

# Antigenicidad de la glicoproteína de membrana GP63 de *leishmania*

Antigenicity of the GP63 membrane glycoprotein of *leishmania*

MORALES, G.; CARRILLO, G. y ALONSO, C.

Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" CSIC-UAM. Facultad de Ciencias. Universidad Autónoma de Madrid. Cantoblanco. 28049. Madrid.

## RESUMEN

El gen que codifica el antígeno de superficie más abundante de *Leishmania infantum*, la Gp63, ha sido clonado y secuenciado. A pesar de la homología general que se encuentra al compararlo con genes de otras especies de *Leishmania*, en particular con el gen expresado constitutivamente por *Leishmania chagasi*, los extremos correspondientes al carboxilo terminal de la proteína son claramente divergentes (62% homología). Para estudiar la predominancia de los anticuerpos anti-Gp63 en sueros de perros con leishmaniasis visceral, se clonó y expresó Gp63 recombinante en *Escherichia coli*. El 100% de dichos sueros reconoció la proteína recombinante sugiriendo que podría funcionar como un potente inmunógeno de células B durante la leishmaniasis visceral canina. Sin embargo, se observó heterogeneidad en el nivel de respuesta de los sueros. Mediante el uso de 6 fragmentos solapantes de la Gp63 y de una colección de péptidos sintéticos se analizaron sus determinantes antigénicos. Los datos muestran que debe existir un cierto grado de restricción inmunológica en el reconocimiento de la proteína ya que se observa una reactividad preferente con la región más divergente de la misma. El mapeo de epítomos de esta región mostró la existencia de dos péptidos inmunodominantes y la respuesta inmunológica producida contra ellos es preferencialmente del tipo IgG2a, isotipo asociado a la respuesta de tipo Th1.

**Palabras clave:** Leishmanolisina. Kinetoplastidos. Leishmaniasis. Respuesta humoral.

## ABSTRACT

The Gp63 gene encoding the major surface antigen of *Leishmania infantum* has been cloned and sequenced. In spite of the overall sequence homology with the gp63 genes from other *Leishmania* species, particularly with the constitutively expressed *Leishmania chagasi* Gp63 gene, the 3' ends of these genes are clearly divergent (62% homology). To study the prevalence of anti-gp63 antibodies in the sera from dogs with visceral leishmaniasis, a recombinant *L. infantum* gp63 protein was expressed in *Escherichia coli*. 100% of the sera from these dogs recognized the recombinant gp63 protein suggesting that it must function as a potent B cell immunogen during natural canine visceral leishmaniasis. However, heterogeneity in the level of response was observed. Fine mapping of the antigenic determinants was performed by means of 6 overlapping subfragments of the gp63 protein and by the use of a library of synthetic peptides. The

data showed that there is some degree of immunological restriction in the recognition of the protein since preferential reactivity was observed against the most divergent region. Epitope mapping of this region showed two immunodominant peptides the response to which is preferentially of the IgG2a type, isotype associated to Th1 response. **Key words:** Leishmanolysin. Kinetoplastids. Leishmaniasis. Humoral response.

Recibido: 15-01-97.

Acceptado: 21-02-97.

BIBLID [0004-2927(1997) 38:2-3; 285-294]

