gln Asp Leu	Ala Thr Tyr Asn Glu	Leu Gln Asp Gln Tyr	Ala Gln
1	5	10	15

ES 2 537 274 T3

Lys Gln Thr Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn Lys Ala Ser Ser Glu Asn
 20 25 30
 Thr Gln Asn Ile Glu Asp Leu Ala Ala Tyr Asn Glu Leu Gln Asp Ala
 35 40 45
 Tyr Ala Lys Gln Gln Thr Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn Lys Ala Ser
 50 55 60
 Ser Glu Asn Thr Gln Asn Ile Glu Asp Leu Ala Ala Tyr Asn Glu Leu
 65 70 75 80
 Gln Asp Ala Tyr Ala Lys Gln Gln Ala Glu Ala Ile Asp Ala Leu Asn
 85 90 95
 Lys Ala Ser Ser Glu Asn Thr Gln Asn Ile Ala Lys Asn Gln Ala Asp
 100 105 110
 Ile Ala Asn Asn Ile Thr Asn Ile Tyr Glu Leu Ala Gln Gln Gln Asp
 115 120 125
 Lys His Arg Ser Asp Ile Lys Thr Leu Ala Lys Thr Ser Ala Ala Asn
 130 135 140
 Thr Asp Arg Ile Ala Lys Asn Lys Ala Asp Asp Asp Ala
 145 150 155

REIVINDICACIONES

1. Péptido que consiste en el ID de Secuencia nº 2.
2. Péptido que consiste en el ID de Secuencia nº 3.
- 5 3. Un ligando que comprende un dominio de unión a fibronectina, consistiendo dicho ligando en una secuencia de aminoácidos seleccionada a partir del grupo que consiste en ID de Secuencia nº 2 o ID de Secuencia nº 3.
4. Una proteína de fusión que comprende uno o varios ligandos según la reivindicación 3.
5. Un medicamento que comprende uno o varios ligandos o proteínas de fusión según la reivindicación 3 o 4 y uno o varios adyuvantes, vehículos, excipientes, aglutinantes, soportes o conservantes farmacéuticamente aceptables.
- 10 6. Una vacuna que comprende uno o varios ligandos o proteínas de fusión según la reivindicación 3 o 4 y uno o varios adyuvantes, vehículos, excipientes, aglutinantes, soportes o conservantes farmacéuticamente aceptables.
7. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un péptido, un ligando o una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, así como polimorfismos y variantes por corte y empalme de los mismos que
- 15 tienen actividad de unión a fibronectina.

Figura 1

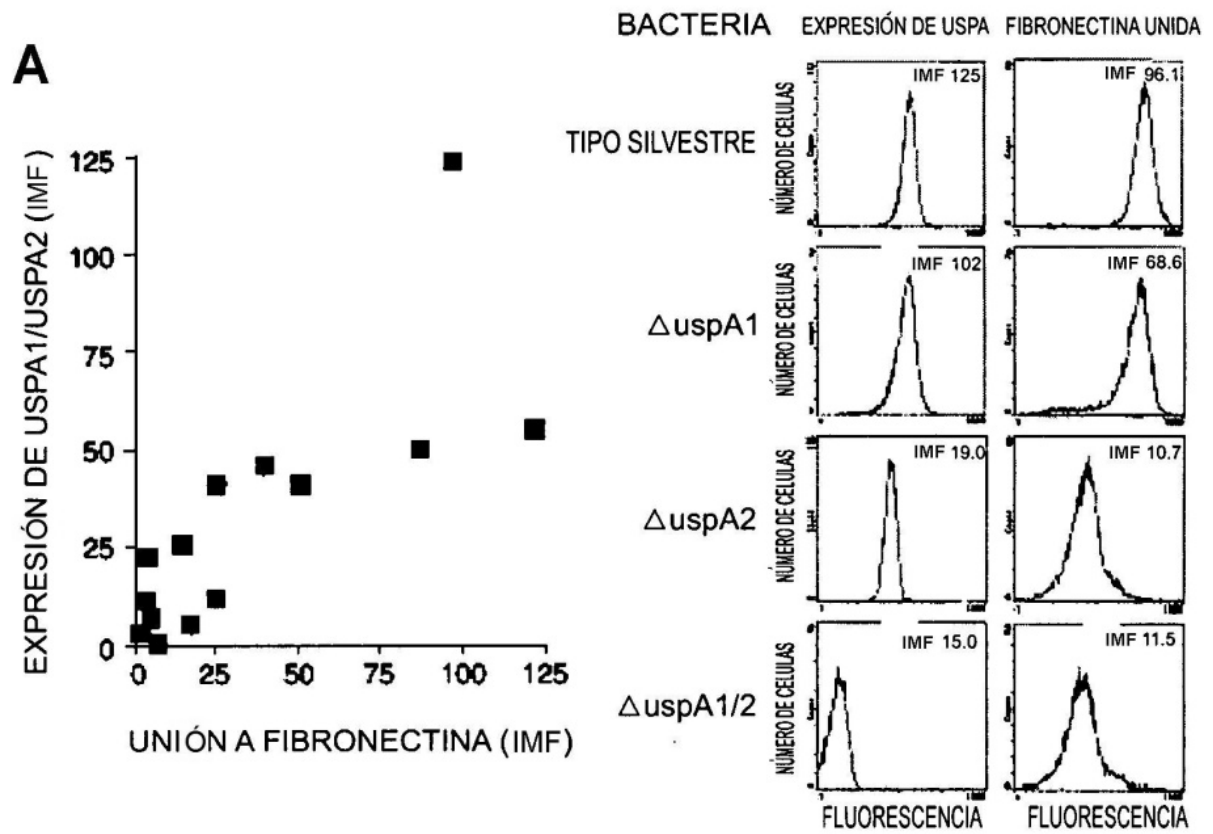


Figura 2

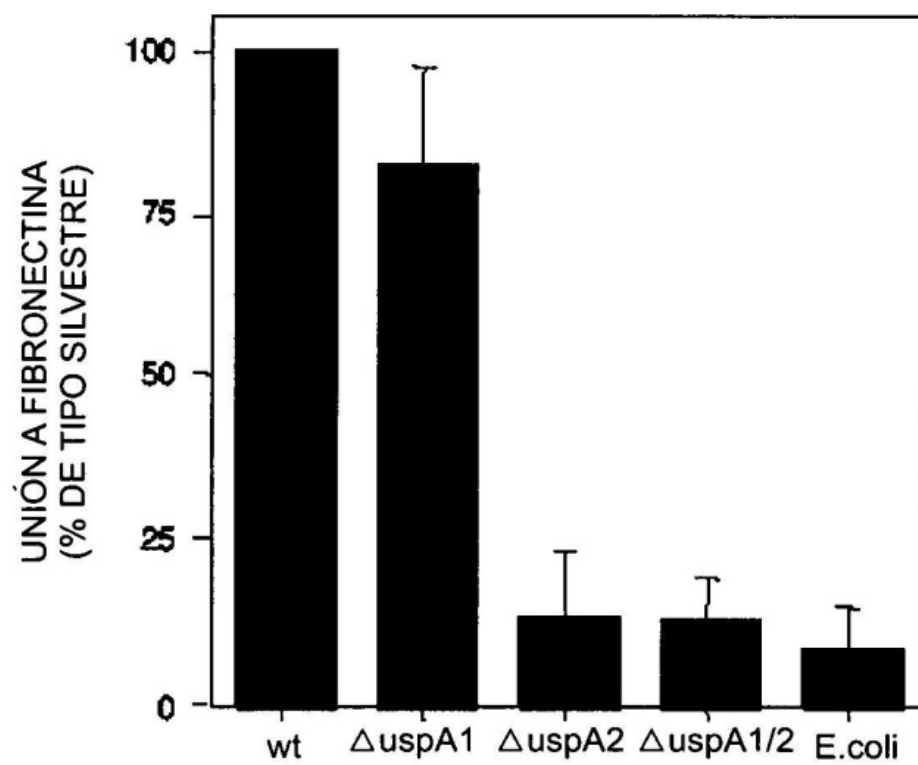
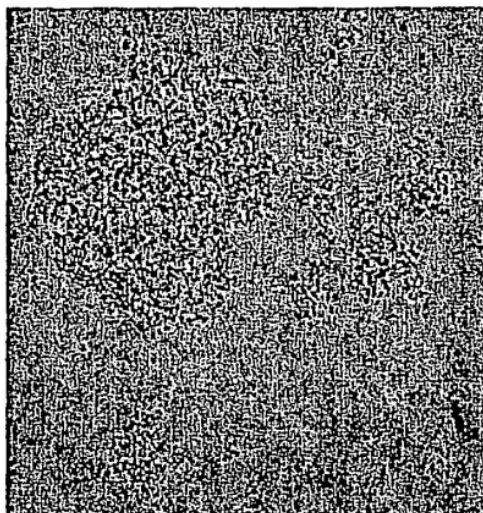
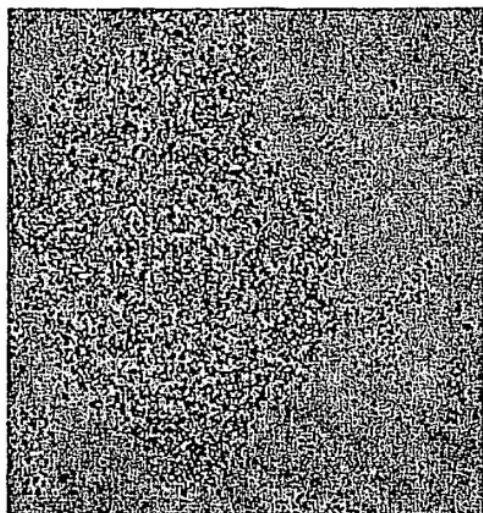
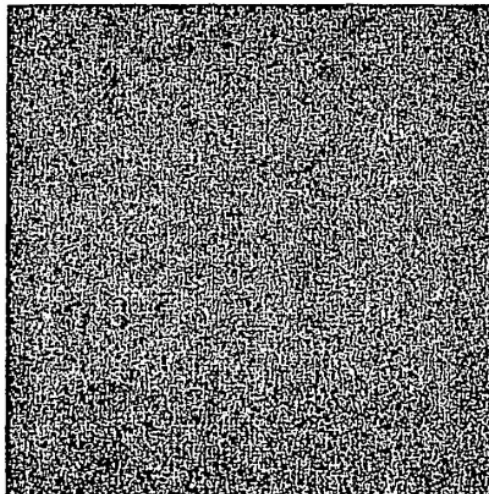


