

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**Departamento de Microbiología II**



**Análisis molecular de los repertorios de receptores de  
antígeno en las respuestas alorreactivas contra HLA-B27 y su  
contribución al estudio comparativo de la estructura  
antigénica de B\*2705 y B\*2703**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR**

**Domingo F. Barber Castaño**

**Director**

**Juan Antonio López de Castro Álvarez**

**Madrid**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II

Ponente: Sr. Dr. Alfonso Javier Anaya Nave  
 Presidente: Sr. Dr. Ulpio Javier Ruiz  
 Vices: Sr. Dr. Rosa Tania Garcia  
 Vocales: Sr. D. DOLORES JARAQUEMADA  
 Vocales: Sr. Dr. ARELIO PLAZA LÓPEZ  
 Secretarios: Sr. Dr. JOSE R. REGUEIRO

TRIBUNAL

**ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS REPERTORIOS DE RECEPTORES DE ANTÍGENO EN LAS RESPUESTAS ALORREACTIVAS CONTRA HLA-B27 Y SU CONTRIBUCIÓN AL ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ESTRUCTURA ANTIGÉNICA DE B\*2705 Y B\*2703.**

TESIS DOCTORAL

**DOMINGO F. BARBER CASTAÑO**

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC.  
Facultad de Ciencias Biológicas, C-208  
Universidad Autónoma de Madrid  
Cantoblanco  
28049 MADRID

MADRID, 1996

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II

**ANÁLISIS MOLECULAR DE LOS REPERTORIOS DE RECEPTORES DE ANTÍGENO EN  
LAS RESPUESTAS ALORREACTIVAS CONTRA HLA-B27 Y SU CONTRIBUCIÓN AL  
ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ESTRUCTURA ANTIGÉNICA DE B\*2705 Y B\*2703.**

Memoria que para optar al grado de doctor  
en Farmacia presenta el licenciado:

**Domingo F. Barber Castaño**

Director: Dr. **José A. López de Castro.**

Profesor de Investigación del CSIC.

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa.

Madrid, Enero de 1996

*A mis padres y a mis hermanos.*

*A mi abuela Teresa.*

*A los que inculcaron en mí  
el interés por el conocimiento.*

## AGRADECIMIENTOS

Gracias José Antonio por tu dirección en el que ha sido nuestro proyecto y por confiar en la iniciativa personal de tus becarios.

Gracias a mi familia y a mis amigos por su apoyo incondicional, aun sin saber muy bien que es eso de TCR, HLA-B27, alogénico, antígeno, ...

Quiero mostrar también mi gratitud a los que compartisteis mis primeros años en el departamento de Inmunología de la Fundación Jiménez Díaz, especialmente a Sol y Miguel (Kiko), mis compañeros de conciertos de "clásica", a Julio y Elena, vecinos en el Lab-3 (las colonias). ¡ Qué tardes memorables en la 9ª !. A los que habéis compartido los últimos años en el Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, especialmente a mis amigos de actividades deportivas, culturales y gastronómicas del viernes noche o cuando y donde se terciase. ¡ Va por ustedes !. A mis compañeros de laboratorio (antes Lab-5 y ahora C-208) a lo largo de estos años de tesis: Rafa, Pilar, Angel, Raúl, Nieves, Susana, Daniel, Rosa, José Alberto (Jal), Begoña, Fernando, Alberto, José Manuel (el tuno), Mark, David, Marina, Manolo, Iñaki, José Ramón (Txerra), José María (el objetor) y Miguel, sobre todo a los que habéis trabajado más directamente conmigo, a Rafa, de quien aprendí los fundamentos técnicos, y a David, mi compañero "ausente" de fatigas en el estudio de la respuesta anti-B\*2703.

Gracias Susana por haber sido una hermana mayor en esto de la ciencia, en el rigor y en el buen hacer. Gracias por tus consejos, mi buena amiga.

Mi gratitud a la Fundación Caja de Madrid por la concesión en el año 1991 de la beca que me ha permitido realizar este trabajo.

Por último, quiero expresar mi agradecimiento a Javier Arroyo Nombela por haber aceptado la ponencia de esta tesis y al Departamento de Microbiología II, en especial a Miguel Sánchez Pérez, por su tutela.

## INDICE

|   |    |
|---|----|
| 1.- INTRODUCCIÓN .....  | 1  |
| 1.1.- El receptor de la célula T. ....  | 1  |
| 1.1.1.- Los genes del receptor $\alpha\beta$ de la célula T. ....   | 1  |
| 1.1.2.- Estructura tridimensional del TCR. ....   | 3  |
| 1.2.- El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) y la presentación de<br>antígeno a los linfocitos T. ....                              | 4  |
| 1.2.1.- Estructura general y organización génica de los antígenos HLA de<br>clase I. ....   | 4  |
| 1.2.2.- Estructura tridimensional de los antígenos de clase I. ....   | 5  |
| 1.2.3.- Estructura del sitio de unión de péptido de los antígenos de clase<br>I. ....   | 6  |
| 1.3.- HLA-B27 y su polimorfismo molecular. ....   | 7  |
| 1.3.1. Péptidos que une HLA-B27. ....   | 8  |
| 1.3.2.- Frecuencia y distribución étnica de los subtipos de HLA-B27. ....   | 9  |
| 1.3.3.- HLA-B27 y espondiloartropatías. ....  | 9  |
| 1.4.- Respuestas alorreactivas anti-HLA-B27. ....   | 11 |
| 1.4.1.- Alorreconocimiento. ....  | 11 |
| 1.4.2.- Especificidad clonal de la respuesta alorreactiva anti-B*2705 y anti-<br>B*2703: relaciones antigénicas entre subtipos de HLA-B27. .... | 12 |
| 1.5.- Repertorios de TCR implicados en respuestas específicas de péptido y en<br>alorreactividad. ....  | 15 |
| 2.- OBJETIVOS .....   | 18 |
| 3.- MATERIALES Y MÉTODOS .....  | 19 |
| 3.1.- Clones de célula T citotóxicas y líneas celulares. ....   | 19 |
| 3.1.1.- Líneas linfoblastoides B (LCL). ....  | 19 |
| 3.1.1.1.- Condiciones de cultivo. ....  | 19 |

|  |    |
|--|----|
| 3.1.1.2.- Congelación y descongelación de LCL. ....  | 19 |
| 3.1.1.3.- Ensayo de detección de micoplasmas en cultivos<br>celulares. ....  | 21 |
| 3.1.2.- Clones citotóxicos de célula T. ....   | 22 |
| 3.1.2.1.- Condiciones de cultivo. ....   | 22 |
| 3.1.2.2.- Aislamiento de células mononucleares de sangre<br>periférica (PBMC). ....                                | 22 |
| 3.1.2.3.- Congelación y descongelación de PBMC. ....   | 22 |
| 3.1.2.4.- Congelación y descongelación de clones de célula T. ....   | 22 |
| 3.2.- Amplificación específica de las cadenas del TCR: estrategia general. ....                                    | 23 |
| 3.2.1.- Aislamiento de RNA. ....   | 24 |
| 3.2.2.- Obtención de cDNA. ....  | 24 |
| 3.2.3.- PCR específica. ....   | 25 |
| 3.2.4.- Identificación de las subfamilias amplificadas. ....   | 28 |
| 3.2.4.1.- Geles de agarosa analíticos. ....  | 28 |
| 3.2.4.2.- Southern blot. ....  | 28 |
| 3.2.4.3.- Marcaje radiactivo de oligonucleótidos. ....   | 30 |
| 3.3.- Secuenciación del material amplificado. ....   | 30 |
| 3.3.1.- Purificación del fragmento amplificado. ....   | 30 |
| 3.3.2.- Amplificación asimétrica. ....   | 30 |
| 3.3.3.- Purificación de los productos de la segunda PCR. ....  | 31 |
| 3.3.4.- Reacciones de secuencia. ....  | 32 |
| 3.3.5.- Electroforesis en geles de poliacrilamida. ....  | 33 |
| 3.4.- Análisis estadístico. ....   | 33 |
| <br>   |    |
| 4.- RESULTADOS .....   | 34 |
| 4.1.- Repertorio de TCR en la respuesta alogénica anti-B*2705. ....  | 34 |
| 4.1.1.- Análisis de la secuencia de las cadenas $\alpha$ y $\beta$ amplificadas. ....                              | 34 |
| 4.1.1.1.- Descripción de un nuevo miembro de la subfamilia $V\alpha 14$<br>y de un nuevo segmento $J\alpha$ . .... | 37 |

|  |    |
|--|----|
| 4.1.2.- Selección asimétrica de la cadena $\beta$ en TCR anti-B*2705. ....   | 38 |
| 4.1.2.1.- Clones alorreactivos con idéntica cadena $\beta$ y distintas<br>cadenas $\alpha$ . Relación con la especificidad. ....             | 38 |
| 4.1.2.2.- Clones alorreactivos con cadenas $\beta$ altamente similares. ..   | 39 |
| 4.1.3.- La selección de segmentos $V\beta$ entre los CTL anti-B*2705 es<br>independiente del respondedor y no es específica de epítipo. .... | 39 |
| 4.1.4.- El uso no aleatorio de segmentos $V\alpha$ entre CTL anti-B*2705 es<br>dependiente del donante. ....                                 | 41 |
| 4.1.5.- La selección de los segmentos $V\alpha$ y $V\beta$ es independiente de la<br>asociación $V\alpha/V\beta$ . ....                      | 43 |
| 4.1.6.- Motivos recurrentes en las regiones N+D $\beta$ . ....   | 43 |
| 4.1.7.- Diversidad de unión en las cadenas $\alpha$ y uso recurrente de<br>segmentos $J\alpha$ . ....  | 45 |
| 4.1.8.- Estructura del TCR en CTL anti-B*2705 que reaccionan<br>cruzadamente con HLA-DR2; homología con TCR anti-DR2. ....                   | 46 |
| 4.2.- Repertorio de TCR en la respuesta alogénica anti-B*2703. ....  | 49 |
| 4.2.1.- Análisis de la secuencia de las cadenas $\alpha$ y $\beta$ amplificadas. ....  | 49 |
| 4.2.2.- Los CTL que reconocen epítipos "privados" de B*2703 presentan<br>una heterogeneidad limitada. ....                                   | 49 |
| 4.2.3.- Uso de segmentos $V\alpha$ y $V\beta$ en los CTL anti-B*2703. ....   | 53 |
| 4.2.4.- Restricciones en la asociación $V\beta$ - $J\beta$ y en la diversidad de la<br>región N+N $\beta$ . ....                             | 56 |
| 4.2.5.- El sesgo en el uso de segmentos $J\alpha$ limita la diversidad de la<br>región CDR3 $\alpha$ . ....                                  | 56 |
| 4.3.- Similitudes y diferencias en el repertorio de TCR entre las respuestas anti-<br>B*2705 y anti-B*2703. ....                             | 57 |
| 4.4.- Motivos recurrentes en las regiones CDR1 y CDR2 $\beta$ en las respuestas<br>alogénicas anti-HLA-B27. ....                             | 59 |
| 5.- DISCUSIÓN .....  | 62 |



|   |    |
|---|----|
| 5.1.- La variabilidad del TCR en las respuestas alorreactivas contra HLA-B*2705<br>está limitada por restricciones a múltiples niveles en ambas cadenas $\alpha$ y<br>$\beta$ . . . . . | 62 |
| 5.1.1.- Distinta contribución de las cadenas $\alpha$ y $\beta$ del TCR al<br>alorreconocimiento. . . . .   | 62 |
| 5.1.2.- La selección a nivel de las regiones CDR3 refleja un número<br>limitado de epítomos inmunodominantes asociados a péptido. . . . .   | 64 |
| 5.1.3.- Base molecular de la reacción cruzada entre HLA-B27 y HLA-<br>DR2. . . . .  | 66 |
| 5.2.- El análisis del repertorio de TCR en las respuestas alorreactivas contra<br>HLA-B*2703 revela que este subtipo conserva la estructura antigénica de<br>B*2705. . . . .            | 66 |
| 5.2.1.- Los epítomos privados son poco frecuentes en B*2703:<br>implicaciones para la unión de péptidos a este subtipo. . . . .   | 66 |
| 5.2.2.- Analogías y diferencias entre las respuestas B*2703 y B*2705:<br>similitud antigénica entre subtipos e implicaciones para su<br>asociación con enfermedad. . . . .              | 67 |
| 5.2.3.- Selección de segmentos V $\beta$ del subgrupo de homología 4 en<br>respuestas autorreactivas y anti-bacterianas en artritis reactiva. . . . .                                   | 69 |
| 6.- CONCLUSIONES . . . . .  | 70 |
| 7.- BIBLIOGRAFÍA . . . . .  | 72 |
| 8.- APÉNDICE 1 . . . . .  | 88 |
| 9.- APÉNDICE 2 . . . . .  | 91 |
| 10.- APÉNDICE 3 . . . . .   | 94 |

## ABREVIATURAS

|                             |   |
|-----------------------------|---|
| <b>aa</b>                   | Aminoácidos                                 |
| <b>APC</b>                  | Célula presentadora de antígeno             |
| <b>AS</b>                   | Espondilitis anquilosante                   |
| <b><math>\beta</math>2m</b> | Beta-2-microglobulina                       |
| <b>C</b>                    | Constante                                   |
| <b>CDR</b>                  | Región determinante de la complementariedad |
| <b>CPM</b>                  | Cuentas por minuto                          |
| <b>CTL</b>                  | Linfocito T citotóxico                      |
| <b>D</b>                    | Diversidad                                  |
| <b>DNA</b>                  | Acido desoxirribonucleico                   |
| <b>dNTP</b>                 | deoxinucleótido trifosfato                  |
| <b>DMSO</b>                 | Dimetil sulfóxido                           |
| <b>DTT</b>                  | Ditiotreitol                                |
| <b>EDTA</b>                 | Acido etilendiaminotetraacético             |
| <b>FCS</b>                  | Suero de ternera fetal                      |
| <b>HLA</b>                  | Antígenos de los leucocitos humanos         |
| <b>HPLC</b>                 | Cromatografía líquida de alta resolución    |
| <b>IEF</b>                  | Isoelectroenfoque                           |
| <b>Ig</b>                   | Inmunoglobulina                             |
| <b>J</b>                    | De unión                                    |
| <b>kb</b>                   | kilobase                                    |
| <b>kD</b>                   | kilodalton                                  |
| <b>LCL</b>                  | Línea celular linfoblástica                 |
| <b>mAb</b>                  | Anticuerpo monoclonal                       |
| <b>MHC</b>                  | Complejo Principal de Hitocompatibilidad    |
| <b>MLC</b>                  | Cultivo mixto de linfocitos                 |
| <b>NP-40</b>                | Nonidet P-40                                |
| <b>bp</b>                   | Pares de bases                              |
| <b>PBMC</b>                 | Células mononucleares de sangre periférica  |
| <b>PCR</b>                  | Reacción en cadena de la polimerasa         |
| <b>PM</b>                   | Peso molecular                              |
| <b>RNA</b>                  | Acido ribonucleico                          |

|             |   |
|-------------|---|
| <b>RFLP</b> | Polimorfismo de fragmentos de restricción |
| <b>s.h.</b> | Subgrupo de homología                     |
| <b>SDS</b>  | Dodecilsulfato sódico                     |
| <b>TCR</b>  | Receptor de la célula T                   |
| <b>Tm</b>   | Temperatura media de disociación          |
| <b>V</b>    | Variable                                  |

# 1.- INTRODUCCIÓN

---

## 1.1.- El receptor de la célula T.

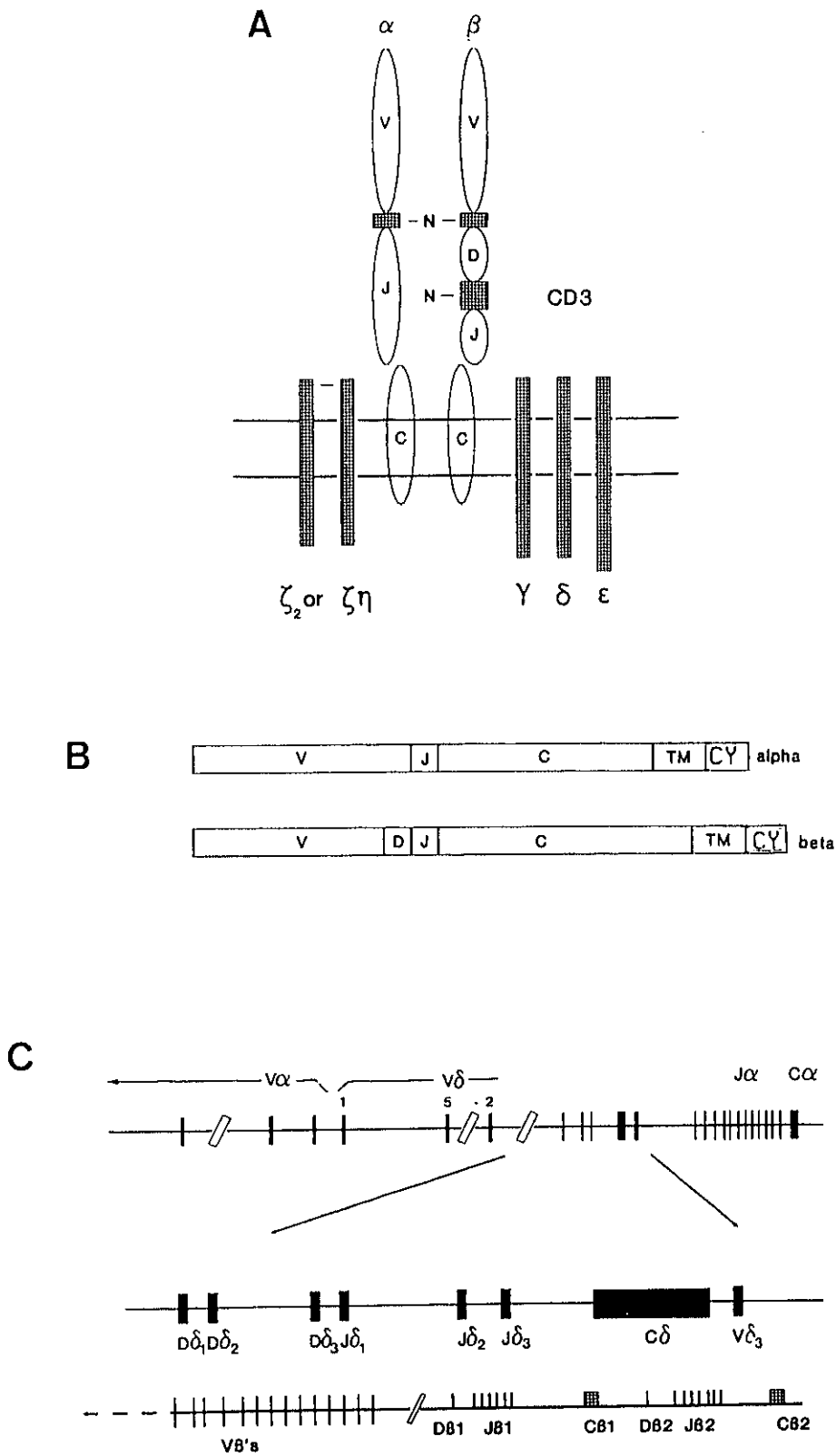
Las células T reconocen en la superficie celular los complejos formados por las proteínas del MHC y los péptidos que éstas presentan, a través de su receptor específico o receptor de célula T (TCR) (Davis y Bjorkman, 1988). El receptor de antígeno de los linfocitos T maduros está compuesto por dos glicoproteínas altamente variables, distribuidas clonalmente (dímero  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$ ), asociadas no covalentemente con los cinco polipéptidos invariables que constituyen el complejo CD3 (Meuer *et al.*, 1983; Brenner *et al.*, 1985) (Figura 1).

Las cadenas  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$  pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) (Davis y Bjorkman, 1988). El receptor  $\alpha\beta$  es el más común en los linfocitos humanos, encontrándose en más de un 95% de las células T de sangre periférica (Groh *et al.*, 1989; Brenner *et al.*, 1986). Posee un dominio distal altamente variable, que es el responsable de la unión de antígeno, y un dominio proximal constante. Su estructura es similar a la de las inmunoglobulinas, identificándose regiones variables (V), de diversidad (D), de unión (J de "joining") y constantes (C) (Siu *et al.*, 1984; Toyonaga y Mak, 1987; Chothia *et al.*, 1988; Wilson *et al.*, 1988; Raulet, 1989; Davis, 1990) (Figura 1).

El complejo CD3 está formado por tres polipéptidos  $\gamma$ ,  $\delta$  y  $\epsilon$ , pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, que se asocian a dos subunidades independientes, las cadenas  $\zeta$  y  $\eta$  que forman homodímeros  $\zeta\zeta$  (90%) o heterodímeros  $\zeta\eta$  (10%) unidos por puentes disulfuro (Mercep *et al.*, 1988; Moss *et al.*, 1992) (Figura 1). Se cree que la cadena  $\zeta$  es necesaria para unir CD3 al TCR  $\alpha\beta$  y para un transporte eficiente del complejo TCR/CD3 a la superficie celular (Mercep *et al.*, 1988). Cada una de las cadenas del complejo se requiere para la eficiente transmisión de señales al interior celular.

### 1.1.1.- Los genes del receptor $\alpha\beta$ de la célula T.

Los distintos segmentos génicos V, D, J y C de la célula T se encuentran distribuidos, en



**Figura 1.** A) Representación esquemática del receptor  $\alpha\beta$  de la célula T y de CD3. B) Representación esquemática de los polipéptidos del receptor, donde se muestra la contribución de los segmentos variables (V), de diversidad (D), de unión (J) y constantes (C) así como la región de la adición N (N). TM y CY corresponden respectivamente a la región transmembrana y citoplásmica (tomado de Moss *et al.*, 1992). C) Representación esquemática de los complejos génicos del TCR  $\alpha/\delta$  y  $\beta$  (tomado de Wilson *et al.*, 1988).

línea germinal, en diferentes grupos, separados unos de otros. Estos segmentos recombinan, durante la maduración de los linfocitos T, siguiendo un proceso por el cual se produce primero la unión de los segmentos D con los J (solo en  $\beta$ ) y luego la unión de los V con los D-J o J (en  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente). Como consecuencia de estas uniones, los genes V, D o J que hay entre los segmentos utilizados por la célula T son deleccionados. Tras este proceso el DNA del linfocito T maduro tiene juntos y recombinados los segmentos V(D)J. La unión de estos segmentos a la región constante se hará durante la maduración del mRNA bajo la acción de una señal de procesamiento. El segmento V está codificado por dos exones separados por un intrón de 90 a 400 pares de bases (bp). El primer exón codifica para una secuencia señal hidrofóbica de aproximadamente 50bp. El segundo exón codifica para el resto de la región V (entre 250 y 350 bp)(Moss *et al.*, 1992). Los segmentos V $\alpha$  y V $\beta$  poseen dos residuos de Cys, separados entre 63 y 69 aa, que forman de puentes disulfuros intracatenarios (Chothia *et al.*, 1988).

Los segmentos V se agrupan en subfamilias, cada una de las cuales incluye aquéllos miembros que presentan una homología mayor del 75% en su secuencia de nucleótidos. La homología entre las proteínas de diferentes subfamilias oscila desde el 16% hasta el 58% (Wilson *et al.*, 1988). Diez aa que son importantes para la conservación de la estructura del TCR, aparecen conservados en más del 75% de las secuencias (Concannon *et al.*, 1986; Klein *et al.*, 1987). Las subfamilias de segmentos V se pueden clasificar a su vez en subgrupos de homología. Estos incluyen aquellas subfamilias V $\alpha$  o V $\beta$  que tienen entre si una identidad en su secuencia de aa mayor del 50% (Chothia *et al.*, 1988).

El elevado número de segmentos génicos permite generar numerosas combinaciones transcripcionales. Esta diversidad se ve muy incrementada por la adición de nucleótidos no codificados en línea germinal en las regiones N o zonas de unión V $\beta$ -D $\beta$  y D $\beta$ -J $\beta$  o V $\alpha$ -J $\alpha$  por la acción de la deoxinucleotidil transferasa terminal (George *et al.*, 1992). En el TCR no existe el fenómeno de la hipermutación somática descrito para las inmunoglobulinas.

Los genes de la cadena  $\alpha$  están localizados en el cromosoma 14 (14q11) (Caccia *et al.*, 1985; Collins *et al.*, 1985) (Figura 1). Los genes para los elementos de la cadena  $\delta$  del TCR se encuentran entre los que codifican para los segmentos V $\alpha$  y J $\alpha$ . Aproximadamente 50 segmentos V $\alpha$ , agrupados en 32 subfamilias, y unos 100 segmentos J $\alpha$  están distribuidos a lo largo de 100kb de DNA (Yoshikai *et al.*, 1986; Kimura *et al.*, 1987; Klein *et al.*, 1987; Roman-Roman *et al.*, 1991;

Moss *et al.*, 1993). A 4kb de los segmentos  $J\alpha$  se encuentra un único segmento  $C\alpha$  (Yoshikai *et al.*, 1985).

El complejo de genes de la cadena  $\beta$  ocupa unas 600kb del cromosoma 7 (7q32-35) (Caccia *et al.*, 1984; Lai *et al.*, 1988) y comprende unos 57 segmentos  $V\beta$  agrupados en 26 subfamilias (Kimura *et al.*, 1986; Concannon *et al.*, 1986; Wilson *et al.*, 1990; Robinson, 1991; Ferradini *et al.*, 1991; Hall *et al.*, 1994) (Figura 1). Hay dos segmentos  $C\beta$  separados unas 8kb entre si. Cada uno posee un grupo de segmentos  $J\beta$  y un segmento  $D\beta$  asociado (Clark *et al.*, 1984; Toyonaga *et al.*, 1985). Los dos segmentos  $C\beta$  son altamente homólogos, diferenciándose tan solo en 4 aminoácidos. Además de los transcritos VDJC el complejo  $\beta$  produce transcritos DJC similares a los  $DJ\mu$  de  $Ig$ , cuya función no se conoce (Gu *et al.*, 1991).

En los genes que codifican para segmentos V y C del TCR  $\alpha\beta$  se ha descrito la existencia de polimorfismo alélico. Las variaciones alélicas más extensamente caracterizadas son las de RFLP, que mapean en regiones no codificantes (Posnett, 1990). También se ha identificado la existencia de polimorfismos en regiones codificantes en algunos genes V (Plaza *et al.*, 1991; Reyburn *et al.*, 1993) y en  $C\alpha$  (Bragado *et al.*, 1994). Hasta ahora no hay evidencia de que este polimorfismo implique diferencias funcionales.

### 1.1.2.- Estructura tridimensional del TCR.

El análisis comparativo de la secuencia de las cadenas del TCR con la de las cadenas de las  $Ig$  permitió predecir que la estructura de éste sería muy similar a la de las primeras (Chothia *et al.*, 1988). Recientemente se han cristalizado, por separado, los dominios extracelulares de las cadenas  $\beta$  (Bentley *et al.*, 1995) y  $\alpha$  (Fields *et al.*, 1995) con una resolución de 1,7Å y 2,2Å respectivamente. Los resultados confirman la gran similitud de la estructura del TCR con  $Ig$ , aunque revelan la existencia de ciertas diferencias. La estructura de las regiones CDR1 y CDR2  $\beta$  permite un menor número de conformaciones en el TCR que en  $Ig$  al estar el dominio C muy próximo al V. La cadena  $\alpha$  presenta un giro diferente al de  $Ig$  que le permite formar homodimeros que podrían dar origen a la formación de tetrameros  $(\alpha\beta)_2$ . Se predice también la posible disposición del TCR en la interacción con el tetramero  $(\alpha\beta)_2$  de clase II: CDR3 $\alpha$  estaría sobre el extremo N-terminal del péptido antigénico, y CDR3 $\beta$  sobre el extremo C-terminal (Fields *et al.*, 1995).

## 1.2.- El Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC) y la presentación de antígeno a los linfocitos T.

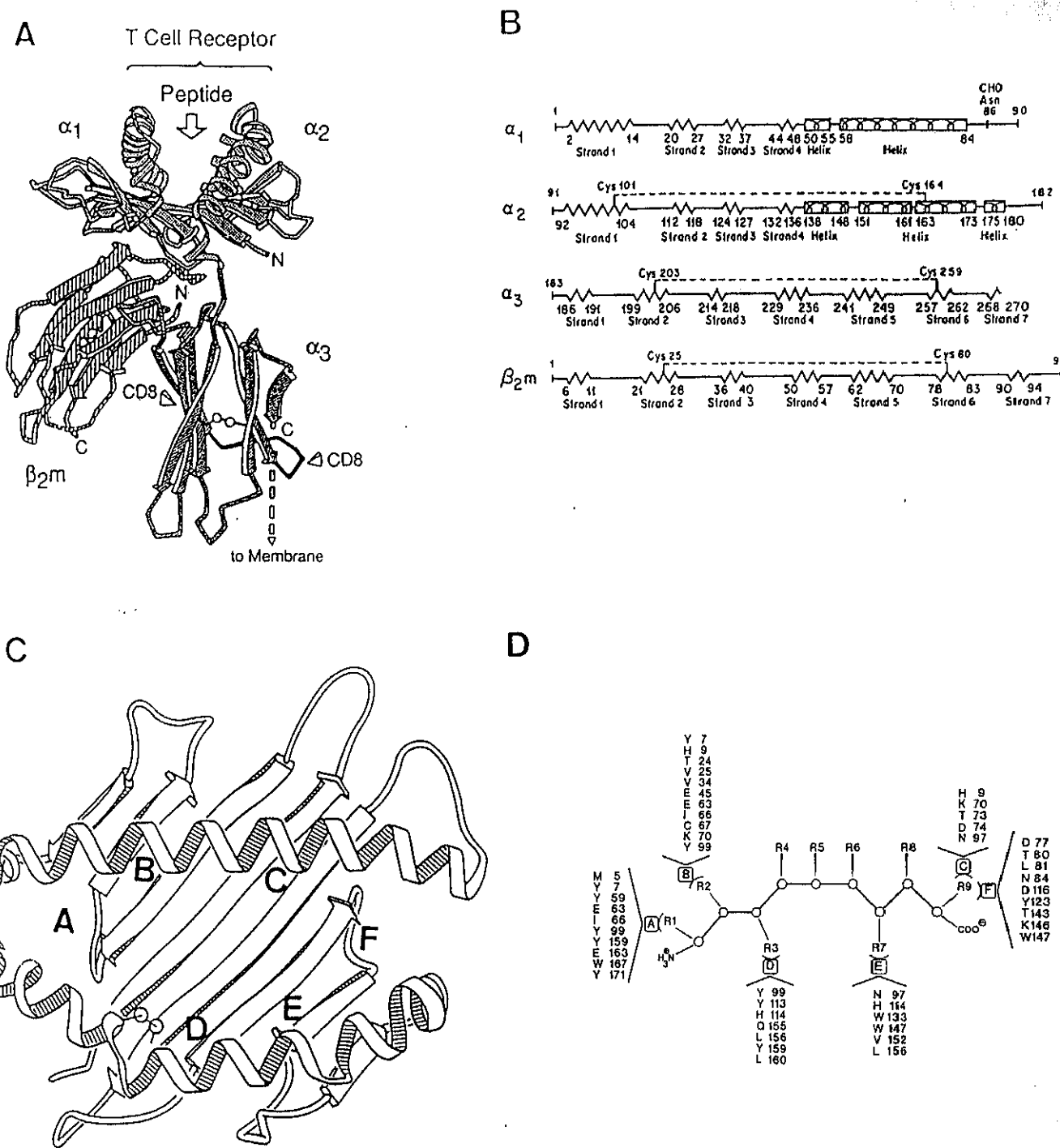
El MHC, denominado HLA en humanos, es un sistema de genes localizado en el brazo corto del cromosoma 6. Ocupa un segmento de 4000kb de DNA dividido en tres regiones: clase I en el extremo telomérico del complejo, clase II en el extremo centromérico, y entre ellos, los genes de clase III que incluyen, entre otros, aquellos que codifican para las proteínas del Sistema del Complemento. Las dos primeras regiones incluyen los genes que codifican para los antígenos de clase I y los de clase II, cuya función es presentar péptidos antigénicos a los linfocitos T (Smell *et al.*, 1976; Mason y Morris, 1986). Existen dos vías de presentación de antígeno (Yewdell y Bennink, 1990). En la vía exógena, las células presentadoras de antígeno (APC) capturan los antígenos extracelulares, los internalizan y degradan en su compartimento endosómico. Algunos de estos productos de degradación se unen a los antígenos de clase II y se presentan en superficie donde son reconocidos por los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, cuya función principal es cooperar en la activación de células efectoras. En la vía endógena, proteínas de parásitos intracelulares o propias sintetizadas endógenamente son degradadas en el citosol y algunos de los péptidos producidos son transportados al interior del retículo endoplásmico donde se unen a los antígenos de histocompatibilidad de clase I para ser presentados en superficie a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, que poseen actividad citolítica.

El polimorfismo es una de las principales características de los antígenos de clase I y clase II, ya que determina la especificidad de presentación de péptidos en estas moléculas.

### 1.2.1.- Estructura general y organización génica de los antígenos HLA de clase I.

Los antígenos de clase I son glicoproteínas de membrana pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas. Constan de dos cadenas polipeptídicas, una pesada, la cadena  $\alpha$ , polimórfica, de aproximadamente 44kD, codificada en el MHC y unida de forma no covalente a una cadena ligera invariante, la  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2m), de aproximadamente 12kD, no codificada en el MHC (Ploegh *et al.*, 1981) (Figura 2). En la cadena pesada se distingue una región extracelular de 274 aa, una región transmembrana hidrofóbica de 25 aa y una región intracitoplásmica hidrofílica de 30 aa (Ploegh *et al.*, 1981). La región extracelular está formada por tres dominios de unos 90 aa, denominados  $\alpha$ 1 (1-90),  $\alpha$ 2 (91-182) y  $\alpha$ 3 (183-274). Los





**Figura 2.** A) Representación esquemática de la estructura tridimensional de la porción extracitoplasmática de las moléculas MHC de clase I (tomado de Lawlor *et al.*, 1990). B) Esquema de la estructura secundaria de la molécula (tomado de Bjorkman *et al.*, 1987a). C) Representación del sitio de unión de antígeno. Se indica la localización de las subcavidades A - F (adaptado de Bjorkmann *et al.*, 1987b). D) Representación esquemática de la interacción péptido-MHC de clase I. En la figura se indican las subcavidades del sitio de unión de antígeno en las que se alojan las cadenas laterales del péptido. Los residuos R4, R5, R6 y R8 son accesibles al medio. Las subcavidades E y C/F forman en HLA-B27 una sola gran cavidad. Se especifica, también, los residuos que en cada subcavidad interaccionan con cada posición del péptido (adaptado de Villadangos *et al.*, 1992).

dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  presentan una cierta homología entre sí (Orr *et al.*, 1979a). El dominio  $\alpha_3$  es homólogo a la cadena ligera  $\beta_{2m}$  y ambas son a su vez homólogas a los dominios constantes de las inmunoglobulinas (Orr *et al.*, 1979b). Los dominios  $\alpha_2$ ,  $\alpha_3$  y  $\beta_{2m}$  tienen puentes disulfuro intradominio. En el dominio  $\alpha_1$  existe un enlace N-glicosídico con un carbohidrato de unos 3,3kD (Ferguson *et al.*, 1979) (Figura 2).

Existen tres loci altamente polimórficos que codifican para antígenos de clase I humanos clásicos: HLA-A, B y C (Koller *et al.*, 1989). Los genes respectivos están organizados en 8 exones que ocupan 3,3kb separados por 7 intrones. El primer exón codifica una región de 18 nucleótidos 5' no traducida, seguida de los 24 tripletes de codones que codifican el péptido señal. Los exones 2 (270 nucleótidos), 3 y 4 (276 nucleótidos) codifican para los dominios  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$  y  $\alpha_3$  respectivamente. El exón 5 (117 nucleótidos) codifica el dominio transmembrana y los residuos que lo flanquean. Los exones 6 (33 nucleótidos) y 7 (48 nucleótidos) codifican para el dominio intracitoplásmico. El exón 8 (400 nucleótidos) contiene dos codones codificantes en su extremo 5' para los residuos C-terminales del dominio intracitoplásmico y la también la región 3' no traducida.

### 1.2.2.- Estructura tridimensional de los antígenos de clase I.

La estructura tridimensional de los antígenos de clase I se determinó mediante estudios de difracción de rayos-X. Se conoce la estructura de tres antígenos humanos: HLA-A2 (Bjorkman *et al.*, 1987a; Bjorkman *et al.*, 1987b; Saper *et al.*, 1991), HLA-Aw68 (Garret *et al.*, 1989; Guo *et al.*, 1992; Silver *et al.*, 1992) y HLA-B27 (Madden *et al.*, 1991; Madden *et al.*, 1992); y de dos antígenos murinos: H-2K<sup>b</sup> (Fremont *et al.*, 1992) y H-2D<sup>b</sup> (Young *et al.*, 1994). La estructura de las distintas moléculas de clase I es muy similar, como cabría esperar de la similitud de sus secuencias y de su función.

Los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ , situados en el extremo distal a la superficie celular, presentan un mismo plegamiento terciario, mientras que el dominio  $\alpha_3$  es análogo al de la  $\beta_{2m}$ , encontrándose ambos cerca de la membrana (Figura 2). Los dominios  $\alpha_3$  y  $\beta_{2m}$  presentan una estructura de "sandwich" compuesto por dos láminas de cuatro y tres cadenas  $\beta$  antiparalelas unidas por puentes disulfuro, típica de los dominios constantes de inmunoglobulinas (Becker y Reeke, 1985; Bjorkman *et al.*, 1987a). Los dominios  $\alpha_3$  y  $\beta_{2m}$  interaccionan a través de la lámina  $\beta$  de cuatro

cadena y forman un ángulo de  $146^\circ$ , con un desplazamiento de la  $\beta_m$  hacia  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  de  $13\text{\AA}$ .

Los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  son prácticamente idénticos. Su porción N-terminal está formada por cuatro cadenas  $\beta$  plegadas, que forman una lámina  $\beta$  antiparalela, mientras que su región C-terminal tiene configuración de hélice  $\alpha$ . La hélice  $\alpha$  de  $\alpha_1$  está formada por una pequeña (residuos 50 a 55), seguida por una de mayor tamaño (residuos 58 a 84), que forma con la anterior un ángulo de  $110^\circ$ . En el dominio  $\alpha_2$ , una primera hélice  $\alpha$  (residuos 138 a 148) precede a una segunda, de mayor tamaño (residuos 151 a 173), girada en el residuo 162. Ambas forman un ángulo de  $130^\circ$ . Este dominio posee además otra hélice  $\alpha$  corta (residuos 177-180) que lo conecta con el dominio  $\alpha_3$ . Las cuatro bandas  $\beta$  de cada dominio forman una única lámina  $\beta$  antiparalela. Las hélices  $\alpha$  de estos dos dominios coronan esta lámina  $\beta$ , enfrentándose una a otra con una separación  $18\text{\AA}$ . Los dos dominios están conectados por enlaces de hidrógeno entre las cadenas  $\beta$  N-terminales de cada dominio, situadas en el centro de la lámina  $\beta$ , y por enlaces entre la región C-terminal de cada hélice  $\alpha$  y residuos de la lámina  $\beta$  del otro dominio.

### 1.2.3.- Estructura del sitio de unión de péptido de los antígenos de clase I.

La estructura tridimensional de  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  forma una cavidad entre las dos hélices  $\alpha$  de  $25\text{\AA}$  de longitud y  $10\text{\AA}$  de anchura y  $11\text{\AA}$  de profundidad. Sus paredes están formadas por las cadenas laterales de algunos de los residuos de dichas hélices  $\alpha$ , y su base por residuos de las láminas  $\beta$  centrales. Esta cavidad aloja los péptidos antigénicos. La determinación de la estructura cristalográfica a alta resolución de HLA-Aw68 (Garret *et al.*, 1989) y HLA-B27 (Madden *et al.*, 1991) unidos a un conjunto de péptidos endógenos, y la de HLA-Aw68 (Silver *et al.*, 1989), HLA-A2 (Madden *et al.*, 1993), H-2K<sup>b</sup> (Fremont *et al.*, 1992) y H-2D<sup>b</sup> (Young *et al.*, 1994) unidos a péptidos individuales de origen viral ha permitido conocer las características de la unión de péptidos antigénicos a las moléculas de clase I.

Se han definido seis subcavidades (A - F) dentro del sitio de unión de péptidos, que se localizan en la intersección de la lámina  $\beta$  y las hélices  $\alpha$  (B, C, D y E) o entre las dos hélices  $\alpha$  (A y F). Su tamaño, forma y polaridad está determinado por los residuos que las forman, que en su mayoría son polimórficos (Figura 2).

Los péptidos, habitualmente nonámeros en conformación extendida, están fuertemente unidos a la molécula de MHC, con sus extremos N y C-terminales interaccionando con residuos

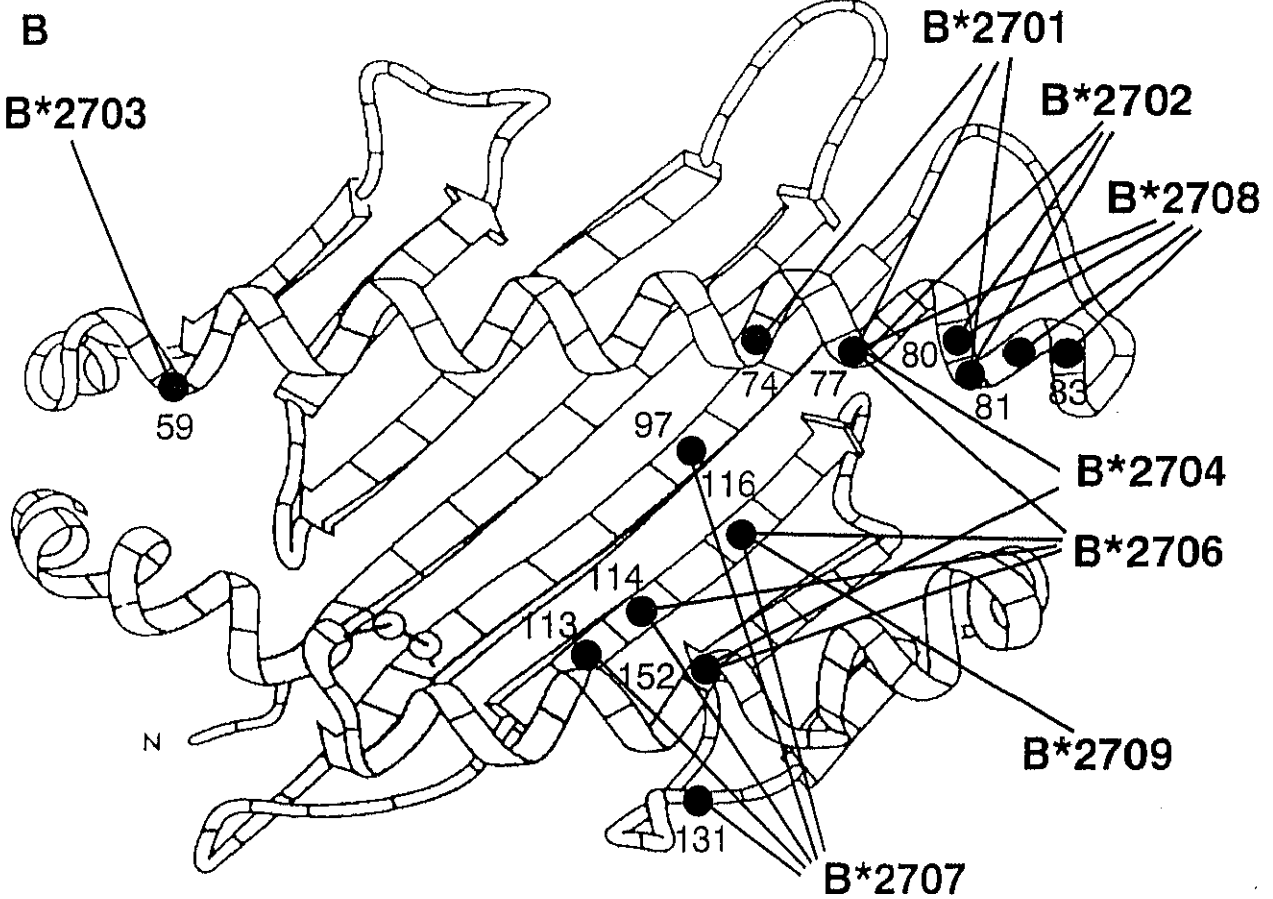
situados en las subcavidades A y F respectivamente. La mayoría de los contactos se establecen con átomos del esqueleto carbonado del péptido y con sus extremos N y C-terminales. Además, ciertas cadenas laterales del péptido interactúan con residuos de las moléculas de MHC que forman estas subcavidades. Otras cadenas laterales del péptido se proyectan hacia el medio y son accesibles al contacto con el TCR, determinando la antigenicidad del complejo (Figura 2).

### 1.3.- HLA-B27 y su polimorfismo molecular.

HLA-B27 adquiere un interés especial entre los antígenos de clase I por su vinculación a un conjunto de espondiloartropatías, principalmente la espondilitis anquilosante y la artritis reactiva, aunque se desconoce el mecanismo de esta asociación (Brewerton *et al.*, 1973). Se han definido nueve subtipos estructurales y funcionales de este antígeno (HLA-B\*2701 a HLA-B\*2709) que se diferencian entre sí en 1 a 5 aa en los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  (López de Castro, 1989; Choo *et al.*, 1991; Del Porto *et al.*, 1994; Hildebrand *et al.*, 1994) (Figura 3). B\*2704 y B\*2706 se distinguen, además, del resto de los subtipos por un cambio adicional, de Gly en vez de Ala211, en el dominio  $\alpha_3$  (Rudwaleit *et al.*, 1996)

Los cambios que distinguen a los 9 subtipos, a excepción de las posiciones 131 y 211, se localizan en el sitio de unión de péptido y, salvo los residuos 82 y 83, poseen sus cadenas laterales orientadas hacia él, contribuyendo por lo tanto a su estructura (Figura 3). Casi todos estos cambios se localizan en la subcavidad E/C/F. El cambio que distingue a B\*2705 de B\*2703 (Tyr a His 59) se localiza en la subcavidad A (Rojo *et al.*, 1987; Choo *et al.*, 1988). Este cambio es único ya que la Tyr59 se encuentra conservada entre todas las moléculas de clase I. La Tyr59 contribuye a estabilizar la unión del péptido a la molécula de clase I mediante la interacción con el extremo N-terminal del péptido a través de una red de puentes de hidrógeno a los que contribuyen otras posiciones de la subcavidad A (Saper *et al.*, 1991; Madden *et al.*, 1992; Madden, 1995). Por el contrario, los residuos que forman la subcavidad B (9, 24, 34, 45 y 67) y los más próximos a ella (7, 63, 66, 70 y 99) se conservan entre los subtipos, y su combinación es única entre las moléculas HLA de clase I. Dado que la subcavidad B es altamente polimórfica, en particular entre los productos del locus B, la conservación de su estructura entre los subtipos de HLA-B27 sugiere que esta subcavidad juega un papel importante para su función y especificidad, lo que explicaría su conservación a lo largo del proceso evolutivo de HLA-B27.

| A      | Residue |     |     |     |     |     |     |       |     |     |     |     |     |
|--------|---------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|
|        | 59      | 74  | 77  | 80  | 81  | 82  | 83  | 97    | 113 | 114 | 116 | 131 | 152 |
| B*2705 | Tyr     | Asp | Asp | Thr | Leu | Leu | Arg | Asn   | Tyr | His | Asp | Ser | Val |
| B*2701 | -       | Tyr | Asn | -   | Ala | -   | -   | -     | -   | -   | -   | -   | -   |
| B*2702 | -       | -   | Asn | Ile | Ala | -   | -   | -     | -   | -   | -   | -   | -   |
| B*2703 | His     | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -     | -   | -   | -   | -   | -   |
| B*2704 | -       | -   | Ser | -   | -   | -   | -   | -     | -   | -   | -   | -   | Glu |
| B*2706 | -       | -   | Ser | -   | -   | -   | -   | -     | -   | Asp | Tyr | -   | Glu |
| B*2707 | -       | -   | -   | -   | -   | -   | -   | Ser   | His | Asn | Tyr | Arg | -   |
| B*2708 | -       | -   | Ser | Asn | -   | Arg | Gly | -     | -   | -   | -   | -   | -   |
| B*2709 | -       | -   | -   | -   | -   | -   | -   | -     | -   | -   | His | -   | -   |
| POCKET | A       | C/F | C/F | C/F | C/F |     |     | E,C/F | D   | D,E | C/F |     | E   |



**Figura 3.** A) Diferencias entre los subtipos de HLA-B27. En la figura se indican las posiciones que diferencian a los subtipos así como las subcavidades en las que se localizan. Además de estos cambios, B\*2704 y B\*2706 se diferencian de los otros subtipos en un cambio en  $\alpha_3$  (Gly en vez de Ala211). B) Localización espacial de las posiciones que son polimórficas en los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  entre los subtipos de HLA-B27. Se indican las posiciones que cambian con respecto a B\*2705 (tomado de López de Castro, 1996).

### 1.3.1. Péptidos que unen HLA-B27.

En la estructura tridimensional de HLA-B27, refinada a 2,1Å de resolución, se observa una clara densidad electrónica en el sitio de unión (Madden *et al.*, 1991) que ha permitido obtener una imagen detallada del conjunto de péptidos que se unen a esta molécula y de sus interacciones con ella. Los péptidos unidos a HLA-B27 son generalmente noámeros en conformación extendida, aunque también se han caracterizado péptidos más largos (Rötzschke *et al.*, 1994; Urban *et al.*, 1994), algunas de cuyas cadenas laterales se introducen en las distintas cavidades del sitio de unión (Figura 2). Esta disposición permite la formación de múltiples enlaces de hidrógeno con el esqueleto del péptido. La mayoría de los contactos entre el péptido y la molécula de HLA-B27 se concentran en los extremos del sitio de unión (cavidades A y C/F), donde se acomodan los extremos N y C-terminales del péptido, respectivamente. En la zona central, la cadena principal del péptido se arquea hacia arriba, y por debajo, y a lo largo del péptido, se unen doce moléculas de H<sub>2</sub>O. Los péptidos presentan un giro entre P3 y P4. Los grupos N y C-terminales se sitúan en los extremos del sitio de unión. La estructura de las subcavidades secundarias que unen P2, P3 y P9 y en menor medida P7, sugieren restricciones sobre las cadenas laterales que pueden unirse, siendo la más importante la de P2. La cadena lateral de P3 se sitúa en la cavidad apolar D, cerca de la Leu156 y de las cadenas laterales de Tyr99, Tyr159 e His114. Las posiciones P7 y P9 se sitúan en dos cavidades (E y C/F), que en HLA-B27 forman una gran cavidad polar y cargada entre los dos residuos Asp74 y Trp147. La cadena lateral de P7 apunta hacia la His114 y el Asp97 y la de P9 puede introducirse en el sitio de unión y establecer contactos con residuos cargados negativamente como Asp116 o Asp77, o si su cadena lateral es más corta, con residuos no polares como Thr143, Trp147, Leu81 o Tyr123.

La cadena lateral de P1 parece dictar la posición de la cadena principal del péptido en el sitio de unión. Las cadenas laterales P4, P5, P6 y P8 están orientadas hacia el solvente y expuestas. La cadena lateral de P6 se sitúa entre la Ala69 y Lys70 situadas en la hélice  $\alpha$  de  $\alpha_1$ .

Por otra parte, se han determinado las secuencias de péptidos endógenos unidos a B\*2705 y a B\*2702 (Rötzschke *et al.*, 1992; Rötzschke *et al.*, 1994), que corresponden a proteínas intracelulares. Aunque el conjunto de péptidos es heterogéneo, posee una serie de características comunes. Todos ellos presentan Arg en la posición 2 (P2), aunque, excepcionalmente se han aislado de HLA-B27 en ratas transgénicas péptidos con otros residuos en esta posición

(Feltkamp et al., 1996). En P1 estos péptidos tienen preferencia por residuos básicos. En P9, los péptidos eluidos de B\*2705 presentan preferencia por residuos básicos, alifáticos o aromáticos. En B\*2702 predominan en P9 los residuos aromáticos, en menor proporción los alifáticos, pero no se detectan residuos básicos. En P3 predominan los residuos hidrofóbicos y en P7 los residuos no polares o residuos polares poco voluminosos. El resto de las posiciones, P4, P5, P6 y P8 no presentan restricción para un tipo determinado de residuos.

### 1.3.2.- Frecuencia y distribución étnica de los subtipos de HLA-B27.

La frecuencia con que HLA-B27 aparece en la población es aproximadamente de un 3,4% en caucasoideos, 1,9% en negros americanos y un 1,6% en orientales. Los indios de Norteamérica y los esquimales son las poblaciones donde HLA-B27 se encuentra con mayor frecuencia. HLA-B27 está en muy baja frecuencia en negros africanos y ausente en las poblaciones aborígenes de América del Sur (Baur *et al.*, 1984).

El 90% de la población caucasoide y el 45% de la oriental HLA-B27<sup>+</sup> es HLA-B\*2705, y éste es también el subtipo mayoritario en otras poblaciones. Los subtipos B\*2701 y B\*2702 sólo se han encontrado en caucasoideos; B\*2701 tan solo se ha detectado en 2 individuos, mientras que B\*2702 se encuentra aproximadamente en el 5 al 10% de esta población (Choo *et al.*, 1986) y es el subtipo predominante entre los judíos (Gonzalez-Roces *et al.*, 1994) y en una población de gitanos españoles (De Pablo *et al.*, 1992). B\*2704 es minoritario en caucasoideos, con una frecuencia de un 1%, sin embargo es predominante en la población oriental (55%). B\*2706 se ha encontrado solamente en poblaciones orientales y B\*2703 solamente en negros americanos y en África Occidental, donde parece ser el subtipo mayoritario (Choo *et al.*, 1986; Hill *et al.*, 1990). B\*2707 es minoritario en poblaciones de la India y Tailandia (Khan, 1995). B\*2708 y B\*2709 son minoritarios en caucasoideos (López de Castro, 1996) siendo el subtipo B\*2709 abundante en la población de Cerdeña (Del Porto *et al.*, 1994).

### 1.3.3.- HLA-B27 y espondiloartropatías.

La espondilitis anquilosante es una enfermedad inflamatoria crónica que afecta predominantemente a las articulaciones. Su patogenia no es conocida, pero el 96% de los individuos que la padecen son HLA-B27<sup>+</sup>. Un 4% de los individuos HLA-B27<sup>+</sup> están afectados

(Brewerton *et al.*, 1973).

Al menos los subtipos B\*2702, B\*2704, B\*2705 y B\*2707 se asocian con la espondilitis anquilosante (Breuer-Vriesendorp *et al.*, 1987; Khan, 1995), lo que sugiere que si el mecanismo patogénico está mediado por un péptido, este debe poder ser presentado al menos por estos subtipos y ser reconocido en todos ellos por CTL (Benjamin y Parham, 1990). La posible asociación de B\*2703 a enfermedad es discutida, puesto que este subtipo es mayoritario en negros del Africa Occidental, que no desarrollan espondilitis anquilosante asociada a HLA-B27 (Hill *et al.*, 1991). Sin embargo, esta enfermedad tampoco se desarrolla en individuos B\*2705<sup>+</sup> de la misma población, lo que sugiere que la carencia de espondilitis anquilosante asociada a HLA-B27 en negros africanos es debida a otros factores genéticos o ambientales. Recientemente, se ha descrito la existencia de individuos B\*2703<sup>+</sup> de la población norteamericana que sufren espondiloartropatías (Feltkamp *et al.*, 1996). En un estudio de población realizado en Tailandia se ha visto que B\*2706 no está asociado a la espondilitis anquilosante en esa población (López-Larrea *et al.*, 1995), aunque se conocen individuos B\*2706<sup>+</sup> de origen indonesio que padecen esta enfermedad (Feltkamp *et al.*, 1996). Otro estudio reciente sugiere que B\*2709 no está asociado a la espondilitis anquilosante en la población de Cerdeña (D'Amato *et al.*, 1995).

Distintas hipótesis tratan de explicar la asociación de HLA-B27 con la espondilitis anquilosante. Se ha propuesto que el causante de la enfermedad podría ser un gen en desequilibrio de ligamiento con HLA-B27 (Keat, 1986), pero estudios genéticos (Lothead *et al.*, 1983) y de RFLP (polimorfismo de fragmentos de restricción) (Reveille *et al.*, 1988) no han encontrado ningún gen distinto asociado con la susceptibilidad de padecer la enfermedad. Por el contrario, se ha demostrado una asociación directa entre la expresión de HLA-B27 y la aparición de una patología similar a la artritis reactiva en ratas transgénicas para HLA-B27, cuyo desarrollo necesita de altos niveles de expresión del transgén (Hammer *et al.*, 1990).

Para explicar el mecanismo de asociación se ha propuesto la participación directa de los linfocitos T en la patogenia de esta enfermedad, no siendo necesaria la expresión de HLA-B27 en las células no linfoides de los órganos afectados, pero sí en las células linfoides y monocíticas (Brebán *et al.*, 1993). Otras hipótesis, basadas en la asociación existente entre algunas artritis reactivas e infecciones por bacterias enteropatógenas, sugieren que HLA-B27 podría presentar localmente un péptido artritogénico endógeno semejante a algún péptido de origen bacteriano.



Tras una infección por estas bacterias, se desencadenaría una reacción cruzada contra las células que expresaran el péptido endógeno. Los linfocitos T jugarían un papel fundamental en esta respuesta. Entre las evidencias que apoyan esta última teoría tenemos: (a) que algunas bacterias intracelulares (*Yersinia*, *Shigella* y *Klebsiella*) son capaces de desencadenar la enfermedad (Kingsley y Sieper, 1993), (b) que algunos péptidos derivados de ellas pueden ser presentados por antígenos de clase I e inducir respuesta mediada por CTL (Aggarwal *et al.*, 1990), y (c) que en el líquido sinovial de pacientes con artritis reactiva y espondilitis anquilosante se ha observado la presencia de CTL restringidos por HLA-B27 específicos contra bacterias así como CTL autorreactivos anti-HLA-B27 (Hermann *et al.*, 1993). Así pues, el mecanismo de asociación de HLA-B27 a las espondiloartropatías parece implicar directamente las características estructurales, antigénicas y/o presentadoras de péptido de esta molécula.

#### **1.4.- Respuestas alorreactivas anti-HLA-B27.**

##### **1.4.1.- Alorreconocimiento.**

La fuerte respuesta de las células T contra aloinjertos dio lugar al descubrimiento y definición de los antígenos de trasplante. Posteriores análisis permitieron identificar las moléculas implicadas como las proteínas codificadas por los genes del MHC. La respuesta alogénica "in vivo" tiene su paralelismo "in vitro" en el cultivo mixto de linfocitos. Los antígenos convencionales activan una fracción muy pequeña de precursores de linfocitos T mientras los aloantígenos activan más del 1% de estas células. Se han propuesto dos hipótesis para explicar la alta frecuencia de precursores. En la primera, cada complejo MHC-péptido podría estimular una población diferente de células T (Matzinger y Bevan, 1977). Un determinado péptido antigénico puede ocupar una pequeña fracción de las moléculas del MHC en la superficie de las células presentadoras de antígeno, por lo que la densidad de antígeno por determinante antigénico sería baja. En la segunda hipótesis, las células T alorreactivas reconocerían directamente la molécula alogénica. En consecuencia, las moléculas de MHC "no propias", funcionando como ligandos, alcanzarían una alta densidad de determinantes antigénicos (Bevan, 1984).

La mayoría de las células T alorreactivas reconocen al aloantígeno MHC y/o los péptidos que une. Estas células suelen ser citotóxicas para el injerto y causan el rechazo agudo

(Lechler *et al.*, 1990). Un segundo grupo podría reconocer el aloantígeno indirectamente, por ejemplo, tras ser procesado y presentado por las APC del huésped. Este subgrupo, con una frecuencia de precursores sensiblemente más baja, podría ayudar a la producción de anticuerpos anti-MHC del respondedor, mediando el rechazo crónico (Benichou *et al.*, 1992; Fangmann *et al.*, 1992).

Nuestro laboratorio se ha centrado en la respuesta alogénica anti-HLA-B27 para analizar las interacciones HLA/péptido/TCR en la totalidad del espectro antigénico de esta molécula.

#### **1.4.2.- Especificidad clonal de la respuesta alorreactiva anti-B\*2705 y anti-B\*2703: relaciones antigénicas entre subtipos de HLA-B27.**

El polimorfismo de HLA-B27 podría modular su antigenicidad, y consecuentemente su relación con la espondilitis anquilosante, si las células T están implicadas en la patogenia de la enfermedad. En nuestro laboratorio se abordó la cuestión de la relación antigénica entre B\*2705, el subtipo principal de HLA-B27, y otros subtipos mediante el análisis de la especificidad fina de CTL alorreactivos. Se analizaron un total de 84 CTL anti-B\*2705 de cuatro respondedores no relacionados y 36 CTL anti-B\*2703 de dos de estos respondedores (López *et al.*, 1994). La especificidad fina de los CTL se determinó por medio de su análisis frente a un panel de LCL. En el análisis de los CTL anti-B\*2705 el subtipo que presentaba mayor número de reacciones cruzadas era B\*2703, ya que un 48% de los CTL lo reconocían. Los subtipos menos reconocidos en reacción cruzada fueron B\*2704 (12%) y B\*2706 (9%). Los subtipos de HLA-B27 se pueden ordenar en función del número de CTL anti-B\*2705 que los reconocen en reacción cruzada de la siguiente manera: B\*2705 > B\*2703 > B\*2702 > B\*2701 > B\*2704 > B\*2706.

En el análisis de CTL anti-B\*2703 destaca el elevado porcentaje de CTL que reconocen a B\*2705. Lo que significa que la gran mayoría de los epítomos aloespecíficos de B\*2703 están presentes en B\*2705. Como el porcentaje de CTL anti-B\*2705 que reconocen en reacción cruzada B\*2703 es significativamente menor que el porcentaje de CTL anti-B\*2703 que reconocen en reacción cruzada a B\*2705, se puede concluir que hay más epítomos aloespecíficos de B\*2705 ausentes de B\*2703 que la situación inversa. Una posible explicación a esto es que el cambio His59 en B\*2703 disminuye la estabilización del grupo amino-terminal del péptido unido. Por lo tanto, muchos péptidos se unirían a B\*2703 con una afinidad significativamente

menor que a B\*2705 o incluso podrían no unirse. Solamente un 22% de los CTL anti B\*2703 no reconocen en reacción cruzada a B\*2705, lo que significa que la His59 origina pocos epítomos nuevos. Esto implica que B\*2703 es antigénicamente defectivo en relación a B\*2705, y presumiblemente presenta, mayoritariamente, un subgrupo de los péptidos unidos a B\*2705. La aparición de nuevos epítomos en B\*2703 se podría explicar por tres mecanismos: (a) algunos péptidos que no se pueden unir a B\*2705 podrían unirse a B\*2703; (b) un mismo péptido podría adoptar diferentes conformaciones en función del subtipo que lo presenta; (c) La His59 podría generar, por sí misma, algún cambio antigénico péptido-independiente. Usando mutantes puntuales de B\*2705 se obtuvo más evidencia de las diferencias en el alorreconocimiento de HLA-B27 entre CTL anti-B\*2705 y anti-B\*2703 (Villadangos *et al.*, 1994a). Los cambios en los residuos 167 y 171, en la subcavidad A, afectan menos a los CTL anti-B\*2703 que a los CTL anti-B\*2705. Por el contrario, el cambio Met por Glu45, en la subcavidad B, que es crítico para el anclaje del motivo Arg2 que comparten los péptidos unidos a HLA-B27 (Madden *et al.*, 1992), afecta más radicalmente a CTL anti-B\*2703. Estos resultados indican que los CTL anti-B\*2703 son menos dependientes de la estructura de la subcavidad A, y sugieren que el cambio en B\*2703 no solo altera la interacción de la subcavidad A con el extremo N-terminal del péptido, sino que también refuerza la interacción de la Arg2 con la subcavidad B.

El fenotipo HLA podría condicionar el repertorio de células T en cada individuo (Akolkar *et al.*, 1993) y por consiguiente podría condicionar la respuesta aloespecífica individual. Por tanto, se planteó la posible existencia de diferencias en las respuestas anti-HLA-B27. Los cuatro respondedores analizados se pueden emparejar en función de las similitudes en sus respuestas anti-B\*2705. Así, mientras en dos respondedores (PA y DL) no se encontraron CTL que reconocieran en reacción cruzada a B\*2704 o B\*2706, en otros dos (GM y SR) un elevado porcentaje de CTL reconocía a uno o ambos de estos subtipos. Las diferencias observadas en la especificidad fina en las respuestas anti-B\*2705 se correlacionan con el haplotipo de clase I de cada respondedor, y en particular con el dimorfismo Val/Glu de la posición 152 de los antígenos HLA-B. PA (HLA-B35, 39) y DL (HLA-B39, 44) tienen Val152 y las únicas reacciones cruzadas que presentaban sus CTL anti-B\*2705 eran con los subtipos que tienen Val152 (B\*2701 a B\*2703). Por el contrario GM (HLA-B7, B8) y SR (HLA-B7, B44) tienen respectivamente un antígeno con Glu152 (HLA-B7) y otro con Val152 (HLA-B8 y HLA-B44, respectivamente) y

presentaban reacciones cruzadas con subtipos con Val152 (B\*2701 a B\*2703) y Glu152 (B\*2704 y B\*2706) (López *et al.*, 1994).

También se estudió la estructura de los epítomos específicos de HLA-B27 reconocidos por los CTL anti-B\*2705. Para ello se analizaron 27 CTL anti-B\*2705 de los respondedores DL, GM y SR con mutantes de B\*2705 que presentan cambios en distintos residuos de las subcavidades del sitio de unión de antígeno (Villadangos *et al.*, 1994a). Se observó que cualquier mutación alteraba el alorreconocimiento y que esta alteración se correlacionaba, en gran medida, con el efecto esperado de la mutación en la presentación de péptidos. Determinadas mutaciones producían diferentes efectos en CTL procedentes de distintos respondedores, lo que sugiere que cada individuo responde preferentemente a epítomos con una estructura determinada. Por ejemplo, en los CTL del respondedor GM la mutación D→Y116 tenía un gran efecto, mientras la L→A81 era irrelevante, lo que sugiere que respondían preferentemente contra epítomos que implicaban péptidos con un grupo C-terminal que necesitaba para su estabilización Asp116 y no Leu81 en la subcavidad C/F. Como el residuo Asp116 se encuentra en la mayoría de los subtipos de HLA-B27, esto explicaría el amplio patrón de reacciones cruzadas en este respondedor con los distintos subtipos de un número relativamente elevado de sus CTL. En el respondedor SR se observó el efecto contrario. Los CTL de este respondedor reconocerían epítomos con residuos C-terminales más cortos o no polares, que serían menos dependientes de Asp116 y más sensibles a cambios en el residuo 81 (Madden *et al.*, 1991). Esto sugiere que los CTL alorreactivos de los respondedores GM y SR muestran preferencias por diferentes grupos de péptidos. Los CTL del individuo DL reconocen principalmente epítomos muy dependientes de la estructura intacta de B\*2705 porque cualquier mutación tiene un gran efecto sobre el alorreconocimiento en este respondedor. Esto explicaría que los CTL de este individuo presenten pocas reacciones cruzadas.

Las características estructurales de los epítomos alorreactivos de HLA-B27 reveladas en los estudios con mutantes han de interpretarse de acuerdo a nuestro conocimiento de la estructura de los complejos HLA + péptido reconocidos por los CTL. A la estructura de los determinantes antigénicos contribuyen tanto la molécula del aloantígeno como los diferentes péptidos a ella unidos (Clayberger *et al.*, 1987; Marrack y Kappler, 1988; Song *et al.*, 1988; Heath *et al.*, 1989; Heath *et al.*, 1991; Rojo *et al.*, 1991; Sherman y Cattopadhyay, 1993). Existe evidencia de que los CTL alorreactivos dependen de péptido de una manera muy variable, que va desde

los estrictamente específicos de péptido a los que reconocen motivos comunes a varios péptidos, y a los péptido-independientes (Falk *et al.*, 1991; Jardetzky *et al.*, 1991; Rötzschke *et al.*, 1991).