## INTRODUCCIÓN

Los promastigotes que infectan a su hospedador vertebrado parasitan única y exclusivamente macrófagos o células monocíticas del mismo linaje. Existen otros organismos capaces de infectar este tipo celular como es el caso de *Toxoplasma* o *Listeria*, pero existe una diferencia fundamental: Mientras *Toxoplasma* o *Listeria* son capaces de inducir la producción temprana de IL12 y TNF $\alpha$  que activan células CD8<sup>+</sup> (1, 2), la infección por *Leishmania* resulta en un retraso en la producción de esta citokina con lo que el condicionamiento inicial de las células CD4<sup>+</sup> se hace en un ambiente "neutral" acentuándose la influencia de la constitución genética del individuo infectado en la diferenciación de las células CD4<sup>+</sup> y por consiguiente en el posterior desarrollo de la enfermedad (3). El retraso en la producción de IL12 parece deberse a la forma en que los antígenos son presentados por los macrófagos: En el caso de *Toxoplasma* o *Listeria* tiene lugar a través de MHCI que induce la producción de IL12, mientras que en la infección por *Leishmania* la presentación de antígeno se hace por medio de MHCII (4). Por tanto, en una infección por *Leishmania* pueden suceder dos cosas dependiendo de la constitución genética del individuo infectado: Si este es genéticamente resistente se induce preferencialmente el subtipo celular Th1 que conlleva la producción de IFN- $\gamma$ . Este induce a los macrófagos a producir interleukinas y NO que matan a los parásitos intracelulares. Si, por el contrario, el individuo es susceptible, las células CD4<sup>+</sup> se diferencian preferencialmente al subtipo celular Th2. Estas células producen las interleukinas IL4 e IL10 que inhiben la producción de **NO por el macrófago activado con lo que, finalmente, se favorece la multiplicación del parásito intracelularmente** (5). Puede por tanto concluirse que el balance entre poblaciones Th1/Th2 es crucial para el resultado de la infección por *Leishmania* y por ello la consecución de una vacuna debe estar orientada hacia la inducción preferencial de una respuesta de tipo Th1 y evitar la diferenciación a células Th2. Las distintas aproximaciones utilizadas para la obtención de una vacuna han tenido resultados variables dependiendo del tipo de molécula inyectada, la v'a de inoculación y el adyuvante empleado (revi-



sado en 6). En algunos casos no sólo no se confiere protección sino que se exacerba la enfermedad debido a la inducción de respuesta Th2. Una de las aproximaciones que más éxito ha tenido en ratones es la administración intraperitoneal de una proteína de superficie del parásito, la Gp63, incluida en liposomas (7). Esta proteína constituye el 0.5%-1% de la proteína total del parásito. Presenta actividad proteasa dependiente de Zinc y está unida a la membrana a través de un enlace glicosil fosfatidil inositol (GPI) (revisado en 8).

La organización genómica de la Gp63 es similar a la descrita para otros genes de *Leishmania*. Constituye una familia génica compuesta por repeticiones en tandem de copias del gen. A pesar de que hay alta homología entre los genes de distintas especies de *Leishmania* existen diferencias en cuanto a la complejidad de la organización génica entre ellas así como polimorfismo entre las copias del gen dentro de una misma especie. Así, por ejemplo, en *L. mexicana* las copias se agrupan en tres clases ordenadas en el genoma de la siguiente forma: La clase C2 con 4 copias, específicas del estadio promastigote y con señal para la adición de GPI. La clase C1 constituida por 5 copias cuya expresión está aumentada en amastigotes y con el extremo 3' más largo que en los genes de la clase C2. Finalmente se encuentra la clase C3 con una copia única específica de promastigotes (9). También en *L. chagasi*, se observa que las copias de los genes se agrupan. En este caso, sin embargo, las distintas clases observadas son dependientes de la fase de crecimiento: Genes S, específicos de fase estacionaria, genes L, de fase logarítmica y un gen único C que se expresa constitutivamente y que muestra homología con los genes C1 de *L. mexicana*. La complejidad genómica en esta especie es mayor ya que no todas las copias que se expresan en una misma fase se encuentran juntas (10). La mayor complejidad en la organización de los genes de la Gp63 se alcanza en *L. guyanensis*: Los genes se agrupan básicamente en tres clases, A, B y C, pero cada una de estas clases puede variar en cuanto al número y tipo de copias que contiene dando lugar por ejemplo a 5 tipos distintos de clase A (11).

La Gp63 ha sido descrita en todas las especies de *Leishmania* y también en *Crithidia* (12). Este parásito, a diferencia de *Leishmania*, es monogénico, teniendo como hospedador exclusivamente al insecto, por lo que se ha sugerido que la función ancestral de la proteasa tiene que tener lugar en el huésped invertebrado. Esto no quiere decir que la proteína no tenga un papel importante en el vertebrado y que haya constituido un paso de preadaptación importante para sobrevivir en el mamífero. La proteína fue descrita primeramente en promastigotes. Actualmente existe controversia en cuanto a su presencia en amastigotes ya que ha sido detectada, aunque con un nivel de expresión mucho menor, en *L. mexicana*, *L. chagasi* y en algunas cepas de *L. major* mientras que no se ha podido determinar su presencia en amastigotes de otras cepas de esta última especie (13, 14, 15). La expresión de la proteína

depende también de la fase de crecimiento pero no se conocen los mecanismos que la regulan. Se ha sugerido que podrían estar implicadas determinadas secuencias intergénicas (16, 17).