Figura 3

A. *M. catarrhalis* de tipo silvestre B. $\Delta uspA1$ mutante



C. $\Delta uspA2$ mutante



D. $\Delta uspA1/A2$ mutante doble

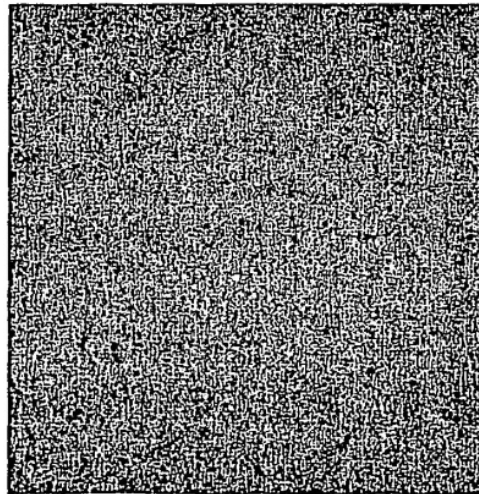


Figura 4

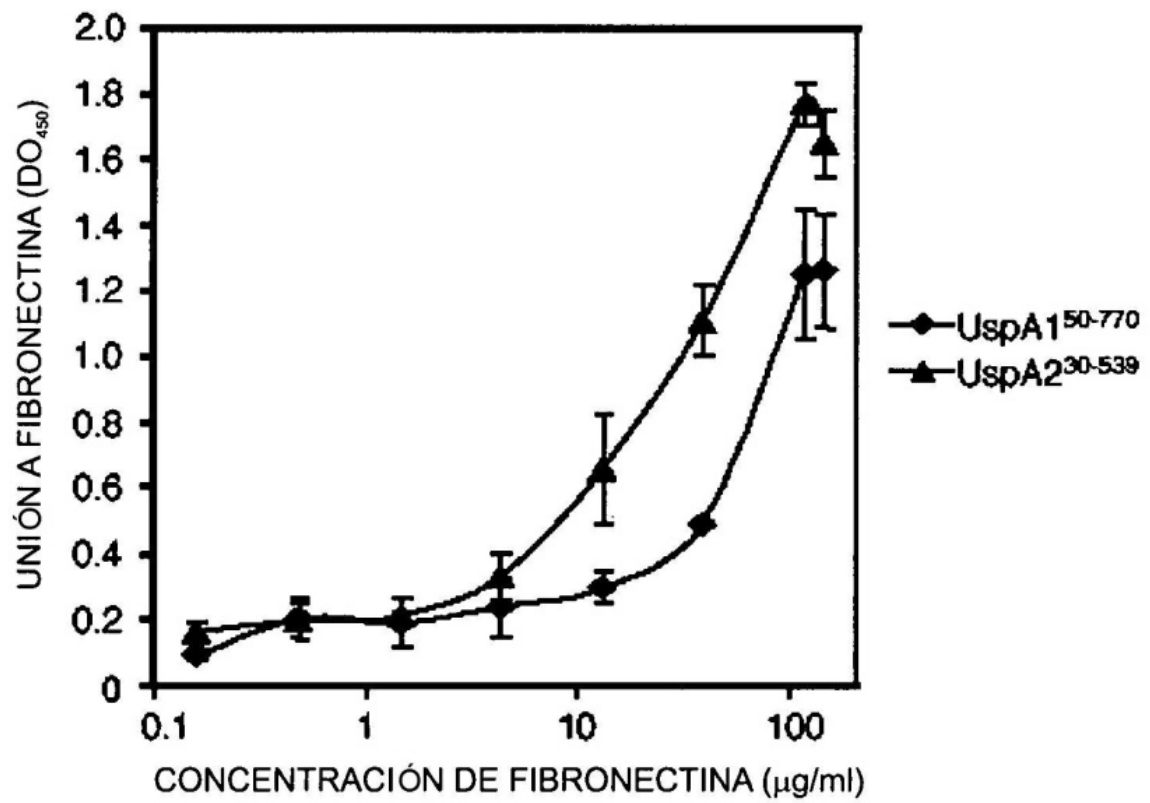


Figura 5

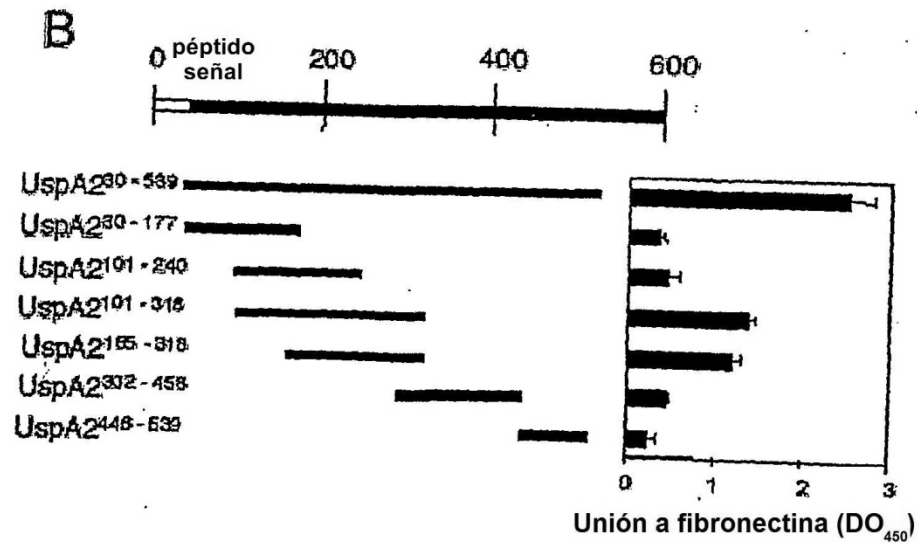
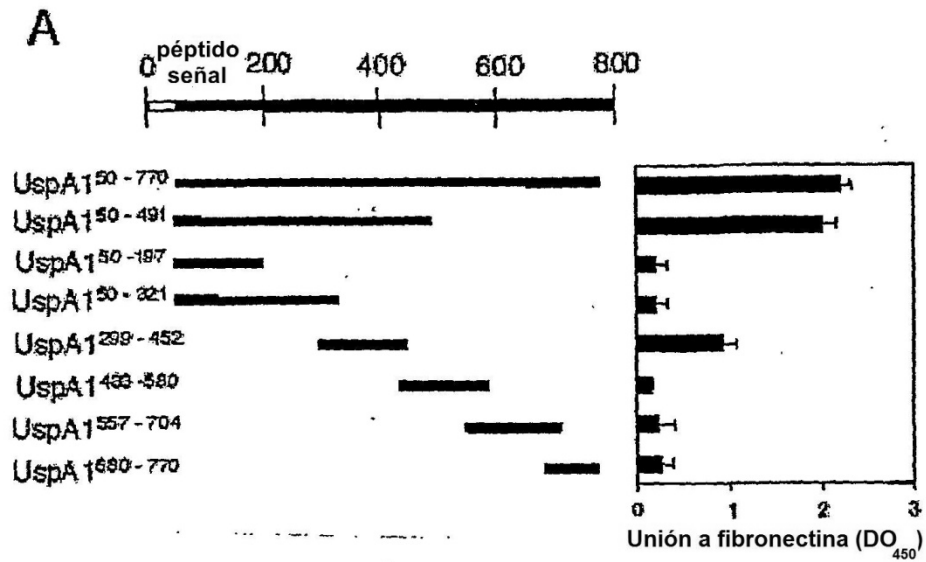


Figura 6

UspA1 299-452	TCNGTIVSVGKKGKERQIVHVGAGEISDTST
UspA2 165-318	- - KDAIAKNNESIED - LYDFGH - EVAES - -
UspA1 299-452	DAYNGSQLHVLATVVAQNKADIKDLDDDEVG
UspA2 165-318	- - - IG - EIAHVN - - EAQNET - - - - LK - - - G
UspA1 299-452	LLGEEINSLEGEIFNNQDAIAKNQADIKTL
UspA2 165-318	LI - - - TNSIE - - NTNN - - - ITKNKADIQAL
UspA1 299-452	ESNVEEGLLDLSGRLLIDQKADIDNNINNIY
UspA2 165-318	ENNVVEELFNLSGRLIDQKADIDNNINNIY
UspA1 299-452	ELAQQQDQHS SDIKTLKNNVEEGLLDLSGR
UspA2 165-318	ELAQQQDQHS SDIKTLKKNVEEGLLELS DH
UspA1 299-452	LIDQ - - - - -
UspA2 165-318	IIDQKTDIAQNQANIQDLATYNELQDQY AQ
UspA1 299-452	-
UspA2 165-318	K

Figura 7

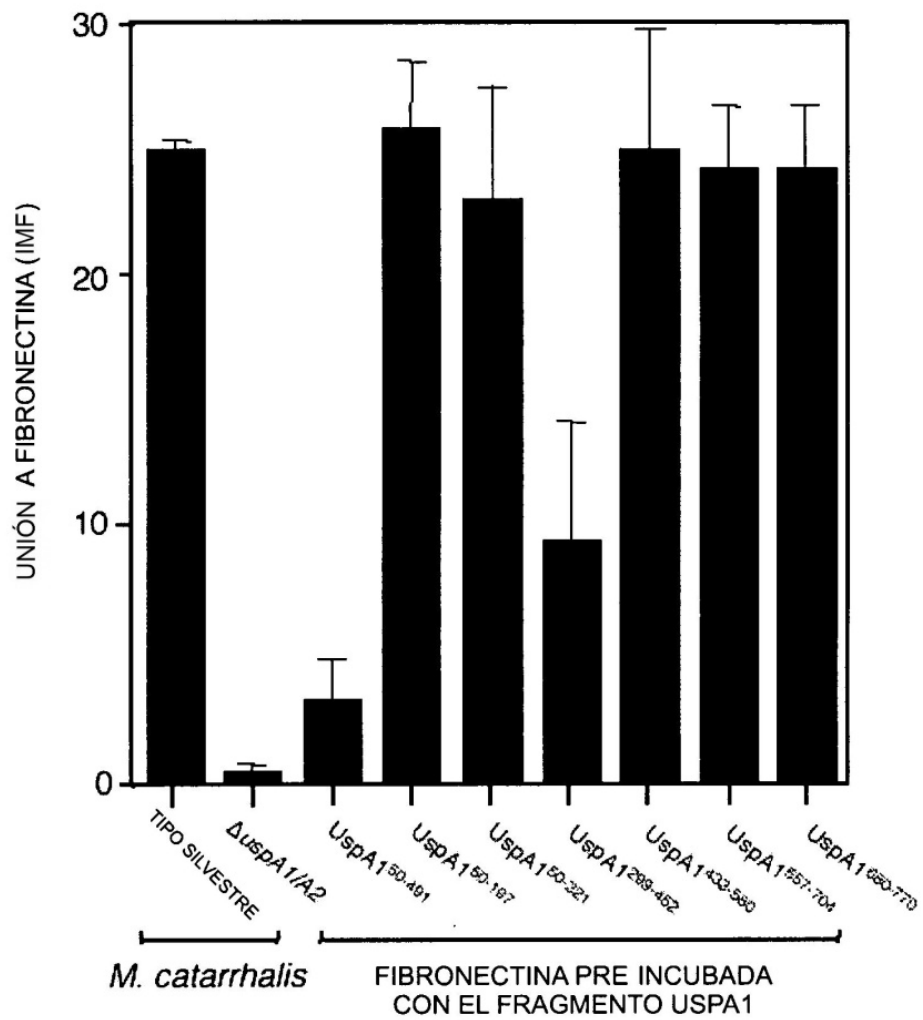
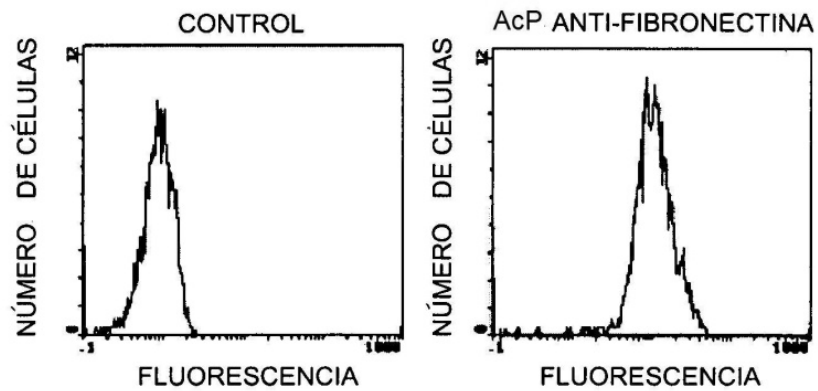
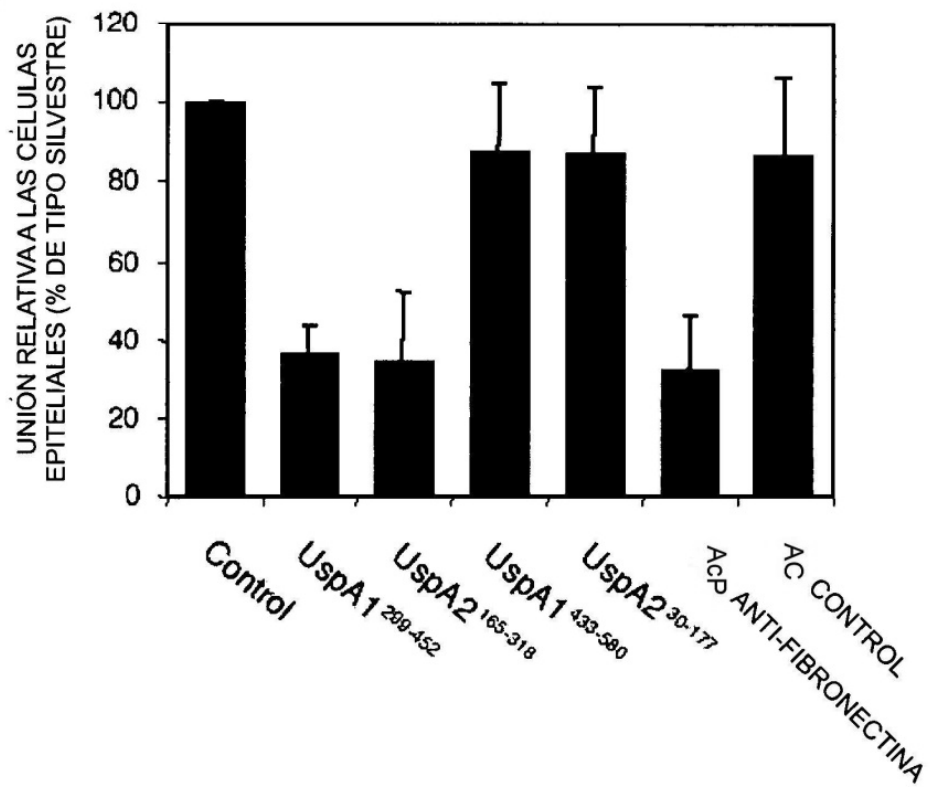