Un ejemplo de estos últimos en la respuesta anti-HLA-B27 lo constituye el CTL anti-HLA-B\*2704 64.8P (Jaraquemada *et al.*, 1988). Este CTL reconoce todos los subtipos de B27 que presentan cambios en la subcavidad C/F de la molécula y los mutantes con cambios en esta zona. Sin embargo, no reconoce B\*2703, que tiene un cambio en la subcavidad A, ni los mutantes con cambios en las subcavidades A y B (Jaraquemada *et al.*, 1988; Villadangos *et al.*, 1994b). Esta distribución espacial, claramente delimitada, de los cambios en la molécula de HLA-B27 que afectan el reconocimiento por este CTL, sugieren que no presenta especificidad para ningún péptido particular, aunque la integridad estructural de la región de la molécula implicada en la interacción con la porción N-terminal de los péptidos es crítica. La independencia de péptido de este CTL se confirmó ya que fue capaz de lisar los transfectantes HLA-B27<sup>+</sup> en las células murinas RMA-S, deficientes en TAP (Villadangos *et al.*, 1994b). Esta lisis se inhibía con anticuerpos anti-HLA-B27, lo que indicaba que no era restringida por H-2, y su eficiencia dependía solamente de los niveles de expresión de HLA-B27. Estos resultados indican que el reconocimiento de HLA-B27 por el CTL 64.8P es péptido independiente, o requiere péptidos con el extremo N-terminal conservado. Además sugieren que el TCR de este CTL reconoce HLA-B27 con una topología inusual, que implica solo uno de los extremos del sitio de unión de péptido. Este CTL se aisló en condiciones en que la respuesta anti-B\*2704 fue muy baja, posiblemente por la carencia en este antígeno de epítomos inmunodominantes de HLA-B27 a los que el respondedor pudiera responder vigorosamente (Jaraquemada *et al.*, 1988). Ello sugiere que los CTL alorreactivos independientes de péptido son excepciones.

### **1.5.- Repertorios de TCR implicados en respuestas específicas de péptido y en alorreactividad.**

Se admite que las regiones hipervariables de los segmentos V $\alpha$  y V $\beta$  del TCR, que se denominan CDR1 y CDR2 (región determinante de la complementariedad) por analogía con las inmunoglobulinas, interaccionan principalmente con la proteína del MHC. Las regiones formadas por los segmentos N $\alpha$ /N+D $\beta$  y parte de los segmentos J $\alpha$  y J $\beta$  se denominan CDR3 y se piensa que interaccionan principalmente con los péptidos unidos al MHC (Chothia *et al.*, 1988; Davis y Bjorkman, 1988; Claverie *et al.*, 1989). Aunque este modelo puede ser correcto en

líneas generales, la contribución de los segmentos V y de las regiones de unión a la especificidad, no es independiente. Por ejemplo, en la respuesta de células T a variantes de péptidos que difieren en residuos que afectan al reconocimiento por células T pero no a la unión al MHC, se usan TCR con cambios recíprocos en el CDR3, lo que sugiere la interacción directa de estas regiones con el péptido (Jorgensen *et al.*, 1992). Sin embargo, también se observa en ocasiones el uso de un reducido número de segmentos V $\beta$ , lo que indicaría la contribución de estos segmentos a la especificidad de péptido. En algunos casos el uso restringido de segmentos V es debido a la presencia de determinados residuos en el extremo C-terminal del segmento, que de hecho forman parte de la región CDR3 y contribuyen a la especificidad de péptido (Jorgensen *et al.*, 1992). Sin embargo las regiones CDR1 y/o CDR2 también pueden contribuir a la especificidad de péptido. Por ejemplo, mutaciones en el CDR1 de V $\beta$  anulan el reconocimiento específico en un receptor que reconoce diversos péptidos presentados por I-E<sup>k</sup> (Patten *et al.*, 1993). Estos resultados no implican necesariamente una interacción directa de CDR1 y/o CDR2 con el péptido antigénico, pero sugieren que la integridad estructural de estas regiones se requiere para una interacción efectiva de CDR3 con el péptido.

En las respuestas restringidas específicas de péptido se observa, en general, una heterogeneidad restringida en los segmentos V y J, y en las regiones CDR3 (Casanova y Maryanski, 1993). Sin embargo hay excepciones. Por ejemplo, en CTL específicos de un péptido de *Plasmodium berghei* restringido por H-2K<sup>d</sup> se ha encontrado una alta diversidad de TCR (Casanova *et al.*, 1991). Algunas respuestas específicas de péptido restringidas por clase II son también muy diversas (Haberman *et al.*, 1990; Taylor *et al.*, 1990; Boitel *et al.*, 1992). En estas respuestas es el péptido presentado el que está determinando principalmente la respuesta, por lo que el uso de segmentos del TCR estaría restringido por las características estructurales del péptido presentado.

En las respuestas alorreactivas, debido a la heterogeneidad clonal y al elevado número de péptidos endógenos implicados, se esperaría una gran diversidad de TCR. Sin embargo se ha observado un uso aparentemente no aleatorio de segmentos V $\beta$  en clones de célula T específicos de I-A<sup>bm12</sup> (Bill *et al.*, 1989) o DR4 (Goronzy *et al.*, 1993) y en linfocitos de infiltrados de aloinjertos (Hall *et al.*, 1993; Shirwan *et al.*, 1993), sin restricciones en N+D $\beta$  o J $\beta$ . Se ha estudiado mucho menos el uso de segmentos de la cadena  $\alpha$  y generalmente se ha encontrado

---

una gran diversidad  $V\alpha$ ,  $J\alpha$  y  $N\alpha$  (Bill *et al.*, 1989; Geiger *et al.*, 1991; Hurley *et al.*, 1993). En la respuesta alogénica contra HLA-B35 se ha observado el uso de regiones CDR3 similares en las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  (Steinle *et al.*, 1995). En algunas respuestas alorreactivas, por tanto, parece existir una selección de segmentos  $V\beta$ . Estas respuestas, al ser la molécula presentadora diferente a las propias, están dirigidas contra epítomos que implican tanto la molécula presentadora como el péptido presentado. La variabilidad en el repertorio de TCR indica que el número de epítomos distintos en esta respuesta es grande. Por tanto, al no haber un péptido antigénico único o mayoritario, el sesgo en  $V\beta$  es probablemente por motivos estructurales en las regiones CDR1 y CDR2 y podría estar determinado por la molécula de aloantígeno.

## 2.- OBJETIVOS

---

El objetivo de este trabajo es determinar la estructura de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de TCR expresados en clones citotóxicos alorreactivos anti-HLA-B27 de especificidad fina conocida, para establecer las reglas que gobiernan la selección del TCR en el alorreconocimiento de este antígeno y en concreto:

- 1.- Los patrones de uso de segmentos  $V\alpha$ ,  $J\alpha$ ,  $V\beta$  y  $J\beta$ .
- 2.- La naturaleza, diversidad y características estructurales comunes en las regiones de unión  $V\alpha$ -N- $J\alpha$  y  $V\beta$ -N-D $\beta$ -N- $J\beta$ .
- 3.- La relación entre especificidad fina y estructura de los TCR anti-HLA-B27.
- 4.- La posible relación entre las características estructurales de TCR anti-B27 y el fenotipo HLA del respondedor.
- 5.- Las similitudes y diferencias en el uso de TCR entre respuestas alorreactivas a distintos subtipos de HLA-B27 ( $B^*2705$  y  $B^*2703$ ).

Estos objetivos se desarrollaron:

- 1.- Determinando la estructura de TCR de clones citotóxicos anti- $B^*2705$ , obtenidos en individuos HLA-B27 negativos, de distintos fenotipos HLA.
- 2.- Determinando la estructura de TCR de clones citotóxicos anti- $B^*2703$ , obtenidos en individuos HLA-B27 negativos, de distintos fenotipos HLA.



## 3.- MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 3.1.- Clones de célula T citotóxicas y líneas celulares.

Se analizaron CTL anti-B\*2705 de los donantes GM (HLA-A1, 24; B7, 8; DR1, 3) y SR (HLA-A3, 29; B7, 44; DR2, 7) y clones de CTL anti-B\*2703 de los donantes DL (HLA-A29, 31; B39, 44; DR7) y GM (Tabla 1). Su aislamiento y la caracterización de su especificidad fina han sido previamente descritos (López *et al.*, 1994). Como control se analizaron, de los mismos individuos, clones de células T no-anti-B27, no seleccionados por otros criterios.

#### 3.1.1.- Líneas linfoblastoides B (LCL).

##### 3.1.1.1.- Condiciones de cultivo.

Como células estimuladoras de los CTL se utilizaron las LCL B\*2705<sup>+</sup> R69, LG15 y R15 y las LCL B\*2703<sup>+</sup> LAR y CH. El fenotipo HLA de estas líneas se muestra en la Tabla 1. Se crecieron en medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con L-Gln 2mM, tampón HEPES (GIBCO) 25mM, y 10% de suero de ternera fetal (FCS) (GIBCO) previamente inactivado durante 30min a 56°C. Se crecieron en ausencia de antibióticos en estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa.

##### 3.1.1.2.- Congelación y descongelación de LCL.

Para su congelación se centrifugaron al menos  $1 \times 10^6$  células y se resuspendieron en 0,1 a 0,4 ml de medio completo. El medio de congelación está compuesto por 40% de RPMI 1640, 40% de FCS y 20% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Merck). Se añadió, gota a gota, un volumen igual al de resuspensión (0,1-0,4 ml) de medio de congelación. La mezcla se transfirió a viales de congelación que se mantuvieron durante 3 a 6 horas a -70°C. Pasado este tiempo, los viales se transfirieron a un contenedor de N<sub>2</sub> líquido, donde se almacenaron.

El proceso de descongelación consistió en añadir, gota a gota, de 1 a 2ml de medio de cultivo completo previamente atemperado a 37°C. Esta mezcla se añadió a un tubo estéril que

**Tabla 1.** Combinaciones respondedor/línea estimuladora usadas para obtener los CTL anti-HLA-B27.

| RESPONDEDOR <sup>1</sup> | CÉLULAS ESTIMULADORAS <sup>2</sup> | MLC PRIMARIO        | MLC SECUNDARIO | TRAS EL CLONAJE | CLONES DE CTL <sup>3</sup> |     |
|--------------------------|------------------------------------|---------------------|----------------|-----------------|----------------------------|-----|
| GM                       | B*2705 <sup>+</sup>                | R69                 | ---            | R69             | GRK                        |     |
|                          |                                    | LG15                | ---            | LG15            | GMZ                        |     |
|                          |                                    | LG15                | LG15           | LG15            | A2                         |     |
| SR                       |                                    | R69                 | ---            | R69             | S69, SRF                   |     |
|                          |                                    | R69                 | R69            | R69             | SRY, SRB                   |     |
|                          |                                    | R69                 | R69            | LG15            | SRZ, SRC                   |     |
|                          |                                    | R69                 | R15            | R15             | SLG                        |     |
| DL                       |                                    | B*2703 <sup>+</sup> | CH             | ---             | ---                        | S15 |
|                          |                                    |                     | LAR            | ---             | ---                        | DCD |
|                          | CH                                 |                     | LAR            | ---             | DLL                        |     |
|                          | LAR                                |                     | CH             | ---             | DLH                        |     |
|                          | CH                                 |                     | LAR            | CH              | DCJ                        |     |
| GM                       | CH                                 |                     | LAR            | LAR             | DCI                        |     |
|                          | CH                                 |                     | LAR            | CH              | GLM                        |     |
|                          |                                    |                     |                |                 |                            | GCP |

<sup>1</sup> DL (HLA-A29, 31; B39, 44; DR2, 7), GM (HLA-A1, 24; B7, 8; DR 1, 3), y SR (HLA-A3, 29; B7, 44; DR2,7).

<sup>2</sup> R69 (HLA-A3, 24; B\*2705, 7; DR3, 5), LG15 (HLA-A32; B\*2705; DR1) y R15 (HLA-A3; B\*2705, 35) para CTL anti-HLA-B\*2705, y CH (HLA-A31, 32; B\*2703, 18; DR8, 11), y LAR (HLA-A23, 31; B\*2703, 53) para CTL anti-HLA-B\*2703.

<sup>3</sup> Nombre genérico de los clones de CTL de cada clonaje.

contenía otros 9ml del mismo medio. Se centrifugó durante 5min a 500xg. Se eliminó el sobrenadante, eliminando así el DMSO, y el sedimento celular se resuspendió en medio completo, a una concentración de  $3-5 \times 10^5$  células/ml. Se transfirió el volumen a un frasco de cultivo (Costar) y se mantuvo a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa.

### 3.1.1.3.- Ensayo de detección de micoplasmas en cultivos celulares.

Se siguió un método comercial, el "Mycoplasma T. C. rapid detection system" (Gen-Probe), basado en la hibridación específica con una sonda de DNA tritiada, complementaria del RNA ribosómico de múltiples especies de micoplasmas.

Se partió de 10ml de sobrenadante de cada línea celular. Se centrifugaron a 10.000xg durante 15min, desechándose los sobrenadantes. Los precipitados se resuspendieron en 1,5ml de PBS y se transfirieron a tubos eppendorf, centrifugándose posteriormente a 12.000xg durante 10min. Tras eliminar el sobrenadante, se añadieron, a cada muestra, 200µl de la solución que contiene la sonda tritiada, se agitaron e incubaron en un baño a 72°C durante 2 a 3 horas. Como controles se prepararon dos tubos con 200µl de la sonda y 50µl, respectivamente, de las soluciones de control positivo y negativo. A continuación, los controles y las muestras, se mezclaron con 5ml de una suspensión de separación, compuesta por hidroxapatito, y se transfirieron a un vial de centelleo líquido (Beckman). Se agitaron y se incubaron durante 5min a 72°C. Pasado este tiempo, se volvieron a agitar los viales y se centrifugaron a 500xg durante 1min. Se desecharon los sobrenadantes y se lavaron dos veces los precipitados con 5ml de solución de lavado. A los precipitados resultantes se les añadió 5ml de líquido de centelleo, y se determinó la radiactividad incorporada por las muestras en un contador β (Wallac 1409).

Para determinar la actividad total de la sonda radiactiva se centrifugaron 5ml de suspensión de separación a 500xg durante 1min, eliminándose el sobrenadante. Se añadieron 50µl de sonda y 5ml de líquido de centelleo, se agitó y se determinó su radiactividad.

El porcentaje de hibridación de cada muestra se calculó aplicando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Hibridación} = ( \text{CPM Muestra} / \text{CPM Total} ) \times 100$$

Se consideró que una muestra estaba contaminada por micoplasmas si el porcentaje de hibridación era superior al 0,4%, siempre que los controles positivo y negativo presentaran un porcentaje de hibridación superior al 30% e inferior al 0,2%, respectivamente.

### **3.1.2.- Clones citolíticos de célula T.**

#### **3.1.2.1.- Condiciones de cultivo.**

Los medios de cultivos para linfocitos T fueron similares a los de cultivo de LCL excepto que se suplementaron con un 10% v/v de mezclas de sueros humanos en vez de FCS, y que el medio no contenía tampón HEPES.

El suero humano AB comercial (DAA) se ultracentrifugó a 20.000xg durante 1h a temperatura ambiente y el sobrenadante, libre de lípidos, se congeló en alícuotas de 10ml a -20° C.

#### **3.1.2.2.- Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC).**

Se aislaron a partir de sangre periférica heparinizada, de donantes sanos, extraída en condiciones estériles. La sangre se diluyó en un volumen igual de RPMI 1640 y 7ml de esta mezcla se depositaron cuidadosamente sobre 3ml de la solución "Lymphoprep" (Nycomed Pharma) en tubos estériles de 10ml. Los tubos se centrifugaron durante 20min a 300xg y a temperatura ambiente. Las células mononucleares se recogieron de la interfase y se lavaron dos veces en RPMI 1640. Las células se resuspendieron en RPMI 1640 suplementado con un 10% v/v de suero humano y L-Gln 2mM (medio de cultivo de linfocitos).

#### **3.1.2.3.- Congelación y descongelación de PBMC.**

El proceso fue similar al de LCL, excepto que en la preparación del medio de congelación se sustituyó el FCS por suero AB humano.

#### **3.1.2.4.- Congelación y descongelación de clones de célula T.**

Cuando un determinado clon estaba suficientemente crecido, se transfirieron 100µl de un pocillo a un vial de congelación y se añadió una cantidad igual de medio de congelación de linfocitos (40% de RPMI 1640, 40% de suero humano AB, y 20% de DMSO). El vial se mantuvo de 3 a 6 horas a -70° C y posteriormente se transfirió a un contenedor de N<sub>2</sub> líquido, donde se almacenó.

Para su descongelación se añadió, gota a gota y agitando suavemente, 1ml de medio completo de cultivo de linfocitos, hasta homogeneizar la mezcla final. Esta mezcla se repartió en 10 pocillos de una placa de 96 de fondo en U (Costar), donde con anterioridad se habían

añadido 200 $\mu$ l de una mezcla de LCL estimuladoras y PBMC alogénicas previamente irradiadas. Las LCL se irradiaron 7.000 rads y las PBMC a 5.000 rads. Las placas se mantuvieron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de humedad relativa.

### 3.2.- Amplificación específica de las cadenas del TCR: estrategia general.

Este método (Bragado *et al.*, 1990; Lauzurica *et al.*, 1992) fue diseñado para obtener la secuencia de las cadenas del TCR de linfocitos T monoclonales. Se basa en la amplificación específica de los cDNA correspondientes a las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR.

El primer paso fue la obtención del RNA total. A continuación, para la obtención de los cDNA específicos se usaron oligonucleótidos específicos de las regiones C $\alpha$  o C $\beta$  respectivamente, como iniciadores de la reacción de la transcriptasa reversa. El paso siguiente fue la amplificación específica de los cDNA  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR. Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es necesario tener dos oligonucleótidos iniciadores, uno en el extremo 5' y otro en el extremo 3'. El extremo 5' del receptor corresponde a los segmentos V. Cuando se inició la realización de esta tesis las secuencias conocidas de los segmentos V $\alpha$  (58 secuencias) se habían agrupado en 22 subfamilias y las de los segmentos V $\beta$  (76 secuencias) en 20 subfamilias, de forma que los miembros de una misma subfamilia tenían entre si al menos un 75% de homología en su secuencia de nucleótidos (Wilson *et al.*, 1988). Por tanto, se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada subfamilia V $\alpha$  y V $\beta$ . El criterio de selección fue el siguiente: el oligonucleótido debía tener una secuencia común a todos los miembros conocidos de la subfamilia correspondiente y debía ser suficientemente distinto de las demás subfamilias. La comparación de secuencias y la búsqueda de los oligonucleótidos se hizo usando los programas "Local" (Molecular Biology Computer Research Source) y "Pattern Matching" versión 4.3 para el sistema operativo MS Dos (DNA and Protein Sequence Analysis Programs) así como el paquete informático "Wisconsin Package" versión 8.0 para el sistema operativo OpenVMS (Genetics Computer Group, Inc.). Los oligonucleótidos específicos de una subfamilia presentaban como mínimo 4 desemparejamientos con respecto a la secuencia de los miembros de otras subfamilias. Los oligonucleótidos de la región V son complementarios a secuencias de la cadena no codificante. Los oligonucleótidos de la región C son complementarios a secuencias de la cadena codificante. Este grupo de oligonucleótidos se denominó externo (V $\alpha$ E o V $\beta$ E) (Tablas 2 y 3).

### 3.2.1.- Aislamiento de RNA.

Se extrajo RNA de  $2-3 \times 10^5$  células de cada clon de CTL siguiendo el siguiente protocolo (Maniatis *et al.*, 1989).

Las células se centrifugaron 20s a 12.000xg para eliminar el medio de cultivo. A continuación se realizaron 2 lavados con 1ml de PBS cada vez. Se retiró el sobrenadante del último lavado cuidadosamente, procurando que quedara el menor volumen posible de PBS.

Las células se lisaron en 200 $\mu$ l de TSM (Tris-HCl 0,1M pH 7,6, NaCl 0,15M y MgCl<sub>2</sub> 0,002M), 0,5% de NP-40 y 10mM de vanadilribonucleótios (VRN), agitando en vórtex e incubando la mezcla en hielo (0 a 5°C) durante 5min. Tras la incubación se agitó la mezcla durante unos segundos y se centrifugó 1min a 4°C y 12.000xg para precipitar los núcleos. Se recuperó el sobrenadante en otro tubo eppendorf y se le añadió un volumen igual de TSE (Tris-HCl 0,1M pH 7,6, NaCl 0,15M y EDTA 0,005M) con 1% de SDS.

A continuación se procedió a una serie de extracciones en fenol/cloroformo con un 0,1% de  $\beta$ -mercaptoetanol, hasta que se eliminó la coloración oscura, lo que ocurre cuando los VRN se han eliminado del medio. Normalmente se necesitaron de 5 a 10 extracciones. Tras esta serie se realizó una última extracción con cloroformo.

Finalmente se precipitó el RNA añadiendo 1:20 de acetato sódico 3M pH 5,5 (0,15M final) y 2,2 volúmenes de etanol absoluto, incubando 1h. a -70°C. Después, se centrifugó 30min a 12.000xg y a 4°C. El precipitado se secó al vacío, se resuspendió en 400 $\mu$ l de acetato sódico 0,15M y se añadieron 880 $\mu$ l de etanol absoluto, para una segunda precipitación. Tras centrifugar y secar como en la primera precipitación, se resuspendió en 20 $\mu$ l de H<sub>2</sub>O de RNA.

Las soluciones usadas para la extracción de RNA se prepararon en H<sub>2</sub>O de RNA, o H<sub>2</sub>O tratada con un 0,1% de dietilpirocarbonato durante 24h a temperatura ambiente y posteriormente autoclavada. Este producto es un potente inhibidor de las ribonucleasas.

### 3.2.2.- Obtención de cDNA.

El cDNA de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR fue sintetizado a partir de dos alícuotas distintas, una para cada cadena, procedentes de la misma extracción de RNA, utilizando el "Reverse Transcription System" (Promega) según las indicaciones del fabricante:

La reacción transcurrió durante 1h a 42°C en 20 $\mu$ l de mezcla con MgCl<sub>2</sub> 5mM (4 $\mu$ l de 25mM), 1x tampón de transcriptasa reversa (Tris-HCl 10mM pH 8,8, KCl 50mM y 0,1% de

Tritón X-100) (2 $\mu$ l de 10x), 1mM de cada dNTP (2 $\mu$ l de 10mM), 15u de la transcriptasa reversa del AMV (0,5 $\mu$ l), 20u del inhibidor de las ribonucleasas "rRNasin" (Promega) (0,5 $\mu$ l), la mitad del RNA procedente de una extracción (aprox. 1 $\mu$ g) (9 $\mu$ l) y 1 $\mu$ M de oligonucleótidos iniciadores C $\alpha$ -específicos (C $\alpha$ E) o C $\beta$ -específicos (C $\beta$ E), respectivamente (2 $\mu$ l) (Tablas 2 y 3).

Al finalizar el tiempo de reacción el producto de la misma se calentó a 95°C durante 5min, y posteriormente se incubó en hielo (0 a 5°C), para inactivar la transcriptasa reversa y mantener el cDNA sintetizado separado del RNA que sirvió de molde.

### 3.2.3.- PCR específica.

Para la amplificación específica de la cadena  $\alpha$  o  $\beta$  del receptor se hicieron tantas alícuotas como oligonucleótidos de subfamilias  $\alpha$  o  $\beta$  teníamos (24 en  $\alpha$  para 22 subfamilias, ya que hay dos para la subfamilia 1 y la 4, y 20 en  $\beta$ ). Cada una de estas alícuotas se sometió a PCR usando como iniciadores el oligonucleótido C $\alpha$ E o C $\beta$ E en todas ellas como oligonucleótido 3' específico y el oligonucleótido V $\alpha$ E o V $\beta$ E correspondiente de cada una de las subfamilias como oligonucleótido 5' específico (Bragado *et al.*, 1990; Lauzurica *et al.*, 1992) (Tablas 2 y 3).

A partir del cDNA  $\alpha$  o del cDNA  $\beta$  se prepararon las mezclas de reacción que luego se alícuotaron. La mezcla para la reacción de  $\beta$  contenía, además del  $\beta$ -cDNA, 1x tampón de Taq (Tris-HCl 10mM pH 8,8, KCl 50mM y 0,1% de Tritón X-100), MgCl<sub>2</sub> 1,5mM, 200 $\mu$ M de cada dNTP, 1 $\mu$ M de C $\beta$ E y 1,25u/tubo de reacción (50 $\mu$ l) de "Taq DNA Polymerase (Storage Buffer A)" (Promega). La concentración final de cada oligonucleótido V $\beta$ E en cada alícuota fue 1 $\mu$ M.

La mezcla para la reacción de  $\alpha$  fue idéntica a la de  $\beta$  salvo en las siguientes modificaciones: los oligonucleótidos V $\alpha$ E y el oligonucleótido C $\alpha$ E se usaron a una concentración final de 0,5 $\mu$ M y se añadió a la mezcla 0,5u/tubo de reacción de "Perfect Match" (Stratagene), reactivo que disminuye reacciones cruzadas de los oligonucleótidos iniciadores de la reacción, aumentando la especificidad de las hibridaciones.

En ambos casos, tras añadir los distintos componentes excepto el enzima, la mezcla de reacción (1.350 $\mu$ l en  $\alpha$  y 1.100 $\mu$ l en  $\beta$ ) se calentó a 95°C durante 5min y se incubó posteriormente 5min en hielo (0 a 4°C). Se añadió entonces el enzima, se mezcló bien y se procedió a repartir dicha mezcla en cada uno de los tubos (47,5 $\mu$ l por tubo en  $\alpha$  ó 45 $\mu$ l por tubo

**Tabla 2.** *Oligonucleótidos para la amplificación específica de los segmentos V $\alpha$  del TCR.*

| Externo        |                       | Interno       |                        |
|----------------|-----------------------|---------------|------------------------|
| Nombre         | Secuencia             | Nombre        | Secuencia              |
| V $\alpha$ 1aE | GCTGAGGTGCAACTACTCAT  | V $\alpha$ 1I | ATCTCTTCTGGTATGT       |
| 1bE            | TCTGTGAGCCAGCATAACCAC |               |                        |
| 2E             | GAAGATGGAAGGTTTACA    |               |                        |
| 3E             | CAGGGAGAAGAGGATCCTCAG | 3I            | ACTAGTATAAACAATTTACAG  |
| 4aE            | AGCCAAATTCAATGGAGAGTA |               |                        |
| 4bE            | CCTCCATGGATTGCGCTGAAG | 4I            | GAAGACAGAAAGTCCAG      |
| 5E             | GAGGCCCTGAACATTCAGGAG | 5I            | AACTATTCTCCAGCATACTTA  |
| 6E             | AAGATAACTCAAACCCAACCA | 6I            | ACCAGTGATCAAAGTTATGGT  |
| 7E             | CACGTACCAGACATCTGGGTT | 7I            | CTGGTACCAGCAACATG      |
| 8E             | ACCCTGAGTGTCCAGGAGGG  | 8I            | ATTATAGACATTCGTTC      |
| 9E             | AGAGTGAICTAGCCCGAGAAG | 9I            | TATTCTGGGAGTCCTGAACTC  |
| 10E            | CTGCTGGAGCAGAGCCCTCAG | 10I           | AGTGTTTTTTCCAGCTTACAA  |
| 11E            | GACCAAGTGTTTCAGCCTTCC | 11I           | GTGTCCAATGCTTACAACCTC  |
| 12E            | AAGGTAACTCAAGCGCAGACT | 12I           | ACCCGTGATACTACTTATTAC  |
| 13E            | CCTCCAGACCTGATTCCTCAG | 13I           | GACTCTGTGAACAATTTGCAG  |
| 14E            | ACAGTCACTCAGTCTCAACCA | 14I           | ACCAGTGAGAGTGATTATTAT  |
| 15E            | GATGTGGAGCAGAGTCTTTTC | 15I           | AGCTCCTCCACCTACTTATAC  |
| 16E            | CAGTCAGTGGCTCAGCCGAA  | 16I           | GGAAACCCTTATCTTTTTTGG  |
| 17E            | CAGCAGGTGAAACAAAGTCCT | 17I           | ACTGCGTTTGACTACTTTCCA  |
| 18E            | CTGAACGTGGAACAAGTCCT  | 18I           | TCCAGCAATTTTTATGCCTTA  |
| 19E            | CAGAACCTGACTGCCCAGGAA | 19I           | GTAGGAATAAGTGCCTTACAC  |
| 20E            | TCCATGGACTCATATGAAGGA | 20I           | AACATTGCTACAAATGATTAT  |
| 21E            | CAGCAAGTTAAGCAAAATTCA | 21I           | AACAGCATGTTTGATTATTTTC |
| 22E            | ATGTCAGGCAATGACAAGGGA | 22I           | AACAAAGGTTTTGAAGCCACA  |
| C $\alpha$ E   | CTTGTCACTGGATTTAGAGTC | C $\alpha$ I  | CAGCTGGTACACGGCAGGGTC  |



**Tabla 3. Oligonucleótidos para la amplificación específica de los segmentos V $\beta$  del TCR.**

| Externo      |                           | Interno      |                        |
|--------------|---------------------------|--------------|------------------------|
| Nombre       | Secuencia                 | Nombre       | Secuencia              |
| V $\beta$ 1E | TCCCCTAGGTCTGGAGACCTCTCT  | V $\beta$ 1I | CAGGGCCTCCAGTTCCTCATT  |
| 2E           | TTTCAGGCCACAACCTATGTTTTG  | 2I           | CTCATGCTGATGGCAACTTCC  |
| 3E           | GATATGGACCATGAAAATATGTTC  | 3I           | AAAATGAAAGAAAAGGAGAT   |
| 4E           | ACGATCCAGTGTCAAGTCGA      | 4I           | CTGATCGCAACTGCAAATCAG  |
| 5E           | CTGATCAAAACGAGAGGACAGCA   | 5I           | CTGGGGGACTCGGCCCT      |
| 6E           | TCAGGTGTGATCCAATTC        |              |                        |
| 7E           | CAACATATGGGGCACAGGGCAATG  | 7I           | TTCTCACCTGAATGCCCAAC   |
| 8E           | GAGGTGACAGAGATGGGACA      | 8I           | TACTTTAACAACAACGTTCCG  |
| 9E           | GAACAAAATCTGGGCCATGATACT  | 9I           | ATTATAAATGAAACAGTTCCA  |
| 10E          | GTTCCCTATAAAAGCACATAGTTAT | 10I          | ATTCAGAAAGCAGAAATAATC  |
| 11E          | TCTCAAACCATGGGCCATGACAAA  | 11I          | ACAGAGAAGGGAGATCTTTCC  |
| 12E          | CTGAGATGTCACCAGACTGAG     | 12I          | ACATCTGTGTACTTCTGTGCC  |
| 13E          | GCATGACACTGCAGTGTGCCC     | 13I          | TCATTACTCAGTTGGTGCTGG  |
| 14E          | ACCCAAGATACCTCATCACAG     | 14I          | AACAGTGACTIONGTTCTCAGA |
| 15E          | TCTCAGACTAAGGGTCATGATAGA  | 15I          | TTTGATGTCAAAGATATAAAC  |
| 16E          | GACCCAATTTCTGGACATGATAAT  | 16I          | GTGAAAGAGTCTAACAGGAT   |
| 17E          | GAACAGAATTTGAACCACGATGCC  | 17I          | CAGATAGTAAATGACTTTTCAG |
| 18E          | AGCCAATGAAAGGACACAGTCAT   | 18I          | CTGGTATCGGCAGCTCCAGA   |
| 19E          | ACCCCCGAAAAGGACATACTTTT   | 19I          | GGTATCAACAGAATCAGAATA  |
| 20E          | GAGGGAACATCAAACCCCAACCTA  | 20I          | ACCGACAGGCTGCAGGCAGGG  |
| C $\beta$ E  | TTTTGGGTGTGGGAGATCTC      | C $\beta$ I  | TTCTGATGGCTCAAACAC     |

en  $\beta$ ), donde previamente se alicuotaron los oligonucleótidos VE (2,5 $\mu$ l de V $\alpha$ E 10 $\mu$ M ó 5 $\mu$ l de V $\beta$ E 10 $\mu$ M). Sobre la mezcla de reacción se añadieron unas gotas de aceite mineral para evitar la evaporación durante la reacción de PCR.

Los programas usados en las amplificaciones fueron:

- Para la cadena  $\beta$ , 30 ciclos a las siguientes condiciones

1min a 95°C, para desnaturalizar,

1min a 39°C, para hibridar,

1min a 72°C, para elongar.

y un ciclo final con 1min a 95°C, 3min a 39°C y 7min a 72°C.

- Para la cadena  $\alpha$  la única diferencia estaba en la temperatura de hibridación, que fue 42°C.

El termociclador utilizado fue el "Programmable Thermal Controller, PTC-100" (MJ Research, Inc.).

### 3.2.4.- Identificación de las subfamilias amplificadas.

#### 3.2.4.1.- Geles de agarosa analíticos.

Tras eliminar el aceite mineral, alícuotas iguales (habitualmente de 9 $\mu$ l) de cada tubo, correspondiente a una subfamilia, se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 2% (Agarose D-1 LE, Hipanagar) en 1xTAE (Tris-acetato 40mM pH 8, EDTA 1mM) con 1 $\mu$ g/ml de bromuro de etidio. El tampón de carga contiene 0,01% de azul de bromofenol, 0,01 % de xilencianol, Na<sub>2</sub>EDTA 0,01M, 0,1% de SDS y 5% de glicerol, y se utilizó en una proporción 1:10 (1 $\mu$ l). Como marcador de peso molecular se utilizó el "1Kb DNA ladder" (BRL) que se resuelve, en nuestras condiciones de electroforesis, los siguientes tamaños: 142/154bp, 200/220bp, 298bp, 344bp, 394bp, 506/516bp, 1.018bp, 1.635bp, 2.036bp y 3.054bp. Habitualmente, debido a la baja cantidad de DNA inicial que se usó en cada una de las alícuotas sometidas a amplificación, la banda teñida con bromuro de etidio no fue visible. También, en ocasiones, aparecían bandas inespecíficas. Por tanto se transfirió el DNA del gel a una membrana y se hibridó con una sonda específica.

#### 3.2.4.2.- Southern blot.

El análisis de la especificidad del DNA presente en geles de agarosa, se realizó mediante

Southern blot (Maniatis *et al.*, 1989), que consiste en la transferencia del DNA a filtros adecuados y su hibridación con sondas específicas. En nuestro caso usamos la transferencia alcalina a membranas "Z-probe GT" (Biorad).

Dos trozos de papel Whatman 3M previamente humedecidos, se colocaron en una superficie horizontal en contacto con un reservorio de NaOH 0,4M, como tampón de transferencia. Se colocó el gel de agarosa, con los pocillos hacia abajo (el DNA recorre así menos camino através de la agarosa), sobre la doble tira de papel Whatman 3M, y sobre el gel se colocó una lámina de "Z-probe GT" humedecida. Sobre esta lámina se colocaron dos de papel Whatman 3M y sobre éstas, servilletas de papel para absorber la solución de transferencia. Habitualmente se transfirió durante la noche, aunque el tiempo de transferencia mínimo sería de 4h.

La membrana se lavó en 2xSSC (1xSSC = NaCl 0,15M, citrato sódico 0,015M) a T ambiente. Se prehibridó en una solución 5xSSPE (1xSSPE = NaCl 0,18M, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM pH 7,4 y EDTA 1mM), 10xDenhardt (1xDenhardt = 0,02% Ficoll, 0,02% polivinil pirrolidona y 0,02% de albúmina sérica bovina), 0,1% de SDS y 40µg/ml de DNA de esperma de salmón. El tiempo de prehibridación osciló entre 30min y 1h. Transcurrido este tiempo se eliminó la solución de prehibridación y se añadió la de hibridación. La única diferencia en la composición de ambas soluciones, aparte de la sonda marcada, es que la solución de hibridación es 5xDenhardt. Se prehibridó y se hibridó 5°C por debajo de la temperatura media de fusión (T<sub>m</sub>) de la sonda utilizada. En la hibridación se utilizaron como sondas específicas oligonucleótidos marcados con [<sup>32</sup>P]dATP (punto 2.2.4.3), correspondientes a la región C, más internos que los usados para la amplificación (CαI o CβI) (Tablas 2 y 3). La T<sub>m</sub> se calculó usando la fórmula  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ . La T<sub>m</sub> del oligonucleótido CαI (Tabla 2) es 70°C y la del CβI (Tabla 3) es 52°C, por lo que se prehibridó e hibridó a 65°C y a 47°C respectivamente. La reacción de hibridación duró un mínimo de 3h.

Tras este tiempo se eliminó la solución de hibridación y se procedió a lavar la membrana. Se hicieron tres lavados de 20min en 6xSSC a T ambiente. El cuarto y último lavado se hizo a la temperatura de hibridación durante 3min. Las bandas específicas se localizaron mediante autorradiografía usando películas Kodak X-Omat S con pantallas amplificadoras Okamoto Lus a -70°C.

### 3.2.4.3.- Marcaje radiactivo de oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos ( $1\mu\text{M}$  final) se marcaron en un volumen total de  $20\mu\text{l}$  con  $40\mu\text{Ci}$  de  $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-dATP}$  de actividad específica de  $3.000\mu\text{Ci}/\text{mmol}$  (Amersham) en su extremo 5' con T4 polinucleótido kinasa (Boehringer Mannheim). Los nucleótidos no incorporados se eliminaron absorbiendo la mezcla de reacción en un papel Whatman DE81 y lavando este papel con el tampón "low-salt" (Tris-HCl  $20\text{mM}$  pH 8, EDTA  $1\text{mM}$ , NaCl  $0,1\text{M}$ ). El oligonucleótido marcado se eluyó mediante lavados con el tampón "high-salt" (Tris-HCl  $20\text{mM}$  pH 8, EDTA  $1\text{mM}$ , NaCl  $1\text{M}$ ), hasta completar un volumen de  $1.200\mu\text{l}$ . La mitad se añadió a  $10\text{ml}$  de la solución de hibridación.

## 3.3.- Secuenciación del material amplificado.

### 3.3.1.- Purificación del fragmento amplificado.

Tras la identificación de la subfamilia, el resto del producto de la PCR del tubo correspondiente se extrajo dos veces con fenol/cloroformo y una con cloroformo. El DNA purificado se precipitó añadiendo  $20\mu\text{l}$  de acetato sódico  $3\text{M}$  pH 5,5 y  $500\mu\text{l}$  de etanol absoluto e incubando 1h. a  $-70^\circ\text{C}$ . Después se centrifugó 30min a  $12.000\times g$  a  $4^\circ\text{C}$ .

El precipitado se secó al vacío y se resuspendió en  $9\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  y  $1\mu\text{l}$  del tampón de carga (ver 2.2.4.1). Esta muestra se sometió a electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión (NuSieve GTG, FMC) al 2%, en las mismas condiciones y con los mismos marcadores de peso molecular que en el apartado 2.2.4.1. Tras esto, se procedió a cortar la banda de DNA visualizada por el bromuro de etidio. En ocasiones la cantidad de DNA fue tan baja que no se visualizó en bromuro de etidio. Entonces, con ayuda de los marcadores de peso molecular, se cortó la zona del tamaño donde hibridó la sonda específica.

### 3.3.2.- Amplificación asimétrica.

Con esta técnica (Gyllensten y Erlich, 1988; Bill *et al.*, 1989) se generó un DNA de cadena sencilla a partir del DNA amplificado de los TCR, para su secuenciación directa. Para ello fue necesario seleccionar un nuevo grupo de oligonucleótidos  $V\alpha$ ,  $V\beta$ ,  $C\alpha$  y  $C\beta$ . Son los oligonucleótidos  $V\alpha\text{I}/V\beta\text{I}$  y  $C\alpha\text{I}/C\beta\text{I}$  (Tablas 2 y 3). Estos oligonucleótidos hibridan en posiciones más 3' que los  $V\alpha\text{E}$  o  $V\beta\text{E}$  específicos de cada subfamilia y más 5' que los  $C\alpha\text{E}$  y  $C\beta\text{E}$ . Estos oligonucleótidos fueron elegidos para que hibridaran con todos los miembros de una

misma subfamilia pero no específicamente porque en esta etapa no hay posibilidad de reacciones cruzadas.

Para conseguir DNA monocatenario, el DNA amplificado, se sometió a una nueva PCR asimétrica. Para ello se hicieron dos alícuotas, una para amplificar la cadena (+) y otra para amplificar la cadena (-). Para generar la cadena (-) se utilizó una proporción 100/1 de los oligonucleótidos CI/VE mientras que para sintetizar la cadena (+) se utilizó una proporción 100/1 de los oligonucleótidos VI/CE.

En la práctica, se prepararon dos reacciones de PCR (A y B) en las mismas condiciones que en el punto 2.2.3, pero con las siguientes diferencias:

- (a) el volumen de reacción fue en ambos casos de 100  $\mu$ l.
- (b) Se añadió a ambos tubos de 2 a 4  $\mu$ l de agarosa fundida (cortada como se describe en el punto 2.3.1) como DNA molde para la reacción.
- (c) Las concentraciones finales de los oligonucleótidos fueron 10nM de V $\alpha$ E/V $\beta$ E frente a 1 $\mu$ M de C $\alpha$ I/C $\beta$ I para la reacción A (cadena -) y 1 $\mu$ M de V $\alpha$ I/V $\beta$ I frente a 10nM de C $\alpha$ E/C $\beta$ E para la reacción B (cadena +).

### 3.3.3.- Purificación de los productos de la segunda PCR.

La amplificación se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa (punto 2.2.4.1). El resto del producto de la PCR de esa subfamilia se extrajo dos veces con fenol/cloroformo y se completó con TE (Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 1mM) hasta un volumen final de 400  $\mu$ l.

Para separar el producto de la PCR de los oligonucleótidos iniciadores y concentrar la muestra, se cargaron los 400  $\mu$ l en un microconcentrador microcon-30 (Amicon), se centrifugó la muestra a 10.000xg y a 4°C durante 15min, se eliminó el volumen inferior (filtrado < 30.000 de peso molecular) del microconcentrador y se añadieron 400  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O sobre la membrana. Esta operación se repitió hasta un total de tres centrifugaciones. Tras esto, se invirtió el microconcentrador, se añadieron 10  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y se recuperó el concentrado por centrifugación a 2.000xg. La recuperación osciló entre 4 y 8  $\mu$ l. Un  $\mu$ l del material recuperado se corrió en un gel de agarosa (punto 2.2.4.1) para comprobar el rendimiento, que habitualmente fue mayor 90%. Este fue el material de partida para la reacción de secuencia.

### 3.3.4.- Reacciones de secuencia.

La secuenciación de los productos de PCR monocatenarios se realizó por el método de los dideoxinucleótidos (Sanger y Coulson, 1975), utilizando la versión 2.0 del kit de "Sequenase".

Brevemente:

#### A) Hibridación de la mezcla:

7 $\mu$ l del producto de PCR monocatenario

2 $\mu$ l de tampón de secuencia (Tris-HCl 200mM pH 7.5, MgCl<sub>2</sub> 25mM, NaCl 250mM)

1 $\mu$ l de oligonucleótido iniciador 10 $\mu$ M (V $\alpha$ I/V $\beta$ I o C $\alpha$ I/C $\beta$ I) (Tablas 2 y 3)

Se calienta de 3 a 5min a 65°C y se deja enfriar lentamente (aproximadamente durante 30min) hasta menos de 35°C para permitir la hibridación del iniciador.

#### B) Reacción de marcaje:

A la mezcla de hibridación se añaden:

1 $\mu$ l de DTT 0,1M

2 $\mu$ l de mezcla de marcaje (1,5 $\mu$ M dCTP, 1,5 $\mu$ M dGTP, 1,5 $\mu$ M dTTP)

0,5 $\mu$ l <sup>35</sup>S-dATP (actividad 1.000Ci/mmol)

2 $\mu$ l Sequenasa diluida (1,5u de sequenasa en Tris-HCl 10mM pH7,5, DTT 5mM y 0,5 mg/ml de BSA)

Se realiza la reacción de marcaje durante 5min a 24°C.

#### C) Reacción de terminación:

Se alicuotan, en 4 tubos, 2,5 $\mu$ l de cada una de las 4 mezclas de terminación (80 $\mu$ M de cada dNTP, NaCl 50mM y 8 $\mu$ M del ddNTP correspondiente). A cada tubo se le añade 3,5 $\mu$ l de la reacción de marcaje y se incuban durante 5min a 40°C. La reacción se para añadiendo 4 $\mu$ l de una solución de parada que contiene un 95% de formamida, EDTA 20mM, 0,05% de azul de bromofenol y 0,05% de xilencianol.

Las reacciones de secuencia se guardan a -20°C hasta su carga.

Para resolver compresiones e inversiones se utilizaron los 7-deaza-dGTP derivados en vez de el dGTP y el ddGTP en las reacciones de marcaje y terminación.

### 3.3.5.- Electroforesis en geles de poliacrilamida.

Las reacciones de secuencia se resuelven en geles de poliacrilamida de 0,4mm de grosor y 40cm de longitud. La composición del gel es: 42% de urea, TBE (Tris-borato 0,09M, EDTA 0,002M), 8% de acrilamida, 0,05% de persulfato amónico y 0,03% de TEMED. La electroforesis se realiza a potencia constante de 45W, lo que da un voltaje que oscila entre 1500-2100V y una intensidad de 35mA en el tampón 1xTBE. Tras la electroforesis, el gel se seca sobre un papel Whatman 3M al vacío a 80°C y se autorradiografía en películas X-Omat de Kodak.

### 3.4.- Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico del uso de segmentos génicos se utilizó el test de  $\chi^2$ , de la facilidad estadística "Astute" diseñada para la hoja de cálculo "Microsoft Excel" versión 4.0.

## 4.- RESULTADOS

### 4.1.- Repertorio de TCR en la respuesta alogénica anti-B\*2705.

#### 4.1.1.- Análisis de la secuencia de las cadenas $\alpha$ y $\beta$ amplificadas.

Mediante PCR específica y secuenciación se caracterizó el TCR de 12 clones anti-B\*2705 de especificidad fina conocida del respondedor GM (HLA-A1, A24; B7, 8; DR1, 3) y de 22 del respondedor SR (HLA-A3, 29; B7, 44; DR2, 7) (Tabla 4). La frecuencia de las principales especificidades clonales en esta respuesta fue analizada en un estudio previo (López *et al.*, 1994). Estas frecuencias y las de los CTL analizados aquí son muy similares. Por ejemplo, las frecuencias de los patrones de reacción I (anti-B\*2705), IV (anti-B\*2705 + B\*2703), y aquellos que presentan reacción cruzada con 3 o más subtipos de HLA-B27 eran en GM 22%, 28% y 39% respectivamente (López *et al.*, 1994) y 17%, 33% y 50% en los clones de este donante estudiados aquí. En SR eran 12%, 36% y 39% respectivamente (López *et al.*, 1994) y 13%, 32% y 40% en los estudiados aquí. Por tanto, nuestros resultados reflejan probablemente las reglas generales del uso de TCR en las respuestas anti-B\*2705 de estos individuos. De cada una de las cadenas del TCR se secuenció parte del segmento V (de 33 a 198 bp, siendo la media 113 bp), la región N/N+D $\beta$ , el segmento J $\alpha$ /J $\beta$ , y la parte 5' del segmento C $\alpha$ /C $\beta$ . La asignación de los segmentos V se hizo en función del oligonucleótido iniciador específico de subfamilia que lo amplificó y de la posterior secuenciación. Esto permitió distinguir entre transcritos correctos y aberrantes. La ausencia de blancos en las PCR indicó que los oligonucleótidos iniciadores hibridaban con la mayoría de los segmentos V $\alpha$  y V $\beta$  más usados. En un caso (CTL 116.8GRK), los iniciadores V $\alpha$ 5E y V $\alpha$ 8E amplificaron en reacción cruzada un transcrito de la cadena  $\alpha$  que usaba V $\alpha$ w24 (Tabla 4). En este CTL el transcrito de la cadena  $\beta$ , que usaba el segmento V $\beta$ 6GLPA, se amplificó con el primer V $\beta$ 8E y no con el V $\beta$ 6E. En el resto de los casos los transcritos amplificados usaban los segmentos V que correspondían a la especificidad nominal de los iniciadores que los amplificaron, aunque de manera ocasional se observaron algunas reacciones cruzadas: los oligonucleótidos V $\alpha$ 3, V $\alpha$ 18 y V $\beta$ 5 amplificaron en reacción cruzada



**Tabla 4.** *Uso de los segmentos génicos de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR en transcritos productivos de CTL anti-B\*2705<sup>1</sup>*

| CTL                      | Patrón de Reacción |          | V $\alpha$ | h.s. | J $\alpha$ | V $\beta$ | h.s. | J $\beta$ | Numero de Acceso<br>alfa/beta |
|--------------------------|--------------------|----------|------------|------|------------|-----------|------|-----------|-------------------------------|
|                          | Subtipos           | Otros    |            |      |            |           |      |           |                               |
| <u>Respondedor GM</u>    |                    |          |            |      |            |           |      |           |                               |
| 116.8GRK                 | 5                  |          | w24        | NA   | HAVT01     | 6         | 1    | 2.7       | L34738/L34720                 |
| 17A2                     | 5                  |          | 84         | 3    | HAVP01     | 13        | 4    | 1.1       | M87870/X51787                 |
| 31GRK                    | 5, 3               |          | 19.1       | 2    | HAVT33     | 13.4      | 4    | 2.3       | L34708/L34730                 |
| 74GRK                    | 5, 3               |          | 16.2       | 4    | HAVP36     | 2         | 3    | 2.3       | L34716/L34735                 |
|                          |                    |          | 11.2       | 7    | AC24       |           |      |           | L34715                        |
| 5A2                      | 5, 3               |          | 14         | 3    | IGRJa12    | 15.1      | 4    | 2.3       | M87869/X51791                 |
| GM7                      | 5, 3               |          | 22         | 4    | PY14       | 3         | 4    | 2.7       | M90479/X51796                 |
| 58GRK                    | 5, 1, 4            |          | 12.1       | 3    | 122GRK     | 6.4       | 1    | 2.7       | L34714/L34734                 |
| 20.8GRK                  | 5, 1, 2, 3, 6      |          | 14.1       | 3    | HAVT01     | 14        | 4    | 2.2       | L34703/L34725                 |
| 122GRK                   | 5, 2, 4, 6         | B56, B61 | 14         | 3    | 122GRK     | 7.1       | 2    | 1.1       | L34699/L34722                 |
| 100GRK                   | 5, 1, 2, 4, 6      | B56, B61 | 8.1        | 1    | HAVT01     | 17.1      | 4    | 2.7       | L34694/L34719                 |
| 37GRK/123.8GRK           | 5, 1, 2, 3, 4, 6   | DR2      | 14         | 3    | IGRJa06    | 1.1       | 1    | 1.1       | M95394/L07294                 |
| <u>Respondedor SR</u>    |                    |          |            |      |            |           |      |           |                               |
| 11SRY/40SRY              | 5                  |          | 2          | 1    | HAVP10     | 8.1       | 1    | 2.7       | L34698/L34721                 |
| 13SRC                    | 5                  |          | 10         | 2    | HAVP29     | 14        | 4    | 2.2       | L34702/L34724                 |
| 93S15                    | 5, 1               |          | 20.1       | 5    | IGRJa04    | 3         | 4    | 1.2       | L34718/L34737                 |
| 21S69                    | 5, 2               |          | 20.1       | 5    | HJGF       | 7         | 2    | 2.2       | L34704/L34726                 |
| 29S15                    | 5, 2               |          | 7.2        | 6    | AG212      | 5.4       | 1    | 1.6       | L34706/L34728                 |
| 12SRF-37SLG <sup>2</sup> | 5, 3               | B60      | 20.1       | 5    | 63.124     | 3         | 4    | 2.1       | L34700/L34723                 |
| 33.8S15                  | 5, 3               |          | 84         | 3    | AC25       | 3         | 4    | 2.1       | L34709/L34723                 |
| 13SLG                    | 5, 3               | B61      | 8.1        | 1    | FR6        | 3         | 4    | 2.1       | L34701/L34723                 |
| 7S15/16S15               | 5, 1, 2            | B55, B56 | 17.1       | 1    | 122GRK     | 14        | 4    | 1.1       | L34717/L34736                 |
| 33S69                    | 5, 1, 3            |          | 2          | 1    | HAVP10     | 14        | 4    | 1.4       | L34710/L34731                 |
| 11.8SLG <sup>3</sup>     | 5, 2, 3            | B60      | 3.1        | 2    | 62.119     | 3         | 4    | 2.1       | L34695/L34723                 |
| 27S69                    | 5, 2, 3            | B61      | 7.2        | 6    | IGRJa06    | 18.1      | 1    | 2.3       | L34705/L34727                 |
| 47S69                    | 5, 1, 2, 3         |          | 84         | 3    | HAVT33     | 17.1      | 4    | 2.7       | L34713/L34733                 |
|                          |                    |          | 12.1       | 3    | AG212      |           |      |           | L34712                        |
| 2SRZ                     | 5, 1, 2, 3         |          | 7.1        | 6    | HAVP36     | 7         | 2    | 2.2       | L34707/L34729                 |
| 3SRF                     | 5, 4, 6            |          | 11.1       | 7    | IGRJa06    | 4         | 3    | 1.2       | L34711/L34732                 |

**Tabla 4.**

<sup>1</sup> Los CTL con TCR idéntico aparecen agrupados. Los patrones de reacción clonales son de López *et al.*, 1994. La numeración de las subfamilias V $\alpha$  y de V $\beta$  1 a V $\beta$  16 es el de Wilson *et al.*, 1988. V $\beta$  17 a V $\beta$  20 están numeradas como en Toyonaga y Mak, 1987. Los miembros de cada subfamilia se asignaron cuando la secuencia parcial determinada era idéntica a un solo miembro de la subfamilia correspondiente. Además de los especificados con número (Toyonaga y Mak, 1987; Wilson *et al.*, 1988) otros miembros asignados son los siguientes: V $\alpha$ w24 (Roman-Roman *et al.*, 1991) en CTL 116.8GRK; V $\alpha$ 14.37GRK (López *et al.*, 1993) en CTL 5A2, 122GRK, y 37GRK/123.8GRK; V $\beta$ 6GLPA (Li *et al.*, 1990) en CTL 116.8GRK; V $\beta$ 13IGRb16 (Ferradini *et al.*, 1991) en CTL 17A2; V $\beta$ 7H67.2 (Plaza *et al.*, 1991), en CTL 21S69 y 2SRZ. Los segmentos V $\alpha$ 2 de los CTL 11SRY/40SRY y 33S69 son diferentes, pero no se puede asignar el miembro de subfamilia exacto en base a la secuencia parcial determinada. Los segmentos V están clasificados en subgrupos de homología (h.s.) (Chothia *et al.*, 1988). Estos incluyen aquellas subfamilias V $\alpha$  o V $\beta$  que tienen entre si una identidad en su secuencia de aminoácidos mayor del 50%. NA: subgrupo no asignado.

<sup>2</sup> Este clonotipo incluye CTL 12SRF, 12SLG, 60SLG, 4S15, 11S15 y 37SLG, que tienen el mismo TCR. CTL 37SLG presenta una actividad lítica elevada reaccionando débilmente con otros subtipos además de B\*2703. CTL 12SRF no presenta reacción cruzada con HLA-B60 (López *et al.*, 1994).

<sup>3</sup> CTL 11.8SLG presenta una reacción más débil con B\*2702 que con B\*2705, B\*2703, o B60 (López *et al.*, 1994).

los segmentos  $V\alpha 8$ ,  $V\alpha 17$  y  $V\beta 6$  respectivamente. Las reacciones cruzadas de los oligonucleótidos selectivos de subfamilia con otra subfamilia V observados en esta tesis se resumen en la Tabla 10 (apdo. 4.2.1).

En la mayoría de los casos cada CTL mostró un único transcrito productivo para cada una de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ . Los CTL 74GRK y 47S69 (Tabla 4) tenían dos transcritos productivos para la cadena  $\alpha$  y solo uno para la cadena  $\beta$ , y podrían por tanto expresar dos TCR. Algunos clones del donante SR, generalmente con una especificidad fina muy parecida, tenían el mismo TCR (Tabla 4). En el CTL 122GRK se detectó un transcrito aberrante de  $\beta$  en el que la  $V\beta 18$  se une en su parte central con el segmento  $C\beta 2$ . También aparecieron transcritos aberrantes de la cadena  $\alpha$  en los CTL 100GRK ( $V\alpha 8$ ,  $J\alpha$ HAVT31), 5A2 ( $V\alpha 9$ ,  $J\alpha$ HAVP44), 12SRF-37SLG ( $V\alpha 7$ ,  $J\alpha$ AB28), 13SLG ( $V\alpha 16$ ,  $J\alpha$ AB19) y 27S69 ( $V\alpha 11$ ,  $J\alpha$ AB28). El único transcrito que se detectó en el CTL 13SRC ( $V\alpha 10$ ,  $J\alpha$  HAVP29) estaba en el marco correcto de lectura, pero su segmento  $V\alpha$  presentaba una secuencia anómala en su extremo y carecía del último codón de Cys (Figura 7B). Aunque ha sido incluido en todos los análisis, este transcrito podría codificar para un polipéptido no funcional y el transcrito productivo  $\alpha$  podría no haber sido amplificado por nuestro conjunto de oligonucleótidos.

#### 4.1.1.1.- Descripción de un nuevo miembro de la subfamilia $V\alpha 14$ y de un nuevo segmento $J\alpha$ .

En el análisis de las secuencias de las regiones  $V\alpha$  se determinó un nuevo miembro de la subfamilia  $V\alpha 14$  y un nuevo segmento  $J\alpha$ . La secuencia parcial del nuevo miembro de la subfamilia  $V\alpha 14$ , que se muestra alineada en la Figura 4 con algunos de los miembros de esta subfamilia, se encontró en tres clonotipos del respondedor GM: CTL 37GRK/123.8GRK, CTL 122GRK y CTL 5A2 (Tabla 4). Hasta el momento es el quinto miembro conocido de esta subfamilia (Kimura *et al.*, 1987; Pluschke *et al.*, 1991; Boitel *et al.*, 1992). Difiere del más homólogo,  $V\alpha 14.2$  (Boitel *et al.*, 1992), en tres nucleótidos de los cuales uno es silencioso y los otros dos implican sendas sustituciones en los aminoácidos correspondientes. Difiere del primer miembro determinado de esta subfamilia,  $V\alpha$ HAVT20 (Kimura *et al.*, 1987) en nueve nucleótidos de los cuales siete son silenciosos y dos implican sendas sustituciones en los aminoácidos correspondientes.

En la Figura 4 se muestra también un nuevo segmento  $J\alpha$  que se encontró con diferentes

Figura 4. Secuencia del nuevo miembro de la subfamilia  $V\alpha 14$  y del nuevo segmento  $J\alpha 122GRK$

## $V\alpha 14$

### DNA

37GRK CAGACAGTCACTCAGTCTCAACCAGAGATGTCTGTGCAGGAGGCAGAGACTGTGACCCTGAGTTGCACATATGACACCAGTGAGAGTAATTAT  
 HAVT20 -----C-----C-----G-----  
 14.2 (B) -----A-G-----  
 14.1 (P) -----CA-----A-----  
 14.2 (P) -----CA-----C-----C-----G-----

37GRK TATTTGTTCTGGTACAAACAGCCTCCAGCAGGCAGATGATTCTCGTTATTCGCCAAGAAGCTTATAAGCAACAGAATGCAACGGAGAATCGT  
 HAVT20 -----A-----G-----A-----  
 14.2 (B) -----G-----  
 14.1 (P) -----G-----  
 14.2 (P) -----A-----G-----

37GRK TTCTCTGTGAACTTCCAGAAAG CAGCCAAATCCTTCAGTCTCAAGAT CTCAGACTCACAGCTGGGGGACACTGCGATGTATTTCTGTGCTTTC  
 HAVT20 -----TG-C-----  
 14.2 (B) -----  
 14.1 (P) -----TC-----T-----  
 14.2 (P) -----

### PROTEÍNA

37GRK QTVTQSQPEMSVQEAETVTLTSLCTYDTSSESNYYLFWYKQPPSRQMLVIRQEAYKQONATENRFSVNFQK AAKSFSCLKISDSQLGDTAMYFCAF  
 HAVT20 -----D-----A-----  
 14.2 (B) -----ND-----  
 14.1 (P) -----A-----NN-----VQPNPSVSRF-----A-----  
 14.2 (P) -----A-----ND-----

## $J\alpha$

|            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|
|            |     |     |     |     |     |     |     |     |     | Y   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
| 122GRK/14  | ATG | ATG | GGG | CCC | TCA | GGA | ACC | TAC | AAA | TAC | ATC | TTT | GGA | ACA | GGC | ACC | AGG | CTG | AAG | GTT | TTA | GCA | A |
| 58GRK/12   | CTC | ATA | TAT | A   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
| 7815/16815 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |
| AP511      |     |     | T   |     |     |     |     |     |     | G   |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |

STOP

**Figura 4.** Secuencia del nuevo miembro de la subfamilia V $\alpha$ 14: 37GRK. Aparece alineada con otros miembros de la subfamilia: HAVT20 (Kimura *et al.*, 1987), 14.2(B) (Boitel *et al.*, 1992), 14.1(P) y 14.2(P) (Pluschke *et al.*, 1991). Los guiones indican las posiciones que son idénticas a la secuencia de 37GRK. Se muestra también diferentes reordenamientos de un nuevo segmento J $\alpha$ .

reordenamientos en su extremo 5' en los transcritos  $\alpha$  correctos de CTL 122GRK y CTL 58GRK del respondedor GM, y en el clonotipo 7S15/16S15, del respondedor SR. Este segmento difiere del J $\alpha$ AP511 (Klein *et al.*, 1987) en un solo nucleótido. Este único cambio hace que un codón stop existente en J $\alpha$ AP511 pase a ser un codón para Tyr en J $\alpha$ 122GRK. El segmento J $\alpha$ AP511 es un pseudogen y el J $\alpha$ 122GRK es un gen expresable. Este segmento tiene la misma secuencia de aminoácidos que J $\alpha$ 17.10 (Moss *et al.*, 1993) en la porción de este segmento disponible para comparación.

#### 4.1.2.- Selección asimétrica de la cadena $\beta$ en TCR anti-B\*2705.

El uso de TCR en la respuesta anti-B\*2705 se reveló no aleatorio con restricciones de uso a varios niveles, como se detallará a continuación. Un primer nivel de restricción consistió en receptores con cadenas  $\beta$  idénticas o altamente similares y cadenas  $\alpha$  dispares, sugiriendo una selección a nivel de la estructura global de la cadena  $\beta$ .

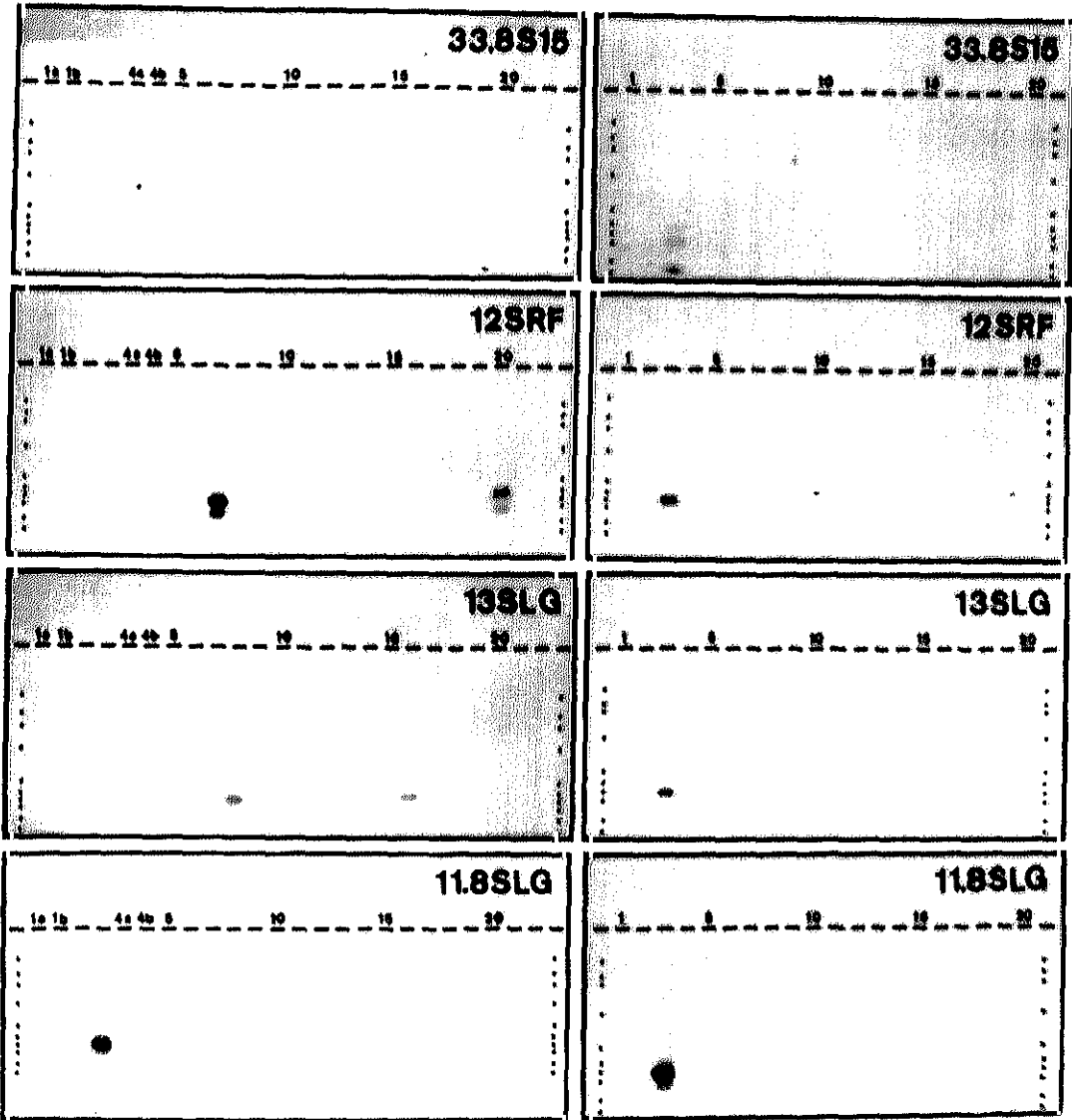
##### 4.1.2.1.- Clones alorreactivos con idéntica cadena $\beta$ y distintas cadenas $\alpha$ . Relación con la especificidad.

La mayoría de los CTL tenían transcritos  $\alpha$  y  $\beta$  diferentes. Sin embargo, en el respondedor SR se hallaron 4 clonotipos con el mismo transcrito  $\beta$  pero con transcritos  $\alpha$  totalmente distintos. Estos eran los CTL 12SRF-37SLG, 33.8S15, 13SLG, y 11.8SLG (Tabla 4, Figura 5). Sus reacciones cruzadas con los subtipos de HLA-B27 se limitaron a B\*2703, aunque en ocasiones se observaron reacciones débiles con B\*2702 (CTL 11.8SLG) u otros subtipos (CTL 37SLG). También, la mayoría de estos CTL, excepto 33.8S15, presentaban reacciones cruzadas con los antígenos de HLA-B60 ó -B61 (López *et al.*, 1994). Estos resultados sugieren que la especificidad fina de estos CTL frente a los subtipos de HLA-B27 está determinada por la cadena  $\beta$ . La diversidad en las cadenas  $\alpha$  se correlacionó con las diferentes reacciones cruzadas con HLA-B60 (12SRF-37SLG y 11.8SLG), B61 (13SLG), o ninguno de estos antígenos (33.8S15), lo que sugiere que las distintas cadenas  $\alpha$  modulan la reactividad diferencial de estos clones. Este es el primer caso documentado de TCR con idéntica cadena  $\beta$  en una respuesta alorreactiva.

Figura 5.