A pesar de todo el trabajo que se ha realizado sobre la Gp63 las funciones de la proteína no están claras. Se la ha implicado en la entrada en el macrófago a través de receptores de complemento y/o de receptores de manosa, en el establecimiento de la infección, en la supervivencia intracelular del parásito y, en general, en la virulencia del mismo (revisado en 8). Dada la importancia que *a priori* se le supone a esta proteína, nuestro laboratorio se decidió estudiar las características antigénicas de la misma en la especie responsable de la leishmaniasis en España, *L. infantum*.

### CLONAJE DE Gp63 DE *L. infantum*

Comparando las secuencias de los genes de *L. major*, *L. donovani* y *L. chagasi* (18, 19, 20), se determinó una zona de gran homología a partir de la cual se diseñaron dos oligonucleótidos para amplificar por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) un fragmento de DNA utilizando como molde DNA genómico de *L. infantum*. El producto de PCR se utilizó como sonda para la búsqueda del gen completo en una genoteca genómica de *L. infantum* y los fagos positivos que se identificaron fueron subclonados y secuenciados. La secuencia del gen completo muestra la existencia de homología entre el gen de *L. infantum* y los de otras especies de *Leishmania*, variando desde un 78% cuando se compara con el gen de *L. guyanensis* hasta un 93% cuando se hace con el gen constitutivo de *L. chagasi*. Las mayores diferencias se encuentran en el tercio correspondiente al carboxilo terminal de la proteína. La comparación de las secuencias de los genes de Gp63 permite la construcción de un árbol filogenético teórico para las distintas especies analizadas (Fig. 1). Se observa que todas las secuencias correspondientes a genes de *L. guyanensis* se agrupan y forman una rama separada del resto de especies. La mayor proximidad de *L. infantum* se obtiene con el gen expresado constitutivamente por *L. chagasi*. Esta relación no es de extrañar ya que algunos autores consideran que *L. chagasi* es la forma en el Nuevo Mundo de *L. infantum* (21, 22). Lo que sí hay que destacar es que la forma constitutiva del gen de *L. chagasi* sea más próximo a *L. infantum* que a las formas logarítmica o estacionaria de su misma especie, lo que sugiere la posibilidad de que las proteínas presenten más homología si se expresan en la misma fase de crecimiento aunque sean de distinta especie que si, perteneciendo a la misma especie, se expresan en distinta fase.

La Gp63 de *L. infantum* está compuesta por 617 aminoácidos según la secuencia deducida de la de nucleótidos y contendría el péptido señal (resi-