Figura 8

A



B



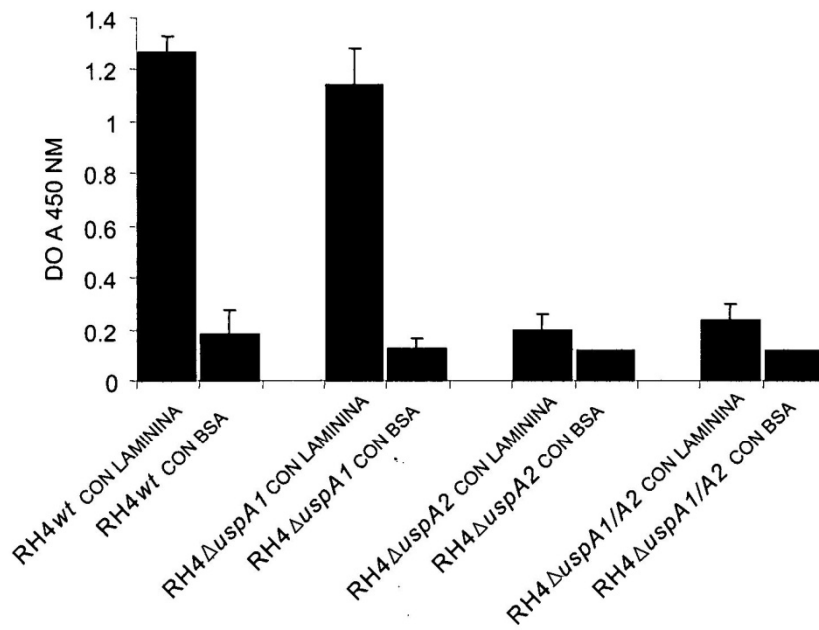


Figura 9A

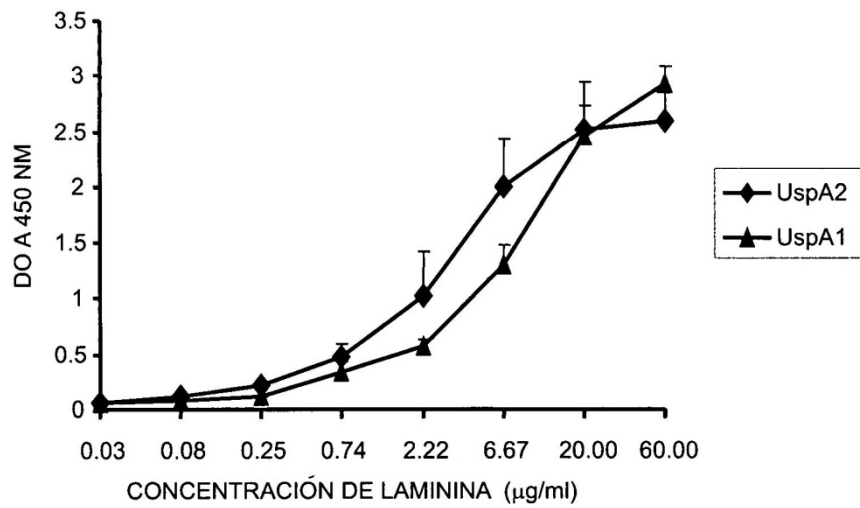


Figura 9B

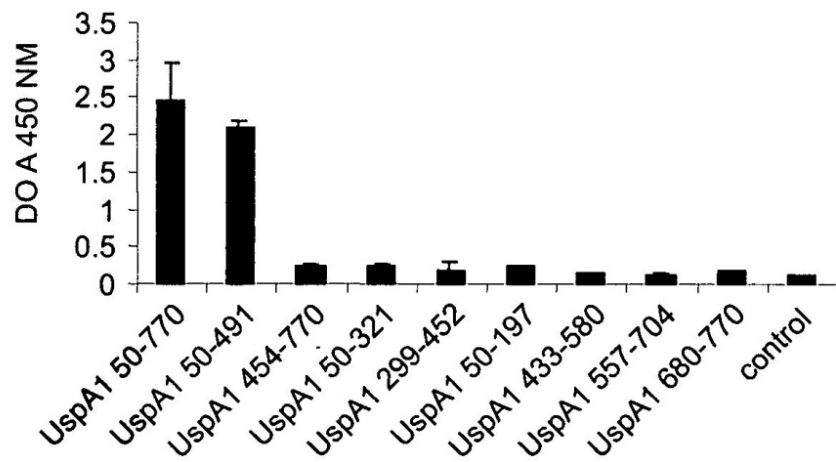


Figura 10A

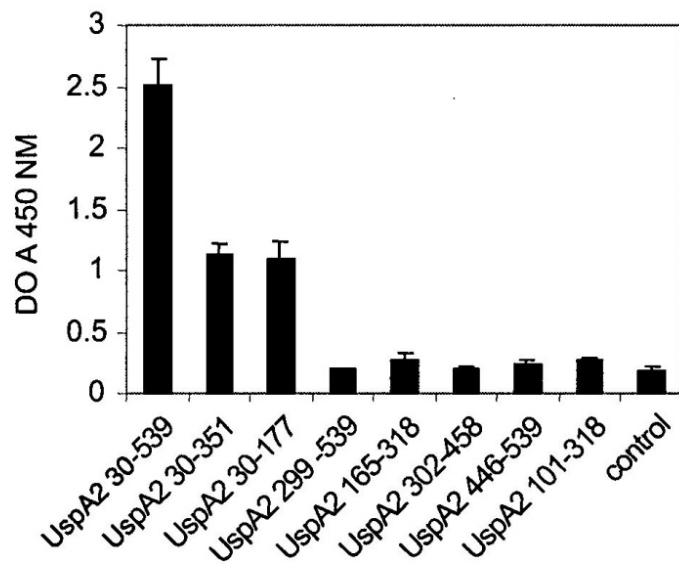


Figura 10B

Figura 11

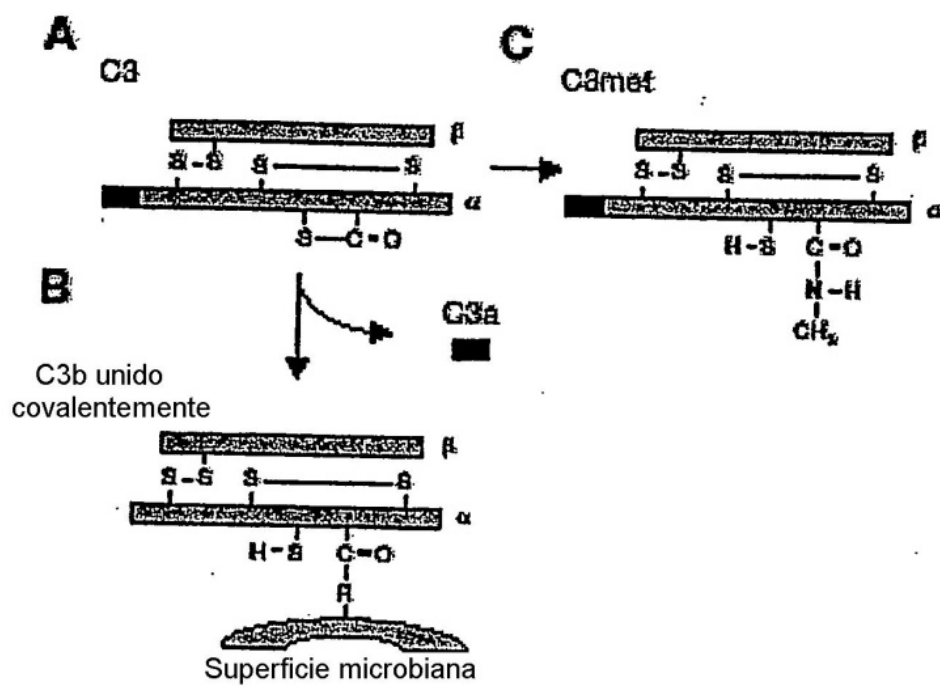
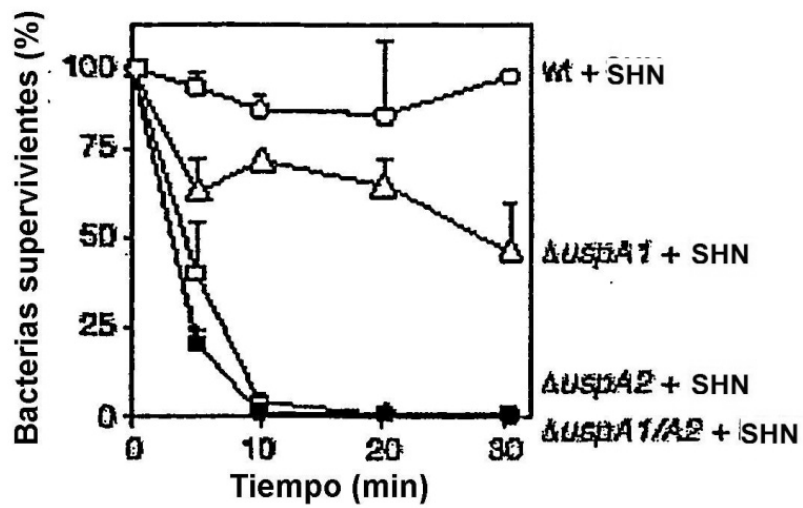


