

Universidad Nacional de la Plata

Facultad de Ciencias Exactas



El complejo mayor de histocompatibilidad humano:

polimorfismo genómico del HLA-B35

Lilien Patricia Chertkoff

10881

TESIS

La Plata, 1992

DONACION.....
A.....
Fecha **12 OCT. 1990**
Inv. B. — Inv. **54369**

El presente trabajo de tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Bioquímicas ha sido realizado en el Hospital de Clínicas "José de San Martín", Facultad de Medicina, UBA.

Bajo la dirección del Dr. M. Leonardo Satz.

a mis padres
a Fernando
a Sebastián

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Leonardo Satz por su valiosa dirección en mi trabajo de tesis.

Al Dr. Carlos Alberto Fossati por su cálida disposición en la tarea de Asesor Científico ante la Facultad.

A mi querida amiga y compañera Mariana Herrera por el apoyo y la compañía que me brindó a lo largo de estos años.

A todos mis compañeros de la sala 4, por los buenos momentos compartidos. Muy especialmente, a mis amigas Graciela Theiler y María del Carmen Salamone porque sin su generosa solidaridad este trabajo hubiera sido mucho más difícil.

A mi querida María Rosa Padrós quien me brindó el cariño de su casa y su familia cuando yo recién llegaba a Bs. As.

A la Dra Alicia Mota y las Lic. Ethel Palavecino y María del Carmen Guala por la tipificación serológica de los individuos estudiados.

Al Dr. Leonardo Fainbiom por sus aportes críticos a este trabajo

Al Dr. Héctor Targovnik por sus valiosos consejos y por creer en mí.

Al Dr Oscar Grau y el Dr Gabriel Favelukes por haberme brindado un lugar de trabajo durante el período en que se construyó nuestro laboratorio. A mis amigos del área de Química Biológica, particularmente a Daniel Grasso que con toda su calidez fue allí mi cicerone.

A Alejandra Cherňavsky por demostrarme que, en los momentos difíciles, siempre los buenos amigos están al alcance de la mano.

A la Dra. Mónica Suarez y a los laboratorios Boehringer por su aporte para la realización material de esta Tesis.

Indice

INTRODUCCION

NATURALEZA MOLECULAR DE LA RESPUESTA INMUNE	1
Función de las moléculas codificadas en el complejo mayor de histocompatibilidad	2
ESTRUCTURA Y DISTRIBUCION DE LAS MOLECULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE CLASE I Y II	6
Moléculas de clase I	6
Productos de clase I	9
Moléculas de clase II	9
Productos de clase II	10
Estructura tridimensional de moléculas HLA de clase I	11
PRESENTACION DE PEPTIDOS PROPIOS.	14
La presentación de péptidos propios durante la ontogenia determinaría el repertorio de reconocimiento de los linfocitos T maduros	16
ORGANIZACION GENETICA DEL SISTEMA HLA	17
Loci de clase I	17
Loci de clase III	19
Loci de clase II	20
ESTRUCTURA DE LOS GENES HLA DE CLASE I	21
REGULACION DE LA EXPRESION DE GENES HLA DE CLASE I	23
Elementos de acción en cis	23
Elementos de acción en trans	25
POLIMORFISMO DE LAS MOLECULAS HLA DE CLASE I	27
EVOLUCION DE LAS MOLECULAS DE CLASE I	31
DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO	33
HLA Y GENETICA POBLACIONAL	34
HLA Y ENFERMEDAD	34
EI ALELO HLA-B35 Y SU ASOCIACION A ENFERMEDAD	37
<u>OBJETIVOS</u>	40

MATERIALES Y METODOS

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS	42
Preparación de DNA a partir de linfocitos de sangre periférica	42
Preparación de plásmidos	42
Purificación del DNA de fagos recombinantes	43
METODOS ELECTROFORETICOS	45
Agarosa nativa	45
Aislamiento de fragmentos de DNA por electroelución	45
Geles desnaturalizantes	46
SUBCLONADO DE FRAGMENTOS DE DNA EN PLASMIDOS	47
Preparación del vector e inserto	47
Reacción de ligado	47
Preparación de bacterias competentes	48
Transformación	48
CONSTRUCCION DE UNA GENOTECA PARCIAL DE DNA HUMANO EN EL FAGO VECTOR ϕ gtWES	49
Preparación de insertos a partir de DNA genómico: separación de los mismos por tamaño utilizando gradiente de sacarosa	49
Ligación del DNA inserto a los brazos del fago ϕ gtWES	49
Empaquetamiento in vitro del DNA ligado	50
Titulación de la genoteca	50
Amplificación de la genoteca	51
IDENTIFICACION DE SECUENCIAS POR HIBRIDIZACION.	52
Identificación de fagos recombinantes	52
Identificación de colonias recombinantes	53
Identificación de secuencias de DNA (Southern blot)	53
HIBRIDIZACION CON SONDAS MOLECULARES RADIOACTIVAS	54
Marcación de las sondas por el método de "Random-Priming	54
Condiciones de hibridización y lavados	55
DETERMINACION DE SECUENCIAS NUCLEOTIDICAS DE DNA	56
Hibridación del oligonucleótido iniciador al DNA molde	56
Extensión del iniciador y marcación	56
Reacción de terminación	57

Electroforesis	57
Sondas utilizadas	58
Oligonucleótidos específicos utilizados para secuenciación de clones de DNA genómico HLA clase I	59

RESULTADOS Y DISCUSION

ESTUDIOS DE POLIMORFISMO GENOMICO EN GENES HLA DE CLASE I Y SU CORRELACION CON LA SEROLOGIA	60
ESTUDIO DE LAS LINEAS CELULARES	62
Análisis de las condiciones metodológicas	62
Metodología experimental y resultados	65
RFLP para los genes HLA de clase I obtenidos con la enzima BglII	70
Conclusiones generales de los RFLP hallados para genes de Clase I	73
CONCLUSIONES GENERALES DEL XWIH	83
BUSQUEDA DE RFLPs ASOCIADOS AL ALELO HLA-B35	84
La banda EcoRV/4,6 kb segrega con el haplotipo HLA-B35,Cw4	87
La banda EcoRV/4.6 kb probablemente contiene al gen B35	89
Localización del sitio EcoRV polimórfico (en la región 3' del gen)	92
El fragmento EcoRV/4.6 kb también está asociado a otros alelos del locus HLA-B	96
Naturaleza de este polimorfismo de restricción	97
El RFLP EcoRV/4,6 kb no constituye un marcador de pacientes portadores de HCA	99
AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UN CLON GENOMICO QUE CODIFICA PARA HLA-B35.	101
CONSTRUCCION DE UNA BIBLIOTECA GENOMICA PARCIAL A PARTIR DE DL	101
RASTREO DE LA GENOTECA	102
CARACTERIZACION DE LOS CLONES POSITIVOS	105
SUBCLONADO Y MAPEO DE RESTRICCION	108

DETERMINACION DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL CLON 621	110
Análisis de la secuencia nucleotidica del clon 621. Características generales	110
Análisis de las diferencias entre B3501 y B3502.	114
Implicancias estructurales	114
Implicancias funcionales	116
Análisis comparativo de las secuencias intrónicas y 3' no traducida	119
Comparación de las secuencias 5' flanqueantes con aquella de otros genes de clase I	119
Consideraciones acerca del origen evolutivo de B3502	122
<u>CONCLUSIONES</u>	125
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	127

Introducción

NATURALEZA MOLECULAR DE LA RESPUESTA INMUNE ESPECIFICA

La característica más destacada del sistema inmune de los vertebrados es su capacidad para montar una respuesta altamente específica contra virtualmente cualquier entidad foránea, aún aquellas nunca antes vistas en el transcurso de su vida. Esta especificidad está determinada por los linfocitos B y T. Estas células son morfológicamente similares, derivan de un precursor hematopoyético común pero se diferencian independientemente en la médula ósea y en el timo. Las células B fabrican inmunoglobulinas (Igs) y las células T realizan un conjunto heterogéneo de funciones que incluyen la cooperación con las células B, la producción de distintas reacciones de hipersensibilidad y la lisis específica (citotoxicidad) de cualquier estirpe celular infectada por un patógeno intracelular (ej, un virus). Las inmunoglobulinas son la única fuente de especificidad de las células B, mientras que el receptor de las células T (RecT) y las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) (dos glicoproteínas de superficie que provienen de dos familias moleculares distintas), son los elementos clave de la especificidad en la respuesta T a antígenos foráneos.

El RecT y las inmunoglobulinas son producto del reordenamiento somático de genes y se expresan clonalmente (Davis, 1988). Esto significa que cada linfocito posee un receptor capaz de reconocer una sola especificidad antigénica. Existen, sin embargo, dos importantes diferencias en el reconocimiento antigénico por parte de ambos grupos de receptores. La primera consiste en el tipo de epítopo o determinante antigénico reconocido. Los RecT reconocen péptidos cortos, secuenciales, menores de 10 aminoácidos (Marrack, 1987; Rothbard, 1988), lo que usualmente requiere del despliegue de la proteína antigénica y su proteólisis dentro de la célula: esto se denomina "procesamiento del antígeno" (Allen, 1987). Las Igs, por el contrario, interactúan comunmente con epítopos formados por la propia estructura tridimensional de

la proteína nativa, si bien pueden también hacerlo contra péptidos. La segunda diferencia radica en la intervención de moléculas que actúan como presentadoras del antígeno al receptor. Para las células B tales moléculas no existen; la Ig en su función de receptor forma un complejo bimolecular estable con la proteína antigénica. Para las células T, en cambio, el péptido antigénico debe estar unido a una molécula del MHC y es este complejo formado por la molécula MHC más el péptido, la estructura que es reconocida por el RecT. Por lo tanto, las moléculas del MHC poseen la capacidad de unir péptidos y puede considerarse que su función esencial es la de presentarlos a los linfocitos T.

Función de las moléculas codificadas en el complejo mayor de histocompatibilidad

Existen dos tipos de glicoproteínas estrechamente relacionadas entre sí y codificadas en el MHC. A pesar de ser estructuralmente distintas ambas cumplen la función de presentación antigénica. Se las denomina moléculas MHC de clase I y clase II. Se expresan en la superficie celular y exhiben un enorme polimorfismo poblacional. Las de clase I presentan antígenos a células T que expresan en su superficie celular la glicoproteína CD8 y las de clase II a los linfocitos T que presentan, en cambio, la glicoproteína CD4. (Parnes, 1989; Teh, 1988). Se distinguen también, si bien de un modo menos estricto, por la forma en que han sido procesados los antígenos y por la actividad funcional de las células T que resultan así activadas. Las moléculas de clase I habitualmente presentan péptidos derivados de proteínas sintetizadas endógenamente, tales como componentes virales producidos luego de una infección, y esto resulta en la activación de linfocitos T citotóxicos (T_c) (Townsend, 1989). Por otro lado, las moléculas de clase II presentan generalmente péptidos derivados de proteínas exógenas endocitadas y parcialmente degradadas por las

células y esto estimula a los linfocitos colaboradores o "helpers" (Th) (Unanue, 1987). Se presume que esta especificidad en el tipo de antígeno presentado por moléculas de clase I o clase II es el resultado de la segregación de los compartimientos intracelulares donde se produce el encuentro entre las moléculas del MHC y el péptido. (Germain, 1986; Bevan, 1987).

En la década del '70 surgieron las primeras evidencias experimentales que mostraron que los linfocitos T requieren para su activación del reconocimiento simultáneo del antígeno junto a moléculas de histocompatibilidad presentes en la superficie celular, fenómeno que se denominó "restricción en el reconocimiento T" (Rosenthal, 1973; Zinkernagel, 1974). Comenzó entonces un extenso debate acerca de las bases moleculares de este reconocimiento dual y si en él participaban uno o dos receptores T (Matzinger P, 1981). El conocimiento de la estructura del RecT y la conformación espacial de las moléculas de clase I permitió comprender con bastante claridad este fenómeno.

Experimentos de tranfección con los genes que codifican para las cadenas α y β del RecT, demostraron que un único RecT era capaz de reconocer un complejo formado por el antígeno foráneo y la molécula de histocompatibilidad (Dembic, 1986). Con respecto al procesamiento del antígeno, se demostró que la incubación de células presentadoras de antígeno con pequeños péptidos permitía soslayar los pasos de procesamiento proveyendo el blanco necesario para los RecT (Townsend, 1986). Estas observaciones condujeron a postular que las moléculas MHC se unían a fragmentos del antígeno, conformando así el ligando para los RecT. Los experimentos de Babbitt y col (1985) que demostraron la unión específica de determinados péptidos a ciertas moléculas MHC de clase II murinas constituyeron la primera evidencia directa que corroboraba este modelo. La cristalización de una molécula de clase I (Bjorkman, 1987) mostró la co-precipitación de un material "electrón denso", de naturaleza extraña a esta molécula, atrapado en una zona muy precisa de su estructura, el ahora denominado "bol-

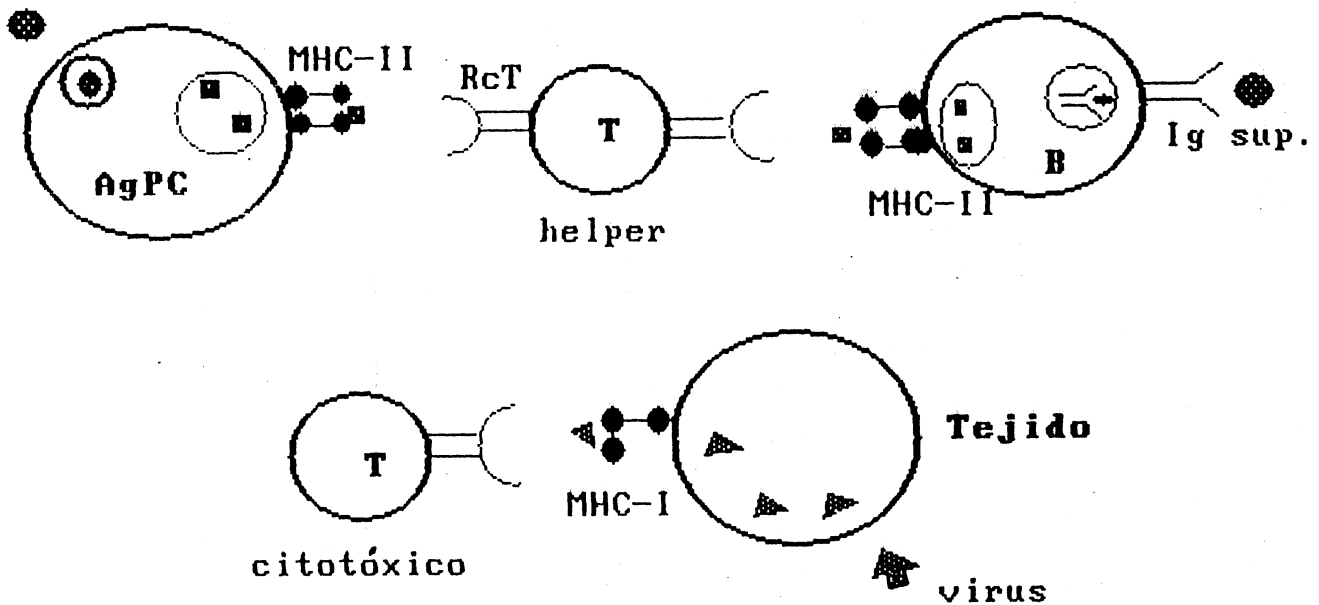
sillo de presentación antigénica", lo que reafirmó la hipótesis.

El MHC fue descrito, originalmente, por el papel que estas moléculas desempeñan como blanco del ataque inmunológico en el rechazo de un transplante entre individuos histoincompatibles (Snell, 1981). Estas respuestas alorreácticas en las que el sistema inmune de un individuo produce anticuerpos y células T específicos contra las moléculas MHC de otro individuo se deben, en parte, al enorme polimorfismo poblacional que exhiben sus genes. El número de alelos diferentes para cada uno de los loci del MHC y el complejo patrón de sustituciones que los genera, convierte a esta familia de genes en la más polimórfica de los vertebrados superiores. Las bases moleculares de esta enorme diversidad y su significado funcional son motivo de análisis en esta Tesis.

Se pudo observar que las diferencias polimórficas entre las distintas moléculas afectan la presentación antigénica, tanto en lo referente a la afinidad por un péptido en particular, como en la respuesta por parte de las células T (Zinkernagel, 1974; Rothbard, 1988; Guillet, 1986). La determinación de la secuencia nucleotídica de diferentes alelos MHC reveló la presencia de regiones específicas de la proteína donde se concentra preferentemente esta diversidad (Parham, 1988). En estas mismas regiones se observa, además, un marcado predominio de sustituciones codificantes sobre sustituciones silenciosas. Estas observaciones sugirieron que esta diversificación ha sido el resultado de un proceso de selección natural (Jaulin, 1985; Hughes, 1988). El modelo más aceptado para el reconocimiento T y su restricción por MHC postula que el RecT interactúa con el complejo formado por un péptido unido a una dada molécula MHC de clase I o clase II y que el clon T así seleccionado solo podría ser reestimulado por el mismo complejo o por uno muy estrechamente relacionado (Fig. 1). La especificidad de la restricción debería ser, entonces, el resultado de la variabilidad en la secuencia de las moléculas MHC. Esta también determinará la capacidad de unirse a los péptidos y el RecT seleccionado. La determinación de la estructura

tridimensional de HLA-A2, molécula MHC de clase I humana (Bjorkman,1987), confirmó los principios generales de este modelo y reveló detalles adicionales acerca de las interacciones moleculares involucradas así como del papel desempeñado por el polimorfismo.

Figura 1: Interacción entre las moléculas del sistema inmune ante la presencia de un antígeno foráneo. Función de los moléculas del MHC. AgPc: célula presentadora de un antígeno en el "contexto del MHC de clase II". T4: linfocito T "helper" (regulador de la respuesta por interacción con las otras células del sistema inmune). B: linfocito B. T8: linfocito T citotóxico responsable de la eliminación de células que presentan antígenos foráneos en el "contexto de clase I"



ESTRUCTURA Y DISTRIBUCION DE LAS MOLECULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE CLASE I Y II

Moléculas de clase I

Las moléculas MHC de clase I están constituidas por dos cadenas unidas no covalentemente. Una de ellas, la cadena pesada, denominada α , posee aproximadamente 340 aminoácidos, con un peso molecular de 44 Kd. Sólo esta cadena está codificada dentro del MHC y es la que porta los residuos de hidratos de carbono. La cadena pesada atraviesa la membrana plasmática como una proteína integral, con su porción N-terminal hacia afuera de la célula (Fig. 2). Su porción extracelular se divide en tres dominios llamados α_1 , α_2 y α_3 (Tragardh, 1979), compuestos por 90, 92, y 92 aminoácidos respectivamente; cada uno de ellos está codificado por un exón diferente (Malissen, 1982). El dominio α_1 es el más externo y contiene el extremo N-terminal. A continuación del dominio α_3 , el más cercano a la membrana plasmática, se extiende una región transmembránica de aproximadamente 25 aminoácidos y una cola intracitoplasmática de alrededor de 30 aminoácidos.

La cadena liviana, llamada β_2 microglobulina, posee 99 aminoácidos y una masa relativa de 12 kd (Grey, 1973). Los dominios α_2 y α_3 y la β_2 microglobulina poseen un puente disulfuro intracatenario, formado por cisteínas separadas entre sí por unos 60 residuos. Los dominios α_3 y la β_2 microglobulina presentan similitud de secuencia con regiones constantes de las inmunoglobulinas (Orr, 1979, Tragardh, 1979, Peterson, 1972). Es por esto que las moléculas aquí descritas forman parte de la superfamilia de las Inmunoglobulinas, que incluye también al RecT y las moléculas MHC de clase II.

La mayoría de las sustituciones de aminoácidos entre los productos de diferentes alelos de clase I se localizan en los dominios α_1 y α_2 . El dominio α_3 es relativamente conservado y la β_2 microglobulina es invariante (Parham, 1988; Michaelson, 1983).

Figura 2: Estructura de las moléculas de histocompatibilidad de clase I y clase II insertados en la bicapa lipídica de la membrana plasmática. β_2m = β_2 microglobulina. Los puntos negros representan a los sitios de glicosilación; S-S: enlaces disulfuro.

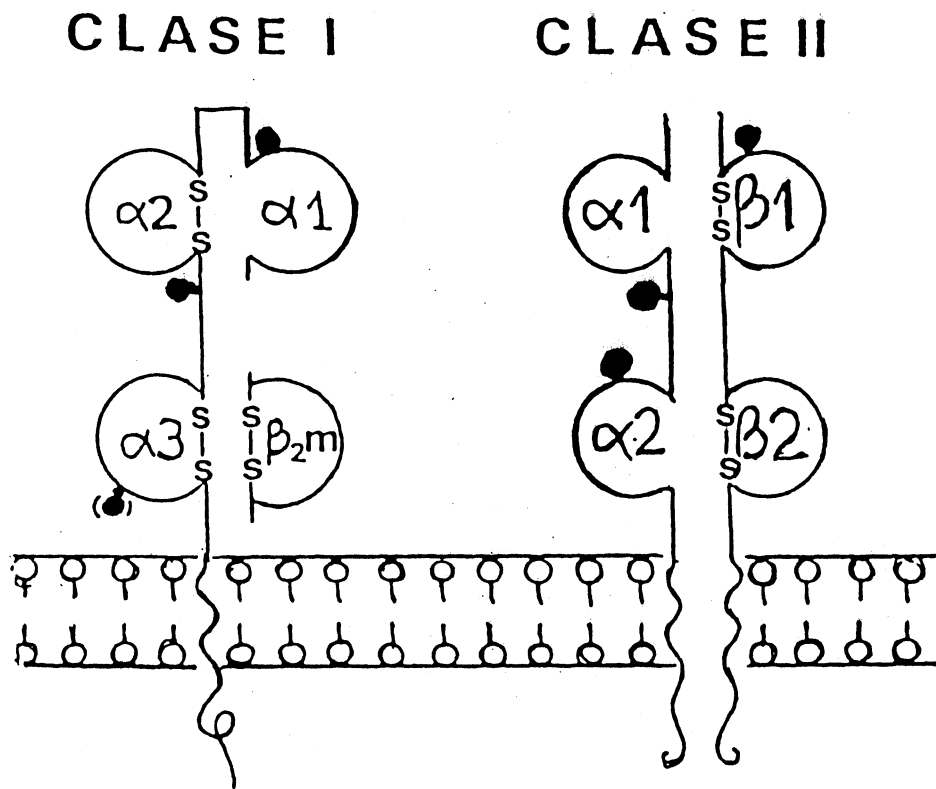


Tabla 1: Especificidades serológicas HLA de clase I reconocidos a partir del X^o Taller Internacional de Histocompatibilidad.

HLA-A	HLA-B	HLA-C
A1	B5	Cw1
A2	B7	Cw2
A3	B8	Cw3
A7	B12	Cw4
A10	B13	Cw5
A11	B14	Cw6
Aw19	B15	Cw7
A23(9)	B16	Cw8
A24(9)	B17	Cw9(w3)
A25(10)	B18	Cw10(w3)
A26(10)	B21	Cw11
A28	Bw22	
A29(w19)	B35	
A30(w19)	B37	
A31(w19)	B38(16)	
A32(w19)	B39(16)	
Aw33(w19)	B40	
Aw34(10)	Bw41	
Aw36	Bw42	
Aw43	B44(12)	
Aw66(10)	B45(12)	
Aw68(28)	Bw46	
Aw69(28)	Bw47	
Aw74(w19)	Bw48	
	B49(21)	
		Bw4
		Bw6

Productos de clase I:

En el hombre, el MHC se denomina HLA y presenta tres moléculas clase I distintas, denominadas HLA-A, HLA-B y HLA-C. Las mismas se expresan simultáneamente en la superficie de casi todas las células, con excepción de los glóbulos rojos y el sincisio trofoblasto (Flavel, 1986). Estas moléculas se diferencian entre sí por sus cadenas α pues comparten la $\beta 2$ microglobulina que, como ya se mencionó, es invariante. Las cadenas α están codificadas por los respectivos loci A, B y C, localizados dentro de la región genética de este sistema en el brazo corto del cromosoma 6 (Fig. 4, ver más adelante en esta Introducción).

Como se mencionó antes, la característica sobresaliente de estas moléculas es su enorme polimorfismo poblacional. La forma clásica de distinguir las distintas variantes es mediante reacciones serológicas, es decir, por medio de anticuerpos. Así, se han identificado hasta el presente más de 20 especificidades distintas para HLA-A, más de 40 diferentes para HLA-B y más de 10 para HLA-C (Tabla 1). Si se tiene en cuenta que la expresión de estas moléculas es codominante, el multiallelismo determina que la mayoría de los individuos sean heterocigotas y exhiban en la superficie celular seis productos diferentes de clase I: dos moléculas HLA-A, dos HLA-B y dos HLA-C.

Moléculas de clase II

Las moléculas de clase II son también heterodímeros unidos no covalentemente. Están constituidas por una cadena α de 229 aminoácidos (32-34 kd) y una β de 237 aminoácidos (28-29 kd) (Fig. 2) con sus extremos N-terminales hacia el exterior de la célula. Cada cadena posee dos dominios extracelulares, la cadena β presenta 2 puentes disulfuro intracatenarios (entre Cys separadas por aproximadamente 65 residuos) mientras que la cadena α sólo 1. El dominio más externo de la cadena β posee 94 aminoáci-

dos y 84, el más próximo a la membrana plasmática. A continuación del mismo se identifica una pequeña porción del 10 aminoácidos llamado péptido de conexión y a su término una porción de transmembrana de 21 residuos. El último tramo, intracitoplasmático, presenta un tamaño variable (de 8 a 18 aminoácidos) de acuerdo al producto codificado. La organización de la cadena α es similar.

Productos de clase II

Las moléculas de clase II presentan una distribución tisular muy restringida, limitada a ciertas células del sistema inmune, como linfocitos B, macrófagos y células T activadas (Flavel, 1986). Con la excepción de ciertas células especializadas (como las de Kupffer en el hígado y células de Langerhans en la piel), la mayoría de los tejidos no expresan estas moléculas de clase II (Reith, 1988). El hombre puede expresar en la superficie celular varios productos de clase II diferentes: las moléculas HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP. Cada heterodímero está constituido por distintas cadenas denominadas DR α /DR β , DQ α /DQ β y DP α /DP β . Cada cadena, a su vez, está codificada por un locus dado, a saber: DRA/DRB1, DQA/DQB1 Y DPA/DPB1 (ver Fig. 4). Ciertos individuos expresan además un cuarto producto denominado DRw52, DRw53 o DRB5, donde la cadena DR α es la misma que está presente en las moléculas DR y la cadena β es el producto de un gen denominado DRB3, DRB4 o DRB5, respectivamente (Bell, 1987) (Fig. 4).

Las moléculas de clase II, de igual modo que las de clase I, presentan un elevado polimorfismo. Se han identificado, por serología, 14 alelos diferentes para DR, 7 para DQ y 6 para DP. En este caso la expresión es también codominante.

Estructura tridimensional de moléculas HLA de clase I

En los últimos tres años, utilizando técnicas cristalográficas de difracción de rayos X, se determinó la estructura tridimensional de tres alelos HLA de clase I, HLA-A2 (Bjorkman, 1987), HLA-Aw68 (Garret, 1989) y HLA-B27 (Madden, 1991). Los esqueletos carbonados de las tres moléculas estudiadas resultaron muy similares, por lo que la descripción general de ellas se aplica, presumiblemente, a la mayoría de las moléculas MHC de clase I. Los diferentes alelos HLA de un mismo locus difieren entre sí en un rango de 1-50 aminoácidos y los de diferentes loci en 60-100 (Lawlor, 1988).