$\alpha$

$\beta$



| CTL     | V $\alpha$ | N+J $\alpha$ | V $\beta$ | N+D $\beta$ | J $\beta$ |
|---------|------------|--------------|-----------|-------------|-----------|
| 33.8S15 | YFCAMR     | RAAAAGNKL    | LCAS      | RLAGN       | NEQ       |
| 12SRF   | YYCLVGD    | KVNTGFQKL    | LCAS      | RLAGN       | NEQ       |
| 13SLG   | YFCAA      | GSPRYDKV     | LCAS      | RLAGN       | NEQ       |
| 11.8SLG | YFCAL      | TGANNL       | LCAS      | RLAGN       | NEQ       |

**Figura 5.** Southern blot de los productos amplificados a partir del cDNA específico del TCR  $\alpha$  y  $\beta$  de los clones anti-B\*2705 que muestran idéntica cadena  $\beta$  y diferente cadena  $\alpha$ . En cada clon se amplifican alícuotas del cDNA mediante PCR usando oligonucleótidos específicos de las subfamilias  $V\alpha$  y  $V\beta$ , y oligonucleótidos  $C\alpha$  y  $C\beta$  (ver Materiales y Métodos). El material amplificado se hibridó con oligonucleótidos específicos de  $C\alpha$  y  $C\beta$  marcados con  $^{32}P$ . La localización de las bandas indica la subfamilia V que utiliza cada clon. Los puntos a ambos lados corresponden al marcador de peso molecular usado (ver Materiales y Métodos). También se muestra la secuencia de aminoácidos deducida de las regiones CDR3  $\alpha$  y  $\beta$  de estos CTL. En los CTL 12SRF y 13SLG aparecieron dos bandas de amplificación  $\alpha$ . El análisis de secuencia de los productos de PCR permitió distinguir en ambos casos entre transcritos correctos ( $V\alpha 20.1$ ,  $J\alpha 63.124$  y  $V\alpha 8.1$ ,  $J\alpha FR6$  respectivamente) y transcritos aberrantes ( $V\alpha 7$ ,  $J\alpha AB28$  y  $V\alpha 16$ ,  $J\alpha AB28$  respectivamente).

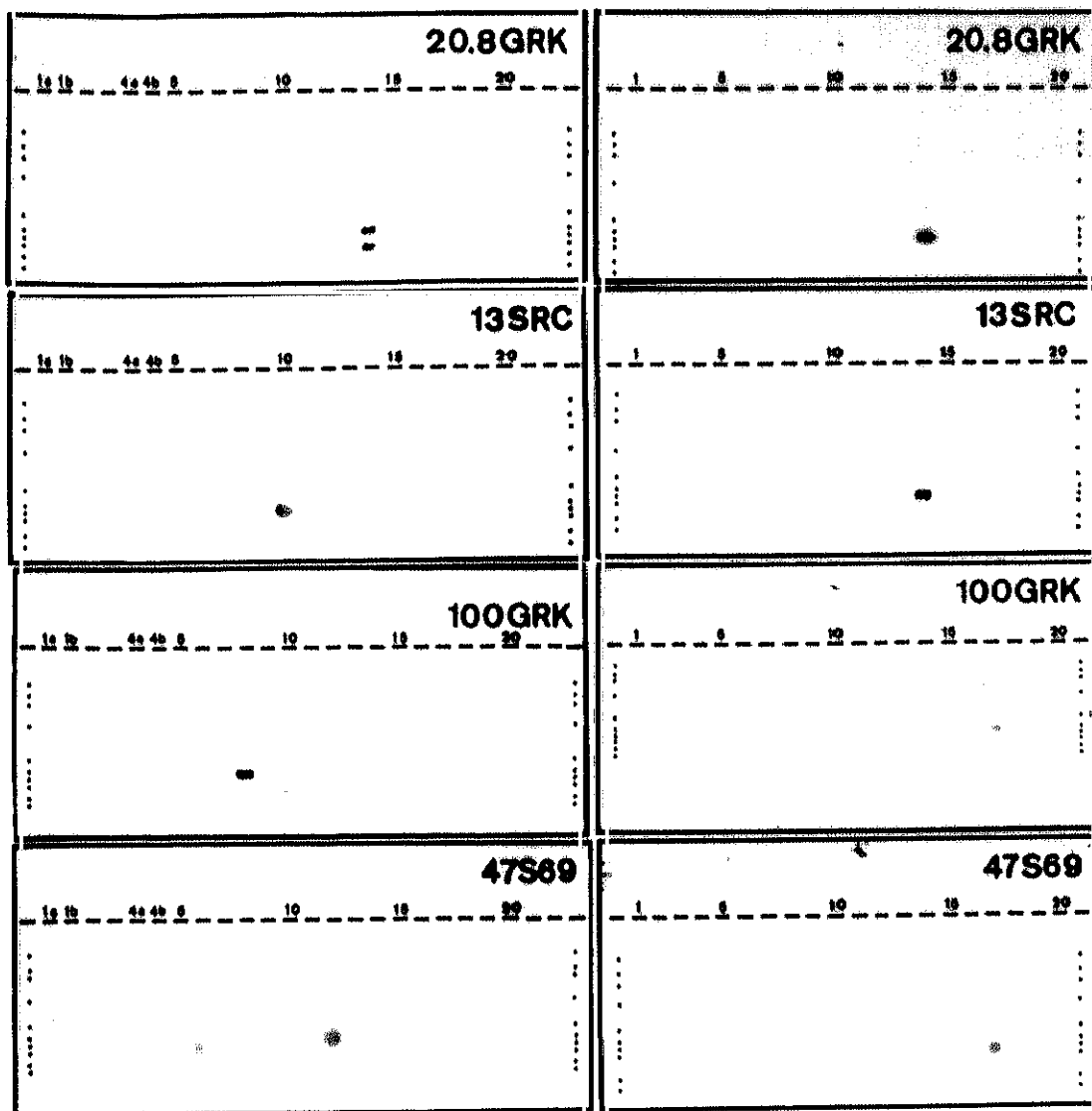


#### 4.1.2.2.- Clones alorreactivos con cadenas $\beta$ altamente similares.

Se encontraron dos pares de CTL que usaban cadenas  $\beta$  con idéntica subfamilia  $V\beta$ , idéntica  $J\beta$ , y donde las regiones  $N+D\beta$  eran muy similares en tamaño y secuencia. Estas parejas las constituyen los CTL 20.8GRK/13SRC y 100GRK/47S69. En cada par, los CTL provenían de distintos respondedores, pero se diferenciaban respectivamente solo en 1 y 2 residuos en su región  $N+D\beta$ . Las cadenas  $\alpha$  correspondientes eran totalmente dispares (Figura 6 y Figura 7). Los CTL en cada par poseían distinta especificidad fina. Mientras CTL 20.8GRK lisaba todos los subtipos menos  $B^*2704$ , 13SRC lisaba solo  $B^*2705$ . CTL 100GRK lisaba todos los subtipos menos  $B^*2703$  y CTL 47S69 lisaba  $B^*2705$ , 01, 02 y 03. Estos resultados indican que se pueden reclutar cadenas  $\beta$  casi idénticas en la respuesta de CTL anti- $B^*2705$  independientemente del respondedor o del patrón de reacción frente a otros subtipos. En cada pareja de CTL las distintas cadenas  $\alpha$  podrían modular la reactividad diferencial, pero no se puede descartar que ésta esté también determinada por las pequeñas diferencias en las regiones  $N+D\beta$ .

#### 4.1.3.- La selección de segmentos $V\beta$ entre los CTL anti- $B^*2705$ es independiente del respondedor y no es específica de epítipo.

Los segmentos V de los transcritos correctos de los respondedores GM y SR (Tabla 4) se clasificaron de acuerdo a los subgrupos de homología a que pertenecían (Chothia *et al.*, 1988). En ambos respondedores un 55% y un 60% respectivamente de los segmentos  $V\beta$  usados por los clonotipos anti-B27 pertenecían al subgrupo de homología 4 (Tabla 5). Este porcentaje era el mismo que se obtuvo anteriormente en nuestro laboratorio en otro individuo no relacionado, DL (Lauzurica *et al.*, 1992), y era mucho mayor que en los controles de células T no-anti-B27 obtenidas de los donantes SR Y GM durante el clonaje (Tabla 5). Las diferencias eran estadísticamente significativas en cada respondedor ( $p < 0,05$ ) y en el total de ambos ( $p < 0,005$ ). No se apreciaron diferencias significativas en otros subgrupos en respondedores individuales con respecto a sus controles, pero considerando ambos donantes se observó una disminución estadísticamente significativa del subgrupo 3 ( $p < 0,05$ ). Estos resultados indican un uso preferente de los segmentos  $V\beta$  del subgrupo de homología 4 entre los CTL anti- $B^*2705$ , que es independiente del respondedor. Esto es debido al uso mayoritario de algunas subfamilias como la  $V\beta 3$  y la  $V\beta 14$ , consideradas en ocasiones como una sola (Toyonaga y Mak, 1987), que

$\alpha$  $\beta$ 

| CTL        | V $\alpha$ | N+J $\alpha$  | V $\beta$ | N+D $\beta$ | J $\beta$ |
|------------|------------|---------------|-----------|-------------|-----------|
| 20.8GRK    | YFCA       | YRSAYSGAGSYQL | FCAS      | WRA         | GEL       |
| 13SRC      | YPRT       | GNTGKL        | FCAS      | WRAA        | EL        |
| 100GRK     | YFCA       | APGSGAGSYQL   | LCASSF    | SGTGT       | YEQ       |
| 47S69 (12) | YFCA       | LSEARGYQKV    | LCASSF    | GTGH        | YEQ       |
| 47S69 (64) | YFCAM      | IGGGSNYKL     |           |             |           |

Figura 6. Southern blot de los productos amplificados a partir del cDNA específico del TCR  $\alpha$  y  $\beta$  de las dos parejas de clones anti-B\*2705 que muestran casi idéntica cadena  $\beta$  y diferente cadena  $\alpha$ . Ver Figura 5. También se muestra la secuencia de aminoácidos deducida de las regiones CDR3  $\alpha$  y  $\beta$  de estos CTL. En CTL 47S69 aparecieron dos bandas  $\alpha$ . Tras el análisis de secuencia se vio que ambas correspondían a transcritos correctos. Como solo apareció una banda  $\beta$ , consideramos las dos combinaciones  $\alpha/\beta$  clonotipos diferentes (Tabla 4).

**Tabla 5. Uso de segmentos V $\beta$  en CTL anti-B\*2705**

| Subgrupo<br>de<br>homología<br>V $\beta$ | Respondedor <sup>1</sup>                    |                         |   |                          | Total                                       |                          |
|--|---|-------------------------|---|--------------------------|---|--------------------------|
|  | GM  |                         | SR  |                          | <u><math>\alpha</math>-B*2705</u><br>(N=26) | <u>Control</u><br>(N=19) |
|  | <u><math>\alpha</math>-B*2705</u><br>(N=11) | <u>Control</u><br>(N=9) | <u><math>\alpha</math>-B*2705</u><br>(N=15) | <u>Control</u><br>(N=10) |   |                          |
| 1  | 3 (27%)                                     | 4 (44%)                 | 3 (20%)                                     | 5 (50%)                  | <u>6 (23%)</u>                              | 9 (47%)                  |
| 2  | 1 (9%)                                      | 1 (11%)                 | 2 (13%)                                     | 0                        | 3 (12%)                                     | 1 (5%)                   |
| 3  | 1 (9%)                                      | 3 (33%)                 | 1 (7%)                                      | 3 (30%)                  | <u>2 (8%)</u>                               | 6 (32%)                  |
| 4  | <u>6 (55%)</u>                              | 1 (11%)                 | <u>9 (60%)</u>                              | 2 (20%)                  | <u>15 (58%)</u>                             | 3 (16%)                  |

<sup>1</sup> El número (N) y el porcentaje de los segmentos V $\beta$  de cada subgrupo en CTL anti-B\*2705 y en células T no-anti-B27 control en cada individuo. Los segmentos V $\beta$  en CTL con idéntico TCR o en CTL con 2 transcritos  $\alpha$  productivos se contaron como uno solo. Los segmentos V $\beta$  de CTL con la misma cadena  $\beta$  y diferentes cadenas  $\alpha$  se contaron como diferentes. Los valores de los CTL anti-B\*2705 que muestran una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) con los controles respectivos están subrayados y en negrilla.

se encontraron en un 23% y en un 15% de los clonotipos anti-B\*2705 respectivamente. En las células T no-anti-B27 de los mismos individuos la V $\beta$ 3 apareció sólo en 1 de 19 transcritos, y la V $\beta$ 14 no apareció ninguna vez. Los resultados también sugieren que las V $\beta$  del subgrupo de homología 3 podrían estar selectivamente disminuidas en los CTL anti-B\*2705 de estos donantes.

Las V $\beta$  del subgrupo de homología 4 se encontraron en el 50% o más de los clones con los siguientes patrones de reacción: anti-B\*2705 (50%), anti-B\*2705 + B\*2703 (86%), y en aquellos que presentaban reacción cruzada con B\*2701 (67%). Estos patrones de reacción constituyen el 77% (20 de 26) de los clonotipos anti-B\*2705 analizados y el 85% (56 de 66) de los CTL caracterizados funcionalmente procedentes de los donantes DL, GM y SR (López *et al.*, 1994). Esto indica que las V $\beta$  del subgrupo de homología 4 no están asociadas en los CTL anti-B\*2705 a ninguna especificidad fina en particular.

El uso incrementado de segmentos V $\beta$  del subgrupo 4 no se asoció a un uso preferente de otros elementos estructurales en los TCR correspondientes. La significación estadística de tal incremento se mantuvo, una vez corregida por los casos de los apartados anteriores, en los que varios TCR compartían cadenas  $\beta$  idénticas o casi idénticas. Este resultado indica que la selección preferente de V $\beta$  del subgrupo 4 se hace en base a la estructura de dichos segmentos y no está asociada a la selección simultánea de otros elementos estructurales del TCR.

#### 4.1.4.- El uso no aleatorio de segmentos V $\alpha$ entre CTL anti-B\*2705 es dependiente del donante.

Se encontraron 16 subfamilias V $\alpha$ , pertenecientes a todos los subgrupos de homología, en los 28 transcritos productivos de los CTL anti-B\*2705 (Tabla 4). A pesar de esta diversidad, algunas subfamilias aparecieron recurrentemente en un respondedor con mayor frecuencia que en los controles respectivos o que en PBL de otros individuos (Tabla 6). V $\alpha$ 14 apareció en un 33% de los transcritos  $\alpha$  productivos de GM, incluyendo 3 de los 4 clonotipos con más reacciones cruzadas en este donante (Tabla 4). Esta subfamilia no se encontró en los correspondientes controles ni en el respondedor SR. Contrastando con esto, V $\alpha$ 7 y V $\alpha$ 20 no se encontraron en los CTL analizados del respondedor GM, pero aparecieron recurrentemente en SR y, dentro de este donante, respectivamente en clonotipos que presentaban pocas reacciones cruzadas con subtipos de HLA-B27 o que presentaban reacción cruzada con B\*2702 (Tabla 4). Estos segmentos V $\alpha$  no se encontraron (V $\alpha$ 20) o se encontraron solo una vez (V $\alpha$ 7) entre las células T no-anti-B27 de los mismos donantes que se analizaron como control (Tabla 6). Por

**Tabla 6. Uso no aleatorio de segmentos  $V\alpha$  en TCR anti-B\*2705**

| Subfamilia<br>$V\alpha^1$ | Respondedor <sup>2</sup>                    |                         |   |                          | PBL <sup>3</sup> |
|---------------------------|---|-------------------------|---|--------------------------|------------------|
|                           | GM  |                         | SR  |                          |                  |
|                           | <u><math>\alpha</math>-B*2705</u><br>(N=12) | <u>Control</u><br>(N=9) | <u><math>\alpha</math>-B*2705</u><br>(N=16) | <u>Control</u><br>(N=11) |                  |
| $V\alpha 7$               | 0   | 0                       | <u>3 (19%)</u>                              | 1 (9%)                   | 2%               |
| $V\alpha 14$              | <u>4 (33%)</u>                              | 0                       | 0   | 0                        | 7%               |
| $V\alpha 20$              | 0   | 0                       | <u>3 (19%)</u>                              | 0                        | 2%               |

<sup>1</sup> Se muestran solo las subfamilias que aparecieron más de dos veces en el mismo respondedor.

<sup>2</sup> Número (N) y porcentaje de segmentos  $V\alpha$  en transcritos productivos de CTL anti-B\*2705, o en transcritos de células T no-anti-B27 control de cada respondedor. Los segmentos  $V\alpha$  de CTL anti-B\*2705 con idéntico TCR se contaron como uno solo. Los segmentos  $V\alpha$  de CTL que tenían dos transcritos productivos se contaron por separado. Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) con PBL no seleccionados (Moss *et al.*, 1993) están subrayadas y en negrilla.

<sup>3</sup> Datos procedentes de Moss *et al.*, 1993, obtenidos de 300 transcritos  $\alpha$  productivos procedentes de PBL de 3 individuos no relacionados.

tanto, el uso recurrente de segmentos  $V\alpha$  entre CTL anti-HLA-B27 refleja diferencias individuales relacionadas con la especificidad clonal. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de  $V\alpha 7$ ,  $V\alpha 14$  y  $V\alpha 20$  en las células T no-anti-B27 de estos donantes con respecto a los valores esperados en base a su presencia en PBL de distintos individuos. Por el contrario en los CTL anti-B\*2705 los valores de  $V\alpha 14$  en GM y  $V\alpha 7$  y  $V\alpha 20$  en SR aparecieron incrementados significativamente ( $p < 0,01$  y  $p < 0,0001$  respectivamente).

Estos resultados indican que hay una menor restricción en el uso de segmentos  $V\alpha$  que en el uso de  $V\beta$ . Sin embargo algunos segmentos  $V\alpha$  aparecen distribuidos de manera no aleatoria. Esta selección de  $V\alpha$  es, a diferencia de la selección de  $V\beta$ , dependiente del respondedor y está asociada a patrones de reacción que presentan características comunes.

#### 4.1.5.- La selección de los segmentos $V\alpha$ y $V\beta$ es independiente de la asociación $V\alpha/V\beta$ .

Se estudiaron las correlaciones positivas y negativas entre el uso de los segmentos  $V\alpha$  más frecuentes y los segmentos  $V\beta$  (Tabla 7) para determinar la posibilidad de un sesgo en la asociación  $V\alpha/V\beta$ . En GM  $V\alpha 14$  apareció asociada tanto a los segmentos  $V\beta$  del subgrupo 4 como a los segmentos  $V\beta$  de otros subgrupos con una frecuencia que sería la esperada si ambos segmentos se asociaran aleatoriamente, en base a sus frecuencias respectivas en los clonotipos anti-B\*2705 de este individuo. Lo mismo ocurrió con  $V\alpha 20$  en el donante SR. Este resultado indica que, en estos casos, la selección de los segmentos  $V\alpha$  o  $V\beta$  en los correspondientes TCR se efectuó independientemente del segmento V en la otra cadena. En contraste con esto,  $V\alpha 7$  se asoció con segmentos  $V\beta$  de subgrupos distintos al 4 con una frecuencia que fue más del doble de la esperada si la asociación fuera aleatoria. Esta frecuencia fue similar a la que se esperaría si la selección de  $V\alpha 7$  se hiciera independientemente del segmento  $V\beta$  (Tabla 7). Este resultado sugiere que la correlación negativa de  $V\alpha 7$  con las  $V\beta$  del subgrupo 4 es debida a que estos TCR fueron seleccionados preferentemente en base a  $V\alpha 7$  y no por sus segmentos  $V\beta$ . Por tanto, como en los casos anteriores, la selección de  $V\alpha$  en estos TCR es aparentemente independiente de su asociación con un determinado segmento  $V\beta$ .

#### 4.1.6.- Motivos recurrentes en las regiones N+D $\beta$ .

En las 23 cadenas  $\beta$  diferentes de los CTL anti-B\*2705 se vio una gran diversidad de

**Tabla 7. Asociación de segmentos  $V\alpha$  y  $V\beta$  en TCR anti-B\*2705**

| Respondedor | Asociación                                 | Frecuencia esperada <sup>1</sup>      | Frec. Encontrada            |
|-------------|--|---------------------------------------|-----------------------------|
| GM          | $V\alpha 14 / V\beta$ h.s. 4               | $0,33 \times 0,55 = 0,18$             | $2 / 12 = 0,17$             |
|             | $V\alpha 14 / V\beta$ h.s. distintos del 4 | $0,33 \times 0,45 = 0,15$             | $2 / 12 = 0,17$             |
| SR          | $V\alpha 20 / V\beta$ h.s. 4               | $0,19 \times 0,6 = 0,11$              | $2 / 16 = 0,125$            |
|             | $V\alpha 20 / V\beta$ h.s. distintos del 4 | $0,19 \times 0,4 = 0,08$              | $1 / 16 = 0,06$             |
|             | $V\alpha 7 / V\beta$ h.s. distintos del 4  | $0,19 \times 0,4 = \underline{0,076}$ | $3 / 16 = \underline{0,19}$ |
|             |  | $0,19 \times 0,8^2 = 0,152$           |                             |

<sup>1</sup> Frecuencia esperada entre los clonotipos anti-B\*2705 si la asociación  $V\alpha/V\beta$  fuera aleatoria. Es el producto de las frecuencias de los segmentos  $V\alpha$  y  $V\beta$  correspondientes. Las diferencias con las frecuencias encontradas están subrayadas y en negrilla.

<sup>2</sup> Frecuencia de los segmentos  $V\beta$  de los subgrupos de homología (h.s.) distintos del 4 en células T no-anti-B27 de SR.

secuencia en la región N+D $\beta$  y un uso no selectivo de segmentos J $\beta$  (Figura 7A). No obstante esta diversidad estaba limitada a tres niveles. Primero, como se ha dicho antes, 4 clonotipos diferentes del donante SR compartían cadenas  $\beta$  idénticas. Segundo, tres pares de transcritos de cadenas  $\beta$  usaban los mismos segmentos V $\beta$  y J $\beta$ . Estos eran los CTL 21S69 y 2SRZ (ambos de SR), 20.8GRK y 13SRC (de GM y de SR respectivamente), y 100GRK y 47S69 (de GM y de SR respectivamente). Las regiones de unión entre estos pares eran muy similares en tamaño y en los dos casos discutidos anteriormente, también en secuencia. Tercero, algunas cadenas  $\beta$  presentaban motivos comunes en la región N+D $\beta$ , pero distintos segmentos V $\beta$  y J $\beta$ . Estas similitudes sugieren una selección dependiente de epítipo de motivos en esta región. Característicamente, el número de motivos N+D $\beta$  recurrentes fue múltiple, y cada uno de éstos era compartido por un subgrupo poco numeroso (entre 2 y 5) de clonotipos. Algunos CTL de un subgrupo dado tenían patrones de reacción parecidos con los subtipos de HLA-B27. Por ejemplo, CTL 74GRK, y la mayoría de los CTL con el clonotipo 12SRF presentaban reacción cruzada solo con B\*2703. CTL 100GRK y 122GRK presentaban reacción cruzada con B\*2702, B\*2704 y B\*2706. CTL 47S69, 100GRK, y 7S15/16S15 presentaban todos reacción cruzada con B\*2701 y B\*2702. En otros casos no se pudo establecer una correlación obvia entre la especificidad fina y la estructura de la región N+D $\beta$ . En conclusión, se observó un uso no aleatorio de secuencias N+D $\beta$ , que consiste en una serie de motivos que aparecen en varios clonotipos. Los motivos recurrentes están asociados a segmentos V $\beta$  y J $\beta$  aparentemente iguales de una manera independiente de donante y de epítipo, pero también a segmentos V $\beta$ +J $\beta$  no relacionados, en clonotipos que a veces tienen una especificidad fina similar. El patrón de restricción en la región N+D $\beta$  sugiere que los epítopos inmunodominantes dependientes de péptido en esta respuesta no son extremadamente diversos.

#### 4.1.7.- Diversidad de unión en las cadenas $\alpha$ y uso recurrente de segmentos J $\alpha$ .

La diversidad de los transcritos  $\alpha$  productivos en la región N fue muy alta y no se apreciaron motivos recurrentes (Figura 7B). Solo dos clonotipos, 33S69 y 11SRY/40SRY, ambos de SR, usaban segmentos V $\alpha$  de la misma subfamilia y los mismos segmentos J $\alpha$ . Sus regiones N tenían la misma longitud, pero eran diferentes. CTL 58GRK y 122GRK (de GM) tenían segmentos V $\alpha$  del mismo subgrupo de homología y segmentos J $\alpha$  idénticos y también tenían regiones N de longitud similar, que empezaban en ambos por dos residuos alifáticos. Los CTL



Figura 7

A

| CTL             | Vβ     | N+Dβ            | Jβ    | Vβ   | Dβ  | Jβ  |
|-----------------|--------|-----------------|-------|------|-----|-----|
| 74GRK           | ICSA   | <u>RLA</u>      | STDTQ | 2    | 2.1 | 2.3 |
| 12SRF           | LCAS   | <u>RLAGN</u>    | NEQ   | 3    | 2.1 | 2.1 |
| <u>21S69</u>    | LCASS  | <u>RGLAV</u>    | NTGEL | 7    | 2.1 | 2.2 |
| <u>2SRZ</u>     | LCASSQ | <u>DLRYA</u>    | GEL   | 7    | 2.1 | 2.2 |
| <u>58GRK</u>    | LCASS  | <u>PGTS</u>     | YEQ   | 6.4  | 2.1 | 2.7 |
| <u>116.8GRK</u> | LCASS  | <u>LTGF</u>     | YEQ   | 6    | 1.1 | 2.7 |
| 5A2             | FCATS  | <u>DLT</u>      | DTQ   | 15.1 | NA  | 2.3 |
| <u>20.8GRK</u>  | FCAS   | <u>WRA</u>      | GEL   | 14   | 2.1 | 2.2 |
| <u>13SRC</u>    | FCAS   | <u>WRAA</u>     | EL    | 14   | 2.1 | 2.2 |
| <u>100GRK</u>   | LCASSF | <u>SGTGT</u>    | YEQ   | 17.1 | 1.1 | 2.7 |
| <u>47S69</u>    | LCASSF | <u>GTGH</u>     | YEQ   | 17.1 | 1.1 | 2.7 |
| 7S15/16S15      | FCASS  | <u>FGTGGQ</u>   | A     | 14   | 1.1 | 1.1 |
| 122GRK          | LCASSQ | <u>GGTGGTD</u>  | TEA   | 7.1  | 1.1 | 1.1 |
| 27S69           | FCASS  | <u>PSSLS</u>    | TQ    | 18.1 | 2.1 | 2.3 |
| 33S69           | FCASS  | <u>PSNSG</u>    | NEKL  | 14   | 2.1 | 1.4 |
| 11SRY/40SRY     | FCASSF | <u>DRGN</u>     | SYEQ  | 8.1  | 1.1 | 2.7 |
| 3SRF            | LCSV   | <u>SDRT</u>     | YGY   | 4    | 1.1 | 1.2 |
| GM7             | LCAS   | <u>KRTQGS</u>   | SYEQ  | 3    | 1.1 | 2.7 |
| 37GRK/123.8GRK  | FCASS  | <u>PRTGL</u>    | NTEA  | 1.1  | 1.1 | 1.1 |
| 31GRK           | FCASS  | <u>RS</u>       | DTQ   | 13.4 | NA  | 2.3 |
| 93S15           | LCAS   | <u>RRGGRGID</u> | YGY   | 3    | 1.1 | 1.2 |
| 29S15           | LCASS  | <u>SLGGAT</u>   | SPL   | 5.4  | 1.1 | 1.6 |
| 17A2            | FCASS  | <u>PGMAYA</u>   | EA    | 13   | 1.1 | 1.1 |

B

| CTL                | Vα      | N+Jα                   | Vα   | Jα      |
|--------------------|---------|------------------------|------|---------|
| 20.8GRK            | YFCA    | <u>YRSAYSGAGSYQL</u>   | 14.1 | HAVT01  |
| 100GRK             | YFCA    | <u>APGSGAGSYQL</u>     | 8.1  | HAVT01  |
| 116.8GRK           | YICV    | <u>VTGAGSYQL</u>       | 24   | HAVT01  |
| <u>58GRK</u>       | YFCA    | <u>LIYTSGTYKY</u>      | 12.1 | 122GRK  |
| 122GRK             | YFCAF   | <u>MMGPGSTYKY</u>      | 14   | 122GRK  |
| 7S15/16S15         | YFCAA   | <u>SSGTYKY</u>         | 17.1 | 122GRK  |
| 37GRK/123.8GRK     | YFCAF   | <u>TTFPAENYGGSQGNL</u> | 14   | IGRJa06 |
| 3SRF               | YCAVE   | <u>LWLTNYGGSQGNL</u>   | 11.1 | IGRJa06 |
| 27S69              | YLCVR   | <u>ASPGEGGSQGNL</u>    | 7.2  | IGRJa06 |
| <u>33S69</u>       | YLCA    | <u>FYDYKL</u>          | 2    | HAVP10  |
| <u>11SRY/40SRY</u> | YLCAV   | <u>RDYKL</u>           | 2    | HAVP10  |
| 31GRK              | YICA    | <u>APWGMSSGSNYKL</u>   | 19.1 | HAVT33  |
| 47S69              | YFCAM   | <u>IGGGSNYKL</u>       | 84   | HAVT33  |
| 29S15              | YLCAV   | <u>SLYSGGYOKV</u>      | 7.2  | AG212   |
| 47S69              | YFCA    | <u>LSEARGYOKV</u>      | 12.1 | AG212   |
| 2SRZ               | YFCVR   | <u>DPNOGGK</u>         | 7.1  | HAVP36  |
| 74GRK              | YFCVR   | <u>ALPYNNOGGK</u>      | 16.2 | HAVP36  |
| GM7                | YFCA    | <u>PLSSASKI</u>        | 22   | PY14    |
| 5A2                | YFCA    | <u>GPLNGYAL</u>        | 14   | IGRJa12 |
| 17A2               | YFCAMRE | <u>GPGNQF</u>          | 84   | HAVP01  |
| 74GRK              | YCAVE   | <u>DRSNFNKF</u>        | 11.2 | AC24    |
| 11.8SLG            | YFCAL   | <u>TGANNL</u>          | 3.1  | 62.119  |
| 12SRF              | YYCLVGD | <u>KVNTGFQKL</u>       | 20.1 | 63.124  |
| 13SLG              | YFCAA   | <u>GSPRYDKV</u>        | 8.1  | FR6     |
| 21S69              | YYCLV   | <u>VSGANSNTPL</u>      | 20.1 | HJGF    |
| 33.8S15            | YFCAMR  | <u>RAAAAGNKL</u>       | 84   | AC25    |
| 93S15              | YYCLVGD | <u>LGGGFKT</u>         | 20.1 | IGRJa04 |
| 13SRC              | YPRT    | <u>GNTGKL</u>          | 10   | HAVP29  |

**Figura 7.** Secuencia de aminoácidos deducida de las regiones de unión de la cadena  $\beta$  (A) y de la cadena- $\alpha$  (B) de transcritos productivos de CTL anti-B\*2705. Se muestran el extremo C-terminal de los segmentos V, las regiones N/N+D $\beta$ , y el extremo N-terminal de los segmentos J. Se indican para cada transcrito los segmentos V, D, y J y el CTL al que corresponden. Los CTL que tienen el mismo transcrito para la cadena  $\beta$  aparecen nombrados, menos en el caso de 12SRF. El mismo transcrito de la cadena  $\beta$  que tiene este CTL aparece junto con el mismo transcrito  $\alpha$  en CTL 12SLG, 60SLG, 4S15, 11S15, y 37SLG, y junto a distintos transcritos  $\alpha$  en los CTL 33.8S15, 13SLG, y 11.8SLG (Tabla 1). Las secuencias están agrupadas de acuerdo con la similitud de sus regiones N+D $\beta$  (A) o por tener segmentos J $\alpha$  iguales (B). Los motivos recurrentes N+D $\beta$  y los segmentos J $\alpha$  iguales aparecen en negrilla y subrayados. Los CTL que usan la misma subfamilia V y el mismo segmento J están recuadrados y en negrilla. El segmento V $\alpha$  del CTL 13SRC se diferencia del V $\alpha$ 10.1a (Obata *et al.*, 1993) en los tres últimos codones y carece del residuo Cys90, conservado en todos los segmentos V $\alpha$ .

en cada uno de estos pares diferían en su especificidad fina, y tenían cadenas  $\beta$  diferentes.

La diversidad de la cadena  $\alpha$  estaba limitada a nivel de los segmentos  $J\alpha$  (Tabla 8). Siete segmentos  $J\alpha$  daban cuenta del 61% de los 28 transcritos  $\alpha$  productivos en GM y SR, mientras que en 300 transcritos  $\alpha$  productivos procedentes de PBL en un estudio previo (Moss *et al.*, 1993) estos segmentos solo aparecieron en un 13.9%. Tres de los segmentos  $J\alpha$  recurrentes se encontraron en CTL de GM o de SR, mientras que los otros se encontraron en ambos respondedores. Por tanto, el uso recurrente de  $J\alpha$  es independiente del respondedor. Los resultados obtenidos en ambos donantes fueron similares. En GM, 5 segmentos  $J\alpha$  que en PBL aparecían un 9,3% (Moss *et al.*, 1993), daban cuenta del 67% de los 12 transcritos productivos  $\alpha$  de este individuo. En SR, 6 segmentos  $J\alpha$  que en PBL aparecían en un 12,9%, daban cuenta del 56% de los 16 transcritos productivos  $\alpha$  de este individuo. El incremento en el uso de estos segmentos  $J\alpha$  en cada donante o en el conjunto de ambos en relación con PBL no seleccionados fue estadísticamente significativo ( $p < 0,0001$ ). En general no parecía haber una correlación entre uso de  $J\alpha$  y especificidad fina. En la mayoría de los casos, los segmentos  $J\alpha$  estaban asociados a segmentos  $V\alpha$  no relacionados, lo que implica que el sesgo de  $J\alpha$  no es debido a la asociación V-J. Estos resultados indican un uso selectivo de segmentos  $J\alpha$  en los CTL anti-B\*2705, que no es específico de epítipo y es independiente del donante, y una diversidad N no restringida. La restricción de segmentos  $J\alpha$  no se asocia a una restricción de motivos estructurales en la región N+D $\beta$  de los mismos TCR (Figura 7). Esto sugiere que las regiones de diversidad en ambas cadenas del TCR (N+D $\beta$  o N+ $J\alpha$ ) son seleccionadas independientemente.

#### **4.1.8- Estructura del TCR en CTL anti-B\*2705 que reaccionan cruzadamente con HLA-DR2: homología con TCR anti-DR2.**

En nuestro laboratorio se describió el primer caso de clones de CTL que presentaban simultáneamente alorreactividad contra antígenos de clase I y clase II (Aparicio *et al.*, 1987). En ese trabajo se caracterizaron tres clones de CTL alorreactivos CD8<sup>+</sup> que eran capaces de lisar dianas HLA-B\*2705<sup>+</sup> y dianas HLA-DR2<sup>+</sup>. Se demostró la alorreactividad dual de estos clones, diferente del reconocimiento restringido por clase I de antígenos de clase II, pero no se pudo establecer la base de esta reacción cruzada ni caracterizar los TCR correspondientes.

En el respondedor GM, no relacionado con el anterior, los CTL 37GRK y 123.8GRK,

**Tabla 8. Segmentos J $\alpha$  recurrentes en los transcritos  $\alpha$  productivos de CTL anti-B\*2705**

| Segmentos J $\alpha$ <sup>1</sup> | Respondedor        |                    | Total              | % en PBL <sup>2</sup> |
|-----------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-----------------------|
|                                   | GM                 | SR                 |                    |                       |
|                                   | N (%) <sup>3</sup> | N (%) <sup>3</sup> | N (%) <sup>3</sup> |                       |
| HAVT01                            | 3 (25%)            | 0                  | 3 (11%)            | 1%                    |
| 122GRK                            | 2 (17%)            | 1 (6%)             | 3 (11%)            | 2,7%                  |
| IGRJa06                           | 1 (8%)             | 2 (12,5)           | 3 (11%)            | 1,3%                  |
| HAVT33                            | 1 (8%)             | 1 (6%)             | 2 (7%)             | 1,3%                  |
| AG212                             | 0                  | 2 (12,5%)          | 2 (7%)             | 1,3%                  |
| HAVP10                            | 0                  | 2 (12,5%)          | 2 (7%)             | 3,3%                  |
| HAVP36                            | 1 (8%)             | 1 (6%)             | 2 (7%)             | 3%                    |
| Total                             | 8 (67%)            | 9 (56%)            | 17 (61%)           | 13,9%                 |

<sup>1</sup> Segmentos J $\alpha$  que aparecen más de una vez en los CTL analizados. J $\alpha$ 122GRK tiene la misma secuencia de aminoácidos que J $\alpha$ 17.10 (AA) (Moss *et al.*, 1993). La frecuencia total de estos segmentos J $\alpha$  en cada respondedor o en ambos respondedores juntos está incrementada significativamente ( $p < 0,0001$ ) si se compara con PBL no seleccionados (Moss *et al.*, 1993).

<sup>2</sup> Datos de Moss *et al.*, 1993.

<sup>3</sup> Los valores porcentuales corresponden a 12, 16 y 28 transcritos productivos diferentes de los donantes GM, SR, o ambos, respectivamente.

presentaron también reacción cruzada con HLA-DR2 (López *et al.*, 1993). Estos CTL reconocían los subtipos B\*2701 a B\*2706, pero solamente el subtipo DR2Dw2 (B5\*0101). La lisis de las dianas DR2<sup>+</sup> se inhibió por anticuerpos monoclonales anti-CD3 y anti-DR. En los ensayos de competición fría las dianas HLA-B27 y DR2Dw2 se inhibieron mutuamente. La correlación entre las secuencias de los subtipos de HLA-B27 y HLA-DR2, y la especificidad fina de estos CTL permitió identificar un motivo estructural específicamente compartido por HLA-B27 y HLA-DR2 (B5\*0101). Este motivo estaba compuesto por varias posiciones de la lámina  $\beta$  que forma el fondo del sitio de unión de péptido. La alteración de residuos de este motivo por mutagénesis dirigida, anulaba el reconocimiento de HLA-B27 por CTL 37GRK. Estas posiciones están implicadas en la presentación peptídica pero no son accesibles al TCR, lo que sugiere que la aloespecificidad dual de 37GRK y 123.8GRK se debe al reconocimiento de péptidos estructuralmente relacionados, presentados por HLA-B27 y HLA-DR2.

El análisis por PCR y secuenciación del TCR mostró que CTL 37GRK y CTL 123.8GRK poseían un único receptor idéntico en ambos casos y por tanto ambos CTL eran un mismo clonotipo (Figura 8). Este resultado demostró formalmente que la alorreactividad dual HLA-B27/DR2 está mediada en estos CTL por un único TCR.

La secuencia de las cadenas  $\beta$  de este TCR se comparó con las de dos clones anti-HLA-DR2 descritos independientemente (Wilson *et al.*, 1991). Las tres secuencias compartían, en la región N+D $\beta$  una Arg y una Asn en el extremo N-terminal del segmento J $\beta$ . Además la secuencia del clonotipo 37GRK/123.8GRK compartía con el TCR del clon anti-DR2 C04 una Pro en la unión V $\beta$ -D $\beta$  y una Leu en la unión D $\beta$ -J $\beta$ . La Leu en esta posición ha aparecido solamente en este clonotipo entre todos los TCR de los clones anti-HLA-B\*2705 examinados. El clonotipo 37GRK/123.8GRK usaba la misma J $\beta$  que el clon C04 reordenada de manera idéntica (Figura 9). Este resultado indica una notable homología del clonotipo 37GRK/123.8GRK con TCR anti-DR2 en la región CDR3 $\beta$  y sugiere que la reacción de este clonotipo con HLA-DR2 implica un motivo peptídico en cuyo reconocimiento está implicada la región N+D $\beta$ .



Figura 9. Region N+D $\beta$ /J $\beta$  del clonotipo 37GRK/123.8GRK y de las células T anti-DR2.<sup>1</sup>

| CTL            | V $\beta$ | V $\beta$                  | N-D $\beta$ -N |          |          |          |          |          |          |          |     |          | J $\beta$ | D $\beta$ | J $\beta$ |     |     |
|----------------|-----------|----------------------------|----------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----|----------|-----------|-----------|-----------|-----|-----|
| 37GRK/123.8GRK | 1.1       | C A S S<br>TGT GCC AGC AGC | ---            | ---      | ---      | P<br>CCC | R<br>CGG | T<br>ACA | G<br>GGC | L<br>C-- | -TG | N<br>AAC | T<br>ACT  | E<br>GAA  | A<br>GCT  | 1.1 | 1.1 |
| T1005UBO03C04  | 8.2       | C A S S<br>TGT GCC AGC AGT | ---            | P<br>CCC | K<br>AAA | S<br>TCC | R<br>CGG | Y<br>TAC | T<br>ACC | L<br>T-- | -TG | N<br>AAC | T<br>ACT  | E<br>GAA  | A<br>GCT  | 1.1 | 1.1 |
| T1005UBO03C16  | 8.2       | C A S S<br>TGT GCC AGC AGT | ---            | ---      | L<br>CTT | Y<br>TAT | R<br>CGA | Q<br>CAG | GG-      | G<br>--- | --T | N<br>AAT | S<br>TCA  | P<br>CCC  | L<br>CTC  | 1.1 | 1.6 |

<sup>1</sup> Los residuos similares de esta región están enmarcados. En la parte superior se indican los segmentos V $\beta$ , D $\beta$  y J $\beta$  de cada receptor. La secuencia de los clones anti-DR2 está tomada de Wilson *et al.*, 1991.

## 4.2.- Repertorio de TCR en la respuesta alogénica anti-B\*2703.

### 4.2.1.- Análisis de la secuencia de las cadenas $\alpha$ y $\beta$ amplificadas.

Se analizaron 31 clones de CTL anti-B\*2703 de especificidad fina conocida: 16 del respondedor DL (HLA-A29, 31; B39, 44; DR2, 7) y 15 del respondedor GM (HLA-A1, 24; B7, B8; DR1, 3). Estos CTL correspondían a 15 y 12 clonotipos respectivamente, ya que, tras el análisis de sus receptores, se vio que algunos eran idénticos (Tabla 9). Se secuenció, de cada cadena, una parte del segmento V (de 31 a 240bp, siendo la media 120 bp), la región N/N+D $\beta$ , el segmento J $\alpha$ /J $\beta$  y el extremo 5' del segmento C. Todos los clones analizados presentaron un único transcrito  $\alpha$  productivo, excepto CTL 23GLM, que presentó dos. Los oligonucleótidos de V $\alpha$ 17, V $\alpha$ 9 y V $\beta$ 8 amplificaron en reacción cruzada los transcritos que expresaban segmentos V de las nuevas subfamilias V $\alpha$ w25, V $\alpha$ w29 (Roman-Roman *et al.*, 1991) y V $\beta$ w22 (Ferradini *et al.*, 1991) respectivamente. Los oligonucleótidos de V $\alpha$ 3 y V $\alpha$ 8 amplificaron en reacción cruzada transcritos que expresaban los segmentos V $\alpha$ 8 y V $\alpha$ 13 y los V $\beta$ 5 y V $\beta$ 8 amplificaron el segmento V $\beta$ 6.4, que el oligonucleótido de V $\beta$ 6 no amplificó. Las reacciones cruzadas de los oligonucleótidos selectivos de subfamilia con otras subfamilias observados en esta tesis se resumen en la Tabla 10. Se hallaron transcritos  $\alpha$  aberrantes en los CTL 18DLH (V $\alpha$ 10.1-J $\alpha$ PY14), 5DCJ (V $\alpha$ 10-J $\alpha$ AC9), 62GCP/63GLM (V $\alpha$ 3.1-J $\alpha$ 13.2) y 29GCP/54GCP (V $\alpha$ 8.2-J $\alpha$ 62.119). En CTL 81DCJ se detectó un transcrito aberrante de la cadena  $\beta$  (V $\beta$ 16.1-J $\beta$ 2.5-C $\beta$ 2).

### 4.2.2.- Los CTL que reconocen epítomos "privados" de B\*2703 presentan una heterogeneidad limitada.

De los 36 clones de CTL anti-B\*2703 de los respondedores GM y DL solo 6 no lisaron LCL que expresaban B\*2705 u otros subtipos (López *et al.*, 1994). Se analizó el TCR de estos clones. Como puede verse en la Tabla 9, los dos clones del respondedor DL, CTL 13DCJ y 31DCJ, expresaban un mismo receptor, siendo por tanto el mismo clonotipo. CTL 42.8GLM y 71GCP, del respondedor GM, resultaron ser también un mismo clonotipo. Además, estos dos



**Tabla 9.** *Uso de los segmentos génicos de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR en transcritos productivos de CTL anti-B\*2703<sup>1</sup>*

| CTL                   | Patrón de reacción<br>con los subtipos | V $\alpha$ | h.s. | J $\alpha$ | V $\beta$ | h.s. | J $\beta$ | Número de acceso<br>alfa/beta |
|-----------------------|--|------------|------|------------|-----------|------|-----------|-------------------------------|
| <u>Respondedor DL</u> |  |            |      |            |           |      |           |                               |
| 13DCJ/31DCJ           | 3                                      | 14.1       | 3    | AC9        | 14        | 4    | 1.5       | U39095/U39128                 |
| 15DLH                 | 3, 5                                   | w29        | NA   | IGRJa04    | 13        | 4    | 2.3       | U39094/U39121                 |
| 18DLH                 | 3, 5                                   | 16.1       | 4    | IGRJa04    | 1         | 1    | 2.3       | U39096/U39127                 |
| 28DLH                 | 3, 5                                   | 3.1        | 2    | 62.119     | 13        | 4    | 2.7       | U39100                        |
| 36DLH                 | 3, 5                                   | w25        | NA   | HAVT06     | 12.3      | 4    | 2.7       | U39102/U39124                 |
| 81DCJ                 | 3, 5                                   | 13.1       | 2    | HAVT06     | 5         | 1    | 1.1       | U39115/U39141                 |
| 7DCI                  | 3, 5                                   | 14.1       | 3    | 122GRK     | 7.2       | 2    | 2.5       | U39118/U39140                 |
| 70DCI                 | 3, 5                                   | 14         | 3    | AA13       | 17.1      | 4    | 1.1       | U39114/U39138                 |
| 5DCJ                  | 3, 5, 2                                | 14         | 3    | IGRJa10    | 7         | 2    | 2.7       | U39112/U39133                 |
| 37DCJ                 | 3, 5, 2                                | 1.8        | 4    | AA17       | 4         | 3    | 1.1       | U39103/U39125                 |
| 5DLL                  | 3, 5                                   | 20.1       | 6    | AC17       | 6.4       | 1    | 2.7       | U39109/U39135                 |
| 3.8DLH                | 3, 5, 4                                | 15.1       | 1    | AB19       | 3         | 4    | 2.1       | U39105                        |
| 12DCJ                 | 3, 5, 1, 2                             | 8.2        | 1    | IGRJa02    | 17.1      | 4    | 2.2       | U39093/U39120                 |
| 43DCJ                 | 3, 5, 2, 4                             | 7.2        | 6    | IGRJa14    | 16.1      | 1    | 2.7       | U39108/U39132                 |
| 11DCJ                 | 3, 5, 4, 6                             | 3.1        | 2    | HAVP41     | w22       | NA   | 2.1       | U39092/U39126                 |
| <u>Respondedor GM</u> |  |            |      |            |           |      |           |                               |
| 39GLM                 | 3                                      | w29        | NA   | AG212      | 14        | 4    | 2.1       | U39104/U39131                 |
| 42.8GLM/71GCP         | 3                                      | 2.2        | 1    | IGRJa10    | 8.2       | 1    | 1.6       | U39107/U39134                 |
| 74.8GCP               | 3                                      | 11.1       | 7    | AC25       | 8.2       | 1    | 1.6       | U39116/U39134                 |
| 77GCP                 | 3, 5                                   | 12.1       | 3    | HAVT33     | w22       | NA   | 1.2       | U39117/U39139                 |
| 23GLM                 | 3, 5                                   | 9.1        | 4    | HAVT33     | 17.1      | 4    | 1.1       | U39097/U39129                 |
|                       |  | 14         | 3    | HAVP01     |           |      |           | U39098                        |
| 48GLM                 | 3, 5                                   | 8.2        | 1    | IGRJa02    | 6.1       | 1    | 1.6       | U39110/U39136                 |
| 62GCP/63GLM           | 3, 5                                   | w25        | NA   | 62.119     | 5.3       | 1    | 1.1       | U39113/U39142                 |
| 29GCP/54GCP           | 3, 5                                   | 7.2        | 6    | HAVP29     | 13.4      | 4    | 1.2       | U39101/U39123                 |
| 42GCP                 | 3, 5, 2                                | 8.4        | 3    | IGRJa14    | 17.1      | 4    | 1.1       | U39106/U39130                 |
| 81GCP                 | 3, 5, 4                                | w25        | NA   | HAVP01     | 17.1      | 4    | 2.2       | U39119/U39143                 |
| 26GCP                 | 3, 6                                   | 8.4        | 3    | HAVP10     | 12.3      | 4    | 2.3       | U39099/U39122                 |
| 56GLM                 | 3, 5, 6                                | 8.1        | 1    | AA17       | 13.4      | 4    | 1.2       | U39111/U39137                 |

**Tabla 9.**

<sup>1</sup> Los CTL con TCR idéntico aparecen agrupados. Los patrones de reacción clonal son de López *et al.*, 1994. Los números indican los subtipos de HLA-B27 que fueron reconocidos por cada CTL en dianas LCL. Los CTL anti-B\*2703 no presentaron reacción cruzada con otros antígenos diferentes de HLA-B27, salvo en los siguientes casos: CTL 43DCJ (B7, B61), 11DCJ (B55) y 23GLM (B60, B61). La numeración de las subfamilias V $\alpha$  1 a V $\alpha$ 22 y de V $\beta$ 1 a V $\beta$ 16 es la de Wilson *et al.*, 1988. V $\beta$ 17 a V $\beta$ 20 están nombradas como en Toyonaga y Mak, 1987. Las subfamilias V $\alpha$  y V $\beta$  con número mayor están nombradas como en Roman-Roman *et al.*, 1991 y Ferradini *et al.*, 1991, respectivamente. Los miembros dentro de una subfamilias se asignaron cuando la secuencia parcial determinada fué idéntica a un solo miembro de la misma. Además de los especificados, otros miembros asignados fueron los siguientes: V $\alpha$ 14.37GRK (López *et al.*, 1993) en CTL 70DCI, 5DCJ y 23GLM; V $\alpha$ w29 (Moss *et al.*, 1993) en CTL 15DLH y 39GLM; V $\beta$ 13IGRb16 (Ferradini *et al.*, 1991) en CTL 28DLH; V $\beta$ 7IGRb18 (Ferradini *et al.*, 1991) en CTL 5DCJ. Los segmentos V están clasificados en subgrupos de homología (h.s.) (Chothia *et al.*, 1988). NA: subgrupo no asignado. No se determinó la secuencia de la región N+D $\beta$  en los CTL 3.8DLH y 28DLH.

**Tabla 10.** *Reacciones cruzadas de oligonucleótidos específicos de subfamilia con otras subfamilias V*

| Oligonucleótido | Subfamilia adicional<br>amplificada           |
|-----------------|---|
| V $\alpha$ 3E   | V $\alpha$ 8                                  |
| V $\alpha$ 5E   | V $\alpha$ w24                                |
| V $\alpha$ 8E   | V $\alpha$ 13, V $\alpha$ w24                 |
| V $\alpha$ 9E   | V $\alpha$ w29                                |
| V $\alpha$ 17E  | V $\alpha$ w25                                |
| V $\alpha$ 18E  | V $\alpha$ 17                                 |
| V $\beta$ 5E    | V $\beta$ 6.4                                 |
| V $\beta$ 8E    | V $\beta$ 6.4, V $\beta$ 6GLPA, V $\beta$ w22 |

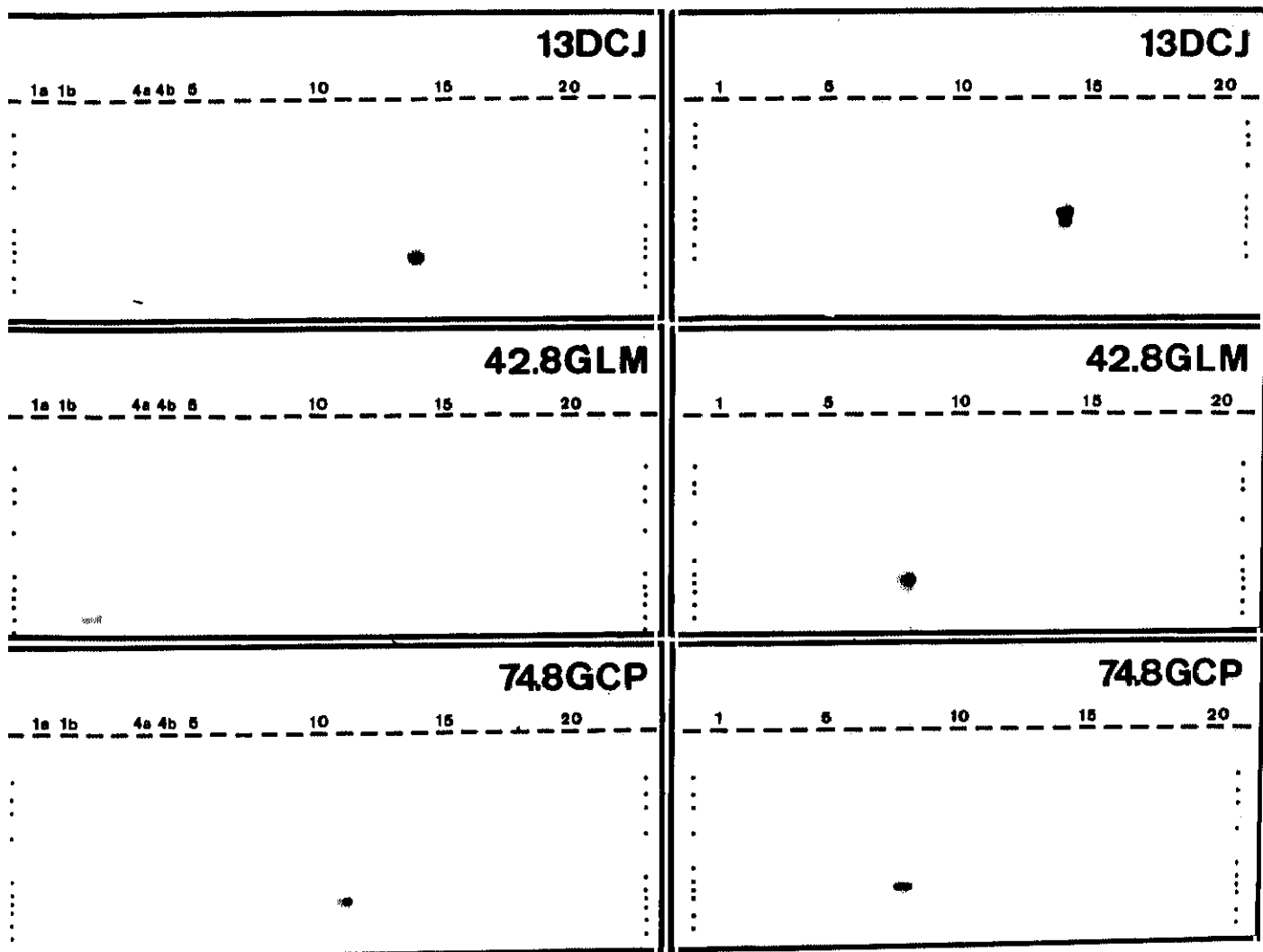
clones y CTL 74.8GCP, también de GM, expresaban la misma cadena  $\beta$ . La cadena  $\alpha$  del 74.8GCP era, sin embargo, diferente a la que compartían los otros dos CTL (Figura 10).

La especificidad fina de los CTL 71GCP y 74.8GCP se analizó con un panel de mutantes de B\*2705 (Figura 11). Los patrones de reacción que se obtuvieron indicaron que estos dos CTL reconocían B\*2705 expresado en células C1R aunque menos eficientemente que B\*2703, y que la especificidad fina de ambos es casi idéntica. Este resultado indica que la especificidad de CTL 42.8GLM/71GCP y 74.8GCP está determinada esencialmente por la cadena  $\beta$ , pues es la que se comparte en ambos casos. Sin embargo, como CTL 71GCP lisó LCL B\*2703<sup>+</sup> (López *et al.*, 1994) o transfectantes B\*2703<sup>+</sup> en C1R con una eficiencia substancialmente mayor que CTL 74.8GCP (ver el pie de la Figura 11) es posible que las cadenas  $\alpha$  respectivas modulen la afinidad del TCR en estos casos. CTL 39GLM, que expresaba un TCR diferente a los anteriores (Tabla 9 y Figura 10), no reconoció a B\*2705 ni a ninguno de los mutantes (Figura 11). En su conjunto, estos resultados indican una gran restricción en la heterogeneidad de los clones que reconocen epítomos de B\*2703 que están ausentes o alterados en B\*2705, confirmando y extendiendo estudios previos en nuestro laboratorio (López *et al.*, 1994; Villadangos *et al.*, 1994a) de que el polimorfismo de B\*2703 induce pocos epítomos nuevos en relación a B\*2705.

#### 4.2.3.- Uso de segmentos V $\alpha$ y V $\beta$ en los CTL anti-B\*2703.

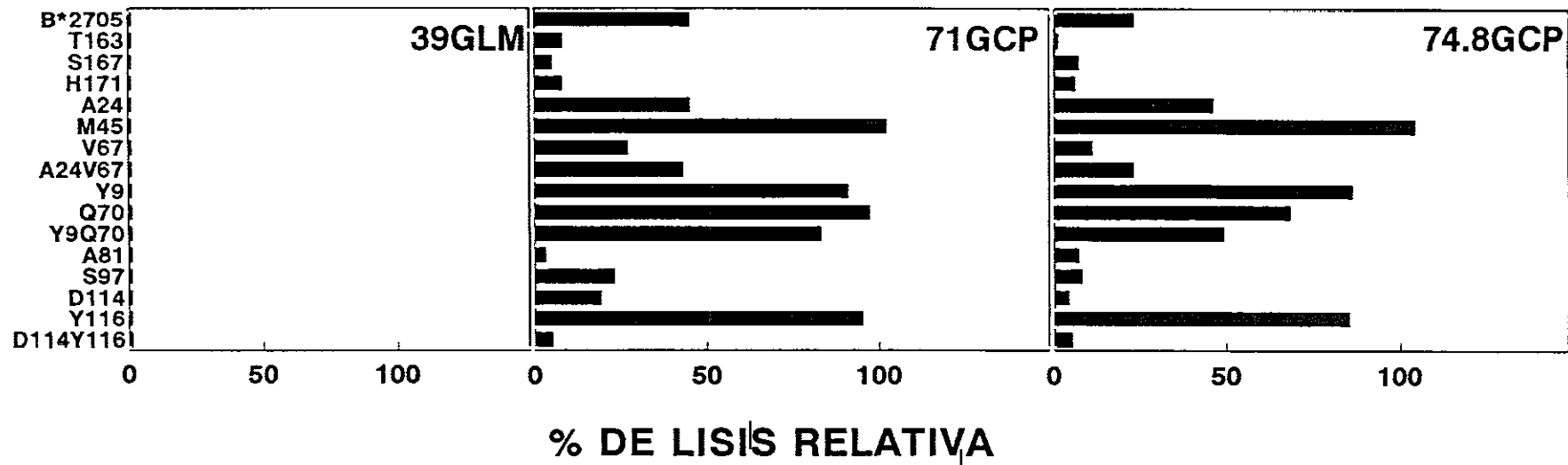
Más de la mitad de los CTL anti-B\*2703 analizados usaron segmentos V $\beta$  del subgrupo de homología 4 (Tabla 11). Este predominio fue estadísticamente significativo en cada respondedor ( $p < 0,05$ ), o en el conjunto de ambos ( $p < 0,01$ ). Las subfamilias V $\beta$ 13 y V $\beta$ 17 fueron las más usadas y daban cuenta de 9 de los 14 segmentos V $\beta$  del subgrupo de homología 4. Estos resultados indican un sesgo en el uso de segmentos V $\beta$  en los CTL anti-B\*2703 que es independiente del respondedor, al igual que ocurría en los CTL anti-B\*2705.

En cuanto al uso de segmentos V $\alpha$ , no se vio ningún sesgo en el respondedor GM, ya que ninguna subfamilia V $\alpha$  se repitió más de dos veces entre los 13 transcritos  $\alpha$  productivos del mismo (Tabla 9). Por el contrario, en el respondedor DL, V $\alpha$ 14 estaba incrementada ( $p < 0,01$ ), ya que apareció en 4 (27%) de los 15 clonotipos anti-B\*2703 de este respondedor (Tabla 11). Este resultado indica que, como en la respuesta anti-B\*2705, la restricción en el uso de segmentos V $\alpha$  es menos fuerte que en V $\beta$  y que, a diferencia de ésta, es dependiente del individuo respondedor.

$\alpha$  $\beta$ 

| CTL           | V $\alpha$ | N+J $\alpha$ | V $\beta$ | N+D $\beta$ | J $\beta$ |
|---------------|------------|--------------|-----------|-------------|-----------|
| 13DCJ/31DCJ   | FCA        | YKAQGGSEKL   | FCASS     | LDPFK       | PQ        |
| 42.8GLM/71GCP | LCA        | VREG         | FCAS      | GGGLG       | SPL       |
| 74.8GCP       | YCAV       | EDRVKAAGNKL  | FCAS      | GGGLG       | SPL       |

**Figura 10.** Southern blot de los productos amplificados a partir del cDNA específico del TCR  $\alpha$  y  $\beta$  de los clones anti-B\*2703 que reconocen "epítotos privados" de B\*2703. CTL 31DCJ y CTL 71GCP presentaron el mismo patrón de amplificación y secuencias idénticas en sus transcritos  $\alpha$  y  $\beta$ , que 13DCJ y 42.8GLM respectivamente, por lo que se consideraron el mismo clonotipo. Ver Figura 5. También se muestra la secuencia de aminoácidos deducida de las regiones CDR3  $\alpha$  y  $\beta$  de estos CTL.



**Figura 11.** Citotoxicidad de los clones anti-B\*2703 CTL 39GLM, 71GCP y 74.8GCP frente a dianas HMy2.C1R transfectadas que expresan B\*2705 o los mutantes de B\*2705 que se especifican. El nombre de los mutantes corresponde al aminoácido(s) introducido(s) (código de una letra) seguido del número(s) de la posición(es) mutada(s). En la figura se muestra el % de lisis relativa: la lisis frente a cada diana se expresa como el % de la lisis específica con respecto a la lisis de células C1R B\*2703<sup>+</sup> en la misma proporción efector-diana. Los datos proceden, al menos, de tres experimentos y se obtuvieron a tres relaciones efector-diana diferentes (2:1, 1:1, 0,5:1). Los resultados fueron similares en los tres casos, por lo que para simplificar se muestran solo los datos de la relación 2:1. El porcentaje de lisis específica del transfectante B\*2703<sup>+</sup> a esta relación efector-diana es del 60%, 68% y 33% en los CTL 39GLM, 71GCP y 74.8GCP, respectivamente. El % de lisis específica de la línea HMy2.C1R transfectada solo con pSV2neo fué el 1% en los tres clones.

Tabla 11. Uso de segmentos  $V\alpha$  y  $V\beta$  en CTL anti-B\*2703

| Subgrupo<br>de<br>homología<br><br>$V\beta$ | Respondedor <sup>1</sup>                    |                          |   |                          | Total                                       |                          |
|---|---|--------------------------|---|--------------------------|---|--------------------------|
|   | GM  |                          | DL  |                          |   |                          |
|   | <u><math>\alpha</math>-B*2703</u><br>(N=12) | <u>Control</u><br>(N=17) | <u><math>\alpha</math>-B*2703</u><br>(N=15) | <u>Control</u><br>(N=17) | <u><math>\alpha</math>-B*2703</u><br>(N=27) | <u>Control</u><br>(N=34) |
| 1   | 4 (33%)                                     | 8 (47%)                  | 4 (27%)                                     | 10 (59%)                 | 8 (30%)                                     | 18 (53%)                 |
| 2   | 0   | 2 (12%)                  | 2 (13%)                                     | 2 (12%)                  | 2 (7%)                                      | 4 (12%)                  |
| 3   | 0   | 3 (18%)                  | 1 (7%)                                      | 2 (12%)                  | 1 (4%)                                      | 5 (15%)                  |
| 4   | <u>7 (58%)</u>                              | 4 (24%)                  | <u>7 (47%)</u>                              | 3 (18%)                  | <u>14 (52%)</u>                             | 7 (21%)                  |
| NA  | 1 (8%)                                      | 0                        | 1 (7%)                                      | 0                        | 2 (7%)                                      | 0                        |
| <u>Subfamilia</u><br><br>$V\alpha^2$        | <u><math>\alpha</math>-B*2705</u><br>(N=13) | <u>Control</u><br>(N=18) | <u><math>\alpha</math>-B*2705</u><br>(N=15) | <u>Control</u><br>(N=18) | PBL <sup>3</sup>                            |                          |
| $V\alpha 14$                                | 1 (8%)                                      | 1 (6%)                   | <u>4 (27%)</u>                              | 1 (6%)                   | 7%  |                          |
| <u>Responde.</u>                            | <u>Asociación</u>                           |                          | <u>Frecuencia esperada<sup>4</sup></u>      |                          | <u>Frecuencia encontrada</u>                |                          |
| DL  | $V\alpha 14/V\beta$ h.s. 4                  |                          | 0,27 x 0,47 = 0,127                         |                          | 2 / 15 = 0,133                              |                          |
|   | $V\alpha 14/V\beta 7$                       |                          | 0,27 x 0,13 = <u>0,035</u>                  |                          | 2 / 15 = <u>0,133</u>                       |                          |

**Tabla 11.**

<sup>1</sup> Número (N) porcentaje de los segmentos V $\alpha$  y V $\beta$  en transcritos productivos de CTL anti-B\*2703 y en células T no-anti-B27 control en cada individuo. Los segmentos V en CTL con idéntico TCR y los segmentos V $\beta$  en CTL con 2 transcritos productivos se contaron como uno solo. Los segmentos V $\beta$  de CTL con la misma cadena  $\beta$  y diferentes cadenas  $\alpha$  se contaron como diferentes. Los valores de los CTL anti-B\*2703 que mostraban un diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) con los controles respectivos están subrayados y en negrilla. Los segmentos V $\beta$  están clasificados en subgrupos de homología. Para V $\alpha$ , las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,01$ ) con PBL no seleccionados (Moss *et al.*, 1993), están subrayados y en negrilla.

<sup>2</sup> V $\alpha$  que aparecen más de dos veces en el mismo respondedor.

<sup>3</sup> Datos procedentes de Moss *et al.*, 1993, obtenidos de 300 transcritos  $\alpha$  productivos procedentes de PBL de 3 individuos no relacionados.

<sup>4</sup> Frecuencia esperada entre los clonotipos anti-B\*2703 si la asociación fuera aleatoria. Es el producto de las frecuencias de los segmentos V $\alpha$  y V $\beta$  correspondientes. Las diferencias con las frecuencias encontradas están subrayadas y en negrilla.



V $\alpha$ 14 estaba asociada con segmentos V $\beta$  del subgrupo de homología 4 en CTL anti-B\*2703 con una frecuencia que correspondía a una asociación aleatoria. Sin embargo, dos de los CTL que expresaban V $\alpha$ 14 expresaban también V $\beta$ 7, que no aparecía en ningún otro CTL anti-B\*2703 analizado (Tabla 9). La frecuencia de esta asociación era mayor que la esperada (Tabla 11). Puesto que estos TCR no presentan homología en otras regiones, este resultado sugiere que han sido seleccionados en base a su combinación V $\alpha$ /V $\beta$ .

#### 4.2.4.- Restricciones en la asociación V $\beta$ -J $\beta$ y en la diversidad de la región N+N $\beta$ .

Además de los CTL 42.8GLM/71GCP y 74.8GCP que compartían la misma cadena  $\beta$  asociada a cadenas  $\alpha$  diferentes, algunos CTL anti-B\*2703 presentaban cadenas  $\beta$  que compartían la subfamilia V $\beta$  y el segmento J $\beta$  (Figura 12A). V $\beta$ 17.1 apareció asociada a J $\beta$ 2.2 en dos clonotipos (81GCP y 12DCJ) y a J $\beta$ 1.1 en tres clonotipos (42GCP, 23GLM y 70DCJ) de ambos respondedores. V $\beta$ 13.4 apareció asociada a J $\beta$ 1.2 en CTL 29GCP/54GCP y 56GLM, del mismo respondedor. Finalmente V $\beta$ 5 apareció asociada a J $\beta$ 1.1 en los clonotipos 62GCP/63GLM y 81DCJ, de ambos respondedores. Algunos clonotipos con la misma combinación V $\beta$ -J $\beta$  tenían también regiones N+D $\beta$  que compartían motivos estructurales comunes. Por ejemplo, las cadenas  $\beta$  de CTL 81DCJ y 12DCJ se diferenciaban tan solo en tres aminoácidos, localizados en esta región. También las regiones N+D $\beta$  de CTL 42GCP y 23GLM compartían el motivo RG. En otros casos las regiones N+D $\beta$  no presentaron similitud. En general, los TCR con cadenas  $\beta$  homólogas poseían cadenas  $\alpha$  no relacionadas. Estos resultados indican, como en la respuesta anti-B\*2705, una selección de TCR en base a la estructura global de la cadena  $\beta$ .