Figura 12

A



B

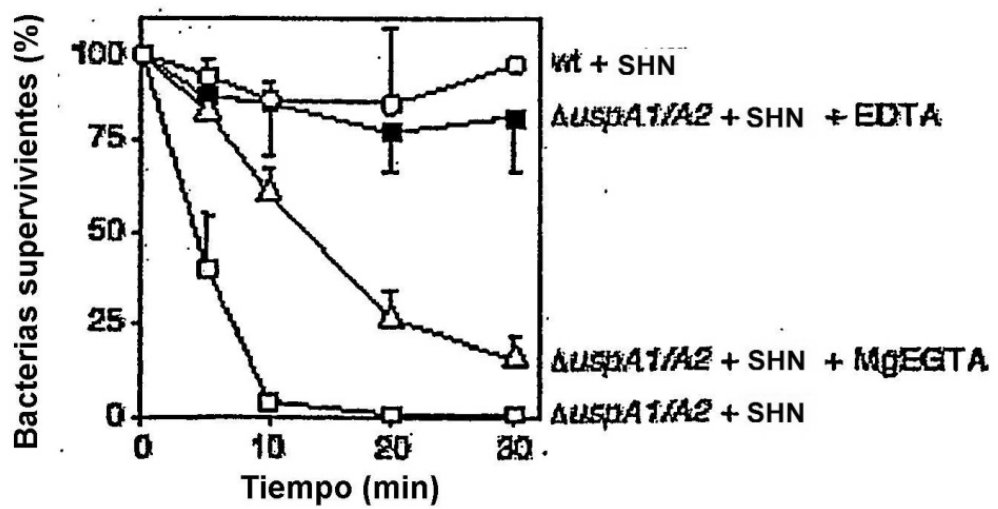


Figura 13

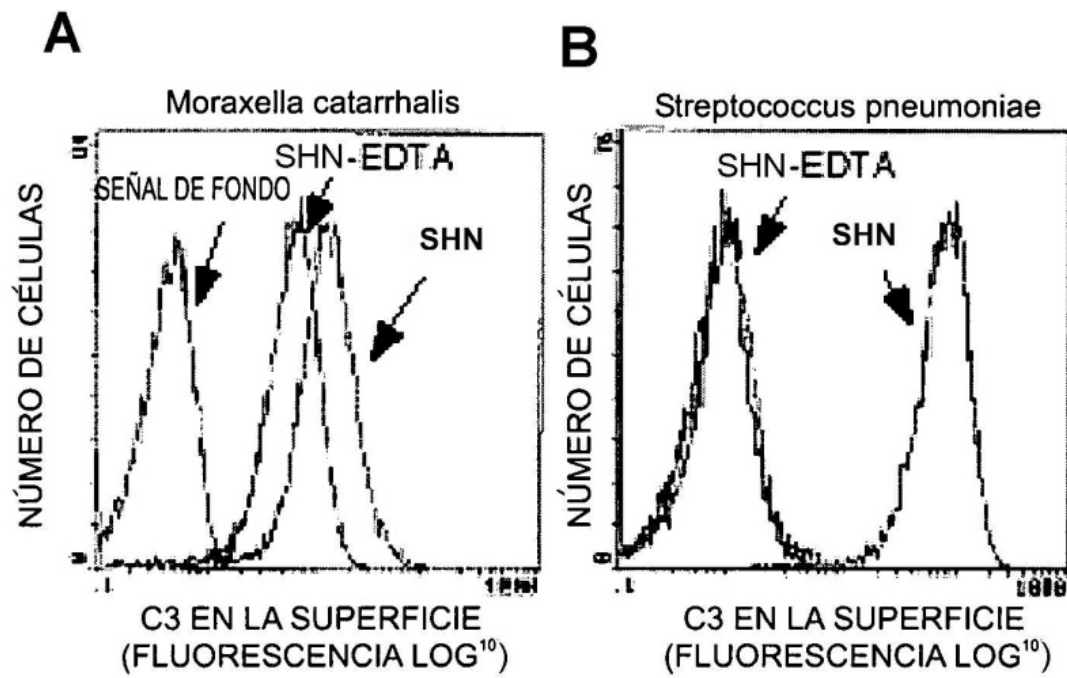


Figura 14

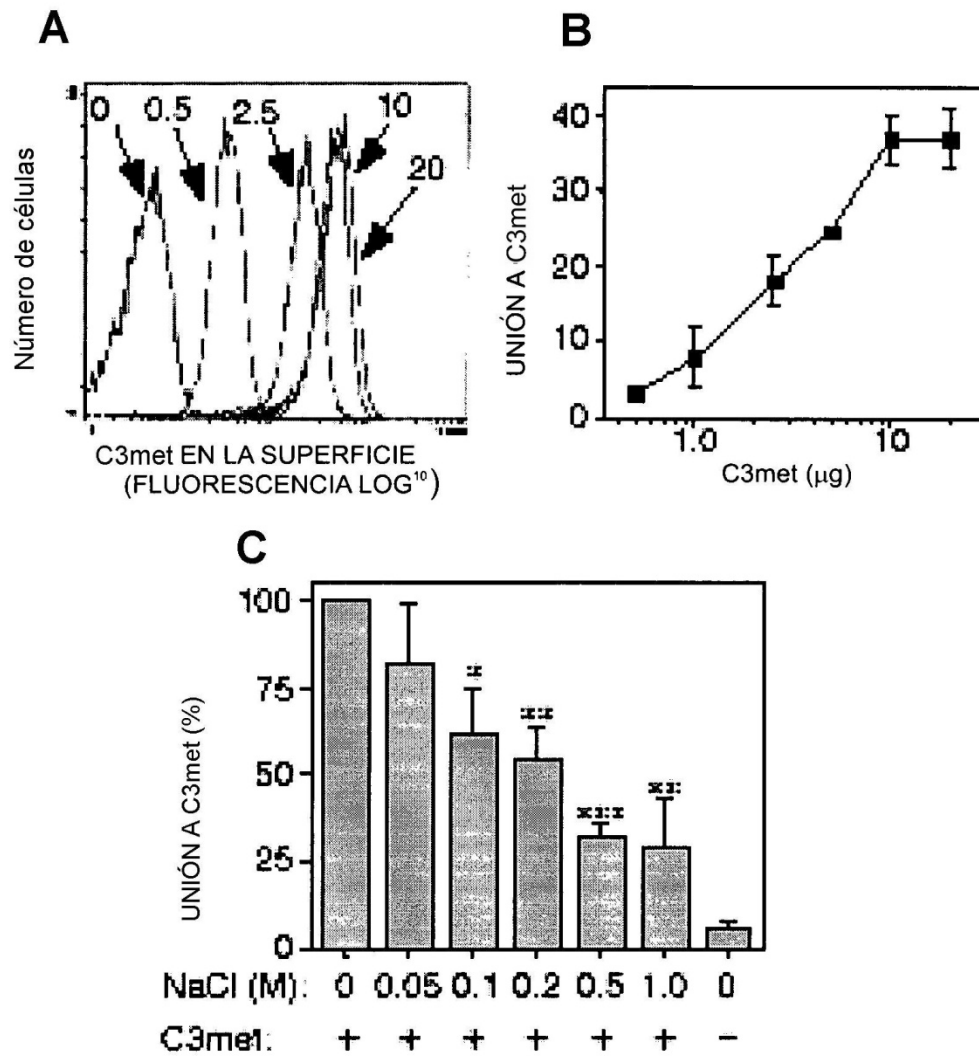


Figura 15

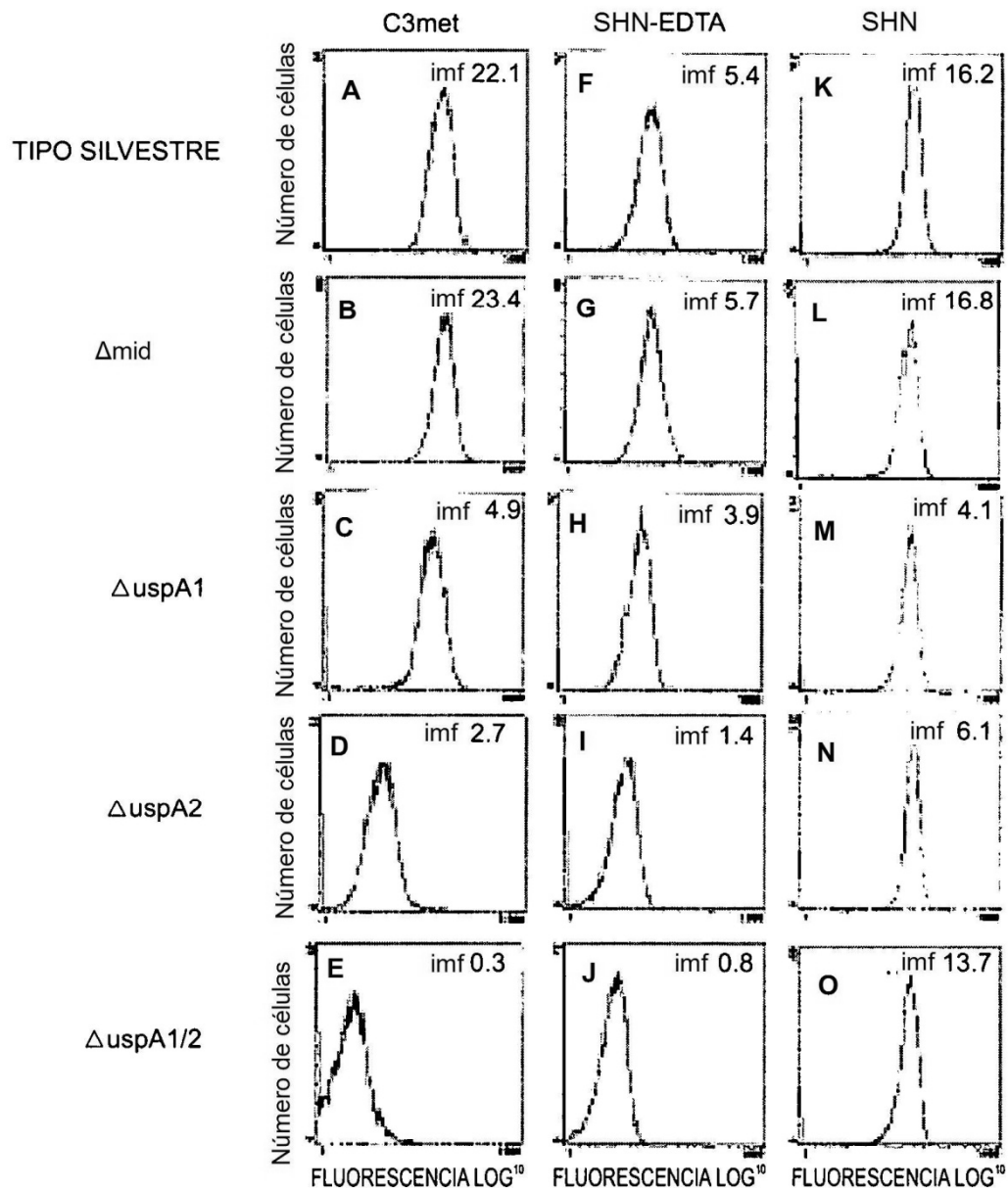


Figura 16

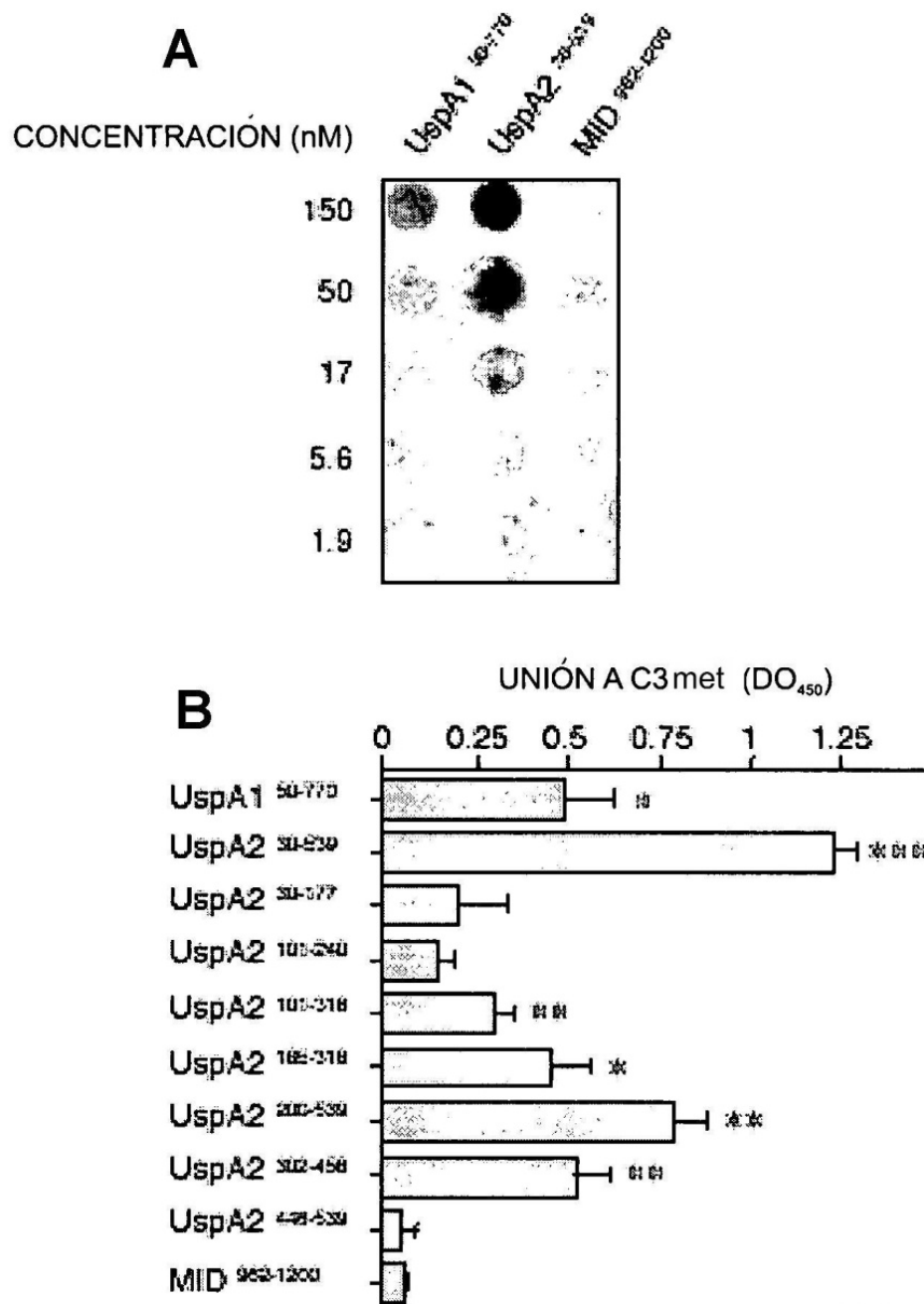


Figura 17

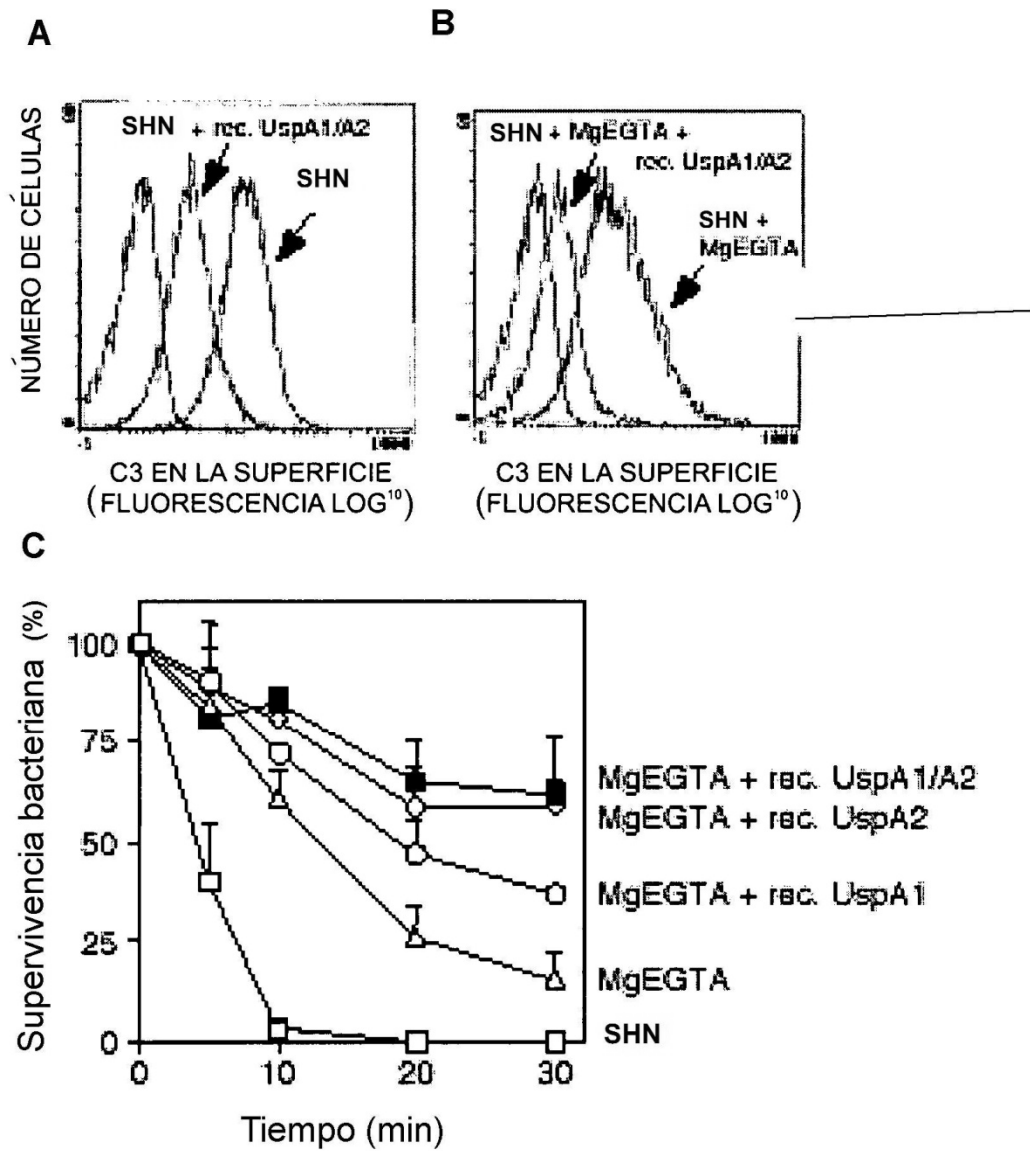


Figura 18

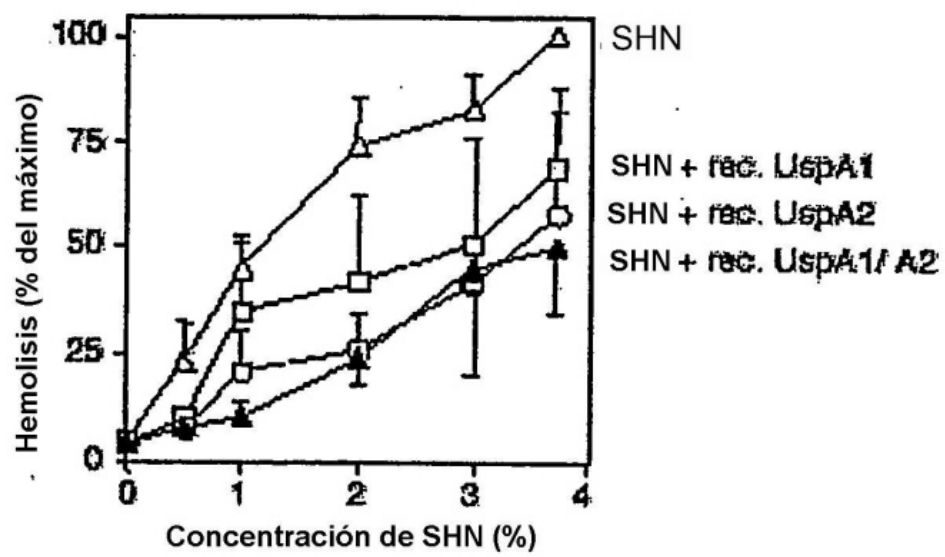


Fig. 19

Pileup - inicio y final del dominio de unión a fibronectina marcado con { y }

```

      *           20           *           40           *
USPA1_O12E : MNKIYKVKKNAAGHLVACSEFAKGHTKKAVLGSLLIVGILGMATTASAQ- : 49
USPA1_P44  : MNKIYKVKKNAAGHLVACSEFAKGHTKKAVLGSLLIVGILGMATTASAQ- : 49
USPA1_ATCC : MNKIYKVKKNAAGHLVACSEFAKGHTKKAVLGSLLIVGILGMATTASAQ- : 49
USPA1_O46E : MNKIYKVKKNAAGHLVACSEFAKGHTKKAVLGSLLIVGILGMATTASAQ- : 49
USPA1_TTA3 : MNKIYKVKKNAAGHLVACSEFAKGHTKKAVLGSLLIVGILGMATTASAAQ : 50
USPA1_O35E : MNKIYKVKKNAAGHLVACSEFAKGHTKKAVLGSLLIVGILGMATTASAQ- : 49
USPA1_TTA2 : MNKIYKVKKNAAGHLVACSEFAKGHTKKAVLGSLLIVGILGMATTASAQ- : 49
USPA1_V117 : MNKIYKVKKNAAGHLVACSEFAKGHTKKAVLGSLLIVGILGMATTASAQ- : 49

      60           *           80           *           100
USPA1_O12E : ----KAANTTNQASGRHT-----YVGGGDNNQATCMYSLFGGFFNQ : 87
USPA1_P44  : ----AIN-----TGQGT-----VVDQ-NGEAIENASTASGGDENQ : 80
USPA1_ATCC : ----KVGKATNKISGGDNNTANGTYLTIGGGDYNKTKGRSTLGGGLFNE : 95
USPA1_O46E : --ATKGTGKHVVDN--KDNKAKGDYSTASGGKDNKAKGNASTVGGGDYNE : 95
USPA1_TTA3 : TIARQKGKMHSIIGGGNDNEANGDYSTVSGGDYNEAKODSETEGGCGYNE : 100
USPA1_O35E : ----ATNS-----KGTGAHFGVNNNNE : 67
USPA1_TTA2 : ----MATTPSAQVVKTN-----KKNGTFFPLGGGDYNT : 79
USPA1_V117 : ----QNNQ-----KSGKVPFLGGGGENN : 68

      *           120           *           140           *
USPA1_O12E : ATGNHLTLGGGSANQAKGNYSSTLGGGDGNETTGTHSTLGGGDS----- : 130
USPA1_P44  : AKGNYS--ASGGSGNTAEGNYSSTASGGLGNTAEGNYSSTASGGLG----- : 123
USPA1_ATCC : ATNYSSTLGGGYNKAAGRYSTLGGGYNBATNOYSTLGGGDN----- : 138
USPA1_O46E : AKGNYS--VGGSSNTAKGEKSTLGGGDTNDANGTYSTLGGG----- : 136
USPA1_TTA3 : AKGDSSTLGGGFYNEAKGESSTLGGGDNNSATCMYSTLGGGDNNSATGRY : 150
USPA1_O35E : APGDYFPLGGGYNKAAGRYSATLGGGLFNKATNEYSTLGGGYY----- : 110
USPA1_TTA2 : TKGNYPPLGGGHNTAEGNYSSTVGGGFTNEAICKNSTVGGGFT----- : 122
USPA1_V117 : VDCKYPLGGGLENIANKRYPTLGGGAHNKANTYSTLGGGSY----- : 111

      160           *           180           *           200
USPA1_O12E : -----NKAEETHSTLGGGYDNTAKGTHSTIVGGRKNRAEGNYSSTVAG : 172
USPA1_P44  : -----NTAKKYSTVAGGANNQAKGDYSTASGGSGNTAEGNYSSTVAG : 165
USPA1_ATCC : -----NTAKGRYSTLGGGYNEATIENTSTVGGGYNQAKGRNSTVAG : 180
USPA1_O46E : -----YYSRAIGDSSTLGGGYNOATPEKSTVAGGRNNOATGNNSTVAG : 180
USPA1_TTA3 : STIAGGWLNOATGHSSTVAGGWLNOATNENSTVGGGRFNOATGRNSTVAG : 200
USPA1_O35E : -----NKAEGRYSTLGGGSNNEATNEYSTIVGGDNKATGRYSTIGG : 152