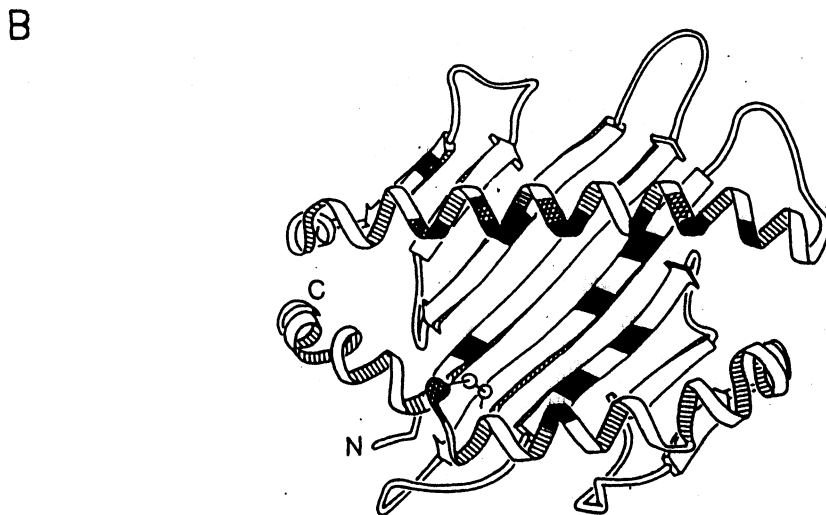
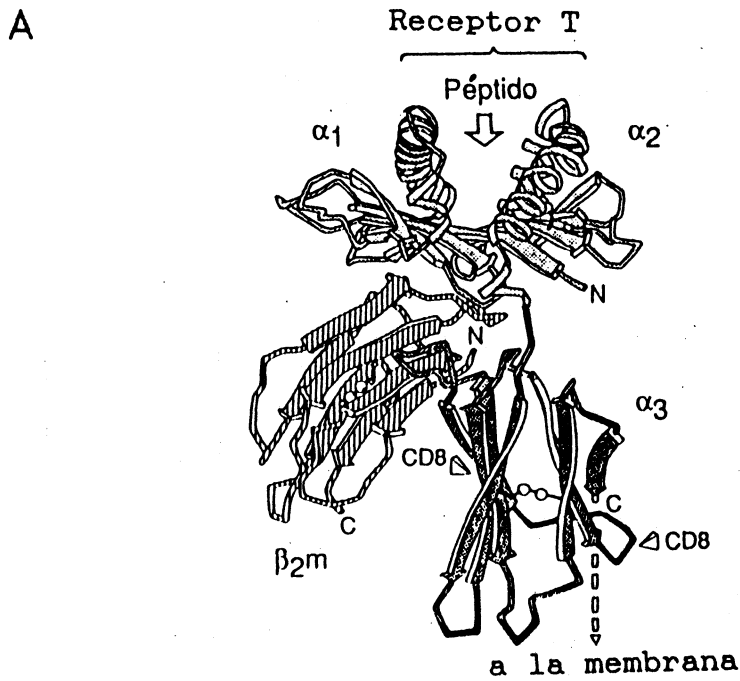
Las molécula HLA de clase I están organizadas espacialmente por dos grupos de dominios estructuralmente homólogos: uno de ellos, próximo a la membrana plasmática, está compuesto de los dominios α_3 y β_2 -m y el otro, más externo, está formado por los dominios α_1 y α_2 (Fig 3). Los dominios α_3 y β_2 -m, plegados formando estructuras " β -sandwich", semejan a las regiones constantes de las Igs, de acuerdo con lo que se dedujo a partir del conocimiento de sus secuencias primarias (Orr, 1979; Traghadh, 1979).

A pesar de que prácticamente no existe homología de secuencias entre los dominios α_1 y α_2 , éstos comparten una estructura terciaria común. Cada uno está compuesto por 4 cadenas antiparalelas con estructura de β -hélice que comprende la mitad N-terminal de cada dominio, seguido de una larga región de α -hélice. Ambos dominios se combinan para formar una plataforma constituida por las 8 cadenas β bordeada por las cadenas dispuestas en α -hélice. Esta estructura semeja una fosa abierta hacia afuera del plano de la membrana que se asienta sobre el soporte determinado por los dominios más conservados α_3 y β_2 -m. La cavidad de esta estructura define el sitio de presentación antigénica de la molécula de clase I. Además del hecho obvio de situarse en la parte más externa de la molécula donde sería fácilmente accesible a los RecT, existen otras líneas que sostienen esta evidencia:

Figura 3: Representación de la estructura tridimensional de la molécula HLA-A2. Las cadenas β se muestran como flechas planas en dirección amino \rightarrow carboxi. Las regiones de α -hélice como cintas rizadas. Los enlaces disulfuro se indican como círculos.

A: Vista lateral. Se indica el sitio de unión al péptido y la zona de interacción con el receptor T.

B: Sitio de presentación de péptidos tal como sería visto por el receptor T. Se resaltan los residuos de alta variabilidad. Zonas en negro: residuos cuyas cadenas laterales apuntan hacia la luz de la cavidad, zonas cuadrilladas: residuos cuyas cadenas laterales apuntan hacia arriba de las α -hélices.



1. La estructura cristalina de la molécula HLA-A2 muestra una molécula o mezcla de moléculas ocupando este sitio que coprecipitaron con la proteína HLA. El hecho de haber permanecido unidas durante todo el procedimiento de purificación resulta consistente con la baja cinética de disociación (con constante de disociación micromolares) que se observa en el caso de péptidos unidos a moléculas de clase II (Buus, 1986).

2. Este sitio posee un tamaño y forma adecuados para acomodar péptidos cuyas dimensiones mostraron ser las apropiadas para ser reconocidas por células T (Rothbard, 1988). Sus dimensiones son 25 Å de largo, 10 Å de ancho y 11 Å de profundidad. Un péptido de 12-20 aminoácidos en conformación α -helicoidal podría calzar adecuadamente dentro del foso. Alternativamente este sitio podría acomodar péptidos de alrededor de 8-9 residuos en una conformación extendida (Madden, 1991). Péptidos de mayor tamaño podrían unirse al sitio, si bien parte de los mismos quedaría protruyente del mismo.

3. Las moléculas HLA-A, B y C presentan la mayor frecuencia de variación entre sus secuencias en residuos ubicados sobre los lados y el piso de esta fosa. Estos hallazgos correlacionan y proveen un mecanismo molecular para la especificidad observada en la unión de péptidos a diferentes productos alélicos HLA. En particular, en 18 de las 20 posiciones de residuos de "alta variabilidad", los aminoácidos tienen sus grupos R apuntando hacia la fosa y por lo tanto pueden potencialmente alterar el sitio de unión al péptido. Cabe mencionar que 10 de las 13 sustituciones que distinguen a HLA-A2 de Aw68 están presentes en estas posiciones.

4. La sustitución deliberada (mutagénesis dirigida) de residuos en este sitio afecta el reconocimiento de las moléculas HLA por clones de células T. Las posiciones ocupadas por ellos podrían

hacer contacto directo con el péptido asociado o con un RecT específico (Bjorkman, 1987).

El piso de esta fosa está formado por residuos cuyas cadenas laterales apuntan hacia "arriba". Las "paredes" de la misma, formadas por las cadenas en α -hélice poseen ciertos aminoácidos cuyas cadenas apuntan hacia "adentro" de la cavidad, otros hacia arriba y algunos, intermedios a ambas posiciones. Aquellos residuos del piso y las paredes que apuntan hacia la luz de la cavidad, han sido clasificados como responsables potenciales de interactuar con los péptidos. Aquellos aminoácidos de las α -helices que dirigen sus cadenas hacia arriba son los candidatos adecuados para el reconocimiento directo por parte de los RecT (ambos tipos de residuos son destacados en la Fig.3). Los de posiciones intermedias podrían interactuar tanto los péptidos como con los RecT (Bjorkman, 1987). Experimentos que ensayaron la capacidad de presentación de péptidos antigénicos por diversos alelos de clase I naturales o modificados por mutagénesis dirigida sobre sus genes, parecen confirmar la relevancia funcional de esta estructura (Biddison, 1982; Bhayani, 1991).

Por otra parte, el dominio α_3 posee un sitio de unión para la glicoproteína CD8, que explica la función de molécula accesoria que la misma posee (Salter, 1990).

PRESENTACION DE PEPTIDOS PROPIOS

El hecho de haber cristalizado a la molécula HLA-A2 con su sitio de unión al péptido ocupado condujo a pensar que estas moléculas en la superficie de las células podrían estar siempre unidas a péptidos propios, derivados de proteínas endógenas. La presentación de péptidos propios, además de los foráneos ha sido postulado por varios autores. Los estudios de Townsend y col (1989) y Kvist (1990) sugieren además que la unión al péptido es esencial para el plegamiento correcto de la cadena pesada y su

transporte a la superficie celular. Los experimentos que demuestran que se requiere de un tratamiento drástico (pH 2,5) para disociar los péptidos unidos a moléculas de clase II ya purificadas (Buus, 1988) conducen a pensar que toda preparación de moléculas de histocompatibilidad purificadas, clase I y II, contiene péptidos unidos a ellas.

El aislamiento y la caracterización de péptidos que normalmente ocupan las moléculas de clase I demostró que se trata en su mayoría de péptidos de nueve residuos, derivados de proteínas intracelulares abundantes (Jardetzky, 1991). Datos experimentales muestran que sólo una pequeña fracción de moléculas MHC presenta sitios accesibles a péptidos exógenos (5-10% de moléculas purificadas de clase II y 0,3% de las de clase I) (Buus, 1988; Chen, 1989). Los ensayos de unión de péptidos exógenos a moléculas de clase I pueden ser interpretados como la unión a este pequeño porcentaje de moléculas de clase I que llegan a la superficie "desnudas" o bien como el desplazamiento de los péptidos endógenos por otros de mayor afinidad.

En una célula sana, las moléculas de clase I muestran en la membrana plasmática una selección de péptidos derivados de proteínas propias que no provoca una respuesta agresiva por parte de las células T, ya que el sistema inmune desarrolla un estado de no-respuesta o tolerancia a lo propio durante su ontogenia. Cuando la misma célula es infectada por un virus, los péptidos virales competirán con los endógenos por el sitio de unión a la molécula MHC de clase I. Cuando estos péptidos son presentados en la superficie celular, serán reconocidos como extraños y estimularán una respuesta agresiva por parte de las células T (Townsend, 1989). Hallazgos recientes demuestran que se requiere de tan sólo 200 complejos MHC-péptido foráneo (menos del 0,08% de las moléculas MHC presentes en la superficie celular) para disparar una respuesta de células T (Christinck, 1991).

La presentación de péptidos propios durante la ontogenia determinaría el repertorio de reconocimiento de los linfocitos T maduros

Toda la evidencia apunta a pensar que la discriminación entre lo propio y lo no propio se ejerce a nivel de las células T, donde las moléculas del MHC y la presentación de péptidos contribuyen a la selección y el control del repertorio de células T. Las células T maduran en el timo. Es allí donde se produce el reordenamiento y expresión de los genes del RecT y es también allí donde sólo una pequeña fracción de células portadoras del RecT se selecciona para diferenciarse a células maduras y exportarse a la circulación periférica (Sprent, 1988). Durante la ontogenia, ocurre una selección de RecTs que reconocen moléculas clase I y II de un individuo, invocando elementos positivos y negativos. Dentro del timo, los RecT de células T inmaduras se exponen a moléculas de clase I y II unidas a péptidos derivados de proteínas endógenas (Marrack, 1987; Sprent, 1988). Las células T potencialmente autorreactivas cuyos receptores interactúan muy fuertemente con alguno de estos complejos son eliminadas. Esta delección clonal es la contribución más importante a la tolerancia. (Kappler, 1987; Pullen, 1988). Por otro lado, aquellas células cuyos receptores muestran una interacción relativamente débil con las moléculas MHC propias, de modo que no son autorreactivas pero que podrían ser estimuladas por un complejo formado esas molécula MHC y un péptido foráneo, son seleccionadas positivamente y exportadas.

La selección negativa que se produce en el timo permite explicar la tolerancia por las proteínas tímicas y por todas aquellas que puedan llegar al mismo a través de la sangre. Sin embargo, existen proteínas propias que son procesadas y presentadas sólo en ciertas células y tejidos pero no en el timo. Por este motivo las células T con receptores para estos nuevos complejos MHC-péptido pueden abandonar el timo. Estudios con animales

transgénicos mostraron que existen mecanismos alternativos para generar tolerancia a nivel periférico que no involucran procesos de delección celular. Se trata de inactivación de células T (anergia), un proceso que requiere la presentación permanente del antígeno y que en ciertos casos puede alterarse y conducir a reacciones de autoinmunidad (Morahan, 1989).

De este modo, es posible explicar la selección y la activación de células T en términos de presentación de péptidos propios y foráneos como puntos críticos en el desarrollo de las células T. Una consecuencia de este esquema es que no se puede inducir tolerancia hacia péptidos propios si los mismos no están unidos a las moléculas MHC del mismo individuo.

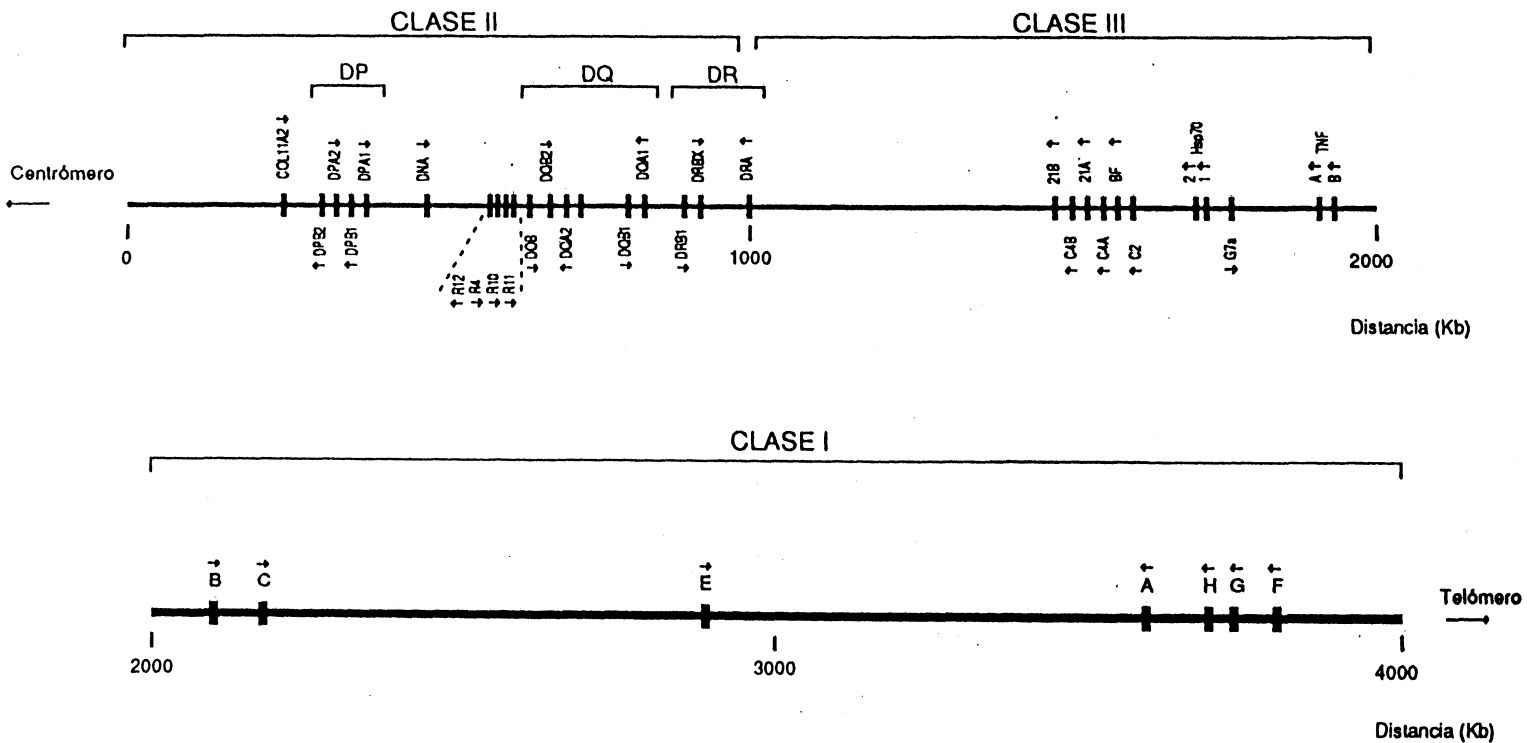
ORGANIZACION GENETICA DEL SISTEMA HLA

Los genes del sistema HLA están localizados en el brazo corto del cromosoma 6 en las regiones 6p21.31 ----> 6p21.33. Está limitado por los genes HLA-DP hacia el centrómero y los genes de clase I hacia el telómero, con una longitud estimada de 4 millones de nucleótidos y unos 3 centiMorgans. Se lo ha dividido en regiones que contienen a los loci de clase I, II y III (Fig. 4). El conjunto de genes presentes en esta región del cromosoma 6 se denomina haplotipo HLA. Debido al enorme polimorfismo poblacional, el conjunto de genes presentes en los diversos haplotipos varía, no sólo en los distintos alelos que posee cada locus, sino también en el número de genes que están presentes y la distancia entre los mismos (Chimini, 1988)

Loci de clase I:

Los genes de clase I constituyen una familia multigénica. Estimaciones basadas en análisis de Southern blot y aislamiento y caracterización de clones genómicos en cósmidos, sugieren que esta familia de genes contiene entre 17 y 20 miembros (Koller,

Figura 4: Mapa genético del sistema HLA en el cromosoma 6. Se indican las regiones de clase I, II y III. R= genes RING asociados a la proteólisis y transporte de péptidos. G7A= valil tRNA sintetasa. Los genes DRB esquematizados corresponden a los haplotipos DR1 y DR10; otros haplotipos poseen genes DRB adicionales. En las vecindades del locus A existen otros genes de clase I no mostrados. Las flechas arriba de cada gen indican el sentido de transcripción de los mismos.



1989; Chimini, 1988) que poseen una secuencia nucleotídica muy homologa entre si. No todas estas secuencias representan genes completos, expresables o funcionales. Los genes que codifican para los clásicos antígenos de clase I, HLA-A, -B y -C están localizados hacia el extremo telomérico del sistema HLA. Los loci HLA-B y -C están muy próximos entre sí, a una distancia estimada de 80 kb. El locus HLA-A está a su vez a unas 1000 kb del locus HLA-C (Lawrence, 1987; Carroll, 1987).

Recientemente se ha descrito el aislamiento de nuevos genes de clase I: HLA-E (Srivastava, 1987; Koller, 1988), HLA-F (Gerarthy D, 1990) y HLA-G (Gerarthy, 1987). Uno de ellos, HLA-E está localizado entre HLA-C y HLA-A, el resto mapea vecinos y teloméricos al locus HLA-A (Fig. 4). El análisis de secuencia de clones genómicos de cada uno de estos genes mostró que codifican cadenas intactas de productos HLA de clase I diferentes de los clásicos HLA-A, -B y -C. Exhiben, sin embargo, una distribución tisular muy restringida, pudiendo ser secretados, retenidos dentro de la célula o expresados en su superficie, por ejemplo HLA-G se expresa sólo en tejido extraembrionario (Wei, 1990). Asimismo, se ha descrito el locus HLA-AR o HLA-H (Zemmour, 1990) estrechamente relacionado al locus HLA-A. Sus productos proteicos poseen defectos estructurales que hacen poco probable su funcionalidad (pseudogenes). Estos últimos podrían jugar un papel importante en la evolución de esta familia multigenética (ver más adelante).

Loci de clase III:

Esta región del sistema HLA codifica para la expresión de moléculas que no cumplen con la función de presentación antigénica, aunque algunos de ellos intervienen en otros aspectos de la respuesta inmune. Hacia el centrómero, a unas 300 kb del locus HLA-B, se hallan los genes que codifican para dos citoquinas: TNF β (linfotoxina) y TNF α , secretados en la respuesta inflamato-

ria por los linfocitos T y macrófagos, respectivamente. Recientemente se ha localizado vecino a los loci para TNF genes que codifican para la proteínas de estrés térmico de la familia HSP70 (Spies, 1989).

Siguiendo hacia el centrómero, a unas 650 kb de TNF α , se localiza el gen que codifica para C2, el segundo componente de la vía clásica del complemento y el factor B de la vía alternativa de activación del complemento. A unas 30 kb del gen para el factor B, existe un tramo de DNA que posee los genes para C4, el cuarto componente del sistema de complemento. Los genes para C4 se alternan con dos genes que codifican para la 21 hidroxilasa, 21OHA y 21OHB, que participa de la síntesis de esteroides adrenales (Carrol, 1987).

Loci de clase II:

Hacia el centrómero, a unas 350 kb de 21OHB, comienza la región que codifica para los productos HLA-DR, -DQ y -DP, con todos los genes localizados en un segmento de 1000 kb. En primer lugar, en un tramo de 300 kb se halla el gen DRA, que codifica para la cadena DR α . A una distancia variable de 80 a 100 kb se puede ubicar el gen DRB3, alternativamente el DRB4 o el DRB5, de acuerdo al haplotipo en cuestión. DRB3 está presente en los haplotipos DR3, DR5 y DR6; DRB4 en los haplotipos DR4, DR7 y DR9; y DRB5 en el haplotipo DR2. Los haplotipos DR1, B y w10 parecen carecer de estos genes DRB adicionales.

A menos de 100 kb de DRB3 se localiza otro par de genes, denominados DRBII, que no es funcional, y DRBI, el gen más polimórfico de la región que codifica para las cadenas beta de las moléculas DR1, DR2, DR3, etc. (Fig. 4).

Le sigue hacia el centrómero la región DQ, que dista de los genes DR, recién descritos una distancia variable de 80-240 kb, según el haplotipo. En primer lugar se hallan los genes DQA1 y DQB1, que codifican para las moléculas HLA-DQ. Como se mencionó

antes, ambos genes exhiben un marcado polimorfismo. En la misma región, se halla otro par de genes, denominados DQA2 y DQB2, que no parecen tener defectos estructurales, pero cuyos productos aún no han sido hallados. Entre ambos pares de genes DQ, a unas 10 kb de DQA, se ha localizado recientemente un pseudogen para una cadena β , denominado DVB, que carece del primer dominio $\beta 1$ (Inoko, 1989).

Hacia el centrómero, a unas 70 kb de DQB2 se halla un gen llamado DOB, cuyo RNA se expresa en muy bajos niveles en linfocitos B y se desconoce el producto proteico (Tonelle, 1985).

A unas 200 kb de DOB se halla el gen DNA cuyo producto no se conoce (Trowsdale, 1985). Este gen se halla inmediatamente vecino a los genes de la región DP. En un tramo de 65 kb están localizados dos pares de genes: DPA1 y DPB1, que codifican para el producto HLA-DP, y otro par de genes llamados DPA2 y DPB2 que no son funcionales.

Entre DOB y DNA se han identificado en el último año genes (denominados RING) que codifican moléculas involucradas en la proteólisis y el transporte de péptidos antigénicos a través de las membranas del retículo endoplásmico, los que jugarían un papel importante en la presentación antigénica (Brown, 1991, Glynn, 1991).

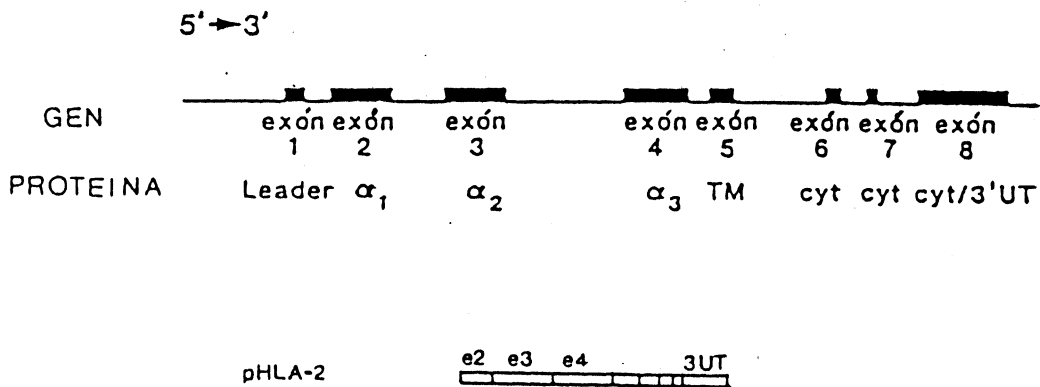
ESTRUCTURA DE LOS GENES HLA DE CLASE I

La estructura de estos genes se describió a partir de la caracterización del primer gen humano de clase I clonado, que, aunque resultó ser un pseudogen, (Malissen 1982) coincidió con la estructura descrita para genes de clase I murinos y de otras especies (Steinmetz, 1981; Singer, 1982).

Un gen de clase I está constituido por 7 exones que se corresponden con los dominios proteicos de la cadena pesada: el exón 1 codifica para el péptido señal (leader), los exones 2, 3 y 4 codifican para los tres dominios externos $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$. El quin-

to exón para el dominio transmembránico y los exones 6 y 7 para la porción intracitoplasmática. Existen algunos genes donde el marco de lectura se continúa en el exón 8 (HLA-A3, HLA-Cw3, Strachan, 1984). En estos casos el exón 8 codifica para un solo aminoácido, luego del cuál se ubica el codón de terminación. A continuación se observa una región no traducida de alrededor de 400 bp, seguida por una señal de poliadenilación convencional (AATAAA). La longitud total del gen es de aproximadamente 4 kb (Fig. 5).

Figura 5: Estructura de un gen de histocompatibilidad de clase I. Se indican también los dominios proteicos codificados por cada exón. El exón 8 incluye al codón de terminación y a las secuencias 3' presentes en el mRNA pero ausentes en la proteína (3'UT). Se muestra también la sonda pHLA-2 utilizada frecuentemente a lo largo de este trabajo: se trata de un cDNA de 1400 bp que cubre parte del segundo exón hasta la región 3'UT.



REGULACION DE LA EXPRESION DE GENES HLA DE CLASE I

Los genes de clase I se expresan constitutivamente en casi todos los tejidos pero el nivel de su expresión varía entre los distintos tejidos o tipos celulares. Existen células somáticas que expresan muy bajos niveles, como por ejemplo células de músculo, de riñón y de hígado. Las células del sistema inmune presentan en cambio los más altos niveles de expresión (Guillemot, 1988). En el hombre, los eritrocitos, los espermatozoides y las células del trofoblasto (frontera celular entre feto y circulación materna) no presentan moléculas de clase I en su superficie (Bodmer, 1981). Se ha observado alteraciones en la expresión de estos antígenos en células tumorales y hay evidencias de algunos sistemas experimentales que esto sería relevante para el escape tumoral (Tanaka, 1988).

La regulación de la expresión de las moléculas de clase I es un proceso complejo. Se considera que la misma se ejerce fundamentalmente a dos niveles: control transcripcional y del ensamblado de la proteína. En la regulación transcripcional existe un primer control grosero, a nivel supragénico relacionado a constricciones estructurales, tales como organización de la cromatina y mecanismos regulatorios que actúan en trans sobre grupos de genes (Satz, 1983, Miyada, 1986). Estos mecanismos si bien son específicos para una familia de secuencias relacionadas, resultan claramente no específicos para un único gen. La regulación fina de los genes individuales es ejercida a través de la interacción específica entre elementos regulatorios presentes en la secuencia de DNA (elementos de acción en cis) y factores solubles que se unen a las mismas (elementos de acción en trans).

Elementos de acción en cis:

La transcripción de los genes eucarióticos está regulada por secuencias no codificantes asociadas a las secuencias codifican-

tes. Existen 3 secuencias importantes para la iniciación de la transcripción y se definen en conjunto como promotor: el sitio de iniciación de la transcripción (sitio "cap"), la llamada "TATA box" y la denominada "CAAT box". Estas secuencias se ubican siempre en la región 5' que flanquea a los genes y sus posiciones relativas no presentan grandes variaciones (Breathnach, 1981). Estas secuencias están también presentes en los genes MHC de clase I. La mayoría de los genes HLA presentan una secuencia del tipo CAAT típica y una variante de la secuencia TATAAA que es TCTAAA, ubicadas a unas 50 y 20 bp del sitio "cap", respectivamente (Ways, 1985; Malissen, 1982; Guillemot, 1988). En el gen HLA-Cw3, las secuencias CAAT y TATAAA han sido reemplazadas por GGGT y TCGAA (Sodoyer, 1984), lo que se ha postulado como una posible explicación del bajo nivel HLA-C en la superficie celular comparado con el nivel de HLA-A y B (Guillemot, 1988).

Además de los elementos comunes que los genes de clase I comparten con la mayoría de los genes eucarióticos, existen otros elementos regulatorios, algunos de los cuales son únicos para estos genes y otros son compartidos con genes que pueden ser coregulados con los de clase I (Fig. 6). Algunos se comportan como elementos de regulación positivos ("enhancers") y otros como elementos negativos ("silencers"). Si bien no son funcionalmente únicos, sus secuencias y sus factores asociados son específicos para genes de clase I. En cierto número de genes de clase I (Israel, 1986; Korber 1988; Shirayoshi, 1988) se identificó un tramo de 13 bp, localizado entre los nucleótidos -169 a -181, que funciona como elemento regulatorio positivo, denominado Enhancer A. La remoción del mismo reduce drásticamente la transcripción de promotores homólogos ubicados a continuación (3') en el DNA (Israel, 1986). Experimentos de competición in vivo, demostraron que se unen a él factores celulares solubles. Este enhancer es homólogo al del gen de inmunoglobulina Kappa. Existe evidencia para sugerir que el enh A puede contribuir a la regulación tejido específica (Handy, 1989). En líneas celulares embrionarias de ra-

tón, esta secuencia actúa como elemento regulador negativo (Miyazaki, 1986). Es así que el EnhA ejercería efectos regulatorios positivos y negativos según el factor soluble que tenga unido.

Se identificaron también otros enhancers asociados a genes de clase I. El enhancer B, que se ubica alrededor de -80, posee una actividad más débil que el anterior del que aún se desconoce su función in vivo. Adyacente al enhancer A, en el tramo ubicado entre -185 y -203 se reconoce otra secuencia con actividad enhancer denominada región II.

Se localizó un elemento de regulación negativa (NRE) dentro de la secuencia de respuesta a interferón (Erlich, 1988; Weissman 1991 a). Recientemente se identificó un segundo elemento de regulación negativa que parece estar relacionado a un elemento semejante en levaduras (Weissman, 1991 b).