La mayoría de las secuencias de las cadenas  $\beta$  se podían clasificar en subgrupos, cada uno de los cuales incluía unos pocos clonotipos, en base a motivos compartidos en la región N+D $\beta$  (Figura 12A). Este patrón es similar al observado en la respuesta anti-B\*2705 y, como en ella, sugiere que los epítotos inmunodominantes asociados a péptidos en la respuesta anti-B\*2703 no son extremadamente diversos.

#### 4.2.5.- El sesgo en el uso de segmentos J $\alpha$ limita la diversidad de la región CDR3 $\alpha$ .

Entre los 28 transcritos  $\alpha$  productivos de CTL anti-B\*2703 no se observó ninguna restricción en la región N. Sin embargo, la diversidad en la región CDR3 estaba limitada por el

Figura 12

A

| CTL                | V $\beta$ | N+D $\beta$       | J $\beta$ | V $\beta$ | D $\beta$ | J $\beta$ |
|--------------------|-----------|-------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 42.8GLM/71GCP      | FCAS      | <u>GGGLG</u>      | SPL       | 8.2       | NA        | 1.6       |
| 74.8GCP            | FCAIS     | <u>SGGG</u>       | TDTQ      | 12.3      | 2.1       | 2.3       |
| 26GCP              | LCASS     | <u>IGGG</u>       | TGEL      | 17.1      | 2.1       | 2.2       |
| <b>81GCP</b>       | LCASS     | <u>IAGGS</u>      | NTGEL     | 17.1      | 2.1       | 2.2       |
| <b>12DCJ</b>       |           |                   |           |           |           |           |
| <b>70DCI</b>       | LCASS     | <u>IGVW</u>       | EA        | 17.1      | 2.1       | 1.1       |
| 37DCJ              | LCSV      | <u>KGVS</u> GM    | NTEA      | 4         | 1.1       | 1.1       |
| <b>42GCP</b>       | LCAS      | <u>TL</u> SVRGOM  | MNTEA     | 17.1      | 1.1       | 1.1       |
| <b>23GLM</b>       | LCAS      | <u>WDRG</u> YRP   | NTEA      | 17.1      | 1.1       | 1.1       |
| 11DCJ              | FCAS      | <u>KDRGT</u>      | EQ        | w22       | 1.1       | 2.1       |
| 5DCJ               | LCASS     | <u>PRAFS</u>      | SYEQ      | 7         | NA        | 2.7       |
| 43DCJ              | FCASS     | <u>QGLR</u> AREVI | YEQ       | 16.1      | 2.1       | 2.7       |
| 39GLM              | FCASS     | <u>DGTGG</u>      | YNEQ      | 14        | 1.1       | 2.1       |
| 7DCI               | LCASS     | <u>QVGTG</u>      | QETQ      | 7.2       | 1.1       | 2.5       |
| 18DLH              | FCASS     | <u>VGTS</u> G     | TDTQ      | 1         | NA        | 2.3       |
| <b>62GCP/63GLM</b> | LCASS     | <u>LVGAG</u>      | TEA       | 5.3       | 1.1       | 1.1       |
| <b>29GCP/54GCP</b> | FCAS      | <u>TIFG</u> GGG   | GY        | 13.4      | 1.1       | 1.2       |
| 5DLL               | LCASS     | <u>HWDTA</u>      | YEQ       | 6.4       | 1.1       | 2.7       |
| <b>56GLM</b>       | FCA       | <u>TETLG</u>      | YGY       | 13.4      | 1.1       | 1.2       |
| <b>81DCJ</b>       | LCASS     | <u>LEAGV</u> VP   | EA        | 5         | 2.1       | 1.1       |
| 36DLH              | FCAIS     | <u>EPTY</u>       | EQ        | 12.3      | 2.1       | 2.7       |
| 13DCJ/31DCJ        | FCASS     | <u>LDPFK</u>      | PQ        | 14        | NA        | 1.5       |
| 48GLM              | LCASS     | <u>LALG</u> EGI   | YNSPL     | 6.1       | 1.1       | 1.6       |
| 77GCP              | FCAS      | <u>PSKT</u> ARD   | YGY       | w22       | 1.1       | 1.2       |
| 15DLH              | FCASS     | <u>YSQ</u>        | TDTQ      | 13        | NA        | 2.3       |

B

| CTL           | V $\alpha$ | N+J $\alpha$          | V $\alpha$ | J $\alpha$ |
|---------------|------------|-----------------------|------------|------------|
| 77GCP         | FCAL       | <u>GGWNSGG</u> SNYKL  | 12.1       | HAVT33     |
| 23GLM         | YCAL       | <u>KGNSGG</u> SNYKL   | 9.1        | HAVT33     |
| 36DLH         | FCA        | <u>GGNAGGT</u> SYGKL  | w25        | HAVT06     |
| 81DCJ         | FCA        | <u>VGWAGGT</u> SYGKL  | 13.1       | HAVT06     |
| 15DLH         | FCG        | <u>THNTGG</u> FKT     | w29        | IGRJa04    |
| 18DLH         | FCA        | <u>VNTGG</u> FKT      | 16.1       | IGRJa04    |
| 62GCP/63GLM   | FCA        | <u>GQTGAN</u> NL      | w25        | 62.119     |
| 28DLH         | FCA        | <u>LAGAN</u> NL       | 3.1        | 62.119     |
| 42GCP         | FCAI       | <u>ANYQL</u>          | 84         | IGRJa14    |
| 43DCJ         | LCA        | <u>VTPDS</u> NYQL     | 7.2        | IGRJa14    |
| <b>48GLM</b>  | FCA        | <u>PGGGF</u> GNVL     | 8.2        | IGRJa02    |
| <b>12DCJ</b>  | FCA        | <u>ENSGV</u> SGNVL    | 8.2        | IGRJa02    |
| 56GLM         | FCA        | <u>ASWAGT</u> ASKL    | 8.1        | AA17       |
| 37DCJ         | FCVV       | <u>SEGS</u> KL        | 1.8        | AA17       |
| 23GLM         | FCAF       | <u>MTAP</u> NQF       | 14         | HAVP01     |
| 81GCP         | FCA        | <u>GQLGN</u> QF       | w25        | HAVP01     |
| 42.8GLM/71GCP | LCA        | <u>VREG</u>           | 2.2        | IGRJa10    |
| 5DCJ          | FCA        | <u>FMKL</u> NDM       | 14         | IGRJa10    |
| 29GCP/54GCP   | LCA        | <u>VLDS</u> NTGKL     | 7.2        | HAVP29     |
| 39GLM         | FCG        | <u>TVNSGG</u> YQKV    | w29        | AG212      |
| 26GCP         | FCAMR      | <u>EPSN</u> DYKL      | 84         | HAVP10     |
| 74.8GCP       | YCAV       | <u>EDRVKA</u> AGNKL   | 11.2       | AC25       |
| 13DCJ/31DCJ   | FCA        | <u>YKAQGG</u> SEKL    | 14.1       | AC9        |
| 7DCI          | FCA        | <u>YSGT</u> YKY       | 14.1       | 122GRK     |
| 70DCI         | FCAF       | <u>RGF</u> NEKL       | 14         | AA13       |
| 5DLL          | YCL        | <u>VGEL</u> PDYNAGNML | 20.1       | AC17       |
| 3.8DLH        | FCA        | <u>ETDT</u> GRRAL     | 15.1       | AB19       |
| 11DCJ         | FCA        | <u>TRGG</u> YQKV      | 3.1        | HAVP41     |

**Figura 12.** Secuencia de aminoácidos deducida de las regiones de unión de la cadena  $\beta$  (A) y de la cadena  $\alpha$  (B) de transcritos productivos de CTL anti-B\*2703. Se muestran el extremo C-terminal de los segmentos V, las regiones N/N+D $\beta$ , y el extremo N-terminal de los segmentos J. Se indican en cada transcrito los segmentos V, D, y J y el CTL al que corresponden. Las secuencias están agrupadas de acuerdo con la similitud de sus regiones N+D $\beta$  (A) o por tener segmentos J $\alpha$  iguales (B). Los motivos recurrentes N+D $\beta$  y los segmentos J $\alpha$  iguales aparecen en **negrilla y subrayados**. Los CTL que usan la misma subfamilia V y el mismo segmento J están **recuadrados y en negrilla**. No se determinó la secuencia de la región N+D $\beta$  en los CTL 3.8DLH y 28DLH.

uso recurrente de segmentos  $J\alpha$  de forma muy similar a la respuesta anti-B\*2705: de los 19 segmentos  $J\alpha$  usados, 9 aparecían en más de un clonotipo (Figura 12B). Estos 9 segmentos  $J\alpha$  representaban el 64% de los transcritos  $\alpha$  analizados en esta respuesta, mientras que en PBL no seleccionados, representan tan solo el 19% de los transcritos productivos (Tabla 12). Esta diferencia es estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$ ). Los segmentos  $J\alpha$  recurrentes aparecieron asociados a distintos segmentos  $V\alpha$  excepto en el caso de CTL 48GLM y 12DCJ (Figura 12B). Al igual que con las restricciones en la región  $N+D\beta$ , el patrón de uso de segmentos  $J\alpha$  sugiere que la mayoría de la respuesta anti-B\*2703 está dirigida contra un grupo no extremadamente diverso de determinantes inmunodominantes asociados a péptido. Habitualmente, los CTL que comparten segmentos  $J\alpha$  no presentan motivos  $N+D\beta$  comunes, lo que indica que los motivos recurrentes que aparecen en las regiones CDR3  $\alpha$  y  $\beta$  son seleccionadas independientemente de la otra cadena.

#### 4.3.- Similitudes y diferencias en el repertorio de TCR entre las respuestas anti-B\*2705 y anti-B\*2703.

En ambas respuestas el hecho más relevante fue el uso predominante de segmentos  $V\beta$  del subgrupo de homología 4: el 58% (Tabla 5) y el 52% (Tabla 11) de las cadenas  $\beta$  del TCR de los clones anti-B\*2705 y anti-B\*2703 respectivamente. Si bien las diferencias no son estadísticamente significativas, las subfamilias que pertenecen a este subgrupo parecen usarse con diferente frecuencia en función de la respuesta. Así los clones anti-B\*2705 usaron más  $V\beta 3$  y  $V\beta 14$  (10/15) (Tabla 4), consideradas por algunos autores como una sola subfamilia (Toyonaga *et al.*, 1987), mientras los clones anti-B\*2703 usaron más  $V\beta 12$ ,  $V\beta 13$ , consideradas también como una sola subfamilia (Toyonaga *et al.*, 1987) y  $V\beta 17$  (11/14) (Tabla 9).

La diversidad en el uso de segmentos  $V\alpha$  fue similar en ambas respuestas, sin embargo las  $V\alpha$  que se usaron de manera recurrente en cada respondedor fueron diferentes dependiendo de la respuesta.  $V\alpha 14$ , que aparecía incrementada en los CTL anti-B\*2705 del respondedor GM (Tabla 6), no se vio incrementada en la respuesta anti-B\*2703 de este respondedor, pero sí en CTL anti-B\*2703 del respondedor DL (Tabla 11).

Los TCR anti-B\*2703 comparten con los anti-B\*2705 motivos estructurales en las regiones CDR3  $\alpha$  y  $\beta$ . Algunos de los motivos  $N+D\beta$  definidos aparecieron en ambas respuestas: DR, GTG, RA, mientras que RLA, LT, PS y RGG aparecieron sólo en CTL anti-

**Tabla 12. Segmentos J $\alpha$  recurrentes en los transcritos productivos de los CTL anti-B\*2703<sup>1</sup>**

| Segmentos J $\alpha$ | Respondedor |         | Total    | % en PBL <sup>2</sup> |
|----------------------|-------------|---------|----------|-----------------------|
|                      | GM          | DL      |          |                       |
|                      | N (%)       | N (%)   | N (%)    |                       |
| AA17                 | 1 (8%)      | 1 (7%)  | 2 (7%)   | 2%                    |
| IGRJa10              | 1 (8%)      | 1 (7%)  | 2 (7%)   | 2%                    |
| IGRJa14              | 1 (8%)      | 1 (7%)  | 2 (7%)   | 2,3%                  |
| 62.119               | 1 (8%)      | 1 (7%)  | 2 (7%)   | 0,7%                  |
| IGRJa02              | 1 (8%)      | 1 (7%)  | 2 (7%)   | 0                     |
| HAVT33               | 2 (15%)     | 0       | 2 (7%)   | 1,3%                  |
| HAVP01               | 2 (15%)     | 0       | 2 (7%)   | 3%                    |
| IGRJa04              | 0           | 2 (13%) | 2 (7%)   | 3,7%                  |
| HAVT06               | 0           | 2 (13%) | 2 (7%)   | 4%                    |
| Total                | 9 (69%)     | 9 (60%) | 18 (64%) | 19%                   |

<sup>1</sup> Segmentos J $\alpha$  que aparecen más de una vez en los CTL analizados. Los valores porcentuales corresponden a 13, 15 y 28 transcritos productivos diferentes de los donantes GM, SR, o ambos, respectivamente. La frecuencia total de estos segmentos J $\alpha$  en cada respondedor o en ambos juntos está incrementada significativamente ( $p < 0,0001$ ) si se compara con PBL no seleccionados (Moss *et al.*, 1993).

<sup>2</sup> Datos de Moss *et al.*, 1993.

B\*2705, e IGGG, GV y D/E sólo en CTL anti-B\*2703 (Figura 7 y Figura 12). En la respuesta anti-B\*2705 siete segmentos J $\alpha$  daban cuenta del 61% de los 28 transcritos  $\alpha$  productivos (Tabla 8) mientras en la respuesta anti-B\*2703 nueve segmentos J $\alpha$  daban cuenta del 64% de los transcritos  $\alpha$  analizados (Tabla 12). De los 19 segmentos J $\alpha$  usados por los CTL anti-B\*2703, 12 (63%) se encontraron también en CTL anti-B\*2705.

#### 4.4.- Motivos recurrentes en las regiones CDR1 y CDR2 $\beta$ en las respuestas alógenicas anti-HLA-B27.

El uso preferente de segmentos V $\beta$  del subgrupo de homología 4 es el aspecto más sobresaliente en las respuestas anti-B\*2705 y anti-B\*2703. Este sesgo es en ambos casos independiente del respondedor y del patrón de reacción clonal. Por tanto, no parece determinado por péptidos sino por la propia molécula de HLA-B27. Los segmentos V de un subgrupo de homología presentan más de un 50% de aa idénticos en sus secuencias. Este porcentaje se ve disminuido en las regiones CDR1 y CDR2 e incrementado en las regiones más conservadas del segmento V. No hay posiciones totalmente conservadas entre los CDR1 de distintos subgrupos. Sin embargo, entre las subfamilias de un mismo subgrupo, hay algunos residuos bastante conservados, especialmente en el subgrupo 1. Entre subgrupos, e incluso dentro de un mismo subgrupo, las secuencias de la región CDR2 presentan menor homología a nivel de residuos y de longitud (Chothia *et al.*, 1988). La selección de segmentos V $\beta$  en las respuestas específicas de péptido está dirigida, en algunos casos, por la presencia de determinados residuos en el extremo C-terminal del segmento, que forman parte de la región CDR3 (Jorgensen *et al.*, 1992). Este no es el caso en los segmentos predominantes en las respuestas aloespecíficas anti-B27. Por tanto, el sesgo de segmentos V $\beta$  del subgrupo de homología 4 en los CTL anti-B\*2705 y anti-B\*2703 podría deberse a la presencia de motivos estructurales comunes en las regiones CDR1 y CDR2 ya que estas regiones se supone que interaccionan con la molécula de HLA (Davis y Bjorkman, 1988; Chothia *et al.*, 1988; Claverie *et al.*, 1989; Hong *et al.*, 1992). Para tratar de identificar tales motivos se efectuó una comparación de las secuencias de las regiones CDR1 y CDR2 de 65 cadenas V $\beta$  procedentes de 38 clones anti-B\*2705 y de 27 clones anti-B\*2703 (Bragado *et al.*, 1990; Lauzurica *et al.*, 1992; y esta tesis). Dicha comparación reveló que en algunas posiciones aparecían uno o dos residuos estructuralmente relacionados, en más del

75% de los segmentos V $\beta$  del subgrupo de homología 4 usados por TCR anti-HLA-B27 (Figura 13). Estos motivos se encuentran en diferentes frecuencias, dependiendo de cada posición, entre los segmentos V $\beta$  de otros subgrupos de homología usados por TCR anti-HLA-B27 (Figura 13). Para valorar la significación de esta conservación, se comparó la frecuencia con que estos motivos aparecían en los CDR1 y CDR2 de los clonotipos anti-B27 frente a la frecuencia con que lo hacían en PBL no seleccionados CD8<sup>+</sup> (Tabla 13) (Akolkar *et al.*, 1993). Aquellos residuos de cualquier posición cuya frecuencia entre los clonotipos anti-B27 era al menos el doble que en PBL se consideraron como los determinantes mínimos de la selección de segmentos V $\beta$  en esta respuesta. Estos residuos eran los siguientes: Asp/Asn28 en CDR1 y Tyr47, Ala/Val52 y Asp/Glu59 en la CDR2. Los segmentos V $\beta$ 3, V $\beta$ 14, V $\beta$ 17 y V $\beta$ 13IGRb16 presentaban estos cuatro motivos y eran, además, los más usados dentro del subgrupo de homología (26/36). Los segmentos V $\beta$ 13.1/2, V $\beta$ 13IGRb14, V $\beta$ 12.3 y V $\beta$ 15 presentaban tres de estos motivos y el V $\beta$ 13.4 presentaba tan solo dos, y eran los menos usados dentro del subgrupo de homología (10/36). Esto indica que el uso de V $\beta$  en CTL anti-B\*2705 o anti-B\*2703 se correlaciona con los motivos en CDR1 + CDR2 y sugiere que la selección de dichos segmentos V $\beta$  se debe, principalmente, a la presencia de estos motivos.

La mayoría de los motivos descritos no aparecían en los segmentos V $\beta$  de otros subgrupos o aparecían en baja proporción (Asn28 lo hace en dos ocasiones) en los clones anti-HLA-B27. Ello sugiere que estos segmentos no han sido seleccionados por presentar los motivos relevantes de los CDR1 y CDR2 del subgrupo 4. Una posible explicación para la presencia de segmentos V $\beta$  de otros subgrupos diferentes al 4 en los CTL anti-B27 sería que los TCR correspondientes son seleccionados en base a otros elementos estructurales y no a los segmentos V $\beta$ , como en el caso mencionado (apdo. 4.1.5) relativo a la selección de V $\alpha$ 7 en la respuesta anti-B\*2705.

Figura 13.

←-CDR1--→

←-----CDR2-----→

D M N H E  
N L D D

Y Y S  
F

V  
A

K

G D I  
E V

| s.h. | V <sub>B</sub> | 26 | 30 | 31A | 47 | 57 | 58 | 62 | N | T |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |    |
|------|----------------|----|----|-----|----|----|----|----|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|
| 4    | 14             | N  | M  | N   | H  | E  | Y  | -  | Y | Y | S | M | N | V | E | V | T | D | K | - | - | G | D | V | P | E | 9 |    |
| 4    | 17.1           | N  | L  | N   | H  | D  | A  | -  | Y | Y | S | Q | I | V | N | D | F | Q | K | - | - | G | D | I | A | E | 8 |    |
| 4    | 3              | D  | M  | D   | H  | E  | N  | -  | Y | F | S | Y | D | V | K | M | K | E | K | - | - | G | D | I | P | E | 7 |    |
| 4    | 13.4           | D  | M  | N   | H  | E  | Y  | -  | H | Y | S | V | G | E | G | T | T | A | K | - | - | G | E | V | P | D | 3 |    |
| 4    | 13IGRb14       | D  | M  | N   | H  | N  | S  | -  | Y | Y | S | A | S | E | G | T | T | D | K | - | - | G | E | V | P | N | 2 |    |
| 4    | 13IGRb16       | D  | M  | N   | H  | N  | Y  | -  | Y | Y | S | V | G | A | G | I | T | D | K | - | - | G | E | V | P | N | 2 |    |
| 4    | 13.1/2         | D  | M  | N   | H  | E  | Y  | -  | H | Y | S | V | G | A | G | I | T | D | Q | - | - | G | E | V | P | N | 2 |    |
| 4    | 12.3           | T  | E  | N   | H  | R  | Y  | -  | H | Y | S | Y | G | V | K | D | T | D | K | - | - | G | E | V | S | D | 2 |    |
| 4    | 15.1           | T  | K  | G   | H  | D  | R  | -  | Y | Y | S | F | D | V | K | D | I | N | K | - | - | G | E | I | S | D | 1 | 36 |
| 1    | 1              | R  | S  | G   | D  | L  | S  | -  | I | Q | Y | Y | N | G | E | E | R | A | K | - | - | G | N | I | L | E | 2 |    |
| 1    | 5.1/2          | I  | S  | G   | H  | R  | S  | -  | F | E | Y | F | S | E | T | Q | R | N | K | - | - | G | N | F | P | G | 2 |    |
| 1    | 6.4            | I  | S  | E   | H  | N  | R  | -  | T | Y | F | Q | N | E | A | Q | L | E | K | S | - | R | L | L | S | D | 2 |    |
| 1    | 8.2            | I  | S  | G   | H  | D  | Y  | -  | I | Y | F | N | N | N | V | P | I | D | D | S | - | G | M | P | E | D | 2 |    |
| 1    | 5.3            | K  | S  | G   | H  | D  | T  | -  | F | Q | Y | Y | E | E | E | E | R | Q | R | - | - | G | N | F | P | D | 1 |    |
| 1    | 5.4            | I  | S  | G   | H  | K  | S  | -  | F | Q | Y | Y | E | K | E | E | R | G | R | - | - | G | N | F | P | D | 1 |    |
| 1    | 6.1            | I  | S  | G   | H  | V  | S  | -  | T | Y | F | Q | N | E | A | Q | L | D | K | S | - | G | L | P | S | D | 1 |    |
| 1    | 6GLPA          | I  | S  | G   | H  | T  | A  | -  | I | Y | F | Q | G | N | S | A | P | D | K | S | - | G | L | P | S | D | 1 |    |
| 1    | 8.1            | I  | S  | G   | H  | N  | S  | -  | I | Y | F | N | N | N | V | P | I | D | D | S | - | G | M | P | E | D | 1 |    |
| 1    | 16.1           | I  | S  | G   | H  | D  | N  | -  | L | H | F | V | K | E | S | K | Q | D | E | S | - | G | M | P | N | M | 1 |    |
| 1    | 18.1           | M  | K  | G   | H  | S  | H  | -  | V | Y | L | Q | K | E | N | I | I | D | E | S | - | G | M | P | K | E | 1 | 15 |
| 2    | 7HT267.2       | H  | L  | G   | H  | N  | A  | -  | F | V | Y | N | F | K | E | Q | T | E | N | - | - | N | S | V | P | S | 2 |    |
| 2    | 7.1            | H  | M  | G   | H  | R  | A  | -  | F | V | Y | S | Y | E | K | L | S | I | N | - | - | E | S | V | P | S | 1 |    |
| 2    | 7.2            | H  | L  | G   | H  | N  | A  | -  | F | V | Y | S | L | E | E | R | V | E | N | - | - | N | S | V | P | S | 1 |    |
| 2    | 7IGRb18        | H  | L  | G   | H  | N  | A  | -  | F | V | Y | S | L | E | E | R | V | E | N | - | - | N | S | V | P | S | 1 | 5  |
| 3    | 4              | V  | D  | S   | Q  | V  | T  | M  | A | T | A | N | Q | G | S | E | A | T | Y | E | S | G | F | V | I | D | 6 |    |
| 3    | 2              | L  | D  | F   | Q  | A  | T  | T  | A | T | S | N | E | G | S | K | A | T | Y | E | Q | G | V | E | K | D | 1 | 7  |
| A    | w22            | I  | S  | N   | H  | L  | Y  | -  | V | S | F | Y | N | N | E | I | S | E | K | S | - | E | I | F | D | D | 2 | 2  |



**Figura 13.** Comparación de la secuencia de aa de las regiones CDR1 y CDR2 de los segmentos V $\beta$  usados por CTL anti-B\*2705 y anti-B\*2703. La delimitación de las regiones CDR se hizo de acuerdo con Chothia *et al.*, 1988. Los segmentos V $\beta$  están agrupados en subgrupos de homología (s.h.). En la figura se indica el número (N) de clonotipos en los que apareció un determinado segmento V $\beta$ , así como el número total (T) de segmentos de cada subgrupo. En las posiciones en que uno o dos residuos estructuralmente similares estaban conservados en más de 27 CTL (75%), éstos se indican en la parte superior y están recuadrados en las secuencias. En negrilla se indican los motivos que aparecen en clonotipos anti-B27 con una frecuencia más de dos veces mayor que en PBL CD8<sup>+</sup> (ver tabla 12).

Tabla 13. Motivos recurrentes en las regiones CDR1 y CDR2  $\beta$  en CTL anti-HLA-B27

|      | Posición nº | Residuo <sup>1</sup> | s.h.4<br>(N=36) <sup>2</sup> | Todos<br>(N=65) <sup>2</sup> | % en PBL <sup>3</sup><br>CD8 <sup>+</sup> | Media <sup>4</sup> |
|------|-------------|----------------------|------------------------------|------------------------------|---|--------------------|
| CDR1 | 26          | D + N                | 33 (92%)                     | 33 (51%)                     | 31  | 1.6                |
|      | 27          | M + L                | 33 (92%)                     | 38 (59%)                     | 34  | 1.8                |
|      | 28          | D + N                | 35 (97%)                     | 37 (57%)                     | 23  | <b>2.5</b>         |
|      | 29          | H                    | 36 (100%)                    | 56 (86%)                     | 76  | 1.1                |
|      | 30          | D + E                | 30 (83%)                     | 34 (52%)                     | 39  | 1.3                |
| CDR2 | 47          | Y                    | 29 (81%)                     | 29 (45%)                     | 20  | <b>2.3</b>         |
|      | 48          | Y + F                | 36 (100%)                    | 44 (68%)                     | 52  | 1.3                |
|      | 49          | S                    | 36 (100%)                    | 37 (57%)                     | 42  | 1.4                |
|      | 52          | V + A                | 31 (86%)                     | 31 (48%)                     | 22  | <b>2.2</b>         |
|      | 57          | K                    | 34 (94%)                     | 44 (68%)                     | 53  | 1.3                |
|      | 58          | G                    | 36 (100%)                    | 56 (86%)                     | 75  | 1.2                |
|      | 59          | D + E                | 36 (100%)                    | 36 (55%)                     | 28  | <b>2</b>           |
|      | 60          | V + I                | 36 (100%)                    | 49 (75%)                     | 54  | 1.4                |

<sup>1</sup> Residuos estructuralmente relacionados que aparecen en más de 27 (75%) segmentos V $\beta$  del subgrupo de homología 4 (Figura 1).

<sup>2</sup> Número y porcentaje de segmentos V $\beta$  que presentan un motivo particular en el subgrupo de homología 4 o en el total de segmentos V $\beta$  de los clonotipos anti-B27.

<sup>3</sup> Suma del porcentaje de uso de las subfamilias V $\beta$  que expresan el motivo correspondiente en una posición determinada en PBL CD8<sup>+</sup>. Basado en Akolkar *et al.*, 1993.

<sup>4</sup> % in todos los anti-B27 / % en PBL CD8<sup>+</sup>. Los motivos para los que está relación es mayor o igual a 2 aparecen en negrilla.

## 5.- DISCUSIÓN

---

**5.1.- La variabilidad del TCR en las respuestas alorreactivas contra HLA-B\*2705 está limitada por restricciones a múltiples niveles en ambas cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ .**

**5.1.1.- Distinta contribución de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  del TCR al alorreconocimiento.**

El análisis del repertorio de TCR implicado en la respuesta anti-B\*2705 se abordó para definir las siguientes cuestiones: 1) las reglas que gobiernan la selección de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , 2) la contribución de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  a la aloespecificidad, y 3) la influencia del respondedor en el uso de TCR en estas respuestas.

La selección del TCR opera a tres niveles y en diferentes elementos estructurales: las cadenas  $\alpha$  o  $\beta$  completas, solo en los segmentos V $\alpha$  o V $\beta$ , y restringiendo la diversidad de la región CDR3 de las cadenas  $\alpha$  o  $\beta$ . Sin embargo hay algunas diferencias importantes entre las cadena  $\alpha$  y  $\beta$ . Dos resultados de esta tesis indican que, aunque la cadena  $\alpha$  o elementos estructurales de la misma, pueden ser esenciales en el reconocimiento de algunos epítomos alorreactivos, en general la cadena  $\beta$  juega un papel preponderante en esta respuesta y está sometida a restricciones de uso más estrictas. Estos resultados son los siguientes: 1) la relativa frecuencia con que cadenas  $\beta$  idénticas o altamente similares se asocian a cadenas  $\alpha$  dispares, y 2) la mucho mayor selección de segmentos V $\beta$ , en relación al sesgo de V $\beta$ .

La asociación de la misma cadena  $\beta$  con cadenas  $\alpha$  distintas es posible porque los genes  $\beta$  reordenan y se expresan antes que los genes  $\alpha$  (Groettrup y von Boehmer, 1993). Este tipo de asociación se ha descrito en respuestas restringidas específicas de péptido (Taylor *et al.*, 1990; Kelly *et al.*, 1993), pero esta es, en nuestro conocimiento, la primera vez que se observa en una respuesta alorreactiva. El hecho de que ocurra en clonotipos con especificidad fina muy similar indica que la cadena  $\beta$  es la que determina predominantemente en estos clones la especificidad del TCR, por lo menos frente a HLA-B27. El hecho de que afecte a 4 de los 15 clonotipos analizados en SR, y que uno de los clonotipos sea idéntico en 6 clones de CTL, sugiere que los determinantes en cuyo reconocimiento esta cadena  $\beta$  está implicada, son fuertemente

aloestimulatorios para el donante SR *in vitro*. De forma análoga, el hallazgo recurrente, incluso entre individuos diferentes, de cadenas  $\beta$  con segmentos V $\beta$  y J $\beta$  iguales, y regiones N+D $\beta$  que difieren tan solo en 1 ó 2 residuos asociadas a cadenas  $\alpha$  diferentes, de nuevo sugiere una selección de los correspondientes TCR en base principalmente a la cadena  $\beta$ . Datos recientes sobre la secuencia madurativa de las poblaciones pre-T en humanos permiten distinguir dos poblaciones: la pre-T I, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> y la pre-T II, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. La expresión del pre-receptor T  $\alpha$  (preT $\alpha$ ) en poblaciones CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> resulta en la expresión de CD8, dando lugar a la población CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>. En esta población pre-T II, donde la expresión de los genes  $\alpha$  no ha empezado, el preT $\alpha$ /TCR $\beta$  se expresa en la superficie celular junto con CD4 y CD8 (M.L. Toribio, comunicación personal). Si en este estadio el preT $\alpha$ /TCR $\beta$  interaccionara con las moléculas de clase I o clase II y ello influyera en la selección del repertorio T, ésto explicaría la mayor restricción de la cadena  $\beta$  que de la cadena  $\alpha$  del TCR en el reconocimiento alógeno de HLA-B27.

El uso predominante de segmentos V $\beta$  del subgrupo de homología 4, de forma independiente del respondedor y de epítomos particulares, es la característica más conservada del repertorio de TCR reclutado en las respuestas anti-HLA-B27 e implica probablemente un papel predominante de estos segmentos en el reconocimiento de dicho antígeno. Esta característica se reveló ya en estudios iniciales anteriores a esta tesis desarrollados en nuestro laboratorio (Bragado *et al.*, 1990; Lauzurica *et al.*, 1992) pero su carácter general no pudo ser establecido debido al número bajo de CTL de respondedores individuales analizado entonces.

Como se mencionó en los resultados, aunque algunos segmentos V $\beta$  de este subgrupo se encuentran en cadenas  $\beta$  idénticas o muy similares de clonotipos distintos, el sesgo de V $\beta$  es independiente de otros elementos de la cadena  $\beta$ . Un uso restringido de segmentos V $\beta$  asociado a una gran diversidad de la región CDR3 de la cadena  $\beta$ , y de la cadena  $\alpha$  se ha descrito en respuestas restringidas específicas de péptido (Casanova *et al.*, 1991; Boitel *et al.*, 1992) lo que sugiere que para algunos epítomos péptidicos el segmento V $\beta$  es crítico. Sin embargo, una diferencia importante entre estos datos y los presentados en esta tesis es que en los CTL anti-B\*2705 la selección de la cadena  $\beta$  no está asociada a un patrón de especificidad fina determinado y, por tanto es muy improbable que esté determinada por motivos antigénicos asociados a péptidos. Nuestros resultados sugieren que el sesgo de segmentos V $\beta$  está

determinado por la propia molécula aloantigénica, de acuerdo con los modelos que predicen una mayor interacción de los segmentos V con las hélices  $\alpha$  de la proteína de MHC (Chothia *et al.*, 1988; Davis y Bjorkman, 1988; Claverie *et al.*, 1989; Hong *et al.*, 1992) y se correlaciona con motivos estructurales de los CDR1 y CDR2. Un sesgo de segmentos V $\beta$  asociado a una gran diversidad en la región CDR3 ya se había descrito en otras respuestas alorreactivas, pero los segmentos V $\beta$  implicados son diferentes (Bill *et al.*, 1989; Geiger *et al.*, 1991; Hurley *et al.*, 1993; Goronzy *et al.*, 1993). Las características de la restricción del repertorio a nivel de segmentos V $\beta$  sugiere la posibilidad de manipular las respuestas alorreactivas anti-HLA-B27 mediante depleción de los linfocitos T que expresan dichos segmentos. El efecto y posible valor terapéutico de dicha manipulación podrían ser explorados experimentalmente.

A diferencia de las cadenas  $\beta$ , el hallazgo de TCR con cadenas  $\alpha$  similares asociadas a  $\beta$  dispares fue menos frecuente, puesto que solo se encontraron dos pares de clonotipos, ambos del mismo donante, con estas características (CTL 33S69 y 11SRY/40SRY, y CTL 58GRK y 122GRK). Además, el sesgo de segmentos V $\alpha$  se reveló mucho menos estricto que el de V $\beta$ , asociado a individuos y a especificidades finas. Ello sugiere que los elementos V $\alpha$  predominantes podrían haber sido seleccionados por determinados epítomos. La selección de segmentos estructurales de la cadena  $\alpha$  por algunos determinantes aloespecíficos es probablemente la causa de que el sesgo de V $\beta$  no sea aún mayor. Esto es sugerible porque: 1) tres de los cuatro TCR que comparten similitudes en las cadenas  $\alpha$  (CTL 33S69 y 11SRY/40SRY, y CTL 58GRK y 122GRK) usan segmentos V $\beta$  de subgrupos distintos del 4, y 2) por la asociación negativa de V $\alpha$ 7 con dicho subgrupo (ver apdo. 4.1.5).

En conclusión, nuestros resultados sugieren que los mecanismos que intervienen en la selección de segmentos V $\alpha$  y V $\beta$  son diferentes y que la contribución de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  a la aloespecificidad no es equivalente, siendo la última mayor.

### **5.1.2.- La selección a nivel de las regiones CDR3 refleja un número limitado de epítomos inmunodominantes asociados a péptido.**

Un tercer nivel de selección se produce a nivel de las regiones CDR3. El patrón de restricción es similar en ambas cadenas pero afecta a elementos estructurales diferentes: la cadena  $\beta$  está restringida a nivel de la región N+D $\beta$ , pero no en J $\beta$ ; la cadena  $\alpha$  está restringida

a nivel de  $J\alpha$  pero no en la región N. Esta asimetría podría explicarse porque el número de segmentos  $J\alpha$  en línea germinal es muy superior al de  $J\beta$  y su contribución a la diversidad de CDR3  $\alpha$  es por ello mayor. En ambas cadenas hay múltiples motivos N+D $\beta$  o segmentos  $J\alpha$  recurrentes, cada uno de ellos compartidos por un pequeño número de clones de forma independiente del donante, y normalmente no se encuentran asociadas a segmentos V $\beta$  o V $\alpha$  similares. Si asumimos que las regiones CDR3 intervienen principalmente en el reconocimiento de los péptidos unidos al MHC (Chothia *et al.*, 1988; Davis y Bjorkman, 1988; Claverie *et al.*, 1989; Jorgensen *et al.*, 1992) este patrón sería consistente con la intervención de múltiples motivos peptídicos en el reclutamiento de CTL anti-B\*2705. Sin embargo, el hecho de que muchos de los motivos N+D $\beta$  o segmentos  $J\alpha$  se encuentren en más de un clonotipo indica una marcada restricción de la diversidad en las regiones CDR3 y sugiere que los epítotos asociados a péptidos inmunodominantes no son extremadamente diversos en las respuestas anti-HLA-B27. Esta conclusión es algo inesperada en vista de la gran diversidad del repertorio de péptidos unidos a B\*2705 (Jardetzky *et al.*, 1991). Es posible que solo una fracción de estos, por ejemplo aquellos péptidos que se unen con alta afinidad, sea realmente inmunogénica, debido a la fuerte correlación entre la afinidad por MHC y la inmunogenicidad (Sette *et al.*, 1994). Además es probable que un número indeterminado de epítotos alorreactivos, implique motivos comunes a múltiples péptidos (Rötzschke *et al.*, 1991).

Aunque no hemos analizado la distribución de los segmentos  $J\alpha$  en PBL de los donantes GM y SR, en un estudio previo se encontró una baja frecuencia de segmentos  $J\alpha$  individuales en poblaciones de células T no seleccionadas y no se observaron variaciones estadísticamente significativas entre individuos (Moss *et al.*, 1993). El uso restringido de segmentos  $J\alpha$  no se debe a una exigencia estructural en la unión V-J independiente de antígeno, como ocurre en otros casos (Roth *et al.*, 1988), ya que en nuestro caso no está asociado al uso recurrente de otros segmentos V. Clones que presentan segmentos  $J\alpha$  relacionados tienen diferentes regiones N+D $\beta$ , y viceversa. No se han encontrado CTL que presentaran motivos compartidos en el CDR3 de ambas cadenas. Esto indica que la selección de los motivos del CDR3 se produce de manera independiente en ambas cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , dependiendo de cada receptor determinado, y sugiere una interacción preferencial de epítotos particulares de células T con los motivos CDR3 de la cadena  $\alpha$  o la  $\beta$  según los casos.

### 5.1.3.- Base molecular de la reacción cruzada entre HLA-B27 y HLA-DR2.

La reacción cruzada entre HLA-B27 y HLA-DR2 no parece determinada por las hélices- $\alpha$  de estas moléculas, ya que en esta región ambas moléculas son muy distintas, lo que no excluye que se produzcan interacciones entre el TCR de los clones que presentan esta reacción cruzada y las hélices- $\alpha$ . Puesto que el motivo compartido por estas moléculas es una combinación de residuos inaccesibles al contacto directo con el TCR es probable que la reacción cruzada implique el reconocimiento de un mismo péptido o de péptidos con motivos similares unidos a HLA-B27 y HLA-DR2Dw2. La presentación de un mismo péptido viral por antígenos de clase I y clase II ha sido descrita anteriormente (Perkins *et al.*, 1989; Perkins *et al.*, 1991). Este modelo de reconocimiento peptídico es también sugerido por los motivos comunes encontrados en las regiones N+D $\beta$ /J $\beta$  del TCR de clones anti-B27 y anti-DR2 (Figura 9) ya que esta región del TCR está implicada en el reconocimiento de péptido.

### 5.2.- El análisis del repertorio de TCR en las respuestas alorreactivas contra HLA-B\*2703 revela que este subtipo conserva la estructura antigénica de B\*2705.

#### 5.2.1.- Los epítotos privados son poco frecuentes en B\*2703: implicaciones para la unión de péptidos a este subtipo.

Una característica de la respuesta alorreactiva anti-B\*2703 es la baja frecuencia de clones que no reconocen en reacción cruzada a otros subtipos de HLA-B27. En nuestros estudios previos (López *et al.*, 1994) la mayoría de los CTL anti-B\*2703 presentan reacción cruzada con B\*2705, y más raramente, con otros subtipos. Solamente 6 de los 36 CTL anti-B\*2703 lisaban exclusivamente las dianas de LCL que expresaban B\*2703. El análisis de los correspondientes TCR, reveló la existencia de solo cuatro clonotipos diferentes, dos de los cuales compartían además una misma cadena  $\beta$  y poseían la misma especificidad fina con mutantes. Esto implica una restricción de epítotos privados de B\*2703 aun mayor de la deducida de los análisis de panel. Además, la mayoría de estos clonotipos conservaban la capacidad, aunque disminuida, de reconocer B\*2705 expresado a muy altos niveles en células transfectadas. Tan solo un clonotipo (39GLM) mostró una ausencia total de reconocimiento de B\*2705. Estos resultados indican una ausencia casi total de epítotos privados en B\*2703.

La escasez de epítotos privados en B\*2703 tiene implicaciones importantes para interpretar el efecto del cambio (Tyr-His59) en este subtipo sobre la unión de péptidos. Dicho

cambio altera la unión del extremo amino-terminal de los péptidos a la molécula de HLA-B27. Como consecuencia de ello, los péptidos que se unen a B\*2705 con baja afinidad pueden no unirse a B\*2703 o hacerlo con muy baja eficiencia (Villadangos *et al.*, 1995). Esto explicaría, en parte, la pérdida de epítomos aloantigénicos en B\*2703 en relación a B\*2705 (López *et al.*, 1994; Villadangos *et al.*, 1995). En principio, otros péptidos que aun conservan la capacidad de unirse a B\*2703 podrían ver alterado su posicionamiento en el sitio de unión de péptido como consecuencia de los requerimientos estereoquímicos de las interacciones en la subcavidad A de B\*2703. Esto implicaría posiblemente una alteración conformacional de los epítomos correspondientes en B\*2703 y por tanto la generación de nuevos determinantes antigénicos. Puesto que este no es el caso, sino muy raramente, debemos concluir que el cambio en B\*2703, aunque afecta a la afinidad de la interacción HLA-B27/péptido, permite, en la gran mayoría de los casos, la misma orientación de los péptidos en el sitio de unión de B\*2703 y B\*2705.

### **5.2.2.- Analogías y diferencias entre las respuestas B\*2703 y B\*2705: similitud antigénica entre subtipos e implicaciones para su asociación con enfermedad.**

El uso de TCR en CTL anti-B\*2703 es similar al de las respuestas anti-B\*2705 en lo siguiente: 1) mayor diversidad en las cadenas  $\alpha$  que en las  $\beta$ , 2) uso predominante de segmentos V $\beta$  del subgrupo de homología 4 de forma independiente del respondedor, 3) uso restringido de algunos segmentos V $\alpha$ , dependiente del respondedor, 4) restricción de la diversidad N+D $\beta$ , consistente en motivos compartidos por unos pocos clonotipos y 5) heterogeneidad restringida de segmentos J $\alpha$ . Estos resultados demuestran la aplicación de reglas similares en la selección de TCR alorreactivos por B\*2703 y B\*2705. Frente a estas similitudes también se han encontrado algunas diferencias. La primera está en el uso de las subfamilias V $\alpha$ : mientras que V $\alpha$ 14 está incrementada entre los CTL anti-B\*2705 del respondedor GM, no se ve ningún incremento de esta u otra subfamilia en la respuesta anti-B\*2703 de este respondedor. Frente a esto, V $\alpha$ 14 aparece incrementada entre los CTL anti-B\*2703 del respondedor DL. La segunda diferencia es que algunos de los motivos recurrentes de la región N+D $\beta$  en los CTL anti-B\*2703 (RA, GTG, etc) se encuentran también entre los CTL de la respuesta anti-B\*2705, pero otros se detectan solo en la respuesta contra uno u otro subtipo. De manera similar, de los 19 segmentos J $\alpha$  usados por los CTL anti-B\*2703, 12 (63%) se encuentran en CTL anti-B\*2705.



Que los TCR anti-B\*2703 compartan con los anti-B\*2705 motivos estructurales en las regiones CDR3  $\alpha$  y  $\beta$  sugiere que los epítomos asociados a péptidos en ambas respuestas solapan, lo que concuerda con el gran número de células T que reconocen en reacción cruzada ambos subtipos (López *et al.*, 1994), con sus similitudes en la especificidad de unión de péptidos (Tanigaki *et al.*, 1994; Villadangos *et al.*, 1995) y, como se ha mencionado en el apartado anterior, con que los péptidos se unan a ambos subtipos con una disposición espacial muy similar. En su conjunto el análisis de TCR proporciona evidencia molecular de la similitud antigénica de B\*2703 y B\*2705, y sugiere que ésta es debida tanto a la similitud estructural de ambas moléculas, como a que comparten un elevado número de epítomos asociados a péptido. Las diferencias entre B\*2703 y B\*2705 se pueden explicar por la diferente relevancia inmunogénica en cada subtipo de epítomos comunes a ambos. Esto se podría conseguir, por ejemplo, a través de distintos niveles de afinidad, expresión o ambas características, de determinados péptidos presentados por ambos subtipos.

La diversidad de los TCR anti-B\*2703 es similar al de los TCR anti-B\*2705. Esto sugiere, que a pesar de que la antigenicidad de B\*2703 es defectiva en relación a B\*2705 (López *et al.*, 1994, Villadangos *et al.*, 1994), la complejidad antigénica de B\*2703 es suficiente como para no imponer mayores restricciones que B\*2705 en la selección de TCR aloespecíficos. De hecho, los perfiles de HPLC de los péptidos unidos a B\*2703 y B\*2705 en las células HMy2.C1R presentan una complejidad parecida (datos no publicados de nuestro laboratorio).

Aunque B\*2703 no se ha asociado a las espondiloartropatías en los estudios de población, esto podría ser debido al hecho de que este subtipo es predominante solo en la población de una parte de Africa donde las enfermedades asociadas a B27 son extremadamente raras (Hill *et al.*, 1991, Khan *et al.*, 1995), por lo que es difícil realizar estudios epidemiológicos adecuados. Basándonos en las similitudes en las respuesta de células T contra este subtipo en relación a B\*2705 es concebible que B\*2703 no proteja de la enfermedad. En relación con esto, recientemente se ha revelado la existencia de individuos B\*2703<sup>+</sup> que sufren espondilitis anquilosante (Feltkamp *et al.*, 1996).

### 5.2.3.- Selección de segmentos V $\beta$ del subgrupo de homología 4 en respuestas autorreactivas y anti-bacterianas en artritis reactiva.

Hemos propuesto en esta tesis que el predominio de segmentos V $\beta$  del subgrupo de homología 4 en CTL anti-B\*2705 refleja un papel de estos segmentos en el reconocimiento de la molécula de HLA-B27, más que de los péptidos unidos. Que B\*2703 reclute preferentemente el mismo subgrupo indica que el cambio His59 en este subtipo no altera la estructura de la molécula o de los péptidos que une de una manera que afecte a la interacción preferencial de estos segmentos V $\beta$  con HLA-B27. La base de esta preferencia se desconoce, pero es destacable que los CTL restringidos por HLA-B27 específicos de *Yersinia enterocolitica* o CTL autorreactivos aislados de infiltrados inflamatorios de pacientes con artritis reactiva también muestran un uso preferencial de segmentos V $\beta$  del subgrupo de homología 4 (Duchmann *et al.*, 1995). Más aún, en el mismo estudio, la frecuencia de estos segmentos V $\beta$  entre los CTL autorreactivos anti-HLA-B27 (57%) es similar a la encontrada entre los CTL alorreactivos anti-B\*2705 o anti-B\*2703. La importancia de este subgrupo en el reconocimiento de HLA-B27 tanto en alorreactividad como en las enfermedades asociadas a HLA-B27 permite identificar una diana potencial para la eventual intervención inmunoterapéutica en trasplantes y en enfermedades asociadas a HLA-B27, una cuestión que podría ser sometida a ulterior análisis experimental.

## 6.- CONCLUSIONES

---

1ª) El repertorio de TCR en las respuestas anti-B\*2705 y anti-B\*2703 está limitado por restricciones que afectan a múltiples elementos estructurales de ambas cadenas, aunque la restricción es mayor en la cadena  $\beta$ .

2ª) Las restricciones de uso de la cadena  $\beta$  se efectúan a dos niveles: 1º) algunos TCR comparten cadenas  $\beta$  idénticas o casi-idénticas, 2º) la restricción de uso afecta a elementos estructurales aislados tales como  $V\beta$  o  $N+D\beta$ . Estos dos niveles de restricción operan también, pero en menor medida, en la cadena  $\alpha$ .

3ª) En las respuestas alorreactivas anti-B\*2705 y anti-B\*2703 hay un uso preferente de segmentos  $V\beta$  del subgrupo de homología 4, que es independiente del respondedor, del epítipo reconocido, y de otros segmentos de la cadena  $\beta$ . Esto sugiere que este sesgo está determinado principalmente por la molécula del aloantígeno.

4ª) La selección de los segmentos  $V\beta$  se debe presumiblemente a la presencia de determinados motivos estructurales en las regiones CDR1 y CDR2, que se ponen de relieve por comparación de secuencia.

5ª) El uso no aleatorio de segmentos  $V\alpha$  en CTL alorreactivos anti-B27 es dependiente del respondedor y se correlaciona con determinados patrones de reacción.

6ª) La selección de los segmentos  $V\alpha$  y  $V\beta$  es generalmente, pero no siempre, independiente de una determinada asociación  $V\alpha/V\beta$ .

7ª) La diversidad en la región CDR3  $\beta$  está limitada por motivos  $N+D\beta$  comunes, compartidos

por subgrupos de TCR.

8ª) La diversidad de la región CDR3  $\alpha$  está limitada por el uso recurrente de segmentos J $\alpha$ , sin restricción en la región N.

9ª) Las restricciones en las regiones CDR3 sugieren que el número de epítomos alorreactivos asociados a péptido no es extremadamente diverso.

10ª) No se han encontrado CTL que presentaran los mismos motivos compartidos en el CDR3 de ambas cadenas. Esto indica que la selección CDR3 se produce de manera independiente en las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , y sugiere una interacción preferencial de epítomos particulares con los motivos del CDR3 de una u otra cadena.

11ª) El análisis comparativo de los repertorios de TCR anti-B\*2703 y anti-B\*2705 indica una gran similitud antigénica de B\*2703 con B\*2705 y una frecuencia muy baja de epítomos "privados" en B\*2703.

12ª) Ello implica que el cambio Tyr $\rightarrow$ His59 en B\*2703 no altera significativamente la estructura molecular de HLA-B27 y, aunque afecta a la afinidad y a la capacidad de unión de péptidos no modifica, en general, la orientación espacial de los péptidos unidos.

## 7.- BIBLIOGRAFÍA

---

Aggarwal, A., Kumar, S., Jaffe, R., Hone, D., Gross, M., Sandoff, J. 1990. Oral Salmonella: malaria circumsporozoito recombinants induce specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cell. *J. Exp. Med.* 172: 1083-1090.

Akolkar, P.N., Gulwani-Akolkar, B., Pergolizzi, R., Bigler, R.D., Silver, J. 1993. Influence of HLA genes on T cell receptor V segment frequencies and expression levels in peripheral blood lymphocytes. *J. Immunol.* 150: 2761-2773.

Aparicio, P., Jaraquemada, D., Lopez de Castro, J.A. 1987. Alloreactive cytolytic T cell clones with dual recognition of HLA-B27 and HLA-DR2 antigens: selective involvement of CD8 in their class I-directed cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 165: 428-443.

Baur, M.P., Neugebauer, M., Deppe, H., Sigmund, M., Luton, T., Mayr, W.R., Albert, E.D. Polpulation analysis on the basis of deduced haplotypes from random families. *Histocompatibility Testing* 1984, p 333-341. Springer-Verlag, Berlín.

Becker, J.W., Reeke, G.N. 1985. Three-dimensional structure of  $\beta$ 2-microglobulin. *P.N.A.S* 82: 4225-4229.

Benichou, G., Takizawa, P.A., Olson, C.A., McMillan, M., Sercarz, E.E. 1992. Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. *J. Exp. Med.* 175: 305-308.

Benjamin, R., Parham, P. 1990. Guilty by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol. Today.* 11: 137-142.

Bently, G.A., Boulot, G., Karjalainen, K., Mariuzza, R.A. 1995. Crystal structure of the  $\beta$  chain of a T cell antigen receptor. *Science* 267: 1984-1987.

- Bevan, M.J. 1984. High determinant density may explain the phenomenon of alloreactivity. *Immunol.Today* 5: 128-130.
- Bill, J., Yagiue, J., Appel, V.B., White, J., Horn, G., Erlich, H.A., Palmer, E. 1989. Molecular genetic analysis of 178 I-A<sup>bm12</sup>-reactive T cells. *J. Exp. Med.* 169: 115-133.
- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C. 1987a. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329: 506-512.
- Bjorkman, P.J., Saper, M.A., Samraoui, B., Bennett, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C. 1987b. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329: 512-518.
- Boitel, B., Ermonval, M., Panina-Bordignon, P., Mariuzza, R.A., Lanzavecchia, A., Acuto, O. 1992. Preferential V $\beta$  gene usage and lack of junctional sequence conservation among human T cell receptors specific for a tetanus toxin-derived peptide: Evidence for a dominant role of a germline-encoded V region in antigen/major histocompatibility complex recognition. *J. Exp. Med.* 175: 765-777.
- Bragado, R., Lauzurica, P., López, D., López de Castro, J.A. 1990. T cell receptor V gene usage in a human alloreactive response: Shared structural features among HLA-B27-specific T cell clones. *J. Exp. Med.* 171: 1189-1204.
- Bragado, R., García, A., Treviño, M.A., Vilches, C., López de Castro, J.A. 1994. Allelic polymorphism in the coding region of human TCR C $\alpha$  gene and characterization of structural variability in the  $\alpha$  chain constant domain. *Int. Immunol.* 6: 223-230.
- Breban, M., Hammer, R.E., Richardson, J.A., Taurog, J. 1993. Transfer of the inflammatory disease of HLA-B27 rats by bone marrow engraftment. *J. Exp. Med.* 178: 1607-1616.
- Brenner, M.B., Trowbridge, I.S., Strominger, J.L. 1985. Cross-linking of human T cell receptor proteins: association between the T cell idiotype beta subunit and the T3 glycoprotein heavy subunit. *Cell* 40: 183-192.

- Brenner, M.B., McLean, J., Scheft, H., Warnke, R.A., Jones, N., Strominger, J.L. 1986. Characterization and expression of human  $\alpha/\beta$  T cell receptor by using a framework monoclonal antibody. *J. Immunol.* 138: 1502-1510.
- Breuer-Vriesendorp, B.S., Dekker-Saeys, A.J., Iványi, P. 1987. Distribution of HLA-B27 subtypes in patients with ankylosing spondylitis: the disease is associated with a common determinant of the various B27 molecules. *Ann. Rheum. Dis.* 46: 353-356.
- Brewerton, D.A., Caffrey, M., Hart, F.D., James, D.C.O., Nicholls, A., Sturrock, R.D. 1973. Ankylosing spondylitis and HLA-B27. *Lancet* 1: 904-907.
- Caccia, N., Kronenberg, M., Saxe, D., Haars, R., Bruns, G.A.P., Goverman, J., Malissen, M., Willard, H., Yoshikai, Y., Simon, M., Hood, L., Mak, T.W. 1984. The T cell receptor  $\beta$  chain genes are located on chromosome 6 in mice and chromosome 7 in humans. *Cell* 37: 1091-1100.
- Caccia, N., Bruns, G.A.P., Kirsch, I.R., Hollis, G.F., Bertness, V., Mak, T.W. 1985. T cell receptor  $\alpha$  chain genes are located on chromosome 14q11 in humans. *J. Exp. Med.* 151: 1255-1263.
- Casanova J.L., Romero, P., Widmann, C., Kourilsky, P., Maryanski, J.L. 1991. T cell receptor genes in a series of class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocyte clones specific for a *Plasmodium berghei* nonapeptide: Implications for T cell allelic exclusion and antigen-specific repertoire. *J. Exp. Med.* 174: 1371-1383.
- Casanova, J.L., Maryanski, J.L. 1993. Antigen-selected T-cell receptor diversity and self-nonself homology. *Immunol. Today.* 14: 391-394.
- Choo, S.Y., Antonelli, P., Nisperos, B., Nepom, T., Hansen, J.A. 1986. Six variants of HLA-B27 identified by isoelectric focusing. *Immunogenetics* 23: 24-29.
- Choo, S.Y., St.John, T., Orr, H.T., Hansen, J.A. 1988. Molecular analysis of the variant alloantigen HLA-B27d (HLA-B\*2703) identifies a unique single amino acid substitution. *Hum. Immunol.* 21: 209-219.

- Choo, S.Y., Fan, L.A., Hansen, J.A. 1991. A novel HLA-B27 allele maps B27 allospecificity to the region around position 70 in the  $\alpha_1$  domain. *J. Immunol.* **147**: 174-180.
- Chothia, C., Boswell, D.R., Lesk, A.M. 1988. The outline structure of the T-cell  $\alpha\beta$  receptor. *EMBO J.* **17**: 3745-3755.
- Clark, S.P., Yoshikai, Y., Siu, G., Taylor, S., Hood, L., Mak, T.W. 1984. Identification of a diversity segment of the human T cell receptor  $\beta$  chain, and comparison to the analogous murine element. *Nature* **311**: 387-390.
- Claverie, J.M., Prochnicka-Chalufour, A., Bougueleret, L. 1989. Implications of a Fab-like structure for the T-cell receptor. *Immunol. Today* **10**: 10-14.
- Clayberger, C., Parham, P., Rothbard, J., Ludwig, D.S., Schoolnik, A., Krensky, A.M. 1987. HLA-A2 peptides, can regulate cytolysis by human allogeneic T lymphocytes. *Nature* **330**: 763-765.
- Collins, M.K.L., Goodfellow, P.N., Spurr, N.K., Solomon, E., Tanigawa, G., Tonegawa, S., Owen, M.J. 1985. The human T cell receptor  $\alpha$ -chain gene maps to chromosome 14. *Nature* **314**: 273-277.
- Concannon, P., Pickering, L.A., Kung, P., Hood, L. 1986. Diversity and structure of human T-cell receptor  $\beta$ -chain variable region genes. *P.N.A.S.* **83**: 6598-6602.
- D'Amato, M., Fiorillo, M.T., Carcassi, C., Mathieu, A., Zuccarelli, A., Bitti, P.P., Tosi, R., Sorrentino, R. 1995. Relevance of residue 116 of HLA-B27 in determining susceptibility to ankylosing spondylitis. *Eur. J. Immunol.* **25**: 3199-3201.
- Davis, M. M., Bjorkman, P.J. 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* **334**: 395-402.
- Davis, M.M. 1990. T cell receptor gene diversity and selection. *Annu. Rev. Biochem.* **59**: 475-496.



- De Pablo, R., Vilches, C., Moreno, M.E., Rementería, M., Solís, R., Kreisler, M. 1992. Distribution of HLA antigens in Spanish Gypsies: A comparative study. *Tissue Antigens* 40: 187-196.
- Del Porto, P., D'Amato, M., Florillo, M.T., Tuosto, L., Piccolella, E., Sorrentino, R. 1994. Identification of a novel HLA-B27 subtype by restriction analysis of a cytotoxic gamma delta T cell clone. *J. Immunol.* 153: 3093-3100.
- Duchmann, R., May, E., Ackermann, B., Goergen, B., Meyer zum Büschenfelde, K.-H., Märker-Hermann, E. 1995. HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to arthritogenic enterobacteria or self antigens are dominated by closely related TCRBV gene segment. *Scand. J. Immunol.* In press.
- Falk, K., Rötzschke, O., Stevanovic, S., Jung, G., Rammensee, H.G. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351: 290-296.
- Fangmann, J., Dalchau, R., Fabre, J.W. 1992. Recognition of skin allografts by indirect allorecognition of donor class I major histocompatibility complex peptides. *J. Exp. Med.* 175: 1521-1529.
- Feltkamp, T.E.W., Khan, M.A., Lopez de Castro, J.A. 1996. The pathogenetic role of HLA-B27. *Immunol. Today.* 17: 5-7.
- Ferguson, W.G., Terhorst, C.T., Robb, R.J., Strominger, J.L. 1979. Localization of the disulfide bridges of human histocompatibility antigens. *Molecular Immunol.* 16: 23-28.
- Ferradini, L., Roman-Roman, S., Azocar, J., Michalaki, H., Triebel, F., Hercend, T. 1991. Studies on the human T cell receptor  $\alpha/\beta$  variable region genes; II. Identification of four additional  $V\beta$  subfamilies. *Eur. J. Immunol.* 21: 935-942.
- Fields, B.A., Ober, B., Malchiodi, E.M., Lebedeva, M.I., Braden, B.C., Ysern, X., Kim, J.K., Shao, X., Ward, E.S., Mariuzza, R.A. 1995. Crystal structure of the  $V\alpha$  domain of a T cell antigen receptor. *Science* 270: 1821-1824.

- Fremont, D.H., Matsumura, E., Stura, A., Peterson, P.A., Wilson, I.A. 1992. Crystal structures of two viral peptides in complex with murine MHC class I H-2K<sup>b</sup>. *Science* **257**: 919-927.
- Garret, T.P., Saper, M.A., Bjorkman, P.J., Strominger, J.L., Wiley, D.C. 1989. Specificity pockets for the side chains of peptide antigen in HLA-Aw68. *Nature* **342**: 692-696.
- Geiger, M.J., Gorski, J., Eckels, D.D. 1991. T cell receptor gene segment utilization by HLA-DR1-alloreactive T cell clones. *J. Immunol.* **147**: 2082-2087.
- George, J.F., Schroeder, H. W. 1992. Developmental regulation of D $\beta$  reading frame and junctional diversity in T cell receptor- $\beta$  transcript from human thymus. *J. Immunol.* **148**: 1230-1239.
- Gonzalez-Roces, S., Brauthar, C., Peña, M., Dominguez, O., Coto, E., Alvarez, V, Segal, R., López-Larrea, C. 1994. Molecular analysis of HLA-B27 haplotypes in Caucasoids. *Hum. Immunol.* **41**: 127-134.
- Goronzy, J.J., Xie, C., Hu, W., Lundy, S.K., Weyand, C.M. 1993. Restrictions in the repertoire of allospecific T cells. Contribution of the  $\alpha$ -helical sequence polymorphism of HLA-DR molecules. *J. Immunol.* **151**: 825-836.
- Groettrup, M., von Boehmer, H. 1993. A role for a pre-T-cell receptor in T-cell development. *Immunol. Today.* **14**: 610-614.
- Groh, V., Porcielli, S., Fabbi, M., Lanier, L.L., Picker, L.J., Anderson, T., Warnke, R.A., Bhan, A.K., Strominger, J.L., Brenner, M.B. 1989. Human lymphocytes bearing T cell receptor gamma delta are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J. Exp. Med.* **169**: 1277-1294.
- Gu, H., Kitamura, D., Rajewsky, K. 1991. B cell development regulated by gene rearrangement: Arrest of maturation by membrane bound D $\mu$  protein and selection of DH element reading frames. *Cell* **65**: 47-54.

Guo, H.CH., Jardetzky, T.S., Garret, T.P.J., Lane, W.S., Strominger, J.L., Wiley, D.C. 1992. Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle. *Nature* 360: 364-366.

Gyllensten, U.B., Erlich, H.A. 1988. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *P.N.A.S.* 85: 7652-7656.

Haberman, A.M., Moller, C., McCreedy, D., Gerhard, W.U. 1990. A large degree of junctional diversity exists among helper T cells specific for the same antigenic site of influenza hemagglutinin. *J. Immunol.* 145: 3087-3094.

Hall, B.L., Hand, S.L., Alter, M.D., Kirk, A.D., Finn, O.J. 1993. Variables affecting the T cell receptor V beta repertoire heterogeneity of T cells infiltrating human renal allografts. *Transpl. Immunol.* 1: 217-227.

Hall, M., Jaeger, E.E.M., Bontrop, R.E., Lanchbury, J.S. 1994. Characterization of a novel human T cell receptor  $\beta$  chain variable region family by transspecies DNA hybridization. *Eur. J. Immunol.* 24: 641-645.

Hammer, R.E., Maika, S.D., Richardson, J.A., Tang, J.P., Taurog, J. 1990. Spontaneous inflammatory disease in transgenic rats expressing HLA-B27 and human  $\beta_2m$ : An animal model of HLA-B27-associated human disorders. *Cell* 63: 1099-1112.

Heath, W.R., Hurd, M.E., Carbone, F.R., Sherman, L.A. 1989. Peptide-dependent recognition of H-2K<sup>b</sup> by alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 341: 749-752.

Heath, W.R., Kane, K.P., Mescher, M.F., Sherman, L.A. 1991. Alloreactive T cells discriminate among a diverse set of endogenous peptides. *P.N.A.S.* 88: 5101-5105.

Hermann, E., Yu, D.T.Y., Meyer, K.H. 1993. HLA-B27-restricted CD8 T cells derived from synovial fluids of patients with reactive arthritis and ankylosing spondylitis. *Lancet* 337: 646-650.

Hildebrand, W.H., Domena, J.D., Shen, S.Y., Marsh, S.G., Bunce, M., Guttridge, M.G., Darke, C., Parham, P. 1994. The HLA-B7Q<sub>i</sub> antigen is encoded by a new subtype of HLA-B27 (HLA-B\*2708). *Tissue Antigens* 44: 47-51.

- Hill, A.V., Allsopp, C.E., Kwiatkowski, D., Anstey, N.M., Greenwood, B.M., McMichael, A.J. 1990. HLA-B27 and an african B27 subtype. *Hum. Immunol.* 16<sup>th</sup> Annual ASHI Meeting Abstracts.
- Hill, A.V., Allsopp, C.E., Kwiatkowski, D., Anstey, N.M., Greenwood, B.M., McMichael, A.J. 1991. HLA class I typing by PCR: HLA-B27 and african B27 subtype. *Lancet* 337: 640-643.
- Hong, S.C., Chelouche, A., Lin, R.H., Shaywitz, D., Braunstein, N.S., Glimcher, D., Janeway Jr., C.A. 1992. An MHC interaction site maps to the amino-terminal half of the T cell receptor  $\alpha$  chain variable domain. *Cell* 69: 999-1009.
- Hurley, C.K., Steiner, N., Wagner, A., Geiger, M.J., Eckels, D.D., Rosen-Bronson, S. 1993. Nonrandom T cell receptor usage in the allorecognition of HLA-DR1 microvariation. *J. Immunol.* 150: 1314-1324.
- Jaraquemada, D., Galocha, B., Aparicio, P., Rojo, S., Calvo, V., López de Castro, J.A. 1988. Modulation on immunogenicity by HLA-B27 subtype polymorphism. *Eur. J. Immunol.* 18: 1945-1950.
- Jardetzky, T.S., Lane, W.S., Robinson, R.A., Madden, D.R., Wiley, C. 1991. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 353: 326-329.
- Jorgensen, J.L., Esser, U., Fazekas de St. Groth, B., Reay, P.A., Davis, M.M. 1992. Mapping T-cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics. *Nature* 355: 224-230.
- Keat, A. 1986. Is spondylitis caused by Klebsiella?. *Immunol. Today* 7: 144-149.
- Kelly, J.M., Sterry, S.J., Cose, S., Turner, S.J., Fecondo, J., Rodda, S., Fink, P.J., Carbone, F.R. 1993. Identification of conserved T cell receptor CDR3 residues contacting known exposed peptide side chains from a major histocompatibility complex class I-bound determinat. *Eur. J. Immunol.* 23: 3318-3326.
- Khan, M.A. 1995. HLA-B27 and its subtypes in world populations. *Curr. Opin. Rheumatol.* 7: 263-269.