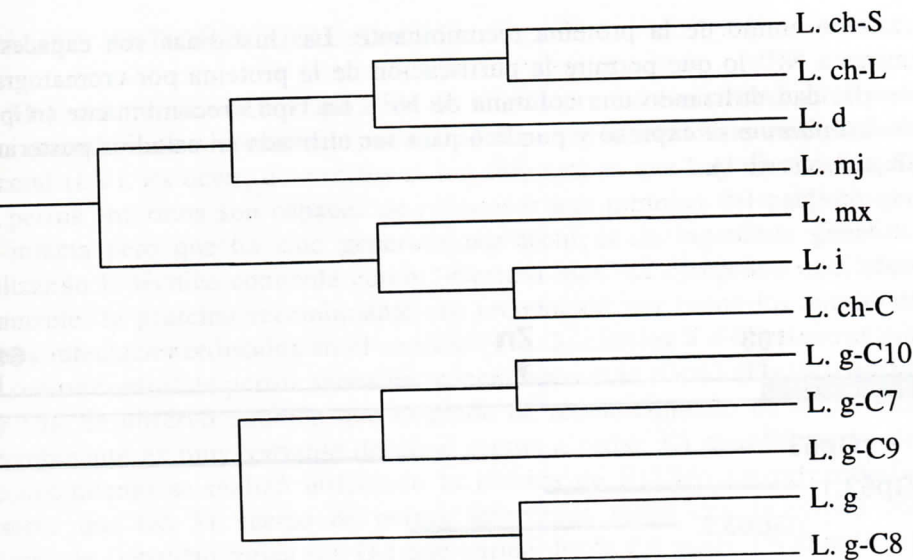


Fig. 1.—Árbol filogenético realizado con secuencias nucleotídicas de Gp63 utilizando el método de medida de distancias de Jukes-Cantor y siguiendo el análisis de máxima parsimonia. L. ch-S, L. ch-L y L. ch-C, gen de Gp63 de *L. chagasi* expresado en fase estacionaria, exponencial y constitutivo respectivamente; L. d, *L. donovani*; L. mj, *L. major*; L. mx, *L. mexicana*; L. I, *L. infantum*; L. g, L. g-C7, L. g-C8, L. g-C9 y L. g-C10, distintos clones de Gp63 de *L. guyanensis*.

residuos 1 a 41) y el propéptido (residuos 42 a 103) descritos para la Gp63 de otras especies (18, 19, 20). La proteína sufre un procesamiento postranscripcional en el que el péptido señal y el propéptido son eliminados para dar lugar a la proteína madura. Este último paso es necesario para que la proteína tenga actividad proteasa y se ha sugerido que el proceso es autocatalítico (23, 24). El péptido señal se encuentra altamente conservado mientras que el propéptido muestra variaciones en la composición de aminoácidos y en su longitud. La proteína de *L. infantum* presenta también 5 posibles sitios de N-glicosilación así como el sitio de unión a  $Zn^{2+}$  (His-X-Met-X-His) necesario para la actividad de la enzima, que se encuentra conservado en todas las especies de *Leishmania* y que es característico de las metaloproteasas (25).

A partir de la secuencia obtenida se diseñaron oligonucleótidos para la amplificación por PCR del fragmento correspondiente a la proteína madura, es decir, desde el aminoácido 103 hasta el 617, sin el péptido señal ni el propéptido para evitar que interfirieran posteriormente en la expresión de la proteína (Fig. 2). El producto de PCR se clonó en un vector de expresión pQE30, Quiagen) que se caracteriza por añadir una cola de 6 histidinas en el

extremo amino de la proteína recombinante. Las histidinas son capaces de unirse a  $\text{Ni}^{2+}$  lo que permite la purificación de la proteína por cromatografía de afinidad utilizando una columna de  $\text{Ni}^{2+}$ . La Gp63 recombinante (rGp63) de *L. infantum* se expresó y purificó para ser utilizada en estudios posteriores (Fig. 3, carril 1).

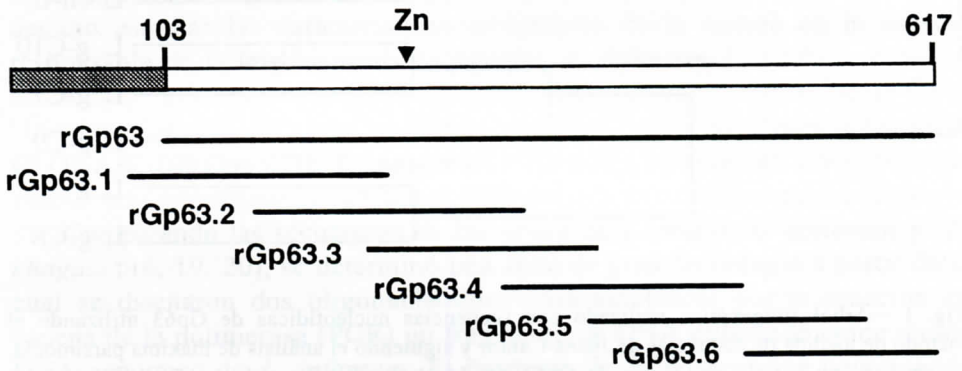


Fig. 2.—Esquema de la Gp63 de *L. infantum* y de la situación de los fragmentos solapantes 1 a 6. La caja sombreada indica la zona del péptido señal y del propéptido. El número 103 indica el residuo aminoacídico (Val) en el que ocurre el corte que libera el propéptido y da lugar a la proteína madura (18). Se indica también el dominio de unión de  $\text{Zn}^{2+}$  (His-X-Met-X-His).