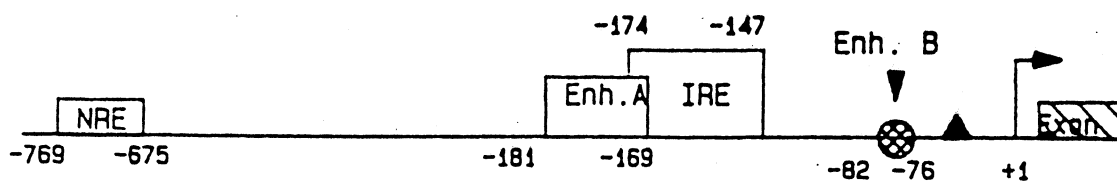
La mayoría de los genes de clase I llevan asociada además una secuencia (denominada IRE) que les confiere respuesta al interferón. La misma se definió originalmente para los genes de HLA-A3, DR α , el pseudogen HLA12.4 y el gen de la metalotioneína II (Friedman, 1985). Está localizada en el tramo -147 a -174 hacia 5' del sitio de iniciación. Si bien es una secuencia necesaria para conferir respuesta a los tres tipos de interferón, no siempre es suficiente para garantizar dicha respuesta (Klar, 1989). Requeriría secuencias como EnhA y/o sec presentes en zonas codificantes, según las circunstancias (Israel, 1986; Korber, 1987).

Elementos de acción en trans

La regulación de la transcripción de los genes se realiza a través de la interacción entre las secuencias regulatorias en el DNA y factores que se unen específicamente a esas secuencias. El número de factores transcripcionales para genes HLA de clase I y la naturaleza de sus interacciones recién comienza a dilucidarse.

Se han analizado algunos factores que se unen a las dos secuencias generales del promotor y permiten la acción de la RNA polimerasa II. Se describieron también algunos factores que se unen a tres de las secuencias regulatorias específicas. De estos estudios surge que una dada secuencia regulatoria es capaz de unirse a varios factores distintos y recíprocamente, que un dado factor puede unirse a múltiples secuencias en el DNA. A menudo es necesaria también la interacción entre factores de acción en trans como un prerequisite para el funcionamiento diferencial de los elementos de acción en cis. Así, una enorme diversidad de interacciones entre factores de acción en trans y entre estos factores y elementos en el DNA, determina el patrón de expresión de estos genes (Weissman, 1991 a).

Figura 6: Representación esquemática de los elementos regulatorios identificados en las regiones 5' flanqueantes de un gen de clase I. Las posiciones de los elementos están dadas en para el gen porcino, PD1. Todos los elementos ilustrados, con excepción del NRE, son comunes a todos los genes de clase I que han sido analizados y están situados en posiciones similares. Promotor que contiene los CAAT y TATA boxes; enh B: enhancer B; IRE: elemento de respuesta a interferón, enh A: enhancer A; NRE: elemento de regulación negativa.



Enh. A = TGGGGATTCCCC

Enh. B = CCYATTG (G/C) GTG

▲ = CCAAT ——— TCTAA
 -57 -26

Existen al menos 4 proteínas que se unen a DNA que parecen estimular la transcripción. Tres de ellas, RIBP, RIIBP y NFB, se unen a la región que contiene el enhancer A, si bien puede distinguirse una de otra. En particular, la unión de RIIBP parece estar regulada durante el desarrollo. El cuarto factor, ICSBP, se une al IRE. Los factores asociados a la regulación negativa están aún poco caracterizados (Singer, 1990).

Con respecto a la regulación a nivel del ensamblado de las moléculas de clase I, los estudios de Townsend (1989) mostraron que se requiere de la presencia de un péptido para el plegamiento adecuado de la cadena α . Se observó que en ausencia de péptidos el número de cadena α unidas a $\beta 2$ microglobulina es muy pequeño, pero que a medida que se adiciona péptido se estimula dicha unión (Kvist, 1990). Se demostró también que si bien las moléculas de clase I pueden unirse a una amplia gama de péptidos aparentemente no relacionados, diferentes moléculas de clase I se unen a distintos sets de péptidos no relacionados (Coligan, 1990).

POLIMORFISMO DE LAS MOLECULAS HLA DE CLASE I

Como se ha mencionado en repetidas ocasiones, la peculiaridad de este sistema consiste en su alto grado de polimorfismo. El método original que permitió la identificación de las diversas variantes fue la serología, esto es, la identificación en estas moléculas de epitopes diferentes por medio de anticuerpos. La gran homología estructural determina la existencia de numerosos epitopes comunes en las diversas moléculas, los que hicieron difícil, en los comienzos, la identificación de los distintos productos. Los anticuerpos contra estas moléculas (aloanticuerpos), utilizados hoy en la identificación de rutina de las distintas especificidades HLA, provienen usualmente de sueros de individuos politransfundidos o de mujeres luego de múltiples embarazos.

El conocimiento actual de la complejidad del sistema es fruto, en parte, de un trabajo colaborativo internacional en Talleres o Workshops, donde cientos de laboratorios intercambian sueros para ser evaluados en un gran número de células pertenecientes a diversos grupos étnicos. La diversidad de las moléculas HLA de clase I está construida sobre dos niveles. Primero, existen tres loci diferentes de clase I, HLA-A, B y C; segundo existen numerosos alelos para cada locus. Luego del 10° Taller Internacional se definieron 20 especificidades serológica para el locus HLA-A, 40 para HLA-B y 11 para HLA-C (Bodmer, 1989). Estos números, de todas maneras, subestiman el número total ya que se ha hecho permanente el hallazgo de alelos nuevos a medida que se aplican métodos más sensibles y precisos en la tipificación de moléculas HLA (Parham, 1989).

En los últimos Talleres se ha estandarizado la aplicación de nuevas metodologías permiten determinar la presencia de variantes alélicas no siempre distinguibles por serología. Fue muy importante el desarrollo de la técnica de identificación de epitopes reconocidos por linfocitos T citotóxicos, pues refleja diferencias en la funcionalidad de estas moléculas y por lo tanto poseen implicancias clínicas en el caso de transplantes (Spits, 1982).

Se utilizan también en la detección de nuevas variantes técnicas de isoelectroenfoque en geles uni y bidireccionales, la presencia de fragmentos polimórficos generados en el DNA por enzimas de restricción (Ness, 1986) y anticuerpos monoclonales para identificar distintos epitopes (Salter, 1987). La determinación de la secuencia nucleotídica de los genes aislados o de sus cDNA, permite verificar que los distintos subtipos definidos por otros métodos analíticos son productos de alelos nuevos (Taketani, 1984; van Schravendijk, 1985; Vega 1987; Cowan, 1985); también permite identificar alelos con sustituciones silenciosas, aún no detectadas por los otras metodologías. Así, por ejemplo, se conoce la secuencia nucleotídica de 7 variantes del HLA-B27, denominadas B2701, B2702, etc., que no se distinguen por serología (Ló-

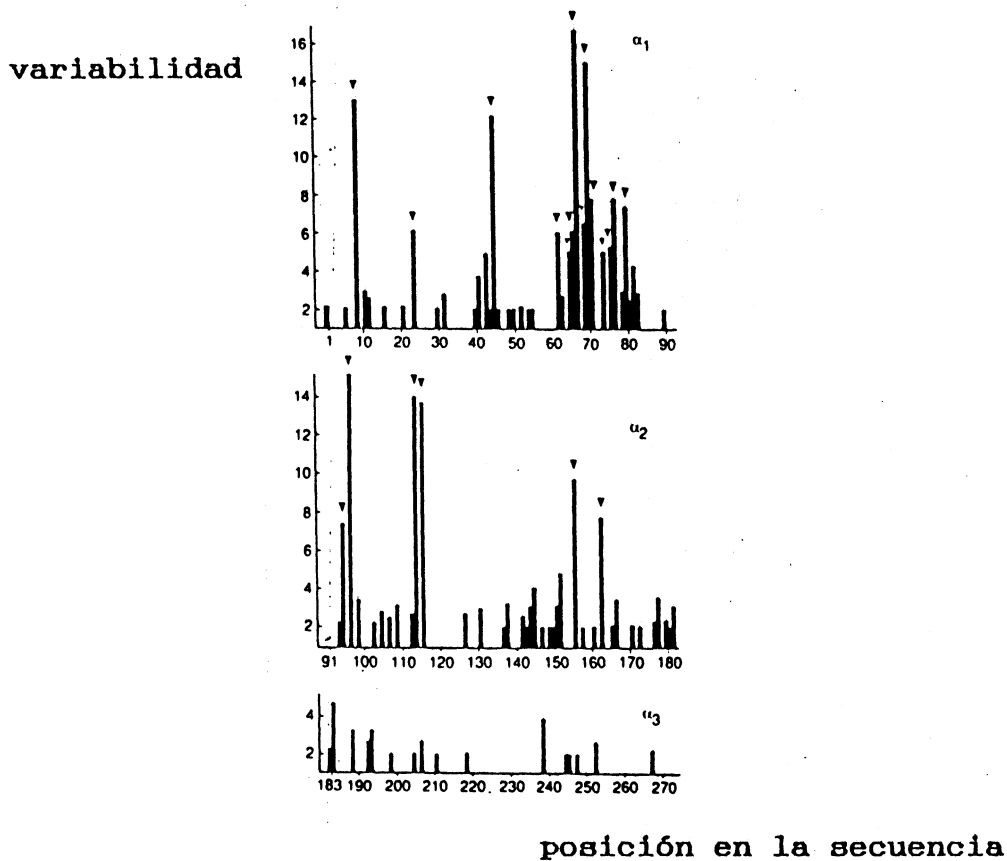
pez de Castro, 1989; Choo, 1989).

Se conoce la secuencia aminoacídica de más de 80 moléculas HLA de clase I. Todas ellas poseen una homología global de aproximadamente el 75-99%. El análisis comparado de las mismas muestra un patrón complejo de variaciones de aminoácidos que es diferente del encontrado en otras grandes familias de proteínas polimórficas, como por ejemplo las variantes de hemoglobinas. En tales familias, variantes poco frecuentes difieren de una secuencia salvaje predominante en sólo uno o dos aminoácidos, y esta secuencia salvaje es, claramente, el ancestro común de todas las variantes. Por el contrario, no existen alelos predominantes para los loci HLA-A, B y C y todas las secuencias difieren de la consenso por sustituciones múltiples (Parham, 1989). Existen posiciones de polimorfismo a lo largo de toda la porción extracelular de la molécula como también numerosas posiciones altamente conservadas. Sobre un total de 274 residuos que componen los dominios α_1 , α_2 y α_3 , 165 posiciones resultaron invariantes entre las 25 HLA-A, 35 HLA-B y 18 HLA-C secuencias comparadas (Parham, 1989). Estas posiciones incluyen al sitio de glicosilación (posición 86 en α_1), las Cys 101, 164, 203 y 259 que forman los enlaces disulfuro en α_2 y α_3 y muchos residuos involucrados en el contacto con β -2m.

Para visualizar mejor las características de este polimorfismo se puede graficar la magnitud de las variaciones en función del número de posiciones sujetas a las mismas (Fig. 7) (Wu y Kabat, 1970). En este gráfico se observa con claridad que la magnitud de tales variaciones es significativamente menor en el dominio α_3 cuando se lo compara con los dominios α_1 y α_2 . Sobre esta base se definieron las posiciones polimórficas en dos grupos: posiciones de "alta variabilidad" que presentan una frecuencia mayor que la hallada en α_3 y posiciones de "baja variabilidad", donde la magnitud es comparable con la hallada en α_3 . Si bien las diferencias predominantes se encuentran en los dominios más externos, las variaciones en α_3 pueden ser importantes, par-

ticularmente, en lo que respecta a la interacción con la molécula CDB. Por ejemplo, la sustitución de Ala por Val en posición 245 mostró una reducción de la afinidad por esta molécula (Salter, 1989).

Figura 7: Gráfico de variabilidad de 39 secuencias HLA-A, B y C. Se muestran por separado los gráficos para los dominios α_1 , α_2 y α_3 . La variabilidad se define como el número de aminoácidos diferentes encontrados en una posición particular dividido por la frecuencia de los aminoácidos más comunes. Las posiciones con una variabilidad mayor o igual a 5 están indicados por (\blacktriangledown).



Las posiciones de alta variabilidad son las que exhiben un número de aminoácidos que oscila entre 3 y 6 y tienden a ser sustituciones más radicales si se las compara con las posiciones de baja variabilidad, que comúnmente poseen dos aminoácidos química-

mente semejantes. Resultó sorprendente la correlación encontrada entre estas posiciones de alta variabilidad y los residuos propuestos como responsables potenciales de interactuar con el péptido antigénico o con el TcR, a partir del análisis de la estructura tridimensional de estas moléculas (Bjorkman, 1987). De las 20 posiciones de alta variabilidad reconocidas, 16 pueden clasificarse como de interacción con el péptido, 2 de interacción con el TcR y las 2 restantes poseen de situación intermedia que les permitiría actuar con uno de ellos o ambos simultáneamente. La alta frecuencia de variación puede servir, en estos casos, para modificar estas interacciones lo que explicaría, en esencia, la función y ventaja selectiva del polimorfismo que exhiben las moléculas HLA (Parham, 1989b).

Existen, además, 71 posiciones de baja variabilidad diseminadas a lo largo de toda la molécula, frecuentemente en posiciones alejadas del bolsillo de presentación antigénica. Estas sustituciones podrían influir sobre las interacciones con péptidos y receptores T a través de perturbaciones conformacionales indirectas. Es interesante destacar que 22 de las 31 posiciones asignadas como "específicas de locus" se encuentran en los dominios de transmembrana e intracitoplasmático. Ellas podrían representar mutaciones de carácter neutro adquiridas durante el proceso de duplicación de los genes que dió lugar a los diferentes loci o, alternativamente, reflejar diferencias funcionales aún desconocidas en las regiones C-terminal de sus productos.

EVOLUCION DE LAS MOLECULAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD

El origen y mantenimiento del extenso polimorfismo de los genes de clase I ha sido objeto de numerosas controversias. Una variedad de mecanismos mutagénicos que incluyen duplicaciones y deleciones de genes, mutaciones puntuales, recombinaciones y conversiones contribuyen a la evolución de estas moléculas. Sin em-

bargo, ninguno de estos mecanismos resulta ser específico para estos genes, como lo son los reordenamientos y otros mecanismos de mutación somática para los genes de inmunoglobulinas y RecT (Davis, 1988). Los eventos de conversión génica no recíproca fueron inicialmente interpretados como mecanismos hipermutacionales específicos (Weiss, 1983). Sin embargo se ha visto que los mismos juegan un papel general en la evolución de los genes eucarióticos. Es así que los genes del MHC no están evolucionando más rápido que otros genes; la extraordinaria diversidad observada en las distintas especies es el resultado de una acumulación gradual de cambios a lo largo del tiempo de vida de una especie y de sus ancestros (Mayer, 1988; Lawlor, 1988). El aspecto inusual de la evolución de estos genes no se encuentra en la frecuencia ni en los mecanismos de mutación, sino en la selección que actúa sobre la variación (Lawlor, 1990).

Las secuencias codificantes de los alelos HLA-A, B y C pueden ser divididas en dos grupos de acuerdo con sus patrones de variación: una región 3' (exones 4-8) casi conservada entre alelos de un mismo locus pero que exhibe considerables diferencias entre alelos de diferentes loci y una 5' (exones 1-3) que presenta la mayoría de las sustituciones que distinguen los alelos de un mismo locus. Los patrones de cambios en la secuencia de ambas porciones, intercalados con regiones de identidad total, sugieren que mecanismos del tipo de conversión génica cumplen un papel preponderante en la generación de diversidad. Este mecanismo, demostrado formalmente en hongos (Egel, 1981), involucra la copia de tramos de información de DNA (durante la replicación del mismo) a partir de genes homólogos. Los genes que interactúan pueden estar en el mismo cromosoma o en cromosomas distintos.

Los caminos evolutivos seguidos por los genes MHC de clase I presentan variaciones importantes entre las diferentes especies. Los primates más evolucionados aparecen comparativamente más estables que los roedores. La conversión intergénica no recíproca entre genes fuertemente ligados parece ser el mecanismo preponde-

rante en la evolución de esta familia multigenética en roedores (Weiss, 1983). En contraste, para la generación de diversidad en humanos este mecanismo tuvo una contribución menor. Para los primates superiores el reordenamiento de sustituciones y segmentos de secuencias por eventos de recombinación (incluyendo conversión alélica no recíproca) entre alelos ha sido la fuente primaria de diversificación (Parham, 1988a, Parham, 1989a). En el caso de los genes de clase I clásicos la conversión alélica contribuye a la diversificación de los exones 5' y a la homogenización de los 3'. En los genes que han perdido o están perdiendo funcionalidad, se produciría la homogeinización de ambas partes con la consiguiente reducción de polimorfismo. Muchos loci de clase I no clásicos parecen pertenecer a esta última categoría. La evidencia actual (Lawlor, 1990) sostiene un modelo en el cuál las únicas proteínas funcionantes son las codificadas por genes de clase I clásicos. Los productos de genes no clásicos HLA-E, F y G y tal vez HLA-C probablemente fueron alguna vez activos en presentación antigénica pero que actualmente están inactivos y en diversos estados de decaimiento. Tales genes pueden aún ser usados como fuente de secuencias donantes para conversiones génicas.

DESEQUILIBRIO DE LIGAMIENTO

Además del polimorfismo, existe otra característica particular que presentan los genes de histocompatibilidad y es el llamado "desequilibrio de ligamiento" (linkage disequilibrium). Este fenómeno consiste en la asociación de dos alelos de distintos loci con una frecuencia mayor que la esperada para una población en equilibrio. Tal es el caso, por ejemplo de los antígenos HLA-A1 y HLA-B8, donde la frecuencia esperada para este haplotipo (calculada en base a la frecuencia de aparición de cada alelo en forma individual) es de 1,6% y sin embargo este haplotipo se observa en el 8,8% de la población. El origen de este fenómeno se

desconoce, si bien se han sugerido algunas explicaciones: que la aparición de una especificidad sea relativamente reciente y no haya habido el tiempo suficiente para que los eventos de recombinación la distribuyan entre los distintos haplotipos, o que existan mecanismos que favorezcan la selección o asociación de ciertos alelos (Roith, 1985; Sachs, 1984).

HLA Y GENETICA POBLACIONAL

Los diversos alelos HLA están distribuidos en la población con una frecuencia que varía de acuerdo a los distintos grupos étnicos. Por ejemplo, el antígeno HLA-B8 está presente con una frecuencia relativamente alta (17,1%) en caucasoides americanos, es menos frecuente en judíos ashkenazi y mejicanos (8,5% y 6,6% respectivamente) y muy baja en indígenas sudamericanos y japoneses (2,9% y 0,2%) (Tiwari, 1985). Asimismo, la identidad definida por serología de un dado alelo en dos individuos pertenecientes a grupos étnicos diferentes no indica necesariamente la presencia de genes idénticos pues se han identificado variantes étnicas por clones T, RFLP y secuencia (Holmes, 1987; Parham, 1988a; Kato, 1989).

HLA Y ENFERMEDAD

Se han descrito más de 500 patologías que se desencadenan preferentemente en individuos portadores de determinados alelos HLA. Muchas de estas patologías, aunque no todas, involucran la participación de respuestas inmunes. La mayoría de estas asociaciones son incompletas, lo que refleja la influencia de factores ambientales y/o otros factores genéticos.

La fuerza de estas asociaciones, además, varía en los distintos grupos étnicos. Teniendo en cuenta que también hay varia-

ciones en la frecuencia de los distintos alelos, se puede calcular cuántas veces más frecuente aparece la enfermedad en portadores del alelo (denominado alelo de riesgo) respecto de los individuos que no lo llevan. Este número se denomina riesgo relativo (RR). Por ejemplo, alrededor del 90-95% de los pacientes que padecen espondilitis anquilosante de todos los grupos étnicos son portadores del alelo HLA-B27. La frecuencia de este antígeno es de alrededor del 50% en indígenas americanos, del 7% en caucasoides y de menos del 1% en japoneses. Esta variación en los tres grupos étnicos conduce a un riesgo relativo que es más alto en japoneses, seguido por caucasoides e indígenas americanos.

Existen otros alelos cuya frecuencia varía de acuerdo a las distintas poblaciones pero que las patologías asociadas a ellos, a diferencia de la espondilitis, no muestran asociación en todas las razas. Es el caso, por ejemplo, de la especificidad HLA-B35 y su asociación a hepatitis crónica activa secundaria a la infección por virus de hepatitis B en población de origen latino (Mazzilli, 1977; Mota, 1987). La misma no se halló en individuos de origen sajón afectados por esta misma patología (van Hattum, 1987). Se han observado, en ciertos casos, asociaciones negativas, es decir, donde la frecuencia de un alelo se halla significativamente disminuida entre los individuos afectados por una dada patología, a estos alelos se los denomina "protectores". La especificidad HLA-B35, por ejemplo, se asocia negativamente (proteje) a infecciones herpéticas recurrentes (Gallina, 1987).

Se han postulado diversos mecanismos para explicar estas asociaciones. Los mismos se dividen en dos grandes grupos: aquellos donde los antígenos HLA se encuentran involucrados directamente en la patogénesis y aquellos donde participan otros genes fuertemente ligados a dicho sistema. Dentro de esta última categoría, sólo en la hiperplasia adrenal congénita se conoce con certeza el mecanismo involucrado (White, 1986). En esta enfermedad hay una deficiencia de 21-hidroxilasa (21OHB, involucrada en la síntesis de esteroides adrenales) asociada al alelo HLA-

Bw47. La asociación se explica por desequilibrio de ligamiento entre dicho alelo HLA y alelos defectivos del gen 210HB (ambos genes se hallan separados entre sí por tan sólo 800kb). En otros casos participarían distintos genes metabólicos o que codifican para otras moléculas de relevancia inmunológica (TNF, C2, C4, HSP70, etc) ligados al sistema HLA.

Muchas de las enfermedades asociadas al HLA, como artritis reumatoidea, diabetes insulino dependiente (IDDM), esclerosis múltiple, myastenia gravis, poseen fuertes rasgos autoinmunes. Se ha propuesto que durante el proceso de aprendizaje en el timo, en aquellos individuos que poseen el fenotipo asociado a la enfermedad, se seleccionarían positivamente clones T potencialmente autorreactivos escapando a la delección clonal (Boehmer, 1978). Moller y col (1990) sostienen que las bases de esta asociación se encuentran en la interacción de las moléculas HLA con péptidos propios durante la maduración tímica más que en la unión a péptidos foráneos para la activación de una respuesta inmune. La autorreactividad se concibe como una respuesta inmune dirigida contra estructuras autólogas presentes en células que no pueden ser regeneradas de modo adecuado. La misma puede, en consecuencia, inducirse contra células que han sido alteradas debido a una infección u otro proceso que conduzca a la presentación de antígenos "nuevos" en la superficie de las células blanco.

Se han propuesto también otros mecanismos para explicar estas y otras asociaciones. Entre ellos, la existencia de reacciones cruzadas entre ciertos microorganismos y ciertos alelos HLA (Hirata, 1970) o bien que la unión de determinados epitopes de microorganismos a ciertos alelos HLA mimetizaría antígenos propios incapacitando al individuo de iniciar una respuesta inmune frente a la infección (Snell, 1968) o por el contrario desatando una respuesta cruzada contra antígenos propios (Van Eden, 1988). Asimismo se ha postulado la posible interacción de las moléculas HLA con receptores hormonales de la superficie celular (Tiwari, 1985).

Si bien los mecanismos moleculares aún permanecen inciertos para la mayoría de las patologías asociadas, las técnicas de biología molecular permitieron, en el caso de la IDDM, hallar las verdaderas moléculas involucradas en esta asociación. Desde hace tiempo se conocía una asociación con los alelos HLA-DR3 y/o DR4, con riesgos relativos moderados (entre 3 y 6) y una asociación menor con otros alelos menos frecuentes. El conocimiento del enorme polimorfismo de las moléculas HLA-DQ y la determinación reciente de la secuencia nucleotídica de 12 alelos para DQB y 8 para DQA, permitió concluir que para esta enfermedad la verdadera asociación es con los alelos DQ. Todos los haplotipos de riesgo se caracterizan por poseer una cadena DQB donde el residuo 57 lo ocupa un aminoácido neutro, en lugar del ácido aspártico típico de los alelos no asociados (Tood, 1987). La presencia de aspártico en posición 57 actúa entonces como marcador de protección, siendo este efecto dominante. Estudios de amplificación enzimática del gen DQB en pacientes mostraron que el 96% de los haplotipos diabéticos era Asp-/Asp-, combinación presente sólo en el 19,5% de los controles, esto determina un riesgo relativo de 107 (Morel, 1988).

EL ALELO HLA-B35 Y SU ASOCIACION A ENFERMEDAD

HLA-B35 es uno de los pocos alelos de clase I asociado a numerosas enfermedades, varias de origen viral: tiroiditis subaguda de DeQuervain (causada por un virus de la familia spumaretroviridae), hepatitis B crónica, riesgo de desarrollo acelerado de SIDA en individuos HIV positivos, azoospermia y enfermedad de Graves en japoneses, leucemia linfática crónica en judíos Ashkenasi (Tabla II).

Resulta peculiar que varias de estas asociaciones ocurran en forma diferencial en diversos grupos étnicos. Por ej. en las infecciones a HBV y HIV, la asociación es significativa en indivi-

duos de origen mediterráneo-latino y no lo es en pacientes de origen sajón (Mota, 1987; Mazzilli, 1977; van Hattum, 1988; Scorza-Smeraldi, 1988).

El mecanismo responsable de esta asociación diferencial en distintos grupos étnicos no se conoce. Como se discutió anteriormente numerosas especificidades de clase I definidas por serología, representan en realidad varios grupos de alelos que no se distinguen por anticuerpos pero sí por otras metodologías bioquímicas o celulares. Así por ejemplo para HLA-A2 se conocen 9 subtipos distintos, que difieren entre sí entre 1 y 6 aminoácidos; todas estas moléculas no se distinguen en una tipificación serológica clásica (simplemente se reconoce "HLA-A2") pero, por ejemplo, pueden distinguirse por linfocitos T citotóxicos (López de Castro, 1989). Estos antecedentes conducen a pensar que una explicación racional para la asociación diferencial de la especificidad HLA-B35 a distintas patologías en diferentes grupos étnicos, podría deberse a la eventual presencia de varios subtipos B35 no discernibles por serología. Las observaciones que apoyan esta noción son fundamentalmente dos: es bien sabido que esta especificidad de clase I presenta un complejo patrón serológico (Bodmer, 1966, Rubinstein, 1984); por otro lado, se detectaron para este alelo variantes reconocidas por diversos clones de linfocitos T citotóxicos (Breuning, 1984). El propósito de este trabajo de Tesis fue investigar la naturaleza polimórfica del alelo HLA-B35.

TABLA II: Asociaciones entre el antígeno HLA-B35 y diversas enfermedades.

PATOLOGIA	RIESGO RELATIVO	REFERENCIAS
Tiroiditis subaguda (de Quervain) (viral)	13,73	Ryder, 1979
Enfermedad de Graves (japoneses)	3,9	Nakao, 1978
Azoospermia (japoneses)	6,5	Kamidomo, 1980
Carcinoma de colon y recto	3,6	Hiwatashi, 1980
Hepatitis crónica activa	4,1	Mota, 1987
Susceptibilidad a desarr. SIDA en indiv. infectados por HIV	4,5	Scorza-Smeraldi, 1988
Granuloma anular generalizado (judíos)	22,5	Friedman -Birnbaum, 1978
Dermatitis atópica	4,35	Goudemand, 1977
Prolapso de válvula mitral (negros americanos)	4,32	Kachru, 1979
(caucasoides americ)	3,28	Brawn, 1977
Periodontosis (negros ingleses)	6,0	Culligan, 1980
Leucemia linfofocítica crónica (ashkenazi)	9,0	Rosina, 1991
Bajo nivel de ión Mg en eritrocitos	($p(10^{-7})$)	Dausset, 1982
Suppressor activating determinant	--	Fainboim, 1981

Objetivos

La asociación diferencial del HLA-B35 con ciertas patologías en diversos grupos étnicos y su complejo patrón serológico, condujeron a postular, como hipótesis de trabajo, la eventual existencia de variantes polimórficas no distinguibles por serología que estarían presentes con frecuencias diferentes en los distintos grupos étnicos. Resultaba de particular interés su asociación con hepatitis crónica activa (secundaria a la infección por HBV) en nuestra población de origen latino. El objetivo de este trabajo de tesis fue, entonces, estudiar la naturaleza polimórfica de este alelo. Para alcanzar este objetivo se propuso:

a) En una primera etapa, la búsqueda de posibles patrones polimórficos de fragmentos de restricción (RFLP) del alelo HLA-B35 mediante hibridización genómica de Southern. Este estudio se realizó en el contexto del X Taller Internacional de Histocompatibilidad donde varios laboratorios analizaron en forma cooperativa los patrones de RFLP de los genes HLA en diferentes grupos étnicos. Este trabajo permitió definir correlaciones entre determinados RFLP y ciertas especificidades HLA de clase I. Así, hemos hallado un polimorfismo del gen B35, detectado con la enzima EcoRV, que permite distinguir a dos alelos serológicamente idénticos, uno de ellos ligado en haplotipo extendido al HLA-Cw4 y el otro a otros alelos del locus C.

b) Encarar el aislamiento y caracterización de un gen HLA-B35 a partir de un individuo caucasoide latinoamericano con ancestros españoles. El polimorfismo genómico arriba mencionado constituyó un excelente marcador que permitió investigar la presencia de este gen en los clones aislados.