- Kimura, N., Toyonaga, B., Yoshiai, Y., Triebel, F., Debre, P., Minden M.D., Mak, T.W. 1986. Sequences and diversity of human T cell receptor  $\beta$  chain variable region genes. *J. Exp. Med.* **164**: 739-750.
- Kimura, N., Toyonaga, B., Yoshikai, Y., Du, R-P, Mak, T.W. 1987. Sequences and repertoire of the human T cell receptor  $\alpha$  and  $\beta$  chain variable region genes in thymocytes. *Eur. J. Immunol.* **17**: 375-383.
- Kingsley, G., Sleper, J. 1993. Current perspectives in reactive arthritis. *Immunol. Today* **14**: 387-391.
- Klein, M.H., Concannon, P., Everett, M., Kim, L.D.H., Hunkapiller, T., Hood, L. 1987. Diversity and structure of human T-cell receptor  $\alpha$ -chain variable region genes. *P.N.A.S.* **84**: 6884-6888.
- Koller, B.H., Geraghty, D.E., DeMars, R., Duvick, L., Rich, S.S., Orr, H.T. 1989. Chromosomal organization of the human major histocompatibility complex class I gene family. *J. Exp. Med.* **169**: 469-480.
- Lai, E., Concannon, P., Hood, L. 1988. Conserved organization of the human and murine T cell receptor  $\beta$  gene families. *Nature* **331**: 543-546.
- Lauzurica, P., Bragado, R., López, D., Galocha, B., López de Castro, J.A. 1992. Asymmetric selection of T cell antigen receptor  $\alpha$ - and  $\beta$ -chains in HLA-B27 alloreactivity. *J. Immunol.* **148**: 3624-3630.
- Lawlor, D.A., Zemmour, J., Ennis, P.D., Parham, P. 1990. Evolution of class-I MHC genes and proteins: from natural selection to thymic selection. *Annu. Rev. Immunol.* **8**: 23-63.
- Lechler, R.I., Lombardi, G., Batchelor, J.R., Reinsmoen, N., Bach, F.H. 1990. The molecular basis of alloreactivity. *Immunol. Today* **11**: 83-88
- Li, Y., Szabo, P., Robinson, M.A., Dong, B., Posnett, D.N. 1990. Allelic variations in the human T cell receptor V beta 6.7 gene products. *J. Exp. Med.* **171**: 221-230.

Lochead, J.A., Chalmers, I.M., Marshall, W.H., Larsen, B., Skanes, V.M., Payne, R.H., Barnard, J.M. 1983. HLA-B27 haplotypes in family studies of ankylosing spondylitis. *Arthritis Rheum.* **26**: 1011-1016.

López, D., Barber, D.F., Villadangos, J.A., López de Castro, J.A. 1993. Cross-reactive T cell clones from unrelated individuals reveal similarities in peptide presentation between HLA-B27 and HLA-DR2. *J. Immunol.* **150**: 2675-2686.

López, D., García-Hoyo, R., López de Castro, J.A. 1994. Clonal analysis of alloreactive T cell responses against the closely related B\*2705 and B\*2703 subtypes. Implications for HLA-B27 association to spondyloarthropathy. *J. Immunol.* **152**: 5557-5571.

López de Castro, J.A. 1989. HLA-B27 and HLA-A2 subtypes: structure, evolution and function. *Immunol. Today* **10**: 239-241.

López de Castro, J.A. 1996. HLA-B27 and HLA-B73 polymorphism and its role on antigenicity, peptide presentation, and disease susceptibility. *Clinical Rheumatol.* **15** (Suppl. 1): 66-69.

López-Larrea, C., Sujirachato, K., Mehra, N.K., Ciewslip, P., Isarangkura, D., Kanga, U., Domínguez, O., Coto, E., Peña, M., Setien, F., Gonzalez-Roces, S. 1995. HLA-B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis: evidence for new associations. *Tissue Antigens* **45**: 169-176.

Madden, D.R., Gorga, J.C., Strominger, J.L., Wiley, D.C. 1991. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* **353**: 321-325.

Madden, D.R., Gorga, J.C., Strominger, J.L., Wiley, D.C. 1992. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* **70**: 1035-1048.

Madden, D.R., Garboczi, D.N., Wiley, D.C. 1993. The antigenic identity of peptide-MHC complexes: A comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2. *Cell* **75**: 693-708.

- Madden, D.R. 1995. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 587-622.
- Maniatis, T.E., Fritsch, E.F., Sambrook, J. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Marrack, P., Kappler, J. 1988. T cells can distinguish between allogeneic major histocompatibility complex products on different cell types. *Nature* 332: 840-843.
- Mason, D.W., Morris, P.J. 1986. Effector mechanism in allograft rejection. *Ann. Rev. Immunol.* 4: 119-145.
- Matzinger, P., Bevan, M.J. 1977. Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens. *Cell Immunol.* 29: 1-5.
- Mercep, M., Bonifacio, J.S., García-Morales, P., Samuelson, L.E., Klausner, R.D., Ashwell, J.D. 1988. T cell CD3  $\zeta\eta$  heterodimer expression and coupling to phosphoinositide hydrolysis. *Science* 242: 571-574.
- Meuer, S.C., Fitzgerald, K.A., Hussey, R.E., Hodgdon, J.C., Schlossman, S.F., Reinherz, E.L. 1983. Clonotypic structures involved in antigen-specific human T cell function. Relationship to the T3 molecular complex. *J. Exp. Med.* 157: 705-713.
- Moss, P.A.H., William, M.C., Rosenberg, W.M.C., Bell, J.I. 1992. The human T cell receptor in health and disease. *Annu. Rev. Immunol.* 10: 71-96.
- Moss, P.A.H., Rosenberg, W.M.C., Zintzaras, E., Bell, J.I. 1993. Characterization of the human T cell receptor  $\alpha$ -chain repertoire and demonstration of a genetic influence on V $\alpha$  usage. *Eur. J. Immunol.* 23: 1153-1159.
- Obata, F., Tsunoda, M., Kaneko, T., Ito, K., Ito, I., Masewicz, S., Mickelson, E.M., Ollier, W.E.R., Pawelec, G., Cella, M., Ferrara, G.B., Kashiwagi, N. 1993. Human T-cell receptor *TCRAV*, *TCRBV*, and *TCRAJ* sequences newly found in T-cell clones reactive with allogeneic HLA class II antigens. *Immunogenetics* 38: 67-70.

- Orr, H.T., López de Castro, J.A., Lancet, D., Strominger, J.L. 1979a. Complete amino acid sequence of a papain-solubilized human histocompatibility antigen HLA-B7. II. Sequence determination and search for homologies. *Biochemistry* 18: 5711-5720.
- Orr, H.T., Lancet, D., Robb, R.J., López de Castro, J. A., Strominger, J.L. 1979b. The heavy chain of human histocompatibility antigen HLA-B7 contains an immunoglobulin-like region. *Nature* 282: 266-279.
- Patten, P.A., Rock, E.P., Sonoda, T., Fazekas de St. Groth, B., Jorgensen, J.L., Davis, M.M. 1993. Transfer of putative complementarity-determining region loops of T cell receptor V domains confers toxin reactivity but not peptide/MHC specificity. *J. Immunol.* 150: 2281-2294.
- Plaza, A., Kono, D.H., Theofilopoulos, A.N. 1991. New human V $\beta$  genes and polymorphic variants. *J. Immunol.* 147: 4360-4365.
- Perkins, D.L., Lai, M.Z., Smith, J.A., Geffer, M.L. 1989. Identical peptides recognized by MHC class I- and II-restricted T cells. *J. Exp. Med.* 170: 279-289.
- Perkins, D.L., Berriz, G., Wang, Y.S., Smith, J.A., Geffer, M.L. 1991. Comparison of class I- and II-restricted T cell recognition of the identical peptide. *Eur. J. Immunol.* 21: 2781-2789.
- Ploegh, H.L., Orr, H.T., Strominger, J.L. 1981. Major histocompatibility antigens: the human (HLA-A, B, C) and murine (H2-K, H2-D) class I molecules. *Cell* 24: 287-299.
- Posnett, D.N. 1990. Allelic variations of human TCR V gene products. *Immunol. Today* 11: 368-373.
- Pluschke, G., Ricken, G., Taube, H., Kroninger, S., Melchers, I., Hartmut H. P., Eichmann K., Krawinkel, U. 1991. Biased T cell receptor V $\alpha$  region repertoire in synovial fluid of rheumatoid arthritis patients. *Eur. J. Immunol.* 21: 2749-2754.
- Raulet, D.H. 1989. The structure, function, and molecular genetics of the gamma delta T cell receptor. *Annu. Rev. Immunol.* 7: 175-207.



- Reveille, J.D., Koopman, W.J., Barger, B.O., Acton, R.T., McDaniel, D.O. 1988. Restriction fragment length polymorphism analysis in ankylosing spondylitis. *Am. J. Med.* 88: 48-50.
- Reyburn, H., Cornélis, F., Russell, V., Harding, R., Moss, P., Bell, J. 1993. Allelic polymorphism of human T-cell receptor V alpha gene segments. *Immunogenetics* 38: 287-291.
- Robinson, M.A. 1991. The human T cell receptor  $\beta$ -chain gene complex contains at least 57 variable gene segments. Identification of six V $\beta$  genes in four new gene families. *J. Immunol.* 146: 4392-4397.
- Rojo, S., Aparicio, P., Hansen, J.A., Choo, S.Y., Lopez de Castro, J.A. 1987. Structural analysis of an HLA-B27 functional variant, B27d, detected in american blacks. *J. Immunol.* 139: 3396-3401.
- Rojo, S., López, D., Calvo, V., López de Castro, J.A. 1991. Conservation and alteration of HLA-B27-specific T cell epitopes on mouse cells. Implications for peptide-mediated alloreactivity. *J. Immunol.* 146: 634-642.
- Roman-Roman, S., Ferradini, L., Azocar, J., Genevée, C., Hercend, T., Triebel, F. 1991. Studies on the human T cell receptor  $\alpha/\beta$  variable region genes; I. Identification of 7 additional V $\alpha$  subfamilies and 14 J $\alpha$  gene segments. *Eur. J. Immunol.* 21: 927-933.
- Roth, M.E., Lacy, M.J., McNeil, L.K., Kranz, D. 1988. Selection of Variable-Joining region combinations in the  $\alpha$  chain of the T cell receptor. *Science* 241: 1354-1358.
- Rötzschke, O., Falk, K., Faath, S., Rammensee, H.G. 1991. On the nature of peptides involved in T cell alloreactivity. *J. Exp. Med.* 174: 1059-1071.
- Rötzschke, O., Falk, K., Stevanovic, S., Jung, G., Rammensee, H.G. 1992. Peptide motifs of closely related HLA class I encompass substantial differences. *Eur. J. Immunol.* 22: 2453-2457.
- Rötzschke, O., Falk, K., Stevanovic, S., Gnau, V., Jung, G., Rammensee, H.G. 1994. Dominant aromatic/aliphatic C-terminal anchor in HLA-B\*2702 and B\*2705 peptide motifs. *Immunogenetics* 39: 74-77.

- Rudwaleit, M., Bowness, P., Wordsworth, P. 1996. The nucleotide sequence of HLA-B\*2704 reveals a new amino acid substitution in exon 4 which is also present in HLA-B\*2706. *Immunogenetic* 43: 160-162.
- Sanger, F., Coulson, A.R. 1975. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 94: 441-449.
- Saper, M.A., Bjorkman, P.J., Wiley, D.C. 1991. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6Å resolution. *J. Mol. Biol.* 219: 277-319.
- Sette, A., Vitiello, A., Reheman, B., Fowler, P., Nayarsina, R., Oseroff, C., Yuan, L., Ruppert, J., Sidney, J., del Guercio, M.F., Southwood, S., Kubo, R.T., Chesnut, R.W., Grey, H.M., Chisari, F.V. 1994. The relationship between class I binding affinity and immunogenicity of potential cytotoxic T cell epitopes. *J. Immunol.* 153: 5586-5592.
- Sherman, L.A., Chattopadhyay, S. 1993. The molecular basis of allorecognition. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 385-402.
- Shirwan, H., Chi, D., Makowka, L., Cramer, D.V. 1993. Lymphocytes infiltrating rat cardiac allograft express a limited repertoire of T cell receptor V $\beta$  genes. *J. Immunol.* 151: 5228-5238.
- Silver, M.L., Guo, H.CH., Strominger, J.L., Wiley, D.C. 1992. Atomic structure of a human MHC molecule presenting an influenza virus peptide. *Nature* 360: 367-369.
- Siu, G., Clark, S., Yoshikai, Y., Malissen, M., Yanagi, Y., Strauss, E., Mak, T.W., Hood, L. 1984. The human T cell antigen receptor is encoded by variable, diversity and joining gene segment that rearrange to generate a complex V gene. *Cell* 37: 393-401.
- Smell, G.D., Dausset, J., Nathenson, S. 1976. Histocompatibility. p 323-334, New York, Academic Press.
- Song, E.S., Linsk, R., Olson, C.A., McMillan, M., Goodenow, R.S. 1988. Allospecific cytotoxic T lymphocytes recognize an H-2 peptide in the context of a murine major histocompatibility complex class I molecule. *P.N.A.S.* 85: 1927-1931.

- Steinle, A., Reinhardt, C., Jantzer, P., Schendel, D.J. 1995. In vivo expansion of HLA-B35 alloreactive T cells sharing homologous T cell receptors: Evidence for maintenance of oligoclonally dominated allospecificity by persistent stimulation with an autologous MHC/peptide complex. *J. Exp. Med.* 181: 503-513.
- Tanigaki, N., Frucl, D., Vigneti, E., Starace, G., Rovero, P., Londel, M., Butler, R.H., Tosi, R. 1994. The peptide binding specificity of HLA-B27 subtypes. *Immunogenetics* 40: 192-198.
- Taylor, A.H., Haberman, A.M., Gerhard, W., Caton, A.J. 1990. Structure-function relationships among highly diverse T cells that recognize a determinant from influenza virus hemagglutinin. *J. Exp. Med.* 172: 1643-1651.
- Toyonaga, B., Yoshikai, Y., Vadasz, V., Chin, B., Mak, T.W. 1985. Organization and sequence of the diversity, joining, and constant region genes of the human T-cell receptor beta chain. *P.N.A.S.* 82: 8624-8628.
- Toyonaga, B., Mak, T.W. 1987. Genes of the T-cell antigen receptor in normal and malignant T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 5: 585-620.
- Urban, R.G., Chicz, R.M., Lane, W.S., Strominger, J.L., Rehm, A., Kenter, M.G.H., Uytdehaag, F.G.C.M., Ploegh, H.L., Uchanska-Ziegler, B., Ziegler, A. 1994. A subset of HLA-B27 molecules contains peptides much longer than nonamers. *P.N.A.S.* 91: 1534-1538.
- Villadangos, J.A., Galocha, B., López, D., Calvo, V., López de Castro, J.A. 1992. Role of binding pockets for amino-terminal peptide residues in HLA-B27 allorecognition. *J. Immunol.* 149: 505-510.
- Villadangos, J.A., Galocha, B., García-Hoyo, R., López, D., García, F., López de Castro, J.A. 1994a. Structure of HLA-B27 T cell epitopes. Antigen presentation in B\*2703 is limited mostly to a subset of the antigenic determinants on B\*2705. *Eur. J. Immunol.* 24: 2548-2555.
- Villadangos, J.A., Galocha, B., López de Castro, J.A. 1994b. Unusual topology of an HLA-B27 allospecific T cell epitope lacking peptide specificity. *J. Immunol.* 152: 2317-2323.

- Villadangos, J.A., Galocha, B., Garcia, F., Albar, J.P., Lopez de Castro, J.A. 1995. Modulation of peptide binding by HLA-B27 polymorphism in pockets A and B, and peptide specificity of B\*2703. *Eur. J. Immunol.* 25: 2370-2377.
- Wilson, K. E., Ball, E., Stasny, P., Capra, J. D. 1991. Allorecognition of HLA DR2 and DR5 molecules by V $\beta$ 8-positive T-cell clones. *Scand. J. Immunol.* 33: 131-139.
- Wilson, R.K., Lai, E., Concannon, P., Barth, R.K., Hood, L.E. 1988. Structure, organization and polymorphism of murine and human T-cell receptor  $\alpha$  and  $\beta$  chain gene families. *Immunol. Rev.* 101: 149-172.
- Wilson, R.K., Lai, E., Kim, L. D. H., Hood, L. 1990. Sequence and expression of a novel T cell receptor beta chain variable region segment subfamily. *Immunogenetics* 32: 406-412.
- Yewdell, J.W., Bennink, J.R. 1990. The binary logic of antigen processing and presentation to T cells. *Cell* 62: 203-206.
- Yoshikai, Y., Clark, S.P., Taylor, S., Sohn, V., Wilson, B., Minden, M., Mak, T.W. 1985. Organization and sequences of the variable, joining and constant region genes of the human T cell receptor  $\alpha$  chain. *Nature* 316: 837-840.
- Yoshikai, Y., Kimura, N., Toyonaga, B., Mak, T.W. 1986. Sequences and repertoire of human T cell receptor  $\alpha$  chain variable region genes in mature T lymphocytes. *J. Exp. Med.* 164: 90-103.
- Young, A.C.M., Zhang, W., Sacchettini, J.C., Nathenson, S.G. 1994. The three-dimensional structure of H-2D<sup>b</sup> at 2.4Å resolution: Implications for antigen-determinant selection. *Cell* 76: 39-50.

# APÉNDICES

## 8.- APÉNDICE 1

---

### Caracterización de un subtipo de HLA-A2: *HLA-A\*0213*.

HLA-A2 es el antígeno de clase I más común en humanos (Baur *et al.*, 1984). Actualmente se conocen 16 subtipos de este antígeno (Strominger *et al.*, 1995). Previamente a la caracterización de éste, se habían descrito 12 subtipos de HLA-A2 (López de Castro, 1989; Castaño y López de Castro, 1991; 1992; Belich *et al.*, 1992). El nuevo subtipo se denominó *HLA-A\*0213* y se detectó por isoelectroenfoque (IEF) en individuos caucasoides europeos (Guttridge *et al.*, 1992).

La estrategia experimental para la determinación de su estructura fue la siguiente. Se extrajo el RNA total de la LCL SLUGEO (HLA-A2, 11; B35, 44; Cw4, w5; DR1) y 1µg se utilizó para sintetizar cDNA con transcriptasa reversa. Como iniciador en la síntesis de cDNA se utilizó un oligonucleótido antisentido de la región 3'-UT (no traducida), 5'-GCGAATTCAGAAACAAAGTCAGGGTT-3', que tenía un sitio de restricción EcoRI (subrayado). Para la amplificación, además se utilizó un oligonucleótido de la región 5'-UT, 5'-GCAAGCTTAGATTCTCCCCAGACGC-3', que tenía un sitio HindIII (subrayado). Los productos de la amplificación se clonaron en pUC18. Se seleccionaron los clones específicos de HLA-A2 hibridando las bacterias DH5αF' transformadas, con un oligonucleótido específico del dominio A2α2 (5'-TGGCAGCTCAGACCACCAAGCAC-3') (Castaño y López de Castro, 1991). Se determinó la secuencia completa de *HLA-A\*0213* en 4 clones de cDNA. Las cuatro secuencias fueron idénticas (Figura 1).

*A\*0213* se diferenció de *A\*0201* (Zemmur y Parham, 1993) en solo tres nucleótidos: 527 (T→A), 538 (T→A) y 539 (T→A). Estos correspondían a la segunda base del codón 152, y a la primera y segunda base del codón 156 respectivamente e implicaron los siguientes cambios de aminoácidos: Val→Glu152 y Leu→Gln156. Estos cambios explicaban el patrón de IEF de este subtipo, muy parecido al de *A\*0203* (Guttridge *et al.*, 1992). Ambos subtipos tenían la misma

carga neta, pero difieren en dos posiciones que pueden influenciar el pK de los residuos cargados vecinos (Figura 2). Los cambios de este subtipo aparecen individualmente en los subtipos *A\*0203* (Holmes *et al.*, 1987; Mattson *et al.*, 1987) y *A\*0212* (Belich *et al.*, 1992) respectivamente. Estos dos cambios se encontraron solo en los alelos de HLA no clásicos *E\*0101* (Mizumo *et al.*, 1988) y *E\*0102* (Koller *et al.*, 1988), pero estos tenían una sustitución no silenciosa en el codón 155. Por tanto es poco probable que *A\*0213* se origine por recombinación con estos genes. Aunque hay otras posibilidades, la explicación más sencilla para el origen de *A\*0213* es una mutación recurrente en el codón 152 de *A\*0212*, que reintroduce el mismo aminoácido que en el producto de *A\*0203*. *A\*0212* sólo se ha encontrado en Indios de América del Sur, mientras que *A\*0213* está en individuos caucasoides. La presencia de estos subtipos tan estrechamente relacionados en dos grupos étnicos diferentes sugiere un origen relativamente antiguo de ambos subtipos, anterior a la diferenciación étnica.

Por tanto, *A\*0213* supone un nuevo ejemplo de generación recurrente de polimorfismo en determinadas zonas del sitio de unión de antígeno de los subtipos de HLA-A2, lo que apoya la hipótesis de la evolución dirigida por presiones selectivas de los subtipos de HLA-A2 (Castaño y López de Castro 1991; 1992), de forma similar a la evolución de HLA-B27 y, probablemente otros antígenos HLA.

### Bibliografía.

Baur, M.P., Neugebauer, M., Deppe, H., Sigmund, M., Luton, T., Mayr, W.R., Albert, E. D. 1984. Population analysis on the basis of deduced haplotypes from random families. In E.D. Albert, M. P. Baur, and W. R. Mayr (eds.): *Histocompatibility Testing 1984*, pp. 333-341, Springer, New York.

Belich, M. P., Madrigal, A., Hildebrand, W. H., Zemmour, J., Williams, R. C., Luz, R., Petzl-Erler, M. L., and Parham, P. 1992. Unusual HLA-B alleles in two tribes of Brazilian Indians. *Nature* 357: 326-332.

Castaño, A.R., López de Castro, J.A. 1991. Structure of the *HLA-A\*0204* antigen, found in South American Indians. Spatial clustering of HLA-A2 subtype polymorphism. *Immunogenetics* 34: 281-285.

Castaño, A.R., López de Castro, J.A. 1992. Structure of *HLA-A\*0211* (A2.5) subtype: further evidence for selection-driven diversification of HLA-A2 antigens. *Immunogenetics* 35: 344-346.

Guttridge, M.G., Marsh, S.G.E., Klouda, P.T. 1992. A new HLA-A2 variant (HLA-A2-SLU) identified by one-dimensional isoelectric focusing. *Tissue Antigens* 39: 32-34.

- Holmes, N., Ennis, P., Wan, A.M., Denney, D.W., and Parham, P. 1987. Multiple genetic mechanisms have contributed to the generation of the HLA-A2/A28 family of class I MHC molecules. *J. Immunol.* **139**: 936-941.
- Koller, B.H., Geraghty, D.E., Shimizu, Y., Demars, R., and Orr, H.T. 1988. HLA-E. A novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes. *J. Immunol.* **141**: 897-904.
- López de Castro, J.A. 1989. HLA-B27 and HLA-A2 subtypes: structure, evolution and function. *Immunol. Today* **10**: 239-246.
- Mattson, D.H., Handy, D.E., Bradley, D.A., Coligan, J.E., Cowan, E.P., and Biddison, W.E. 1987. DNA sequence of the genes that encode the CTL-defined HLA-A2 variants M7 and DK1. *Immunogenetics* **26**: 190-192.
- Mizuno, S., Trapani, J. A., Koller, B. H., Dupont, B., and Yang, S. Y. 1988. Isolation and nucleotide sequence of a cDNA clone encoding a novel HLA class I gene. *J. Immunol.* **140**: 4024-4030.
- Strominger, J., Svejgaard, A., Terasaki, P.I. 1995. Nomenclature for factors of the HLA system. *Tissue Antigens* **46**: 1-18.
- Zemmour, J., Parham, P. 1993. HLA class I nucleotide sequences, 1992. *Immunogenetics* **37**: 239-250.



**Exon 1**  
M A V M A P R T L V L L L S G A L A L T -5  
ATGGCCGTCATGGCGCCCCGAACCCTCGTCTGCTACTCTCGGGGGCTCTGGCCCTGACC 60  
**Exon 2**  
Q T W A G S H S M R Y F F T S V S R P G 16  
CAGACCTGGGCGGGCTCTCACTCCATGAGGTATTTCTTCACATCCGTGTCCCGGCCCGGC 120  
R G E P R F I A V G Y V D D T Q F V R F 36  
CGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCAGTGGGCTACGTGGACGACACGCAGTTCGTGCGGTTTC 180  
D S D A A S Q R M E P R A P W I E Q E G 56  
GACAGCGACGCCGCGAGCCAGAGGATGGAGCCGCGGGCGCCGTGGATAGAGCAGGAGGGT 240  
P E Y W D G E T R K V K A H S Q T H R V 76  
CCGGAGTATTGGGACGGGGAGACACGGAAAGTGAAGGCCCACTCACAGACTCACCGAGTG 300  
**Exon 3**  
D L G T L R G Y Y N Q S E A G S H T V Q 96  
GACCTGGGGACCCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCCGGTTCTCACACCGTCCAG 360  
R M Y G C D V G S D W R F L R G Y H Q Y 116  
AGGATGTATGGCTGCGACGTGGGGTCCGACTGGCGCTTCTCCGCGGGTACCACCAGTAC 420  
A Y D G K D Y I A L K E D L R S W T A A 136  
GCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAAAGAGGACCTGCGCTCTTGACCGCGGGC 480  
D M A A Q T T K H K W E A A H E A E Q Q 156  
GACATGGCAGCTCAGACCACCAAGCACAAGTGGGAGGCGGCCCATGAGGCGGAGCAGCAG 540  
R A Y L E G T C V E W L R R Y L E N G K 176  
AGAGCCTACCTGGAGGGCACGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGGAGAACGGGAAG 600  
**Exon 4**  
E T L Q R T D A P K T H M T H H A V S D 196  
GAGACGCTGCAGCGCACGGACGCCCCCAAACGCATATGACTCACCACGCTGTCTCTGAC 660  
H E A T L R C W A L S F Y P A E I T L T 216  
CATGAAGCCACCCTGAGGTGCTGGGCCCCTGAGCTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGACC 720  
W Q R D G E D Q T Q D T E L V E T R P A 236  
TGGCAGCGGGATGGGGAGGACCAGACCCAGGACACGGAGCTCGTGGAGACCAGGCCTGCA 780  
G D G T F Q K W A A V V V P S G Q E Q R 256  
GGGGATGGAACCTTCCAGAAGTGGGCGGCTGTGGTGGTGCCCTCTGGACAGGAGCAGAGA 840  
**Exon 5**  
Y T C H V Q H E G L P K P L T L R W E P 276  
TACACCTGCCATGTGCAGCATGAGGGTTTGCCCAAGCCCCTCACCTGAGATGGGAGCCG 900  
S S Q P T I P I V G I I A G L V L F G A 296  
TCTTCCCAGCCCACCATCCCCATCGTGGGCATCATTGCTGGCCCTGGTTCTCTTTGGAGCT 960  
**Exon 6**  
V I T G A V V A A V M W R R K S S D R K 316  
GTGATCACTGGAGCTGTGGTCTGCTGTGATGTGGAGGAGGAAGAGCTCAGATAGAAA 1020  
**Exon 7**  
G G S Y S Q A A S S D S A Q G S D V S L 336  
GGAGGGAGCTACTCTCAGGCTGCAAGCAGTGACAGTGCCCGGGCTCTGATGTGTCTCTC 1080  
**Exon 8**  
T A C K V 341  
ACAGCTTGTAAGTGTGA 1098

**Figura 1.** Secuencia de nucleótidos y deducida de aminoácidos de A\*0213. Se indica la localización de los exones.

|                   |   |                         |
|-------------------|---|-------------------------|
| <i>HLA-A*0201</i> | TGG GAG GCG GCC CAT GTG GCG GAG CAG TTG AGA GCC | W E A A H V A E Q L R A |
| <i>HLA-A*0213</i> | --- --- --- --- --- -A- --- --- --- CA- --- --- | - - - - - E - - - Q - - |
| <i>HLA-A*0212</i> | --- --- --- --- --- --- --- --- --- CA- --- --- | - - - - - - - - - Q - - |
| <i>HLA-A*0203</i> | --- --- A-- --- --- -A- --- --- --- -G- --- --- | - - T - - E - - - W - - |
| <i>CONSENSUS</i>  | --- --- --- --- -G- --- --- --- C-- --- ---     | - - - - R - - - - - - - |

**Figura 2.** Secuencia de los subtipos de HLA-A2 relacionados con A\*0213 en la región en que A\*0213 difiere de A\*0201. Las cuatro subtipos comparados son idénticos fuera de esta región.

## 9.- APÉNDICE 2

### Equivalencia de la nomenclatura de los segmentos V usados en esta tesis con la nueva nomenclatura.

Tras la redacción de esta tesis se ha publicado la nueva nomenclatura de los segmentos V del TCR en: Arden, B., Clark, S.P., Kabelitz, D., Mak, T.W. 1995. Human T cell receptor gene segment families. *Immunogenetics* 42: 455-500. En esta tabla se muestra la nomenclatura usada en esta tesis, la nueva nomenclatura y el nombre de los CTL anti-HLA-B27 donde apareció la correspondiente segmento V.

| Segmentos V $\beta$ |                    |  |
|---------------------|--------------------|--|
| En esta tesis       | Nueva nomenclatura | CTL  |
| V $\beta$ 1         | BV1S1A1            | 18DLH  |
| V $\beta$ 1.1       | BV1S1A1N1          | 37GRK/123.8GRK   |
| V $\beta$ 2         | BV2S1              | 74GRK  |
| V $\beta$ 3         | BV3S1              | GM7, 93S15, 12SRF-37SLG, 33.8S15, 13SLG, 11.8SLG, 3.8DLH |
| V $\beta$ 4         | BV4S               | 37DCJ  |
| V $\beta$ 4         | BV4S1A1T           | 3SRF   |
| V $\beta$ 5         | BV5                | 81DCJ  |
| V $\beta$ 5.3       | BV5S2              | 62GCP/63GLM  |
| V $\beta$ 5.4       | BV5S3A3T           | 29S15  |
| V $\beta$ 6.1       | BV6S2A1N1T         | 48GLM  |
| V $\beta$ 6.4       | BS6S4A1            | 5DLL   |
| V $\beta$ 6.4       | BV6S4A3T           | 58GRK  |
| V $\beta$ 6GLPA     | BV6S5A2            | 116.8GRK   |
| V $\beta$ 7.1       | BV7S1A1N1T         | 122GRK   |
| V $\beta$ 7.2       | BV7S2A1N1T         | 7DCI   |

|            |             |  |
|------------|-------------|--|
| Vβ7H67.2   | BV7S2A2T    | 21S69, 2SRZ  |
| Vβ7IGRb18  | BV7S3A2T    | 5DCJ   |
| Vβ8.1      | BV8S1       | 11SRY/40SRY  |
| Vβ8.2      | BV8S2A1T    | 42.8GLM/71GCP, 74.8GCP                                   |
| Vβ12.3     | BV12S1A1N2  | 36DLH, 26GCP   |
| Vβ13       | BV13S1      | 15DLH  |
| Vβ13IGRb16 | BV13S6A1N2T | 17A2, 28DLH  |
| Vβ13.4     | BV13S2A2PT  | 31GRK, 29GCP/54GCP, 56GLM                                |
| Vβ14       | BV14S1      | 20.8GRK, 13SRC, 7S15/16S15,<br>33S69, 13DCJ/31DCJ, 39GLM |
| Vβ15.1     | BV15S1      | 5A2  |
| Vβ16.1     | BV16S1A1N1  | 43DCJ  |
| Vβ17.1     | BV17S1A1T   | 100GRK, 47S69, 70DCI, 12DCJ,<br>42GCP, 81GCP, 23GLM      |
| Vβ18.1     | BV18S1      | 27S69  |
| VβW22      | BV22S1A2N1T | 11DCJ, 77GCP   |

**Segmentos Vα**

| <b>En esta tesis</b> | <b>Nueva nomenclatura</b> | <b>CTL</b>                            |
|----------------------|---------------------------|---------------------------------------|
| Vα1.8                | AV1S5                     | 37DCJ                                 |
| Vα2                  | AV2S1                     | 11SRY/40SRY                           |
| Vα2.2                | AV2S1                     | 42.8GLM/71GCP                         |
| Vα2                  | AV2S2                     | 33S69                                 |
| Vα3.1                | AV3S1                     | 11.8SLG, 28DLH, 11DCJ                 |
| Vα4                  | ADV6S1A1N2T               | 17A2, 33.8S15, 47S69, 42GCP,<br>26GCP |
| Vα7.1                | AV7S1A2                   | 2SRZ                                  |
| Vα7.2                | AV7S2                     | 29S15, 27S69, 43DCJ,<br>29GCP/54GCP   |
| Vα8.1                | AV8S1A1                   | 100GRK, 13SLG, 56GLM                  |
| Vα8.2                | AV8S2                     | 12DCJ, 48GLM                          |
| Vα9.1                | AV9S1                     | 23GLM                                 |
| Vα10.1a              | AV10S1A2                  | 13SRC                                 |
| Vα11.1               | AV11S1A1T                 | 3SRF, 74.8GCP                         |
| Vα11.2               | AV11S1A2T                 | 74GRK                                 |
| Vα12.1               | AV12S1                    | 58GRK, 47S69, 77GCP                   |

---

|                     |             |  |
|---------------------|-------------|--|
| V $\alpha$ 13.1     | AV13S1      | 81DCJ  |
| V $\alpha$ 14.1     | ADV14S1     | 20.8GRK, 13DCJ/31DCJ, 7DCI                         |
| V $\alpha$ 14.37GRK | AV14S2A3T   | 5A2, 122GRK, 37GRK/123.8GRK,<br>70DCI, 5DCJ, 23GLM |
| V $\alpha$ 15.1     | AV15S1      | 3.8DLH   |
| V $\alpha$ 16.1     | AV16S1A2T   | 18DLH  |
| V $\alpha$ 16.2     | AV16S1A1T   | 74GRK  |
| V $\alpha$ 17.1     | ADV17S1A1T  | 7S15/16S15   |
| V $\alpha$ 19.1     | AV19S1      | 31GRK  |
| V $\alpha$ 20       | AV20S1      | 93S15, 21S69, 12SRF-37SLG, 5DLL                    |
| V $\alpha$ 22       | AV22S1A1N1T | GM7  |
| V $\alpha$ 24       | AV24S1      | 116.8GRK   |
| V $\alpha$ w25      | AV25S1      | 36DLH, 62GCP/63GLM, 81GCP                          |
| V $\alpha$ w29      | AV29SS1A2T  | 15DLH, 39GLM                                       |

## 10.- APÉNDICE 3

---

### Publicaciones a que ha dado lugar esta tesis.

- 1.- López, D., Barber, D.F., Villadangos, J.A., and López de Castro, J.A. 1993. Crossreactive T cell clones from unrelated individuals reveal similarities in peptide presentation between HLA-B27 and HLA-DR2. *J. Immunol.* 150: 2675-2686.
- 2.- Barber D.F., Fernandez, J.M., Guttridge, M.G., and López de Castro, J.A. 1994. Primary structure of a new HLA-A2 subtype: *HLA-A\*0213*. *Immunogenetics* 39: 378.
- 3.- Barber D.F., López, D., and López de Castro, J.A. 1995. T-cell receptor diversity in alloreactive responses against HLA-B27 (*B\*2705*) is limited by multiple-level restrictions in both  $\alpha$  and  $\beta$  chains. *Eur. J. Immunol.* 25: 2479-2485.
- 4.- Barber, D.F., Obeso, D., García-Hoyo, R., Villadangos, J.A., and López de Castro, J.A. 1996. T-cell receptor usage in alloreactivity against *HLA-B\*2703* reveals significant conservation of the antigenic structure of *B\*2705*. *Enviado*.
- 5.- Barber, D.F., and López de Castro, J.A. 1996. T-cell recognition of HLA-B27. En C. López-Larrea (ed.): *HLA-B27 and Ankylosing Spondylitis*, en prensa, R.G. Landes Co., Austin.

# Cross-Reactive T Cell Clones from Unrelated Individuals Reveal Similarities in Peptide Presentation between HLA-B27 and HLA-DR2<sup>1</sup>

Daniel López, Domingo F. Barber, José A. Villadangos, and José A. López de Castro<sup>2</sup>

Centro de Biología Molecular, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

**ABSTRACT.** HLA-B27<sup>+</sup> responder cells were stimulated *in vitro* with B\*2705<sup>+</sup> lymphoblastoid cell lines and alloreactive CTL clones were obtained by limiting dilution. Of the CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> HLA-B27-specific CTL clones obtained, two of them, possessing the same TCR, cross-reacted with HLA-DR2. The fine specificity of these CTL was established with HLA-B27 and HLA-DR2 subtypes. They recognized the B\*2701 to B\*2706 subtypes, but only DR2Dw2. Lysis of DR2<sup>+</sup> target cells was specifically inhibited by anti-CD3, anti-class II, and anti-DR mAb, but not with an anti-CD8 antibody. The monoclonal nature of the cross-reaction was established by the mutual inhibition of HLA-B27 and DR2Dw2 cells in cold target competition experiments. The DR2 protein involved in the cross-reaction was the heterodimer carrying the B5\*0101 product, as shown by using L cell transfectants expressing each of the two molecules encoded in the DR2Dw2 haplotype. A correlation between the fine specificity of these CTL clones and the amino acid sequences of HLA-B27 and HLA-DR2 subtypes revealed a shared structural motif between HLA-B27 and the DR2 B5\*0101 chain, which could be related to the observed cross-reaction. This motif was contributed for by several residues located in adjacent  $\beta$  strands, at the floor of the peptide-binding site. The contribution of two of these residues, as well as other  $\beta$ -pleated sheet residues to HLA-B27 allorecognition by the cross-reactive CTL clones was directly demonstrated with site-directed mutants. These results suggest that the dual reactivity pattern reflects presentation of identical or structurally related peptides by HLA-B27 and HLA-DR2Dw2. As T cell cross-reactivity between HLA-B27 and HLA-DR2 was previously found in cells from an unrelated individual the results reported here are likely to reflect an intrinsic property of HLA-B27, rather than the fortuitous finding of a rare clonal reaction pattern. We speculate on the potential implications of these results for the pathogeny of HLA-B27-associated spondyloarthropathies. *Journal of Immunology*, 1993, 150: 2675.

**M**HC molecules present peptides to T cells, a phenomenon that is central to the activation of specific immune responses and to the induction of self-tolerance. Class I and class II MHC proteins have a peptide-binding site with similar overall structure, which is

contributed for by the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  domains of class I, and by  $\alpha 1$  and  $\beta 1$  in class II proteins. It is a groove composed of a  $\beta$  pleated sheet floor topped by two  $\alpha$  helical segments (1-3), and its structure consists of a series of pockets that bind peptide side chains. These pockets are formed mainly by side chains from residues in the  $\alpha$  helices and  $\beta$  pleated sheet of the molecule (4, 5). MHC polymorphism modulates the specificity of peptide binding by altering the fine structure of these pockets.

In spite of their similarities, class I and class II proteins

Received for publication August 14, 1992. Accepted for publication January 6, 1993.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked advertisement in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

<sup>1</sup> This work was supported by Grants PB87/0347 and SAl 91-0428 from the Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, D. L., D. F. B., and J. A. V. are fellows of the Fundación Jiménez Díaz, Caja de Ahorros de Madrid, and Ministerio de Educación y Ciencia, respectively.

<sup>2</sup> Address correspondence and reprint requests to Dr. José A. López de Castro, Centro de Biología Molecular, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco 28049 Madrid, Spain.

differ in the size and cellular origin of the peptides they bind. Most of the peptides bound to class I molecules are 8–10 residues long (6–8), whereas those bound to class II are longer and more heterogeneous in size (9). In addition, class I molecules bind peptides derived from endogenously synthesized proteins, which are degraded in the cytosol or in the endoplasmic reticulum. Such binding is critical for stability, transport, and cell-surface expression of the class I molecules (10–14). Class II proteins can also bind some peptides of this origin, but more frequently they bind those derived from exogenous proteins, which are degraded in the endocytic pathway (15). These differences in the mechanisms of peptide uptake correspond to the functional dichotomy, in which class I molecules present peptides from intracellular Ag to CTL, leading to lysis of infected or otherwise modified target cells, whereas class II proteins activate Th cells, which stimulate antibody production to extracellular Ag. However, CTL can also be generated against class II Ag.

A particular class I Ag can present many different peptides (16, 17). In spite of their heterogeneity, these peptides share structural motifs that are specific for each MHC protein (7, 8). Much evidence suggests that alloreactive T cells, which are activated in response to cells expressing allogeneic MHC molecules, recognize MHC-bound peptides. However, alloreactive T cells can also recognize as foreign structural features of the alloantigen molecule itself. The relative contribution of the peptide and the MHC molecule to allospecific epitopes may be variable, and may depend on the particular CTL (18).

Alloreactive T cells can be specific for the stimulator alloantigen, but T cells cross-reacting with other alloantigens are also found. The frequency of cross-reactive CTL in a particular T cell response depends strongly upon individual differences among responder donors (19). T cell cross-reactivity usually involves alloantigens from the same MHC locus, which correlates with their higher structural similarity, as compared with those from other MHC loci.

T cells specific for either class I or class II MHC Ag use the same TCR genes, suggesting that the mechanism of Ag recognition is similar in both systems. However, cross-reactive CTL showing dual recognition of class I and class II Ag have very seldom been found (20, 21). The frequency of this type of cross-reactivity is difficult to assess because of the requirement that cross-reactive CD8<sup>+</sup> CTL be sufficiently reactive against the class II target in the absence of CD4. We have previously reported three CTL clones raised against B\*2705 from a single individual, which were cross-reactive with HLA-DR2 and showed identical fine specificity patterns (21). Here we show that anti-B\*2705 CTL raised from an unrelated individual, again cross-react with HLA-DR2. The fine specificity of these CTL differs from those previously reported, but the cross-reaction in-

volves the same serologic specificities. The recurrent finding of T cells cross-reacting between HLA-B27 and HLA-DR2 suggests that these two Ag can present some identical or structurally related peptides. A structural motif shared by HLA-B27 and HLA-DR2 proteins was identified in the peptide-binding site. It is suggested that this may be related to similarities in peptide presentation between these Ag.

## Materials and Methods

### Cell lines and HLA-B27 mutants

Mycoplasma-free human LCL, used as stimulators in MLC and as target cells were cultured without antibiotics as previously described (21). Generation of site-directed mutants and their corresponding transfectants into the human class I-deficient cell line HMy2.C1R, as well as culture conditions for these cells, were described elsewhere (22). The following cell lines (a gift of Dr. Dolores Jaraquemada, Badalona, Spain) were also used: DAP-3 is a subline of murine L fibroblasts; 5B.6 and 3B.4 are DAP-3 transfectants expressing the DR2Dw2 B5\*0101 and B1\*1501 products, respectively; 5B.6 21 and 3B4 F10 were derived from 5B.6 and 3B.4, respectively, by co-transfection with the human ICAM-1 gene, and express ICAM-1 in addition to the corresponding DR2Dw2 product. These cell lines and their culture conditions were previously described (23). The DR2<sup>+</sup> ICAM-1 transfectants are described in full detail in a more recent report.<sup>3</sup>

### mAb and FMF analysis

The anti-HLA mAb used in this study were W6/32 (anti-HLA class I monomorphic determinant) (24), ME1 (anti-HLA-B27 + B7 + Bw22) (25), EDU-1 (anti-HLA class II monomorphic determinant) (26), L243 (HB55, anti-HLA-DR monomorphic determinant) (27), Genox 3.53 (anti-HLA-DQ1) (28), and B7.21 (anti-HLA-DP monomorphic determinant) (29). They were used at 1/300 dilution of ascitic fluid except EDU-1, which was used at 1/900 dilution.

Phenotyping of T cells by FMF analysis was carried out as previously described (21), except that 1/300 dilutions of ascitic fluid were used for the anti-CD3 (SPV-T3b), -CD4 (HP2/6), and -CD8 (B9/4) mAb (30–32).

### CTL clones and cytotoxicity assays

The anti-HLA-B27 CTL 37GRK and 123GRK were isolated after stimulation of PBMC from donor GM (HLA A1 24; B7, 8; Cw7) with the LCL R69 (HLA-A3, 24; B\*2705; DR3, 5), cloning by limiting dilution, and selectiv-

<sup>3</sup> Jaraquemada, D., M. Martí, R. Martí, A. Wagner, H. F. McFarland, and Rosen-Bronson. Influence of ICAM-1/LFA-1 adhesion in self-restricted antigen recognition and allorecognition by class II-specific T cell clones. Submitted for publication.



Table I  
Fine specificity of CTL 37GRK with HLA-DR2: panel analysis<sup>a</sup>

| Target            | HLA    |          |      |      |      |    | E:T Ratio |         |
|-------------------|--------|----------|------|------|------|----|-----------|---------|
|                   | A      | B        | Cw   | DR   | Dw   | DQ | 4:1       | 1:1     |
| LG15 <sup>b</sup> | 32     | *2705    | 2    | 1    |      |    | 63 (6)    | 41 (2)  |
| R69 <sup>b</sup>  | 3, 24  | *2705, 7 |      | 3, 5 |      |    | 60 (18)   | 45 (11) |
| HOM1              | 3      | 7        | 7    | 2    | 2    | 1  | 29 (2)    | 19 (4)  |
| BBF               | 1      | 37       | 2    | 2    | 2    | 1  | 30 (7)    | 24 (4)  |
| KT7               | 11, 24 | 52       |      | 2    | 12   | 1  | 2 (1)     | 0 (1)   |
| TOK               | 24     | 52       |      | 2    | 12   | 1  | 3 (2)     | 1 (2)   |
| FJO               | 2, 3   | 7, 16    |      | 2    | 21   | 1  | 7 (3)     | 7 (3)   |
| BAS               | 2      | 51       |      | 2    | 22   | 3  | 4 (2)     | 2 (2)   |
| 12w9              | 2, 26  | 57, 66   | 6    | 2    | 22   |    | 0 (3)     | 0 (2)   |
| TTL               | 11, 33 | 51, 54   | 1, 3 | 2, 6 | 2, - | 1  | 23 (12)   | 13 (5)  |
| VIV               | 2, 3   | 35, 44   |      | 1, 2 | 1, 2 | 1  | 6 (2)     | 3 (1)   |
| JY                | 2      | 7        |      | 4, 6 |      |    | 4 (3)     | 0 (1)   |
| LB                | 28     | 60       | 3    | 6    |      |    | 0 (2)     | 0 (2)   |
| SWEIG             | 29     | *4002    | 2    | 11   |      | 7  | 8 (4)     | 3 (4)   |
| VEN               | 3, 31  | 18, 55   | 3, 5 |      |      |    | 3 (2)     | 6 (2)   |
| VOO               | 1, 3   | 8, 56    | 1    |      |      |    | 6 (4)     | 4 (4)   |
| WT49              | 2      | 17       |      | 3    | 3    | 2  | 4 (1)     | ND      |

<sup>a</sup> Data are expressed as % specific <sup>51</sup>Cr-release and are mean values of the number of experiments given in parentheses. Positive cytotoxicity values ( $\geq 15\%$  at the highest E:T ratio) are italicized.

<sup>b</sup> Lysis of LG15 and R69 reflects the anti-HLA-B27 reactivity of this CTL clone (33). These data are included as a control.

by their capacity to lyse B\*2705<sup>+</sup> transfectant HMy2.C1R cells, but not the same untransfected cells. The procedure was detailed in a previous report (33).

CTL 37GRK was CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup>. CTL 123GRK initially contained a mixed population of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells. The CD4<sup>+</sup> population was removed by culture in the presence of a different B\*2705<sup>+</sup> LCL, LG15 (HLA-A32; B\*2705; Cw2; DR1), and of the anti-CD4 mAb HP2/6 (1/100 dilution of ascitic fluid). The final phenotype of the cells was CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup>, and it remained stable. They were renamed CTL 123.8GRK.

Growth of T cell clones with 20 IU/ml of rIL-2 (a gift of Hoffmann-La Roche, Nutley, NJ), <sup>51</sup>Cr-release cytotoxicity, mAb blocking, and cold target inhibition assays were performed as previously described (21).

#### PCR<sup>4</sup> and sequencing of TCR cDNA

Isolation of RNA, generation of TCR- $\alpha$  and - $\beta$  cDNA, specific PCR amplification using C $\alpha$ -, C $\beta$ -, V $\alpha$  family-, and V $\beta$  family-specific primers, and sequencing of amplified cDNA was carried out as previously described (34, 35).

## Results

### Fine specificity of CTL 37GRK and 123.8GRK

In a previous study, CTL 37GRK was shown to lyse target cells expressing any of the B\*2701 to B\*2706 subtypes.

Lysis was mediated by HLA-B27 in all cases, as demonstrated by specific blocking of the cytotoxicity with the ME1 mAb (33). In that study, lysis of the HLA-B27<sup>-</sup> target TTL (HLA-A11, 33; B51, 54; Cw1, w3; DR2, 6) was also observed. This was not significantly inhibited by the W6/32 or ME1 mAb; it was totally blocked by the anti-class II mAb EDU-1 and the anti-DR mAb L243, and not by anti-DP or anti-DQ1 mAb (data not shown).

The possibility that CTL 37GRK could have an additional class II-directed reactivity was addressed by cytotoxicity testing with a panel of LCL, including those expressing the known HLA-DR2 subtypes (Table I). Homozygous cells expressing Dw2, but not those expressing other DR2 subtypes, were lysed. Of 2 Dw2<sup>+</sup> heterozygous LCL tested, TTL but not VIV, was lysed. However, the latter partially inhibited lysis of homozygous DR2<sup>+</sup> cells in cold target competition assays (see below). These results strongly suggest that the anti-HLA-B27 CTL 37GRK specifically cross-reacts with DR2Dw2. Two subclones derived from CTL 37GRK by limiting dilution that were analyzed retained the same dual reaction pattern (data not shown), further suggesting that this was mediated by one single T cell clone.

Fine specificity analysis of CTL 123.8GRK (Table II) showed a reactivity pattern with HLA-B27 subtypes identical to that previously described for CTL 37GRK (33), although specific lysis was consistently less efficient with all target cells. CTL 123.8GRK did not lyse the DR2Dw2 cells that were killed by CTL 37GRK.

<sup>4</sup> Abbreviations used in this paper: PCR, polymerase chain reaction.

Table II  
Fine specificity of CTL 123.8GRK: panel analysis<sup>a</sup>

| Target | HLA    |              |      |       | E:T Ratio <sup>b</sup> |        |
|--------|--------|--------------|------|-------|------------------------|--------|
|        | A      | B            | Cw   | DR    | 4:1                    | 1:1    |
| LG15   | 32     | *2705        | 2    | 1     | 30 (60)                | 21 (1) |
| R69    | 3, 24  | *2705, 7     |      | 3, 5  | 34 (7)                 | 19 (6) |
| R15    | 3      | *2705, 35    | 1, 4 | 1     | 49 (3)                 | 33 (3) |
| LH     | 24     | *2701, 8     | 1, 7 | 3, 4  | 29 (5)                 | 17 (5) |
| R34    | 2, 24  | *2702, 18    | 2, 5 | 3, 5  | 42 (4)                 | 21 (4) |
| CHR    | 2, 3   | *2702, 35    | 6    | 2, 7  | 37 (2)                 | 50 (1) |
| R56    | 2, 11  | *2702, 14    |      |       | 59 (4)                 | 46 (4) |
| NW     |        | *2702, 8     |      |       | 44 (1)                 | 41 (1) |
| CH     | 31, 32 | *2703, 18    | 2, 7 | 8, 11 | 19 (2)                 | 11 (1) |
| LAR    | 23, 31 | *2703, 53    | 2, 4 |       | 35 (4)                 | 20 (4) |
| R42    | 2, 9   | *2704, *2706 |      |       | 21 (3)                 | 11 (2) |
| WEI    | 11, 24 | *2704, 62    | 2, 4 | 2     | 30 (5)                 | 18 (4) |
| JSL    | 11     | *2704, 48    | 6    | 2     | 17 (2)                 | ND     |
| KNE    | 1, 2   | *2704, 8     |      | 2, 3  | 38 (2)                 | 19 (1) |
| SIA    | 2, 24  | *2704, 60    | 4    | 3, 5  | ND                     | 22 (1) |
| LIE    | 2, 11  | *2706, 5     |      | 12    | 15 (2)                 | 20 (2) |
| PAR    | 11, 24 | *2706, 60    |      | 2, 11 | 35 (5)                 | 22 (5) |
| HOM-1  | 3      | 7            | 7    | 2     | 2 (2)                  | ND     |
| TTL    | 11, 33 | 51, 54       | 1, 3 | 2, 6  | 2 (3)                  | 0 (1)  |
| JY     | 2      | 7            |      | 4, 6  | 0 (3)                  | ND     |
| LB     | 28     | 60           | 3    | 6     | 0 (1)                  | 0 (1)  |
| SWEIG  | 29     | *4002        | 2    | 11    | 1 (1)                  | 0 (1)  |
| VEN    | 3, 31  | 18, 55       | 3, 5 |       | 0 (1)                  | ND     |
| VOO    | 1, 3   | 8, 56        | 1    |       | 3 (1)                  | 5 (1)  |
| FJO    | 2, 3   | 7, 16        |      | 2     | 0 (1)                  | 0 (1)  |

<sup>a</sup> Data are expressed as % specific <sup>51</sup>Cr-release, and are mean values of the number of experiments given in parentheses.  
<sup>b</sup> Positive cytotoxicity values ( $\geq 15\%$  at the highest E:T ratio) are italicized.

### mAb inhibition analysis

The cytotoxicity of CTL 37GRK toward LCL HOM-1 (HLA-B27<sup>-</sup>, DR2Dw2<sup>+</sup>) was assayed in the presence of anti-HLA mAb (Fig. 1A). Lysis of this target cell was totally inhibited by the anti-class II monomorphic antibody EDU-1 and by the anti-DR mAb L243 (HB55), and was not inhibited by W6/32, anti-DQ1, or anti-DP mAb. This demonstrates that CTL 37GRK recognizes HLA-Dw2, as suggested by the panel analysis.

The role of CD3 and CD8 in the cytotoxicity of CTL 37GRK was also examined by mAb blocking analysis (Fig. 1B). Blocking of HLA-B27<sup>+</sup> targets by anti-CD3 mAb was somewhat heterogeneous depending on the subtype, ranging from total blocking of lysis with B\*2701<sup>+</sup>, B\*2703<sup>+</sup>, and B\*2705<sup>+</sup> cells to no inhibition with B\*2704<sup>+</sup> cells. This is in agreement with cold target competition data showing that B\*2704<sup>+</sup> cells are the most efficient inhibitors of the lysis of B\*2705<sup>+</sup> cells (33). Lysis of DR2<sup>+</sup> targets was totally inhibited by anti-CD3 mAb.

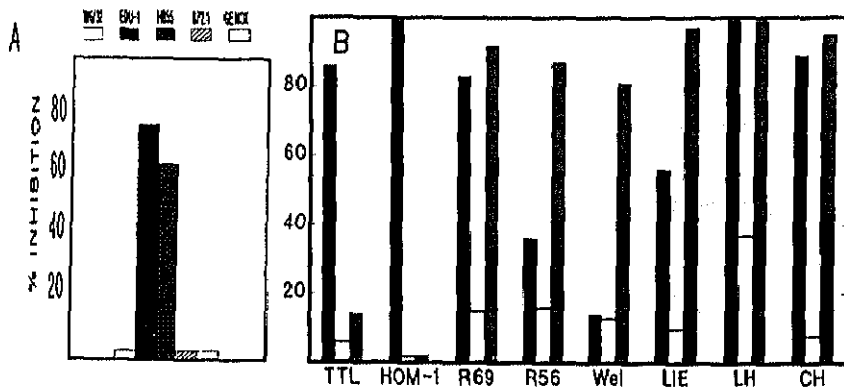
The anti-CD8 mAb B9/4 inhibited lysis of all HLA-B27<sup>+</sup> targets, having no effect on lysis of DR2<sup>+</sup> cells. Thus, CD8 is required for the HLA-B27-directed, but not for the

class II-directed lysis of CTL 37GRK. This result is fully consistent with the dual reactivity of this CTL clone toward HLA-B27 and -DR2 Ag, as shown by panel and anti-HLA mAb blocking analyses.

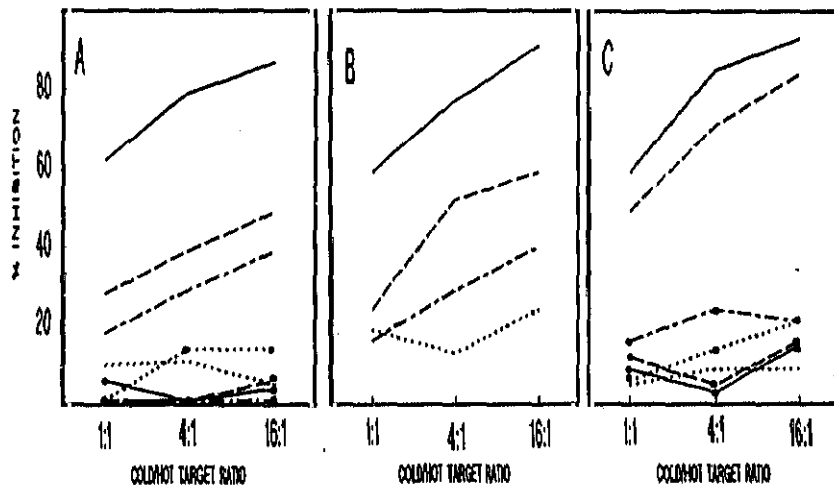
The cytotoxicity of CTL 123.8GRK toward target cells expressing the B\*2701 to B\*2706 subtypes was blocked by anti-HLA-B27 and anti-CD8 mAb, but not by the anti-class II mAb EDU-1 (data not shown).

Dual reactivity of CTL 37GRK is mediated by a single cell population

Cold target competition experiments between HLA-B27<sup>+</sup> and HLA-DR2<sup>+</sup> cells (Fig. 2) were carried out to demonstrate that the dual reactivity pattern exhibited by CTL 37GRK was not caused by an additional cell population putatively responsible for the class II-directed cytotoxicity. Lysis of hot R69 (B\*2705<sup>+</sup>) cells was partially but significantly inhibited by two DR2Dw2<sup>+</sup> targets (Fig. 2A) including the heterozygous LCL VIV, which was not lysed in direct cytotoxicity assays. This inhibition was specific, as DR2<sup>+</sup>Dw2<sup>-</sup> cells did not block lysis. In the complementary experiment (Fig. 2B), lysis of hot BB



**FIGURE 1.** *A*, inhibition of the cytotoxicity of CTL 37GRK toward the LCL HOM-1 (HLA-A3; B7; Cw3; DR2Dw2; DQ1) by the anti-HLA mAb W6/32, EDU-1, HB55 (L243), B7.21, and Genox 3.53 (see *Materials and Methods* for specificity of these mAb). Data are means of two experiments at an E:T ratio of 1:1. Specific  $^{51}\text{Cr}$ -release of HOM-1 in the absence of mAb at this E:T ratio was 16%. *B*, inhibition of the cytotoxicity of CTL 37GRK toward the specified target LCL (see Tables I and II for HLA types) by anti-CD3 (black bars), anti-CD4 (white bars), and anti-CD8 (hatched bars) mAb. Data were obtained at an E:T ratio of 4:1. Specific  $^{51}\text{Cr}$  release for each of the target cells in the absence of mAb was: 36% (TTL: Dw2<sup>+</sup>), 22% (HOM-1: Dw2<sup>+</sup>), 84% (R69: B\*2705<sup>+</sup>), 89% (R56: B\*2702<sup>+</sup>), 83% (Wel: B\*2704<sup>+</sup>), 87% (LIE: B\*2706<sup>+</sup>), 27% (LH: B\*2701<sup>+</sup>), and 62% (CH: B\*2703<sup>+</sup>).



**FIGURE 2.** Cold target inhibition analysis of the cytotoxicity of CTL 37GRK (*A* and *B*) and 123.8GRK (*C*) toward HLA-B27<sup>+</sup> or DR2<sup>+</sup> cells. Hot target cells and their  $^{51}\text{Cr}$ -specific release by the corresponding CTL at an E:T ratio of 4:1 in the absence of competing cold cells were: *A*, R69 (B\*2705), 54%; *B*, BBF (DR2Dw2), 40%; *C*, LG15 (B\*2705), 38%. Cold target cells in *A* and *B* were: R69 (—), BBF (---), VIV (· — · —), JY (·····), KT7 (● — — ●), FJO (● — ● — ●), I2w9 (● — ● — ●), and BAS (● — ● — ●). JY (B27<sup>-</sup>, DR2<sup>-</sup>) was used as negative control. Cold target cells in *C* were as in *A* and *B* except that LG15 (—), and HOM-1 (---) were used instead R69 and BBF, respectively. For complete HLA types see Tables I and II. Data are mean values of five (*A*), four (*B*), and eight (*C*) experiments.

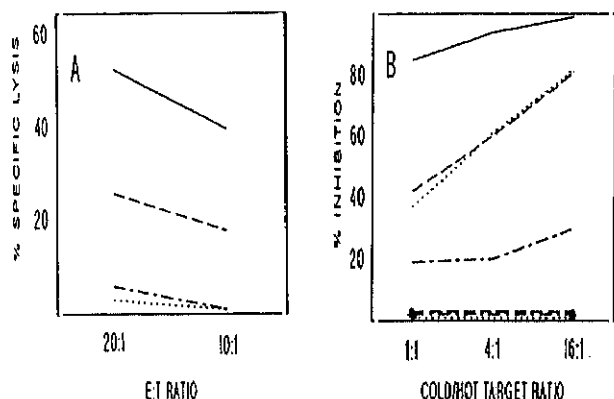
(DR2Dw2<sup>+</sup>) cells was inhibited by R69 much more efficiently than by cold BBF or VIV cells. These results indicate that the dual reactivity of CTL 37GRK toward HLA-B27 and HLA-DR2 is mediated by the same cell population.

#### CTL 37GRK recognizes the DR2Dw2 B5 product

To determine whether the DR2 molecule recognized by CTL 37GRK was the B5\*0101 or the B1\*1501 product, murine L cell transfectants expressing each of these molecules plus human ICAM-1 were used as target cells in

direct cytotoxicity assays. As L cells are relatively inefficient targets, a higher E:T ratio than in other experiments involving human target cells was used. The results (Fig. 3*A*) indicate that the transfectants expressing the Dw2 B5 product, 5B6 21, but not those expressing the B1 product, were lysed. Lysis of the 5B6 21 cells was specifically inhibited with the anti-DR mAb L243 (data not shown).

This result was further substantiated by cold target inhibition assays in which the HLA-B27<sup>+</sup> R69 LCL was used as hot target cell. As shown in Figure 3*B*, lysis of the HLA-B27<sup>+</sup> cells was inhibited with the 5B6 21 (B5 + ICAM-1)



**FIGURE 3.** A, cytotoxicity of CTL 37GRK against HOM-1 (DR2Dw2) (—), 5B6 21 (B5\*0101+ICAM-1) (---), 3B4 F10 (B1\*1501+ICAM-1) (— · —), and DAP-3 (untransfected L cells) (·····). Data are expressed as percent specific  $^{51}\text{Cr}$ -release and are mean values of two experiments. B, cold target inhibition analysis of the cytotoxicity of CTL 37GRK toward hot R69 (HLA-B27<sup>+</sup>) target cells. Cold target cells were: R69 (—), HOM-1 (---), 5B6 21 (·····), 5B6 (B5\*0101) (— · —), 3B4 F10 (●··●), 3B4 (B1\*1501) (●-·-●), and DAP-3 (●-●-●). Specific cytotoxicity of the hot R69 cells at the E:T ratio used of 2:1 in the absence of competing cells was 84%. Data are mean values of two experiments.

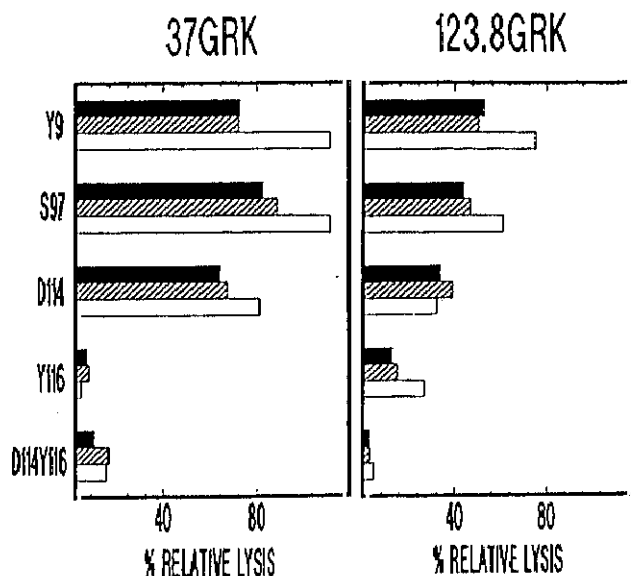
cells as efficiently as with the DR2Dw2<sup>+</sup> LCL HOM-1. It was less efficiently inhibited with the 5B.6 target, lacking ICAM-1. The 3B4 (B1) transfectants did not show any inhibitory capacity, regardless of their expression of ICAM-1.

#### Dual reactivity of CTL 123.8GRK revealed by cold target competition analysis

The possibility that CTL 123.8GRK would recognize DR2 Ag, although this was not revealed by direct cytotoxicity assays, was raised from its similar reaction pattern to CTL 37GRK with HLA-B27 subtypes. This was tested by cold target inhibition experiments in which lysis of hot LG15 (B\*2705<sup>+</sup>) cells was measured in the presence of cold target cells expressing the various DR2 subtypes. As shown in Figure 2C, HOM-1 (DR2Dw2<sup>+</sup>) cells inhibited very efficiently hot target lysis, whereas cells expressing other DR2 subtypes showed no inhibitory effect. That the inhibition by HOM-1 was caused by HLA-DR2 is indicated by the fact that FJO (DR2Dw21), which share other HLA Ag with HOM-1 (see Table I) did not inhibit hot target cell lysis in these assays. This result indicates that CTL 123.8GRK recognizes HLA-B27 and -DR2 with the same fine specificity as CTL 37GRK.

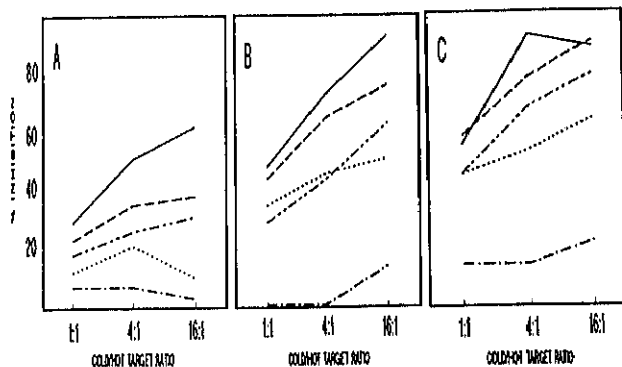
#### Recognition of HLA-B27 $\beta$ pleated sheet mutants by CTL 37GRK and 123.8GRK

We have previously shown that multiple mutations in the  $\alpha$  helices of HLA-B27 had no effect on lysis by CTL



**FIGURE 4.** Cytotoxicity of CTL 37GRK and 123.8GRK against HMy2.C1R transfectants expressing HLA-B27 mutants. Results are expressed as the percentage of relative lysis, in which the lysis of each target cell is referred to the specific lysis of the B\*2705<sup>+</sup> HMy2.C1R transfectant at the same E:T ratio. Data are means of at least eight experiments with CTL 37GRK and at least two experiments with 123.8GRK. Results were obtained at 2:1 (black bars), 1:1 (hatched bars), and 0.5:1 (white bars) E:T ratios. The percent specific lysis of the B\*2705<sup>+</sup> transfectant with CTL 37GRK was 60% (E:T ratio 2:1), 44% (1:1) and 27% (0.5:1), and with 123.8GRK was 39% (2:1), 30% (1:1), and 22% (0.5:1). Percent lysis of the HMy2.C1R cells transfected only with pSV2neo, used as negative control, was 1% in all experiments.

37GRK, but changes at positions 163 and 167 abrogated lysis (33). Because of the accessibility of these two positions, it was not possible to exclude that their effect was caused by altering direct TCR contacts with the HLA-B27 molecule. Thus, the effect of mutations in the  $\beta$ -pleated sheet floor of the peptide-binding site on recognition by CTL 37GRK was examined. The single mutants Y9 (H $\rightarrow$ Y), S97 (N $\rightarrow$ S), D114 (H $\rightarrow$ D), and Y116 (D $\rightarrow$ Y), as well as the double D114Y116 mutant, were used in this study. They were separately transfected into HMy2.C1R cells, and transfectants expressing high levels of HLA-B27 by FMF analysis were used as target cells. As shown in Figure 4, lysis of Y9, S97, and D114 transfectants by CTL 37GRK was comparable to or slightly lower than that of the wild type. In contrast, lysis of the Y116 and D114Y116 mutants was totally abrogated. CTL 123.8GRK showed a similar reaction pattern with these mutants, but lysis of Y9, S97, and D114 was more significantly decreased. The effect of some of these mutations on recognition by CTL 37GRK was more closely examined by cold target inhibition experiments (Fig. 5). S97 and D114 targets inhibited the lysis of hot B\*2705<sup>+</sup> transfectants less efficiently than cold B\*2705<sup>+</sup> cells (Fig. 5A). Thus, these mutations affect to



**FIGURE 5.** Cold target inhibition of the cytotoxicity of CTL 37GRK with HLA-B27 mutants. Hot target cells were HMy2. C1R transfectants expressing B\*2705 (A), S97 (B), and D114 (C). Specific  $^{51}\text{Cr}$ -release of the hot target cells at the E:T ratio 4:1 used, in the absence of competing cold cells was 77%, 42%, and 39% respectively. Cold target cells were HMy2. C1R transfectants expressing B\*2705 (—), S97 (---), D114 (- · - · -), Y116 (·····), and pSV2neo (- · - · -) used as negative control. Data are means from two experiments.

some extent CTL interaction. Figures 4B and 4C show that Y116 targets inhibited the lysis of hot S97 and D114 cells significantly above HLA-B27<sup>-</sup> cells. This result indicates that recognition of Y116 by CTL 37GRK was not totally abrogated, in spite of the observed lack of killing of this mutant (Fig. 4). Because of their location in the floor of the peptide binding groove, these results strongly suggest that the effects of the  $\beta$  pleated sheet mutants on recognition by CTL 37GRK and 123.8GRK are through altering peptide presentation.