Fig. 3.—Análisis por el método “Western blot” de la rGp63 purificada. El carril 1 muestra la tinción por Coomassie de la proteína purificada. La flecha indica la posición de la proteína recombinante. Los carriles 2 a 8 muestran la reactividad de los sueros de perros afectados de VL (Sueros numero 17, 1, 9, 19, 13, 3, 20, 6, 12 respectivamente). Los carriles 9 y 10 muestran la reactividad de los sueros normales.

## ANÁLISIS ANTIGÉNICO DE rGp63

Una vez purificada la rGp63 era de interés crucial comprobar si la proteína recombinante es reconocida por sueros de perros afectados de leishmaniasis visceral (LV). Es decir, determinar si los anticuerpos que hay en el suero de los perros enfermos son capaces de reconocer una proteína del parásito que los infecta pero que ha sido generada por técnicas de ingeniería genética. Utilizando la técnica conocida como "Western blot" se comprobó que, efectivamente, la proteína recombinante era reconocida por todos los sueros de perros infectados utilizados en el análisis (Fig. 3, carriles 2 a 8) mientras que los sueros control de perros sanos no reaccionan con la rGp63 (Fig. 3, carriles 9 y 10). Se observó también que el grado de reconocimiento de la proteína recombinante es muy variable de unos sueros a otros. La cuantificación del reconocimiento se realizó utilizando la técnica de ELISA. En este caso se observa que los 31 sueros de perros infectados reconocen la rGp63 con valores de Densidad óptica (D. O.) que varían desde 0,4 hasta 1,6 (Fig. 4 A). Estos datos demuestran que la proteína recombinante es útil para un estudio antigénico y también para un posible uso diagnóstico ya que la sensibilidad llega hasta el 100% de los sueros estudiados.

Para realizar un análisis más detallado de las zonas antigénicas de la proteína se generaron por PCR 6 fragmentos de DNA solapantes que cubren toda la longitud de la secuencia correspondiente a la proteína madura (Fig. 2). Los fragmentos tienen una longitud que varía desde 408 pb el más corto hasta 560 pb el más largo (136 a 186 aminoácidos) y solapan 250 pb como medio (80 aminoácidos). Los productos de PCR se clonaron en vectores de expresión (pQE, Quiagen) y los polipéptidos obtenidos se purificaron por cromatografía de afinidad del mismo modo que se hizo con la proteína. El análisis por ELISA de los fragmentos solapantes utilizando sueros de perros enfermos muestra que el reconocimiento va dirigido mayoritariamente al fragmento 6 que corresponde a la región carboxilo terminal de la proteína (Fig. 4 B-G). De nuevo el 100% de los sueros la reconoce y el grado de reactividad es variable obteniéndose valores de D. O. desde 0,2 hasta 0,7. Estos datos muestran la existencia de una restricción inmunológica en el reconocimiento de la proteína ya que la respuesta va dirigida mayoritariamente contra una región concreta de la misma, contrastando con lo descrito por otros autores en leishmaniasis visceral humana (26). La existencia de una región discreta responsable del reconocimiento de la proteína por sueros de perros infectados nos llevó a buscar los determinantes antigénicos implicados. Para realizar este estudio se sintetizaron péptidos de 20 aminoácidos solapantes en 5 que cubren toda la región correspondiente al fragmento 6 y se analizó el reconocimiento de dichos péptidos por los sueros. Aunque de nuevo existe cierta variabilidad en el grado de reconocimiento, existen 3 péptidos, 47, 49 y 50, que son recono-