La determinación de la secuencia nucleotídica de uno de dichos clones durante el presente trabajo de tesis, coincidió con la documentación de la secuencia de un gen B35 aislado de un in-

dividuo japonés.

Ambos alelos difieren entre sí en sólo 3 nucleótidos que ocasionan substituciones aminoácídicas, dos de ellas localizadas en el bolsillo de presentación antigénica. La naturaleza de estos cambios afecta la funcionalidad de ambos alelos como moléculas presentadoras de péptidos y sustenta la hipótesis antes mencionada para explicar la asociación diferencial.

**Materiales
 y
 Métodos**

AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE ACIDOS NUCLEICOS

Preparación de DNA a partir de linfocitos de sangre periférica

Se colectaron muestras de 30 ml de sangre periférica a las que se agregó EDTA al 5% como anticoagulante. Las mismas se procesaron de la siguiente manera: se centrifugó a 1500 rpm y se descartó el plasma. Se agregaron 2 volúmenes de buffer de lisis de glóbulos rojos (RCLB: 10 mM Tris pH 7.6, 5 mM MgCl₂, 10 mM NaCl) y se descartó el sobrenadante luego de centrifugar a 1500 rpm por 5 min. El pellet se resuspendió en RCLB y se repitió la centrifugación. Finalmente, el pellet se resuspendió en 2 ml de RCLB y se agregó 15 ml de buffer de lisis de glóbulos blancos (WCLB: 10 mM Tris pH 7.6, 10 mM EDTA pH 8, 50 mM NaCl, 0.2% SDS). Se incubó durante la noche a 42 °C.

Se realizaron dos extracciones de la fase acuosa con un volumen de fenol-cloroformo 3:1 y otras 2 con un vol.de cloroformo-isoamil alcohol 24:1.

Se agregó NaCl hasta una concentración final de 60 mM para permitir la precipitación del DNA con un vol. de isopropanol 100%. El precipitado se lavó dos veces con etanol 70%, se secó en vacío y se resuspendió en Tris 1 mM, EDTA 0.1 mM.

Se midió la concentración del DNA en espectrofotómetro de luz UV, considerando 1 OD₂₆₀ = 40 ug/ml.

Preparación de plásmidos

Se utilizó una modificación del método de Birnboim y Doly (1979) para trabajar en pequeña escala (minipreparación). Se partió de 5 ml de cultivo crecido en LB/Ampicilina, con agitación durante toda la noche a 37°C.

- Las bacterias fueron cosechadas por centrifugación a 4000 rpm durante 15 min. y resuspendidas en 100ul de: Tris-HCl 25 mM,

pHB,0, EDTA 10 mM, glucosa 50 mM y lisozima 5 mg/ml.

- La suspensión de bacterias se incubó 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se le agregó 200 ul de SDS 1%-NaOH 0,2 N preparado en el momento. Se mezcló por inversión y se agregó luego 150 ul de acetato de sodio 3N, se mezcló por inversión y se dejó en hielo.
- Luego de 15 min de incubación, se centrifugó en microcentrifuga a 12000 rpm durante 10 min. Al sobrenadante obtenido (400ul) se lo extrajo con 1 vol de fenol:cloroformo 3:1 y luego con 1 vol de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1.
- A la fase acuosa obtenida se le agregó 2 vol de etanol. Luego de 10 min a temp ambiente se centrifugó en microcentrifuga a 12000 rpm durante 15 min.
- El precipitado se resuspendió en 100 ul de TE, se le agregó 2,5 ul de RNAsa A (10 mg/ml) libre de DNAsa y se incubó 10 min a temp. ambiente. Se agregaron 80 ul de H₂O y 20 ul de acetato de Na 3 M.
- Luego de una extracción con fenol:cloroformo 3:1 y una con cloroformo:alcohol isoamílico 24:1 se precipitó el DNA por el agregado de 500 ul de etanol.
- El plásmido se recuperó por centrifugación en microcentrifuga durante 10 min y se resuspendió en 20 ul de 10 mM Tris pH 7,5.

Purificación del DNA de fagos recombinantes: preparación en pequeña escala (Basado en el método de Yamamoto, 1970)

- Se inocularon 10 ml LB/Mg/maltosa en tubo Falcon de 50 ml con 200 ul de células crecidas toda la noche en LB/Mg²⁺/Maltosa y un taquito de agar conteniendo una placa de lisis del fago correspondiente.

Se utilizó la cepa LE392, realizándose la infección a 37°C, con agitación a 200 rpm por 9-12 hs. Se incluyó siempre un tubo

conteniendo sólo células como control de lisis.

- Luego de que la lisis fue evidente, se agregó 200 ul CHCl_3 y se incubó 5-10 min más a 37°C , para lisar las bacterias remanentes.
- Se centrifugó 5 min a 3000 rpm, para eliminar los restos celulares y una alícuota del sobrenadante se guardó a 4°C como stock de fagos (título arpx 10^{10} - 10^{11} pfu/ml).
- Con el resto del sobrenadante se procedió a la purificación del DNA.
- Se tomaron 8 ml del sobrenadante, se mezclaron con 8 ml de buffer TM (Tris 50 mM, pH 7,4, SO_4Mg 10 mM) y el contenido total se pasó a un tubo Corex de 30 ml.
- Se agregó 320 ul DNAsaI/RNAsaA (1mg/ml de cada uno en TM) y se incubó 15-30 min a temperatura ambiente.
- Los fagos se concentraron luego por precipitación en PEG-ClNa, por agregado de 1,6 ml NaCl 5N, y 1,8 g PEG-8000 o PEG 6000 sólido.
- Una vez disuelto el PEG, se incubó 15 min en hielo, recogiendo los fagos luego por centrifugación a 10000 rpm por 10 min a 4°C .
- Se descartó el sobrenadante y al precipitado de fagos resuspendido en 300 ul de TM, se le realizaron 2 extracciones con Cl_3CH para extraer el PEG residual.
- A la fase acuosa final se le agregó 15 ul EDTA 0,5N, pH 8, 30 ul NaCl 5N y 360 ul de fenol equilibrado con buffer Tris.
- Luego de esta extracción fenólica, se realizaron 2 extracciones con Cl_3CH , y a la fase acuosa final se le agregó 875 ul de etanol y se recogió el DNA por centrifugación por 5 min en microcentrífuga. El precipitado se resuspendió en 50 ul H_2O y se guardó a -20°C .

El rendimiento fue de 3-5 ug, suficientes para una restricción y posterior subclonado.

METODOS ELECTROFORETICOS

Agarosa nativa

- Se utilizaron geles de agarosa entre 0,6-1,5 % dependiendo del tamaño de los fragmentos a resolver.
- El buffer que se utilizó fue TBE que contenía 20 mM de Tris-borato, 20 mM de ácido bórico y 20 mM de EDTA, y los geles contenían 0,5 ug/ml de Bromuro de Etidio (BrEt). El buffer de corrida contenía también 1,5 ug/ml de BrEt. Las corridas se realizaron en general, a un campo de 1-5 V/cm, a temperatura ambiente.
- Como buffer de siembra 5X se usó 50% Ficcol o 60% sacarosa, 5X TBE y 1% azul de bromofenol.
- Los geles fueron fotografiados a través de un transiluminador de luz ultravioleta de 300 nm, utilizando una cámara Polaroid MP-4 con filtro rojo (RPC4) con película Polaroid 667.

Aislamiento de fragmentos de DNA por electroelución

- La banda de DNA a purificar fue resuelta en un gel nativo de agarosa conteniendo 0,5 ug/ml BrEt, en las condiciones previamente descriptas.
- Finalizada la corrida, se extrajo un taco de agarosa conteniendo la banda a purificar, y se la depositó sobre un pocillo (hecho en otro gel sin BrEt), que había sido previamente tapizado con una membrana de diálisis. La membrana se preparó hirviéndola durante 5-10 min en 2% de CO_3HNa y 10 mM de EDTA y fue lavada luego con H_2O deionizada.
- El buffer de corrida (TBE 1X) tenía un nivel mínimo, sólo el suficiente para hacer un correcto contacto, salvo en el pocillo cuyo nivel se mantenía constantemente por adición de TBE 1X.
- La electroelución se llevó a cabo a 5 V/cm durante 30-90 min, dependiendo del tamaño de la banda, y fue controlado por

iluminación con una lámpara UV de mano.

- Confirmada la electroelución por la fluorescencia del BrEt sobre la membrana de diálisis, se procedió a la purificación del DNA. Para ello, sin cortar la corriente, se retiró la membrana y se lavó la misma 3 veces con 150 ul H₂O, se extrajo con 1 vol de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), y se precipitó luego con 1/10 vol ACONa 3 M más 2 vol etanol. La muestra resuspendida en H₂O, fue guardada a -20°C hasta su uso.
- El rendimiento de la electroelución fue aproximadamente del 60-80%, estimada la concentración de banda por comparación con masas conocida de λ DNA, en un gel nativo de agarosa.
- El DNA así aislado, resulta lo suficientemente puro como para ser usado en restricciones, ligaciones y marcaciones para sondas.

Geles desnaturalizantes

- Para las técnicas de secuenciación se prepararon geles de poliacrilamida al 6% a partir de 15 ml de una solución 38% acrilamida/2% bisacrilamida, 50 g de urea, 10 ml 10x TBE y 45 ml H₂O.
- La polimerización se llevo a cabo por el agregado de 1 ml de persulfato de amonio al 10% p/v y 10 ul de TEMED.
- Se utilizaron vidrios de 33 x 40 cm y espaciadores de 0,3-0,4mm de espesor.
- Luego de polimerizados se montaron en una cuba para electroforesis modelo S2 (BRL) y se utilizó como buffer de corrida TBE 1X.

SUBCLONADO DE FRAGMENTOS DE DNA EN PLASMIDOS

Preparación del vector e inserto

- Se utilizaron, en general, los siguientes vectores: pUC13, pUC18 y pUC19.
- Se cortó 1 ug de plásmido con la/s enzima/s adecuada/s en el buffer adecuado.
- En caso de cortes simples, el vector fue defosforilado con fosfatasa alcalina, utilizando 10 mU CIP/pmol extremo 5'.
- En caso de digestiones dobles, la banda correspondiente a la forma lineal fue aislada del gel nativo de agarosa.
- Los vectores se resuspendieron en H₂O a una concentración 50 ng/ul.
- Los insertos fueron, en general, purificados en geles de agarosa, o bien eran digeridos de clones originales, sin purificación de banda.

Reacción de ligado

- Para las reacciones de ligado se utilizaron 20-100 ng vector (20 ng para el vector con corte simple defosforilado y 100 ng para vector con corte doble).
- El volúmen de reacción fue 10-20 ul, utilizando 0,5 ul (ligación de extremos cohesivos), ó 1 ul (extremos romos) de DNA ligasa de T₄ (1 U/ul).
- La temperatura y el tiempo de reacción dependió de cada caso:
 - las ligaciones que involucraban extremos romos (blunt end) se realizaron por 12 hs a temp amb.
 - las ligaciones que involucraban extremos cohesivos ("sticky ends") se realizaron por 12 hs a 14-16°C.

- Se incluyó siempre un control de vector, sin inserto, como estimación de background del vector (plásmido remanente sin cortar o religado).
- La relación vector:inserto utilizada fue de aproximadamente 1:2 a 1:5 y se realizaron varias reacciones, manteniendo constante la masa de vector, y variando la cantidad de inserto.
- Luego de la reacción de ligado se procedió inmediatamente a la transformación, o se guardaron las muestras a -20°C .

Preparación de bacterias competentes (Hannahan, 1983).

Se prepararon bacterias E coli de diferentes cepas: MC1061 y DH5 α .

- Se centrifugaron 100 ml de cultivo bacteriano D.O.₅₅₀ = 0,5 (medio de cultivo LB) durante 5 minutos a 4°C y 3000 rpm. El pellet se resuspendió en 40 ml de solución TPb1 (30 mM acetato de K, 100 mM KCl, 10 mM CaCl_2 , 15% glicerol, pH=5,8).
- Luego de 5 minutos a 4°C la suspensión se centrifugó durante 5 min. a 3000 rpm y las células se resuspendieron en 4 ml de solución TPb2 (10 mM Pipes pH 6,5, 75 mM CaCl_2 , 10 mM KCL, 15% glicerol) y se dejó nuevamente 5 min en hielo.
- La preparación se utilizó en el momento o se tomaron alícuotas y se congelaron en nitrógeno líquido. Las bacterias se mantuvieron de este modo o a -70°C por un período de hasta 6 meses.

Transformación

Las transformaciones se realizaron incubando 10 ng de DNA con 50 μl de células competentes durante 30 min. a 0°C .

- Se realizó luego un shock de temperatura a 42°C durante 90 segundos y posteriormente se incubó 5 min a 0°C .

- La recuperación de las células se realizó por el agregado de 200 ul de medio LB y la incubación de las mismas durante 1 hora a 37°C.
- Una alicuota del cultivo se esparció sobre una placa Petri con medio LB-agar y 100 ug/ml de ampicilina. En el caso de plásmidos derivados de pUC se agregó a la placa 10 ul de 100 mM IPTG (isopropil-β-D-tiogalactósido) y 10 ul de 2% X-gal (5-Br, 4-Cl, 3-indolilgalactósido) como indicadores de plásmidos recombinantes carentes de actividad de beta-galactosidasa.

CONSTRUCCION DE UNA GENOTECA PARCIAL DE DNA HUMANO EN EL FAGO VECTOR λgtWES

Preparación de insertos a partir de DNA genómico: separación de los mismos por tamaño utilizando gradiente de sacarosa

Se digirieron 200 ug de DNA genómico con 5 u/ug de EcoRI, incubando a 37 °C durante toda la noche. Luego de confirmar que la reacción fue completa, se realizó una extracción con un volumen de fenol:cloroformo 3:1 y dos extracciones con igual volumen de cloroformo:alcohol isoamilico 24:1.

- El DNA se precipitó por el agregado de acetato de Na hasta concentración final de 0,3M y 2,5 vol. de etanol y se resuspendió en 500 ul de buffer STE (1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 8, 5 mM EDTA).

- Se preparó un gradiente lineal de sacarosa 10-40% en buffer STE en tubos de centrifuga Beckman SW-41.

- Se sembraron 100 ug de DNA digerido en cada tubo y se centrifugó a 35000 rpm durante 20 hs a 20°C. Previamente, la muestra fue calentada a 65 °C durante 10 min, a fin de evitar la agregación del DNA.

- El gradiente fue fraccionado tomando alicuotas de 500 ul.

- El tamaño del DNA de las distintas fracciones colectadas se determinó por electroforesis en geles de agarosa 0.6%. A los marcadores de PM, se agregó NaCl a fin de igualar la concentración del mismo en las muestras.

- Las fracciones que contenían los fragmentos de DNA de tamaño apropiado se reunieron y dializaron frente a 6 l de buffer TE, se precipitaron con acetato de Na/etanol y finalmente se resuspendieron en 100 ul de TE.

Ligación del DNA inserto a los brazos del fago fgtWES

En una primera etapa, se determinó la relación óptima de inserto/brazos del vector, es decir aquella con la que se obtuviera el mayor número de fagos recombinantes. Para ello, se realizaron una serie de reacciones de ligación utilizando cantidades constantes de vector (100 ng) y distintas cantidades de inserto (50 ng, 25 ng, 10 ng, 5ng).

Empaquetamiento in vitro del DNA ligado

Se utilizaron los extractos Packagene (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante: 2 ul de cada mezcla de ligación (incluyendo también en este paso DNA fgt11 como control) se mezclaron con 10 ul de extractos de Packagene inmediatamente después de descongelado de -70°C y se incubó 20 hs a 22°C . A continuación se le agregó a cada tubo 0,3 ml de SM y 10 ul de cloroformo.

Titulación de la genoteca

Para la titulación se utilizaron bacterias E. coli Y1090;

las mismas fueron preparadas de la siguiente manera: 100ml de un cultivo en LB-Maltosa 0,2% crecido hasta saturación, se centrifugaron durante 10 min. a 4000 rpm y se resuspendieron en 40 ml de 10 mM MgSO₄.

Para la infección se incubaron 100 ul de la preparación anterior con 1 y 10 ul de la preparación de fagos durante 20 min a 37 °C. Las mezclas se plaquearon utilizando 4 ml LB/10mM MgSO₄ - 0,7% agarosa, 100 ug/ml ampicilina y se incubaron durante 10 a 14 hs a 37 °C

El resto de la mezcla de ligación con la que se obtuvo la mayor eficiencia se empaquetó y tituló de manera similar a la descrita.

Amplificación de la genoteca (Maniatis, 1982).

Conocido el título de la genoteca, se procedió a plaquear la misma en cajas de 15 cm (aproximadamente 30000 pfu/caja). Se procedió de manera análoga al paso anterior. En estas placas se realizó el primer rastreo o screening de los fagos recombinantes. -

A continuación se agregaron 8 ml de SM a cada caja, y se las incubó a 4°C durante la noche. Al día siguiente, se colectó el SM de las cajas, cada caja se enjuagó con 2 ml adicionales de SM que se juntó con el resto, y se centrifugó a 7000 rpm. El precipitado (restos bacterianos) se descartó, y se le agregó al sobrenadante 30 ul/ml de cloroformo.

- La genoteca así amplificada se guardó a 4°C.

IDENTIFICACION DE SECUENCIAS POR HIBRIDIZACION

Identificación de fagos recombinantes (Benton-Davis, 1977)

- Se utilizaron para el primer rastreo o "screening" de fagos recombinantes placas de 150 mm. Se plaquearon aproximadamente 40000 pfu/placa.
- Las placas se incubaron a 37°C, durante 8-10 hs, dejándose luego a 4°C durante por lo menos 1 hora, antes de comenzar la transferencia.
- Para la transferencia se utilizaron filtros de nitrocelulosa previamente rotulados, y por duplicado. Se apoyó suavemente el filtro sobre la placa, y se transfirió durante 1 min, tiempo en el cual se marcaron en forma asimétrica mediante una aguja con tinta china, atravesando el filtro y el agar. El filtro duplicado se transfirió 1,5 min, y se marcó de la misma forma que el anterior sobre las primeras marcas.
- Una vez transcurrido el tiempo de transferencia, los filtros con los fagos hacia arriba se embebieron con 0,5 N NaOH - 1,5 N NaCl a temperatura ambiente, durante 1 min, luego con 0,5 N Tris-HCl, pH 8, ClNa 1,5 N en las mismas condiciones y luego, con SSC 2X (NaCl 0,3 N - citrato de sodio 0,03 N).
- Los filtros se secaron a temperatura ambiente sobre papel Whatmann 1 y luego se calentaron 2 hs a 80°C, entre papeles Whatmann 3MM. Los filtros se guardaron a temperatura ambiente hasta someterlos a la hibridación.
- Para el rescreeening, se plaquearon los fagos positivos a baja densidad, 50-100pfu/placa de 90 mm y se procesaron de la forma ya descripta.

Identificación de colonias recombinantes (Grunstein-Hogness, 1975)

En algunos casos de subclonado en plásmidos, se utilizó la hibridación como forma de screening del subclón correcto.

- Las placas crecidas, con colonias de 1-2 mm, se dejaron a 4°C durante 30 min, y luego se procesaron.
- Se utilizó, como soporte de transferencia, filtros de nitrocelulosa, marcados y rotulados previamente, y no se hicieron duplicados.
- Se apoyó suavemente el filtro sobre la placa, y se dejó a temperatura ambiente durante 2 min. Luego de la transferencia se procesaron los filtros como en el punto anterior.
- La placa de Petri se dejó luego 1-2 hs a 37°C, para hacer visibles nuevamente las colonias, y se guardó a 4°C hasta el rescreening.

Identificación de secuencias de DNA. Southern blot (Southern, 1975)

La técnica de Southern blot fue utilizada para la identificación de secuencias homólogas a una sonda determinada.

- En el caso de DNA genómico, muestras de 7-10 ug previamente digerido, fueron fraccionadas en geles de agarosa 0,6-0,9%, en presencia de BrEt a una concentración final de 0,5 ug/ml. En el caso de DNAs clonados, las muestras contenían 100-500 ng de DNA. Junto a las muestras se sembraron marcadores de tamaño molecular.
- Los geles se fotografiaron antes de ser transferidos.
- Luego de la corrida electroforética, se procedió a incubar los geles en HCl 0,15 N, a temperatura ambiente durante 10 min. En el caso de DNAs clonados se omitió este paso.
- Luego de la hidrólisis ácida, se desnaturalizó el DNA con NaOH 0,4 N, durante 30 min a temperatura ambiente.

- En paralelo se humedecieron en H₂O destilada membranas de nylon (Biotrace RP, Gelman), destinadas a retener el DNA.
- Las transferencias se realizaron en 0,4M NaOH durante la noche, en forma análoga al procedimiento de Southern.
- Se marcaron los lugares de siembra. Los restos de agarosa pegados a la membrana se lavaron con 2X SSPE (30X: 5.4 M NaCl, 0.3 M NaH₂PQ₄, 30 mM EDTA) durante 10 min. Las membranas se secaron al aire.
- Las membranas se guardaron a temperatura ambiente hasta su uso en la hibridación.

HIBRIDIZACION CON SONDAS MOLECULARES RADIATIVAS

Marcación de las sondas por el método de "Random-Priming"
(Feinberg y Vogelstein 1984).

Se mezclaron 25 ng de la sonda con 250 pg de lambda DNA. El DNA se hirvió durante 2 min y se incubó en hielo durante 5 min.

- Se agregaron 5 ul de 5x OLB (*), 8.7 ul de H₂O, 4 ul de α P32 dCTP 10 uCi/ul (más de 3000 ci/mMol). Finalmente se agregaron 2.5 U de Klenow y se incubó durante 3 hs a temperatura ambiente.

- La sonda marcada se separó de los nucleótidos no incorporados pasando la muestra por una columna de Sephadex G200 o una de intercambio iónico (Elutip, S & S). La solución de 5X OLB (*) se preparó de la siguiente forma:

-Solución "0": 1.25 M Tris pH8, 0.125 M MgCl₂.

-Solución "A": 1 ml de solución "0", 18 ul 2-mercaptoetanol 3 M, 5 ul de cada trifosfato (dATP, dTTP, dGTP) previamente disuelto hasta 0.1 M en 3 mM Tris pH 7, 0.2 mM EDTA .

-Solución "C": Hexadeoxinucleótidos (Pharmacia: pd(N)6, 50 unidades) solubilizados en 3 mM Tris pH 7, 0.2 mM EDTA, a 90 OD unidades/ml.

La solución 5x OLB, se obtiene mezclando las soluciones A:B:C en la proporción 100:250:150.

Condiciones de hibridización y lavados

En el caso de Southern-blot de DNA genómico, la membrana se prehibridizó a 42°C durante 4 hs en una bolsa con una solución que contenía 50 % formamida, 0.1% Denhart (0,1% Ficoll, 0,1% se-roalbúmina bovina, 0,1% polivinilpirrolidona), 5x SSPE, 5% Dex-tran sulfato, 1% SDS, 200 ug/ml de DNA de esperma de salmón des-naturalizado a 100 OC durante 5 min. Luego de prehibridizar du-rante 4 hs o más a 42°C, se agregó a la bolsa, la sonda y se in-cubó durante 12 a 18 horas a 42°C.

- En los otros casos, rastreo de fagos y colonias, etc., la hibridización se realizó en medio acuoso: 10X Denhardt, 6X SSPE, 0,2% SDS, 100 ug/ml de DNA de esperma de salmón desnaturalizado. Se prehibridizó durante 2 hs. a 60-65°C y se hibridizó durante 12 hs. a la misma temperatura.

- Se realizaron 2 lavados sucesivos con 2X SSPE a Temp. ambi-ente durante 5 min, luego 1 con 2X SSPE, 0.5% SDS a 65°C durante 15 min. y 1 con 0.5X SSPE también a 65°C durante 15 min.

- Se obtuvieron autorradiografías de las membranas utilizando placas radiográficas X-OMAT-AR (Kodak) y pantallas intensifica-doras y un tiempo de exposición de entre 2 a 6 días a -70°C.

- Una misma membrana de nylon pudo ser rehibridizada hasta 6 veces. La dehibridización de las membranas se realizó en baño a 42°C durante 30 min en 0.4 N NaOH y luego en 0.2 M Tris pH 7.5, 0.5% SDS, 0.1x SSPE. Luego se prehibridizaron e hibridizaron como

se mencionó antes.

DETERMINACION DE SECUENCIAS NUCLEOTIDICAS DE DNA

Se realizó por el método de Sanger sobre DNA plasmídico, utilizando un kit comercial (Sequenase 2.0, USB Corp.)

Hibridación del oligonucleótido iniciador al DNA molde

Se mezclaron 4 ug de DNA con H₂O hasta un vol de 8 ul, se agregaron 2 ul de 2 N NaOH y se incubó 5 min a T amb.

- Se agregaron 0.5 pmoles del iniciador, se neutralizó por el agregado de 3 ul de AcoNa 3 M pH 5 y 9 ul de H₂O.
- Se precipitó por el agregado de 75 ul de etanol y se colocó durante 30 min a -70 C.
- Se centrifugó 5 min a 15000 rpm, se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet 2 veces con etanol 70%.
- El pellet se secó al vacío y se resuspendió en 10 ul de buffer: 200 mM Tris pH 7.5, 100 mM MgCl₂, 250 mM NaCl. (Buffer 1X Sequenase)

Extensión del iniciador y marcación

A la mezcla anterior se le agregó 1ul de DTT 0.1 M, 2 ul de mezcla de marcación (7.5 uM dGTP, 7.5 uM dCTP, 7.5 uM dTTP) diluida 1:5, 0.5 ul de α^{32} P dATP (actividad específica 1100-1300 Ci/mmol), 2 ul de DNA polimerasa de fago T7 (U S B) diluida 1:8 en buffer TE. La reacción se incubó 5 minutos a temperatura ambiente.

Reacción de terminación

Se rotularon cuatro tubos de Eppendorf con las letras A, C, G y T y se les agregó a cada uno 2.5 ul de la respectiva mezcla de terminación. Se dejaron preincubando a 37°C durante 2 min.

- Se les agregó 3.5 ul de la mezcla de marcación (paso anterior) a cada uno de estos tubos y se incubó por 5 minutos a 37°C.
- Se detuvo la reacción por agregado de 4 ul de buffer de siembra (95% formamida, 20 mM EDTA, 0.05% Bromophenol Blue, 0.05% xilene Cyanol FF), y se mantuvo en hielo. Antes de sembrar, se calentó 2 min a 75 °C.

Electroforesis

Las muestras se resolvieron utilizando geles desnaturalizantes de poliacrilamida, a una potencia constante de 50 watts.

- Se realizaron de cada muestra 2 corridas, una larga de 5 hs, y una corta de 2 hs. El orden de siembra fue G, A, T, C.
- Luego de la corrida se fijó el gel en 10% metanol/10% ac.acético durante 20 min y se lo secó en desecador de vacío. Los resultados se revelaron por exposición sobre una placa radiográfica.

Sondas utilizadas

Las hibridizaciones fueron realizadas con diferentes sondas correspondientes a genes o fragmentos de genes de HLA.

pHLA-2: cDNA de 1400 bp (Sood, 1981), gentilmente cedido por el Dr. S. Weissman. Este cDNA incluye secuencias desde parte del segundo exón hasta la región 3' no traducida del mRNA de un gen de clase I y, bajo condiciones de hibridización habituales, detecta gran parte de toda la familia multigenética de clase I.

pB3UT: Sonda específica para detectar genes del locus HLA-B (Koller, 1984) fue gentilmente cedida por el Dr. H. Orr. Se trata de un fragmento de 358 bp derivados de la región 3' no traducida un cDNA de un gen HLA-BB. Este fragmento fue subclonado en el vector pUC9.

pC250: Sonda específica para detectar genes del locus HLA-C (Strachan, 1986), fue gentilmente cedida por el Dr. B. Jordan. Se trata de un fragmento de 250 bp derivados del exón 7 e intrón 7 de un clon genómico correspondiente al gen HLA-Cw3.

pBB1: Comprende una zona de 450 bp que codifica para el dominio $\alpha 2$ del pseudogen HLA 12.4 (posiciones +565 a +1024 respecto del ATG iniciador, Malissen, 1979). No discrimina especificidad HLA-A, B, C.

pA3UI: Se trata de un fragmento de 400 bp de la región 3' no traducida de un gen HLA-A (Parham, 1989a).

Oligonucleótidos específicos utilizados para secuenciación de clones de DNA genómico HLA Clase I.