USPA1_TTA2 : -----NEAMGEYSTVAGGANNQAKGNYSSTVGGGNGKATGNNSTVAG : 164
USPA1_V117 : -----NEANGEKSTLGGGDNTAKGNHSTVVGGYKNEATCKYSTVAG : 153

      *           220           *           240           *
USPA1_O12E : EDNNQAEENNSTVVGGSKNQATGAGSFAAGVNNQAKTENAVAGGNKNTIG : 222
USPA1_P44  : GKENQAEGLNSTVAGGSDNOATGIGSFAAGVGNKANAENAVAGGNKNTIE : 215
USPA1_ATCC : GYNQAEETDSTIAGGRKNQATGKGSFAAGIDNEANADNAVALGNKNTIE : 230
USPA1_O46E : GSYNQAEENNSTVAGGSHNOATGEGSFAAGVENANANNAVALGNKNTID : 230
USPA1_TTA3 : GYKNKATGVVDSTIAGGRNNOANGIGSFAAGIDNOANANNITVALGNKNTIK : 250
USPA1_O35E : GDNNTAESEYSTVAGGKNNQATGIGSFAAGVENQANAENAVAVGKKNNTIE : 202
USPA1_TTA2 : GSNQAKGEHSTIAGGKNNQATGNGSFAAGVENADANNAVALGNKNTIE : 214
USPA1_V117 : GNSNKAEETDSTIAGGKNNQAKGESFAAGVENANANAENAVAVGKKNNTIE : 203

```

```

                260          *          280          *          300
USPA1_O12E : G T N S V A I G S N N T V E D G K Q D V F I L G S N -- T T N A G S G S V L L G N N T G S G K E A T A : 270
USPA1_P44 : G E N S V A I G S N N T V E T G K E N V F I L G S G -- T T G V T S N S V L L G N K T G K E A T A : 263
USPA1_ATCC : G E N S V A I G S N N T V K K G Q Q N V F I L G S N T D T T N A G S G S V L L G H N T G K K A T I : 280
USPA1_O46E : G D N S V A I G S N N T I D S G K Q N V F I L G S S T N T T N A G S G S V L L G H N T G K K A T A : 280
USPA1_TTA3 : G K D S V A I G S N N T V E T G K E N V F I L G S -- N T K D A H S N S V L L G N E T T G K K A T T : 298
USPA1_O35E : G E N S V A I G S E N T V K T E H K N V F I L G S -- G T T G V T S N S V L L G N E T T G K Q A T T : 250
USPA1_TTA2 : G T N S V A I G S N N T V K T C K E N V F I L G S N T N T E N A G S G S V L L G N N T G K K A T T : 264
USPA1_V117 : G K D S V A I G S E N T V E N N K Q N V F I L G S -- K T S G A G S N S V L L G N E T T G K K A T T : 251

```

```

                *          320          *          340          *
USPA1_O12E : V S S A T V S R I K L E S F A G V S Q A N Q A - N S G I V S V G S A E S E R Q I V N V G A G I S A : 319
USPA1_P44 : V N D A T V N G L T L K N F A G V S K T --- G N G I V S V G S E N H E R Q I V N V G A G K I S A : 309
USPA1_ATCC : V N S A E V E G I S L E S F A G A S K T --- G N G I V S V G K K E K E R Q I V H V G A G E I S D : 326
USPA1_O46E : V S S A K V N G I T L G N F A G A S K T G --- N C I V S V G S E N N E R Q I V N V G A G N I S A : 326
USPA1_TTA3 : V E N A K V G I S L E S F A G A S K A N T --- N N G I V S V G K Q E K E R Q I V N V G A G I S A : 346
USPA1_O35E : V K N A E V E G I S L E S F A G E S K A E N --- G V V S V G S E E G E R Q I V N V G A G I S D : 296
USPA1_TTA2 : V N N A E V N G I T L E N F A G A S K A N A N N - I G I V S V G S E N N E R Q I V N V G A G I S A : 313
USPA1_V117 : V E N A E V E G I S L E S F A G A S K A N A N A N I C H I V S V G S O E K E R Q I V N V G A G I S A : 301