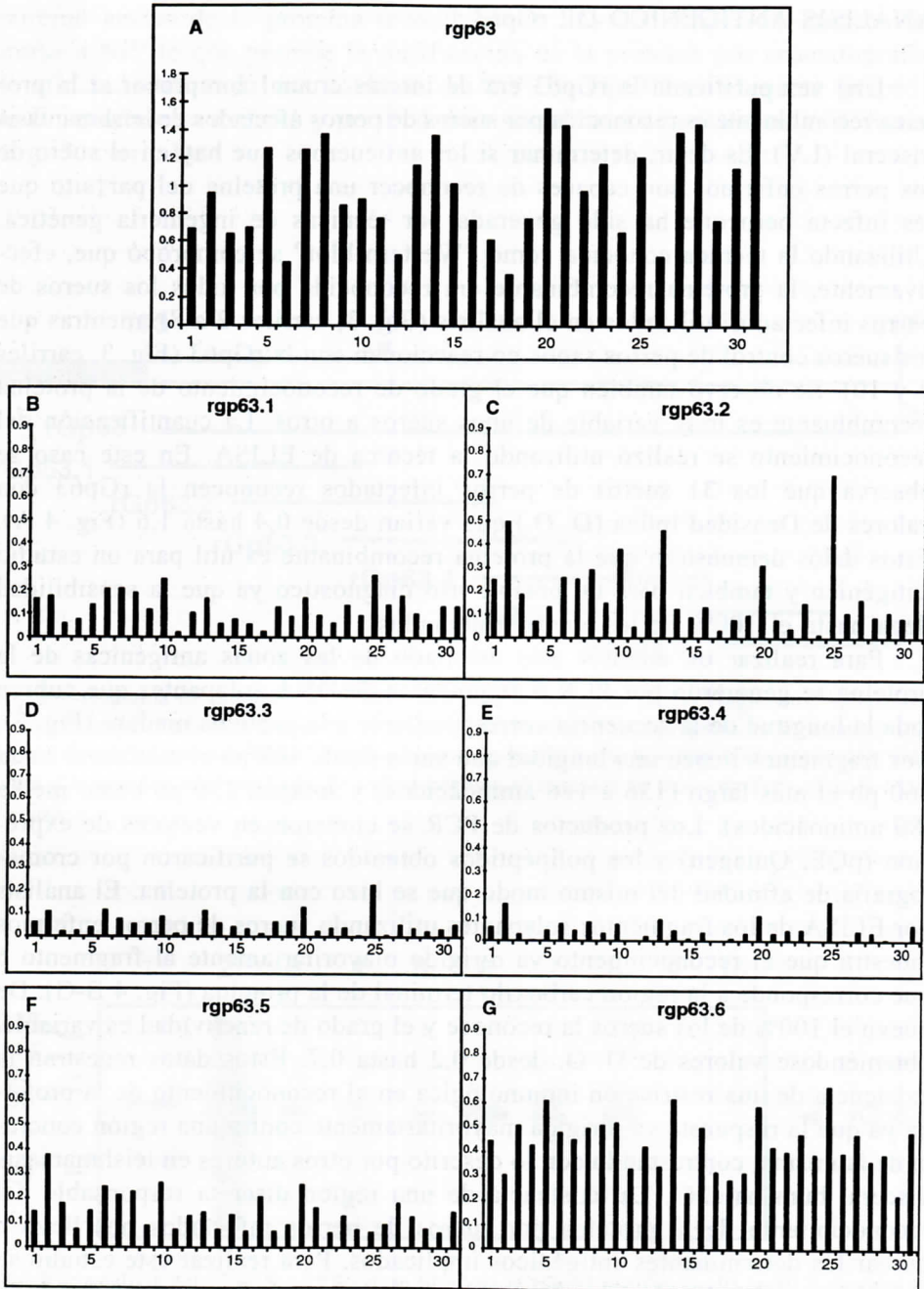


Fig. 4.—FAST-ELISA de 31 sueros de perros afectados de VL enfrentados a: (A) rGp63; (B) Fragmento 1; (C) Fragmento 2; (D) Fragmento 3; (E) Fragmento 4; (F) Fragmento 5 y (G) Fragmento 6. La reactividad se representa como densidad óptica a 450 nm para cada suero tras restar el valor de reactividad media de 5 sueros normales (0.07) mas 3 desviaciones estándar (0.01).