	Secuencia (5'--->3')	Homología bp N	Permite secuenciar a ... (Polaridad)
1	GAGGGTCGGGCGGGTCTCAGC	834-854	Exón 2 (R)
2	GGGATGAGGGGTCGTGACCTG	829-854	Exón 2 (C)
3	AAAATCCCCCGGGTTGGTCGGGGC	1318-1342	Exón 3 (R)
4	TCCCCTTCTTGTGGGAGGCCATCCC	1709-1733	Exón 3 (C)
5	AGATGCAAAATGCCTGAATTTTCTGA	2199-2224	Exón 4 (R)
6	AGGCTCCTGCTTTCCTAGAAAGACAT	2538-2563	Exón 4 (C)
7	CCGAGTGGACCTGGGGAC	1091-1108	Intrón 2 (R)
8	CGACCCACGTCGCAGCC	1413-1430	Intrón 2 (C)
11	TGCGTCGGGTCCTTCTTCCTGGATACTC	514-541	Exón 1 (R)
12	GCTGAGACCCGCCCGACCTCCTCCC	829-854	Exón 1 (C)
13	CTCACCCCTGAGATGGGGTAAGGAGGG	2498-2523	Exón 5 (R)
14	AAAAGAGTAAGTGCTGGCACACAGGG	2863-2888	Exón 5 (C)
15	GGGTCCAAGACTAGGAGGTTCTCTA	3094-3119	Exones 6,7 (R)
16	CCGGACCCATTACCTCTAACAACTAACC	3419-3449	Exones 6,7 (C)
17	GGCCTAGGTAATGGAGATTCTTTGATTGG	3419-3449	Exón 8 (R)
18	CAGACACATTCAGAGTGCCTTTGCAGA	3622-3648	Exón 8 (C)

R: secuencia homóloga al mRNA.

C: secuencia complementaria al mRNA.

Resultados y Discusión

ESTUDIOS DE POLIMORFISMO GENÓMICO EN GENES HLA DE CLASE I Y SU CORRELACION CON LA SEROLOGIA

Como se mencionara en la Introducción, hacia 1986 se describieron los primeros estudios de polimorfismos genómicos en el sistema HLA, sobre todo aquellos asociados a genes de clase II. Sólo los trabajos de Cohen y Dausset (1983) y Dreisel y col. (1985) mostraron la correlación de ciertos RFLP con determinados alelos HLA de clase I definidos por la serología clásica. Ness y col. (1987) describen por primera vez para genes de clase I, la existencia de variantes polimórficas de restricción no distinguibles por serología.

Hacia 1987 nuestro laboratorio describió la asociación del alelo HLA-B35 con la hepatitis crónica activa en población latinoamericana (Mota y col, 1987). Teniendo en cuenta que esta asociación no se observa en sajones (Van Hattum, 1987), nos planteamos como hipótesis de trabajo la eventual existencia de variantes del alelo B35: estos subtipos no serían distinguibles por serología, estarían presentes con frecuencias diferentes en los distintos grupos étnicos y explicarían la asociación diferencial. Esta idea se basa en los hallazgos de Cohen-Haguenauer y col (1985), quienes habían demostrado la existencia de variantes de RFLP para genes HLA-DR y -DQ en pacientes diabéticos de tipo I.

Nuestro primer objetivo fue entonces encarar la búsqueda de posibles polimorfismos genómicos del alelo HLA-B35. La estrategia a seguir, sin embargo, no resultaba sencilla por varios motivos:

a) las moléculas HLA de clase I están codificadas por una familia multigenética, con la presencia en el genoma humano de 15-20 genes muy homólogos entre sí. Como consecuencia de esto, las hibridaciones genómicas en experimentos de Southern resultan en la presencia de un complejo patrón de 15-30 bandas, a veces difícil de interpretar.

b) según se usen como sondas clones genómicos o clones de cDNA, sondas "completas" o pequeñas (representando los extremos 5' ó 3' del gen de clase I), los resultados que se obtienen son muy diferentes.

c) el número de enzimas de restricción a ensayar para el rastreo de polimorfismos es muy grande.

d) los antecedentes experimentales hasta ese momento no sólo involucraban a pocos alelos de clase I, sino además, eran estudiados por distintos laboratorios en condiciones experimentales no siempre comparables entre sí.

Afortunadamente, tuvimos la oportunidad de encarar una estrategia ordenada para este proyecto, al poder participar del X Taller Internacional de Histocompatibilidad. Por primera vez, en estos trabajos colaborativos internacionales se incluyó una sección de estudio del sistema HLA a nivel genómico. Esta tuvo dos objetivos principales:

- introducir a la comunidad de inmunogenetistas condiciones tecnológicas reproducibles y comparables entre distintos laboratorios
- definir un patrón de fragmentos de restricción asociado con las diferentes especificidades HLA

El trabajo comprendió: primero, el estudio de 70 líneas celulares homocigotas a nivel del HLA con 12 enzimas de restricción; luego estudios de segregación de patrones de RFLP en familias locales; y finalmente estudios opcionales de asociación a enfermedad, genotipos recombinantes y haplotipos raros. Para la hibridización, todos los laboratorios usaron la misma colección de 13 sondas derivadas de genes HLA de clase I, II y III.

ESTUDIO DE LAS LINEAS CELULARES

Se estudiaron 70 líneas celulares (2 de ellas duplicadas) homocigotas a nivel del HLA-DR, que cubren las especificidades serológicas DR1 al DR8 (Tabla 3). Se utilizaron 12 enzimas de restricción distintas (EcoRI, MspI, BamHI, PvuII, BglII, HindIII, RsaI, TaqI, PstI, EcoRV, KpnI y SstI) con las 13 sondas HLA de clase I, II y III. Esto hace $12 \times 13 = 156$ combinaciones enzima/sonda para cada célula. Las muestras fueron codificadas por los organizadores de forma que el análisis fue "ciego". Cada laboratorio debió trabajar con una enzima de restricción (en nuestro caso BglII) y 9 sondas (nuestro laboratorio DRB, DQB, DPB, DQA, Clase I, C2, Bf, C4 y 210H).

Describiremos, a continuación los resultados generados en nuestro laboratorio para este taller internacional, su análisis local y centralizado y las conclusiones generales obtenidas para los genes de clase I.

Análisis de las condiciones metodológicas:

1. El protocolo de referencia tomó en cuenta la complejidad genómica de esta familia multigenética, para facilitar el análisis de fragmentos numerosos y de tamaños moleculares desde 100 bp a 20-30 kb. Para ello, fue necesario realizar dos procedimientos de electroforesis para las mismas muestras de DNA bajo diferentes condiciones de concentración de agarosa, voltaje y tiempo de migración (L y S). También debieron buscarse marcadores de peso molecular que abarcaran un amplio espectro de tamaños desde 500 bp a 30 kb (DNA de bacteriófago lambda digerido con SmaI, HindIII, KpnI y BstEII, marcadores M1 y M2, ver Mat.y Mét.).

Tabla 3: Lineas celulares utilizadas para los estudios de RFLP del X Workshop Internacional de Histocompatibilidad.

<u>LINEAS</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>DR</u>	<u>DRw</u>	<u>DQw</u>
QBL	26	18	5?	3	52	2
RSH	68,30	42	2	3	5	4
LO0B17B5	3	18	5	3	52	2
WT51	23	65	8	4	53	8
BM92	25	51	1	4	53	8
YAR	26	38	-	4	53	8
PE117	24	60	10	4	53	8
LKT3	24	54	1	4	53	4
BM14	3	7	7	4	53	8
BSM	2	62	9	4	53	8
SAVC	3	7	7	4	53	8
DEU	31	35	4	4	53	7
MLF	2	62	9	4	53	7
BOLETH	2	62	10	4	53	8
JHAF	31	51	-	4	53	7
DEM	2	57	6	16	53	5
JVM	2	18	5	11	52	7
DHIF	31	38	-	11	52	7
BM15	1	49	7	11	52	7
SPO010	2	44	5	11	52	5
SWEIG007	29	61	2	11	52	7
BM21	1	41	-	11	52	7
TISI	24	35	4	11	52	7
FPAF	1	35	4	11	52	6
TUBO	2,3	51	7	11,12	52	7
BM16	2	18	7	12	52	7
HO301	3	14	8	6	52	6
WDV	2	38	-	13	52	6
HHKB	2,3	51	7	13	52	6
MGAR	26	8	7	15	-	6
SCHU	3	7	7	15	-	6
AMAI	28	53	4	15	-	6
RML	2	51	-	16	-	7
DUCAF	30	18	5	3	52	2
PF04015	1	8	-	3	52	2
CB6B	1	62	9	13	52	5
OMW	2	45	-	13	52	6
WT47	32	44	5	13	52	6
SLE005	2	60	10	13	52	6
KOSE	2	35	-	13,14	52	5
AMALA	2	62	9	14	52	7
31227ABO	2	18	7	14	52	5
EK	2	44	5	14	52	5
TEM	26	38	-	14	52	1

<u>LINEAS</u>	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>DR</u>	<u>DRw</u>	<u>DQw</u>
MOU	29	44	-	7	53	2
PLH	3	47	6	7	53	2
DBB	2	57	6	7	53	9
PITOUT	29	44	-	7	53	2
MANIKA	3	50	-	7	53	2,3
LBUF	30	13	6	7	53	2
TAB089	2	46	11	8	52	6
BM9	2	35	4	8	52	4
MADURA	2	60	10	8	52	4
BTB	2	27	1	8	52	4
OLGA	31	62	1,10	8	52	4
LUY	2	51	-	8	52	7
SPACH	31	62	1,3.1	8	52	4
DXB	24	60	10	9	53	9
KAS116	24	51	-	1	-	5
JESTHOM	2	27	1	1	-	5
WT100BIS	11	35	4	1	-	5
MZ070782	24	14	2,8	1	-	5
HOM2	3	27	1	1	-	5
KAS011	1	37	6	2	-	1
DO208915	25	18	-	15	-	6
HO104	3	7	7	15	-	6
E418324	1	52	-	15	-	1
COX	1	8	7	3	52	2
VAVY	1	8	7	3	52	2

2. Cada laboratorio debió hibridizar al menos 6 membranas simultáneamente y realizar por lo menos 6 hibridizaciones sucesivas. Por lo tanto se buscaron las membranas de mayor eficiencia de rehibridización y el método de marcación radiactiva de la sonda que proveyera mayor actividad específica.

3. A fin de poder comparar las diferentes autorradiografías con la misma enzima y sonda, se decidió utilizar una técnica donde los marcadores de peso molecular fueran detectados sobre cada membrana luego de cada hibridización: se sembró una pequeña cantidad de los marcadores M1 y M2 de fago lambda (ver Materiales y Métodos) y se agregó, en la marcación de la sonda HLA específica, DNA total de fago lambda. Como los marcadores de peso molecular no eran visibles a la luz UV y para que las distancias de migración recorridas por las muestras en los distintos experimentos fueran comparables, se sembró en un carril 1 ug del plásmido PAT 153 linearizado como marcador.

Metodología experimental y resultados

Se digirió el DNA de las 72 líneas con la enzima BglII y se sembraron 7 ug de DNA por calle junto con marcadores de tamaño molecular según el siguiente orden:

gel A: M1, M2, línea 1, 2,etc. hasta la 24, M1, M2

gel B: M1, M2 línea 25, 26, ... etc. hasta la 48, M1, M2

gel C: M1 M2 línea 49, 50, ... etc. hasta la 72, M1, M2

Para la resolución de los fragmentos largos (L), se sembró el DNA en un gel de 0.6% agarosa que se sometió a 40 volts durante aproximadamente 40 hs. Para la resolución de los fragmentos cortos (S), la electroforesis se llevó a cabo geles de 0.9% agarosa a 25 volts durante alrededor de 48 hs. Luego de la electro-

foresis, el DNA se transfirió a membranas de nylon las cuales fueron hibridizadas con las diferentes sondas. Ya que cada muestra se analizó en ambas condiciones, tuvimos un total de 6 membranas que representaban las 72 líneas celulares en condiciones L y S.

Los patrones de hibridización obtenidos en cada membrana fueron analizados localmente y en forma centralizada por la comisión organizadora del Workshop. Esta información fue registrada en programas de computación provistos por los organizadores y fue remitida para su análisis en diskettes de 5 1/4. El programa consistió en definir en primer lugar los datos de la migración (en mm) de los fragmentos correspondientes a cada uno de los marcadores de tamaño molecular (M1 y M2) de cada una de las 6 autoradiografías hibridizadas con una sonda dada. Para cada una de las membranas, estos datos serán los mismos con las distintas sondas usadas. Se definieron luego, los fragmentos de restricción presentes numerados según un orden creciente de migración y se colocó, en mm, la distancia de migración correspondiente a los distintos geles. Se analizó finalmente, para cada línea celular (en cada carril) la presencia o ausencia de cada fragmento según el siguiente código:

- 1 = intensidad de fragmento asignable a simple copia.
- 2 = intensidad de fragmento asignable a doble copia.
- 3 = intensidad mayor que dos veces asumida como simple.
- 8 = fragmento presente de intensidad débil.
- 9 = imposibilidad de leer.
- Blanco = fragmento ausente.

La Fig. 8 muestra un ejemplo de los resultados obtenidos con la sonda de clase I y la Tabla 4 el registro de las bandas obtenidas.

Luego de la estimación de los parámetros para cada filtro, el programa de computación estimó los tamaños moleculares de los fragmentos experimentales vistos en el filtro correspondiente.

Figura 8: Autorradiografía del patrón de fragmentos obtenidos de la hibridización con la sonda de clase I. Los fragmentos BglII se resolvieron en un gel de agarosa al 0,9% (condiciones cortas). M1 y M2 son maradores de tamaño molecular (ver materiales y métodos).

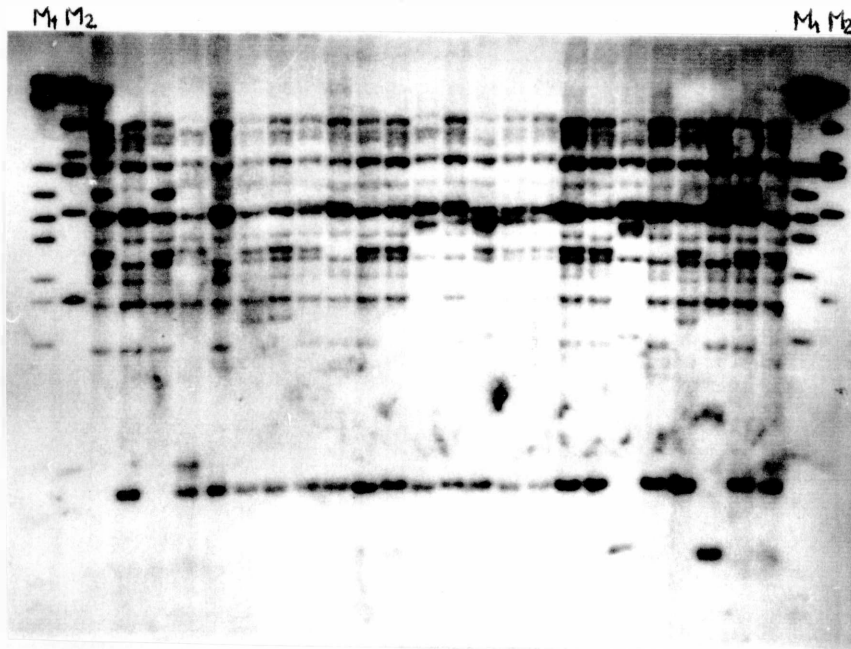


Tabla 4: Análisis por computación de los fragmentos de restricción.

a) Distancia recorrida en mm de los marcadores de PM en las distintas radiografías de las membranas hibridizadas con la sonda pHLA-2.

m1= marcador M1; m2= marcador M2; A= membrana que contiene a las líneas celulares 1 a 24; B= membrana que contiene a las líneas celulares 25 a 48; C= membrana que contiene a las líneas celulares 49 a 72; S= condiciones de electroforesis para resolución de fragmentos cortos; L= condiciones de electroforesis para resolución de fragmentos largos.

b) Numeración de todos los fragmentos de restricción BglII presentes en la hibridización con pHLA-2 y la distancia de migración en mm en las distintas membranas.

c) Modelo para el análisis del patrón de fragmentos. En la segunda línea se indica el nombre de la sonda utilizada: clase I y la enzima: BglII. En la tercera y cuarta línea están numeradas las 72 líneas celulares como calles o columnas. Debajo de cada una de ellas se analiza por presencia o ausencia de cada uno de los 33 fragmentos definidos en b) según el código antes mencionado (se muestra solamente los resultados para los diez primeros fragmentos).

A

Probe Name: CLASSI

Marker Mobility
Enzyme Name: BGLII

Frag	ASm1	ASm2	BSm1	BSm2	CSm1	CSm2	ALm1	ALm2	BLm1	BLm2	CLm1	CLm2
1	0	97	0	204	0	110	0	525	0	547	0	537
2	110	0	215	0	122	0	577	0	587	0	578	0
3	130	0	228	0	145	0	610	0	632	0	619	0
4	0	137	0	240	0	150	0	650	0	675	0	652
5	203	0	290	0	212	0	799	0	821	0	794	0
6	272	0	357	0	278	0	951	0	965	0	939	0
7	297	0	386	0	305	0	1011	0	1025	0	995	0
8	0	308	0	390	0	310	0	1020	0	1036	0	1005
9	317	0	403	0	323	0	1042	0	1055	0	1027	0
10	0	368	0	445	0	363	0	1142	0	1150	0	1122
11	412	0	495	0	410	0	1226	0	1230	0	1202	0
12	0	430	0	507	0	415	0	1247	0	1256	0	1224
13	0	476	0	558	0	470	0	1341	0	1334	0	1308
14	0	567	0	652	0	553	0	1497	0	1485	0	1468
15	0	617	0	708	0	610	0	1582	0	1557	0	1548
16	625	0	710	0	610	0	1582	0	1565	0	1552	0
17	0	728	0	810	0	708	0	1740	0	1705	0	1705
18	0	1012	0	1097	0	975	0	0	0	2040	0	2102
19	1025	0	1115	0	1010	0	0	0	0	0	0	0
20	1115	0	1200	0	1102	0	0	0	0	0	0	0
21	0	1130	0	1215	0	1145	0	0	0	0	0	0
22	0	1294	0	1370	0	1242	0	0	0	0	0	0
23	0	1352	0	1425	0	1295	0	0	0	0	0	0
24	0	1402	0	1472	0	1340	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Por lo tanto, para cada fragmento experimental, tendremos hasta 6 estimaciones de peso molecular, las cuales deberán ser utilizadas para una estimación final promedio obtenida de los 6 filtros. El análisis centralizado permitió definir para cada enzima :

a) la correlación fragmento/sonda.

b) la correlación entre la tipificación serológica de cada línea celular con el tamaño de cada fragmento para cada sonda (ver ej. en Tabla 6 A y B y Tabla 7).

De esta manera se pudieron definir "clusters" de correlación de determinados fragmentos asociados a determinadas tipificaciones serológicas.

Estos datos fueron posteriormente analizados por los investigadores participantes en el taller de discusión del XWIH llevado a cabo en noviembre de 1987 en Princeton, USA.

RFLP para los genes HLA de clase I obtenidos con la enzima BglII

A fin de ejemplificar como se realizó este estudio describimos, en primer lugar, los resultados obtenidos en nuestro laboratorio con la sonda pHLA-2, de clase I y la enzima BglII. Esta sonda reconoce todos los genes de clase I, no presenta especificidad de locus. Este sistema identificó 25 fragmentos sobre las 70 líneas (Tabla 5). El patrón de bandas observado fue muy difícil de analizar especialmente para los fragmentos de alto PM, aún en condiciones L de migración. Los fragmentos 3, 4 y 5 así como 10 y 11 están muy cercanos entre sí, lo que dificulta su diferenciación. Siete de los 25 fragmentos fueron constantes (no polimórficos), esto es, estuvieron presentes en todas las líneas.

La Tabla 5 indica la distribución de los fragmentos en las líneas celulares, no se incluyeron los 7 fragmentos constantes. El fragmento 4 podría ser específico para A11 (aunque en el panel hubo sólo una línea A11). El fragmento 7 podría correlacionar con el haplotipo A29, B44 (si bien el número de células es sólo dos). El fragmento 20 parece específico para A3 (n = 11) y para

Figura 9: Fragmentos identificados con el sistema Clase I/BglII. M1 y M2: marcadores de peso molecular. Todos los fragmentos estandarizados están indicados una vez al menos para la migración corta (S) y/o larga (L). La presencia de un fragmento estandarizado se indica por un guión.

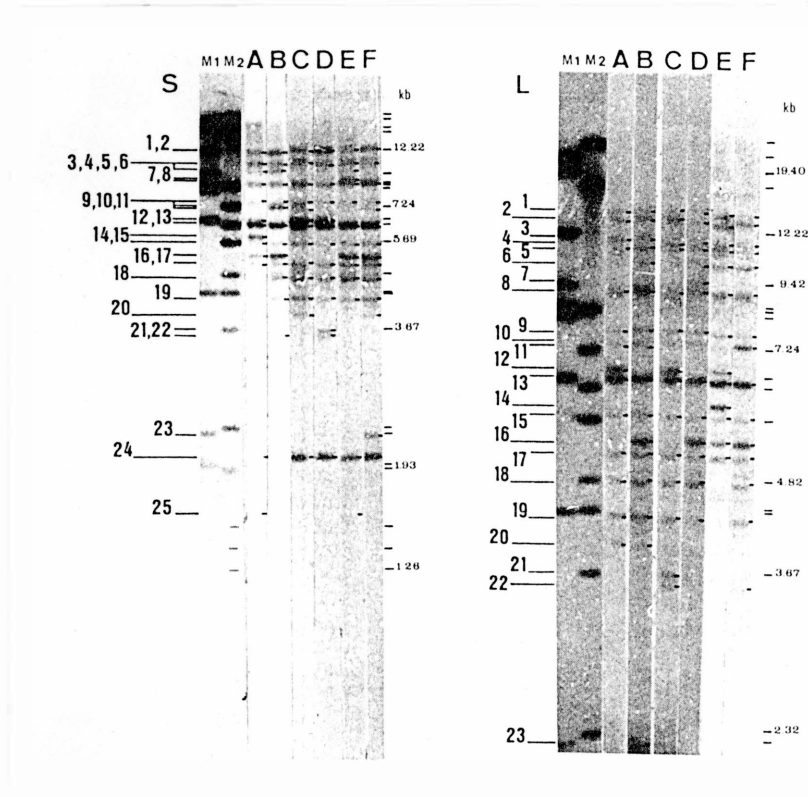


Tabla 5: RFLP para el sistema ClaseI/BglII. Distribución de las bandas identificadas en el panel de líneas celulares del X° taller internacional de histocompatibilidad.

LINEAS	A	Cw	B	23467111111222222								LINEAS	A	Cw	B	23467111111222222							
				0124689012345												0124689012345							
9018	3	5	18	22	2	22	22	22	2	2	9039	2	5	18	22	92	22	2	28				
9021	w68/30	2	w42	22	2		22	22	22	22	9064	2	9	w62	22	2	22	2	28				
9104	31	-	38	22	9	8	22	22	22	22	9068	2	4	35	22	2	22	2	22				
9048	30	6	13	22	2	8	22	22	22	22	9105	1	4	35	22	2	22	2	28				
9034	3	7	7	22	2	8	9	22	22	22	9055	3	8	14	22	82	22	2	2				
9082	3	7	7	22	2	8	22	22	22	28	9056	2	-	35	22		22	2	2				
9013	3	7	7	22	2	8	22	22	22	2	9056	2	-	35	22		22	2	28				
9047	3	6	w47	22	2	8	22	22	22	2	9062	2	-	38	22		22	2	28				
9005	3	1	27	22	2		22	22	22	2	9026	26	-	38	22		22	2	28				
9017	3	7	7	22	2		22	22	22	2	9057	26	-	38	22		22	2	28				
9065	3	7	7	22	2		22	22	22	2	9025	31	4	35	22		22	2	28				
9033	3	7	7	22	9		22	22	22	2	9063	32	5	44	22		22	2	28				
9045	2/3	7	51	22	2		22	22	22	2	9042	24	4	35	22		22	2	2				
9092	25	1	51	22	2		22	22	22	2	9075	24	10	w60	22		22	2	2				
9008	25	-	18	22	2		22	22	22	2	9029	23	8	w65	22		22	2	8				
9038	2	7	18	22	2		22	22	22	2	9107	24	1	w54	22		22	2	2				
9061	2	7	18	22	2		22	22	22	2	9003	24	-	51	22		22	2	28				
9058	2	-	45	22	2		22	22	22	2	9028	24	10	w60	22		22	2	22				
9067	2	1	27	22	2		22	22	22	2	9030	31	-	51	22		22	2	28				
9009	1	6	37	22	2		22	22	22	2	9071	31	1	w62	22		22	2	28				
9011	1	-	w52	22	2		22	22	22	2	9072	31	1	w62	99	9	22	2	28				
9040	1	7	49	22	2		22	22	22	2	9002	24	2	14	22		22	2	2				
9043	1	-	w41	22	2		22	22	22	2	9050	29	-	44	22		22	2	28				
9106	3	-	w50	99	9		22	22	22	2	9051	29	-	44	22		22	2	28				
9004	2	1	27	22	2		22	22	22	9					22		22						
9016	2	-	51	22	2		22	22	22	2					22		22						
9066	2	11	w46	22	2	2	22	22	22	2					22		22						
9019	30	5	18	22	2	82	22	22	22	2					22		22						
9014	26	7	8	22	2	2	22	22	22	2					22		22						
9020	26	75	18	22	2	2	22	22	22	2					22		22						
9069	2	10	w60	22	2	2	22	22	22	2					22		22						
9031	2	10	w62	22	2	2	22	22	22	2					22		22						
9032	2	9	w62	22	2	2	22	22	22	2					22		22						
9032	2	9	w62	22	2	92	22	22	22	2					22		22						
9091	2	9	w62	22	2	2	22	22	22	2					22		22						
9036	2	5	44	22	2	2	22	22	22	2					22		22						
9054	2	5	44	22	2	2	22	22	22	2					22		22						
9070	2	-	51	22	2	2	22	22	22	2					22		22						
9059	2	10	w60	22	2	2	22	22	22	2					22		22						
9022	1	7	8	22	2	2	22	22	22	2					22		22						
9023	1	7	8	22	2	2	22	22	22	2					22		22						
9088	1	-	8	22	2	2	22	22	22	2					22		22						
9060	1	9	w62	22	2	2	22	22	22	2					22		22						
9006	11	4	35	22	2	2	22	22	22	2					22		22						
9007	2	6	w57	22	2	2	22	22	22	2					22		22		8				
9052	2	6	w57	22	2	2	22	22	22	2					22		22		8				
9010	28	4	w53	22	2	2	22	22	22	2					22		22						
9037	29	2	w61	22	2	2	22	22	22	2					22		22		28				

Aw30 (n = 3). El fragmento 22 parece correlacionar con A2, A25 y A26. Los fragmentos 18 y 19 están presentes en todas las células excepto A23 y algunas A24 (4/6). Los fragmentos 2 y 3 están presentes en todas las células salvo Aw23, A24 (n=6), A29-B44 (n=2), A32 (n=1), A31 (n=1). El fragmento 14 parece ser alélico con los fragmentos 18 y 19. El fragmento 10 parece ser alélico con el fragmento 24. La Figura 9 muestra 2 autorradiografías donde la presencia fragmentos estandarizados está señalada al menos una vez con un guión.

Conclusiones generales de los RFLP hallados para genes de Clase I

El panel de líneas celulares estudiadas había sido preseleccionado por los organizadores del XWIH de acuerdo a los alelos del locus DR, cubriendo las especificidades DR1 hasta DR8. Es por ello que las especificidades de clase I representadas en las mismas no cubrieron en forma pareja un gran número de alelos. Esto se observa en la Tabla 3: por ej. hay numerosas líneas A1, A2, A24, B7, B18, B35, B44, B51, Bw62, Cw1, Cw3 Cw4, Cw5, Cw6, Cw7, pero representan poco más de una docena de alelos sobre un total de alrededor de cien existentes. A pesar de esta limitación, el análisis permitió correlacionar numerosas bandas con determinados alelos.

Se detectaron 204 fragmentos con la sonda de clase I utilizando 11 enzimas de restricción. A pesar no haberse utilizado sondas específicas para los diferentes locus de clase I, se pudo establecer buena correlación entre conjuntos de fragmentos y alelos de los loci A y C, si bien en la mayoría de los casos no pudieron ser observados subtipos ("splits") de especificidades clásicas. La Tabla 6 muestra la presencia de "clusters" de correlación del total de fragmentos obtenidos frente a 68 líneas listadas para las especificidades HLA-A. Los fragmentos asociados con uno o un número limitado de especificidades serológicas fueron reordenados para ilustrar las asociaciones. En la Tabla 7 los

Tabla 7: Fragmentos de restricción de clase I asociados al locus HLA-C (n=22) en las distintas líneas celulares. En la parte superior se especifican las distintas enzimas de restricción y los tamaños de fragmentos que generan cada una de ellas. A la izquierda se hallan listadas las líneas celulares y sus fenotipos HLA de clase I correspondientes ordenadas de acuerdo a las especificidades HLA-C. Para la mayoría de las mismas pueden verse patrones de fragmentos distintivos. En la parte inferior de la Tabla, 16 líneas celulares no poseen tipificación serológica para este locus. Algunas de ellas poseen patrones de RFLP semejantes a especificidades conocidas.

			CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
			LLLLLLLLLLLLLLLLLLLL
			IIIIIIIIIIIIIIIIIIII
			PBPEKBNENPPMBPKBENBPM
			VASCCPGSCISVSASPGCIIS
			UMTVVNLPIDTUPMNLIDDT
			1 1 1 1 1 1 42
			3110446578734316573454
			701949729247406348472
			9036424361114317757837
9004 B27	A2	CM1	666 86 8 888
9005 B27	A3	CM1	666 86 8 888
9067 B27	A2	CM1	666 6 86 8 888
9092 B51	A25	CM1	666 4 86 8 888
9072 BW62	A31	CM1	666 86 8 888
9071 BW62	A31	CM1	666 4 86 8 8866
9002 B14	A24	CM2	666 888688 8 886
9017 BW61	A29	CM2	666 48 66 8 8 8 8
9021 BW42	A30	CM2	6 84 6 84 88668
9105 B35	A1	CM4	66688888 86 8 8
9006 B35	A11	CM4	66688888 86 4 8 8
9068 B35	A2	CM4	66688888 86 8 8
9042 B35	A24	CM4	66688888 86 8 8
9025 B35	A31	CM4	66688888 86 8 8
9010 BW53	A28	CM4	66688888 86 8 8
9016 B44	A2	CM5	666 888886
9054 B44	A2	CM5	666 888886
9063 B44	A32	CM5	666 888886
9039 B18	A2	CM5	666 88888666
9020 B18	A26	CM5	666 88888664
9018 B18	A3	CM5	666 888888
9019 B18	A30	CM5	666 888888
9009 B37	A1	CM6	666 888888 886486
9007 BW57	A2	CM6	666 64 888888
9052 BW57	A2	CM6	666 64 888888
9047 BW47	A3	CM6	666 888888
9048 B11	A30	CM6	666 888888
9040 B49	A1	CM7	666 4 6 88888888
9014 B8	A26	CM7	88 8668 6 8 8 6
9022 B8	A1	CM7	88 8668 6 8 8 6
9023 B8	A1	CM7	88 8668 6 8 8 6
9038 B18	A2	CM7	6 88888888
9061 B18	A2	CM7	6 88888888
9045 B51	A2	CM7	666 848 86 86688 8
9065 B7	A3	CM7	4 884888888
9013 B7	A3	CM7	888888888
9017 B7	A3	CM7	4 888888888
9034 B7	A3	CM7	4 888888888
9033 B7	A3	CM7	6 888888888
9082 B7	A3	CM7	888888888
9055 B14	A3	CM8	666 888886
9029 BW14	A23	CM8	666 88888666
9060 BW62	A1	CM9	66 888 864 8 8
9064 BW62	A2	CM9	66 888 864 4 6
9032 BW62	A2	CM9	66 888 864 6
9091 BW62	A2	CM9	66 888 864 6
9031 BW62	A2	CM10	66 888 864 6
9069 BW60	A2	CM10	66 888 66 8 8
9059 BW60	A2	CM10	66 888 688 8 8
9028 BW60	A24	CM10	66 888 648 88888
9075 BW60	A24	CM10	66 88 684 8 8
9066 BW46	A2	CM11	666 86 8 888
9056 B35	A2		666 88888888
9058 B45	A2		666 6 888 8 8
9062 B38	A2		666 88888888
9003 B51	A24		666 88888888
9008 B18	A25		666 6 88888888
9026 B38	A26		666 6 88888888
9057 B38	A26		666 88888888
9050 B44	A29		666 6 888 8 8
9051 B44	A29		666 6 888 8 8
9043 BW41	A1		666 6 888 8 8
9011 BW52	A1		666 8 8 666 88 8
9088 B8	A1		88 8648 6 8 8 6
9016 B51	A2		66 888 8668 8866
9070 B51	A2		666 888 8648 8 8
9106 BW50	A3		666 888 8648 888886
9030 B51	A31		66 888 8648 886

fragmentos relacionados con HLA-C fueron tomados de las primeras 22 columnas de la Tabla 6 (ECV 1096 a PST 721) y las células reordenadas de acuerdo a las especificidades HLA-C.

Fue posible definir RFLPs para los alelos A1, A2, A3, A9, A10, A11, A30 y A31 (Figura 10), algunos de ellos con fragmentos únicos y otros a través de fragmentos compartidos por 2 o más especificidades. La Figura 11 representa esquemáticamente estas observaciones.

Otros fragmentos tuvieron una distribución muy amplia y fueron caracterizados por una correlación negativa con una o varias especificidades bien definidas. Estos "clusters" de fragmentos se muestran en la Figura 12. Fue así que 14 RFLP distintos estuvieron presentes en todas las células a excepción de las tipificadas como A9. En varios casos, se pudo observar un fragmento específico para un alelo dado como opuesto a un otro fragmento que correlaciona con las especificidades restantes. Tomando el mismo ejemplo de las células tipificadas como A9, la enzima SstI pudo definir 2 fragmentos: SstI de 5,92 kb que estuvo presente en todas las células A9 y SstI de 5,06 kb encontrado en todas aquellas líneas con especificidades serológicas distintas de A9.

Para los alelos HLA-B no se alcanzó una buena definición con RFLPs. Se identificaron sólo siete fragmentos que presentaron buena correlación con especificidades HLA-B (Tabla 8). El fragmento SstI 1.62 kb asociado con B14 y B38 es aún tentativo ya que todas las células B14 expresaron también Cw8, por lo que este fragmento podría correlacionar con uno u otro alelo. En el caso de los alelos del locus C, seis fragmentos mostraron buena correlación con algunas especificidades HLA-C, (Tabla 8) y pudieron definirse patrones distintivos de fragmentos para cada especificidad (Tabla 7).

Se encontraron cuatro nuevos patrones de RFLP que parecen ser independientes de las especificidades HLA conocidas (Tabla 9). Uno de estos grupos muestra una débil asociación con Cw6 y otro con el resto de los alelos HLA-C; estos podrían ser alelos

"supertípicos" del locus C. Los otros dos grupos son nuevos y no correlacionan con ninguna especificidad de locus HLA-A, B, C o Clase III. Estos grupos podrían definir nuevos loci de clase I.

Ciertos fragmentos de clase I se presentaron agrupados con otros de clase III, reflejando la existencia de RFLP para haplotipos extendidos.

Figura 10: Distribución de los RFLPs entre las especificidades HLA-A. La altura de las barras representa el número de células con un mismo tipo serológico HLA-A.

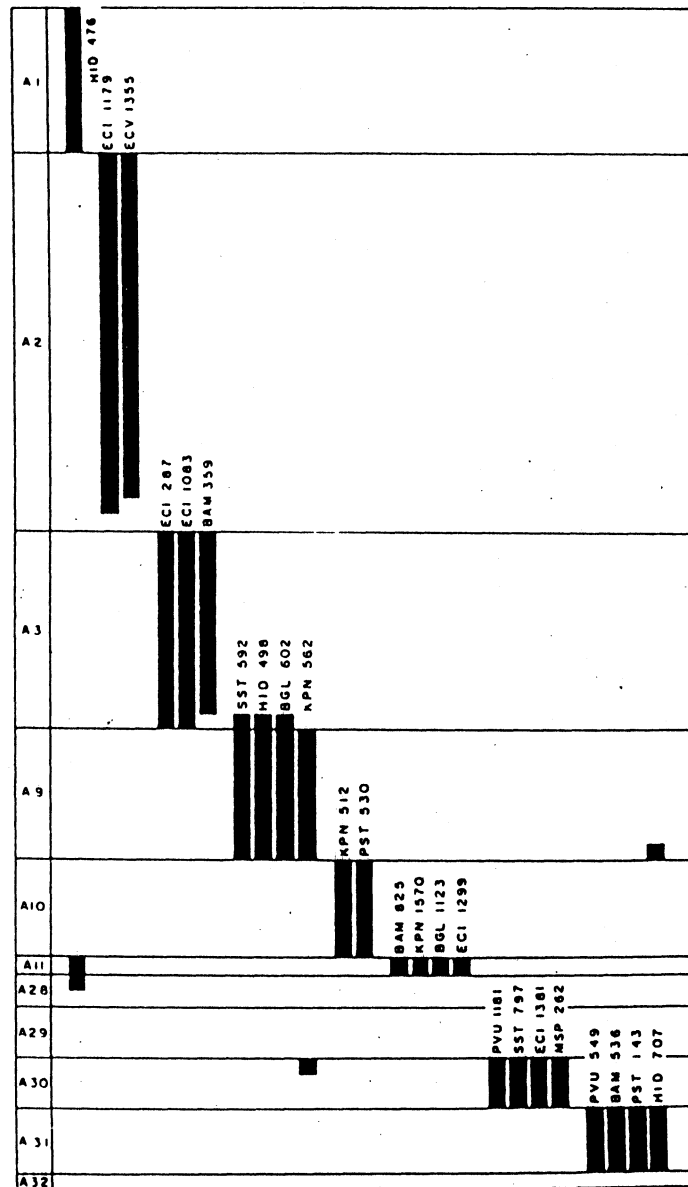


Figura 11: Representación esquemática de los fragmentos específicos para un cierto alelo o compartidos por alelos diferentes. Ejemplo de ellos son: 1: Sst 5,92, 2: PvuII 8,81, 3: BamHI 3,59, 4: BamHI 8,55, 5: BamHI 5,36, KpnI 18,71, 7: SstI 7,97.

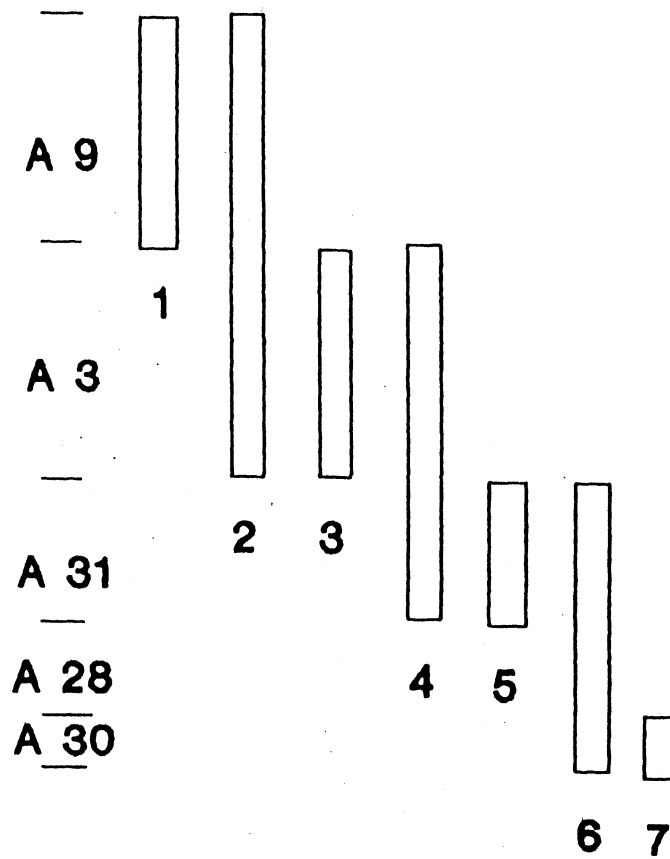


Figura 12: Algunos RFLPs con amplia distribución entre las especificidades HLA-A. Los mismos son compartidos por varios alelos pero están ausentes en otros. El ancho de las barras representa el número de fragmentos encontrados en el "cluster". Ejemplos de cada uno son 1: BamHI 10,08; 2: BglIII 13,39; 3: HindIII 5,35; 4: SstI 5,06; 5: PstI 4,05; 6: TaqI 2,72; 7: HindIII 6,72.

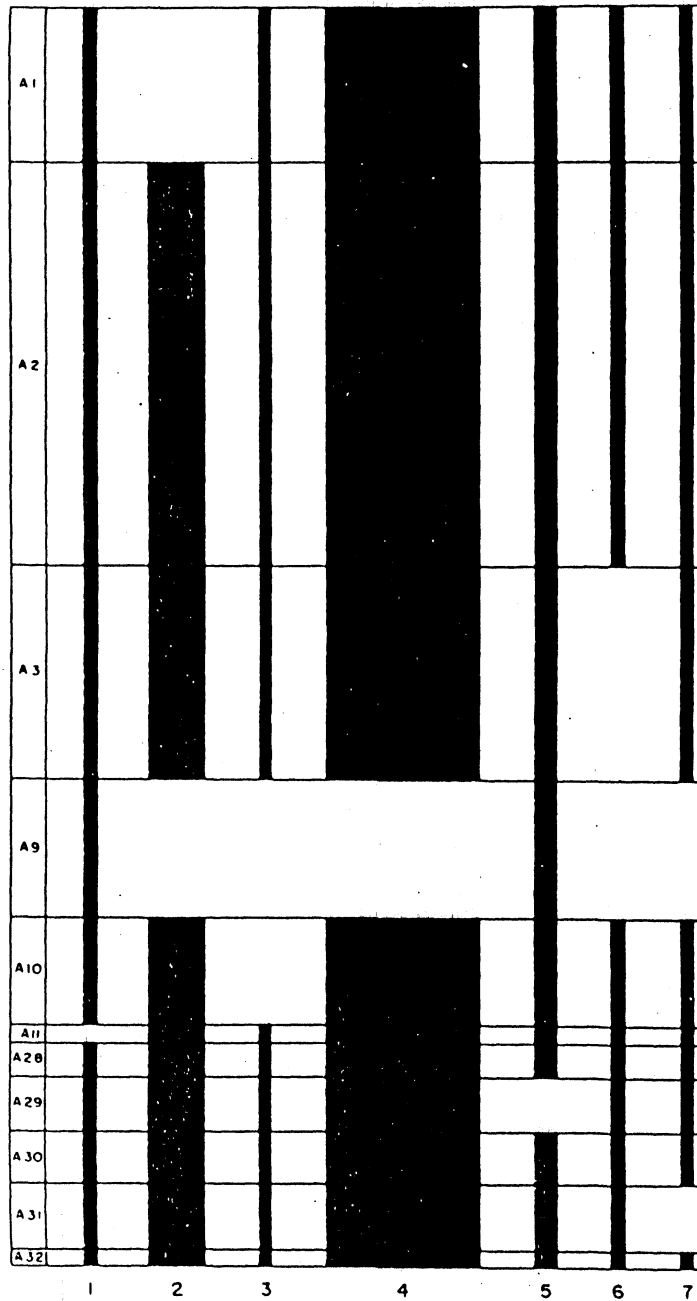


Tabla 8: Fragmentos específicos para alelos HLA-B o C. Selección de los mejores fragmentos encontrados asociados a los alelos HLA B y C. El fragmento SstI 1,62 está presente en las líneas celulares B38 y B14. Ya que todas las B14 son también Cw8, la especificidad asignada podría ser B38 + Cw8.

HLA B o C	Fragmento		N° positivas/ N° células	Extra
BB	BamHI	23,56	4/4	1/6 B51
	EcoRV	7,86	4/4	1/6 B7
B35	PvuII	2,69	5/6	---
B35 + B14	SstI	1,62	6/6	---
B40	KpnI	26,44	3/5	---
B60	HindIII	9,93	4/4	---
B51	SstI	2,78	3/6	---
Cw4	EcoRV	10,96	6/6	2/14 Cw7
	EcoRV	4,44	6/6	1/15 CwX
	PvuII	2,69	4/6	2/14 Cw7
				1/15 CwX
Cw5 + Cw8	EcoRI	7,96	10/10	---
Cw7	PstI	1,01	13/13	1/15 CwX
	BamHI	23,43	10/13	---

Tabla 9: Clusters de fragmentos de clase I que no correlacionaron con genes HLA de clase I ya definidos. Podría identificarse una contraparte alélica para tres de estos clusters. Los mismos pueden indicar nuevos genes de clase I.

HindIII 31,25 PstI 7,21 HindIII 18,91	HindIII 43,87 PstI 5,73 HindIII 24,48	KpnI 14,92 BglIII 6,74 MspI 5,19	KpnI 6,67 BglIII 5,37
TaqI 1,34 TaqI 0,31 TaqI 0,27		PvuII 6,05 HindIII 5,17	HindIII 5,46

Para la tipificación HLA convencional, el objetivo es la búsqueda de reactivos que resulten únicos para especificidades HLA individuales. La práctica de la serología evoluciona a través de la identificación de sueros que reaccionan con uno o un número limitado de especificidades serológicas. Del mismo modo algunos RFLPs pueden ser identificados como asociados a especificidades serológicas discretas. Otros fragmentos son generados por células que poseen una o más especificidades dentro de un grupo dado y son comparables en su utilidad a los sueros multiespecíficos. Con el tiempo se fueron identificando reactivos con especificidades que se acercan progresivamente a la monoreactividad. El acceso permanente a nueva información acerca de secuencias nucleotídicas de genes de clase I y el advenimiento de sondas y oligonucleótidos locus específicos harán posible la tipificación por DNA de los alelos HLA de clase I.

CONCLUSIONES GENERALES DEL XWIH

Desde un punto de vista práctico, la técnica de Southern resultó de gran utilidad en la tipificación de genes de clase II. Se identificaron para estos antígenos, numerosos fragmentos de restricción alelo-específicos. Para los antígenos de clase I los patrones de RFLP obtenidos no alcanzaron el poder discriminatorio de alelos y haplotipos que se hubiera pretendido. Esto se debió, fundamentalmente, a que para la tipificación por DNA de alelos HLA-de clase I se utilizó una sonda específica de clase y no sondas específicas de locus; además, pocos alelos estuvieron representados en varias líneas. Sin embargo, como en el caso de clase II, la combinación de fragmentos únicos con la presencia o ausencia de fragmentos ampliamente reactivos permitió distinguir diferentes haplotipos. En todos los casos, los datos obtenidos a partir del XWIH constituyen un marco de referencia para el estudio de los patrones de restricción asociados a distintos grupos étnicos, así como también en el estudio de enfermedades asociadas al sistema HLA.

La participación de nuestro laboratorio en este Taller permitió además, poner a punto esta metodología, tomar contacto estrecho con el sistema y adquirir un sólido entrenamiento en la interpretación y comprensión de este complejo patrón de RFLP para el sistema HLA.

Simultáneamente, se inició la caracterización genómica del alelo HLA-B35 a fin de investigar la eventual presencia de variantes preferentemente asociadas a patologías de etiología viral.

BUSQUEDA DE RFLPs ASOCIADOS AL ALELO HLA-B35

Los estudios del XIWH extendieron los hallazgos originales de correlación entre determinados RFLP y ciertas especificidades de clase I. Para encarar la búsqueda de variantes del B35 eventualmente asociadas a ciertas patologías, se tomaron en cuenta las observaciones preliminares de Cohen y col. (1983). Allí se describió la presencia de un fragmento EcoRV de 4.6 kb detectado con la sonda pHLA-2, en 9/9 individuos que habían sido tipificados serológicamente como HLA-B35; se habían analizado un total de 68 individuos portadores de distintos alelos HLA y este fragmento sólo se observó en los portadores del B35. Los estudios del XWIH confirmaron la presencia de este RFLP en 5/5 líneas HLA-B35. Se analizó entonces este RFLP sobre un amplio panel de individuos caucásicos argentinos.

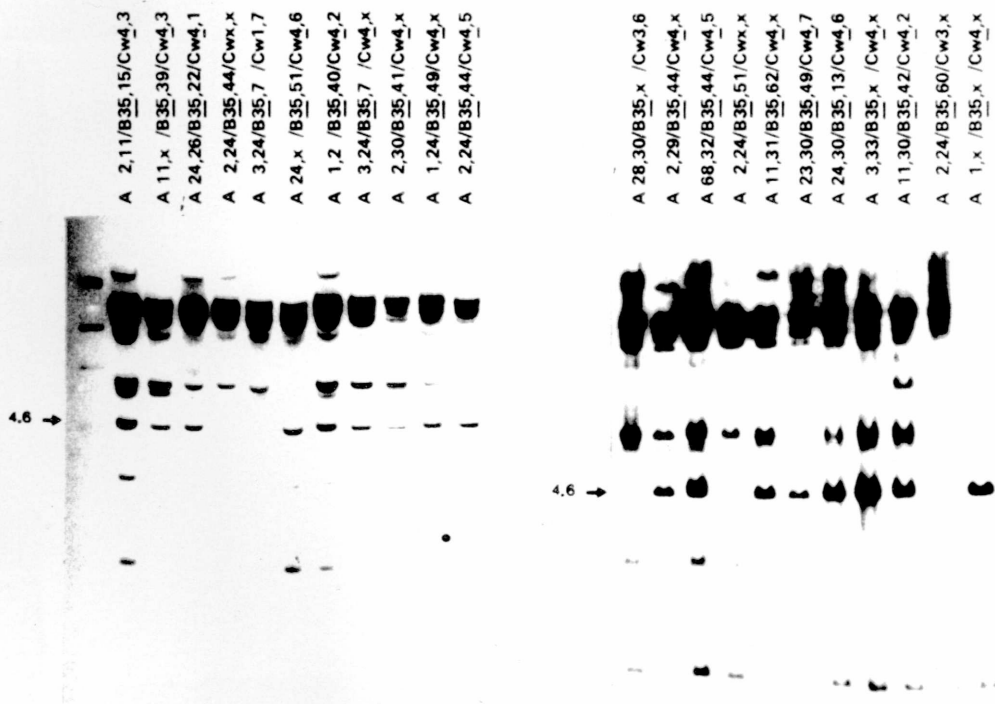
Panel de individuos tipificados: Se preparó el DNA de 69 individuos previamente caracterizados serológicamente para su fenotipo HLA de clase I. La tipificación serológica se realizó sobre células mononucleares de sangre periférica y estuvo a cargo de la Dra. A. Mota. Se seleccionaron para este estudio individuos caucásicos latinoamericanos (en su mayoría con background italiano, español o argentino) portadores del alelo B35, como así también portadores de otros alelos del locus B, abarcando un total de 21 especificidades diferentes para este locus (Tabla 10). Las especificidades de todos los individuos fueron confirmadas por el análisis serológico del IV Taller latinoamericano de Histocompatibilidad y del X Taller Internacional de Histocompatibilidad.

Se analizó en primer lugar el DNA de 31 individuos previamente tipificados como HLA-B35 (sanos y portadores de HCA) mediante la técnica de Southern. Las muestras se digirieron con la enzima EcoRV y se hibridizaron con la sonda pHLA-2. De las 31 muestras estudiadas, 24 presentaron, entre otras, una banda de

Tabla 10: Fenotipo HLA de los individuos analizados para la presencia (+) o ausencia (-) del fragmento EcoRV/4.6 kb.

I.D. #	HLA - A	HLA - B	HLA - Cw	4,6 kb band
1	2,11	15,35	3,4	+
2	11,x	39,35	3,4	+
3	3,28	7,35	4,x	+
4	2,30	41,35	4,x	+
5	1,24	49,35	4,x	+
6	28,x	35,x	4,x	+
7	11,24	18,35	4,7	+
8	24,26	22,35	4,1	+
9	24,x	51,35	4,6	+
10	1,2	40,35	2,4	+
11	2,3	13,35	4,8	+
12	11,31	62,35	4,x	+
13	2,28	35,x	4,x	+
14	2,29	44,35	4,x	+
15	68,32	44,35	4,5	+
16	23,30	49,35	4,7	+
17	24,30	13,35	4,6	+
18	3,33	35,x	4,x	+
19	11,30	42,35	4,2	+
20	2,24	44,35	4,5	+
21	3,31	51,35	4,x	+
22	2,24	39,35	4,7	+
23	1,2	35,x	3,4	+
24	1,x	35,x	4,x	+
25	2,24	44,35	x,x	-
26	3,24	7,35	1,7	-
27	28,30	35,x	3,6	-
28	2,24	49,35	7,x	-
29	2,24	60,35	3,x	-
30	1,2	45,35	x,x	-
31	1,2	8,35	3,x	-
32	11,23	51,44	4,x	-
33	2,x	44,x	4,x	-
34	1,30	8,13	4,6	-
35	26,31	27,44	4,x	-
36	2,30	60,x	4,3	-
37	11,23	51,44	4,x	-
38	28,x	53,44	4,x	+
39	1,28	53,49	4,7	+
40	26,x	53,38	4,x	+
41	2,x	53,51	x,x	+
42	2,x	44,52	x,x	+
43	1,24	8,52	x,x	+
44	2,29	44,52	x,x	+
45	23,36	41,52	x,x	+
46	11,29	52,x	7,x	+
47 (32)	11,23	51,44	4,x	-
48 (37)	11,23	51,44	4,x	-
49	2,31	51,39	1,7	-
50	2,3	51,39	7,x	-
51	3,11	51,44	x,x	-
52	2,24	51,35	x,x	-
53	24,30	44,18	2,x	-
54	29,30	44,18	x,x	-
55	2,x	41,18	7,x	-
56	2,32	44,18	5,7	-
57	2,28	39,18	7,x	-
58	2,29	44,8	7,x	-
59	30,x	13,64	x,x	-
60	26,x	38,x	x,x	-
61	3,25	38,x	8,x	-
62	1,24	8,62	3,7	-
63	1,2	8,44	5,7	-
64	29,32	37,64	8,x	-
65	2,3	8,41	7,x	-
66	1,26	8,39	7,x	-
67	1,28	22,45	x,x	-
68	26,32	38,63	7,x	-
69	3,24	7,62	3,x	-

Figura 13: Se analizó el DNA de 22 individuos previamente tipificados como HLA-B35, con la enzima EcoRV y con la sonda pHLA-2. Se muestran los resultados de dos geles independientes. Se indica el fenotipo HLA de los individuos estudiados. En el margen izquierdo de cada panel se hallan marcadores de tamaño molecular de lambda/HindIII. La flecha señala la posición del fragmento polimórfico de 4.6 kb.



4.6 kb similar a la descrita por Cohen y col. (1983) (Fig. 13 y Tabla 10). Los 7 individuos que carecían de esta banda, fueron serológicamente indistinguibles de los otros 24 en lo referente a la tipificación del antígeno HLA-B35. Sin embargo, los 24 individuos positivos poseían en común el fenotipo HLA-B35,Cw4, mientras que los 7 individuos que carecían de dicho fragmento, si bien portaban el alelo HLA-B35, mostraban en el locus C, alelos diferentes al Cw4 (denominaremos aquí a este último fenotipo como "B35+,Cw4-"). En la población caucásica, el alelo HLA-B35 se presenta en fuerte desequilibrio de ligamiento con el alelo HLA-Cw4: el 70% de los individuos HLA-B35 presentan en el locus C al alelo Cw4 (MP Baur, 1984). Por lo tanto la banda EcoRV 4,6 kb segrega, aparentemente, con el haplotipo extendido B35,Cw4. Esto fue investigado formalmente.

La banda EcoRV/4,6 kb segrega con el haplotipo HLA-B35,Cw4

Con el objeto de estudiar si la banda EcoRV/4.6 kb segrega con el haplotipo extendido HLA-B35,Cw4, se realizó el análisis de la familia CAR. Esta familia presenta la siguiente constitución de haplotipos HLA:

MADRE:	a	A24,B35,Cw4	PADRE:	c	A1,B8,Cw7
	b	A2,B39,Cw7		d	A24,B62,Cw3
HIJO 1:	a	A24,B35,Cw4	HIJO 2:	c	A1,B8,Cw7
	d	A24,B62,Cw3		b	A2,B39,Cw7

El haplotipo B35,Cw4 está presente en uno de los padres y uno de los hijos. En la Fig. 14 se observa que este fragmento, presente en el haplotipo A24,B35,Cw4 de la madre, también está presente en el hijo 1, que comparte el mismo haplotipo. Por lo

tanto, el RFLP EcoRV/4.6 kb descrito aquí distingue los haplotipos HLA-B35+,Cw4+ y HLA-B35+,Cw4-.

Figura 14: El fragmento EcoRV/4.6 kb segrega con el haplotipo B35+,Cw4 en la familia CAR. F = padre (A1,B8,Cw7/A24,B62,Cw3). M = madre (A2,B39,Cw7/A24,B35+,Cw4). C1 = hijo 1 (A24,B62,-Cw3/A24,B35+,Cw4). C2 = hijo 2 (A1,B8,Cw7/A2,B39,Cw7). Como sonda se usó pHLA-2.