```

```

                360          *          380          *          400
USPA1_O12E : E S T D A V N G S Q L H A L A T V V A V S Q N --- Q D N I L T N R V D I Q E L K : 355
USPA1_P44 : D S T D A V N G S Q L H A L A T V V A K N K --- S D I T K N Q A E T L V N R V N I E E E : 352
USPA1_ATCC : E S T D A V N G S Q L H A L A T V V A Q S --- K A D I K D L D : 355
USPA1_O46E : D S T D A V N G S Q L Y A L A T A V K A D --- A D E N F R A T : 356
USPA1_TTA3 : D S T D A V N G S Q L H A L A T A V --- D A E F R T L T : 372
USPA1_O35E : E S T D A V N G S Q L H A L A T V V D D N Q Y D I V N N R A D I L N N Q D D I K D L Q E V G L D : 346
USPA1_TTA2 : E S T D A V N G S Q L H A L A K A V A K N --- K S D I K G L N K G V E L D : 349
USPA1_V117 : E S T D A V N G S Q L H A L A S T I D E E --- V D L L G : 327

```

```

                *          420          *          440          *
USPA1_O12E : R K Q E N D I K E V V E M Q N A I A E Q A D I --- N K N H I Q D E A K A Q L A G V A V M E E E Q K : 402
USPA1_P44 : R K Q E N D I K E V V E M Q N A I A E Q A D K --- N K N H I Q D E A K A Q L A G V T V M E E E N K : 399
USPA1_ATCC : D E V G --- I L G --- : 362
USPA1_O46E : K T Q N --- T L I E Q G E --- A Q D A L I A Q N Q T : 378
USPA1_TTA3 : Q T Q N --- A L I E Q G E A --- I N Q E L E C H A D Y T N A Q D E K I L K N Q T : 408
USPA1_O35E : N E V G E L S R D I N S L H D V T D N Q D --- D I K E E K R G V K E L D N E V G V S R : 389
USPA1_TTA2 : K E V G V L S R D I N S L H D D V A D N Q D S I A K N K A D I K G E N K E V K E L D K E V G V S R : 399
USPA1_V117 : E E I N S L E G E I F N N Q D A I A K N Q A --- D I A T N K T N I E T N G S K I T N E G T : 370

```

```

                460          *          480          *          500
USPA1_O12E : H V E D L Y E T N E N L D K E S Q L D G A V F N N T Q N I E D L A A Y N E L Q D A Y A K Q Q T E A : 452
USPA1_P44 : H V E D L Y E T N D N L D K E S Q L D G A V F N --- : 424
USPA1_ATCC : --- E E E N S L E G E I F N --- : 374
USPA1_O46E : D I T A N K T I E R N F N R T V V G F E I E K --- : 403
USPA1_TTA3 : D I T A N K T I E Q N F N R T V T G F E I E K --- : 433
USPA1_O35E : D I N S L H D D V A D N Q D D E A K N K A D I K G L N K E V K E L D K E V G --- V L S R D : 432
USPA1_TTA2 : D I G S L H D D V A D N Q D S I A K N K A D I K G L N K E V K E L D K E V G --- V L S R D : 442
USPA1_V117 : L Y A T V T K E V G N N T Q G V A A K A D I T K N K A D I Q D L D D E V G --- V L S Q D : 413

```

```

                *          520          *          540          *
USPA1_O12E : I D A L N K A S S E N T Q N I A K N S N H I T L E S N V E E L L N L S G R L I D Q K A D I D N N : 502
USPA1_P44 : --- N T Q N I A K N S N H I C L E N N V E E L L N L S G R L I D Q K A D I D N N : 464
USPA1_ATCC : --- N Q D A I A K N Q A D I T L E S N V E E G L L D L S G R L I D Q K A D I D N N : 414
USPA1_O46E : --- N K K G I A K N Q A D I Q C L E N N V G E E L L N L S G R L I D Q K A D I D N N : 443
USPA1_TTA3 : --- N K E G I A K N Q A D I Q T L E N D V G K E L L N L S G R L I D Q K A D I D N N : 473

```


USPA1_Q35E : IGS LHDDVATNQADIAKNQAPLEKLENGVEEELL LSGRLDQKADIDNN : 482
USPA1_TTA2 : IGS LHDDVATNQADIAKNQAPLEKLENGVEEELL LSGRLDQKADIDNN : 492
USPA1_V117 : IGS LHDDVATNQADIAKNQAPLEKLENGVEEELL LSGRLDQKADIDNN : 463

	500	*	580	*	600	
USPA1_O12E :	INNIYELAQQQDQHSSDIKTLK	-----	-----	-----	-----	: 525
USPA1_P44 :	INNIYELAQQQDQHSSDIKTLK	-----	-----	-----	-----	: 514
USPA1_ATCC :	INNIYELAQQQDQHSSDIKTLK	-----	-----	-----	-----	: 464
USPA1_O46E :	INNIYELAQQQDQHSSDIKTLK	-----	-----	-----	-----	: 493
USPA1_TTA3 :	INNIYELAQQQDQHSSDIKTLK	-----	-----	-----	-----	: 523
USPA1_O35E :	INNIYELAQQQDQHSSDIKTLK	-----	-----	-----	-----	: 505
USPA1_TTA2 :	INNIYELAQQQDQHSSDIKTLK	-----	-----	-----	-----	: 542
USPA1_V117 :	INNIYELAQQQDQHSSDIKTLK	-----	-----	-----	-----	: 513

* 620 * 640 *

```
USPA1_O12E : --NVEEGLLDLSGRLIDQKADIANKQADIAKNQDIQDLAAYNELQDAYA : 573  
USPA1_P44 : --NNVEEGLLDLSGRLIDQKADIANKQADIAKNQDIQDLAAYNELQDAYA : 564  
USPA1_ATCC : --SNVEEGLLDLSGRLIDQKADIANKQADIAKNQDIQDLAAYNELQDAYA : 514  
USPA1_O46E : --NNVEEGLLDLSGRLIDQKADIANKQADIAKNQDIQDLAAYNELQDOYA : 543  
USPA1_TTA3 : --NNVEEGLLDLSGRLIDQKADIAK-----NQADIQDLAAYNELQDOYA : 566  
USPA1_O35E : --NVEEGLLDLSGRLIDQKADIANKQADIAKNQDIQDLAAYNELQDOYA : 553  
USPA1_TTA2 : --KNVVEEGLLDLSGRLIDQKADIANKQADIAKNQDIQDLAAYNELQDOYA : 592  
USPA1_V117 : --SNVEEGLLDLSGRLIDQKADIANKQADIAKNQDIQDLAAYNELQDOYA : 563
```

	660	*	680	*	700	
USPA1_O12E :	KQTEAIDALNKASS	NTDRIANAFDGTAKENKDAQAQAQANENKDGTA	:	623		
USPA1_P44 :	KQTEAIDALNKASS	NTDRIANAFDGTAKENKDAQAQAQANENKDGTA	:	614		
USPA1_ATCC :	KQTEAIDALNKASS	NTDRIANAFDGTAKENKDAQAQAQANENKDGTA	:	564		
USPA1_O46E :	KQTEAIDALNKASS	NTDRIANAFDGTAKENKDAQAQAQANENKDGTA	:	593		
USPA1_TTA3 :	KQTEAIDALNKASS	NTDRIANAFDGTAKENKDAQAQAQANENKDGTA	:	616		
USPA1_O35E :	KQTEAIDALNKASS	NTDRIANAFDGTAKENKDAQAQAQANENKDGTA	:	572		
USPA1_TTA2 :	KQTEAIDALNKASS	NTDRIANAFDGTAKENKDAQAQAQANENKDGTA	:	642		
USPA1_V117 :	KQTEAIDALNKASS	NTDRIANAFDGTAKENKDAQAQAQANENKDGTA	:	613		

		*	720	*	740	*										
USPA1_Q12E :	KNOAD	LDI	CHDKK	LVN	IGTH	SMV	RAV	GN	TC	GV	LV	TK	AT	TA	NOADIAN	: 673
USPA1_P44 :	KNOAD	LDI	CHDKK	LVN	IGTH	SMV	RAV	GN	TC	GV	LV	TK	AT	TA	NOADIAN	: 664
USPA1_ATCC :	KNOAD	LDI	CHDKK	LVN	IGTH	SMV	RAV	GN	TC	GV	LV	TK	AT	TA	NOADIAN	: 614
USPA1_Q46E :	KNOAD	LDI	CHDKK	LVN	IGTH	SMV	RAV	GN	TC	GV	LV	TK	AT	TA	NOADIAN	: 643
USPA1_TTA3 :	K	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	NOADIAN	: 624
USPA1_Q35E :	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	N	AT	NOADIAN	: 583
USPA1_TT2 :	KNOAD	LDI	CHDKK	LVN	IGTH	SMV	RAV	GN	TC	GV	LV	TK	AT	TA	NOADIAN	: 692
USPA1_V117 :	KNOAD	LDI	CHDKK	LVN	IGTH	SMV	RAV	GN	TC	GV	LV	TK	AT	TA	NOADIAN	: 663

	760	*	780	*	800	
USPA1_Q12E :	NIKNIYELAQQODQHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN	:	723			
USPA1_P44 :	NIKNIYELAQQODQHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN	:	714			
USPA1_ATCC :	NIKNIYELAQQODQHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN	:	664			
USPA1_Q46E :	NIKNIYELAQQODQHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN	:	693			
USPA1_TTA3 :	NIKNIYELAQQODQHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN	:	674			
USPA1_Q35E :	NIKNIYELAQQODQHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN	:	633			
USPA1_TTA2 :	NIKNIYELAQQODQHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN	:	742			
USPA1_V117 :	NIKNIYELAQQODQHSSDIKTLAKVSAANTDRIAKNKAEDASFETLTKN	:	713			

* 820 * 840 *

USPA1_O12E : QNTLIEQGEALVEQNKAINQOELEGFAAHADVQDKQILQNOADITTNKTAI : 773
 USPA1_P44 : QNTLIEQGEALVEQNKAINQOELEGFAAHADVQDKQILQNOADITTNKTAI : 764
 USPA1_ATCC : QNTLIEQGEALVEQNKAINQOELEGFAAHADVQDKQILQNOADITTNKTAI : 714
 USPA1_O46E : QNTLIEQGEALVEQNKAINQOELEGFAAHADVQDKQILQNOADITTNKTAI : 743
 USPA1_TTA3 : QNTLIEQGEALVEQNKAINQOELEGFAAHADVQDKQILQNOADITTNKTAI : 724
 USPA1_O35E : QNTLIEQGEALVEQNKAINQOELEGFAAHADVQDKQILQNOADITTNKTAI : 683
 USPA1_TTA2 : QNTLIEQGEALVEQNKAINQOELEGFAAHADVQDKQILQNOADITTNKTAI : 792
 USPA1_V117 : QNTLIEQGEALVEQNKAINQOELEGFAAHADVQDKQILQNOADITTNKTAI : 763

860 * 880 * 900
 USPA1_O12E : EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILQNDRLNRINETNNHQDQKID : 823
 USPA1_P44 : EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILQNDRLNRINETNNHQDQKID : 814
 USPA1_ATCC : EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILQNDRLNRINETNNHQDQKID : 764
 USPA1_O46E : EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILQNDRLNRINETNNHQDQKID : 793
 USPA1_TTA3 : EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILQNDRLNRINETNNHQDQKID : 774
 USPA1_O35E : EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILQNDRLNRINETNNHQDQKID : 733
 USPA1_TTA2 : EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILQNDRLNRINETNNHQDQKID : 842
 USPA1_V117 : EQNINRTVANGFEIEKNKAGIATNKQELILQNDRLNRINETNNHQDQKID : 813

* 920 * 940 *
 USPA1_O12E : QLGYALKEQGQHFNRRISAVERTAGGIANAIATLPSPSRAGEHHVLF : 873
 USPA1_P44 : QLGYALKEQGQHFNRRISAVERTAGGIANAIATLPSPSRAGEHHVLF : 864
 USPA1_ATCC : QLGYALKEQGQHFNRRISAVERTAGGIANAIATLPSPSRAGEHHVLF : 814
 USPA1_O46E : QLGYALKEQGQHFNRRISAVERTAGGIANAIATLPSPSRAGEHHVLF : 843
 USPA1_TTA3 : QLGYALKEQGQHFNRRISAVERTAGGIANAIATLPSPSRAGEHHVLF : 824
 USPA1_O35E : QLGYALKEQGQHFNRRISAVERTAGGIANAIATLPSPSRAGEHHVLF : 783
 USPA1_TTA2 : QLGYALKEQGQHFNRRISAVERTAGGIANAIATLPSPSRAGEHHVLF : 892
 USPA1_V117 : QLGYALKEQGQHFNRRISAVERTAGGIANAIATLPSPSRAGEHHVLF : 863