CTL 37GRK and 123.8GRK use apparently identical TCR and share structural motifs at the  $\beta$ -chain junctional regions with other anti-DR2 TCR

TCR- $\alpha$  and  $\beta$ -chain cDNA was independently obtained from CTL 37GRK and 123.8GRK, using  $\text{C}\alpha$ - or  $\text{C}\beta$ -specific primers for specific reverse transcription. cDNA amplification was carried out using, in parallel reactions, one of a set of  $\text{V}\alpha$  or  $\text{V}\beta$  family-specific primers, and the same  $\text{C}\alpha$ - or  $\text{C}\beta$ -specific primer. As shown in Figure 6A, cDNA from both CTL clones was amplified only with  $\text{V}\beta 1$ - and with  $\text{V}\alpha 14$ -specific primers. Partial V and complete junctional and J segment sequences were determined from all amplified transcripts (Fig. 6B). Sequencing confirmed the results from PCR typing concerning the V segments used and further indicated that the  $\alpha$  and  $\beta$  transcripts from both CTL clones were correctly rearranged and identical over the obtained sequences. Although identity of the V segments is inferred from the partial sequences determined, identity at the junctional regions and J segments indicate that CTL 37GRK and 123.8GRK use identical TCR. The  $\alpha$ -chain included a new  $\text{V}\alpha 14$  member, first found in this and other CTL from the same individual and the  $\text{J}\alpha\text{IGRJ}\alpha 06$

segment (36) in a rearranged form which is longer than previously reported. The  $\beta$ -chain consisted of  $\text{V}\beta 1.1$ ,  $\text{D}\beta 1.1$ ,  $\text{J}\beta 1.1$ , and  $\text{C}\beta 1$ .

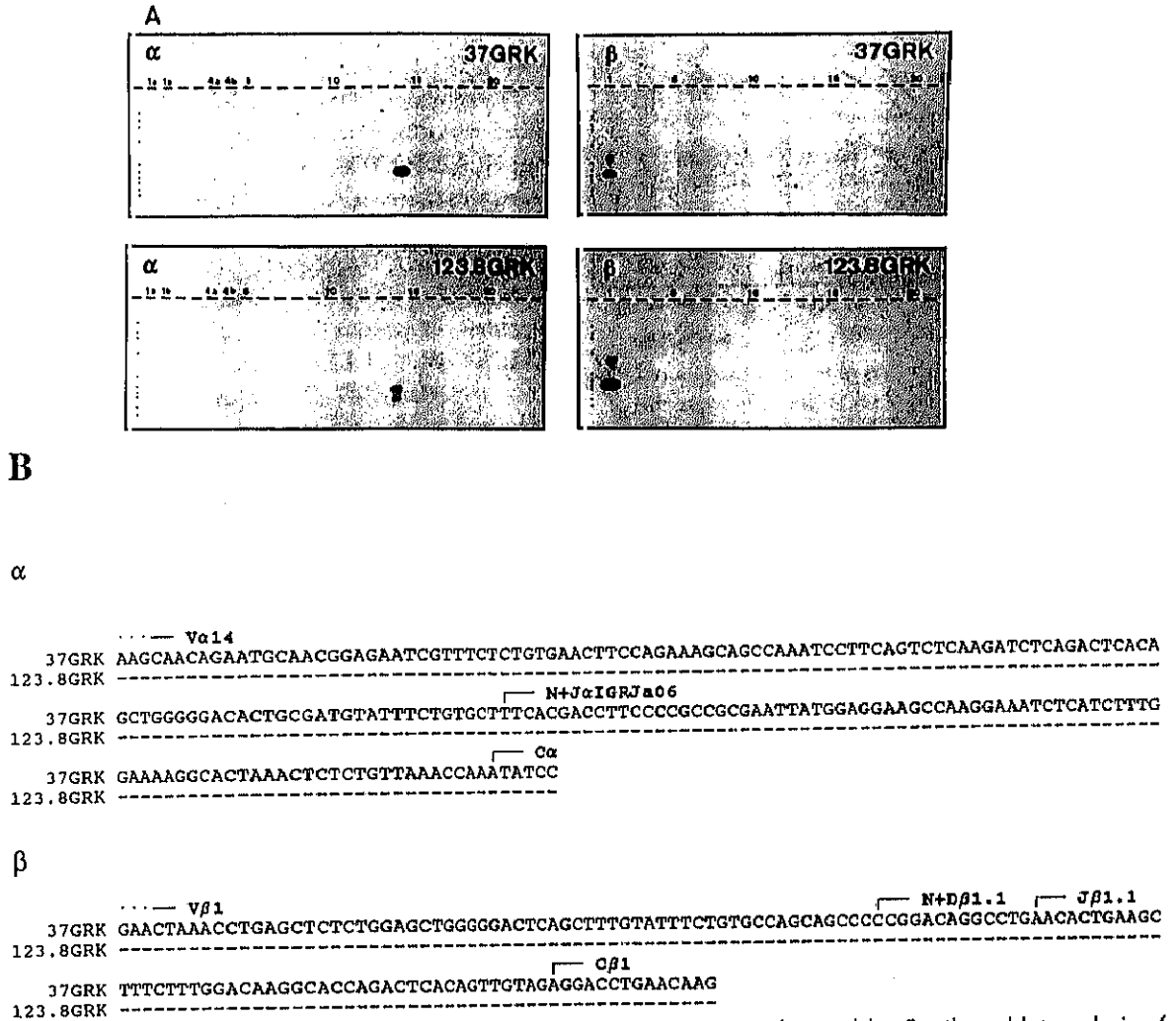
The sequence of the  $\beta$ -chain junctional region was compared with the corresponding sequences from two other anti-HLA-DR2 TCR (37). As shown in Table III, the three sequences share an Arg residue in the junctional region and an Asn residue at the  $\text{J}\beta$  N terminus. In addition, the sequences from CTL 37GRK and 123.8GRK share with the C04 anti-DR2 TCR Pro and Leu at the  $\text{V}\beta$ - $\text{D}\beta$  and  $\text{D}\beta$ - $\text{J}\beta$  junctions, respectively. This later residue was unique to CTL 37GRK and 123.8GRK among all of the sequences from anti-HLA-B27 CTL clones whose TCR have been examined in our laboratory (34, 35). CTL 37GRK and 123.8GRK also use the same  $\text{J}\beta$  segment as C04 rearranged in an identical way.

## Discussion

The results in this report demonstrate that HLA-B27 has T cell epitopes in common with HLA-DR2. The dual reactivity described is unlikely to represent a fortuitous finding of an unusual clonotypic pattern, as cross-reaction of anti-HLA-B27 CTL with HLA-DR2 was reported previously from our laboratory (21). In that study three identical CTL clones with such dual reactivity were derived against B\*2705 from an individual who was unrelated to the donor from whom CTL 37GRK and 123.8GRK were obtained. Their fine specificity with HLA-B27 and HLA-DR2 subtypes was different from that of CTL 37GRK and 123.8GRK. They recognized only B\*2705 and all DR2 subtypes except Dw12. In contrast, the CTL reported here recognize the B\*2701 to B\*2706 subtypes but only DR2Dw2. Thus, although the cross-reactive epitopes recognized by the CTL from the two donors are different, they involve the same class I and class II serologic specificities.

As in that earlier study (21), class II directed lysis by the cross-reactive CTL was independent of CD8, although this molecule was required for lysis of HLA-B27<sup>+</sup> target cells. This implies a greater contribution of the TCR to the overall avidity of the CTL clone for the HLA-DR2<sup>+</sup> targets relative to HLA-B27<sup>+</sup> targets. Indeed, that anti-CD3 mAb blocked lysis of DR2<sup>+</sup> cells more efficiently than the lysis of some of the HLA-B27<sup>+</sup> targets is probably related to the additional contribution of CD8 to avidity in the class I-directed lysis by this CTL.

It is striking that, both earlier (21) and in this study, the dual reactivity was found in various CTL clones of identical fine specificity, among a limited number of anti-B27 CTL analyzed. Now, we have also shown that CTL 37GRK and 123.8GRK have apparently identical TCR, probably representing the same clonotype picked up twice after limiting dilution. This could simply be a consequence of overgrowth of the particular clonotype in the bulk culture before clon-



**FIGURE 6.** A, V $\alpha$  and V $\beta$  segments used by CTL 37GRK and 123.8GRK, as detected by Southern blot analysis of PCR-amplified TCR cDNA. For each clone, cDNA aliquots were subjected to PCR using V $\alpha$  or V $\beta$  family-specific primers and C $\alpha$ - or C $\beta$ -specific primers (see *Materials and Methods*). Amplified material was hybridized with <sup>32</sup>P-labeled C $\alpha$ - or C $\beta$ -specific oligonucleotides. Thus, the location of radioactive spots indicate the V subfamilies used by the T cell clones. Dots at both sides of each autoradiogram correspond to m.w. markers (1-kb DNA ladder, Bethesda Research Laboratories, Bethesda, MD) of 2,036, 1,635, 1,016, 516/506, 394, 344, 298, 220, and 200 bp, respectively. B, nucleotide sequence of TCR- $\alpha$  and - $\beta$  cDNA from CTL 37GRK and 123.8GRK. V $\alpha$  segment sequences encompass 210 and 120 bp respectively, although only the length available for comparison between both sequences is shown. N + J $\alpha$  and C $\alpha$  segment boundaries are marked. The complete sequence of the V $\beta$ 1.1 segment from CTL 37GRK has been determined (not shown) and is compared with the portion sequenced from CTL 123.8GRK. N + D $\beta$ , J $\beta$ , and C $\beta$  boundaries are marked. The TCR- $\alpha$  and - $\beta$  sequences have been submitted to the GenBank nucleotide sequence database and have been assigned accession numbers M95394 and LO7294.

ing, but it might also reflect a relatively high CTL precursor frequency for such cross-reactive epitope in the corresponding donors. Why the lytic efficiencies of CTL 37GRK and 123.8GRK are different is not clear. We have not provided formal proof of structural identity over the whole V $\alpha$  and V $\beta$  segment sequences, but it is very unlikely that changes are to be found in the portions that were not sequenced. Indeed, this would imply that different V segments, belonging, however, to the same subfamily, rearranged in an identical way in both CTL clones, generating the same junctional regions. It is possible that the two CTL

clones differ either in the surface expression of some molecules involved in target cell interaction, which would influence avidity, or in the efficiency of their signal transduction pathways or lytic machineries. Both CTL clones showed similar expression levels of CD3 and CD8 upon FMF analysis (not shown), but other possibilities were not addressed.

The recurrent finding of CTL with dual reactivity for HLA-B27 and -DR2 makes it important to define a possible molecular basis for such cross-reaction. A correlation of the structure of HLA-B27 and HLA-DR2 subtypes with the

Table III  
TCR  $\beta$ -chain junctional regions from CTL 37GRK, 123.8GRK, and anti-DR2 T cells<sup>a</sup>

| T Cell Clone    | V $\beta$ |     | V $\beta$ |     | N-D $\beta$ -N |     | J $\beta$ |     | D $\beta$ |     |     |     |     |     |
|-----------------|-----------|-----|-----------|-----|----------------|-----|-----------|-----|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|
|                 |           |     |           |     |                |     |           |     |           |     |     |     |     |     |
| 37GRK, 123.8GRK | 1.1       | C   | A         | S   | S              | P   | R         | T   | G         | L   | N   | T   | E   | A   |
|                 |           | TGT | GCC       | AGC | AGC            | CCC | CGG       | ACA | GGC       | C-- | -TG | AAC | ACT | GAA |
| T1005UBO03C04   | 8.2       | C   | A         | S   | S              | P   | R         | Y   | T         | L   | N   | T   | E   | A   |
|                 |           | TGT | GCC       | AGC | AGT            | CCC | CGG       | TAC | ACC       | T-- | -TG | AAC | ACT | GAA |
| T1005UBO03C16   | 8.2       | C   | A         | S   | S              | P   | R         | Q   | G         | G   | N   | S   | P   | L   |
|                 |           | TGT | GCC       | AGC | AGT            | TAT | CGA       | CAG | GG-       | --  | --T | AAT | TCA | CCC |

<sup>a</sup> Shared residues in the junctional region are boxed. V $\beta$ , D $\beta$  and J $\beta$  segments from each TCR are also indicated. Data concerning the anti-DR2 C04 and C016 T-cell clones are from Reference 37.

reactivity pattern of CTL 37GRK and 123.8GRK was attempted in order to map structural motifs uniquely shared by the HLA-B27 and -DR2 subtypes recognized by these CTL. We first looked for amino acid differences among the B5  $\beta$ -chains from DR2 subtypes that could account for selective recognition of DR2Dw2. Among DRB5 products, only D30, D37, and L38 were unique to the Dw2-associated B5\*0101 chain (Table IV). Residues 30, 37, and 38 are equivalent, on the basis of the predicted class II model, to residues 116, 123, and 124 of the class I molecule, respectively, and would be located in the  $\beta$  pleated sheet floor of the peptide-binding site. Residues 123 and 124 are conserved in class I Ag and are different from D37 and L38 of the B5\*0101 product. In contrast, residue 116 is highly polymorphic among class I Ag and only HLA-B27 and -B44 have Asp at this position. Furthermore, DTT6 is present in all B27 subtypes except B\*2706 and, as we have shown, is critical for recognition of HLA-B27 by CTL 37GRK and 123.8GRK. Position 30 in DR  $\beta$ -chains is also highly polymorphic, -D30 being almost unique to the B5\*0101 product. Thus, sequence comparisons suggest that D30 from the B5\*0101 chain could be necessary for cross-reactivity with HLA-B27.

We next plotted the identical residues between B\*2705 and the DR2Dw2  $\alpha\beta$  (B5\*0101) heterodimer on the predicted three-dimensional model for class II (3) (Fig. 7). A number of residues in the  $\alpha$ -helical regions are identical between both molecules, but they are of little or no variability among HLA-DR proteins and form no unique combinations that could account for cross-reactivity between HLA-B27 and HLA-Dw2. In contrast, five residues located in two adjacent  $\beta$ -strands are identical between DR2Dw2 (B5\*0101) and HLA-B27. Three of these residues are predicted to be pointing toward the peptide-binding site. These are Y13, H28, and D30 from the B5\*0101 chain, which correspond to residues 99, 114, and 116, respectively, in class I. This residue is not accessible to solvent probes in the peptide-binding site (5), but is involved in contacts with residues in the  $\alpha$ 1  $\alpha$ -helix that can influence peptide binding (1). None of these four residues is unique to either HLA-B27 or to the B5\*0101  $\beta$ -chain but, because of their polymorphism, their combination is unique to HLA-B27 (except B\*2706) and DR2Dw2 (B5\*0101). The conserved W61 residue from the  $\beta$ -chain, which is equivalent to W147 from class I Ag, can be included in this motif because of its spatial proximity and because it is the only  $\alpha$ -helical residue from the  $\beta$ -chain, of those common to HLA-B27 and -DR2, that is predicted as pointing into the peptide-binding site. The two  $\alpha$ -helical residues from the DR  $\alpha$ -chain that are identical to HLA-B27 and are predicted to be pointing into the peptide-binding site are E55 and D66, which are equivalent to residues 63 and 74 of HLA-B27, respectively. It cannot be ruled out that one or both of these

Table IV  
Polymorphic residues among HLA-DR2 subtypes<sup>a</sup>

|           | $\beta 1$ |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | $\beta 2$ |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----------|-----------|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|           | 6         | 9 | 11 | 13 | 28 | 30 | 31 | 37 | 38 | 47 | 67 | 70 | 71 | 85 | 86 | 96        | 104 | 105 | 108 | 120 | 133 | 135 | 142 | 157 | 191 |
| DRB5*0101 | R         | Q | D  | Y  | H  | D  | I  | D  | L  | Y  | F  | D  | R  | V  | G  | E         | A   | R   | T   | N   | R   | S   | V   | T   | Q   |
| DRB5*0102 |           |   |    |    |    | G  |    | N  | V  |    |    |    |    |    |    |           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| DRB5*0201 | C         |   |    |    |    | G  |    | N  | V  |    | I  | Q  | A  | A  | V  |           |     |     |     |     |     | G   |     | I   |     |
| DRB5*0202 | C         |   |    |    |    | G  |    | N  | V  |    | I  | Q  | A  | A  | V  |           |     |     |     |     |     | G   |     | I   |     |
| DRB1*1501 | R         | W | P  | R  | D  | Y  | F  | S  | V  | F  | I  | Q  | A  | V  | V  | Q         | S   | K   | P   | S   | L   | G   | M   | T   | R   |
| DRB1*1502 |           |   |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    | G  |           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| DRB1*1601 |           |   |    |    |    |    |    |    |    | Y  | F  | D  | R  |    | G  |           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| DRB1*1602 |           |   |    |    |    |    |    |    |    | Y  | L  | D  | R  |    | G  |           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<sup>a</sup> DRB5 and DRB1 allelic products are separately compared. Residues that are invariant in both allelic series are not shown. Blanks indicate identity to the corresponding reference sequence (B5\*0101 or B1\*1501) in each series. Sequences are from References 47 to 49.

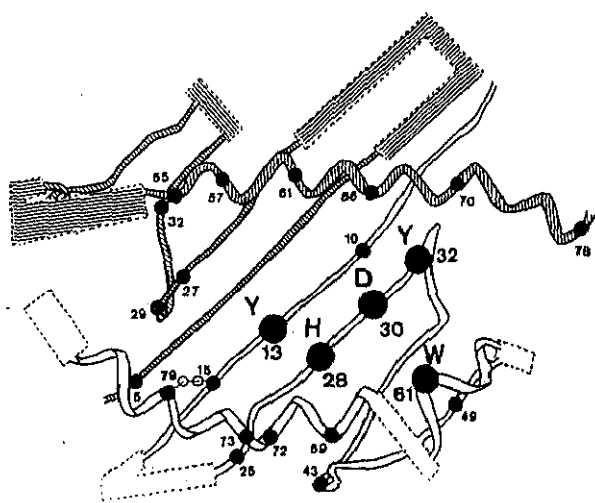


FIGURE 7. Structural similarities between HLA-B27 and HLA-DR2. The amino acid sequence of the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  domains of HLA-B27 was compared with the sequence of the DR  $\alpha 1$  domain and the  $\beta 1$  domain from the DRB5\*0101, respectively, using the same alignment as in Brown et al. (3). Identical residues between both molecules located in areas of defined structure are represented by dots on the predicted three-dimensional model of class II proteins (3). Large dots represent those residues proposed as contributing to a shared structural motif that could confer some peptide presenting similarities to HLA-B27 and HLA-DR2Dw2 (see text). Numbering corresponds to the class II amino acid sequence. On the basis of the class I model (1, 5), of 10  $\alpha$ -helical residues identical between both molecules, only 3 (residues 55 and 66 from  $\alpha 1$ , and residue 61 from  $\beta 1$ ) are predicted to be pointing toward the peptide-binding site. Of 6 identical  $\beta$ -pleated sheet residues, 3 (residues 13, 28, and 30, all from  $\beta 1$ ) are pointing toward the site. Residues 27 and 29 from the DR  $\alpha$ -chain are equivalent to 29 and 30 from class I (3), whose side chains do not contribute to the peptide-binding site (5).

residues might contribute to the motif, but they have not been included because their mutation in HLA-B27 does not significantly affect lysis of the corresponding transfectants by CTL 37GRK (33). B\*2706, which differs from B\*2705 at positions 77, 114, 116, and 152 (38), is recognized by

CTL 37GRK and 123.8GRK, in spite of lacking such motif (33). This is likely caused by compensatory effects of the 77 and 152 changes, as mutations mimicking the B\*2706 changes at positions 116 or 114 + 116 strongly affect recognition by these CTL (Fig. 4).

The location of the common motif between HLA-B27 and DR2Dw2 at the bottom of the peptide-binding site, inaccessible to direct TCR contact, suggests that the cross-reactivity pattern of CTL 37GRK and 123.8GRK could be caused by recognition of peptides that require this structural motif for MHC binding. It is also possible that the similarities found in the TCR  $\beta$ -chain junctional regions with other anti-DR2 T cells (37) might be related to recognition of peptide motifs shared with DR2-bound peptides, by CTL 37GRK and 123.8GRK, as junctional regions are thought to be critically involved in peptide recognition (39). The relative contribution of the  $\alpha$ -helical regions in the MHC molecule and the peptide to the interaction with the TCR is not known, and it may be variable for different TCR. Our interpretation of the cross-reactive pattern of CTL 37GRK and 123.8GRK implies that the  $\alpha$ -helical segments are not the structural elements determining the observed cross-reaction, because they are largely different between HLA-B27 and -DR2, although this does not exclude interactions between the  $\alpha$ -helices and these TCR.

It is possible that a same peptide binds to HLA-B27 and to DR2Dw2 because identical peptides can bind to and be presented by class I and class II proteins to self-restricted T cells (40-44). However, peptides with sufficient similarity in the residues influenced by the common motif described above, and in those interacting with the TCR could also account for the cross-reactive pattern. Evidence for involvement of distinct peptides in cross-reactive T cell epitopes has been reported from studies with HLA-B27 mutants (22, 45).

In conclusion, we have shown recurrent CTL cross-reactivity between HLA-B27 and DR2. For the CTL clones analyzed in this study such cross-reactivity can be interpreted as being mediated by identical or structurally related



peptides requiring an MHC-binding motif common to HLA-B27 and DR2Dw2 and unique to these Ag. Although we favor this interpretation, alternative possibilities involving less apparent relationships between HLA-B27, HLA-DR2, and their respective bound peptides cannot be ruled out. The property of sharing allospecific T cell epitopes with class II has not been described for other class I HLA Ag, but analogous findings in the mouse (20) suggest that this property might not be unique to HLA-B27 in humans. Nevertheless, the linkage of HLA-B27 to ankylosing spondylitis, a disease that might have autoimmune components, raises the question of whether the peptide presenting similarities of HLA-B27 and HLA-DR2 could be related to disease susceptibility. For instance, it has been shown that a viral peptide that is an immunodominant class I-restricted CTL determinant and can also bind to class II Ag and induce class II-restricted Th cells contributes to stimulate the class I-restricted CTL response to the same peptide (43). B27-associated spondyloarthropathies may be the product of an autoimmune T cell response against a tissue-specific peptide specifically presented by HLA-B27 in joint tissues (46). Thus, it is conceivable that, in individuals having the appropriate class II Ag, bacterial peptides mimicking an "arthritogenic" self-peptide could be presented by class II molecules to Th cells upon infection and elicit a helper response. This could stimulate CTL precursors cross-reacting with HLA-B27 in joint tissues. It might be of interest to evaluate disease association data for the possibility that the concomitant presence of HLA-B27 and particular DR2 subtypes could imply a relative risk to developing disease greater than with HLA-B27 alone.

*Note added to proof.* A recent report (Nazirov, P. K., and L. E. Pospelov. 1991. HLA antigens in patients with osteoarticular tuberculosis and chronic hematogenic osteomyelitis. *Orthop. Travmatol. Protez.* 26:9.) in which osteoarticular tuberculosis was found to be associated with HLA-B27 and HLA-DR2 in Uzbeks came to our attention while this paper was being reviewed.

## Acknowledgments

We thank Dolores Jaraquemada for her gift of the L cell transfectants used in this study. We also thank Cristina Navarrete, Jorge Martínez (Hospital 12 de Octubre), and José L. Vicario for cell typing and biologic reagents, and acknowledge the help of our colleagues Guillermo Marqués, Rosa García-Hoyo, Rafael Bragado, Angel Ezquerro, and Begoña Galocha. The Blood Bank laboratory from the Hospital 12 de Octubre, Madrid, supplied human sera for this work.

## References

1. Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennet, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506.
2. Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennet, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1987. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329:512.
3. Brown, J. R., T. Jardetzky, M. A. Saper, B. Samraoui, P. J. Bjorkman, and D. C. Wiley. 1988. A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature* 332:845.
4. Garret, T. P., M. A. Saper, P. J. Bjorkman, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1989. Specificity pockets for the side chains of peptide antigen in HLA-Aw68. *Nature* 342:692.
5. Saper, M. A., P. J. Bjorkman, and D. C. Wiley. 1991. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 219:277.
6. Schumacher, T. N. M., M. L. H. De Bruijn, L. N. Vernie, W. M. Kast, C. J. M. Melief, J. J. Neeffjes, and H. L. Ploegh. 1991. Peptide selection by MHC class I molecules. *Nature* 350:703.
7. Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung, and H. G. Rammensee. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351:290.
8. Jardetzky, T. S., W. S. Lane, R. A. Robinson, D. R. Madden, and D. C. Wiley. 1991. Identification of self peptides bound to purified HLA-B27. *Nature* 353:326.
9. Rudensky, A., P. Preston-Hurlburt, S. C. Hong, A. Barlow, and C. A. Janeway. 1991. Sequence analysis of peptides bound to MHC class II molecules. *Nature* 353:622.
10. Nuchtern, J. G., J. S. Bonifacio, W. E. Biddison, and R. D. Klausner. 1989. Brefeldin A implicates egress from the endoplasmic reticulum in class I-restricted antigen presentation. *Nature* 339:223.
11. Yewdell, J. W., and J. R. Bennink. 1989. Brefeldin inhibits presentation of protein antigens to cytotoxic T lymphocytes. *Science* 244:1072.
12. Townsend, A., C. Öhlén, J. Bastin, H. G. Ljunggren, L. Foster, and K. Kärre. 1989. Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 340:443.
13. Ljunggren, H., N. J. Stam, C. Öhlén, J. J. Neeffjes, P. Höglund, M. T. Heemels, J. Bastin, T. N. M. Schumacher, A. Townsend, K. Kärre, and H. L. Ploegh. 1990. Empty MHC class I molecules come out in the cold. *Nature* 346:476.
14. Townsend, A., T. Elliot, V. Cerundolo, L. Foster, B. Barber, and A. Tse. 1990. Assembly of MHC class I molecules analyzed in vitro. *Cell* 62:285.
15. Neeffjes, J. J., and H. D. Ploegh. 1992. Intracellular transport of MHC class II molecules. *Immunol. Today* 13:179.
16. Hunt, D. F., R. A. Henderson, J. Shabanowitz, K. Sakaguchi, H. Michel, N. Sevelir, A. L. Cox, E. Appella, and V. H. Engelhard. 1992. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 255:1261.
17. Henderson, R. A., H. Michel, K. Sakaguchi, J. Shabanowitz, E. Appella, D. F. Hunt, and V. C. Engelhard. 1992. HLA-A2.1-associated peptides from a mutant cell line: second pathway of antigen presentation. *Science* 255:1264.
18. Rotzschke, O., K. Falk, S. Faath, and H. G. Rammensee. 1991. On the nature of peptides involved in T cell alloreactivity. *J. Exp. Med.* 174:1054.
19. Breur-Vriesendorp, B. S., J. Vingerhoed, W. P. Schaasberg, and P. Iványi. 1990. Variations in the T-cell repertoire against HLA antigens in humans. *Hum. Immunol.* 27:1.

20. Schilham, R. Lang, R. Benner, R. Zinkernagel, and H. Hengartner. 1986. Studies of an alloreactive CTL clone specific for H-D<sup>b</sup> that cross-reacts with I-E<sup>k</sup>. *J. Immunol.* 137:2748.
21. Aparicio, P., D. Jaraquemada, and J. A. Lopez de Castro. 1987. Alloreactive cytolytic T cell clones with dual recognition of HLA-B27 and HLA-DR2 antigens: selective involvement of CD8 in their class I-directed cytotoxicity. *J. Exp. Med.* 165:428.
22. Villadangos, J. A., B. Galocha, D. López, V. Calvo, and J. A. López de Castro. 1992. The role of binding pockets for amino-terminal peptide residues in HLA-B27 allorecognition. *J. Immunol.* 149:505.
23. Jaraquemada, D., R. Martin, S. Rosen-Bronson, M. Flerlage, H. F. McFarland, and E. O. Long. 1990. HLA-DR2a is the dominant restriction molecule for the cytotoxic T cell response to myelin basic protein in DR2Dw2 individuals. *J. Immunol.* 145:2880.
24. Barnstable, C. J., W. F. Bodmer, G. Brown, G. Galfre, C. Milstein, and A. F. Williams. 1978. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens: new tools for genetic analysis. *Cell* 14:9.
25. Ellis, S. A., C. Taylor, and M. McMichael. 1982. Recognition of HLA-B27 and related antigens by a monoclonal antibody. *Hum. Immunol.* 5:49.
26. Colombani, J., V. Lepage, and J. Kalil. 1983. HLA monoclonal antibody registry: second listing. *Tissue Antigens* 22: 97.
27. Lampson, L. A., and R. Levy. 1980. Two populations of Ia-like molecules on a human B cell line. *J. Immunol.* 125:293.
28. Brodsky, F. M., P. Parham, and W. F. Bodmer. 1980. Monoclonal antibodies to HLA-DRw determinants. *Tissue Antigens* 16:30.
29. Watson, A. J., R. DeMars, I. S. Trowbridge, and H. F. Bach. 1983. Detection of a novel human class II antigen. *Nature* 304:358.
30. DeVries, J. E., and H. Spits. 1984. Cloned human cytotoxic T lymphocyte (CTL) lines reactive with autologous melanoma cells. I. In vitro generation, isolation, and analysis to phenotype and specificity. *J. Immunol.* 132:510.
31. Carrera, A. C., F. Sanchez-Madrid, M. López-Botet, C. Bernabeu, and M. Ortíz de Landazuri. 1987. Involvement of the CD4 molecule in a post-activation event on T cell proliferation. *Eur. J. Immunol.* 17:179.
32. Malissen, B., N. Rebai, A. Liabeuf, and C. Mawas. 1982. Human cytotoxic T cell structures associated with expression of cytolysis: analysis at the clonal cell level of the cytolysis-inhibiting effect of 7 monoclonal antibodies. *Eur. J. Immunol.* 12:739.
33. López, D., S. Rojo, V. Calvo, and J. A. López de Castro. 1992. Peptide-presenting similarities among functionally distant HLA-B27 subtypes revealed by alloreactive T lymphocytes of unusual specificity. *J. Immunol.* 148:996.
34. Bragado, R., P. Lauzurica, D. López and J. A. López de Castro. 1990. T cell receptor V $\beta$  gene usage in a human alloreactive response: shared structural features among HLA-B27-specific T cell clones. *J. Exp. Med.* 171:1189.
35. Lauzurica, P., R. Bragado, D. López, B. Galocha and J. A. López de Castro. 1992. Asymmetric selection of T cell antigen receptor  $\alpha$ - and  $\beta$ -chains in HLA-B27 alloreactivity. *J. Immunol.* 148:3624.
36. Roman-Roman, S., L. Ferradini, J. Azucar, C. Genevee, T. Mercend, and F. Triebel. 1991. Studies on the human T cell receptor  $\alpha/\beta$  variable region genes. *Eur. J. Immunol.* 21:927.
37. Wilson, K. E., E. Ball, P. Stasny, and J. D. Capra. 1991. Allorecognition of HLA DR2 and DR5 molecules by V $\beta$ 8-positive T-cell clones. *Scand. J. Immunol.* 33:131.
38. Vega, M. A., R. Bragado, P. Iványi, J. L. Peláez, and J. A. López de Castro. 1986. Molecular analysis of a functional subtype of HLA-B27: a possible evolutionary pathway for HLA-B27 polymorphism. *J. Immunol.* 137:3557.
39. Davis, M. M., and P. J. Bjorkman. 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334:395.
40. Sette, A., A. Vitiello, P. Farness, J. Furze, J. Sidney, J. M. Claverie, H. M. Grey, and R. Chesnut. 1991. Random association between the peptide repertoire of A2.1 class I and several different DR class II molecules. *J. Immunol.* 147: 3893.
41. Perkins, D. L., M. Z. Lai, J. A. Smith, and M. L. Gefter. 1989. Identical peptides recognized by MHC class I- and II-restricted T cells. *J. Exp. Med.* 170:279.
42. Perkins, D. L., G. Berriz, Y. S. Wang, J. A. Smith, and M. L. Gefter. 1991. Comparison of class I- and II-restricted T cell recognition of the identical peptide. *Eur. J. Immunol.* 21:2781.
43. Takahashi, H., R. N. Germain, B. Moss, and J. A. Berzofsky. 1990. An immunodominant class I-restricted cytotoxic T lymphocyte determinant of human immunodeficiency virus type 1 induces CD4 class II-restricted help for itself. *J. Exp. Med.* 171:571.
44. Carreño, B. M., R. V. Turner, W. E. Biddison, and J. E. Coligan. 1992. Overlapping epitopes that are recognized by CD8<sup>+</sup> HLA class I-restricted and CD4<sup>+</sup> class II-restricted cytotoxic T lymphocytes are contained within an influenza nucleoprotein peptide. *J. Immunol.* 148:894.
45. Buxton, S. E., R. J. Benjamin, C. Clayberger, P. Parham, and A. M. Krensky. 1992. Anchoring pockets in human histocompatibility complex leukocyte antigen (HLA) class I molecules: analysis of the conserved B ("45") pocket of HLA-B27. *J. Exp. Med.* 175:809.
46. Benjamin, R., and P. Parham. 1990. Guilt by association: HLA-B27 and ankylosing spondylitis. *Immunol. Today* 11: 137.
47. Wu, S., T. L. Saunders, and F. H. Bach. 1986. Polymorphism of human Ia antigens generated by reciprocal intergenic exchange between two DR beta loci. *Nature* 324:676.
48. Lee, B. S. M., N. A. Rust, A. J. McMichael, and H. O. McDevitt. 1987. HLA-DR2 subtypes form an additional supertypic family of DR $\beta$  alleles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:4591.
49. Liu, C. P., F. H. Bach, and S. Wu. 1988. Molecular studies of a rare DR2/LD-5a/DQw3 HLA class II haplotype. *J. Immunol.* 140:3631.

# Primary structure of a new HLA-A2 subtype: HLA-A\*0213

Domingo F. Barber<sup>1</sup>, José M. Fernández<sup>1</sup>, Martín G. Guttridge<sup>2</sup>, José A. López de Castro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Biología Molecular (CSIC-UAM), Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain  
<sup>2</sup> UK Transplant Support Service Authority, Fox Den Road, Stoke Gifford, Bristol BS12 6RR, UK

Received November 16, 1993/Revised version received December 1, 1993

HLA-A2 is the most common class I antigen in humans. Twelve subtypes have been previously described (López de Castro 1989; Castaño and López de Castro 1991; 1992; Belich et al. 1992). We have now determined the structure of a new one, A\*0213, detected in a European Caucasoid individual by isoelectric focusing (IEF; Guttridge et al. 1992).

Full-length cDNA was amplified after reverse transcription of 1 µg of RNA from the lymphoblastoid cell line SLUGBO (HLA-A2, 11; B35, 44; Cw4, w5; DR1). A 3' untranslated region (UTR) derived antisense HLA-A-specific primer, 5'-CGAATTCAGAAACAAAGTCAGGGTT-3', and a forward 5' UTR-derived primer, 5'-GCAAGCTTAGATTCTCCCCA-GACGC-3', containing *Eco* RI and *Hin* dIII sites, respectively (underlined), were used. Cloning and selection of HLA-A2-specific clones was done as previously described (Castaño and López de Castro 1991). Complete sequences of four such clones were determined, and were identical (Fig. 1).

A\*0213 differs from A\*0201 (Koller and Orr 1985) in only three nucleotides: 527 (T→A), 538 (T→A), and 539 (T→A). These correspond to the second position of codon 152, and to the first and second positions of codon 156, respectively, and imply amino acid changes of Val<sub>152</sub> to Glu<sub>152</sub> and Leu<sub>156</sub> to Gln<sub>156</sub>. These account for the IEF pattern observed which was very close to that of the A\*0203 protein (Guttridge et al. 1992). Both subtypes have the same net charge, but differ at two positions than can influence the pK of neighbor-charged residues (Fig. 2). The changes in codons 152 and 156 are separately present in A\*0203 and in A\*0212 (Zemmour and Parham 1993), respectively. They are together only in HLA-E\*0101 (Mizuno et al. 1988) and E\*0102 (Koller et al. 1988), but these alleles have an additional change at codon 155. Although there are other possibilities, the simplest one for the origin of A\*0213 is by a recurrent point mutation at codon 152 from A\*0212, re-introducing the same residue as in the A\*0203 product. A\*0212 has only been found in South American Indians. That A\*0212 and A\*0213 are from different ethnic groups might suggest a relatively old origin of both subtypes, predating ethnic diversification. A\*0213 provides a new example of the spatial clustering of HLA-A2 subtype polymorphism in a restricted region of the peptide binding site, further supporting a selection-driven evolution of HLA-A2 subtypes. (Castaño and López de Castro 1991; 1992).

**Acknowledgments.** We thank Dr. C. Vilches for help. D. F. B. is a fellow from Fundación Caja de Madrid. This work was supported by grant SAL91-0408 from the CICYT. We also thank the Fundación Ramón Areces for an institutional grant to the CBM.

### References

Belich, M. P., Madrigal, A., Hildebrand, W. H., Zemmour, J., Williams, R. C., Luz, R., Peitzl-Erlor, M. L., and Parham, P. Unusual HLA-B alleles in two tribes of Brazilian Indians. *Nature* 357: 326-332, 1992  
 Castaño, A. R. and López de Castro, J. A. Structure of the HLA-A\*0204 antigen, found in South American Indians. Spatial clustering of HLA-A2 subtype polymorphism. *Immunogenetics* 34: 281-285, 1991  
 Castaño, A. R. and López de Castro, J. A. Structure of HLA-A\*0211 (A2.5) subtype: further evidence for selection-driven diversification of HLA-A2 antigens. *Immunogenetics* 35: 344-346, 1992  
 Guttridge, M. G., Marsh, S. G. E., and Klouda, P. T. A new HLA-A2 variant (HLA-A2-SLU) identified by one-dimensional isoelectric focusing. *Tissue Antigens* 39: 32-34, 1992

The nucleotide sequence data reported in this paper have been submitted to the EMBL nucleotide sequence database and have been assigned the accession number Z27120.

Correspondence to: J. A. López de Castro.

Exon 1

```

M A V N A P R T L V L L L L L L L L L L L L L L T 55
ATGGCCGTCATGGCCGCCCGAACCCCTGGTCTGCTACTCTCGGGGCTCTGGCCCTGACC 60
      Exon 2
Q T V I L G F H N D M R Y Y F T T E V V R R P G 116
CAGACCTGGCCGGCTCTCACTCCATAGGATATTTCTTACATCCCGTCTCCCGGCCCGG 120
R E S F R V I R V G V G V D D T Q F V R Y F 138
CGCGGGAGCCCGCTTCAATCGCAGTGGGCTAGCTGAGCGACACCGCATGTTCGCTGG 140
D S D A A S D R K E F P R M I E Q G R 154
GACCGGAGCCCTCGAGCCAGGATGGAGCCCGCCCGGTGATAGACAGGAGGCT 160
P E Y V D G E T R V K A N I E Q R R V 174
CCGAGTATTTGGACGGGAGGACCGGAAAGTGAAGGCCACTCACAGACTCACCGGATG 180
G A C T G L R V Y V N Q E E A D G H T V G 194
GACCTGGGAGCCCTGGCCCGCTACTACAAACCGAGCGAGGCCCTTCTCACCCCTCCAG 160
R M V G C D V G S D N R F L R G V Y X Y 116
AGGATGTATGGCTGGACCTGGGGTGGACTGGCCCTCTCTCCCGGGTACCCAGGATAC 120
A Y D G K D Y I A L K E D L R E N W T A 136
GCCTACCGACCGCAAGGATTACATCGCCCTGAAAGAGGACCTCGCTCTTGGACCGCCG 140
D N A A Q T T K H X W E A A K E A S D Q 156
GACATGGCAGCTCAGACACCAAGGACCAAGTGGGAGCGGCCATGAGGCGAGCCAG 160
R A Y L E G T C V E W L R R Y L E N G K 174
AGAGCCCTACCTGAGGCGACCTGGAGTGGCTCCGCAATATCTGGAGCAAGCGAAG 180
G A G C C T G C G C C G A C C G A C C C C A A A C G C A T A T G A C T C A C G C T G T C T G A G 194
      Exon 4
T T L Q R T A P X T E M T E R A V D 198
GAGACCTGCGCGCCAGCGGACCGCCCAAAACGATATGACTCAGCAGCCTGTCTCTGAG 160
W E A L L R C H A L S F V P A E I T L T 214
CATGAAAGCCCTGAGTGTCTGGCCCTGAGCTTCACTCCCTGGAGATCACTGAGC 220
V U R D G E D Q T Q D V E L V E T E R A 234
TGGCAGCGGATGGGAGGAGCCAGACCCAGGACCGGACTCCTGGAGAGCCAGGCTGCA 180
O D G E F P Q X W A A Y V V F P S C Q D R 156
GGGATGGAACCTTCCAGAAATGGCGGCTGTGGTGGCTCTGTCAGACAGGAGGAGGA 140
Y T C R V Q N E G L P R F L V L N W E F 174
TACATCTGCCATGTGCAGCATGAGGCTTTGCCAAGGCCCTCACCTGGAGATGGAGCC 180
      Exon 5
S E Q P Y I P I V G I E A Q L Y L P D A 204
TCTTCCGACCCCACTCCCACTCGTGGACATCATTCGCTGGCTGGTCTTGGAGCT 160
Y I T G A V V A A Y V X W R R K S D R K 214
GTGATCACTGGAGCTGTGGCTCGCTGTGATGGAGAGGAAAGAGCTCAGATGAAAA 180
      Exon 7
G G A G G A G C T A C T C A G C G C T C A A G C A T G A C A G T G C C C A G G C C T G A T C T C T C T 236
ACAGCTTCTAATGTGA 1098
      Exon 8
T A C K X Y 341
ACAGCTTCTAATGTGA 1098
    
```

Fig. 1. Nucleotide and deduced amino acid sequence of A\*0213. Exons are indicated.

|            | 511 | 546 | 147 |    |                       |
|------------|-----|-----|-----|----|-----------------------|
| HLA-A*0201 | TGG | GAG | GCC | CA | W E A A H V A E Q L R |
| HLA-A*0213 | --- | --- | --- | CA | ---                   |
| HLA-A*0212 | --- | --- | --- | CA | ---                   |
| HLA-A*0203 | --- | A   | --- | -G | ---                   |
| CONSENSUS  | --- | -G  | --- | C  | ---                   |

Fig. 2. Structural relationship of A\*0213 to other HLA-A2 subtypes in the region in which A\*0213 differs from A\*0201. The four subtypes compared are identical outside this region.

Koller, B. H. and Orr, H. T. Cloning and complete sequence of an HLA-A2 gene. Analysis of two HLA-A2 alleles at the nucleotide level. *J Immunol* 134: 2727-2733, 1985  
 Koller, B. H., Geraghty, D. E., Shimizu, Y., Demars, R., and Orr, H. T. HLA-E. A novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes. *J Immunol* 141: 897-904, 1988  
 López de Castro, J. A. HLA-B27 and HLA-A2 subtypes: structure, evolution and function. *Immunol Today* 10: 239-246, 1989  
 Mizuno, S., Trapani, J. A., Koller, B. H., Dupont, B., and Yang, S. Y. Isolation and nucleotide sequence of a cDNA clone encoding a novel HLA class I gene. *J Immunol* 140: 4024-4030, 1988  
 Zemmour, J. and Parham, P. HLA class I nucleotide sequences. 1992. *Immunogenetics* 37: 239-250, 1993

Domingo F. Barber,  
Daniel López and  
José A. López de Castro

Centro de Biología Molecular  
Severo Ochoa (C.S.I.C.-U.A.M.),  
Universidad Autónoma de Madrid,  
Facultad de Ciencias, Madrid, Spain

## T cell receptor diversity in alloreactive responses against HLA-B27 (B\*2705) is limited by multiple-level restrictions in both $\alpha$ and $\beta$ chains

The T cell receptors (TCR) in HLA-B27 (B\*2705) alloreactivity were analyzed in cytotoxic T lymphocytes (CTL) from two individuals. Non-random usage was found in V $\beta$ , N+D $\beta$ , V $\alpha$ , and J $\alpha$ , but not in J $\beta$  segments or N $\alpha$ -regions. V $\beta$  segments from homology subgroup 4 were predominant and not associated to a particular donor or fine specificity, suggesting involvement in recognizing the HLA-B27 molecule. In contrast, preferential V $\alpha$  usage was associated with particular individuals and fine specificities, indicating distinct V $\beta$  and V $\alpha$  recruitment and contribution to allorecognition. Recurrent N+D $\beta$  motifs and J $\alpha$  segments, even from different donors, limited junctional diversity, suggesting that CDR3 usage was determined by the alloantigenic epitope independently of individuals. TCR were selected differently at various levels, as indicated by the following findings. Four clonotypes with similar fine specificity had identical  $\beta$  and unrelated  $\alpha$  chains. Similar  $\alpha$  were associated with unrelated  $\beta$  chains, and vice versa. CTL using V $\beta$  subgroup 4 did not globally show concomitant predominance of other TCR elements. V $\alpha$ 7, one of the preferred V $\alpha$  segments, was always associated with V $\beta$  subgroups other than 4. Sometimes, a TCR showed homology in elements of one chain to a second TCR or group of TCR, and to another in the other chain. These results are best explained by differential selection of TCR elements by different epitopes, providing a key to the inner structure of allospecific TCR repertoires.

### 1 Introduction

T cells recognize MHC+peptide complexes at the cell surface. Upon stimulation with allogeneic cells, strong T cell responses against MHC alloantigens are elicited, which involve recognition of alloantigen-bound peptides [1–3] and of exposed MHC protein residues. Alloreactive T cells range from being peptide-specific to lacking peptide specificity [4, 5]. The hypervariable CDR1 and 2 regions of the TCR V $\alpha$  and V $\beta$  segments may predominantly interact with the MHC protein. CDR3 regions, formed by N/N+D, J $\alpha$ , and J $\beta$  segments, are thought to interact mainly with MHC-bound peptides [6–8]. However, the contribution of V segments and junctional regions to specificity is not independent [9–11].

Numerous studies have shown conservation of V, J and N/N+D segments in peptide-specific class I-restricted responses [12]. Yet high TCR diversity with only V $\beta$  conservation was found among H-2K<sup>d</sup>-restricted CTL specific for a peptide from *Plasmodium berghei* [13]. Some peptide-specific class II-restricted responses are also very diverse [14–16]. TCR studies in alloreactivity are far less numerous. Apparently non-random V $\beta$  usage was observed among few T cell clones specific for DP2 [17] or DR1 [18, 19]. V $\beta$  skewing, without N+D $\beta$  or J $\beta$  restriction, was clearer in analyses of many more T cell clones

specific for I-A<sup>b</sup>m12 [20] or DR4 [21], and in allograft-infiltrating lymphocytes [22, 23]. Studies that have examined  $\alpha$  chain usage have generally found high V $\alpha$ , J $\alpha$ , and N-region diversity [18–20]. Recently, limited heterogeneity of anti-HLA-B35 TCR  $\alpha$  and  $\beta$  chains has been reported [24].

Critical aspects of allorecognition remain obscure. For instance, the contribution of the MHC molecule relative to peptides, the role of the responder in shaping alloreactive TCR repertoires, or the putative existence of immunodominant determinants could all influence TCR usage and limit its diversity. Besides insight into the poorly defined structural basis of allospecificity, knowing the rules governing TCR usage in alloreactivity is required to assess immunotherapeutic intervention in acute graft rejection through selective ablation or antagonism of alloimmune CTL.

We have reported preferential V $\beta$  and N+D $\beta$  usage among anti-B\*2705 CTL [25, 26]. It was not then possible to compare individual responses, or TCR specificity and structure. Here, we determined the structure of TCR from anti-B\*2705 CTL of known fine specificity in two individuals to address the rules governing  $\beta$  and  $\alpha$  chain selection, the contribution of each chain to allospecificity, and the influence of the responder in determining TCR usage. Both  $\alpha$  and  $\beta$  chain usage was non-random, but there were significant differences in their selection and contribution to specificity.

[I 14148]

**Correspondence:** José A. López de Castro, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Cantoblanco, E-28049 Madrid, Spain (Fax: +34-1-397 83 44)

**Key words:** T cell receptor / Alloreactivity / HLA-B27

### 2 Materials and methods

Anti-B\*2705 CTL clones from the unrelated donors GM (HLA-A1, 24; B7, 8; DR1, 3) and SR (HLA-A3; 29; B7,

Table 1. TCR  $\alpha$  and  $\beta$  gene segments in productive transcripts from anti-B\*2705 CTL<sup>a)</sup>

| CTL                       | Reaction pattern |          | Va   | Homology subgroup | Ja      | V $\beta$ | Homology subgroup | J $\beta$ | Accession number $\alpha/\beta$ |
|---------------------------|------------------|----------|------|-------------------|---------|-----------|-------------------|-----------|---------------------------------|
|                           | Subtypes         | Other    |      |                   |         |           |                   |           |                                 |
| Donor GM                  |                  |          |      |                   |         |           |                   |           |                                 |
| 116.8GRK <sup>b)</sup>    | 5                |          | 24   | NA                | HAVT01  | 6         | 1                 | 2.7       | L34738/L34720                   |
| 17A2*                     | 5                |          | 84   | 3                 | HAVP01  | 13        | 4                 | 1.1       | M87870/X517878                  |
| 31GRK                     | 5, 3             |          | 19.1 | 2                 | HAVT33  | 13.4      | 4                 | 2.3       | L34708/L34730                   |
| 74GRK                     | 5, 3             |          | 16.2 | 4                 | HAVP36  | 2         | 3                 | 2.3       | L34716/L34735                   |
|                           |                  |          | 11.2 | 7                 | AC24    |           |                   |           | L34715                          |
| 5A2*                      | 5, 3             |          | 14   | 3                 | IGRJa12 | 15.1      | 4                 | 2.3       | M87869/X51791                   |
| GM7*                      | 5, 3             |          | 22   | 4                 | PY14    | 3         | 4                 | 2.7       | M90479/X51796                   |
| 58GRK                     | 5, 1, 4          |          | 12.1 | 3                 | 122GRK  | 6.4       | 1                 | 2.7       | L34714/L34734                   |
| 20.8GRK                   | 5, 1, 2, 3, 6    |          | 14.1 | 3                 | HAVT01  | 14        | 4                 | 2.2       | L34703/L34725                   |
| 122GRK                    | 5, 2, 4, 6       | B56, B61 | 14   | 3                 | 122GRK  | 7.1       | 2                 | 1.1       | L34699/L34722                   |
| 100GRK                    | 5, 1, 2, 4, 6    | B56, B61 | 8.1  | 1                 | HAVT01  | 17.1      | 4                 | 2.7       | L34694/L34719                   |
| 37GRK/123.8GRK*           | 5, 1, 2, 3, 4, 6 | DR2      | 14   | 3                 | IGRJa06 | 1.1       | 1                 | 1.1       | M95394/L07294                   |
| Donor SR                  |                  |          |      |                   |         |           |                   |           |                                 |
| 11SRV/40SRV               | 5                |          | 2    | 1                 | HAVP10  | 8.1       | 1                 | 2.7       | L34698/L34721                   |
| 13SRC <sup>c)</sup>       | 5                |          | 10   | 2                 | HAVP29  | 14        | 4                 | 2.2       | L34702/L34724                   |
| 93S15                     | 5, 1             |          | 20.1 | 5                 | IGRJa04 | 3         | 4                 | 1.2       | L34718/L34737                   |
| 21S69                     | 5, 2             |          | 20.1 | 5                 | HJGF    | 7         | 2                 | 2.2       | L34704/L34726                   |
| 29S15                     | 5, 2             |          | 7.2  | 6                 | AG212   | 5.4       | 1                 | 1.6       | L34706/L34728                   |
| 12SRF-37SLG <sup>d)</sup> | 5, 3             | B60      | 20.1 | 5                 | 63.124  | 3         | 4                 | 2.1       | L34700/L34723                   |
| 33.8S15                   | 5, 3             |          | 84   | 3                 | AC25    | 3         | 4                 | 2.1       | L34709/L34723                   |
| 13SLG                     | 5, 3             | B61      | 8.1  | 1                 | FR6     | 3         | 4                 | 2.1       | L34701/L34723                   |
| 7S15/16S15                | 5, 1, 2          | B55, B56 | 17.1 | 1                 | 122GRK  | 14        | 4                 | 1.1       | L34717/L34736                   |
| 33S69                     | 5, 1, 3          |          | 2    | 1                 | HAVP10  | 14        | 4                 | 1.4       | L34710/L34731                   |
| 11.8SLG <sup>e)</sup>     | 5, 2, 3          | B60      | 3.1  | 2                 | 62.119  | 3         | 4                 | 2.1       | L34695/L34723                   |
| 27S69                     | 5, 2, 3          | B61      | 7.2  | 6                 | IGRJa06 | 18.1      | 1                 | 2.3       | L34705/L34727                   |
| 47S69                     | 5, 1, 2, 3       |          | 84   | 3                 | HAVT33  | 17.1      | 4                 | 2.7       | L34713/L34733                   |
|                           |                  |          | 12.1 | 3                 | AG212   |           |                   |           | L34712                          |
| 2SRZ                      | 5, 1, 2, 3       |          | 7.1  | 6                 | HAVP36  | 7         | 2                 | 2.2       | L34707/L34729                   |
| 3SRF                      | 5, 4, 6          |          | 11.1 | 7                 | IGRJa06 | 4         | 3                 | 1.2       | L34711/L34732                   |

a) Previously reported TCR sequences [25, 40] are marked (\*), and included here for comparison. CTL with identical TCR are grouped. Clonal reaction patterns are from [27]. HLA-B27 subtype differences strongly affect peptide presentation [41], so that differences in fine specificity with subtypes must largely reflect recognition of different peptide-dependent epitopes. Va and V $\beta$ 1-V $\beta$ 16 numbering is as in [29]. V $\beta$ 17-V $\beta$ 20 numbering is as in [28]. Subfamily members were assigned when the partial sequences determined were identical to only one member of the subfamily. Besides those shown, other assigned members are: Vaw24 [32] in CTL 116.8GRK; Va14.37GRK-[40] in CTL 5A2, 122GRK, and 37GRK/123.8GRK; V $\beta$ 6GLPA [42] in CTL 116.8GRK; V $\beta$ 13IGRb16 [43] in CTL 17A2; V $\beta$ 7H267.2 [44], in CTL 21S69 and 2SRZ. The Va2 segments from CTL 11SRV/40SRV and 33S69 were different, but the precise members could not be assigned. V segments are classified in homology subgroups, including those subfamilies that have more than 50% amino acid sequence identity [6]. NA: subgroup not assigned.

b) Cross-hybridization of the Va5 primer resulted in amplification of a transcript using Va24.

c) The only  $\alpha$  transcript amplified in CTL 13SRC was in-frame, but its Va segment had an anomalous sequence at its end and lacked the last Cys codon (Fig. 1). Although included here, this transcript may not encode a functional polypeptide.

d) This clonotype included CTL 12SRF, 12SLG, 60SLG, 4S15, 11S15, and 37SLG which had the same TCR. CTL 37SLG had a very high lytic activity, and showed weak cross-reactions with subtypes other than B\*2703. CTL 12SRF did not cross-react with HLA-B60 [27].

e) Cross-reaction of CTL 11.8 SLG with B\*2702 was weak [27].

44; DR2, 7) were analyzed. Their isolation, culture conditions, and fine specificity were described [27]. Non-anti-B27, but otherwise unselected T cell clones from the same individuals were analyzed as controls.

RNA was extracted from  $2 \times 10^5 - 3 \times 10^5$  cells of each CTL clone as described [25]. TCR  $\alpha$  and  $\beta$  cDNA was synthesized from separate RNA aliquots from the same extraction, using a Reverse Transcription System (Promega, Madison, WI) and  $1 \mu\text{M}$   $\alpha$ -specific (CTTG-TCACTGGATTAGAGTC) and  $\beta$ -specific (TTTTGGGTGTGGGAGATCTG) primers, respectively, as indicated by the manufacturer. cDNA amplification was done as described [25, 26]. V $\beta$  subfamily-specific primers [25] were matched to 20 (V $\beta$ 1 to V $\beta$ 20) of the 25 known V $\beta$

subfamilies [28–31]. Va-specific primers [26] were selected on the basis of 22 (Va1 to Va22) of the 32 known Va subfamilies [28, 29, 32, 33]. Absence of blanks indicated that our primers hybridize with the most common Va and V $\beta$  segments. Direct sequencing of both strands of  $\alpha$  and  $\beta$  cDNA was done with Sequenase (USB, Cleveland, OH) as described [25, 26]. Statistical analysis was carried out by the  $\chi^2$  test.

### 3 Results and discussion

#### 3.1 TCR $\alpha$ and $\beta$ usage in anti-B\*2705 CTL

Anti-B\*2705 TCR of known fine specificity from donors GM and SR were analyzed (Table 1). V segment sequen-

ces ranging from the last 33 to 198 bp, and complete N-region and J segment sequences, were determined. Most CTL had single productive  $\alpha$  and  $\beta$  chain transcripts. CTL 74GRK and 47S69 each showed two productive  $\alpha$  and one  $\beta$  transcripts. Frequencies of the clonal specificities among the CTL analyzed here are very similar to those in the anti-B\*2705 responses from which they were derived [27]. Thus, the results described below reflect TCR usage in the anti-B\*2705 responses from these individuals *in vitro*.

**3.2 Alloreactive CTL with identical TCR  $\beta$  chains and distinct  $\alpha$  chains. Relationship to specificity**

Four clonotypes (hereby defined as distinct  $\alpha/\beta$  combinations of productive transcripts; CTL with identical TCR have the same clonotype, CTL with two productive  $\alpha$  transcripts are considered as two clonotypes for  $\alpha$ -chain usage, and as one clonotype for  $\beta$ -chains) from donor SR had identical  $\beta$ , but unrelated  $\alpha$  transcripts. They were CTL 12SRF-37SLG, 33.8S15, 13SLG, and 11.8SLG (Table 1 and Fig. 1). This has been observed among peptide-specific CTL [16, 34], but it is, to our knowledge, the first report in alloreactive responses. These CTL had similar fine specificity with HLA-B27 subtypes (Table 1), indicating that the  $\beta$  chain is predominant in determining subtype specificity in these CTL clones.  $\alpha$ -chain diversity did not affect subtype specificity, but correlated with cross-

reactivity of these CTL with HLA-B60, B61, or none of these antigens (Table 1). These results provide an example of differential contribution of  $\alpha$  and  $\beta$  chains to allospecificity.

**3.3 V $\beta$  restriction among anti-B\*2705 CTL is donor independent and not epitope specific**

V segments were classified according to homology subgroups [6] (Table 1). V $\beta$  subgroup 4 was used by 55 to 60% of the anti-B27 clonotypes from each donor (Table 2). This percentage was much higher than among non-anti-B27 T cells from the same donors. The difference was statistically significant in each individual ( $p < 0.05$ ) and in the total of both donors ( $p < 0.005$ ). No other subgroup showed statistically significant differences compared to controls in single individuals, but V $\beta$  subgroup 3 was statistically decreased ( $p < 0.05$ ) in the total of both donors. These results indicate preferential usage of V $\beta$  subgroup 4 among anti-B\*2705 CTL in two independent donors. This was due mainly to selection of V $\beta$ 3 and V $\beta$ 14, which are sometimes considered as a single subfamily [28]. The results confirm our previous report with a third unrelated donor, DL [26]. In addition, they indicate that preferential use of V $\beta$  subgroup 4 in anti-HLA-B27 responses is donor-independent.

**A**

| CTL             | V $\beta$ | N+D $\beta$     | J $\beta$ | V $\beta$ | D $\beta$ | J $\beta$ |
|-----------------|-----------|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 74GRK           | ICSA      | <u>RLA</u>      | STDQ      | 2         | 2.1       | 2.3       |
| 12SRF           | LCAS      | <u>RLAGN</u>    | NEQ       | 3         | 2.1       | 2.1       |
| <b>21869</b>    | LCASS     | <u>RGLAV</u>    | NTGEL     | 7         | 2.1       | 2.2       |
| <b>2BRZ</b>     | LCASSQ    | <u>DLRYA</u>    | GEL       | 7         | 2.1       | 2.2       |
| <b>58GRK</b>    | LCASS     | <u>PGTS</u>     | YEQ       | 6.4       | 2.1       | 2.7       |
| <b>116.8GRK</b> | LCASS     | <u>LTGF</u>     | YEQ       | 6         | 1.1       | 2.7       |
| <b>5A2</b>      | FCATS     | <u>DLT</u>      | DTQ       | 15.1      | NA        | 2.3       |
| <b>20.8GRK</b>  | FCAS      | <u>WRA</u>      | GEL       | 14        | 2.1       | 2.2       |
| <b>13BRC</b>    | FCAS      | <u>WRAA</u>     | EL        | 14        | 2.1       | 2.2       |
| <b>100GRK</b>   | LCASSF    | <u>SGTGT</u>    | YEQ       | 17.1      | 1.1       | 2.7       |
| <b>47869</b>    | LCASSF    | <u>GTGH</u>     | YEQ       | 17.1      | 1.1       | 2.7       |
| 7S15/16S15      | FCASS     | <u>FGTGGQ</u>   | A         | 14        | 1.1       | 1.1       |
| 122GRK          | LCASSQ    | <u>GGTGGTD</u>  | TEA       | 7.1       | 1.1       | 1.1       |
| 27869           | FCASS     | <u>PSSLS</u>    | TQ        | 18.1      | 2.1       | 2.3       |
| 33869           | FCASS     | <u>PENSG</u>    | NEKL      | 14        | 2.1       | 1.4       |
| 118RY/408RY     | FCASSF    | <u>DRGN</u>     | SYEQ      | 8.1       | 1.1       | 2.7       |
| 3SRF            | LCSV      | <u>SDRT</u>     | YGY       | 4         | 1.1       | 1.2       |
| GM7             | LCAS      | <u>KRTQGS</u>   | SYEQ      | 3         | 1.1       | 2.7       |
| 37GRK/123.8GRK  | FCASS     | <u>PETGL</u>    | NTEA      | 1.1       | 1.1       | 1.1       |
| 31GRK           | FCASS     | <u>RS</u>       | DTQ       | 13.4      | NA        | 2.3       |
| 93S15           | LCAS      | <u>RRGGRGID</u> | YGY       | 3         | 1.1       | 1.2       |
| 29S15           | LCASS     | <u>SLGGAT</u>   | SPL       | 5.4       | 1.1       | 1.6       |
| 17A2            | FCASS     | <u>PGMAYA</u>   | EA        | 13        | 1.1       | 1.1       |

**B**

| CTL                | V $\alpha$ | N+J $\alpha$           | V $\alpha$ | J $\alpha$       |
|--------------------|------------|------------------------|------------|------------------|
| 20.8GRK            | YFCA       | <u>YRSAYEGAGSYQL</u>   | 14.1       | HAVT01           |
| 100GRK             | YFCA       | <u>APGGGAGSYQL</u>     | 8.1        | HAVT01           |
| 116.8GRK           | YICV       | <u>VTGAGSYQL</u>       | 24         | HAVT01           |
| <b>58GRK</b>       | YFCA       | <u>LIYTBSTYKY</u>      | 12.1       | 122GRK           |
| <b>122GRK</b>      | YFCAF      | <u>MMGPSTYKY</u>       | 14         | 122GRK           |
| <b>7S15/16S15</b>  | YFCAA      | <u>SSGYKY</u>          | 17.1       | 122GRK           |
| 37GRK/123.8GRK     | YFCAF      | <u>TTFPAENYGGGQGNL</u> | 14         | IGRJ $\alpha$ 06 |
| 3SRF               | YCAVE      | <u>LWLTNYGGGQGNL</u>   | 11.1       | IGRJ $\alpha$ 06 |
| 27S69              | YLCAVR     | <u>ASPGEGGGQGNL</u>    | 7.2        | IGRJ $\alpha$ 06 |
| <b>33869</b>       | YLCA       | <u>FVDYKL</u>          | 2          | HAVP10           |
| <b>118RY/408RY</b> | YLCAV      | <u>RDYKL</u>           | 2          | HAVP10           |
| 31GRK              | YICA       | <u>APWGMSSGGSNYKL</u>  | 19.1       | HAVT33           |
| 47S69              | YFCAM      | <u>IGGGSNYKL</u>       | 84         | HAVT33           |
| 29S15              | YLCAV      | <u>SLYSGGYQKY</u>      | 7.2        | AG212            |
| 47S69              | YFCA       | <u>LSEARQYQKY</u>      | 12.1       | AG212            |
| 2SRZ               | YFCAVR     | <u>DPNQGKGL</u>        | 7.1        | HAVP36           |
| 74GRK              | YFCAVR     | <u>ALPYNQGKGL</u>      | 16.2       | HAVP36           |
| GM7                | YFCA       | <u>PLSSASKI</u>        | 22         | PY14             |
| 5A2                | YFCA       | <u>GPLNGYAL</u>        | 14         | IGRJ $\alpha$ 12 |
| 17A2               | YFCAMRE    | <u>GPGNQF</u>          | 84         | HAVP01           |
| 74GRK              | YCAVE      | <u>DRSNFNK</u>         | 11.2       | AC24             |
| 11.8SLG            | YFCAL      | <u>TGANNL</u>          | 3.1        | 62.119           |
| 12SRF              | YYCLVGD    | <u>KVNTGFQKL</u>       | 20.1       | 63.124           |
| 13SLG              | YFCAA      | <u>GSPPRYDKV</u>       | 8.1        | FR6              |
| 21869              | YYCLV      | <u>VSGANGNTPL</u>      | 20.1       | HJGF             |
| 33.8S15            | YFCAMR     | <u>RAAAGNKL</u>        | 84         | AC25             |
| 93S15              | YYCLVGD    | <u>LGGGPKT</u>         | 20.1       | IGRJ $\alpha$ 04 |
| 13BRC              | YPRT       | <u>GNTGKL</u>          | 10         | HAVP29           |

Figure 1. Deduced amino acid sequences of  $\beta$ - (A) and  $\alpha$ -chain (B) junctional regions in productive transcripts from anti-B\*2705 CTL. C-terminal ends of V segments, N/N+D $\beta$  regions, and N-terminal ends of J segments are shown. V, D, and J segments in each transcript, and the corresponding CTL are indicated. CTL having the same  $\beta$ -chain transcript are specified, except in the case of CTL 12SRF. Identical  $\beta$ -chain transcripts to that in this CTL were found, together with the same  $\alpha$  transcripts, in CTL 12SLG, 60SLG, 4S15, 11S15, and 37SLG, and together with different  $\alpha$ -chain transcripts in CTL 33.8S15, 13SLG, and 11.8SLG. Sequences are grouped according to N+D $\beta$  (Panel A) or J $\alpha$  similarity (Panel B). Recurrent N+D $\beta$  motifs and J $\alpha$  segments are underlined. CTL clones using the same V subfamily plus the same J segments in either  $\alpha$  or  $\beta$  chains are boxed. The V $\alpha$  segment from CTL 13SRC differed from V $\alpha$ 10.1a [45] in the last three codons, and lacked the last Cys residue.