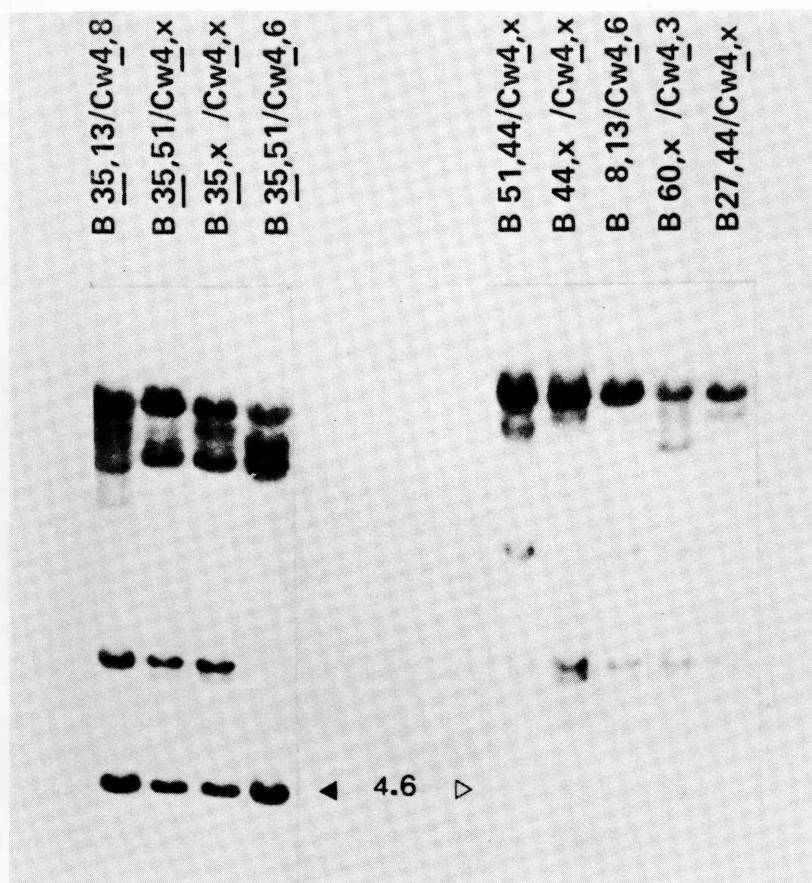


La banda EcoRV/4.6 kb probablemente contiene al gen B35

De acuerdo a los resultados recién descritos, la banda EcoRV/4.6 kb podría correlacionar con el gen Cw4 (o a secuencias fuertemente ligadas a él), ya que está ausente en los individuos B35+,Cw4-; o alternativamente podría tratarse de un fragmento polimórfico que contiene al gen B35 (o a secuencias fuertemente ligadas a él). Con el fin de discernir entre estas posibilidades, se realizaron los siguientes experimentos.

Se analizó el DNA de 6 individuos tipificados como HLA-Cw4 pero portadores de otros alelos del locus HLA-B distintos al HLA-B35 ("B35-,Cw4+"): como se observa en la Fig. 15, ninguno de estos individuos presentó el fragmento EcoRV/4.6 kb.

Figura 15: El fragmento EcoRV/4.6 kb está ausente en individuos HLA-Cw4+ con alelos distintos al B35. Como controles se muestran en el panel izquierdo cinco individuos HLA-B35+,Cw4+. Como sonda se usó pHLA-2.



Este resultado tiene dos interpretaciones:

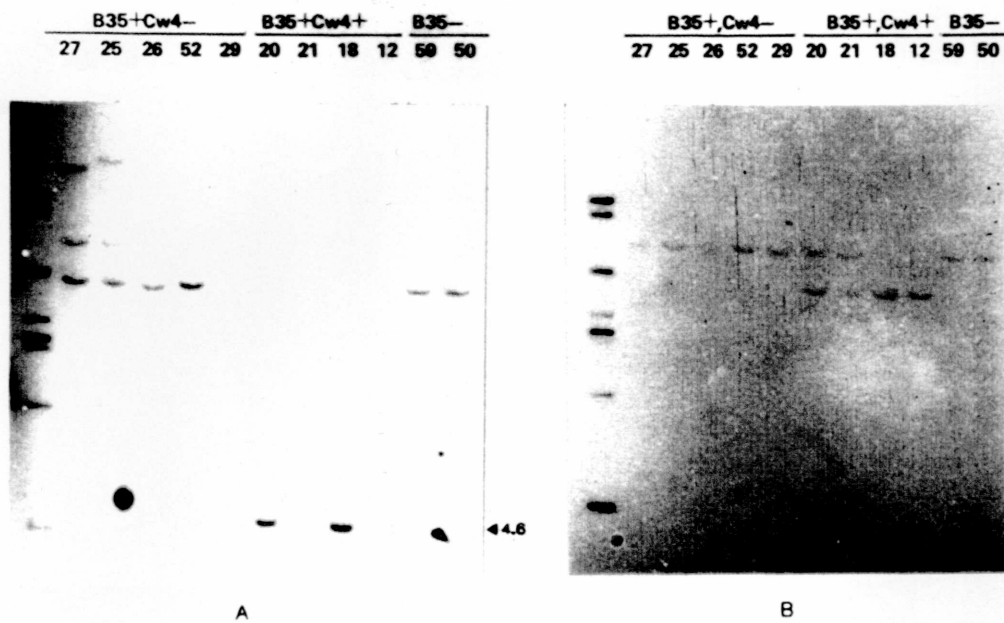
- a) que este fragmento no posee secuencias del gen Cw4
- b) que el fragmento representa una variante polimórfica del gen HLA-Cw4 que distingue individuos B35+,Cw4+ e individuos B35,Cw4+.

Koller y col. (1984) y Strachan y col. (1986), describieron la presencia de secuencias de DNA específicas de cada locus de clase I, en las regiones correspondientes al exón 7, intrón 7 y región 3' no traducida. Bajo condiciones de hibridización y lavado severas, las sondas derivadas de dichas regiones sólo hibridizan a los genes específicos de cada locus. Procedimos entonces al uso de dichas sondas con el propósito de responder los interrogantes planteados anteriormente. Se digirió el DNA de cuatro muestras HLA-B35+,Cw4+ y cinco muestras B35+,Cw4-, con la enzima EcoRV y se las analizó con la sonda específica para el locus B (pB3UT). Como se observa en la Fig. 16A, los individuos B35+,Cw4+ exhiben una intensa señal de un fragmento de 4.6 kb, mientras que las muestras B35+,Cw4- poseen en cambio una banda de 11.5 kb. Por otro lado, cuando la misma membrana fue rehibridizada con la sonda específica para el locus C (pC250), no se observó hibridización al fragmento de 4.6 kb. (Fig. 16B). Estos resultados constituyen una evidencia directa en favor de la interpretación que la banda EcoRV/4.6 kb contiene secuencias correspondientes al gen B35.

En otros experimentos se utilizó una sonda de 100 bp derivadas del exón 2 del gen HLA-B7, (dominio $\alpha 1$, ver Fig. 5) (gentilmente cedida por el Dr. O.Burrone). Esta sonda también detectó el fragmento de 4.6 kb (resultados no mostrados). Si se tiene en cuenta que un gen de clase I posee alrededor de 4 kb (Malissen, 1982) y que la sonda específica de locus B deriva de la región 3' no traducida, es probable entonces que la banda EcoRV de 4.6 kb contenga a un gen B35 completo.

La mayoría de las muestras analizadas con la sonda específica para el locus HLA-C (Fig. 16B) mostró una banda de 15 kb. La sonda específica para el locus HLA-B detectó también un fragmento

Figura 16: El fragmento EcoRV/4.6 kb contiene secuencias del gen B35. (A) Se digirió el DNA de individuos HLA-B35+,Cw4+ y HLA-B35, Cw4- con la enzima EcoRV y se los analizó con la sonda específica para genes del locus HLA-B. Se obtuvo hibridización a una banda de 4.6 kb sólo en los individuos B35+,Cw4+, mientras que las muestras B35+,Cw4- poseen una de 11.5 kb. (B) La misma membrana usada en (A) fue rehibridizada con una sonda específica para los genes del locus HLA-C: no se obtuvo señal en la banda de 4.6 kb. Los números indicados arriba de cada carril corresponde a los individuos listados en la Tabla 1. En el margen izquierdo de cada panel se muestran marcadores de tamaño molecular generados por las digestiones lambda/SmaI + lambda/HindIII.



de igual tamaño, si bien con una señal muy débil (Fig. 16A). Se trata, probablemente, de una hibridización cruzada entre secuencias de loci HLA-B y HLA-C. La presencia de este tipo de reacción cruzada ya había sido señalada por Strachan y col (1986), quienes encontraron que los fragmentos de DNA derivados del exón 7 y del intrón 7 se comportaban como genuinas sondas específicas de locus (tal el caso de pC250), mientras que secuencias provenientes de la región 3' no traducida (como la pB3UT aquí utilizada para el locus HLA-B) manifiestan una significativa reactividad cruzada. Como también se observa en la Fig. 16B, luego de la hibridización con la sonda específica de locus C, solamente los individuos B35+,Cw4+ presentaron una banda de 11.5 kb. Esto podría representar un RFLP para el alelo Cw4, si bien esta posibilidad debería ser examinada en profundidad con estudios adicionales. Nótese que las muestras 18 y 12 en dicha Figura, exhibieron este único fragmento de 11.5 kb. Esto podría ser explicado en el caso del individuo número 18, tipificado como HLA-A3,33/B35,x-/Cw4,x, por ser homocigota para los loci HLA-B y C, como fue determinado por análisis serológico de su familia (padre: HLA-A3,X/B35,18/Cw4,5; madre: HLA-A3,33/B35,X/Cw4,X). La homocigosis del locus B en este individuo se advierte también en la Figura 16A, donde se observa el fragmento de 4.6 kb con una señal de gran intensidad. Por otro lado, el individuo número 12 fue tipificado como HLA-Cw4,x; en consecuencia, podría ser homocigota para este locus o portador de una especificidad "blanco" con una banda polimórfica de 11.5 kb.

Localización del sitio EcoRV polimórfico (en la región 3' del gen)

Como ya hemos visto, los individuos HLA-B35+,Cw4- contienen al gen HLAB-35 en un fragmento genómico de 11.5 kb en lugar del de 4.6 kb. Esto significa que carecen de uno de los dos sitios

EcoRV presentes en el haplotipo HLA-B35+,Cw4+, el localizado en el extremo 5' o el presente en el extremo 3' del gen. La estrategia seguida para determinar la posición del sitio EcoRV polimórfico consistió en la digestión simultánea de las muestras con dos enzimas de restricción. Para ello resultó necesario, en primer lugar, determinar la posición de los sitios reconocidos por otras endonucleasas en los genes HLA de clase I. Según datos de la literatura (Jordan,1985; Szots,1986) la mayoría de los genes HLA de clase I poseen un sitio de restricción conservado para la enzima KpnI en el exón 3 (dominio α_2). Además, los genes del locus HLA-B, están flanqueados por sitios EcoRI conservados, separados entre sí por aproximadamente 6.6 kb (Ways,1985; observaciones personales de nuestro laboratorio).

En primer lugar, hemos confirmado la presencia de estos sitios conservados en el DNA de individuos B35+,Cw4+ y B35+,Cw4-, mediante la digestión simple con EcoRI (datos no mostrados), y la digestión doble EcoRI + KpnI: ambos haplotipos exhiben una intensa banda de 5.5 kb luego de la hibridización con la sonda específica del locus HLA-B (Fig. 17; ver también en la Fig. 19 la posición de los sitios EcoRI y KpnI).

Para el análisis siguiente, se tuvo en cuenta que el sitio KpnI conservado está localizado en el exón 3, esto es, entre ambos sitios EcoRV presentes en el haplotipo B35+,Cw4+. Nótese en la Fig. 19, que al realizar una doble digestión EcoRV + KpnI se puede predecir el tamaño del fragmento que se genera en el haplotipo B35+,Cw4+: este será de aproximadamente 3.5 kb luego de hibridizar con la sonda específica de locus B (téngase en cuenta que esta sonda se une a secuencias de la región 3' del gen). Además, la doble digestión permitirá determinar la posición del sitio EcoRV ausente en el haplotipo HLA-B35+,Cw4-: se generará un fragmento de 3.5 kb si el sitio EcoRV ausente es el localizado en el extremo 5'; si el sitio EcoRV ausente es el ubicado en el extremo 3' del gen, el fragmento será de un tamaño distinto a 3.5 kb. Como se observa en la Fig. 18, la doble digestión EcoRV +

Figura 17: Se realizó una doble digestión EcoRI + KpnI de muestras B35+,Cw4+ y B35+,Cw4- y se las analizó con la sonda locus B específica. Se observa la presencia de un fragmento conservado de 5.5 kb en todas las muestras. Los números indicados arriba de cada carril corresponden a los individuos listados en la Tabla 1.

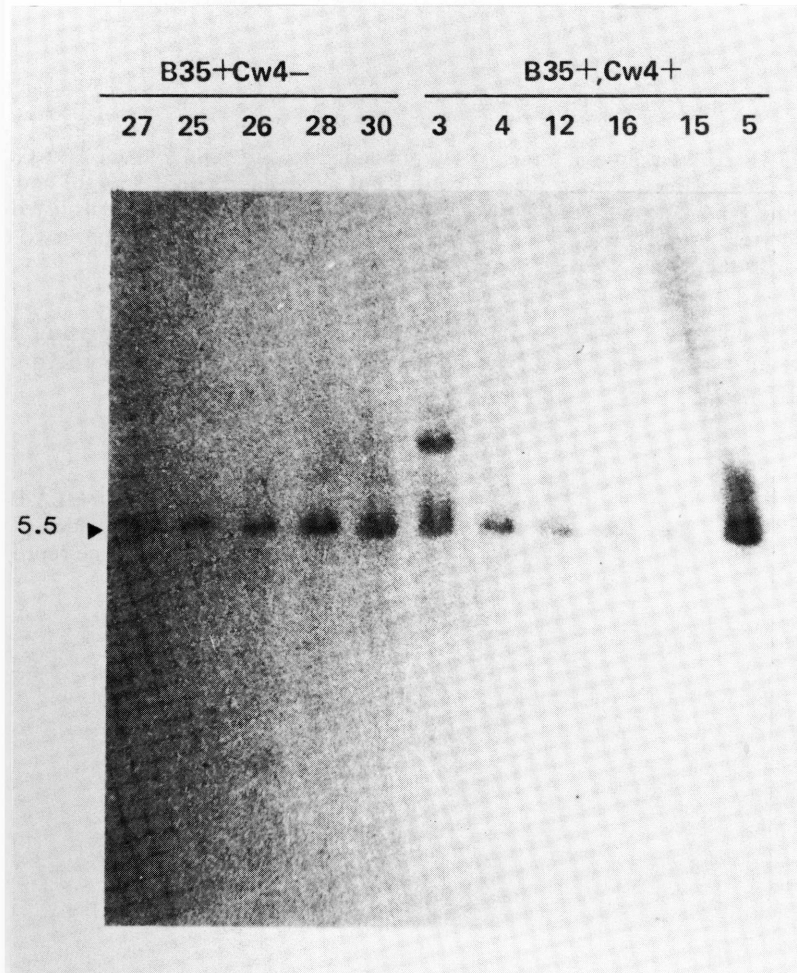
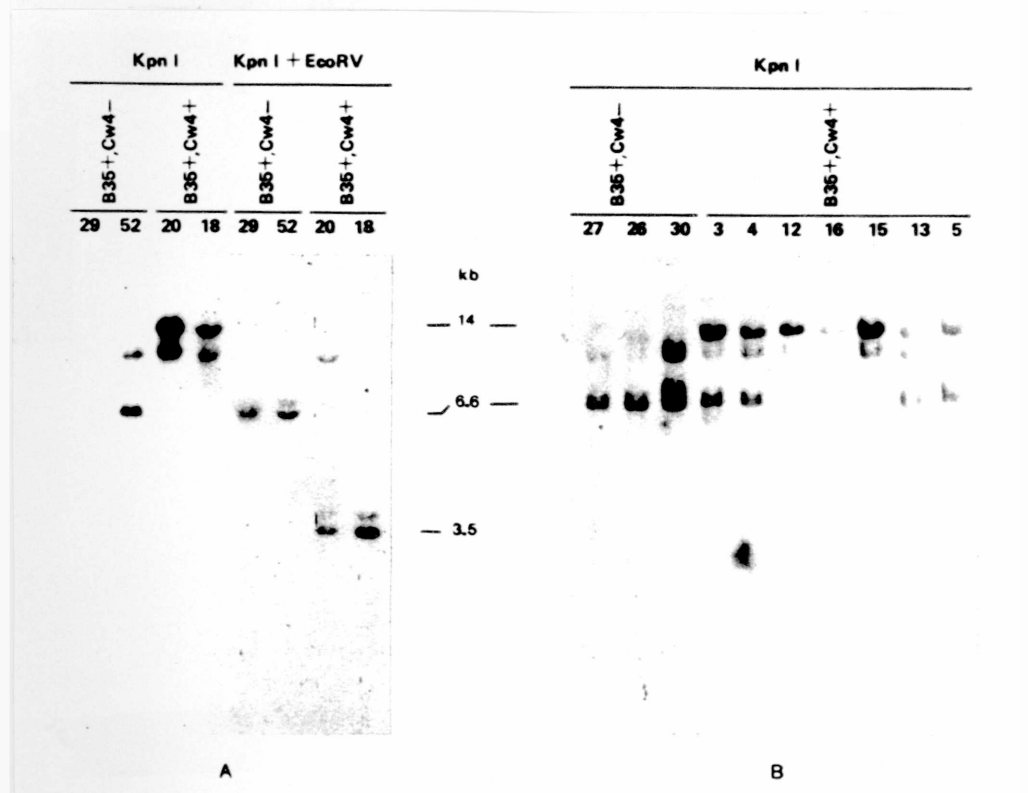


Figura 18: Localización del sitio EcoRV polimórfico. Se digirió el DNA de individuos B35+,Cw4+ y B35+,Cw4- con KpnI solamente o con KpnI + EcoRV, y se los analizó con la sonda locus B específica. Los números indicados corresponden a los individuos listados en la Tabla 1. (Ver más detalles en el texto).



KpnI de las muestras B35+,Cw4+ generó en efecto una banda de 3.5 kb, mientras que las muestras B35+,Cw4- generaron una banda de 6.6 kb, tanto con la digestión doble como con la digestión simple con KpnI (Fig. 18). Los resultados sugieren entonces, que el sitio polimórfico está localizado en el extremo 3' del gen B35 (ver Fig. 19).

Si se tiene en cuenta que los individuos B35+,Cw4- poseen al gen B35 en un fragmento EcoRV de 11.5 kb, el próximo sitio EcoRV en este haplotipo está ubicado aproximadamente a unas 7 kb hacia 3' del sitio EcoRV polimórfico (Fig. 19).

Por otro lado, al comparar los fragmentos de restricción generados por las muestras B35+,Cw4+ y B35+,Cw4-, luego de la digestión simple con KpnI, los resultados muestran dos patrones distintos para ambos haplotipos: se observó la presencia de una intensa banda de 14 kb en 9/9 muestras B35+,Cw4+, presente en sólo una de las cinco muestras B35+,Cw4- (Fig. 19). Por lo tanto, KpnI también exhibe polimorfismo en estos dos haplotipos. Si se tiene en cuenta que ambos haplotipos poseen conservado el sitio KpnI en el exón 3 (Fig. 17), se concluye que el sitio KpnI polimórfico está ubicado en la región 3' que flanquea al gen B35 (Fig. 19). Por lo tanto, ambos haplotipos se distinguen por la presencia de dos sitios de restricción polimórficos ubicados en la región 3' al gen B35.

El fragmento EcoRV/4.6 kb también está asociado a otros alelos del locus HLA-B

Se investigó la presencia de esta banda en otras 38 muestras de DNA provenientes de individuos portadores de un total de 21 alelos diferentes del locus HLA-B (Tabla 10). Este RFLP está presente en portadores de otros dos alelos del locus B: en individuos portadores del alelo HLA-B52 (5/5 muestras estudiadas) y del alelo HLA-B53 (4/4 muestras). El HLA-B52 y HLA-B53 son miembros

del llamado grupo serológico "4c" de reactividad antigénica cruzada (portadores de epitopes comunes entre sí) que también incluye al HLA-B18, HLA-B51 y HLA-B35 (Bodmer, 1966; Rubinstein, 1984). No se halló este fragmento EcoRV/4.6 kb en ninguna de las cinco muestras B18 y en ninguna de las 6 muestras B51 estudiadas (Tabla 10). Mediante el análisis serológico el alelo HLA-B53 es muy similar al B35 y también exhibe un desequilibrio de ligamiento con el alelo Cw4 (Baur, 1984). Por lo tanto, no es sorprendente la presencia del fragmento EcoRV/4.6 en los individuos HLA-B53. Es interesante destacar que ninguna de las muestras HLA-B52 poseía el alelo Cw4 y sin embargo todas presentaron dicho fragmento.

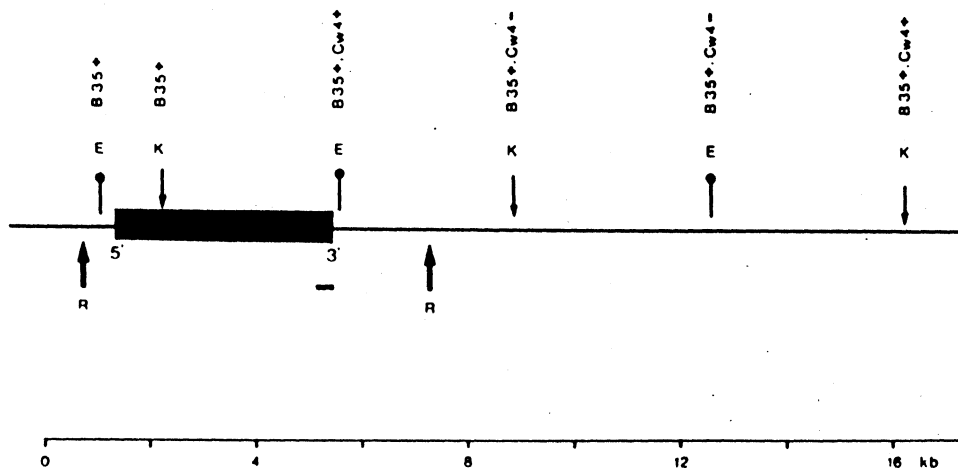
El fragmento EcoRV/4,6 está ausente en portadores de otros 21 alelos del locus HLA-B. Por otro lado, su presencia no correlaciona con ninguno de los 16 alelos diferentes del locus HLA-A presentes en los individuos aquí estudiados.

Naturaleza de este polimorfismo de restricción

La Fig. 19 resume la posición de los sitios de restricción presentes en el genoma, en el gen HLA-B35 y en las regiones que lo flanquean. Aún cuando no se han estudiado otros sitios de restricción en la región 5' a este gen, es interesante el hallazgo de dos sitios polimórficos en la región flanqueante 3' al mismo. Los polimorfismos permiten distinguir molecularmente a dos alelos del gen HLA-B35 serológicamente idénticos, uno de ellos ligado al alelo HLA-Cw4 y el otro asociado a otros alelos del locus HLA-C. El sitio de restricción EcoRV que genera el fragmento de 4.6 kb está presente en individuos HLA-B35+,Cw4+, así como también en individuos B53 y B52, mientras que está ausente en otros 21 alelos del locus HLA-B. Estos resultados sugieren que este sitio de restricción ha evolucionado junto a las secuencias

exónicas, ya que B52, B53 y B35 pertenecen a un mismo grupo antigénico de reactividad cruzada.

Figura 19: Resumen de los sitios de restricción localizados dentro del gen B35 y las regiones que lo flanquean. R = EcoRI, K = KpnI, E =EcoRV. También se muestran los haplotipos portadores de los sitios de restricción encontrados en este trabajo. La pequeña barra bajo la región 3' del gen representa la sonda locus B específica. El gen no está esquematizado en exones e intrones a fin de simplificar el diagrama.



Los sitios de restricción distintos presentes en el haplotipo B35+,Cw4-, pudieron haber surgido por eventos del tipo de conversión génica (como los que parecen contribuir a la evolución de estos genes) o por mutaciones puntuales. Por otro lado, recientemente se ha podido localizar con precisión al gen HLA-C, en posi-

ción 3' relativo al gen del locus HLA-B, a una distancia de 80-100 kb (Dunham, 1987). La presencia de sitios de restricción diferentes en el flanco 3' del gen B35 asociado a alelos distintos del Cw4, también podría sugerir que los eventos de crossing over que generaron los haplotipos HLA-B35+,Cw4- han afectado las secuencias del sitio de reconocimiento EcoRV y aquellas hacia 3' del mismo.

El RFLP EcoRV/4,6 kb no constituye un marcador de pacientes portadores de HCA

Como ya se mencionó anteriormente, nuestro laboratorio describió la asociación entre hepatitis crónica activa por HBV y el alelo HLA-B35: el 45% de los afectados eran portadores HLA-B35, comparado con un 16.5% de presencia de este alelo en un panel de población normal. Esta observación confirmó el resultado preliminar comunicado en 1977 por Mazzilli y col. en población mediterránea y reafirmó, además, la naturaleza étnica de esta asociación, ya que esta asociación no fue hallada en población de pacientes holandeses (Van Hattum, 1987).

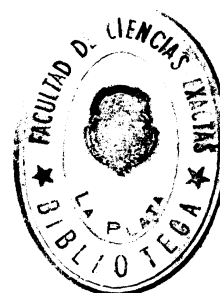
Se planteó el análisis del polimorfismo antes descrito en pacientes portadores de esta patología de etiología viral, a fin de establecer una eventual correlación con el mismo.

Se compararon un total de 17 individuos sanos y 14 portadores de HCA, todos ellos HLA-B35. Los haplotipos hallados fueron los siguientes:

	B35,Cw4+	B35,Cw4-	TOTAL
Sanos	13	4	17
HCA	11	3	14
TOTAL	24	7	31

Por lo tanto, la presencia de este fragmento polimórfico asociado a distintos alelos del locus C no correlaciona con esta patología.

Es importante recordar que este alelo muestra una gran heterogeneidad. Esta se manifiesta no sólo por su complejo patrón serológico sino por todas las variantes del mismo halladas por medio de distintas metodologías como así también por la naturaleza étnica de sus asociaciones a patologías. Esto conduce a búsqueda de una caracterización más fina de posibles variantes latinas o latinoamericanas para un posterior análisis de frecuencias en población normal y portadora de patologías asociadas. Con este fin nos abocamos al aislamiento y caracterización de un gen B35 de un individuo B35 de origen hispano.



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UN CLON GENOMICO QUE CODIFICA PARA HLA-B35.

Con el fin de estudiar la complejidad alélica de la especificidad HLA-B35 en distintos grupos étnicos, se decidió aislar este gen a partir de un individuo caucasoide latinoamericano con ancestros hispanos y determinar su secuencia nucleotídica. Para la construcción de la biblioteca genómica, se seleccionó un individuo, denominado D.L., homocigota para los alelos HLA-B35 y Cw4, según se determinó de la tipificación serológica del mismo y sus padres:

PADRE: A3,X/B35,B44/Cw4,Cw5

MADRE: A3,A33/B35,X/Cw4,X

HIJA: A3,A33/B35,X/Cw4,X

Los estudios previos de RFLP en este individuo aportaron evidencia adicional acerca de su homocigosis a nivel del locus HLA-B (muestra 18 en Fig. 16 A y B), reflejado como una intensa banda EcoRV/4,6 kb.

CONSTRUCCION DE UNA BIBLIOTECA GENOMICA PARCIAL A PARTIR DE DL

Como se demostró en el capítulo precedente, la mayoría de los alelos del locus B están contenidos en un fragmento EcoRI de 6,6 kb (los sitios EcoRI se encuentran en regiones 5' y 3' flanqueantes al gen, Fig. 17 y 19). Estos datos facilitan la estrategia de aislamiento de los genes que pertenecen a este locus, pues permiten realizarlo a partir de genotecas parciales construidas

sobre digestos completos de DNA genómico. En el caso particular del gen B35, a partir de los hallazgos de RFLP descritos en el capítulo anterior, se contó con un marcador adicional que permitía confirmar que el gen que se estaba clonando se trataba de un B35.

Se procedió entonces a la construcción de una genoteca restringida a fragmentos genómicos EcoRI de 5 a 9 kb de longitud, usando como vector de clonado al fago lambda gtWES. Para ello se utilizó la siguiente estrategia (Parham, 1989a): se preparó DNA genómico a partir de leucocitos de sangre periférica de DL. Se realizó una digestión completa de 200 ug del mismo con la enzima EcoRI. El DNA digerido se fraccionó a través de un gradiente de sacarosa 10-40%. Alícuotas de las fracciones así obtenidas se analizaron por electroforesis en geles de 0,6% agarosa (Fig. 20). Se seleccionaron aquellas que contenían los fragmentos de DNA de 5-9 kb (muestras 3, 6 y 7 en la Fig. 20). Estas muestras fueron reunidas en un solo tubo, se purificó el DNA de las mismas, el que se utilizó para ligar a los brazos EcoRI del fago vector y empaquetar in vitro, como se describe en M & M. La genoteca se tituló en bacterias E.coli Y1090, obteniéndose un total de 1.5×10^8 fagos recombinantes independientes.

RASTREO DE LA GENOTECA

Se analizaron 9×10^4 placas de lisis mediante la sonda pHLA-2. El rastreo de los clones se realizó por medio de la técnica de hibridización in situ sobre membranas de nitrocelulosa, por duplicado. Se obtuvieron 13 clones positivos, 6 de los cuales mostraron una muy intensa señal de hibridización (ver Fig. 21A). Cada uno de los mismos fue aislado mediante cuatro pasos de purificación hasta que el 100% de las placas de lisis mostraron hibridización positiva (Fig. 21B). Estas diferencias en la intensidad de las señales de hibridización se mantuvieron a lo largo de las

Figura 20: Electroforesis en gel de agarosa 0.6% de fracciones de 0.5 ml obtenidas de dos gradientes de sacarosa 10-40%. Carriles 1 a 4: muestras provenientes de 4 fracciones consecutivas del gradiente A. Carriles 5 a 10: muestras provenientes de 5 fracciones consecutivas del gradiente B. Marcadores: DNA de lambda digerido con HindIII + DNA de lambda digerido con SmaI.