960 * 980 *
 USPA1_O12E : GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK : 922
 USPA1_P44 : GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK : 913
 USPA1_ATCC : GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK : 863
 USPA1_O46E : GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK : 892
 USPA1_TTA3 : GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK : 873
 USPA1_O35E : GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK : 832
 USPA1_TTA2 : GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK : 941
 USPA1_V117 : GSGYHNGQAAVSLGAAGLSDTGKSTYKIGLSWSDAGGLSGGVGGSYRWK : 912

Fig. 20

Alineación múltiple PileUp de secuencias proteicas de UspA2 de longitud completa

```

                                *      20      *      40      *
q848s1_morca : MNKIYKVKKNAAGHSVACSEFAKGHTKKAVLGSLIIVGALGMATTASAQ-L
: 50
q91961_morca : MNKIYKVKKNAAGHLVACSEFAKGHTKKAVLGSLIIVGALGMATTASAOEL
: 51
q8rtb2_morca : ~~~~~
: -
q91963_morca : ~~~~~
: -
o54407_morca : ~~~~~
: -
q9xd51_morca : ~~~~~
: -
q58xp4_morca : ~~~~~
: -
q8gh86_morca : ~~~~~
: -
q91962_morca : ~~~~~ MNKIYKVKK
: 10
forsgren_uspa2 : ~~~~~
: -
q9xd55_morca : ~~~~~
: -
q848s2_morca : ~~~~~
: -
q9xd53_morca : ~~~~~
: -

                                60      *      80      *      100
q848s1_morca : VSTQFNDYRSTTGNKHTIGSSWSIIGAGHDNIIVVSSASNSGILSGYKNNV
: 101
q91961_morca : VSTNKP-----NQVKEKNSIIGAGRNINNVGSAHSGILSGYKNTV
: 93
q8rtb2_morca : ~~~~~
: -
q91963_morca : ~~~~~
: -
o54407_morca : ~~~~~
: -
q9xd51_morca : ~~~~~
: -
q58xp4_morca : ~~~~~
: -
q8gh86_morca : ~~~~~
: -
q91962_morca : AAGHSVACSEFAKGHTKKAVLGSLIIVGALGMATTASAQFGSTNAANQNTI
: 61
forsgren_uspa2 : ~~~~~
: -
q9xd55_morca : ~~~~~
: -
q848s2_morca : ~~~~~
: -

```

```

q9xd53_morca : ~~~~~
: -

                                *      120      *      140      *
q848s1_morca : NGSTSAIVGGYDNETRGGKYTFVGGGYKNLAEGHQSALIGGGYFNNNAEGDNAT
: 152
q91961_morca : NGSTSAIVGGYDNETGGDYTFVGGGYKNLAEGNYTFVGGGYKNLAEGDNAT
: 144
q8rtb2_morca : ~~~~~
: -
q91963_morca : ~~~~~
: -
o54407_morca : ~~~~~
: -
q9xd51_morca : ~~~~~
: -
q58xp4_morca : ~~~~~
: -
q8gh86_morca : ~~~~~
: -
q91962_morca : SGVGGYVGGGVINQAKGNYPIVGGGFENRAEGNYSVISGGFENQAKGHST
: 112
forsgren_uspa2 : ~~~~~
: -
q9xd55_morca : ~~~~~
: -
q848s2_morca : ~~~~~
: -
q9xd53_morca : ~~~~~
: -

                                160      *      180      *      200
q848s1_morca : IAGGFENFAAGNSALIGGGYFNNNAEGEDATIIAGGFENRAEGNSALIGGGYA
: 203
q91961_morca : IAGGFANLAEGDNATIIAGGFENRAEGHDSMVSGGYENQATGESSIVAGGSN
: 195
q8rtb2_morca : ~~~~~
: -
q91963_morca : ~~~~~
: -
o54407_morca : ~~~~~
: -
q9xd51_morca : ~~~~~
: -
q58xp4_morca : ~~~~~
: -
q8gh86_morca : ~~~~~
: -
q91962_morca : IAGGNSNEALYGENSTIAGGFENNOAMGTNSTVAGGFENNOAKGNSIAGMGN
: 163
forsgren_uspa2 : ~~~~~
: -
q9xd55_morca : ~~~~~
: -
q848s2_morca : ~~~~~
: -
q9xd53_morca : ~~~~~
: -

```

```

      *           220           *           240           *
q848s1_morca : NFAAGDTEFVGGGYNENRAEGNQSAIQGGYANLAEGDNATITAGGRENBAKG
: 254
q91961_morca : NLAEGKSSAIGGGRQNEASGDRSTVSGGYNNLAEGKSSAIGGGRQNEAIGN
: 246
q8rtb2_morca : -----
: -
q91963_morca : -----
: -
o54407_morca : -----
: -
q9xd51_morca : -----
: -
q58xp4_morca : -----
: -
q8gh86_morca : -----
: -
q91962_morca : QANTDNANAECKNNEINGNNSAATGSENTVNECKNVEGHSNTTNADSGS
: 214
forsgren_uspa2 : -----
: -
q9xd55_morca : -----
: -
q848s2_morca : -----
: -
q9xd53_morca : -----
: -

      260           *           280           *           300
q848s1_morca : NSVVSQGYANQARCEESTTAGG-----FENRAEGIDSVVSGGYANQAMPAE
: 300
q91961_morca : NATISGGGRQNEASGDRSTVAG-----FONGAIGKYSTISGGGRQNEASDR
: 292
q8rtb2_morca : --MKTMKLLPLKIAVTSAMITGLGAASTANAQ-----AETFLPNLFDNDY
: 44
q91963_morca : --MKTMKLLPLKIAVTSAMVGLGMASTANAQQOKSPKAEIFLPNLFDNDN
: 49
o54407_morca : --MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGAESTVNAQ-----VVEQFEPNIFENEN
: 44
q9xd51_morca : --MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGAESTVNAQ-----VVEQFEPNIFENEN
: 44
q58xp4_morca : --MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGAASTANAQQOKQKDEMFLPNLFYNDY
: 49
q8gh86_morca : --MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGMASTANAQVSPANOKI-----QOK
: 42
q91962_morca : VILGHEASGLATAVSRARNGLTNLKNESGVSKFENGTVSV-----SSS
: 258
forsgren_uspa2 : --MKTMKLLPLKIAVTSAMITGLGAASTANAQAQN-----DI-----T
: 36
q9xd55_morca : --MKTMKLLPLKIAVTSAMITGLGAASTANAQAQN-----DI-----T
: 36
q848s2_morca : --MKTMKLLPLKIAVTSAMIVGLGMASTANAQAQSRSDOI-----QTK
: 42
q9xd53_morca : --MKTMKLLPLKIAVTSAMITGLGAASTANAQSPRSLEDI-----ODS
: 42

      *           320           *           340           *
q848s1_morca : SEVAGLYNNQATGESSTIEGGANNQAIGTQTAAGVENGAKADNAPALAE

```

```

: 350
q91961_morca : -STWAGGEONDAIFCKYSTVSGGYRNCATGKSSPAAGIUNKANADNAVALEN
: 342
q8rtb2_morca : REETDRLYHGMILGNTA-I--EQD-T--QMKFYAENENEVPDSLIFNKILH
: 89
q91963_morca : REETDRLYHNMILGNTALE--EQE-N--QMKFYADDENGVPDSLIFNKILH
: 95
o54407_morca : HDELD DAYHNMILGDTALVSN SQD- NSTOLKFYSNDEDSVPDSLIFSKLLH
: 94
q9xd51_morca : HDELD DAYHNMILGDTALVSN SQD- NSTOLKFYSNDEDSVPDSLIFSKLLH
: 94
q58xp4_morca : REETDRLYHNMILGDTALVERONYNSOLKFYSNDEESVPDSLIFSKMLN
: 100
q8gh86_morca : IKK-----VRKELRODIEKSLRNDEE-----SNTADIGSLNDDVADN
: 78
q91962_morca : GKE-----RQIVHVGAGQNSI--C-----STDVNGSGLYALATA
: 291
forsgren_uspa2 : LEDLFYLIKKITONFEEADIGDIPATEKYLALSQGNILAEELN-----
: 81
q9xd55_morca : LEDLFYLIKKITONFEEADIGDIPATEKYLALSQGNILAEELN-----
: 81
q848s2_morca : LADLAGKTAAGKNGGGQNNNNQNDINKYLFESQANLITMEELNNNVKN
: 93
q9xd53_morca : ISKLV-----QIDIDTLKQDQQRMNKYLLENQLANTLITDRLNANMLKN
: 86

360          *          380          *          400
q848s1_morca : NNITNG--DNISALIGEN-NTYKKEOKDVFILESN--TESGDSNSPLLSENG
: 396
q91961_morca : KNTIEG--ENSVAILIGEN-NTYKKNQKAVFILESNDTKDSSQSTLISNKE
: 390
q8rtb2_morca : EQQLNGFKAGDTHIFLDENGKPVYKIDERTENGVKIKVYSVTIKATATREDV
: 140
q91963_morca : EQQLNGFKAGDTHIFLDENGKPVYKIDSVVEQGRKKTIVYSVTIKATATADDV
: 146
o54407_morca : EQQLNGFKAGDTHIFLDENGKPVYKIDERTEDGKVEIVYSVTIKATATQDDV
: 145
q9xd51_morca : EQQLNGFKAGDTHIFLDENGKPVYKIDERTEDGKVEIVYSVTIKATATQDDV
: 145
q58xp4_morca : EQQLNGFKAGDTHIFVDANCSVAYOKDERVEEGKIPHTVL SVTHKATATQDDV
: 151
q8gh86_morca : QDDI---ENQADIAKNQD-----DIEKNQADIEKELDEEVSIVLSRE---
: 116
q91962_morca : VD-----ENGYDIEINQD-----NIKDLQKEVKGLQKEVSIVLSRD---
: 326
forsgren_uspa2 : KAL---EEDDEDVGNQON-----DIANLEDDIVETLTKNQNAFAEQGEA
: 121
q9xd55_morca : KAL---EEDDEDVGNQON-----DIANLEDDIVETLTKNQNALAQGEA
: 121
q848s2_morca : SSS---ETLETDEGWNEN-----DVADLEDGVEELTKNONTLAEKDEE
: 134
q9xd53_morca : TNSI---EALGDEIGWNEN-----DIADLEGVEELTKNONTLAEKDEE
: 127

*          420          *          440          *          46
q848s1_morca : TGKKAFAWDEATVGDLE-----SLTGFAGVSKANSSTVWVSSECKERC
: 438
q91961_morca : SGKAFAWDEATVGDLE-----SLTGFAGVSKANSSTVWVSSECKERC
: 432