Table 2. TCR V $\beta$  and V $\alpha$  segment usage among anti-B\*2705 CTL

| V $\beta$<br>Homology<br>subgroup  | Donor <sup>a)</sup>               |         |   |          | Total              |         |
|------------------------------------|-----------------------------------|---------|---|----------|--------------------|---------|
|                                    | GM                                |         | SR                                      |          | anti-B*2705        | Control |
|                                    | anti-B*2705                       | Control | anti-B*2705                             | Control  |                    |         |
| 1                                  | 3 (27%)                           | 4 (44%) | 3 (20%)                                 | 5 (50%)  | 6 (23%)            | 9 (47%) |
| 2                                  | 1 (9%)                            | 1 (11%) | 2 (13%)                                 | 0        | 3 (12%)            | 1 (5%)  |
| 3                                  | 1 (9%)                            | 3 (33%) | 1 (7%)                                  | 3 (30%)  | <u>2 (8%)</u>      | 6 (32%) |
| 4                                  | <u>6 (55%)</u>                    | 1 (11%) | <u>9 (60%)</u>                          | 2 (20%)  | <u>15 (58%)</u>    | 3 (16%) |
| V $\alpha$ <sup>b)</sup> subfamily | anti-B*2705                       | Control | anti-B*2705                             | Control  | PBL <sup>c)</sup>  |         |
|                                    | (n = 12)                          | (n = 9) | (n = 16)                                | (n = 11) |                    |         |
| V $\alpha$ 7                       | 0                                 | 0       | <u>3 (19%)</u>                          | 1 (9%)   | 2%                 |         |
| V $\alpha$ 14                      | <u>4 (33%)</u>                    | 0       | 0                                       | 0        | 7%                 |         |
| V $\alpha$ 20                      | 0                                 | 0       | <u>3 (19%)</u>                          | 0        | 2%                 |         |
| Donor                              | Association                       |         | Expected frequency <sup>d)</sup>        |          | Found frequency    |         |
| GM                                 | V $\alpha$ 14/V $\beta$ h.s. 4    |         | 0.33 $\times$ 0.55 = 0.18               |          | 2/12 = 0.17        |         |
| SR                                 | V $\alpha$ 20/V $\beta$ h.s. 4    |         | 0.19 $\times$ 0.6 = 0.11                |          | 2/16 = 0.125       |         |
|                                    | V $\alpha$ 7/V $\beta$ h.s. 1+2+3 |         | 0.19 $\times$ 0.4 = <u>0.076</u>        |          | 3/16 = <u>0.19</u> |         |
|                                    |                                   |         | 0.19 $\times$ 0.8 <sup>e)</sup> = 0.152 |          |                    |         |

a) Number and percentage of V $\alpha$  and V $\beta$  segments in productive transcripts from anti-B\*2705 CTL and in transcripts from non-anti-B27 T cells from each donor. V segments in CTL with identical TCR, and V $\beta$  segments in CTL with two productive  $\alpha$  transcripts were counted only once. V $\beta$  segments from CTL with the same  $\beta$  and different  $\alpha$  transcripts, and V $\alpha$  segments from CTL with two productive  $\alpha$  transcripts were counted separately. V $\beta$  frequencies in anti-B\*2705 CTL that were statistically different ( $p < 0.05$ ) from the respective control are underlined. For V $\alpha$ , statistically significant differences ( $p < 0.01$ ) with unselected PBL are underlined.

b) Only those V $\alpha$  subfamilies appearing more than twice in the same donor are indicated.

c) Data from [33], corresponding to 300 productive  $\alpha$  transcripts from PBL of three unrelated individuals.

d) Expected frequency among anti-B\*2705 clonotypes if V $\alpha$ /V $\beta$  association were random. This is the product of the corresponding V $\alpha$  and V $\beta$  segment frequencies. Differences between observed and expected frequencies are underlined.

e) Frequency of V $\beta$  segments from homology subgroups (h.s.) other than 4 in non-anti-B27 T cells from SR.

V $\beta$  subgroup 4 was in anti-B\*2705 CTL with widely different fine specificities (Table 1). This was not revealed in our previous study [26] because a particular fine specificity was predominant in the set of clones analyzed.

V $\beta$  skewing was independent of other  $\beta$  chain elements: if V $\beta$  segments associated with similar N+D $\beta$  plus identical J $\beta$  segments are counted only once, those from subgroup 4 still account for more than 50% of the total ( $p < 0.01$ ). Restricted V $\beta$  usage associated with high N+D $\beta$  and  $\alpha$ -chain diversity in peptide-specific responses suggests that the V $\beta$  segment is critical for some peptide epitopes [13, 14]. An important difference between these results and those reported here is that since in anti-B\*2705 CTL V $\beta$ , restriction does not correlate with fine specificity, it is unlikely to be determined by particular peptides. Our results strongly suggest that V $\beta$  segment bias is determined by the alloantigen molecule itself.

### 3.4 Non-random V $\alpha$ usage among anti-B\*2705 CTL is donor dependent

Of the 16 V $\alpha$  subfamilies found in productive transcripts from anti-B\*2705 CTL (Table 1), some appeared with greater frequency than in non-anti-B27 T cells from the same donor or in PBL from other individuals (Table 2). V $\alpha$ 14 was in 33% of the anti-B\*2705 clonotypes from GM, including three of the four most cross-reactive ones in this donor (Table 1). It was absent in the non-anti-B27 T cells tested, and in donor SR. In contrast, V $\alpha$ 20 and V $\alpha$ 7 were absent in the CTL tested from GM, but were

recurrent (19% each) in SR and, within this donor, in clonotypes of limited subtype cross-reactivity or cross-reactive with B\*2702, respectively (Table 1). They were absent (V $\alpha$ 20) or found only once (V $\alpha$ 7) among non-anti-B27 T cells from the same donor (Table 2), indicating that recurrent V $\alpha$  usage did not reflect individual differences unrelated to HLA-B27 specificity. The frequencies of V $\alpha$ 7, V $\alpha$ 14, and V $\alpha$ 20 in non-anti-B27 T cells from each donor were not statistically different from those in PBL from other individuals. In contrast, V $\alpha$ 14 in GM, and V $\alpha$ 7 and V $\alpha$ 20 in SR were significantly increased among anti-B\*2705 CTL ( $p < 0.01$  and  $p < 0.0001$ , respectively). Thus, unlike V $\beta$ , non-random V $\alpha$  usage in anti-B\*2705 CTL was donor-dependent and correlated with reaction patterns sharing common features. This indicates different V $\beta$  and V $\alpha$  selection, and distinct contribution of these segments to allospecificity.

We looked for correlations between the most frequent V $\alpha$  and V $\beta$  segments (Table 2). In GM, V $\alpha$ 14 was found with V $\beta$  subgroup 4 as expected from random association, on the basis of their respective frequencies in anti-B\*2705 clonotypes from this individual. The same was found for V $\alpha$ 20 in donor SR. V $\alpha$ 7 was found with V $\beta$  subgroups other than 4 with a frequency more than double than expected from their random association, but similar to that expected if V $\alpha$ 7 were recruited irrespective of V $\beta$  (Table 2). This suggests that the negative correlation with V $\beta$  subgroup 4 is due to the corresponding TCR being preferentially selected on the basis of V $\alpha$ 7. Thus, the most frequent V $\alpha$  and V $\beta$  segments among anti-B\*2705 CTL were selected independently of particular V $\alpha$ /V $\beta$  associations.

### 3.5 Recurrent motifs in $\beta$ -chain junctional regions

N+D $\beta$  sequence diversity in anti-B\*2705 CTL was limited at three levels (Fig. 1A). First, as described above, four different clonotypes from donor SR shared identical  $\beta$  chains. Second, three pairs of  $\beta$  transcripts used the same V $\beta$  and J $\beta$  segments: CTL 21S69 and 2SRZ (both from SR), 20.8 GRK and 13SRC (from GM and SR, respectively), and 100GRK and 47S69 (from GM and SR, respectively). N+D $\beta$  regions in each pair were very similar: in the last two pairs, the  $\beta$  chains, although from different individuals, differed only in one and two amino acid residues respectively. In addition, CTL 58GRK and 116.8GRK possessed different V $\beta$ 6 and the same J $\beta$  segments. CTL in each of these pairs showed different fine specificity and unrelated  $\alpha$  chains (Table 1). These results indicate that anti-B\*2705 TCR with highly similar  $\beta$  chains are recruited independently of specific epitopes, donors, or  $\alpha$  chains. Third, some  $\beta$  chains showed common N+D $\beta$  motifs, but distinct V $\beta$  and J $\beta$  segments. This suggests epitope-dependent selection. Indeed, some of the CTL from these groups have related reaction patterns with HLA-B27 subtypes. For instance, CTL 74GRK, and the 12SRF clonotype were cross-reactive only with B\*2703. CTL 100GRK and 122GRK were both cross-reactive with B\*2702, B\*2704 and B\*2706. CTL 47S69, 100GRK and 7S15/16S15 were all cross-reactive with B\*2701 and B\*2702. In conclusion, recurrent N+D $\beta$  motifs were multiple, each shared by few clonotypes, not donor-associated, and often not associated with shared V $\beta$  or J $\beta$  segments. This pattern suggests a restricted set of immunodominant peptide-associated determinants in anti-B\*2705 responses. It is likely that, among the highly diverse B\*2705-bound peptides [35], only those bound with high affinity are significantly immunogenic, due to correlation between MHC binding affinity and immunogenicity [36]. Analogous patterns of limited N+D $\beta$  diversity have not been observed in other alloreactive responses [18-21]. In a recent study [24] two anti-HLA-B35 TCR were very similar, and showed N+D $\beta$  homology with two of five  $\beta$ -chain clones from an anti-B35 T cell line from the same individual. Although this pattern is different from that found among anti-HLA-B27 CTL, it also suggests immunodominant allostimulation by particular determinants.

### 3.6 $\alpha$ -chain junctional diversity and recurrent J $\alpha$ usage

Two pairs of clonotypes had similar  $\alpha$  chains (Fig. 1B). They used the same V $\alpha$  subfamily (33S69 and 11SRY/40SRY, from SR) or V $\alpha$  segments in the same subgroup (CTL 58GRK and 122GRK, from GM), identical J $\alpha$  segments, and N-regions of the same or similar length. The corresponding  $\beta$  chains were very different, suggesting recruitment based mainly on their  $\alpha$  chains. Three of these CTL used V $\beta$  subgroups other than 4. Thus, as with the negative correlation of V $\alpha$ 7 with V $\beta$  subgroup 4 (see above), an explanation to the use of other V $\beta$  subgroups is that anti-B\*2705 TCR whose  $\alpha$  chains contribute sufficiently to allospecificity can bypass the requirement for V $\beta$  subgroup 4.

$\alpha$ -chain diversity was mainly limited by restricted J $\alpha$  usage (Fig. 1B and Table 3). Seven J $\alpha$  segments accounted for 61% of the productive transcripts from GM plus SR.

**Table 3.** Recurrent J $\alpha$  segments among productive transcripts from anti-B\*2705 CTL.

| J $\alpha$ segment <sup>a)</sup> | Donor                      |                            | Total                      | % in PBL <sup>b)</sup> |
|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|------------------------|
|                                  | GM                         | SR                         |                            |                        |
|                                  | <i>n</i> (%) <sup>c)</sup> | <i>n</i> (%) <sup>c)</sup> | <i>n</i> (%) <sup>c)</sup> |                        |
| HAVT01                           | 3 (25%)                    | 0                          | 3 (11%)                    | 1%                     |
| 122GRK                           | 2 (17%)                    | 1 (6%)                     | 3 (11%)                    | 2.7%                   |
| 1GRJa06                          | 1 (8%)                     | 2 (12.5%)                  | 3 (11%)                    | 1.3%                   |
| HAVT33                           | 1 (8%)                     | 1 (6%)                     | 2 (7%)                     | 1.3%                   |
| AG212                            | 0                          | 2 (12.5%)                  | 2 (7%)                     |                        |
| HAVP10                           | 0                          | 2 (12.5%)                  | 2 (7%)                     | 3.3%                   |
| HAVP36                           | 1 (8%)                     | 1 (6%)                     | 2 (7%)                     | 3%                     |
| Total                            | 8 (67%)                    | 9 (56%)                    | 17 (61%)                   | 13.9%                  |

- a) J $\alpha$  segments appearing more than once in the CTL analyzed. J $\alpha$  122 GRK has the same amino acid sequence over the length reported than J $\alpha$ 17.10 (AA) in [33]. The total frequency of these J $\alpha$  segments in each donor or in both donors together was significantly increased ( $p < 0.0001$ ) when compared with unselected PBL.
- b) Data from [33].
- c) Percent values are relative to 12, 16, and 28 different productive transcripts from donors GM, SR, or both, respectively.

Together these segments were expressed in 13.9% of PBL [33]. That four of these J $\alpha$  segments were found in both individuals indicates that J $\alpha$  recurrence was not donor-dependent. Similar results were obtained in the two donors. Five J $\alpha$  segments that together accounted for 9.3% of PBL were in 67% of the productive transcripts from GM. Six J $\alpha$  segments, accounting for 12.9% of PBL, were in 56% of the productive transcripts from SR. The increased joint use of these J $\alpha$  segments in each or in both donors, relative to unselected PBL, was statistically significant ( $p < 0.0001$ ). Although J $\alpha$  segments in PBL from GM and SR were not analyzed, a previous analysis failed to detect statistically significant variation in J $\alpha$  usage among individuals [33]. There was no correlation between J $\alpha$  and fine specificity. In most cases, recurrent J $\alpha$  segments associated with unrelated V $\alpha$  segments, indicating that J $\alpha$  skewing was not due to structural constraints related to V-J joining. These results indicate selective J $\alpha$  usage among anti-B\*2705 CTL that is not epitope-specific or donor-dependent, and is not associated with the sharing of other TCR elements. This type of J $\alpha$  restriction has not been reported in other alloreactive responses.

The pattern was similar to N+D $\beta$ , in that multiple J $\alpha$  segments were each used by few CTL, but differed in that N-region diversity was essentially unrestricted. Yet since J $\alpha$  are much more numerous than J $\beta$  segments, their contribution to diversity is larger. As in  $\beta$  chains, restricted  $\alpha$ -chain junctional diversity suggests recognition of multiple, but not extremely diverse, peptide-associated determinants. CTL sharing J $\alpha$  segments had unrelated N+D $\beta$  regions, and *vice versa*. No TCR with CDR3 homology in both chains were found. This indicates that CDR3 selection acted independently on either  $\alpha$  or  $\beta$  chains, and suggests preferential interaction of particular antigenic motifs with either  $\alpha$  or  $\beta$  CDR3 regions.

### 4 Concluding remarks

HLA-B27-specific TCR diversity was limited at three levels and on different structural elements: the whole  $\alpha$  or



$\beta$  chain, V $\alpha$  or V $\beta$  segments alone, and  $\alpha$  or  $\beta$  CDR3 regions. There were significant differences between  $\alpha$  and  $\beta$  chains. V $\beta$  and V $\alpha$  selection was different in the relationship to donor and fine specificity.  $\beta$ - and  $\alpha$ -chain junctional diversity was limited by recurrent N+D $\beta$  motifs and J $\alpha$  segments, respectively. These patterns indicate distinct contributions of  $\alpha$  and  $\beta$  chains to TCR specificity, and differential selection of their structural elements.

TCR with similarities in their  $\beta$  chains often had unrelated  $\alpha$  chains, and vice versa. In several instances, a particular TCR was similar to a second one in the  $\beta$  chain, and to a third TCR in the  $\alpha$  chain, the other chain being unrelated between each pair. This suggests that different allopecific epitopes can recruit distinct elements, such as a particular V segment or CDR3 motif, in either TCR chain. This explains both the multiplicity and asymmetry in the selection of  $\alpha$ - and  $\beta$ -chain elements. Different epitopes induce distinct patterns of TCR selection in peptide-specific responses [9, 12]. Within their diversity, HLA-B27 allopecific epitopes may share peptide- or alloantigen-associated structural motifs. Thus, TCR usage in this response is determined by the interplay of epitope multiplicity, their structural relationships, and preference of distinct epitopes for different TCR elements. It is therefore likely that there is no general rule for TCR usage in alloreactivity. Indeed, whereas non-random selection is generally found in such responses [18-24], the precise patterns are variable.

Except for V $\alpha$ , limited influence of the responder on skewed usage of other TCR elements was indicated by the finding of such elements in both donors. However, although unrelated, GM and SR shared HLA-B7, and this correlated with some similarities in their anti-B27 CTL responses [27]. Thus, we do not rule out an additional influence on TCR usage in donors of less-related phenotype. Preferred usage of V $\beta$  subgroup 4 was a major donor- and epitope-independent feature. Use of other V $\beta$  subgroups was often associated with shared  $\alpha$ -chain elements, suggesting that  $\alpha$  chain-targeted selection was able to overcome the preference for V $\beta$  subgroup 4. This subgroup was not found among B27-restricted CTL from HLA-B27<sup>+</sup> individuals, and in one donor, most of the V $\beta$  segments from this subgroup found among anti-B27 CTL were not detected [37]. It is possible that TCR using V $\beta$  segments preferred in recognition of HLA-B27 as non-self may be more or less depleted in HLA-B27<sup>+</sup> individuals, depending on their whole HLA phenotype. This might condition T cell responses in these individuals and, as long as T cells are involved in pathogenesis of spondyloarthropathies [38, 39], influence disease susceptibility.

We thank our colleagues Mark Alter, Rafael Bragado, Begoña Galocha, and Pilar Lauzurica for their help. This work was supported by grant SAL 9110408 from the Plan Nacional de I+D. D.F.B. is a fellow from the Fundación Caja de Madrid. We thank the Fundación Ramón Areces for an institutional grant to the C.B.M.S.O.

Received March 9, 1995; in revised form May 18, 1995; accepted June 16, 1995.

## 5 References

- Rammensee, H. G., Falk, K. and Rötzschke, O., *Annu. Rev. Immunol.* 1993. 11: 213.
- Heath, W. R., Kane, K. P., Mescher, M. F. and Sherman, L. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991. 88: 2102.
- Sherman, L. and Chattopadhyay, S., *Annu. Rev. Immunol.* 1993. 11: 385.
- Rötzschke, O., Falk, K., Faath, S. and Rammensee, H. G., *J. Exp. Med.* 1991. 174: 1054.
- Villadangos, J. A., Galocha, B. and López de Castro, J. A., *J. Immunol.* 1994. 152: 2317.
- Chothia, C., Boswell, D. R. and Lesk, A. M., *EMBO J.* 1988. 7: 3745.
- Davis, M. M. and Bjorkman, P. J., *Nature* 1988. 334: 395.
- Claverie, J. M., Prochnicka-Chaloufour, A. and Bougueleret, L., *Immunol. Today* 1989. 10: 10.
- Jorgensen, J. L., Esser, U., Fazekas de St. Groth, B., Reay, P. A. and Davis, M. M., *Nature* 1992. 355: 224.
- White, J., Pullen, A., Choi, K., Marrack, P. and Kappler, J. W., *J. Exp. Med.* 1993. 177: 119.
- Patten, P. A., Rock, E. P., Sonoda, T., Fazekas de St. Groth, B., Jorgensen, J. L. and Davis, M. M., *J. Immunol.* 1993. 150: 2281.
- Casanova, J. L. and Maryanski, J. L., *Immunol. Today* 1993. 14: 391.
- Casanova, J. L., Romero, P., Widmann, C., Kourilsky, P. and Maryanski, J. L., *J. Exp. Med.* 1991. 174: 1371.
- Boitel, B., Ermonval, M., Panina-Bordignon, P., Mariuzza, R. A., Lanzavecchia, A. and Acuto, O., *J. Exp. Med.* 1992. 175: 765.
- Haberman, A. M., Moller, C., McCree, D. and Gerhard, W. U., *J. Immunol.* 1990. 145: 3087.
- Taylor, A. H., Haberman, A. M., Gerhard, W. and Caton, A. J., *J. Exp. Med.* 1990. 172: 1643.
- Beal, S. S., Lawrence, J. V., Bradley, D. A., Mattson, D. H., Singer, D. S. and Biddison, W. E., *J. Immunol.* 1987. 139: 1320.
- Geiger, M. J., Gorski, J. and Eckels, D. D., *J. Immunol.* 1991. 147: 2082.
- Hurley, C. K., Steiner, N., Wagner, A., Geiger, M. J., Eckels, D. D. and Rosen-Bronson, S., *J. Immunol.* 1993. 150: 1314.
- Bill, J., Yagüe, J., Appel, V. B., White, J., Horn, G., Erlich, H. A. and Palmer, E., *J. Exp. Med.* 1989. 169: 115.
- Goronzy, J. J., Xie, C., Hu, W., Lundy, S. K. and Weyand, C. M., *J. Immunol.* 1993. 151: 825.
- Shirwan, H., Chiu, D., Makowka, L. and Cramer, D. V., *J. Immunol.* 1993. 151: 5228.
- Hall, B. L., Hand, S. L., Alter, M. D., Kirk, A. D. and Fina, O. J., *Transpl. Immunol.* 1993. 1: 217.
- Steinle, A., Reinhardt, C., Jantzer, P. and Schendel, D. J., *J. Exp. Med.* 1995. 181: 503.
- Bragado, R., Lauzurica, P., López, D. and López de Castro, J. A., *J. Exp. Med.* 1990. 171: 1189.
- Lauzurica, P., Bragado, R., López, D., Galocha, B. and López de Castro, J. A., *J. Immunol.* 1992. 148: 3624.
- López, D., Carca-Hoyo, R. and López de Castro, J. A., *J. Immunol.* 1994. 152: 5557.
- Toyonaga, B. and Mak, T. W., *Annu. Rev. Immunol.* 1987. 5: 585.
- Wilson, R. K., Lai, E., Concannon, P., Barth, R. K. and Hood, L. E., *Immunol. Rev.* 1988. 101: 149.
- Robinson, M. A., *J. Immunol.* 1991. 146: 4392.
- Hall, M., Jaeger, E. E. M., Bontrop, R. E. and Lanchbury, J. S., *Eur. J. Immunol.* 1994. 24: 641.
- Roman-Roman, S., Ferradini, L., Azocar, J., Genevée, C., Hercend, T. and Triebel, F., *Eur. J. Immunol.* 1991. 21: 927.
- Moss, P. A. H., Rosenberg, W. M. C., Zintzaras, E. and Bell, J. I., *Eur. J. Immunol.* 1993. 23: 1153.
- Kelly, J. M., Sterry, S. J., Cose, S., Turner, S. J., Fecondo, J., Rodda, S., Fink, P. J. and Carbone, F. R., *Eur. J. Immunol.* 1993. 23: 3318.
- Jardetzky, T. S., Lane, W. S., Robinson, R. A., Madden, D. R. and Wiley, D. C., *Nature* 1991. 353: 326.
- Sette, A., Vitiello, A., Rehman, B., Fowler, P., Nayersina, R., Oseroff, C., Yuan, L., Ruppert, J., Sidney, J., del Guer-

- cio, M. F., Southwood, S., Kubo, R. T., Chesnut, R. W., Grey, H. M. and Chisari, F. V., *J. Immunol.* 1994. 153: 5586.
- 37 Bowness, P., Moss, P. A. H., Rowland-Jones, S., Bell, J. I. and McMichael, A. J., *Eur. J. Immunol.* 1993. 23: 1417.
- 38 Benjamin, R. J. and Parham, P., *Immunol. Today* 1990. 11: 137.
- 39 López de Castro, J. A., *Curr. Opin. Rheumatol.* 1994. 6: 371.
- 40 López, D., Barber, D. F., Villadangos, J. A. and López de Castro, J. A., *J. Immunol.* 1993. 150: 2675.
- 41 Rojo, S., García, F., Villadangos, J. A. and López de Castro, J. A., *J. Exp. Med.* 1993. 177: 613.
- 42 Li, Y., Szabo, P., Robinson, M. A., Dong, B. and Posnett, D. N., *J. Exp. Med.* 1990. 171: 221.
- 43 Ferradini, L., Roman-Roman, S., Azocar, J., Michalaki, H., Triebel, F. and Hercend, T., *Eur. J. Immunol.* 1991. 21: 935.
- 44 Plaza, A., Kono, D. H. and Theofilopoulos, A. N., *J. Immunol.* 1991. 147: 4360.
- 45 Obata, F., Tsunoda, M., Kaneko, T., Ito, K., Ito, I., Masewicz, S., Michelson, E. M., Ollier, W. E. R., Pawelec, G., Cella, M., Ferrara, G. B. and Kashiwagi, N., *Immunogenetics* 1993. 38: 67.

**TITLE:**

T-CELL RECEPTOR USAGE IN ALLOREACTIVITY AGAINST HLA-B\*2703  
REVEALS SIGNIFICANT CONSERVATION OF THE ANTIGENIC  
STRUCTURE OF B\*2705.

**Authors:** Domingo F. Barber, David Obeso, Rosa García-Hoyo, José A. Villadangos, and José A. López de Castro.

**Affiliation:** Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (C.S.I.C.-U.A.M.),  
Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Cantoblanco,  
28049 Madrid. SPAIN.

**Running Title:** T-cell receptors against B\*2703

**Keywords:** T-cell Receptor/Alloreactivity/HLA-B27/B\*2703

**Correspondence:** Dr. José A. López de Castro. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias. Cantoblanco, 28049 Madrid (SPAIN). (Fax: 34-1-397 83 44; Phone: 34-1-397 80 50).

**Footnotes:** This work was supported by grant SAF 94/0891 from the Plan Nacional de I+D. D.F.B. and D.O. are fellows of the Fundación Caja de Madrid and Ministerio de Educación y Ciencia, respectively. We thank the Fundación Ramón Areces for an institutional grant to the C.B.M.S.O.

## Summary

B\*2703 is an exceptional HLA-B27 molecule in that it differs from the most common B\*2705 subtype by a unique amino acid change (His59) altering N-terminal peptide anchorage. To assess how this unusual feature affects the antigenic structure of HLA-B27, TCR usage by alloreactive CTL raised against B\*2703 from two individuals was analyzed. Limited heterogeneity of the few CTL recognizing B\*2703 epitopes that are absent or altered in B\*2705 was revealed by: 1) identity of TCR in two pairs of such CTL clones, 2) identity of  $\beta$  chains, paired to distinct  $\alpha$  chains, in two clonotypes, and 3) almost identical fine specificity of these two clonotypes with site-specific HLA-B27 mutants. These results indicate that B\*2703 "private" epitopes are rare. TCR usage among anti-B\*2703 CTL was analogous as in anti-B\*2705 responses in the predominant and donor-independent usage of  $V\beta$  segments from homology subgroup 4, more moderate and donor-dependent  $V\alpha$  skewing, N+D $\beta$  diversity limited by motifs shared among clonotypes, and restricted  $J\alpha$  heterogeneity. Homology of N+D $\beta$  motifs and  $J\alpha$  segments of anti-B\*2703 with anti-B\*2705 TCR suggested significant sharing of peptide-associated epitopes between both subtypes. The results indicate that allospecific TCR are recruited by B\*2703 following similar rules as in the anti-B\*2705 response, and suggest that the B\*2703 change keeps unaltered much of the antigenic structure of the molecule relative to B\*2705.

## 1 Introduction

Alloreactive responses against MHC antigens are directed against multiple antigenic determinants involving many constitutively bound peptides. The structure of the allo-MHC molecule, to which the responder is not tolerized, is likely to contribute prominently to the alloantigenic epitopes. For this reason, and also for factors affecting peptide immunogenicity, such as their expression level and affinity for the MHC protein [1], alloreactive CTL are heterogeneous in their degree of peptide specificity [2], and may even be peptide-independent [3,4]. Thus, the basis for TCR selection in alloreactivity is likely to be different from self-restricted responses both in the role of the alloantigen molecule and in the relevance of peptide-associated motifs.

High but non-random TCR diversity has generally been detected in alloreactive responses [5-12]. We have recently reported that in the anti-B\*2705 response TCR diversity is limited in a complex way by restrictions affecting most of the structural elements of  $\alpha$  and  $\beta$  chains, except N $\alpha$ -regions and J $\beta$  segments [13].

HLA-B\*2703 is a subtype with exceptional structural and antigenic properties. It is unique among class I HLA molecules in the nature of its single amino acid difference with B\*2705, which involves substitution of His for the otherwise conserved Tyr59 [14,15]. Tyr59 contributes to stabilizing peptide binding to the class I molecule by interacting with the peptidic N-termini through a network of hydrogen bonds that also involves other residues in the A pocket of the molecule [16-18]. Disruption of this network by the His59 change in B\*2703 leads to defective antigenicity and peptide presentation relative to B\*2705, together with reinforcement of pocket B interactions with the Arg2 motif of B27-bound peptides [19-21]. Our previous studies suggested that B\*2703 can present only a subset of the B\*2705-bound peptides and alloantigenic epitopes, while acquiring few "private" determinants or little capacity to present peptides

not presented by B\*2705.

To further investigate the antigenic features of B\*2703 we have now analyzed the structure and usage of the TCR expressed by alloreactive CTL raised against this subtype. The results allow us, by comparison with our previous analyses of anti-B\*2705 TCR [13,22,23], to assess how the single change in B\*2703 affects the repertoire of the TCR recruited in the alloreactive response to this subtype and, therefore, its antigenic structure.

## **2 Materials and methods.**

### **2.1 T-cell clones and TCR analysis**

Anti-B\*2703 CTL clones from two unrelated donors DL (HLA-A29, 31; B39, 44; DR2, 7) and GM (HLA-A1, 24; B7, 8; DR1, 3) were analyzed. Isolation, culture conditions, and fine specificity of the CTL used in this study were previously described [19]. Non-anti-B27, but otherwise unselected T-cell clones from the same individuals were analyzed as controls.

RNA extraction, TCR cDNA synthesis, PCR amplification with V $\alpha$  and V $\beta$  subfamily-specific primers, direct sequencing, and statistical analysis of gene segment usage was carried out exactly as previously described [13].

### **2.2 CTL assays with HLA-B27 mutants**

For fine specificity analysis of anti-B\*2703 CTL with HLA-B27 mutants, HMy2.C1R transfectants with high expression of B\*2703, B\*2705 or each of 15 B\*2705 site-specific mutants were used as target cells. Generation of these transfectants, their HLA-B27 expression levels, and culture conditions have been previously described [20]. A standard <sup>51</sup>Cr-release cytotoxicity assay was used [24].

### 3 Results

#### 3.1 General remarks

TCR were analyzed from 16 and 15 anti-B\*2703 CTL clones of known fine specificity from donors DL and GM, respectively. Identity of TCR among some of the CTL resulted in 15 and 12 distinct clonotypes, respectively (Table 1). Partial V segment sequences ranging from 31 to 240 bp, and complete N/N+D and J segment sequences were determined. Except CTL 23GLM, which showed two productive  $\alpha$  transcripts, all the CTL clones analyzed had single productive  $\alpha$  and  $\beta$  transcripts.

#### 3.2 Limited heterogeneity of CTL recognizing B\*2703 "private" epitopes

Only 6 of 36 anti-B\*2703 CTL clones from donors GM plus DL did not lysed LCL expressing B\*2705 or other subtypes in a previous study [19]. The TCR of these CTL clones were analyzed. As shown in Table 1, the two CTL clones from DL, 13DCJ and 31DCJ expressed the same TCR and were therefore a same clonotype. CTL 42.8GLM and 71GCP, from GM, were also a single clonotype. In addition, these two CTL expressed the same  $\beta$  chain as CTL 74.8GCP, from the same donor, but a totally unrelated  $\alpha$  chain.

Analysis of the reaction patterns of CTL 71GCP and 74.8GCP with an extensive panel of B\*2705 mutants (Figure 1) indicated that these two CTL recognized B\*2705 on C1R cells less efficiently than B\*2703, and had almost identical fine specificity. CTL 39GLM, which expressed an unrelated TCR (Table 1), did not recognized B\*2705 or any of the mutants (Figure 1). These results indicate a restricted heterogeneity of CTL clones recognizing B\*2703 epitopes that are absent or altered in B\*2705. They also indicate that the specificity of CTL 42.8GLM/71GCP and 74.8GCP is mostly determined by the  $\beta$  chain. However, since CTL 71GCP killed B\*2703<sup>+</sup> LCL [19] or C1R transfectants more efficiently than CTL 74.8GCP (see Figure 1 legend), a role of the respective  $\alpha$  chains

in TCR affinity cannot be ruled out.

### 3.3 V $\beta$ and V $\alpha$ segment usage among anti-B\*2703 CTL

About half of the anti-B\*2703 CTL analyzed used V $\beta$  segments from homology subgroup 4 (Table 2). This predominance was statistically significant in each donor ( $p < 0.05$ ) and in the total from both donors ( $p < 0.01$ ). V $\beta$ 13 and V $\beta$ 17 were the most frequently used subfamilies, accounting for 9 of the 14 V $\beta$  segments from subgroup 4. These results indicate a donor-independent bias in V $\beta$  usage among anti-B\*2703 CTL, which is the same as among anti-B\*2705 CTL [13].

No V $\alpha$  skewing was found in GM: any particular V $\alpha$  subfamily was observed no more than twice among the 13 productive  $\alpha$  transcripts from this donor (Table 1). In contrast, V $\alpha$ 14 was increased ( $p < 0.01$ ) in DL, as it appeared in 4 (27%) of the 15 anti-B\*2703 clonotypes from this donor (Table 2). V $\alpha$ 14 was associated with V $\beta$  subgroup 4 with the frequency expected from random association. However, two of the CTL expressing V $\alpha$ 14 also expressed V $\beta$ 7, a subfamily which did not appear in any other of the anti-B\*2703 CTL analyzed (Table 1). The frequency of this association was higher than expected by chance (Table 2). Since these TCR did not show homology in other regions, this suggests that they were selected on the basis of their particular V $\alpha$ /V $\beta$  combination. Other V $\alpha$  subfamilies were found no more than twice in DL, indicating an otherwise diverse V $\alpha$  usage also in this donor.

### 3.4 V $\beta$ -J $\beta$ associations and restricted N+D $\beta$ diversity

Besides the sharing of a same  $\beta$  chain paired to unrelated  $\alpha$  chains by CTL 42.8GLM/71GCP and 74.8GCP (see above), some anti-B\*2703 CTL showed  $\beta$  chains with the same V $\beta$  subfamily and J $\beta$  segment (Figure 2A). V $\beta$ 17.1 was associated to J $\beta$ 2.2 in 2 clonotypes (81GCP and 12DCJ) and to J $\beta$ 1.1 in 3 clonotypes (42GCP, 23GLM, and 70DCI) from different donors. V $\beta$ 13.4 was associated to J $\beta$ 1.2 in CTL



29GCP/54GCP and 56GLM, from the same donor. Finally, V $\beta$ 5 was associated to J $\beta$ 1.1 in the two clonotypes, from different donors, that expressed this V $\beta$  segment (62GCP/63GLM and 81DCJ). Some clonotypes with the same V $\beta$ -J $\beta$  combination also had N+D $\beta$  regions sharing common motifs. For example, the  $\beta$  chains of CTL 81GCP and 12DCJ differed by only 3 amino acid residues, located in the junctional region. In addition, the N+D $\beta$  regions of CTL 42GCP and 23 GLM shared the RG motif. In other cases the junctional regions were unrelated.

As in the anti-B\*2705 response [13], most of the  $\beta$ -chain sequences could be classified in subgroups, each encompassing few clonotypes, on the basis of shared N+D $\beta$  motifs (Figure 2A). This suggests that immunodominant peptide-associated epitopes in the anti-B\*2703 response are not highly diverse.

### **3.5 J $\alpha$ skewing limits $\alpha$ -chain junctional diversity**

No N-region restriction was apparent among the 28 productive transcripts analyzed from anti-B\*2703 CTL. However, junctional diversity was limited by recurrent J $\alpha$  segments: of 19 J $\alpha$  segments used, 9 appeared in more than 1 clonotype (Figure 2B). These 9 J $\alpha$  segments accounted for 64% of the  $\alpha$  transcripts analyzed, although together these segments are in only 19% of the productive transcripts from unselected PBL (Table 3). This difference was statistically significant ( $p < 0.0001$ ). Recurrent J $\alpha$  were associated to unrelated V $\alpha$  segments, except in CTL 48GLM and 12DCJ (Figure 2B). Similarly as the N+D $\beta$  restrictions, this pattern of J $\alpha$  skewing suggests that much of the anti-B\*2703 response is directed against a relatively restricted set of immunodominant peptide-associated determinants. CTL with recurrent J $\alpha$  segments often did not shared N+D $\beta$  motifs, indicating that recurrent motifs in the junctional regions of  $\alpha$  and  $\beta$  chains are selected independently of each other.

#### 4 Discussion

A striking feature of the anti-B\*2703 alloreactive response is the low frequency of CTL clones not crossreactive with other HLA-B27 subtypes. In a previous study [19] most of the anti-B\*2703 CTL crossreacted with B\*2705 and, less frequently, other subtypes. Only 6 of 36 anti-B\*2703 CTL lysed exclusively target LCL expressing B\*2703. The restricted heterogeneity of these CTL revealed by analysis of their TCR provides strong evidence that "private" epitopes or those that are altered or less expressed on B\*2705 are rare in B\*2703.

TCR usage by anti-B\*2703 CTL is similar to that in anti-B\*2705 responses [13] in the following features: 1) larger  $\alpha$  than  $\beta$  chain diversity, 2) predominant and donor-independent usage of V $\beta$  subgroup 4, 3) donor-dependent V $\alpha$  skewing, 4) N+D $\beta$  diversity restricted by multiple motifs (combinations of amino acid residues) each shared by few clonotypes, and 5) restricted J $\alpha$  heterogeneity. In spite of these similarities, some differences were also observed. A first one was in the use of predominant V $\alpha$  subfamilies: whereas V $\alpha$ 14 was increased among anti-B\*2705 CTL from GM [13], there was no increase of this or any other V $\alpha$  subfamily in the anti-B\*2703 response from this donor. In contrast, V $\alpha$ 14 was increased among anti-B\*2703 CTL from DL. The small number of anti-B\*2705  $\alpha$ -chain sequences reported from this donor [23] is not sufficient for a comparison. Some of the recurrent N+D $\beta$  motifs in anti-B\*2703 CTL (i.e.: RA, GTG, etc.) were also found among anti-B\*2705 CTL [13], but other were detected only in the response against one of these subtypes. Similarly, of the 19 J $\alpha$  segments used by the anti-B\*2703 CTL, 12 (63%) were also found among anti-B\*2705 CTL. The sharing of structural motifs in the junctional regions of  $\alpha$  and  $\beta$  chains between anti-B\*2703 and anti-B\*2705 TCR strongly suggests overlap of peptide associated epitopes, in agreement with the large T-cell crossreactivity between both subtypes [19], and their similarities in

peptide binding [21,25]. Together the results demonstrate that similar rules apply to alloreactive TCR selection by B\*2703 and B\*2705, and that the corresponding TCR repertoires have a significant homology in their structural elements. The data provide molecular evidence for the antigenic similarity between both subtypes, and suggest that this is due both to structural similarity of the HLA-B27 molecules, and to significant sharing of peptide-associated epitopes. The differences in V $\alpha$  usage and junctional diversity of anti-B\*2703 relative to anti-B\*2705 CTL could be explained by the different immunogenic relevance in each subtype of epitopes common to both, without requiring new B\*2703-specific epitopes. This could be achieved, for instance, through distinct affinity, expression level, or both, of particular peptides presented by both subtypes.

The range of diversity of the anti-B\*2703 TCR analyzed here is similar to that of the anti-B\*2705 TCR reported previously [13]. This suggests that, in spite of the defective antigenicity of B\*2703 relative to B\*2705 [19,20] the antigenic complexity of B\*2703 is sufficient as to impose no more restriction than B\*2705 to allospecific TCR selection. Indeed, although of limited resolution for the many peptides involved, the HPLC profiles of the peptides bound to B\*2703 or to B\*2705 on HMy2.C1R cells are of comparable complexity (F. García and our unpublished observations).

B\*2703 has not been found associated to spondyloarthritis in population studies, but this might be due to the fact that this subtype is predominant only in an african population in which B27-associated disease is very rare [26,27], so that appropriate epidemiological studies are difficult to carry out. On the basis of the similarities in the T-cell response against this subtype relative to B\*2705, it is conceivable that B\*2703 does not protect from disease. Indeed, B\*2703<sup>+</sup> individuals suffering from spondyloarthritis have been recently reported [28].

We have previously suggested that the predominance of V $\beta$  subgroup 4 in the

anti-B\*2705 CTL response reflects involvement of these segments in recognition of the HLA-B27 molecule, rather than B27-bound peptides [13]. That the same subgroup is preferentially recruited by B\*2703 indicates that the His59 change in this subtype does not alter the structure of the molecule or its bound peptides in a way that affects the preferential interaction of HLA-B27 with V $\beta$  segments of this subgroup. The basis for this preference remains unknown, but it is noteworthy that HLA-B27-restricted CTL specific for *Yersinia enterocolitica* or self antigens from patients with reactive arthritis also showed preferential usage of V $\beta$  segments from subgroup 4 [29]. Moreover, the frequency of these V $\beta$  segments among B27-directed autoreactive CTL clonotypes in the same study (57%) was similar to that found among anti-B\*2705 or anti-B\*2703 alloreactive CTL. The relevance of this subgroup for HLA-B27 recognition both in alloreactivity and in B27-associated disease identifies a potential target for immunotherapeutic intervention that might be worth exploring in further depth.

### **Acknowledgements**

We thank our colleagues Rafael Bragado and Begoña Galocha for their help, and Elisabeth Märker-Hermann for pre-prints.

## 5 References

- 1 Sette, A., Vitiello, A., Reherman, B., Fowler, P., Nayersina, R., Kast, W.M., Melief, C.J., Oseroff, C., Yuan, L., Ruppert, J. and et al, *J. Immunol.* 1994. 153: 5586.
- 2 Rotzschke, O., Falk, K., Faath, S. and Rammensee, H.G. *J. Exp. Med.* 1991. 174: 1059.
- 3 Elliott, T.J. and Eisen, H.N. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1990. 87: 5213.
- 4 Villadangos, J.A., Galocha, B. and Lopez de Castro, J.A. *J. Immunol.* 1994. 152: 2317.
- 5 Beall, S.S., Lawrence, J.V., Bradley, D.A., Mattson, D.H., Singer, D.S. and Biddison, W.E. *J. Immunol.* 1987. 139: 1320.
- 6 Geiger, M.J., Gorski, J. and Eckels, D.D. *J. Immunol.* 1991. 147: 2082.
- 7 Hurley, C.K., Steiner, N., Wagner, A., Geiger, M.J., Eckels, D.D. and Rosen Bronson, S. *J. Immunol.* 1993. 150: 1314.
- 8 Bill, J., Yague, J., Appel, V.B., White, J., Horn, G., Erlich, H.A. and Palmer, E. *J. Exp. Med.* 1989. 169: 115.
- 9 Goronzy, J.J., Xie, C., Hu, W., Lundy, S.K. and Weyand, C.M. *J. Immunol.* 1993. 151: 825.
- 10 Shirwan, H., Chi, D., Makowka, L. and Cramer, D.V. *J. Immunol.* 1993. 151: 5228.
- 11 Hall, B.L., Hand, S.L., Alter, M.D., Kirk, A.D. and Finn, O.J. *Transpl. Immunol.* 1993. 1: 217.
- 12 Steinle, A., Reinhardt, C., Jantzer, P. and Schendel, D.J. *J. Exp. Med.* 1995. 181: 503.
- 13 Barber, D.F., Lopez, D. and Lopez de Castro, J.A. *Eur. J. Immunol.* 1995. 25:

- 2479.
- 14 Rojo, S., Aparicio, P., Hansen, J.A., Choo, S.Y. and Lopez de Castro, J.A. *J. Immunol.* 1987. 139: 3396.
  - 15 Choo, S.Y., St.John, T., Orr, H.T. and Hansen, J.A. *Hum. Immunol.* 1988. 21: 209.
  - 16 Saper, M.A., Bjorkman, P.J. and Wiley, D.C. *J. Mol. Biol.* 1991. 219: 277.
  - 17 Madden, D.R., Gorga, J.C., Strominger, J.L. and Wiley, D.C. *Cell* 1992. 70: 1035.
  - 18 Madden, D.R. *Annu. Rev. Immunol.* 1995. 13: 587.
  - 19 Lopez, D., Garcia Hoyo, R. and Lopez de Castro, J.A. *J. Immunol.* 1994. 152: 5557.
  - 20 Villadangos, J.A., Galocha, B., Garcia Hoyo, R., Lopez, D., Garcia, F. and Lopez de Castro, J.A. *Eur. J. Immunol.* 1994. 24: 2548.
  - 21 Villadangos, J.A., Galocha, B., Garcia, F., Albar, J.P. and Lopez de Castro, J.A. *Eur. J. Immunol.* 1995. 25: 2370.
  - 22 Bragado, R., Lauzurica, P., Lopez, D. and Lopez de Castro, J.A. *J. Exp. Med.* 1990. 171: 1189.
  - 23 Lauzurica, P., Bragado, R., Lopez, D., Galocha, B. and Lopez de Castro, J.A. *J. Immunol.* 1992. 148: 3624.
  - 24 Aparicio, P., Jaraquemada, D. and Lopez de Castro, J.A. *J. Exp. Med.* 1987. 165: 428.
  - 25 Tanigaki, N., Fruci, D., Vigneti, E., Starace, G., Rovero, P., Londei, M., Butler, R.H. and Tosi, R. *Immunogenetics* 1994. 40: 192.
  - 26 Hill, A.V., Allsopp, C.E., Kwiatkowski, D., Anstey, N.M., Greenwood, B.M. and McMichael, A.J. *Lancet* 1991. 337: 640.
  - 27 Khan, M.A. *Curr. Opin. Rheumatol.* 1995. 7: 263.

- 28 Feltkamp, T.E.W., Khan, M.A. and Lopez de Castro, J.A. *Immunol. Today* 1996.  
*In press.*
- 29 Duchmann, R., May, E., Ackermann, B., Goergen, B., Meyer zum Büschenfelde, K.-H. and Märker-Hermann, E. *Scand. J. Immunol.* 1995. *In press.*
- 30 Roman Roman, S., Ferradini, L., Azocar, J., Genevee, C., Hercend, T. and Triebel, F. *Eur. J. Immunol.* 1991. 21: 927.
- 31 Ferradini, L., Roman Roman, S., Azocar, J., Michalaki, H., Triebel, F. and Hercend, T. *Eur. J. Immunol.* 1991. 21: 935.
- 32 Lopez, D., Barber, D.F., Villadangos, J.A. and Lopez de Castro, J.A. *J. Immunol.* 1993. 150: 2675.
- 33 Moss, P.A., Rosenberg, W.M., Zintzaras, E. and Bell, J.I. *Eur. J. Immunol.* 1993. 23: 1153.
- 34 Chothia, C., Boswell, D.R. and Lesk, A.M. *EMBO J.* 1988. 7: 3745.

## Figure Legends

### Figure 1

Cytotoxicity of the anti-B\*2703 CTL clones 39GLM, 71GCP, and 74.8GCP towards HMy2.C1R transfectant target cells expressing B\*2705 or the B\*2705 mutants specified in the Y-axis. Mutants are named with the single-letter code of the amino acid(s) introduced followed by the position number(s) of the mutation. Results are expressed as the percent relative lysis, in which the lysis of each target is shown as a percentage of the specific lysis of the B\*2703<sup>+</sup> C1R cells at the same E:T ratio. Data are means of at least three experiments, and were obtained at 2:1, 1:1, and 0.5:1 E:T ratios with analogous results. For simplicity, only the values at the highest E:T ratio are shown. Percent specific lysis of the B\*2703<sup>+</sup> transfectant at this E:T ratio was 66%, 68%, and 33% with CTL 39GLM, 71GCP, and 74.8GCP, respectively. Percent specific lysis of HMy2.C1R cells transfected only with the pSV2neo vector was 1% with the three CTL clones.

### Figure 2

Deduced amino acid sequences of  $\beta$ - (Panel A) and  $\alpha$ -chain (Panel B) junctional regions in productive transcripts from anti-B\*2703 CTL. C-terminal ends of V segments, N/N+D $\beta$  regions, and N-terminal ends of J segments are shown. V, D, and J segments in each transcript, and the corresponding CTL are indicated. Sequences are grouped according to N+D $\beta$  (Panel A) or J $\alpha$  similarity (Panel B). Recurrent N+D $\beta$  motifs and J $\alpha$  segments are underlined. CTL clones using the same V subfamily plus the same J segments in either  $\alpha$  or  $\beta$  chains are boxed.



Table 1. TCR  $\alpha$  and  $\beta$  gene segments in productive transcripts from anti-B\*2703 CTL<sup>a)</sup>

| CTL             | Reaction Pattern<br>with subtypes | V $\alpha$ | h.s. | J $\alpha$ | V $\beta$ | h.s. | J $\beta$ | Accession Number<br>alfa/beta |
|-----------------|-----------------------------------|------------|------|------------|-----------|------|-----------|-------------------------------|
| <u>Donor DL</u> |                                   |            |      |            |           |      |           |                               |
| 13DCJ/31DCJ     | 3                                 | 14.1       | 3    | AC9        | 14        | 4    | 1.5       | U39095/U39128                 |
| 15DLH           | 3, 5                              | w29        | NA   | IGRJa04    | 13        | 4    | 2.3       | U39094/U39121                 |
| 18DLH           | 3, 5                              | 16.1       | 4    | IGRJa04    | 1         | 1    | 2.3       | U39096/U39127                 |
| 28DLH           | 3, 5                              | 3.1        | 2    | 62.119     | 13        | 4    | 2.7       | U39100                        |
| 36DLH           | 3, 5                              | w25        | NA   | HAVT06     | 12.3      | 4    | 2.7       | U39102/U39124                 |
| 81DCJ           | 3, 5                              | 13.1       | 2    | HAVT06     | 5         | 1    | 1.1       | U39115/U39141                 |
| 7DCI            | 3, 5                              | 14.1       | 3    | 122GRK     | 7.2       | 2    | 2.5       | U39118/U39140                 |
| 70DCI           | 3, 5                              | 14         | 3    | AA13       | 17.1      | 4    | 1.1       | U39114/U39138                 |
| 5DCJ            | 3, 5, 2                           | 14         | 3    | IGRJa10    | 7         | 2    | 2.7       | U39112/U39133                 |
| 37DCJ           | 3, 5, 2                           | 1.8        | 4    | AA17       | 4         | 3    | 1.1       | U39103/U39125                 |
| 5DLL            | 3, 5                              | 20.1       | 6    | AC17       | 6.4       | 1    | 2.7       | U39109/U39135                 |
| 3.8DLH          | 3, 5, 4                           | 15.1       | 1    | AB19       | 3         | 4    | 2.1       | U39105                        |
| 12DCJ           | 3, 5, 1, 2                        | 8.2        | 1    | IGRJa02    | 17.1      | 4    | 2.2       | U39093/U39120                 |
| 43DCJ           | 3, 5, 2, 4                        | 7.2        | 6    | IGRJa14    | 16.1      | 1    | 2.7       | U39108/U39132                 |
| 11DCJ           | 3, 5, 4, 6                        | 3.1        | 2    | HAVP41     | w22       | NA   | 2.1       | U39092/U39126                 |
| <u>Donor GM</u> |                                   |            |      |            |           |      |           |                               |
| 39GLM           | 3                                 | w29        | NA   | AG212      | 14        | 4    | 2.1       | U39104/U39131                 |
| 42.8GLM/71GCP   | 3                                 | 2.2        | 1    | IGRJa10    | 8.2       | 1    | 1.6       | U39107/U39134                 |
| 74.8GCP         | 3                                 | 11.1       | 7    | AC25       | 8.2       | 1    | 1.6       | U39116/U39134                 |
| 77GCP           | 3, 5                              | 12.1       | 3    | HAVT33     | w22       | NA   | 1.2       | U39117/U39139                 |
| 23GLM           | 3, 5                              | 9.1        | 4    | HAVT33     | 17.1      | 4    | 1.1       | U39097/U39129                 |
|                 |                                   |            | 14   | 3          | HAVP01    |      |           | U39098                        |
| 48GLM           | 3, 5                              | 8.2        | 1    | IGRJa02    | 6.1       | 1    | 1.6       | U39110/U39136                 |
| 62GCP/63GLM     | 3, 5                              | w25        | NA   | 62.119     | 5.3       | 1    | 1.1       | U39113/U39142                 |
| 29GCP/54GCP     | 3, 5                              | 7.2        | 6    | HAVP29     | 13.4      | 4    | 1.2       | U39101/U39123                 |
| 42GCP           | 3, 5, 2                           | 8.4        | 3    | IGRJa14    | 17.1      | 4    | 1.1       | U39106/U39130                 |
| 81GCP           | 3, 5, 4                           | w25        | NA   | HAVP01     | 17.1      | 4    | 2.2       | U39119/U39143                 |
| 26GCP           | 3, 6                              | 8.4        | 3    | HAVP10     | 12.3      | 4    | 2.3       | U39099/U39122                 |
| 56GLM           | 3, 5, 6                           | 8.1        | 1    | AA17       | 13.4      | 4    | 1.2       | U39111/U39137                 |

**Footnotes to Table 1**

a) CTL with identical TCR are grouped. Clonal reaction patterns are from [19]. Numbers indicate the subtypes that are recognized by the corresponding CTL clone on LCL targets (3 indicates recognition of B\*2703, etc). Anti-B\*2703 CTL did not cross-react with non-B27 antigens, with three exceptions: CTL 43DCJ (B7, B61), 11DCJ (B55), and 23GLM (B60, B61). V gene segment numbering was as in [13] for V $\alpha$ 1 to V $\alpha$ 22 and V $\beta$ 1 to V $\beta$ 20, and as in [30] and [31] for other V $\alpha$  and V $\beta$  subfamilies, respectively. Subfamily members were assigned when the partial sequences determined were identical to only one member of the subfamily. Besides those shown, other assigned V segment subfamily members are the following: V $\alpha$ 14(37GRK) [32] in CTL 70DCI, 5DCJ, and 23GLM, V $\alpha$ w29 [33] in CTL 15DLH and 39GLM, V $\beta$ 13(IGRb16) [31] in CTL 28DLH, and V $\beta$ 7(IGRb18) [31] in CTL 5DCJ. V segments are classified in homology subgroups (h.s.), which include those subfamilies that have more than 50% amino acid sequence identity [34]. NA: subgroup not assigned. Transcripts expressing V $\alpha$ w25, V $\alpha$ w29, and V $\beta$ w22 were amplified by crosshybridization of the V $\alpha$ 17-, V $\alpha$ 9-, and V $\beta$ 8-specific primers, respectively. The sequences of the N+D $\beta$  regions of CTL 3.8DLH and 28DLH were not determined.

Table 2. TCR V $\beta$  and V $\alpha$  segment usage among anti-B\*2703 CTL

| V $\beta$<br>Homology<br>Subgroup                            | Donor <sup>a)</sup>                         |                          |   |                          | Total                                       |                          |
|--|---|--------------------------|---|--------------------------|---|--------------------------|
|  | GM  |                          | DL  |                          | <u><math>\alpha</math>-B*2703</u><br>(N=27) | <u>Control</u><br>(N=34) |
|  | <u><math>\alpha</math>-B*2703</u><br>(N=12) | <u>Control</u><br>(N=17) | <u><math>\alpha</math>-B*2703</u><br>(N=15) | <u>Control</u><br>(N=17) |   |                          |
| 1  | 4 (33%)                                     | 8 (47%)                  | 4 (27%)                                     | 10 (59%)                 | 8 (30%)                                     | 18 (53%)                 |
| 2  | 0   | 2 (12%)                  | 2 (13%)                                     | 2 (12%)                  | 2 (7%)                                      | 4 (12%)                  |
| 3  | 0   | 3 (18%)                  | 1 (7%)                                      | 2 (12%)                  | 1 (4%)                                      | 5 (15%)                  |
| 4  | <b><u>7 (58%)</u></b>                       | 4 (24%)                  | <b><u>7 (47%)</u></b>                       | 3 (18%)                  | <b><u>14 (52%)</u></b>                      | 7 (21%)                  |
| NA   | 1 (8%)                                      | 0                        | 1 (7%)                                      | 0                        | 2 (7%)                                      | 0                        |
| <u>V<math>\alpha</math><sup>b)</sup></u><br><u>subfamily</u> | <u><math>\alpha</math>-B*2705</u><br>(N=13) | <u>Control</u><br>(N=18) | <u><math>\alpha</math>-B*2705</u><br>(N=15) | <u>Control</u><br>(N=18) | PBL <sup>c)</sup>                           |                          |
| V $\alpha$ 14  | 1 (8%)                                      | 1 (6%)                   | <b><u>4 (27%)</u></b>                       | 1 (6%)                   | 7%  |                          |
| <u>Donor</u>   | <u>Association</u>                          |                          | <u>Expected frequency<sup>d)</sup></u>      |                          | <u>Found frequency</u>                      |                          |
| DL   | V $\alpha$ 14/V $\beta$ h.s. 4              |                          | 0.27 x 0.47 = 0.127                         |                          | 2 / 15 = 0.133                              |                          |
|  | V $\alpha$ 14/V $\beta$ 7                   |                          | 0.27 x 0.13 = <b><u>0.035</u></b>           |                          | 2 / 15 = <b><u>0.133</u></b>                |                          |

**Footnotes to Table 2:**

<sup>a)</sup> Number and percentage of V $\alpha$  and V $\beta$  segments in productive transcripts from anti-B\*2703 CTL and in transcripts from non-anti-B27 T cells from each donor. V segments in CTL with identical TCR, and V $\beta$  segments in CTL with 2 productive  $\alpha$  transcripts were counted only once. V $\beta$  segments from CTL with the same  $\beta$  and different  $\alpha$  transcripts, and V $\alpha$  segments from CTL with 2 productive  $\alpha$  transcripts were counted separately. V $\beta$  frequencies in anti-B\*2703 CTL that were statistically different ( $p < 0.05$ ) from the respective control are underlined. V $\beta$  segments were classified in homology subgroups [34] as defined in Table 1. For V $\alpha$ , statistically significant differences ( $p < 0.01$ ) with unselected PBL are underlined.

<sup>b)</sup> V $\alpha$  subfamilies appearing more than twice in one donor.

<sup>c)</sup> Data from [33], corresponding to 300 productive  $\alpha$  transcripts from PBL of 3 unrelated individuals.

<sup>d)</sup> Expected frequency among anti-B\*2703 clonotypes for random V $\alpha$ /V $\beta$  association. This is the product of the corresponding V $\alpha$  and V $\beta$  frequencies. Differences with found frequencies are underlined.

**Table 3.** Recurrent J $\alpha$  segments among productive transcripts from anti-B\*2703 CTL<sup>a)</sup>

| J $\alpha$ segment | Donor   |         | Total    | % in PBL <sup>b)</sup> |
|--------------------|---------|---------|----------|------------------------|
|                    | GM      | DL      |          |                        |
|                    | N (%)   | N (%)   | N (%)    |                        |
| AA17               | 1 (8%)  | 1 (7%)  | 2 (7%)   | 2%                     |
| IGRJa10            | 1 (8%)  | 1 (7%)  | 2 (7%)   | 2%                     |
| IGRJa14            | 1 (8%)  | 1 (7%)  | 2 (7%)   | 2.3%                   |
| 62.119             | 1 (8%)  | 1 (7%)  | 2 (7%)   | 0.7%                   |
| IGRJa02            | 1 (8%)  | 1 (7%)  | 2 (7%)   | 0                      |
| HAVT33             | 2 (15%) | 0       | 2 (7%)   | 1.3%                   |
| HAVP01             | 2 (15%) | 0       | 2 (7%)   | 3%                     |
| IGRJa04            | 0       | 2 (13%) | 2 (7%)   | 3.7%                   |
| HAVT06             | 0       | 2 (13%) | 2 (7%)   | 4%                     |
| Total              | 9 (69%) | 9 (60%) | 18 (64%) | 19%                    |

<sup>a)</sup> J $\alpha$  segments appearing more than once in the CTL analyzed are indicated. Percent values are relative to 13, 15, and 28 different productive  $\alpha$  transcripts from donors GM, DL, or both, respectively. The total frequency of these J $\alpha$  segments in each or in both donors together was significantly increased ( $p < 0.0001$ ) when compared with unselected PBL.

<sup>b)</sup> Data from [33].

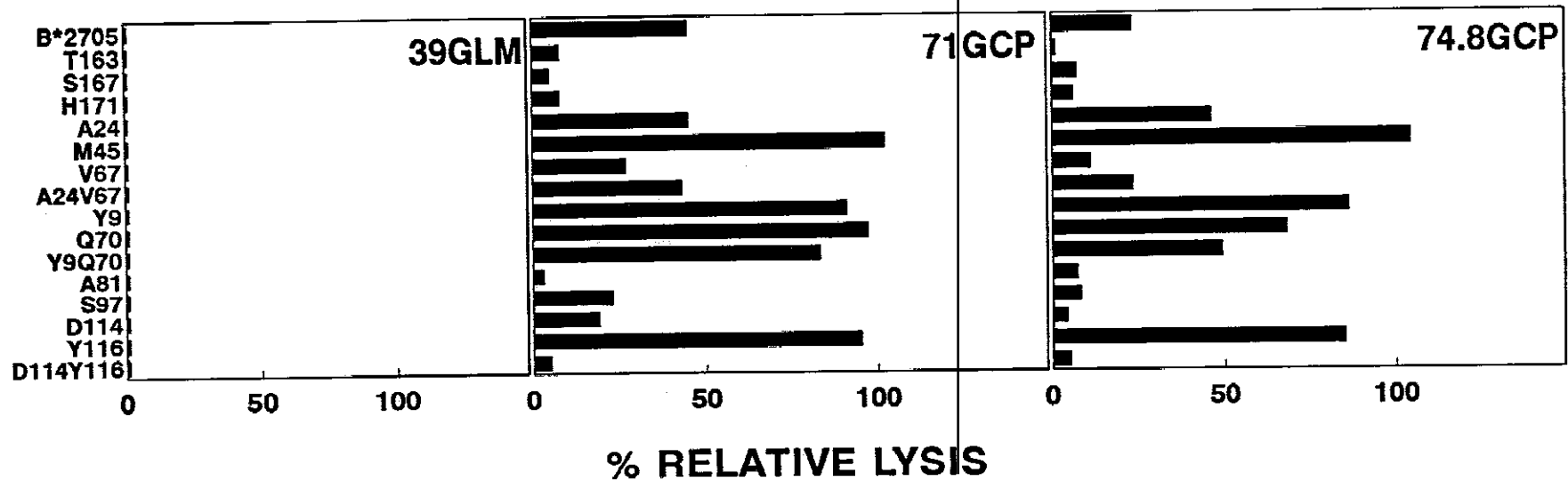


Fig 4.

A

| CTL                | Vβ    | N+Dβ             | Jβ    | Vβ          | Dβ         | Jβ         |
|--------------------|-------|------------------|-------|-------------|------------|------------|
| 42.8GLM/71GCP      |       |                  |       |             |            |            |
| 74.8GCP            | FCAS  | <u>GGGLG</u>     | SPL   | 8.2         | NA         | 1.6        |
| 26GCP              | FCAIS | <u>SGGG</u>      | TDTQ  | 12.3        | 2.1        | 2.3        |
| <b>81GCP</b>       | LCASS | <u>IGGG</u>      | TGEL  | <b>17.1</b> | <b>2.1</b> | <b>2.2</b> |
| <b>12DCJ</b>       | LCASS | <u>IAGGS</u>     | NTGEL | <b>17.1</b> | <b>2.1</b> | <b>2.2</b> |
| <b>70DCI</b>       | LCASS | <u>IGVW</u>      | EA    | <b>17.1</b> | <b>2.1</b> | <b>1.1</b> |
| 37DCJ              | LCSV  | <u>KGVSGM</u>    | NTEA  | 4           | 1.1        | 1.1        |
| <b>42GCP</b>       | LCAS  | <u>TLSVRGQM</u>  | MNTEA | <b>17.1</b> | <b>1.1</b> | <b>1.1</b> |
| <b>23GLM</b>       | LCAS  | <u>WDRGYRP</u>   | NTEA  | <b>17.1</b> | <b>1.1</b> | <b>1.1</b> |
| 11DCJ              | FCAS  | <u>KDRGT</u>     | EQ    | w22         | 1.1        | 2.1        |
| 5DCJ               | LCASS | <u>PRAFS</u>     | SYEQ  | 7           | NA         | 2.7        |
| 43DCJ              | FCASS | <u>QGLRAREVI</u> | YEQ   | 16.1        | 2.1        | 2.7        |
| 39GLM              | FCASS | <u>DGTGG</u>     | YNEQ  | 14          | 1.1        | 2.1        |
| 7DCI               | LCASS | <u>QVGTG</u>     | QETQ  | 7.2         | 1.1        | 2.5        |
| 18DLH              | FCASS | <u>VGTSG</u>     | TDTQ  | 1           | NA         | 2.3        |
| <b>62GCP/63GLM</b> | LCASS | <u>LVGAG</u>     | TEA   | <b>5.3</b>  | <b>1.1</b> | <b>1.1</b> |
| <b>29GCP/54GCP</b> | FCAS  | <u>TIFGQGG</u>   | GY    | <b>13.4</b> | <b>1.1</b> | <b>1.2</b> |
| 5DLL               | LCASS | <u>HWDTA</u>     | YEQ   | 6.4         | 1.1        | 2.7        |
| <b>56GLM</b>       | FCA   | <u>TETLG</u>     | YGY   | <b>13.4</b> | <b>1.1</b> | <b>1.2</b> |
| <b>81DCJ</b>       | LCASS | <u>LEAGVVP</u>   | EA    | <b>5</b>    | <b>2.1</b> | <b>1.1</b> |
| 36DLH              | FCAIS | <u>EPTY</u>      | EQ    | 12.3        | 2.1        | 2.7        |
| 13DCJ/31DCJ        | FCASS | <u>LDPFK</u>     | PQ    | 14          | NA         | 1.5        |
| 48GLM              | LCASS | <u>LALGEGI</u>   | YNSPL | 6.1         | 1.1        | 1.6        |
| 77GCP              | FCAS  | <u>PSKTARD</u>   | YGY   | w22         | 1.1        | 1.2        |
| 15DLH              | FCASS | <u>YSQ</u>       | TDTQ  | 13          | NA         | 2.3        |

Fig 2.

# B

| CTL           | V $\alpha$ | N+J $\alpha$        | V $\alpha$ | J $\alpha$     |
|---------------|------------|---------------------|------------|----------------|
| 77GCP         | FCAL       | <u>GGWNSGGSNYKL</u> | 12.1       | HAVT33         |
| 23GLM         | YCAL       | <u>KGNSGGSNYKL</u>  | 9.1        | HAVT33         |
| 36DLH         | FCA        | <u>GGNAGGTSYGKL</u> | w25        | HAVT06         |
| 81DCJ         | FCA        | <u>VGWAGGTSYGKL</u> | 13.1       | HAVT06         |
| 15DLH         | FCG        | <u>THNTGGFKT</u>    | w29        | IGRJa04        |
| 18DLH         | FCA        | <u>VNTGGFKT</u>     | 16.1       | IGRJa04        |
| 62GCP/63GLM   | FCA        | <u>GQTGANNL</u>     | w25        | 62.119         |
| 28DLH         | FCA        | <u>LAGANNL</u>      | 3.1        | 62.119         |
| 42GCP         | FCAI       | <u>ANYQL</u>        | 64         | IGRJa14        |
| 43DCJ         | LCA        | <u>VTPDSNYQL</u>    | 7.2        | IGRJa14        |
| <b>48GLM</b>  | FCA        | <u>PGGGFGNVL</u>    | <b>8.2</b> | <b>IGRJa02</b> |
| <b>12DCJ</b>  | FCA        | <u>ENSGVSGNVL</u>   | <b>8.2</b> | <b>IGRJa02</b> |
| 56GLM         | FCA        | <u>ASWAGTASKL</u>   | 8.1        | AA17           |
| 37DCJ         | FCVV       | <u>SEGSKL</u>       | 1.8        | AA17           |
| 23GLM         | FCAF       | <u>MTAPNQF</u>      | 14         | HAVP01         |
| 81GCP         | FCA        | <u>GQLGNQF</u>      | w25        | HAVP01         |
| 42.8GLM/71GCP | LCA        | VREG                | 2.2        | IGRJa10        |
| 5DCJ          | FCA        | FMKLNDM             | 14         | IGRJa10        |
| 29GCP/54GCP   | LCA        | VLDSNTGKL           | 7.2        | HAVP29         |
| 39GLM         | FCG        | TVNSGGYQKV          | w29        | AG212          |
| 26GCP         | FCAMR      | EPSNDYKL            | 64         | HAVP10         |
| 74.8GCP       | YCAV       | EDRVKAAGNKL         | 11.2       | AC25           |
| 13DCJ/31DCJ   | FCA        | YKAQGGSEKL          | 14.1       | AC9            |
| 7DCI          | FCA        | YSGTYKY             | 14.1       | 122GRK         |
| 70DCI         | FCAF       | RFGNEKL             | 14         | AA13           |
| 5DLL          | YCL        | VGELPDYNAGNML       | 20.1       | AC17           |
| 3.8DLH        | FCA        | ETDTGRRAL           | 15.1       | AB19           |
| 11DCJ         | FCA        | TRGGYQKV            | 3.1        | HAVP41         |



**TITLE:**

T-CELL RECOGNITION OF HLA-B27.