cidos mayoritariamente y con las reactividades más altas. Hay que destacar que los péptidos 49 y 50 contienen secuencias que en *L. major* han sido descritas como inductoras de la producción de IFN- $\alpha$  en pacientes humanos (27) mientras que el péptido 47 contiene parte de las secuencias de *L. major* que, en ratones, inducen respuesta Th1 o Th2, según el fragmento de secuencia que se analice (28). El péptido 47 se encuentra en una zona de la proteína en la que la homología con *L. major* es menor que en otras regiones (Fig. 5). Pequeñas variaciones en la secuencia de aminoácidos pueden inducir un tipo de respuesta diferente. Este es el caso de los péptidos de *L. major*, pequeños desplazamientos hacia el amino o el carboxilo terminal hace que la respuesta pase de ser Th1 a Th2 (28). Por ello es interesante preguntarse qué tipo de respuesta será la inducida por el péptido 47. El análisis de la respuesta obtenida es muy importante si tenemos en cuenta que es necesaria la inducción de Th1 para atajar la enfermedad y que si se produce una respuesta Th2 la enfermedad puede exacerbarse. La presencia en sueros de anticuerpos del subtipo IgG2a está asociada a la respuesta Th1 mientras que los anticuerpos del subtipo IgG1 aparecen asociados a respuesta Th2. El análisis de los sueros que reconocen los péptidos inmunodominantes muestra que al menos en alguno de ellos el reconocimiento está asociado a la existencia de anticuerpos del subtipo IgG2a, lo que sugiere que la utilización de estos péptidos en una inmunización podría inducir una respuesta Th1.

Podemos por tanto concluir que la obtención de la Gp63 recombinante ha sido de gran importancia ya que su producción en grandes cantidades nos ha permitido realizar estudios inmunológicos que han demostrado su validez como herramienta de diagnóstico así como una disección de sus determinantes antigénicos que guiarán en el futuro los pasos a seguir para la consecución de una posible vacuna.

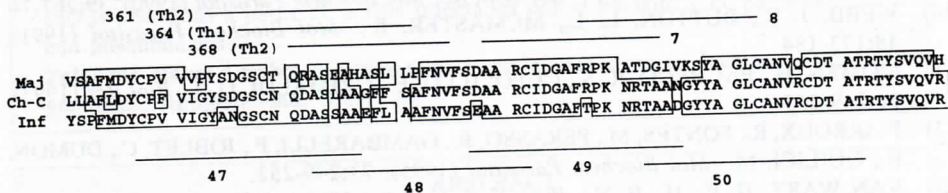


Fig. 5.—Comparación de la región correspondiente a los aminoácidos 451 a 550 de la secuencia deducida de la Gp63 de *L. infantum* (Inf) con la región correspondiente a la secuencia de la proteína de *L. major* (Maj) y la de la proteína constitutiva de *L. chagasi* (Ch-C). Los aminoácidos idénticos se muestran dentro de las cajas. Las líneas numeradas 47 a 50 indican la posición sobre la secuencia de la proteína de estos péptidos de *L. infantum*. Las líneas numeradas como 361 y 368 corresponden a los péptidos de *L. major* descritos como inductores de respuesta Th2. La línea numerada como 364 corresponde al péptido descrito como inductor de respuesta Th1 (28). Las líneas numeradas 7 y 8 corresponden a los péptidos descritos como inductores de producción de IFN- $\alpha$  (27).