```

```

q8rtb2_morca : EQSAYSRGIQGDIDDLNFA NKENVNRLIEHGDKIFANEESVQYLNKEVOIN
: 191
q91963_morca : -NSAYSRGIQGDIDDLNFA NKENVNRLIEHGDKIFANEESVQYLNREVOIN
: 196
o54407_morca : EQSAYSRGIQGDIDDLMDINREVNRYLKAHHDYNEFQTEAIDALNKASSAN
: 196
q9xd51_morca : EQSAYSRGIQGDIDDLMDINREVNRYLKAHHDYNEFQTEAIDALNKASSAN
: 196
q58xp4_morca : D-SAYSRGIQCKVNDLDDMNFLNHETSLYDVTANQDDIKGLKKGVKDR
: 201
q8gh86_morca : -----IGSLNDDEIAENYDIEDNYTDHINCAANIAKNQDEIEKN
: 155
q91962_morca : -----IGSLHDDVAE-----NQADIAKN
: 344
forsgren_uspa2 : KKEDL-QGLADIVEGGQFGKHLNMTSHKENHORNLVNGFEIEKNKDAIAKN
: 171
q9xd55_morca : KKEDL-QGLADIVEGGQFGKHLNMTSHKENHORNLVNGFEIEKNKDAIAKN
: 171
q848s2_morca : HRLIAQNGAD-IQLENNVVEELFNL---SDRLIDQKEDIKNDIAIAQ
: 181
q9xd53_morca : HRLIAQNGAD-IQLENNVVEELFNL---SERLIDQKEDIKNDIAIAQ-----N
: 167

0          *          480          *          500          *
q848s1_morca : IVHVGACGISNDSTDAMNGSGLKALAAVVDONQWDIEKNQDDAKKARGV-
: 488
q91961_morca : IVHVGACGISNDSTDAMNGSGLKALAAVVDONQWDIEKNQDDAKKADIA
: 483
q8rtb2_morca : IENI-HEL---AQQDDHSSDIKELKKNVVEGLLELSGH---LIADKEDIA
: 235
q91963_morca : IENI-HEL---AQQDDHSSDIKELKKNVVEGLLELSGH---LIADKEDIA
: 240
o54407_morca : EERI-ETA---EERTDKNEYDIKALENVVEGLLELSGH---LIDQKADET
: 240
q9xd51_morca : EERI-ETA---EERTDKNEYDIKALENVVEGLLELSGH---LIDQKADET
: 240
q58xp4_morca : KKGV-KGL---NKELKELCKEYGVSRSG---SLNDD---VAONNESIE
: 241
q8gh86_morca : QAEI-KEL---DKEVGVSRLIGSLNDEV-----ADNDEDIA
: 188
q91962_morca : KANI-KEL---DKEMNVISRTIVSLNDEV-----ADNDEDIA
: 377
forsgren_uspa2 : NESI-EELYDFDNEVAESIGEIHANEACNETLKGLITN---SIENNNTIT
: 218
q9xd55_morca : NESI-EELYDFDNEVAESIGEIHANEACNETLKGLITN---SIENNNTIT
: 218
q848s2_morca : NESI-EELYDFDNEVAEKIGEIHANTEEVNKTLODLITN---SKNNTBN-S
: 228
q9xd53_morca : NASI-EELYDFDNEVAERIGEIHANTEEVNKTLENLITN---SKNNTBNIS
: 214

520          *          540          *          560
q848s1_morca : -----KELDKEMVLSRDIGALNEDV-----AQNO---SD
: 515
q91961_morca : KNCADIQTLENVIGKELNLNLSGRLLDQKADIDNNINHIYELAQQQDQHSSD
: 534
q8rtb2_morca : QNQLDIQELATYNEH---QDQPAQKQLEAIDALNKASSENTONIAKNSNH
: 282
q91963_morca : QNQLDIQELATYNEH---QDQPAQKQLEAIDALNKASSENTONIAKNSNH

```

```

: 287
o54407_morca : KD-----
: 242
q9xd51_morca : KD-----
: 242
q58xp4_morca : DVEESQEVADSTGE---THANKAONEHCDITNSVENTNNTTKKAD
: 288
q8gh86_morca : KNQADIQTLENNVEEGLLELSGHLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSE
: 239
q91962_morca : KNQADIKTLENNVEEGLLDLSGRLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSE
: 429
forsgren_uspa2 : KKKADIQALENNVEEGLLENLSGRLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSE
: 269
q9xd55_morca : KKKADIQALENNVEEGLLENLSGRLIDQKADIDNNINNIYELAQQQDQHSSE
: 269
q848s2_morca : KN-----KADIDNNINNIYELAQQQDQHSSE
: 254
q9xd53_morca : KN-----KADIDNNINNIYELAQQQDQHSSE
: 240

```

```

*      580      *      600      *
q848s1_morca : IKTLKNNVEEGLLELSGHLIDQKADLTkdIKALENNVEEGLLD-----
: 558
q91961_morca : IKTLKNNVEEGLLELSGHLIDQKADLTkdIKALESNVEEGLLD-----
: 577
q8rtb2_morca : IKTLENNVEEGLLELSGHLIDQKADLTkdIKALESNVEEGLLD-----
: 325
q91963_morca : IKTLENNVEEGLLELSGHLIDQKADLTkdIKALESNVEEGLLD-----
: 330
o54407_morca : IKALESNVEEGLLELSGHLIDQKADLTkdIKALESNVEEGLLD-----
: 285
q9xd51_morca : IKALESNVEEGLLELSGHLIDQKADLTkdIKALESNVEEGLLD-----
: 285
q58xp4_morca : IQALENNVVEEGLLENLSGHLIDQKADLTkdIKALESNVEEGLLD-----
: 331
q8gh86_morca : IKTLKNNVEEGLLELSGHLIDQKADLTkdIAQNQANQDITATYNELDQYAOEQ-
: 290
q91962_morca : IKTLKNNVEEGLLELSGHLIDQKADLTkdIAQNQANQDITATYNELDQYAOEQ-
: 479
forsgren_uspa2 : IKTLKNNVEEGLLELSGHLIDQKADLTkdIAQN-----
: 299
q9xd55_morca : IKTLKNNVEEGLLELSGHLIDQKADLTkdIAQN-----
: 299
q848s2_morca : IKTLKNNVEEGLLELSGHLIDQKADLTkdIKTLE-----
: 288
q9xd53_morca : IKTLKNNVEEGLLELSGHLIDQKADLTkdIKALE-----
: 274

```

```

620      *      640      *      660
q848s1_morca : -----LSGRLIDQKADIakNQAT
: 576
q91961_morca : -----LSGRLIDQK-----AD
: 588
q8rtb2_morca : -----LSGRLIDQKADIakNQAT
: 343
q91963_morca : -----LSGRLIDQK-----AD
: 341
o54407_morca : -----LSGRLIDQKADIakNQAT
: 303

```


q9xd51_morca : -----LSGRLLDQKADIAQNQAN
: 303
q58xp4_morca : -----LSGHLIDQKADIKNQAD
: 349
q8gh86_morca : EAIDALNKASSENTQNI-----AK-NSNRIRALE-----SN
: 320
q91962_morca : EAIDALNKASSENTQNIEDLAAYNELODAYAKQOTEATIDALNKASSENTQNI
: 530
forsgren_uspa2 : -----AN
: 301
q9xd55_morca : -----AN
: 301
q848s2_morca : -----NN
: 290
q9xd53_morca : -----SN
: 276

q848s1_morca : I-----*-----680-----*-----700-----*-----
: 577
q91961_morca : I-----
: 589
q8rtb2_morca : I-----AQNQTETIDLAAYNELODAYAK
: 366
q91963_morca : I-----AENQANIQDLAAYNELODAYAK
: 364
o54407_morca : I-----
: 304
q9xd51_morca : IEDLAAYNELODAYAKQOTEADALNKASSENTQNIEDLAAYNELODAYAK
: 354
q58xp4_morca : I-----
: 350
q8gh86_morca : VEE-GLLELSGHLIDQKAD-----LTKDIAKAFESNVEE-GLLELSGHLID
: 363
q91962_morca : IEDLAAYNELODAYAKQOTEADALNKASSENTQNIEDLAAYNELODAYAK
: 581
forsgren_uspa2 : IQD-----LATNNELODAYAK-----KOTFAITFAL-----
: 326
q9xd55_morca : IQD-----LATNNELODAYAK-----KOTFAITFAL-----
: 326
q848s2_morca : VEE-GLIDLSGRLIDQKAD-----IAKN-----
: 312
q9xd53_morca : VEE-GLIDLSGRLIDQKAD-----LTKDIAKAFESNVEE-GLIDLSGRLID
: 319

q848s1_morca : -----720-----*-----740-----*-----760-----
: 615
q91961_morca : -----AQNQTETIDLAAYNELODAYAKQOTEADALNKASSENTQNI
: 627
q8rtb2_morca : QOTEADALNKASSENTQNIEDLAAYNELODAYAKQOTEADALNKASSENTQNI
: 417
q91963_morca : QOTEADALNKASSENTQNIEDLAAYNELODAYAKQOTEADALNKASSENTQNI
: 415
o54407_morca : -----AQNQTET-----
: 310
q9xd51_morca : QOTEADALNKASSENTQNIEDLAAYNELODAYAKQOTEADALNKASSENTQNI
: 405
q58xp4_morca : -----AQNQANIQDLAAYNELODAYAKQOTEADALNKASSENTQNI

: 388
q8gh86_morca : ~~QKADI~~-----~~QONQ~~NIQDLAAYNELODQYAPKQTEAIDALNKASSEN
: 406
q91962_morca : ~~QC~~TEAIDALNKASSENTQNIQDLAAYNELODAYAKQOTEAIDALNKASSEN
: 632
forsgren_uspa2 : ~~NKAS~~-----~~SEN~~TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEAIDALNKASSEN
: 368
q9xd55_morca : ~~NKAS~~-----~~SEN~~TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEAIDALNKASSEN
: 368
q848s2_morca : ~~QADI~~-----~~QONQ~~DIQDLAAYNELODQYAPKQTEAIDALNKASSEN
: 354
q9xd53_morca : ~~QKADI~~-----~~QONQ~~DIQDLAAYNELODQYAPKQTEAIDALNKASSEN
: 362

* 780 * 800 *
q848s1_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNIN
: 666
q91961_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNIN
: 678
q8rtb2_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNIN
: 468
q91963_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNIN
: 466
o54407_morca : ---TDLAAYNELODAYAKQOTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNIN
: 358
q9xd51_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNIN
: 456
q58xp4_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNIN
: 439
q8gh86_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNIN
: 457
q91962_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNIN
: 683
forsgren_uspa2 : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNIN
: 419
q9xd55_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNIN
: 419
q848s2_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNIN
: 405
q9xd53_morca : TONIEDLAAYNELODAYAKQOTEAIDALNKASSENTQNIAKNQADIANNIN
: 413

820 * 840 * 860
q848s1_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 717
q91961_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 729
q8rtb2_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 519
q91963_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 517
o54407_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 409
q9xd51_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 507
q58xp4_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 490
q8gh86_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 508

```

q91962_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 734
forsgren_uspa2 : NIYELAQQQDKHRSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 470
q9xd55_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 470
q848s2_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTDRIAKNKADADASFETLTKNQNTL
: 456
q9xd53_morca : NIYELAQQQDQHSSDIKTLAKASAANTNRI-----ADAEELGTAEENKKDAQ
: 458

*      880      *      900      *      9
q848s1_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 768
q91961_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 780
q8rtb2_morca : IEKDKEHDKLITANKTAICANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 570
q91963_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 568
o54407_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 460
q9xd51_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 558
q58xp4_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 541
q8gh86_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 559
q91962_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 785
forsgren_uspa2 : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 521
q9xd55_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 521
q848s2_morca : IEKDKEHDKLITANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 507
q9xd53_morca : IEKKAQAN-----ANKTAIDANKASADTKFAATADAITKNGNAITKNAKSIT
: 504

20      *      940      *      960
q848s1_morca : DLGTKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 812
q91961_morca : DLGTKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 824
q8rtb2_morca : DLGTKVDGFDGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 621
q91963_morca : DLGTKVDGFDGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 619
o54407_morca : DLGTKVDGFDGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 511
q9xd51_morca : DLGTKVDGFDGRVTALDTKVNALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 609
q58xp4_morca : DLGTKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 585
q8gh86_morca : DLGTKVDNAFDSRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 603
q91962_morca : DLGTKVDGFDGRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 829
forsgren_uspa2 : DLGTKVDGFDNRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL

```

```

: 565
q9xd55_morca : DLGTVKVDGFDGSRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 565
q848s2_morca : DLGTVKVDGFDGSRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 551
q9xd53_morca : DLGTVKVDGFDGSRVT-----ALDTKVNAFDGRITALDSKVENGMAAQAAL
: 548

*          980          *          1000          *          1020
q848s1_morca : SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 863
q91961_morca : SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 875
q8rtb2_morca : SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 672
q91963_morca : SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 670
o54407_morca : SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 562
q9xd51_morca : SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 660
q58xp4_morca : SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 636
q8gh86_morca : SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 654
q91962_morca : SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 880
forsgren_uspa2 : SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 616
q9xd55_morca : SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 616
q848s2_morca : SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 602
q9xd53_morca : SGLFQPYSVGKFNATAALGGYGSKSAVAIGAGYRVNPNLAFKAGAAINTSG
: 599

*
q848s1_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 877
q91961_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 889
q8rtb2_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 686
q91963_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 684
o54407_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 576
q9xd51_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 674
q58xp4_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 650
q8gh86_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 668
q91962_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 894
forsgren_uspa2 : NKKGSYNIGVNYEF : 630
q9xd55_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 630
q848s2_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 616
q9xd53_morca : NKKGSYNIGVNYEF : 613

```

Fig. 21

% de identidad en regiones identificadas sobre una secuencia Forsgren

	30-177 unión a laminina	165-318 unión a fibronectina	302-458 unión a C3
q848s1_morca	8	19	74
q9l961_morca	6	41	73
q8rtb2_morca	9	22	67
q9l963_morca	10	23	68
o54407_morca	10	17	53
q9xd51_morca	10	19	66
q58xp4_morca	10	16	75
q8gh86_morca	18	43	69
q9l962_morca	9	36	64
q9xd55_morca	99	98	96
q848s2_morca	35	54	74
q9xd53_morca	29	52	64