**Authors:** Domingo F. Barber and José A. López de Castro.

**Affiliation:** Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (C.S.I.C.-U.A.M.), Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Cantoblanco, 28049 Madrid. SPAIN.

**Correspondence:** Dr. José A. López de Castro, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias. Cantoblanco, 28049 Madrid (SPAIN). (Fax: 34-1-397 83 44; Phone: 34-1-397 80 50).

## 1 Introduction.

Strong T-cell responses to allografts led to discovery and definition of transplantation antigens. Further analyses made it possible to identify the molecules involved: peptide-presenting proteins encoded by the MHC genes. These *in vivo* responses have a parallelism in the mixed lymphocyte reaction *in vitro*. Conventional antigens activate a very small fraction of T lymphocyte precursors, while alloantigens activate more than 1% of these cells. Two hypotheses have been put forward in order to account for the high frequency of alloreactive T-cell precursors. In the first hypothesis, each MHC-peptide complex could stimulate a different T-cell population (Matzinger and Bevan<sup>1</sup>). Since any given peptide binds to a small fraction of MHC molecules on the surface of antigen presenting cells, the antigen density per antigenic determinant would be low. Alternatively, alloreactive T-cells could recognize directly the allogenic molecule itself, so that MHC-bound peptides would not play an important role. Consequently, foreign MHC molecules, functioning as ligands, could provide high determinant density (Bevan<sup>2</sup>).

A majority of alloreactive T-cells recognize the MHC alloantigen and/or its bound peptide. These cells are usually cytotoxic for the graft and cause acute rejection (Lechler et al.<sup>3</sup>). A second subgroup recognize the alloantigen indirectly, for example, after being processed and presented by antigen presenting cells of the host. This subgroup, with a much lower precursor frequency, would help in the production of anti-MHC antibodies in the donor, producing chronic rejection (Benichou et al.<sup>4</sup>; Fangman et al.<sup>5</sup>).

Our laboratory has focused on the anti-HLA-B27 allogenic response to analyze HLA/peptide/TCR interactions in the whole antigenic spectrum of this molecule. This analysis was developed at two levels: (a) characterization of clonal heterogeneity, fine specificity, and structural requirements of epitopes recognized by monoclonal CTL, and (b) molecular characterization of alloreactive TCR. These studies will be reviewed below.

## 2 Clonal analysis of anti-B\*2705 and anti-B\*2703 alloreactive responses.

HLA-B27 polymorphism could modulate its antigenicity, and its relationship to ankylosing spondylitis if T-cells are involved in the pathogenesis of this disease. For this reason the antigenic relationships between the main HLA-B27 antigen, B\*2705, and other subtypes (Figure 1) was approached through fine specificity analysis of alloreactive CTL. As an initial stage we analyzed a total of 84 anti-B\*2705 CTL clones and 36 anti-B\*2703 CTL from four unrelated donors and from two of these donors, respectively (López et al.<sup>6</sup>). B\*2703 differs from B\*2705 by a single amino acid change of His instead of Tyr<sup>59</sup>. This change is unique among class I HLA antigens and affects an otherwise conserved residue that is involved in stabilization of the amino-terminal group of HLA-bound peptides (Madden et al.<sup>7</sup>). The fine specificity of the CTL was determined by panel analysis against LCL. In the analysis of anti-B\*2705 CTL the subtype presenting the highest cross reaction was B\*2703, since it was recognized by 48% of the CTL clones. The less crossreactive subtypes were B\*2704 and B\*2706 (Table 1). The antigenic closeness of HLA-B27 subtypes with B\*2705 could be ordered, according to the number of anti-B\*2705 CTL that crossreacted with them in the following way: B\*2705 > B\*2703 > B\*2702 > B\*2701 > B\*2704 > B\*2706.

An outstanding feature of anti-B\*2703 CTL was that many were crossreactive with B\*2705 (Table 1). This means that most of the B\*2703 allospecific epitopes are present in B\*2705. Since the number of anti-B\*2705 CTL crossreacting with B\*2703 (48%) was significantly lower than the anti-B\*2703 CTL crossreacting with B\*2705 (78%), it can be concluded that there are more B\*2705 allospecific epitopes absent in B\*2703 than the reverse situation. A possible explanation for this may be that the His<sup>59</sup> change in B\*2703 decreases the stabilization of the amino-terminal group of bound peptides, so that many peptides will bind to B\*2703 with less affinity or might not bind at all. Only 22% of anti-B\*2703 CTL did not crossreact with B\*2705 on LCL, which means that His<sup>59</sup> brings about few new epitopes. Thus, B\*2703 is antigenically defective, relative to B\*2705, and presumably presents mostly

a subset of the B\*2705-bound peptides. The appearance of the few new epitopes in B\*2703 can be explained according to three mechanisms: (a) some peptides that cannot bind to B\*2705 could bind to B\*2703; (b) the same peptide could adopt different conformations depending on the subtype to which it binds, and (c) the His59 itself might generate some peptide-independent antigenic changes.

Further insight into the differences between anti-B\*2705 and anti-B\*2703 CTL in HLA-B27 recognition was obtained with site-directed mutants (Villadangos et al.<sup>8</sup>). Changes in pocket A residues 167 and 171 affected less anti-B\*2703 than anti-B\*2705 CTL recognition. In contrast, the change from Glu to Met45 in the B pocket, a residue which is critically involved in anchoring the Arg2 motif of HLA-B27-bound peptides (Madden et al.<sup>7</sup>) affected more deeply recognition by anti-B\*2703 CTL (Table 2). This indicates that anti-B\*2703 are less dependent than anti-B\*2705 CTL on pocket A and more dependent on pocket B structure, and suggests that the B\*2703 change not only disrupts pocket A interaction with the peptidic N-terminus, but also reinforces the interaction of Arg in the B pocket.

The HLA phenotype may condition the T-cell repertoire of each individual (Akolkar et al.<sup>9</sup>) and therefore condition individual allospecific responses. Thus, we addressed the possible existence of donor-dependent differences in anti-HLA-B27 responses. The four analyzed donors could be grouped in two pairs according to similarities in their anti-B\*2705 responses. For example, in donors PA and DL CTL recognizing B\*2704 and/or B\*2706 were not found. In contrast, a relatively high percentage of CTL crossreactive with one or both of these subtypes were obtained from donors GM and SR (Table 1). The differences observed in the anti-B\*2705 responses correlated with the class I phenotype of the responder individuals, and in particular with the Val/Glu dimorphism at position 152 in their HLA-B antigens. PA (HLA-B35, 39) and DL (HLA-B39, 44) have Val152, and the only crossreactions that were observed in the anti-B\*2705 CTL from these donors were with subtypes presenting Val152 (B\*2701 to B\*2703). On the other hand, GM (HLA-B7, B8) and SR (HLA-B7, B44)

have HLA antigens with Glu152 (HLA-B7) and with Val152 (HLA-B8 and HLA-B44), and showed crossreactions with subtypes having Val152 (B\*2701 to B\*2703) and Glu152 (B\*2704 and 2706) (López et al.<sup>6</sup>).

We also analyzed the structure of HLA-B27 specific epitopes recognized by anti-B\*2705 CTL. For this purpose 27 anti-B\*2705 CTL from donors DL, GM and SR were analyzed with site-specific B\*2705 mutants with changes in various side-chain binding pockets of the antigen binding site (Villadangos et al.<sup>8</sup>). Any of the mutations tested altered allorecognition and this alteration correlated strongly with the expected effect of the mutation on peptide presentation. Specific mutations showed different effects on CTL from different donors suggesting that each individual responds predominantly to epitopes with a particular structure. For example, great effect of the D→Y116 mutation and irrelevance of the L→A81 mutation on CTL from GM suggested a preferred response of this donor to epitopes that involve peptides with C-terminal residues requiring Asp116 but not Leu81 in the C/F pocket. Since Asp116 is found in most HLA-B27 subtypes (Figure 1), this might explain the wide crossreactivity of a relatively large number of CTL from donor GM with subtypes. In donor SR the opposite effect was observed. Thus, CTL from this donor would recognize epitopes with shorter or nonpolar C-terminal residues, which depend less on Asp116 and are more sensitive to changes in residue 81 (Madden et al.<sup>10</sup>). This suggests that alloreactive CTL from donors GM and SR show preference for different groups of peptides. CTL from donor DL recognized mainly epitopes that are highly dependent on the intact B\*2705 structure as any mutation had great effect (Villadangos et al.<sup>8</sup>). This can account for the fact that CTL from this individual present less crossreaction with subtypes than those from other donors (Table 1).

### 3 T-cell recognition of HLA-B27 expressed on murine cells. Functional evidence for implication of endogenous peptides in allogenic responses to HLA-B27.

Many alloreactive CTL do not kill the P815 murine cell line transfected with HLA-B27 and human  $\beta 2$  microglobulin. For the analysis of this phenomenon we selected two groups of CTL, in such a way that, within each group, the CTL presented a very similar reaction pattern, but they could be distinguished on the basis of their different avidity by inhibition of lysis with anti-CD8 monoclonal antibody. In each group, only those CTL which were not inhibited by this antibody, were capable of lysing HLA-B27<sup>+</sup> P815 transfectants (Calvo et al.<sup>11</sup>). These results suggested that, for CTL with similar fine specificity, only those with sufficient TCR avidity could overcome the requirement for adhesion molecules on the target cell surface. Indeed, lysis by CTL requires a sufficiently avid cell-to-cell contact involving CD8 (Salter et al.<sup>12</sup>), LFA-1 (their ligands are ICAM-1 to ICAM-3) (Marlin and Springer<sup>13</sup>; Staunton et al.<sup>14</sup>; De Fougères and Springer<sup>15</sup>) and CD2 (its ligand is LFA-3) (Selvaraj et al.<sup>16</sup>). When human CTL are confronted with murine targets the interaction CD2/LFA3 does not take place, since murine cells lack an appropriate ligand for human CD2; the human LFA-1 binds to murine ICAM-1, with less efficiency than to the human counterpart (Johnston et al.<sup>17</sup>). Other evidence suggested that, in some cases, failure to lyse murine HLA transfectants by human CTL was dependent on fine specificity rather than avidity, implying cell-dependent expression of particular allospecific epitopes (Bernhard et al.<sup>18</sup>, Marrack and Kappler<sup>19</sup>; Heath et al.<sup>20</sup>; Castaño et al.<sup>21</sup>). In order to distinguish between these two possibilities P815 transfected with HLA-B27, ICAM-1 and LFA-3 were used as target cells for anti-HLA-B27 alloreactive CTL. Four different reaction patterns were observed (Galocha et al.<sup>22</sup>). The first group consisted of CTL that lysed both human and murine HLA-B27 transfectants, with no need for human adhesion molecules in murine cells. The second group consisted of CTL that lysed the murine HLA-B27 transfectants with low efficiency, but showed significantly increased lysis of transfectants carrying, in addition, human

adhesion molecules. The third group, consisted of CTL that did not lyse the HLA-B27 murine transfectants, unless co-transfected with ICAM-1+LFA-3. In the fourth group, the CTL did not lyse the murine transfectants even when co-transfected with human adhesion molecules, indicating that in this group, which accounted for 42% of the CTL tested, absence of lysis was not due to lack of avidity. Thus, lysis of HLA-B27<sup>+</sup> murine cells by human alloreactive CTL is heterogeneous. In some clones absence of lysis can be explained by lack of avidity of human CTL for murine cells. For CTL of group four, absence of lysis is probably due to lack of the corresponding epitopes, suggesting that these involve peptides expressed in the human but not in the murine cells tested.

#### **4 Peptide dependency and unexpected clonal allospecificity.**

Alloreactive CTL generally recognize allo-MHC+peptide complexes (Rammensee et al.<sup>23</sup>; Heath et al.<sup>24</sup>; Sherman and Chattopadhyay<sup>25</sup>). Both the alloantigen molecule and the many peptides bound may directly contribute to the structure of alloantigenic determinants. Available evidence suggests that the peptide dependency of alloreactive CTL is variable, ranging from strict specificity for a particular peptide to recognition of motifs shared by multiple peptides or even peptide independence (Rötzschke et al.<sup>26</sup>). This variability explains the occurrence of anti-HLA-B27 CTL showing unexpected crossreaction with DR2. The first example of CTL clones displaying dual class I- and class II-directed alloreactivity was reported in our laboratory by Aparicio et al.<sup>27</sup>. This work described the characterization of three alloreactive CD8<sup>+</sup> CTL clones that displayed simultaneous lytic ability for both HLA-B\*2705<sup>+</sup> cells and HLA-DR2<sup>+</sup> targets expressing certain DR2-associated Dw determinants. The dual allospecificity of these CTL, as opposed to a putative class I-restricted recognition of the class II antigens, was demonstrated, but the basis for the class II crossreactivity was not established.

More recently, and from the unrelated donor GM, the anti-B\*2705 CTL clonotype 37GRK/123.8GRK also presented crossreaction with DR2 (López et al.<sup>28</sup>). These CTL recognized the B\*2701 to B\*2706 subtypes, but only the DR2Dw2 subtype (B5\*0101). The lysis of DR2<sup>+</sup> targets was inhibited by anti-CD3 and anti-DR monoclonal antibodies. In cold target competition assays, there was reciprocal inhibition between HLA-B27 and DR2Dw2 targets. Furthermore, PCR and sequencing showed a single TCR, indicating that the dual allospecificity of this clonotype was mediated by the same TCR. From correlation between the sequences of HLA-B27 and HLA-DR2 subtypes, and the fine specificity of this CTL a structural motif common to HLA-B27 and HLA-DR2 (B5\*0101) and specific for these molecules was identified. This motif was formed by various positions of the  $\beta$  sheet that is the antigen binding site bottom. Changes affecting this motif that were introduced by site-directed mutagenesis abrogated HLA-B27 recognition by CTL 37GRK/123.8GRK. Since these positions are involved in peptide presentation but are not accessible to the TCR, these results suggest that the dual allospecificity of CTL 37GRK/123.8GRK is due to recognition of antigenically similar peptides presented by HLA-B27 and HLA-DR2.

An opposite example, showing that allospecific CTL clones can be largely independent of peptides, was provided by the anti-B\*2704 CTL 64.8P. This CTL recognized all B27 subtypes tested with changes in the C/F pocket of the molecule (Jaraquemada et al.<sup>29</sup>), as well as mutants with changes in this region (Villadangos et al.<sup>30</sup>). However, it did not recognize B\*2703, with a change in the A pocket, or mutants with changes in pockets A and B. The clear-cut spatial distribution of the changes in the HLA-B27 molecule affecting recognition by this CTL clone strongly suggests that it lacks specificity for any particular peptide, but requires the structural integrity of the site



involved in interactions with the N-terminal portion of peptides. The peptide-independence of this CTL was confirmed by its capacity to lyse HLA-B27<sup>+</sup> murine TAP-deficient RMA-S transfectants (Villadangos et al.<sup>30</sup>). This lysis was inhibited by anti-HLA-B27 antibodies, indicating that it was not H-2-restricted and its efficiency was dependent only on the expression level of HLA-B27. Thus, recognition of HLA-B27 by CTL 64.8P was peptide-independent or required a N-terminal peptide residue common to many peptides. These results also showed that the corresponding TCR recognized HLA-B27 with an unusual topology, involving mainly one of the sides of the peptide binding groove. The unusual features of this CTL suggest that peptide-independent alloreactive CTL are rather exceptional.

### **5 TCR usage and the molecular basis of HLA-B27 allorecognition.**

TCR variability is generated by rearrangement of multiple germline-encoded segments (V, D and J) through mechanisms that allow for the introduction of great variability in the junctional regions (Toyonaga and Mak<sup>31</sup>; Wilson et al.<sup>32</sup>). The hypervariable regions of V $\alpha$  and V $\beta$  segments, called CDR1 and CDR2 by analogy with immunoglobulins, would interact mainly with the MHC protein. The junctional regions, formed by the N $\alpha$ /N+D $\beta$  and parts of J $\alpha$  and J $\beta$  segments, are known as CDR3 and are thought to interact mainly with the peptides bound to MHC (Chothia et al.<sup>33</sup>; Davis and Bjorkman<sup>34</sup>; Claverie et al.<sup>35</sup>). Although this model might be correct in general terms, the contribution of V segments and of junctional regions to specificity is not independent. For example, in the T-cell response to peptide variants that differ in residues affecting T-cell recognition but not binding to MHC, TCR with reciprocal changes in the CDR3 are used, suggesting direct interaction between these regions and the peptide (Jorgensen

et al.<sup>36</sup>). However, at times, there is also a reduced number of V $\beta$  segments, which would imply their contribution to peptide specificity (White et al.<sup>37</sup>). Moreover, mutations in the CDR1 of V $\beta$  cancel peptide-specific recognition (Patten et al.<sup>38</sup>).

In peptide-specific responses limited heterogeneity of V and J segments, and of junctional regions is frequently observed (Casanova and Maryanski<sup>39</sup>). However, there are exceptions. For example, much TCR diversity, with only V $\beta$  segments conserved, has been found in CTL specific for a peptide of *Plasmodium berghei* restricted by H-2K<sup>d</sup> (Casanova et al.<sup>40</sup>). Certain class-II restricted peptide-specific responses are also extremely diverse (Boitel et al.<sup>41</sup>; Haberman et al.<sup>42</sup>; Taylor et al.<sup>43</sup>). TCR studies in alloreactivity are far less numerous. Due to clonal heterogeneity and the many endogenous peptides involved, one would expect great TCR diversity in alloreactive responses. However, non random use of V $\beta$  segments has been observed among T-cell clones specific to I-A<sup>bm12</sup> (Bill et al.<sup>44</sup>), or DR4 (Goronzy et al.<sup>45</sup>) and in allograft-infiltrating lymphocytes (Shirwan et al.<sup>46</sup>; Hall et al.<sup>47</sup>), although no restrictions were observed in N+D $\beta$  or J $\beta$  segments. The use of  $\alpha$  chain segments has been less studied, and generally great diversity has been found in V $\alpha$ , J $\alpha$  and N $\alpha$  regions (Bill et al.<sup>44</sup>; Geiger et al.<sup>48</sup>; Hurley et al.<sup>49</sup>). HLA-B35 allogenic responses showed limited variability in  $\alpha$  and  $\beta$  CDR3 regions (Steinle et al.<sup>50</sup>).

In an attempt to define the rules applying to TCR selection in the HLA-B27 allorecognition, we analyzed the structure of the TCR from anti-B\*2705 alloreactive CTL of known fine specificity. In an initial study involving 15 anti-B\*2705 CTL from various donors (Bragado et al.<sup>51</sup>; Lauzurica et al.<sup>52</sup>), a predominant use of V $\beta$  segments from homology subgroup 4 (V $\beta$ 3, V $\beta$ 11, V $\beta$ 12, V $\beta$ 13, V $\beta$ 14, V $\beta$ 15 and V $\beta$ 17) was observed. Homology subgroups include those V $\alpha$  or V $\beta$  subfamilies that present more than 50%

amino acid sequence identity (Chothia et al.<sup>33</sup>). In addition, recurrent structural motifs in the  $\beta$  chain junctional regions were also observed: 7 of 15 anti-B\*2705 CTL showed an Ala codon in the D $\beta$ -N-J $\beta$  junction, and in 5 CTL the junctional region of the  $\beta$  chain was formed only by hydrophobic residues. No evidence for  $\alpha$  chain restrictions was found in that study (Lauzurica et al.<sup>52</sup>).

To confirm and extend these initial results, we further analyzed TCR usage in the anti-HLA-B\*2705 responses from donors SR and GM. The purpose was to assess possible differences between donors and the general character of the previously observed selective trends. The results from this study, which are described below, reveal a complex selection of anti-B27 TCR, and demonstrate that such selection takes place on multiple TCR elements following distinct rules for different gene segments (Barber et al.<sup>53</sup>).

A first observation in this study was that four clonotypes from donor SR had identical  $\beta$  chains, but very different  $\alpha$  chains (Figure 2). These CTL presented similar fine specificity with HLA-B27 subtypes, suggesting that the  $\beta$  chain rather than the  $\alpha$  chain, determines the fine specificity of these CTL. Although previously observed in peptide-specific responses, this is to our knowledge, the first case of TCR sharing the same chain among alloreactive TCR, and is a clear example of uneven contribution of  $\alpha$  and  $\beta$  chains to allorecognition.

Regarding V $\beta$  segments, both donors showed a predominant use of V $\beta$  homology subgroup 4 (55 to 60% of clonotypes in each donor), with no statistically significant differences in the use of other V $\beta$  segments (Table 3). These data confirm previous results and show that the use of V $\beta$  subgroup 4 in the anti-HLA-B\*2705 response is donor-independent. Moreover these V $\beta$  segments were expressed in CTL with very

different fine specificity, indicating that their use is not epitope-specific. This suggests that V $\beta$  skewing is determined by the HLA-B\*27 molecule itself rather than by bound peptides.

V $\alpha$  segment usage was more diverse. Yet, some V $\alpha$  segments appeared repeatedly and with higher frequency than in controls. For instance, V $\alpha$ 14 appeared in 33% of anti-HLA-B\*2705 CTL from donor GM, including 3 of the four CTL with the most complex reaction patterns. V $\alpha$ 7 and V $\alpha$ 20 appeared recurrently (19% each) in SR and in clonotypes with simple reaction patterns. Thus, there is a somewhat restricted use of V $\alpha$  segments among anti-B\*2705 CTL, which is donor-dependant and might be related to particular reaction patterns.

In general, V $\alpha$  and V $\beta$  segments were selected independently from any given V $\alpha$ /V $\beta$  combination. However, V $\alpha$ 7 associated with V $\beta$  segments of homology subgroups other than 4 with a frequency higher than expected for random association, and similar to that expected if V $\alpha$ 7 were selected independently from V $\beta$ . This negative correlation between V $\alpha$ 7 and V $\beta$  subgroup 4 suggests that the corresponding TCR were selected on the basis of their V $\alpha$  segment. These results strongly suggest that V $\alpha$  and V $\beta$  segments are independently selected, and are involved in recognition of distinct structural elements of the allospecific epitopes.

$\alpha$  and  $\beta$  chain junctional diversity was also non-random. In  $\beta$  chains diversity was limited at three levels. Besides the CTL with identical  $\beta$  chains mentioned above, three pairs of CTL used identical V $\beta$ , J $\beta$ , and very similar N+D $\beta$  regions. The CTL in each of these pairs showed different fine specificity, suggesting that anti-B\*2705 TCR with similar  $\beta$  chains can be selected independently of specific epitopes or donors. Finally, some  $\beta$  chains presented common N+D $\beta$  motifs, but different V $\beta$  and J $\beta$  segments. In

most cases, sharing of these motifs was not associated to any specific reaction pattern and was donor-independent. In contrast to  $\beta$  chains,  $\alpha$  chain junctional diversity was not restricted in the N regions, but there was restriction in the use of  $J\alpha$  segments, so that 7  $J\alpha$  segments accounted for 61% of the anti-B27 CTL analyzed. Together these segments were found in 14% of unselected PBL in an independent study (Moss et al.<sup>54</sup>). This  $J\alpha$  selection was also donor and epitope independent. Recurrent N+D $\beta$  motifs did not occur concomitantly with recurrent  $J\alpha$  segments, suggesting that selection of junctional regions takes place independently in  $\alpha$  and  $\beta$  chains. This implies that specific antigenic determinants may interact predominantly with the CDR3 region of one of the TCR chains.

In conclusion, diversity of HLA-B27 specific TCR is limited at three levels and in different structural elements: first, in the whole  $\beta$  chain, second, in  $V\alpha$  or  $V\beta$  segments only, and third, in the CDR3 regions of either chain.  $V\alpha$  and  $V\beta$  segments are selected differently, in their dependency of the donor and fine specificity. Diversity in  $\alpha$  and  $\beta$  chain junctional regions is limited in different genetic elements of the CDR3 (ie:  $J\alpha$  and N+D $\beta$ , respectively). This pattern of asymmetric selection of structural elements indicates that contribution of  $\alpha$  and  $\beta$  chains to TCR specificity is not equivalent. Except for  $V\alpha$ , it seems to be little influence of the donor in TCR selection. In particular, the predominant use of  $V\beta$  subgroup 4 in multiple donors, raises the possibility that these  $V\beta$  segments might be suitable targets for therapeutic manipulation of alloreactive responses.

$V\beta$  segment selection in peptide-specific responses has sometimes been related to C-terminal  $V\beta$  residues, actually contributing to CDR3 (Jorgensen et al.<sup>36</sup>). However, preferential recruitment of  $V\beta$  subgroup 4 among anti-B\*2705 CTL is probably based on CDR1 and CDR2, as these regions are likely to interact with the alloantigen molecule

(Chothia et al.<sup>33</sup>; Davis et al.<sup>34</sup>; Claverie et al.<sup>35</sup>; Hong et al.<sup>55</sup>). A comparison of CDR1 and CDR2 sequences revealed that at many positions one or two structurally related residues were present in more than 75% of the V $\beta$  segments from subgroup 4 used by 38 anti-B\*2705 clonotypes (Lauzurica et al.<sup>52</sup>; Barber et al.<sup>53</sup>). These motifs were at variable frequency, depending on each position, among V $\beta$  segments from other subgroups in these CTL (Figure 3). To assess their putative significance, the frequencies of CDR1 and CDR2 motifs in anti-B\*2705 clonotypes were compared with those in unselected CD8<sup>+</sup> PBL (Akolkar et al.<sup>9</sup>) (Table 4). The motifs at any given position whose frequency among anti-B\*2705 clonotypes was more than double that in PBL were assigned as the minimum determinants of the observed V $\beta$  segment selection. They were the following: Met27, and Asp/Asn28 in CDR1, and Tyr47, Val52, and Asp/Glu59 in CDR2. V $\beta$ 3 and V $\beta$ 14 possessed the 5 CDR1 and CDR2 motifs so defined. V $\beta$ 13IGRb14, V $\beta$ 13IGRb16, and V $\beta$ 17.1 possessed 4 of the 5 motifs. V $\beta$ 13.1/2, V $\beta$ 13.4, and V $\beta$ 15.1 possessed only three. This indicates a close correlation between particular CDR1+CDR2 motifs and V $\beta$  usage by anti-B\*2705 CTL. There was no clear correlation with overall homology in these regions (Figure 3), suggesting that V $\beta$  segments are recruited based on certain residues, rather than on global CDR1 or CDR2 sequence homology.

Most of these motifs were absent or rare (Met27) in V $\beta$  segments from other subgroups expressed in anti-B\*2705 CTL. This indicates that these V $\beta$  segments were not selected for their sharing of the relevant CDR1 or CDR2 motifs with subgroup 4. A likely explanation for the presence of V $\beta$  subgroups other than 4 among anti-B\*2705 CTL is that the corresponding TCR were selected mainly on the basis of TCR elements other than the V $\beta$  segments. A likely example of this was mentioned above concerning

selection of V $\alpha$ 7 irrespective of the V $\beta$  subgroup.

Remarkably, B27-restricted CTL specific for arthritogenic bacteria (*Yersinia enterocolitica*) as well as autoreactive B27-specific CTL isolated for the synovial fluid of patients with *Yersinia*-induced reactive arthritis used TCR with a predominance of V $\beta$  subfamilies from subgroup 4 (V $\beta$ 13, 14, and 17) (Duchman et al.<sup>56</sup>). The frequency of these V $\beta$  segments among B27-directed autoreactive CTL (57%) was similar to that found among our anti-B\*2705 alloreactive CTL (Barber et al.<sup>53</sup>). This finding further indicates the relevance of this V $\beta$  subgroup in HLA-B27 directed responses and suggests the possibility of immune manipulation of pathogenetic T-cell responses against this antigen.

## 6 Peptide-specific HLA-B27 restricted T-cell recognition.

HLA-B27-restricted peptides from influenza NP (381-388) (Tussey et al.<sup>57</sup>), and NP (383-391), HIV gp120 (314-322), HIV gag p24 (265-274) (Hueth et al.<sup>58</sup>), Epstein-Barr virus (EBV) LMP2 (236-244) and EBNA 3C (258-266) (Brooks et al.<sup>59</sup>), HSP 60 (284-282) (Cerrone et al.<sup>60</sup>), measles F protein (438-446) (van Binnendijk et al.<sup>61</sup>), and procollagen-CII P109 (Gao et al.<sup>62</sup>) have been reported. However, few studies have yet addressed the issue of HLA-B27 subtype differences in peptide presentation to self-restricted CTL. Brooks et al.<sup>59</sup>, used CTL responses to EBV as a system to identify B27-restricted epitopes. When CTL clones were tested against targets expressing individual EBV proteins from recombinant vaccinia vectors, all B\*2705-, B\*2702- and some B\*2704-restricted clones recognized the EBNA 3C antigen. In addition, all the EBNA 3C-specific clones tested from B\*2705-, B\*2702, or B\*2704-positive donors recognized the same immunodominant peptide. This was the first direct evidence that different HLA-

B27 subtypes can present the same immunodominant peptide. In contrast, an EBV LPM2-derived peptide was presented only by B\*2704. Nevertheless, this peptide binds to B\*2705 in vitro with similar efficiency as the B\*2705-restricted EBNA 3C peptide (Villadangos et al.,<sup>63</sup>), suggesting that factors other than binding affinity to a given subtype can determine peptide immunogenicity in a particular HLA class I context. In another study (Colbert et al.<sup>64</sup>) a B\*2705-restricted influenza NP (383-391) peptide was inefficiently presented by B\*2703, due to reduced affinity of the peptide for this subtype. High affinity and presentation by B\*2703 could be induced by changing the amino-terminal residue of the peptide from Ser to Arg. Recently, Tussey et al.<sup>57</sup> have reported that two overlapping peptides from influenza, NP (381-388) and NP (383-391), are restricted by B\*2702 or B\*2705, respectively. These studies indicate a large degree of specificity in viral peptide presentation, although some peptides can be presented by multiple subtypes. The molecular basis of the subtype specificity correlates with the nature of the peptidic anchor residues. For instance, natural B\*2702-bound peptides present mainly aromatic or aliphatic C-terminal residues. B\*2705-bound peptides possess both basic, aromatic or aliphatic C-terminal residues. Since influenza NP (383-381) peptide have C-terminal Arg, this explains the specificity of this peptide for B\*2705 but not B\*2702. The overlapping peptide NP (381-388) has C-terminal Ile and can be efficiently presented by B\*2702 (Tussey et al.<sup>57</sup>). Subtype polymorphism, by modulating binding of peptides with related structure but differing in relevant anchor residues, may be effective in presenting variant peptides resulting from mutational drift of viral antigens, thus adapting MHC function to pathogen variations.

Contrary to allorecognition, where the structure of allospecific epitopes is yet undefined, self-restricted T-cell recognition is amenable to a more detailed



characterization of the molecular interactions between peptide-specific TCR and self-restricted epitopes. These studies have been developed in the influenza system. Restricted TCR  $\alpha$  and  $\beta$  chain usage has been reported in the response against NP (383-391) peptide (Bowness et al.<sup>65</sup>). In particular,  $\beta$  chains showed a predominant use of V $\beta$ 7 and homologous N+D $\beta$  regions. A CDR3 consensus motif could be defined in positions 96-100: QExVG. In this motif, QE residues are contributed by V $\beta$ 7, while VG residues are in the N+D $\beta$  region. The negative charge of Glu97 might play an important role due to its interaction with the peptidic Arg7, thus promoting selection of V $\beta$ 7. V $\beta$ 7.1 can use Glu or Asp at position 97, depending on the first nucleotide in the N+D $\beta$  region. In this response Glu97 was always used (Callan et al.<sup>66</sup>). Since both residues differ only in the length of their side chains, this suggests high restriction in the interaction of this position. Further analysis of the TCR/peptide interaction in this system was carried out with peptide variants (Bowness et al.<sup>67</sup>). On the basis of X-ray analysis, peptide residues 1, 4, and 8 are accessible to the TCR (Madden et al.<sup>7</sup>). Thus, these positions in the NP (383-391) peptide were systematically changed to assess their relevance in T-cell recognition. Substitutions of peptide Ser1 affected some CTL clones but not others. Trp4 and Thr8 were crucial for recognition by all tested CTL, so that even conservative changes greatly reduced lysis. Substitutions in residue 7 also affected recognition without altering binding to HLA-B27, suggesting that in this peptide, the Arg7 side chain is oriented towards the receptor. The effect of peptide changes on T-cell recognition could be correlated with the TCR used by the corresponding CTL clones to assess the basis for TCR selection in this response. NP (383-391)-specific CTL could be divided into two groups depending on their requirement for Ser1. The CTL that were affected used V $\alpha$ 14, J $\alpha$ 9.3, and a long CDR3  $\alpha$  region with bulky aromatic residues, whereas those unaffected

used V $\alpha$ 12 and short CDR3  $\alpha$  regions. These data suggest that the  $\alpha$  chain interacts with the MHC close to peptide residue 1. As mentioned above, the importance of the peptidic Arg7 for interaction with the TCR would account for the existence of a Glu97 in the CDR3 region of the  $\beta$  chain of most CTL.

## 7 Concluding remarks.

HLA-B27 polymorphism provides an experimental system in which to analyze the functional consequences of naturally occurring class I HLA microheterogeneity at a molecular level. Drastic changes in HLA-B27 T-cell antigenicity are induced by even single amino acid substitutions. Antigenic changes can be interpreted as an effect of subtype polymorphism on modulating peptide binding specificity. Although the general mechanisms by which HLA polymorphism influences peptide presentation have been established, largely as a consequence of X-ray analysis of peptide-MHC complexes, the detailed effects of single amino acid changes on modulating peptide specificity are yet insufficiently known. The importance of such analysis is justified by the potentially great effects of seemingly subtle changes in antigen presentation and disease. For instance, there are reports of lack of association of particular HLA-B27 subtypes to spondyloarthropathy, at least in particular populations (López-Larrea et al.<sup>68</sup>, D'Amato et al.<sup>69</sup>). Thus, a molecular interpretation of the effects of subtype polymorphism on peptide binding and T-cell recognition may greatly enhance our understanding of HLA variation in its relationship to pathogens and chronic disease.

In addition, the molecular relationships between TCR structure and HLA recognition can be approached by detailed molecular analysis of specific TCR in their relationship to T-cell antigens whose structure can be modulated by HLA or peptide

microheterogeneity. Understanding the basis for selection of TCR repertoires in peptide-specific, alloreactive or autoimmune T-cell responses may identify potential targets for therapeutic intervention.

### **Acknowledgements.**

We thank Dr. Rosa Sorrentino and Dr. Elisabeth Märker-Hermann for preprints, and Ana Blanco for secretarial assistance. This work was supported by grant SAF 94/0891 from the Plan Nacional de I+D. We thank the Fundación Ramón Areces for an institutional grant to the C.B.M.S.O.

## 8 References.

1. Matzinger P and Bevan MJ. Hypothesis: why do so many lymphocytes respond to major histocompatibility antigens. *Cell Immunol* 1987; 29: 1-5.
2. Bevan MJ. High determinant density may explain the phenomenon of alloreactivity. *Immunol Today* 1984; 5: 128-130.
3. Lechler RI, Lombardi G, Batchelor JR et al. The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today* 1990; 11: 83-88.
4. Benichou G, Takizawa PA, Olson CA et al. Donor major histocompatibility complex (MCH) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. *J Exp Med* 1992; 175: 305-308.
5. Fangmann J, Dalchau R, Fabre JW. Recognition of skin allografts by indirect allorecognition of donor class I major histocompatibility complex peptides. *J Exp Med* 1992; 175: 1521-1529.
6. López D, García-Hoyo R, López de Castro JA. Clonal analysis of alloreactive T-cell responses against the closely related B\*2705 and B\*2703 subtypes. Implications for HLA-B27 association to spondyloarthropathy. *J Immunol* 1994; 152: 5557-5571.
7. Madden DR, Gorga JC, Strominger JL et al. The three-dimensional structure of HLA-B27 at 2.1 Å resolution suggests a general mechanism for tight peptide binding to MHC. *Cell* 1992; 70: 1035-1048.
8. Villadangos JA, Galocha B, García-Hoyo R et al. Structure of HLA-B27 T-cell epitopes. Antigen presentation in B\*2703 is limited mostly to a subset of the antigenic determinants on B\*2705. *Eur J Immunol* 1994; 24: 2548-2555.
9. Akolkar PN, Gulwani-Akolkar B, Pergolizzi R et al. Influence of HLA genes on T-cell receptor V segment frequencies and expression levels in peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 1993; 150: 2761-2773.
10. Madden DR, Gorga JC, Strominger JL et al. The structure of HLA-B27 reveals nonamer

- self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* 1991; 353: 321-325.
11. Calvo V, Rojo S, Aparicio P et al. Avidity dictates the lytic capacity of human cytolytic T-lymphocyte clones with similar fine specificity against murine cells expressing HLA-B27 antigen. *J Immunol* 1988; 141: 3798-3803.
  12. Salter RS, Benjamin RJ, Wesley PK et al. A binding site for the T-cell co-receptor CD8 on the  $\alpha 3$  domain of HLA-A2. *Nature* 1990; 345: 41-46.
  13. Marlin SD and Springer TA. Purified intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-2) is a ligand for lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1). *Cell* 1987; 51: 813-819.
  14. Stauton DE, Dustin ML, Springer TA. Functional cloning of ICAM-2, cell adhesion ligand for LFA-1 homologous to ICAM-1. *Nature* 1989; 339: 61-64.
  15. De Fougere AR and Springer TA. Intercellular adhesion molecule-3, a third adhesion counter-receptor for lymphocyte function-associated molecule-1 on resting lymphocytes. *J Exp Med* 1992; 175: 185-190.
  16. Selvaraj P, Plunkett ML, Dustin M et al. The lymphocyte glyco-protein CD2 binds the cell surface ligand LFA-3. *Nature* 1987; 326: 400-403.
  17. Johnston SC, Dustin ML, Hibbs ML et al. On the species specificity of the interaction of LFA-1 with intercellular adhesion molecules. *J Immunol* 1990; 145: 1181-1187.
  18. Bernhard EJ, Ai-xuan TL, Yannell JR et al. The ability of cytotoxic T-cells to recognize HLA-A2.1 or HLA-B7 antigens expressed on murine cells correlates with their epitope specificity. *J Immunol* 1987; 139: 3614-3620.
  19. Marrack P and Kappler J. T-cells can distinguish between allogeneic major histocompatibility complex products on different cell types. *Nature* 1988; 332: 840-843.
  20. Heath WR, Hurd ME, Carbone FR et al. 1989. Peptide-dependent recognition of H-2K<sup>b</sup> by alloreactive cytotoxic T lymphocytes. *Nature* 1989; 341: 749-752.
  21. Castaño AR, Lauzurica P, Domenech N et al. Structural identity between HLA-A2 antigens differentially recognized by alloreactive cytotoxic lymphocytes. *J Immunol* 1991; 146:

- 2915-2920.
22. Galocha B, López D, López de Castro JA. Clonal heterogeneity in LFA-3 and ICAM-1 requirements for lysis by alloreactive T lymphocytes. *J Immunol* 1993; 150: 1653-1662.
  23. Rammensee HG, Falk K, Rötzschke O. Peptides naturally presented by MHC class I molecules. *Ann Rev Immunol* 1993; 11: 213-244.
  24. Heath WR, Kane KP, Mescher MF et al. Alloreactive T-cells discriminate among a diverse set of endogenous peptides. *PNAS* 1991; 88: 5101-5105.
  25. Sherman LA and Chattopadhyay S. The molecular basis of allorecognition. *Annu Rev Immunol* 1993; 11: 385-402.
  26. Rötzschke O, Falk K, Faath S et al. On the nature of peptides involved in T-cell alloreactivity. *J Exp Med* 1991; 174: 1059-1071.
  27. Aparicio P, Jaraquemada D, Lopez de Castro JA. Alloreactive cytolytic T-cell clones with dual recognition of HLA-B27 and HLA-DR2 antigens: selective involvement of CD8 in their class I-directed cytotoxicity. *J Exp Med* 1987; 165: 428-443.
  28. López D, Barber DF, Villadangos JA et al. Cross-reactive T-cell clones from unrelated individuals reveal similarities in peptide presentation between HLA-B27 and HLA-DR2. *J Immunol* 1993; 150: 2675-2686.
  29. Jaraquemada D, Galocha B, Aparicio P et al. Modulation on immunogenicity by HLA-B27 subtype polymorphism. *Eur J Immunol* 1988; 18: 1945-1950.
  30. Villadangos JA, Galocha B, López de Castro JA. Unusual topology of an HLA-B27 allospecific T-cell epitope lacking peptide specificity. *J Immunol* 1994; 152: 2317-2323.
  31. Toyonaga B and Mak TW. Genes of the T-cell antigen receptor in normal and malignant T-cells. *Annu Rev Immunol* 1987; 5: 585-620.
  32. Wilson RK, Lai E, Concannon P et al. Structure, organization and polymorphism of murine and human T-cell receptor alpha and beta chain gene families. *Immunol* 1988; 101: 149-172.

33. Chothia C, Boswell DR, Lesk AM. The outline structure of the T-cell  $\alpha\beta$  receptor. *EMBO J* 1988; 17: 3745-3755.
34. Davis MM and Bjorkman PJ. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 1988; 334: 395-402.
35. Claverie JM, Prochnicka-Chalufour A, Bougueleret L. Implications of a Fab-like structure for the T-cell receptor. *Immunol Today* 1989; 10: 10-14.
36. Jorgensen JL, Esser U, Fazekas de St. Groth B et al. Mapping T-cell receptor-peptide contacts by variant peptide immunization of single-chain transgenics. *Nature* 1992; 355: 224-230.
37. White J, Pullen A, Choi K et al. Antigen recognition properties of mutant  $V\beta^+$  T-cell receptors are consistent with an immunoglobulin-like structure for the receptor. *J Exp Med* 1993; 177: 119-125.
38. Patten PA, Rock E P, Sonoda T et Al. Transfer of putative complementarity-determining region loops of T-cell receptor V domains confers toxin reactivity but not peptide/MHC specificity. *J Immunol* 1993; 150: 2281-2294.
39. Casanova JL, Maryanski JL. Antigen-selected T-cell receptor diversity and self-nonsel homology. *Immunol Today* 1993; 14: 391-394.
40. Casanova JL, Romero P, Widmann C et al. T-cell receptor genes in a series of class I major histocompatibility complex-restricted cytotoxic T lymphocyte clones specific for a *Plasmodium berghei* nonapeptide: Implications for T-cell allelic exclusion and antigen-specific repertoire. *J Exp Med* 1991; 174: 1371-1383.
41. Boitel B, Ermonvai M, Panina-Bordignon P et al. Preferential  $V\beta$  gene usage and lack of junctional sequence conservation among human T-cell receptors specific for a tetanus toxin-derived peptide: Evidence for a dominant role of a germline-encoded V region in antigen/major histocompatibility complex recognition. *J Exp Med* 1992; 175: 765-777.
42. Haberman AM, Moller C, McCree D. A large degree of junctional diversity exists

- among helper T-cells specific for the same antigenic site of influenza hemagglutinin. *J Immunol* 1990; 145: 3087-3094.
43. Taylor AH, Haberman AM, Gerhard W et al. Structure-function relationships among highly diverse T-cells that recognize a determinant from influenza virus hemagglutinin. *J Exp Med* 1990; 172: 1643-1651.
44. Bill J, Yagüe J, Appel VB et al. Molecular genetic analysis of 178 I-A<sup>bm</sup>12-reactive T-cells. *J Exp Med* 1989; 169: 115-133.
45. Goronzy JJ, Xie C, Hu W et al. Restrictions in the repertoire of allospecific T-cells. Contribution of the  $\alpha$ -helical sequence polymorphism of HLA-DR molecules. *J Immunol* 1993; 151: 825-836.
46. Shirwan H, Chi D, Makowka L et al. Lymphocytes infiltrating rat cardiac allograft express a limited repertoire of T-cell receptor V $\beta$  genes. *J Immunol* 1993; 151: 5228-5238.
47. Hall BL, Hand SL, Alter MD et al. Variables affecting the T-cell receptor V $\beta$  repertoire heterogeneity of T-cells infiltrating human renal allografts. *Transpl Immunol* 1993; 1: 217-227.
48. Geiger MJ, Gorski J, Eckels DD. T-cell receptor gene segment utilization by HLA-DR1-alloreactive T-cell clones. *J Immunol* 1991; 147: 2082-2087.
49. Hurley CK, Steiner N, Wagner A et al. Nonrandom T-cell receptor usage in the allorecognition of HLA-DR1 microvariation. *J Immunol* 1993; 150: 1314-1324.
50. Steinle A, Reinhardt C, Jantzer P et al. In vivo expansion of HLA-B35 alloreactive T-cells sharing homologous T-cell receptors: Evidence for maintenance of oligoclonally dominated allospecificity by persistent stimulation with an autologous MHC/peptide complex. *J Exp Med* 1995; 181: 503-513.
51. Bragado R, Lauzurica P, López D et al. T-cell receptor V gene usage in a human alloreactive response: Shared structural features among HLA-B27-specific T-cell clones. *J Exp Med* 1990; 171: 1189-1204.
52. Lauzurica P, Bragado R, López D et al. Asymmetric selection of T-cell antigen receptor



- $\alpha$ - and  $\beta$ -chains in HLA-B27 alloreactivity. *J Immunol* 1992; 148: 3624-3630.
53. Barber D, López D, López de Castro JA. T-cell receptor diversity in alloreactive responses against HLA-B27 (B\*2705) is limited by multiple-level restrictions in both  $\alpha$  and  $\beta$  chains. *Eur J Immunol* 1995; 25: 2479-2485.
54. Moss PAH, Rosenberg WMC, Zintzaras E et al. Characterization of the human T-cell receptor  $\alpha$ -chain repertoire and demonstration of a genetic influence on  $V\alpha$  usage. *Eur J Immunol* 1993; 23: 1153-1159.
55. Hong SC, Chelouche A, Lin RH et al. An MHC interaction site maps to the amino-terminal half of the T-cell receptor  $\alpha$  chain variable domain. *Cell* 1992; 69: 999-1009.
56. Duchmann R, May E, Ackermann B et al. HLA-B27-restricted cytotoxic T lymphocyte responses to arthritogenic enterobacteria or self antigens are dominated by closely related TCRBV gene segment. *Scand J Immunol* 1995, In press.
57. Tussey LG, Rowland-Jones S, Zheng TS et al. Different MHC class I alleles compete for presentation of overlapping viral epitopes. *Immunity* 1995; 3: 65-77.
58. Huet S, Nixon DF, Rothbard, JB et al. Structural homologies between two HLA-B27-restricted peptides suggest residues important for interaction with HLA-B27. *Int Immunol* 1990; 2: 311-316.
59. Brooks JM, Murray RJ, Thomas WA et al. Different HLA-B27 subtypes present the same immunodominant Epstein-Barr virus peptide. *J Exp Med* 1993; 178: 879-887.
60. Cerrone MC, Ma JJ, Stephens, RS. Cloning and sequence for the heat-shock protein-60 from *Chlamydia trachomatis* and immunological reactivity of the protein. *Infect Immunol* 1991; 59: 79-90.
61. van Binnendijk RS, Versteeg van Oosten JPM, Poelen, MCM et al. Human HLA class I- and class II-restricted cloned cytotoxic lymphocytes identify a cluster of epitopes on the Measles virus fusion protein. *J Virol* 1993; 67: 2276-2284.
62. Gao XM, Wordsworth P, McMichael AJ. Collagen-specific cytotoxic T lymphocyte

- responses in patients with ankylosing spondylitis and reactive arthritis. *Eur J Immunol* 1994; 24: 1665-1670.
63. Villadangos JA, Galocha B, García F et al. Modulation of peptide binding by HLA-B27 polymorphism in pockets A and B, and peptide specificity of B\*2703. *Eur J Immunol* 1995; 25: 2370-2377.
64. Colbert RA, Rowland-Jones SL, McMichael AJ et al. Differences in peptide presentation between B27 subtypes: the importance of the P1 side chain in maintaining high affinity peptide binding to B\*2703. *Immunity* 1994; 1: 121-130.
65. Bowness P, Moss PAH, Rowland-Jones S et al. Conservation of T-cell receptor usage by HLA B27-restricted influenza-specific cytotoxic T lymphocytes suggests a general pattern for antigen-specific major histocompatibility complex class I-restricted responses. *Eur J Immunol* 1993; 23: 1417-1421.
66. Callan MFC, Reyburn HT, Bowness P et al. Selection of T-cell receptor variable gene-encoded amino acids on the third binding site loop: a factor influencing variable chain selection in a T-cell response. *Eur J Immunol*. 1995; 25: 1529-1534.
67. Bowness P, Allen RL, McMichael AJ. Identification of T-cell receptor recognition residues for a viral peptide presented by HLA-B27. *Eur J Immunol* 1994; 24: 2351-2363.
68. López-Larrea C, Sujirachato K, Mehra NK et al. HLA-B27 subtypes in Asian patients with ankylosing spondylitis: evidence for new associations. *Tissue Antigens* 1995; 45: 169-176.
69. D'Amato M, Fiorillo MT, Carcassi C et al. Relevance of residue 116 of HLA-B27 in determining susceptibility to ankylosing spondylitis. *Eur J Immunol* 1995, In press.

### Figure legends.

#### Figure 1.

Spatial location of the positions that are polymorphic among HLA-B27 subtypes in the  $\alpha 1$  and  $\alpha 2$  domains. Bars indicate the positions in which each subtype differs from B\*2705. The diagram shows a schematic top of view of the antigen-binding site of the class I HLA molecule. Amino acid differences of HLA-B27 subtypes with B\*2705 are the following: D $\rightarrow$ Y74, D $\rightarrow$ N77, and L $\rightarrow$ A81 in B\*2701, D $\rightarrow$ N77, T $\rightarrow$ I80, and L $\rightarrow$ A81 in B\*2702, Y $\rightarrow$ H59 in B\*2703, D $\rightarrow$ S77 and V $\rightarrow$ E152 in B\*2704, D $\rightarrow$ S77, H $\rightarrow$ D114, D $\rightarrow$ Y116, and V $\rightarrow$ E152 in B\*2706, N $\rightarrow$ S97, Y $\rightarrow$ H113, H $\rightarrow$ N114, D $\rightarrow$ Y116 and S $\rightarrow$ R131 in B\*2707, D $\rightarrow$ S77, T $\rightarrow$ N80, L $\rightarrow$ R82, and R $\rightarrow$ G83 in B\*2708, and D $\rightarrow$ H116 in B\*2709.

#### Figure 2.

TCR  $\alpha$  and  $\beta$  gene segments and sequence of the CDR3 region in productive transcripts from anti-B\*2705 CTL with identical  $\beta$  chains. V $\alpha$  and V $\beta$  subfamilies are indicated by number and classified according to the homology subgroup to which they belong. The 12SRF clonotype included CTL 12SRF, 12SLG, 60SLG, 4S15, 11S15, and 37SLG which had the same TCR but were cloned independently from the same bulk population. CTL 11.8SLG showed an additional but weak crossreaction with B\*2702 (López et al.<sup>6</sup>).

#### Figure 3.

Comparison of amino acid sequences in CDR1 and CDR2 of the V $\beta$  segments found among anti-B\*2705 CTL. CDR are defined as in Chothia et al.<sup>33</sup>. V $\beta$  segments are grouped according to their homology subgroup (h.s.). The number (N) of clonotypes in which each V $\beta$  segment was found, and their total number from each subgroup (T), are given. In those positions in which one or two structurally similar residues were found in more than 75% of h.s. 4 V $\beta$  segments, the corresponding motif is shown on top, and the corresponding residues are boxed. Motifs appearing among anti-B\*2705 clonotypes with a frequency more than double that in CD8<sup>+</sup> PBL (see Table 4) are underlined.

Table 1. Crossreaction of anti-HLA-B27 CTL clones with HLA-B27 subtypes<sup>1</sup>

| <u>Subtype</u> | <u>Anti-HLA-B*2705 CTL from Individual Donors</u> |            |           |            |           |            |           |                   |              |            |
|----------------|---|------------|-----------|------------|-----------|------------|-----------|-------------------|--------------|------------|
|                | <u>PA</u>   |            | <u>DL</u> |            | <u>GM</u> |            | <u>SR</u> |                   | <u>TOTAL</u> |            |
|                | <u>N</u>  | <u>(%)</u> | <u>N</u>  | <u>(%)</u> | <u>N</u>  | <u>(%)</u> | <u>N</u>  | <u>(%)</u>        | <u>N</u>     | <u>(%)</u> |
| B*2705         | 18  | (100)      | 15        | (100)      | 18        | (100)      | 33        | (100)             | 84           | (100)      |
| B*2701         | 3   | (17)       | 2         | (13)       | 8         | (47)       | 11        | <sup>1</sup> (33) | 24           | (29)       |
| B*2702         | 8   | (44)       | 4         | (27)       | 5         | (28)       | 11        | (33)              | 28           | (33)       |
| B*2703         | 9   | (50)       | 2         | (13)       | 9         | (50)       | 20        | (61)              | 40           | (48)       |
| B*2704         | 0   | (0)        | 0         | (0)        | 6         | (33)       | 4         | (12)              | 10           | (12)       |
| B*2706         | 0   | (0)        | 0         | (0)        | 5         | (28)       | 2         | (6)               | 7            | (8)        |

| <u>Subtype</u> | <u>Anti-HLA-B*2703 CTL from Individual Donors</u> |            |           |            |  |  | <u>TOTAL</u> |            |
|----------------|---|------------|-----------|------------|--|--|--------------|------------|
|                | <u>DL</u>   |            | <u>GM</u> |            |  |  | <u>N</u>     | <u>(%)</u> |
|                | <u>N</u>  | <u>(%)</u> | <u>N</u>  | <u>(%)</u> |  |  |              |            |
| B*2703         | 21  | (100)      | 15        | (100)      |  |  | 36           | (100)      |
| B*2705         | 18  | (86)       | 10        | (67)       |  |  | 28           | (78)       |
| B*2701         | 2   | (10)       | 0         | (0)        |  |  | 2            | (6)        |
| B*2702         | 6   | (29)       | 1         | (7)        |  |  | 7            | (19)       |
| B*2704         | 4   | (19)       | 2         | (13)       |  |  | 6            | (17)       |
| B*2706         | 1   | (5)        | 2         | (13)       |  |  | 3            | (8)        |

<sup>1</sup> Figures are the number (N) and percentage (%) of CTL clones recognizing each subtype. Data are from López et al.<sup>6</sup>

**Table 2.** Recognition of B\*2705 mutants by anti-HLA-B27 CTL<sup>1</sup>

| CTL         | Pocket | Mutants | Relative cytotoxicity |          | N  |
|-------------|--------|---------|-----------------------|----------|----|
|             |        |         | 0-50%                 | 51-100%  |    |
| Anti-B*2705 | A      | S167    | 9 (69%)               | 4 (31%)  | 13 |
|             |        | H171    | 10 (76%)              | 3 (23%)  | 13 |
|             | B      | M45     | 7 (53%)               | 6 (47%)  | 13 |
| Anti-B*2703 | A      | S167    | 3 (20%)               | 12 (80%) | 15 |
|             |        | H171    | 3 (20%)               | 12 (80%) | 15 |
|             | B      | M45     | 12 (80%)              | 3 (20%)  | 15 |

<sup>1</sup> Figures are the number and (in parenthesis) percent of CTL showing relative cytotoxicity towards the corresponding mutant in the range indicated on top of each column. N: number of CTL analyzed with each mutant. Data are from Villadangos et al.<sup>8</sup>.

Table 3. TCR V $\beta$  gene segment usage among anti-B\*2705 CTL

| V $\beta$<br>Homology<br>Subgroup | Donor <sup>1</sup>                          |                         |   |                          | Total                                       |                          |
|-----------------------------------|---|-------------------------|---|--------------------------|---|--------------------------|
|                                   | GM  |                         | SR  |                          | <u><math>\alpha</math>-B*2705</u><br>(N=26) | <u>Control</u><br>(N=19) |
|                                   | <u><math>\alpha</math>-B*2705</u><br>(N=11) | <u>Control</u><br>(N=9) | <u><math>\alpha</math>-B*2705</u><br>(N=15) | <u>Control</u><br>(N=10) |   |                          |
| 1                                 | 3 (27%)                                     | 4 (44%)                 | 3 (20%)                                     | 5 (50%)                  | 6 (23%)                                     | 9 (47%)                  |
| 2                                 | 1 (9%)                                      | 1 (11%)                 | 2 (13%)                                     | 0                        | 3 (12%)                                     | 1 (5%)                   |
| 3                                 | 1 (9%)                                      | 3 (33%)                 | 1 (7%)                                      | 3 (30%)                  | <u>2 (8%)</u>                               | 6 (32%)                  |
| 4                                 | <u>6 (55%)</u>                              | 1 (11%)                 | <u>9 (60%)</u>                              | 2 (20%)                  | <u>15 (58%)</u>                             | 3 (16%)                  |

<sup>1</sup> Number (N) and percentage of V $\beta$  segments from each subgroup in anti-B\*2705 CTL and in non-anti-B27 T-cells (control) from each donor. Values corresponding to anti-B\*2705 CTL that show statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) with the respective control are in bold and underlined.

Table 4. Recurrent motifs in V $\beta$  CDR1 and CDR2 regions among anti-B\*2705 CTL

|      | Position n <sup>o</sup> | Residue <sup>1</sup> | h.s.4<br>(N=22) <sup>2</sup> | all<br>(N=38) <sup>2</sup> | % in CD8 <sup>+</sup> PBL <sup>3</sup> | Ratio <sup>4</sup> |
|------|-------------------------|----------------------|------------------------------|----------------------------|--|--------------------|
| CDR1 | 26                      | D + N                | 21 (95%)                     | 21 (55%)                   | 31                                     | 1.8                |
|      | 27                      | M                    | 18 (82%)                     | 19 (50%)                   | 24                                     | <u>2.1</u>         |
|      | 28                      | D + N                | 21 (93%)                     | 21 (55%)                   | 23                                     | <u>2.4</u>         |
|      | 29                      | H                    | 22 (100%)                    | 31 (82%)                   | 76                                     | 1.1                |
|      | 30                      | D + E                | 19 (86%)                     | 19 (50%)                   | 39                                     | 1.3                |
| CDR2 | 47                      | Y                    | 20 (91%)                     | 20 (53%)                   | 20                                     | <u>2.7</u>         |
|      | 48                      | Y + F                | 22 (100%)                    | 26 (73%)                   | 52                                     | 1.3                |
|      | 49                      | S                    | 22 (100%)                    | 23 (61%)                   | 42                                     | 1.5                |
|      | 52                      | V                    | 17 (77%)                     | 17 (45%)                   | 18                                     | <u>2.5</u>         |
|      | 57                      | K                    | 21 (95%)                     | 25 (66%)                   | 53                                     | 1.2                |
|      | 58                      | G                    | 22 (100%)                    | 34 (89%)                   | 75                                     | 1.2                |
|      | 59                      | D + E                | 22 (100%)                    | 22 (58%)                   | 28                                     | <u>2.1</u>         |
|      | 60                      | V + I                | 22 (100%)                    | 31 (82%)                   | 54                                     | 1.5                |
|      | 61                      | P                    | 18 (82%)                     | 23 (61%)                   | 46                                     | 1.3                |

**Footnotes to Table 4:**

<sup>1</sup> One or two structurally related residues present in at least 18 of the 22 clonotypes expressing V $\beta$  segments from h.s. 4 (Figure 3).

<sup>2</sup> Number and percentage of the V $\beta$  segments from h.s. 4 or from all V $\beta$  segments in anti-B\*2705 clonotypes that have the particular motif.

<sup>3</sup> Added percentage of the V $\beta$  subfamilies expressing the corresponding motif at each position among CD8<sup>+</sup> PBL. Based on Akolkar et al.<sup>9</sup>.

<sup>4</sup> % in all / % in CD8<sup>+</sup> PBL. Motifs for which this ratio is >2 are in bold.



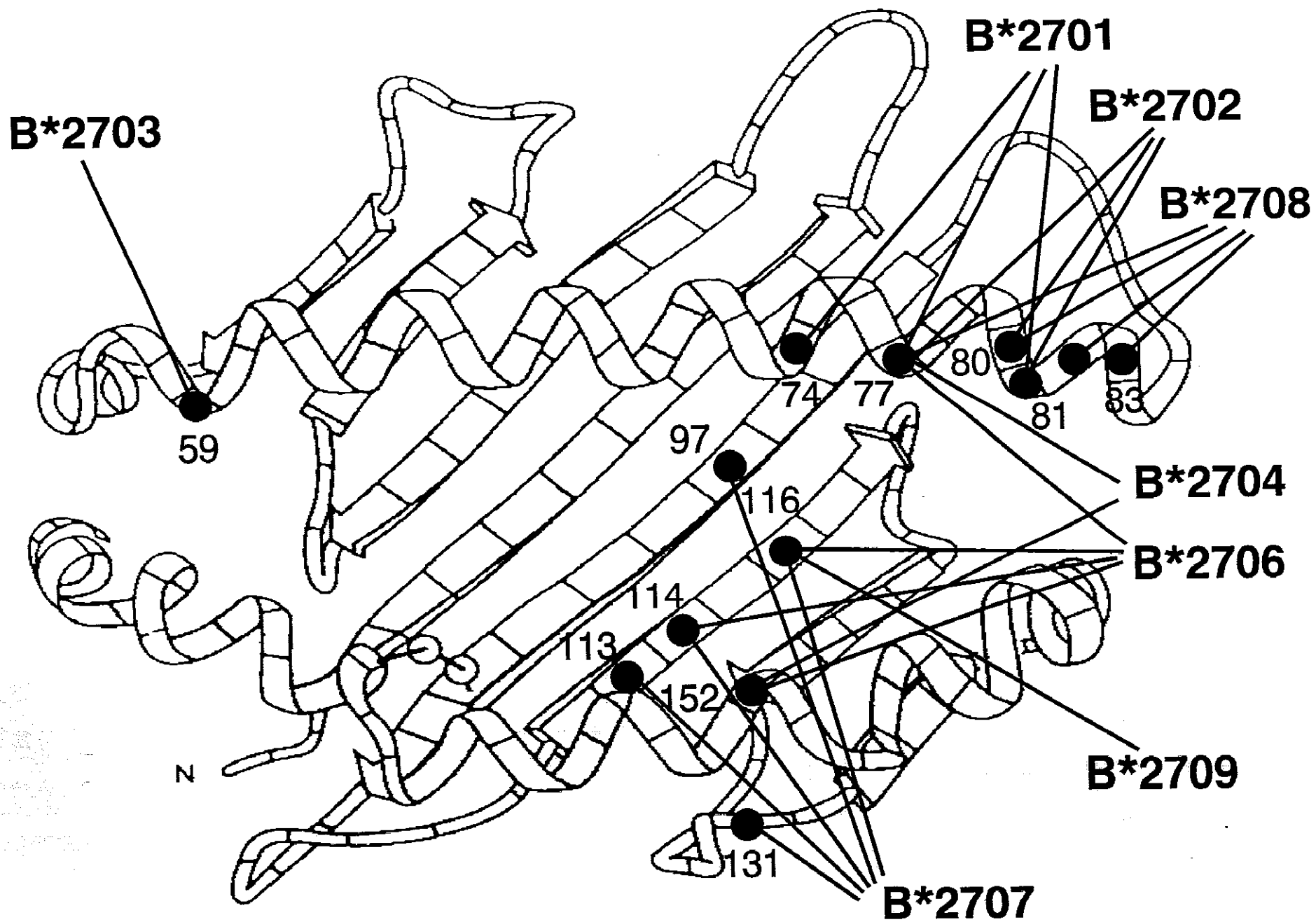


Fig. 4.

| Reaction Pattern with Subtypes | CTL     | $V\alpha$ -Homology Subgroup |     |            |   |      |   |   | $J\alpha$ | $V\beta$ -Homology Subgroup |   |   |   |   | $J\beta$ |
|--------------------------------|---------|------------------------------|-----|------------|---|------|---|---|-----------|-----------------------------|---|---|---|---|----------|
|                                |         | 1                            | 2   | 3          | 4 | 5    | 6 | 7 |           | 1                           | 2 | 3 | 4 | 5 |          |
| 5, 3                           | 12SRF   |                              |     |            |   | 20.1 |   |   | 63.124    |                             |   |   | 3 |   | 2.1      |
| 5, 3                           | 33.8S15 |                              |     | $\delta 4$ |   |      |   |   | AC25      |                             |   |   | 3 |   | 2.1      |
| 5, 3                           | 13SLG   | 8.1                          |     |            |   |      |   |   | FR6       |                             |   |   | 3 |   | 2.1      |
| 5, 3                           | 11.8SLG |                              | 3.1 |            |   |      |   |   | 62.119    |                             |   |   | 3 |   | 2.1      |

|         | $V\alpha$     | $N+J\alpha$       | $V\beta$ | $N+D\beta$ | $J\beta$ |
|---------|---------------|-------------------|----------|------------|----------|
| 12SRF   | Y Y C L V G D | K V N T G F Q K L | L C A S  | R L A G N  | N E Q    |
| 33.8S15 | Y F C A M R   | R A A A A G N K L | L C A S  | R L A G N  | N E Q    |
| 13SLG   | Y F C A A     | G S P R Y D K V   | L C A S  | R L A G N  | N E Q    |
| 11.8SLG | Y F C A L     | T G A N N L       | L C A S  | R L A G N  | N E Q    |

Fig 2.

h.s. VB

26

30 31A

41

|   |          |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 4 | 14       | N | M | N | H | E | Y | - | Y | Y | S | M | N | V | E | V | T | D | K | - | - | G | D | V | P | E | 7 |
| 4 | 3        | D | M | D | H | E | N | - | Y | F | S | Y | D | V | K | M | K | E | K | - | - | G | D | I | P | E | 6 |
| 4 | 17.1     | N | L | N | H | D | A | - | Y | Y | S | Q | I | V | N | D | F | Q | K | - | - | G | D | I | A | E | 3 |
| 4 | 13IGRb14 | D | M | N | H | N | S | - | Y | Y | S | A | S | E | G | T | T | D | K | - | - | G | E | V | P | N | 2 |
| 4 | 13IGRb16 | D | M | N | H | N | Y | - | Y | Y | S | V | G | A | G | I | T | D | K | - | - | G | E | V | P | N | 1 |
| 4 | 13.4     | D | M | N | H | E | Y | - | H | Y | S | V | G | E | G | T | T | A | K | - | - | G | E | V | P | D | 1 |
| 4 | 13.1/2   | D | M | N | H | E | Y | - | H | Y | S | V | G | A | G | I | T | D | Q | - | - | G | E | V | P | N | 1 |
| 4 | 15.1     | T | K | G | H | D | R | - | Y | Y | S | F | D | V | K | D | I | N | K | - | - | G | E | I | S | D | 1 |

22

|   |       |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 1     | R | S | G | D | L | S | - | I | Q | Y | Y | N | G | E | E | R | A | K | - | - | G | N | I | L | E | 1 |   |
| 1 | 5.1/2 | I | S | G | H | R | S | - | F | E | Y | F | S | E | T | Q | R | N | K | - | - | G | N | F | P | G | 1 |   |
| 1 | 5.4   | I | S | G | H | K | S | - | F | Q | Y | Y | E | K | E | E | R | G | R | - | - | G | N | F | P | D | 1 |   |
| 1 | 6.4   | I | S | E | H | N | R | - | T | Y | F | Q | N | E | A | Q | L | E | K | S | - | - | R | L | L | S | D | 1 |
| 1 | 6GLPA | I | S | G | H | T | A | - | I | Y | F | Q | G | N | S | A | P | D | K | S | - | - | G | L | P | S | D | 1 |
| 1 | 8.1   | I | S | G | H | N | S | - | I | Y | F | N | N | N | V | P | I | D | D | S | - | - | G | M | P | E | D | 1 |
| 1 | 18.1  | M | K | G | H | S | H | - | V | Y | L | Q | K | E | N | I | I | D | E | S | - | - | G | M | P | K | E | 1 |

|   |          |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |   |
|---|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 2 | 7HT267.2 | H | L | G | H | N | A | - | F | V | Y | N | F | K | E | Q | T | E | N | - | - | N | S | V | P | S | 2 |   |   |
| 2 | 7.1      | H | M | G | H | R | A | - | F | V | Y | S | Y | E | K | L | S | I | N | - | - | E | S | V | P | S | 1 |   |   |
| 3 | 4        | V | D | S | Q | V | T | M | A | T | A | N | Q | G | S | E | A | T | Y | E | S | - | - | G | F | V | I | D | 5 |
| 3 | 2        | L | D | F | Q | A | T | T | A | T | S | N | E | G | S | K | A | T | Y | E | Q | - | - | G | V | E | K | D | 1 |

GIBALACER ACIN J:K  
 Hand Sample

7/3