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) GAZZINELLI, R. T., HIENY, S., WYNN, T. A., WOLF, S., SHER, A.: *Proc Natl Acad Sci USA* (1993), **90**:615-619.
- (2) TRIPP, C. S., WOLF, S. F., UNANUE, E. R.: *Proc Natl Acad Sci USA* (1993), **90**:3725-3729.
- (3) REINER, S. L., ZHENG, S., WANG, Z. E., STOWRIN, L., LOCKSLEY, R. M.: *J Exp Med* (1994), **179**:447-56.
- (4) REINER, S. L., LOCKSLEY, R. M.: *Annu Rev Immunol* (1995), **13**:151-177.
- (5) XU, D., LIEW, F. Y.: *Vaccine* (1994), **12**:1534-1536.
- (6) LIEW, F. Y., O'DONNELL, C. A.: *Adv Parasitol* (1993), **32**:186-259.
- (7) RUSSELL, D. G., ALEXANDER, J.: *J Immunol* (1988), **140**:1274-1279.
- (8) BOUVIER, J., SCHNEIDER, P., ETGES, R.: *Proteolytic Enzymes: Aspartic and Metallo Peptidases* (1995), **248**:614-633.
- (9) MEDINA-ACOSTA, E., KARESS, R. E., RUSSELL, D. G.: *Mol Biochem Parasitol* (1993), **57**:31-45.
- (10) RAMAMOORTHY, R., DONELSON, J. E., PAETZ, K. E., MAYBODI, M., ROBERTS, S. C., WILSON, M. E.: *J Biol Chem* (1992), **267**:1888-1895.
- (11) STEINKRAUS, H. B., GREER, J. M., STEPHENSON, D. C., LANGER, P. J.: *Mol Biochem Parasitol* (1993), **62**:173-85.
- (12) INVERSO, J. A., MEDINA-ACOSTA, E., O'CONNOR, J., RUSSELL, D. G., CROSS, G. A. M.: *Mol Biochem Parasitol* (1993), **57**:47-54.
- (13) MEDINA-ACOSTA, E., KARESS, R. E., SCHWARTZ, H., RUSSELL, D. G.: *Mol Biochem Parasitol* (1989), **37**:263-274.
- (14) FROMMEL, T. O., BUTTON, L. L., FUJIKURA, Y., MCMASTER, W. R.: *Mol Biochem Parasitol* (1990), **38**:25-32.
- (15) SCHNEIDER, P., ROSAT, J. P., BOUVIER, J., LOUIS, J., BORDIER, C.: *Exp Parasitol* (1992), **75**:196-206.
- (16) RAMAMOORTHY, R., SWIHART, K. G., MCCOY, J. J., WILSON, M. E., DONELSON, J. E.: *J Biol Chem* (1995), **270**:12133-12139.
- (17) RAMAMOORTHY, R., DONELSON, J. E., WILSON, M. E.: *Mol Biochem Parasitol* (1996), **77**:65-76.
- (18) BUTTON, L. L., MCMASTER, W. R.: *J Exp Med* (1988) **167**:724-729.
- (19) MILLER, R. A., REED, S. G., PARSONS, M.: *Mol Biochem Parasitol* (1990), **39**:267-74.
- (20) WEBB, J. R., BUTTON, L. L., MCMASTER, R.: *Mol Biochem Parasitol* (1991), **48**:173-184.
- (21) MOMEN, H., PACHECO, R. S., CUPOLILLO, E., GRIMALDI, G. J.: *Biol Res* (1993), **26**:249-255.
- (22) PIARROUX, R., FONTES, M., PERASSO, R., GAMBARELLI, F., JOBLET, C., DUMON, H., QUILICI, M.: *Mol Biochem Parasitol* (1995), **73**:249-252.
- (23) VAN WART, H. E., H., B.-H.: *Proc Natl Acad Sci USA* (1990), **87**:5578-5582.
- (24) BUTTON, L. L., WILSON, G., ASTEM, C. R., MCMASTER, W. R.: *Gene* (1993), **134**:75-81.
- (25) RAWLINGS, N. D., BARRETT, A. J.: *Meth Enzymol* (1995), **248**:183-228.
- (26) SHREFFLER, W. G., BURNS JR., J. M., BADARÓ, R., GHALIB, H. W., BUTTON, L. L., MCMASTER, W. R., REED, S. G.: *J Infect Dis* (1993), **167**:426-430.
- (27) RUSSO, D. M., JARDIM, A., CARVALHO, E. M., SLEATH, P. R., ARMITAGE, R. J., OLAFSON, R. W., REED, S. G.: *J Immunol* (1993), **150**:932-939.
- (28) SOARES, L. R. B., SERCARZ, E. E., MILLER, A.: *Int Immunol* (1994), **6**:785-794.