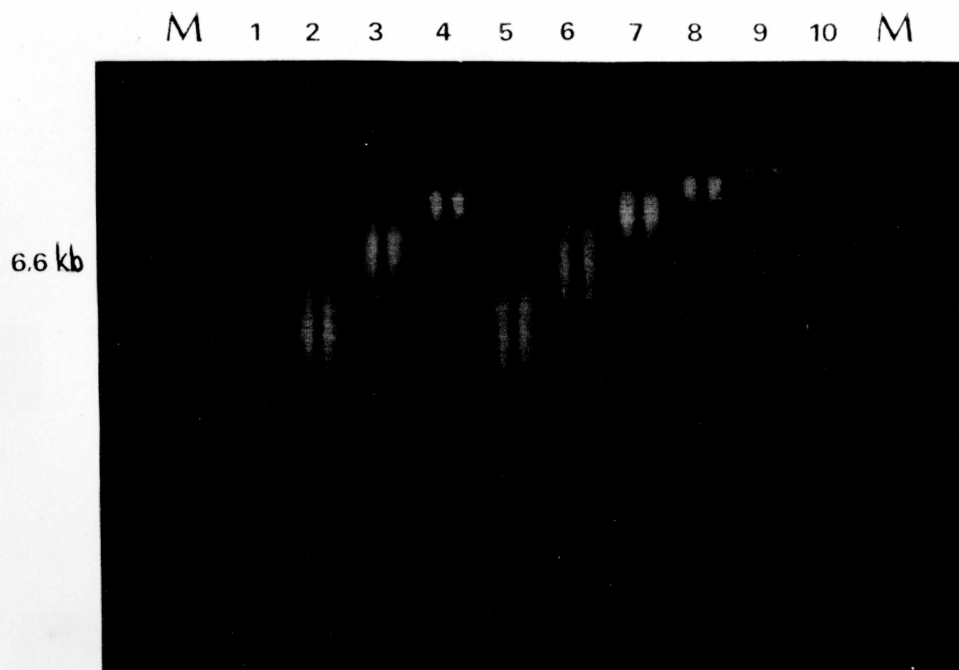
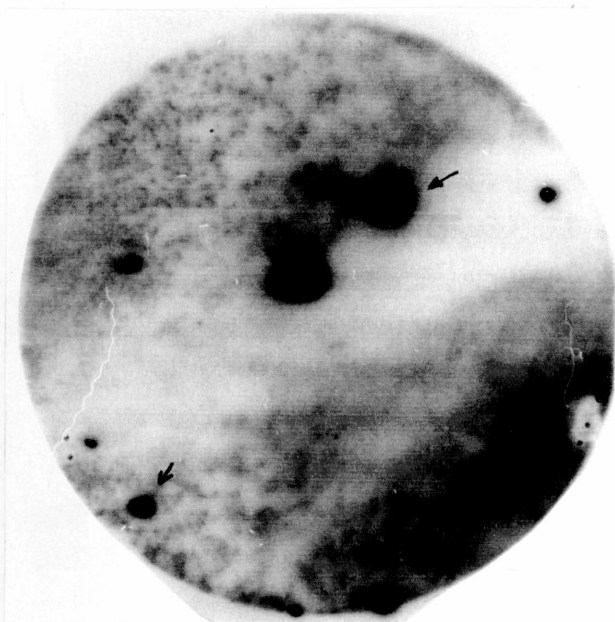
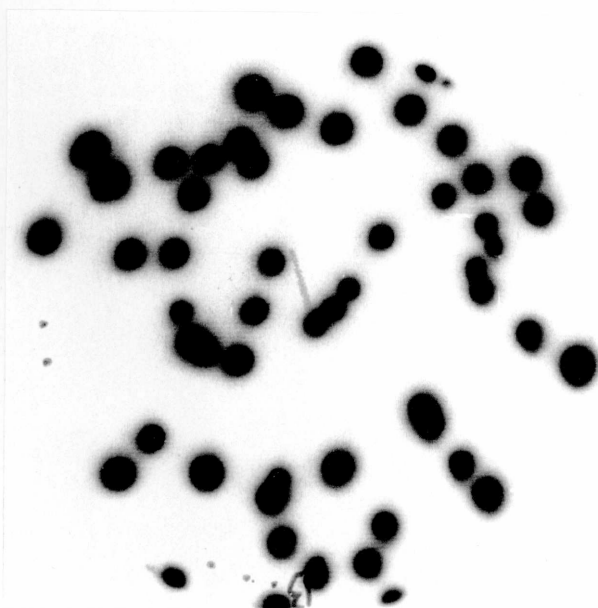


Figura 21: (A) Autoradiografía de un filtro conteniendo aproximadamente 20000 placas de lisis luego de la hibridización con la sonda pHLA-2 (primer screening). Las flechas señalan las placas con diferente intensidad de señal. (B) Autoradiografía de un filtro conteniendo aproximadamente 50 placas de lisis luego de cuatro etapas de purificación de un clón positivo.

A



B



purificaciones.

CARACTERIZACION DE LOS CLONES POSITIVOS

Se preparó DNA a partir del crecimiento en *E. coli* cepa LE392, de cada uno de los fagos recombinantes. Para su caracterización, se digirieron alícuotas de los mismos con EcoRI y EcoRV separadamente. EL objetivo de la digestión con EcoRI fue la identificación del tamaño del inserto. La digestión con EcoRV se realizó para identificar a los eventuales clones portadores de un fragmento de 4.6kb. Los fragmentos se resolvieron en geles 0,8% agarosa (Fig. 22A y 23A) y se transfirieron a membranas de Nylon. Las mismas se hibridizaron sucesivamente con las sondas pHLA-2 (Fig. 22B y 23B), pB3UT (específica para genes del locus HLA-B, Figs. 22C y 23C), pA3UT (específica para genes del locus HLA-A, Figs. 22D y 23D) y pC250 (específica para genes del locus HLA-C). Los 13 clones presentaron insertos positivos para la sonda pHLA-2, 6 de los cuales exhibieron una señal muy intensa en un fragmento EcoRI de 6.6kb (Fig. 22, carriles 4,5,9,12,14 y 16). Se trataba de los mismos clones que mostraron este tipo de señal durante el rastreo de la genoteca. Cabe mencionar que la sonda pHLA-2 proviene de un gen de locus B por lo que podría esperarse una mayor afinidad por genes de este locus. Estos mismos 6 clones presentaron señal específica con la sonda pB3UT en la misma banda EcoRI y en una banda EcoRV de 4.6kb (Fig. 22C y 23C).

Sólo uno de los clones mostró una hibridización preferencial con la sonda pA3UT (Figs. 22D y 23D, carril 13) identificando un fragmento EcoRV de 8.5 kb. Los 6 clones restantes generaron fragmentos EcoRV de 1 + 1,7 kb (2 clones), 3kb (1 clon) y 9kb (un clon) que hibidizaron con secuencias HLA de clase I. Ninguno de ellos mostró señal positiva con la sonda pC250.

En el capítulo anterior se había demostrado que el gen que codifica para el antígeno HLA-B35 en individuos portadores del haplotipo extendido HLA-B35, Cw4 (incluido el individuo DL, muestra 18) está contenido dentro de un fragmento genómico EcoRV de

Figura 22 : (A) Productos de la digestión de 16 clones, con EcoRI, resueltos en gel de agarosa al 0,8%. Las dos bandas de mayor tamaño corresponden a los brazos del vector. Marcador: DNA de lambda digerido con HindIII. El DNA fue transferido e hibridizado sucesivamente con la sonda: (B) pHLA-2. El DNA de los carriles 1, 7 y 15 no mostró hibridización. (C) pB3UT. (D) pA3UT. El carril 13 mostró hibridización preferencial con esta sonda (comparar con panel C, carril 13); las otras seis señales pueden deberse a señal residual debida a la sonda anterior o hibridización cruzada.

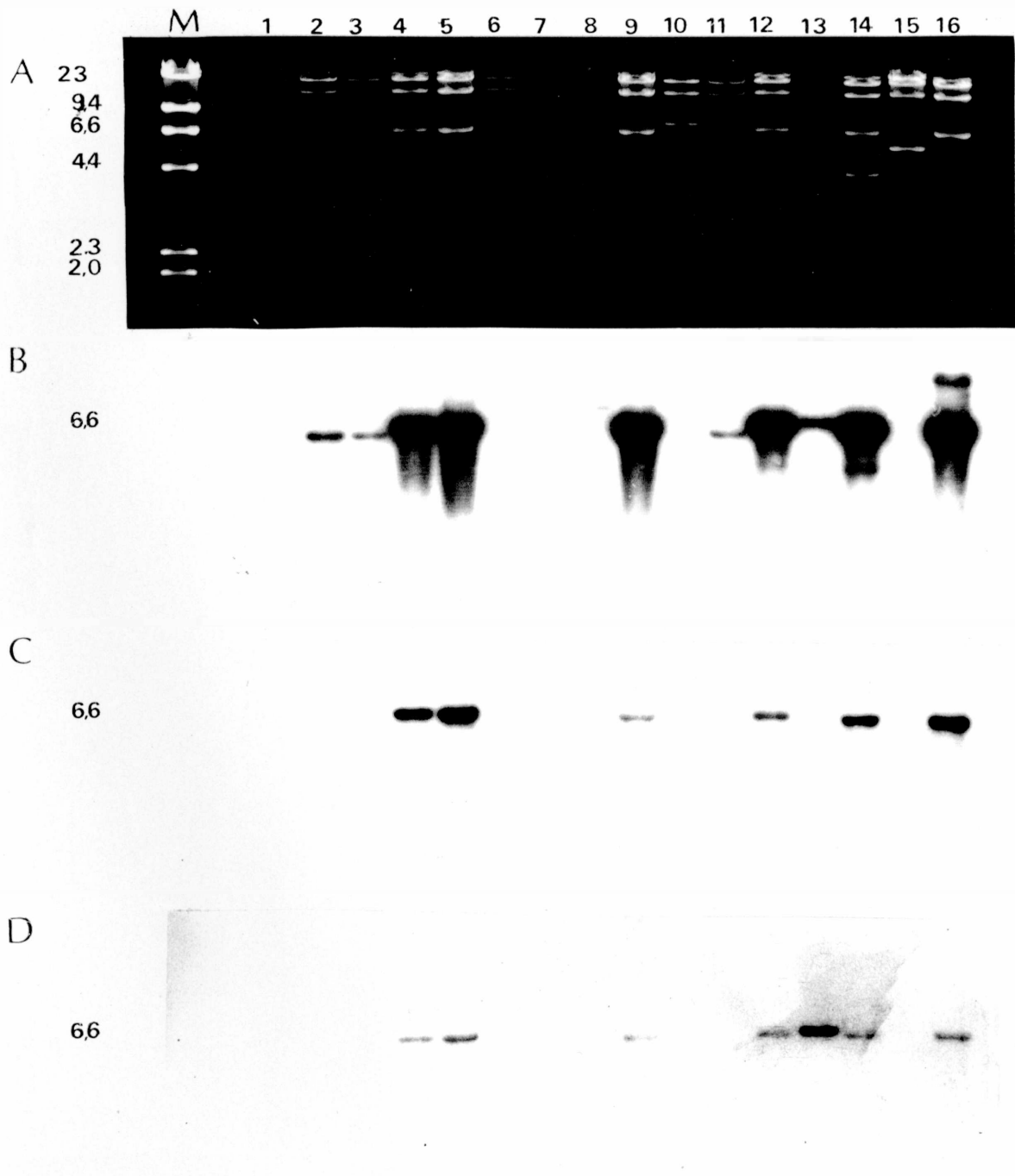
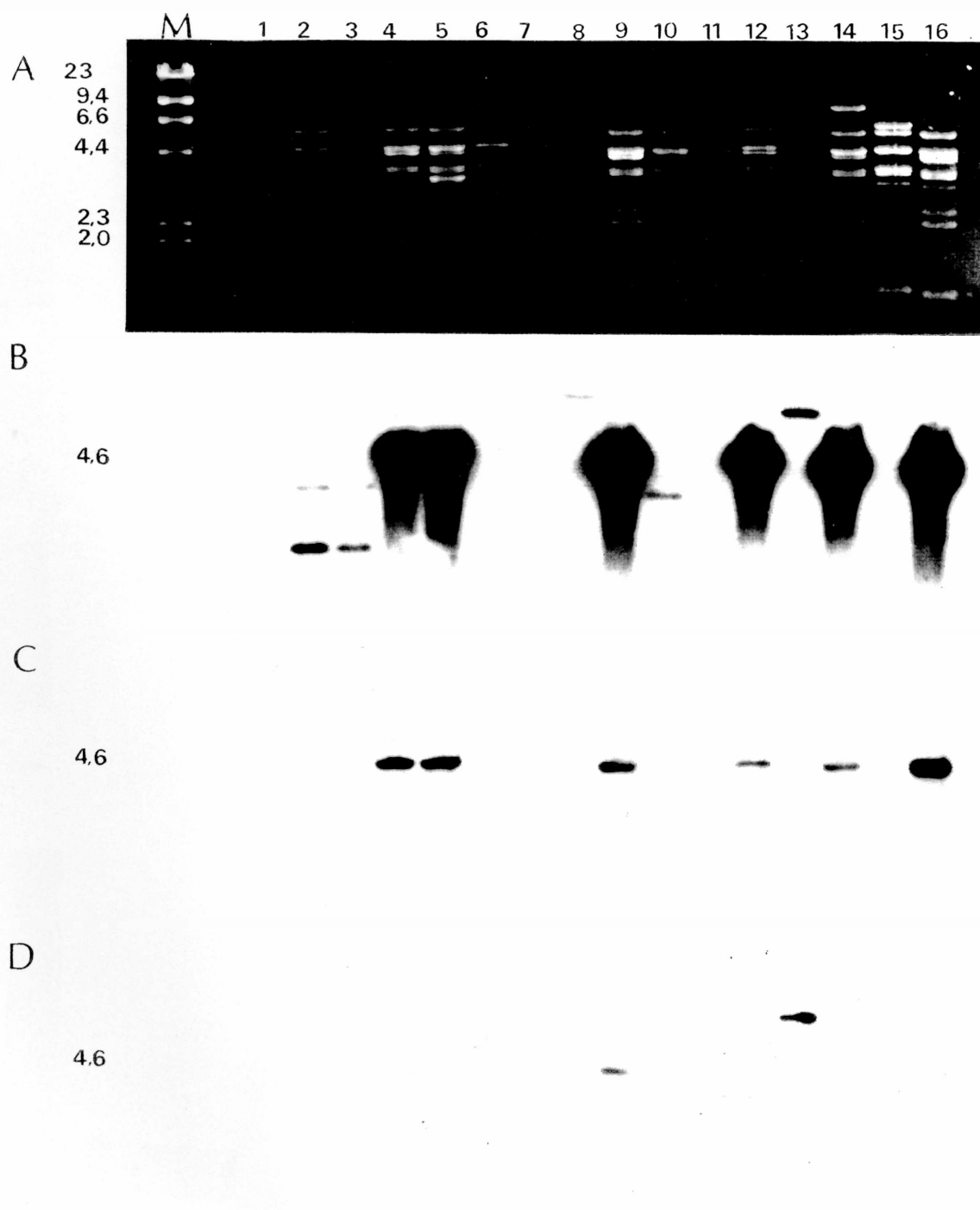


Figura 23: Análisis de los 16 clones con la enzima EcoRV. A) Tinción con Bromuro de Ethidio. (B) Autoradiografía obtenida luego de la hibridización con la sonda pHLA-2. (C) Hibridización con la sonda pB3UT. (D) Hibridización con la sonda pA3UT.



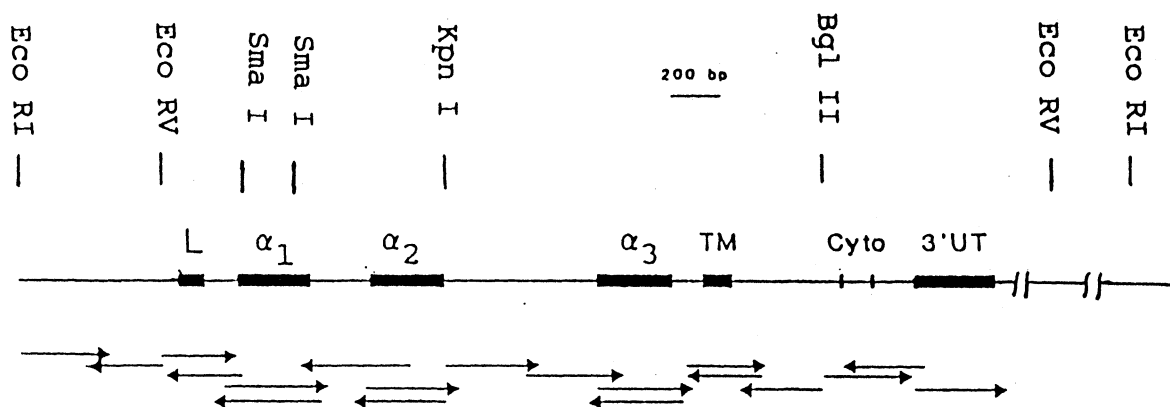
4,6 kb. Por lo tanto, todos los clones recombinantes que contienen dicho fragmento visualizado con la sonda específica del locus B, son candidatos a codificar este alelo. Estas observaciones sugieren que los 6 clones mencionados son portadores del gen HLA-B35. Se eligió uno de ellos para una mejor caracterización y análisis de su secuencia nucleotídica.

Es bien sabido, a través del análisis de Southern blot (Orr, 1982), que la familia de genes de clase I contiene muchos más segmentos de DNA que hibridizan con una sonda de clase I que las que corresponden a los antígenos clásicos HLA-A, -B y -C. Algunos de ellos ya han sido clonados y caracterizados permitiendo localizar 4 nuevos loci: HLA-E, -F, -G y -H. Cabe destacar, por ejemplo, que el aislamiento del locus H resultó de elegir para su caracterización aquellos clones de una genoteca que hibridizaban debilmente con una sonda HLA-A específica (Zemour, 1990). Por lo tanto, no sería extraño que alguno de estos clones que no hibridizaron con las sondas HLA-A, -B y -C específicas, pueda contener alguno de los genes HLA no clásicos.

SUBCLONADO Y MAPEO DE RESTRICCIÓN

El inserto EcoRI de 6.6kb del clon N°4 de las Fig. 22 y 23 fue subclonado en el vector pUC13, y el plásmido recombinante se denominó 621. Se procedió a la caracterización del mismo con varias enzimas de restricción. Los resultados obtenidos se muestran en la Fig. 24. El único sitio KpnI localizado coincidió con el descrito para otros genes HLA de clase I. El sitio BglII y 2 sitios SmaI coincidieron con los descritos para el gen HLA-Bw58 (Ways, 1985). Los sitios EcoRV se localizaron en el clon genómico de acuerdo a lo previsto por el análisis de RFLP. La posterior determinación de la secuencia nucleotídica de este clon identificó un tercer sitio SmaI que no había sido detectado por análisis de restricción ya que generaba un fragmento de 40 bp.

Figura 24: Mapa de restricción parcial generado sobre uno de los clones que posee un inserto positivo EcoRV de 4.6kb. No existen sitios de corte para Sall y HindIII. Las flechas indican la estrategia de secuenciación.



DETERMINACION DE LA SECUENCIA NUCLEOTIDICA DEL CLON 621

Los fragmentos de restricción EcoRI-EcoRV (600 bp del extremo 5'), EcoRV-KpnI (1,1 kb), KpnI-EcoRV (3,5 kb), KpnI-BglII (1,5 kb) y BglII-EcoRV (2 kb), fueron subclonados en plásmidos pUC18 o 19 según los requerimientos de compatibilidad de los extremos generados por las distintas enzimas. La determinación de la secuencia nucleotídica se realizó mediante la técnica de Sanger sobre DNA plasmídico (doble cadena). La estrategia de secuenciación se muestra en la Fig. 24. Se utilizaron los "primers" universales directo y reverso cuyas zonas de homología se encuentran sobre el vector. Los mismos permiten iniciar la síntesis a ambos lados del sitio de clonado y secuenciar ambas cadenas del inserto. Se utilizaron también oligonucleótidos específicos, gentilmente cedidos por el Dr. P. Parham, para determinar las secuencias exónicas. Los mismos fueron diseñados sobre regiones flanqueantes a los exones, teniendo en cuenta que estuvieran conservadas en la mayoría de los genes de HLA. (Ennis, 1990). La secuencia nucleotídica de los exones y parte de los intrones se determinó sobre ambas cadenas de DNA.

Análisis de la secuencia nucleotídica del clon 621. Características generales

La Fig. 25 muestra la secuencia nucleotídica de 3950 bp, a partir del extremo 5' del clon 621, y la secuencia de aminoácidos que de ella se deduce. El gen está organizado de un modo similar a otros genes HLA (Parham, 1989a). El mismo consta de ocho exones caracterizados por las señales de splicing apropiadas. El codón de terminación de la traducción está localizado al final del exón 7 en la misma posición que otros genes del locus B (Sood, 1985; Ways, 1985). Presenta las secuencias transcripcionales TATA y CAAT en posiciones equivalentes a otros genes de clase I así como

Figura 25: Secuencia nucleotídica y la secuencia deducida de aminoácidos del clon genómico 621 (3950 bp). Se subrayan, comenzando en la posición 370 en la secuencia de este clon, las secuencias que corresponden al tramo de polipurinas a -229 del sitio de iniciación, enhancer A, enhancer B, CCAAT box, codón de iniciación, sitios de "splincing" AG/GT y la señal de poliadenilación.

```

1   AATCATTGAGGGATTACCAATATTGTGCTACCTACTGTATCAATAAACAA
101  AAAGGAAACTGGTCTCTATGAGAATCTCTGTGTGGTGGCTTCAGACAAAA
    CTTCGCCAGGTTTAGAGAGAAAACCCCTGTCTCTACACCTCCATTCCCAG
201  GGCGAGCTCACTCTCTGGCATCAAGTTCTCCGTGATCAGTTTCCCTACAC
    AAGATCCAAGAGGAGAGGTAAGGAGTGAGAGGCAGGGAGTCCAGTTCAGG
301  GACAGGGATTCCAGGAGGAGAAGTGAAGGGGAAGCGGGTCGGGCAGCCTG
    GGGGTCTCTCCCTGGTTTCCACAGACAGATCCTTGTGCAGGACTCAGGCA
401  GACAGTGTGACAAAGAGGCTGGTGTAGGAGAAGAGGGATCAGGACGAAGT
    CCCAGCCGCGGGCGGGCTCTCAGGGTCTCAGGCTCCGAGAGCCTTGTCT
501  GCATTGGGGAGGCGCAGCGTGGGGATTCCCCACTCCCACGAGTTTCACT
    TCTTCTCCCAACCTATGTCGGGTCTTCTTCCAGGATACTCGTGACGCGT
601  CCCCATTTCCCCTCCATTGGGTGTGCGATATCTAGAGAAGCCAATCAGT
    GTCGCCGGGTCCAGTCTAAAGTCCCCACGCACCCACCCGGACTCAGA
    ATCTCCTCAGACGCCGAGATGCGGGTCAAGCGCCCCGAACCGTCTCCT
    exon 1  M R V T A P R T V L L
701  GCTGCTCTGGGGGCGAGTGGCCCTGACCGAGACCTGGGCGGIGAGTGCG
    L L W G A V A L T E T W A
    GGGTCGGGAGGGAAATGGCCTCTGTGGGGAGGAGCGAGGGACCCGAGGC
801  GGGGGCGCAGGACCTGAGGAGCCGCGCGGGAGGAGGGTCGGGCGGGTCT
    CAGCCCCTCCTCGCCCCAGGCTCCCACTCCATGAGGTATTTCTACACCG
    exon 2  G S H S M R Y F Y T
901  CCATGTCCCAGCCCGCGCGGGGAGCCCCGCTTCATCGCAGTGGGCTAC
    A M S R P G R G E P R F I A V G Y
    GTGACGACACCCAGTTCTGTGAGGTTGACAGCGACCCGCGAGTCCGAG
1001  V D D T Q F V R F D S D A A S P R
    GACGGAGCCCCGGGCGCCATGGATAGAGCAGGAGGGGCGGAGTATTGGG
    T E P R A P W I E Q E G P E Y W
    ACCGGAACACACAGATCTTCAAGACCAACACACAGACTTACCGAGAGAGC
1101  D R N T Q I F K T N T Q T Y R E S
    CTGCGGAACCTGCGCGGCTACTACAACCAGAGCGAGGCGGIGAGTGACC
    L R N L R G Y Y N Q S E A
    CCGCCCCGGGGCGCAGGTCAAGTCCCCATCCCCACGTACGGCCCGGG
1201  GTGCCCCGAGTCTCGGGTCCGAGATCCGCCTCCCTGAGGCGCGGGAC
    CCGCCAGACCCTCGACCGGCGAGAGCCCCAGGCGGTTTACCCGTTTC
1301  ATTTTCAGTTGAGGCCAAAATCCCCGCGGTTGGTTCGGGGCGGGCGGGG
    CTCGGGGGACGGGGCTGACCGCGGGGCGGGGCCAGGGTCTCACATCATC
    exon 3  G S H I I
1401  CAGAGGATGTATGGCTGCGACCTGGGGCCCGACGGGCGCTTCTCCGCGG
    Q R M Y G C D L G P D G R F L R G
    GCATAACCAGTACGCCTACGACGGCAAGGATTACATCGCCCTGAACGAGG
    H N Q Y A Y D G K D Y I A L N E
1501  ACCTGAGCTCCTGGACCGCGGGACACCGCGGCTCAGATCACCCAGCGC
    D L S S W T A A D T A A Q I T Q R
    AAGTGGGAGGGCGCCCGTGTGGCGGAGCAGCTGAGAGCCTACCTGGAGGG
    K W E A A R V A E Q L R A Y L E G
1601  CCTGTGCGTGGAGTGGCTCCGCAGATACCTGGAGAACGGGAAGGAGACGC
    L C V E W L R R Y L E N G K E T
    TGCAGCGCGGGTACCAGGGGAGTGGGGAGCCTTCCCCATCTCCTATA
    L Q R A
1701  GGTCGCCGGGGATGGCCTCCCACGAGAAGAGGAGGAAAATGGGATCAGCG
    CTAGAATGTCGCCCTCCCTTGAATGGAGAATGGCATGAGTTTTCTGAGT
1801  TTCTCTGAGGGCCCCCTTCTCTCTAGGACAATTAAGGGATGACGTCT
    CTGAGGAAATGGAGGGGAAGACAGTCCCTAGAATACTGATCAGGGGTCCC
1901  CTTTGACCCCTGCAGCAGCCTTGGGAACCGTGACTTTTCTCTCAGCGCT

```

2001 TGTTCTCTGCCTCACACTCAGTGTGTTTGGGGCTCTGATTCCAGCACTTC
 TGAGTCACTTTACCTCCACTCAGATCAGGAGCAGAAGTCCCTGTTCCCCG
 CTCAGAGACTCGAACTTTCCAATGAATAGGAGATTATCCCAGGTGCCTGC
 2101 GTCCAGGCTGGTGTCTGGGTTCTGTGCCCTTCCCCACACCAGGTGTCT
 GTCCATTCTCAGGCTGGTACATGGGTGGTCTAGGGTGTCCCATGAGAG
 2201 ATGCAAAGCGCCTGAATTTCTGACTCTTCCCATCAGACCCCCAAAGAC
 exon 4 D P P K T
 ACACGTGACCCACCACCCCGTCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAGGTGCT
 H V T H H P V S D H E A T L R C
 2301 GGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGACCTGGCAGCGGGAT
 W A L G F Y P A E I T L T W Q R D
 GGCGAGGACCAAACCTCAGGACACTGAGCTTGTGGAGACCAGACCAGCAGG
 G E D Q T Q D T E L V E T R P A G
 2401 AGATAGAACCTTCCAGAAGTGGGCAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAAG
 D R T F Q K W A A V V V P S G E
 AGCAGAGATACACATGCCATGTACAGCATGAGGGGCTGCCGAAGCCCTC
 E Q R Y T C H V Q H E G L P K P L
 2501 ACCCTGAGATGGGGTAAAGGAGGGGGATGAGGGGTCAATCTCTTCTCAGG
 T L R W
 GAAAGCAGGAGCCCTTCTGGAGCCCTTCAAGAGGGTCAAGGGCCCTCGTC
 2601 TTCCCTCCTTTCCAGAGCCATCTTCCAGTCCACCATCCCATCGTGG
 exon 5 E P S S Q S T I P I V
 GCATTGTTGCTGGCCTGGCTGTCCTAGCAGTTGTGGTCATCGGAGCTGTG
 G I V A G L A V L A V V V I G A V
 2701 GTCGCTACTGTGATGTGTAGGAGGAAGAGCTCAGGTAGGGAAGGGGTGAG
 V A T V M C R R K S S
 GGGTGGGGTCTGGGTTTTCTTGTCCCACTGGGGTTTTCAAGCCCCAGGTA
 2801 GAAGTGTTCCCTGCCTCATTACTGGGAAGCAGCATCCACACAGGGGCTAA
 CGCAGCCTGGGACCCTGTGTGCCAGCACTTACTCTTTTGTGCAGCACATG
 2901 TGACAATGAAGGACGGATGTATCACCTTGATGGTTGTGGTGTGGGGTCC
 TGATTTTCAAGATTTCATGAGTCAGGGGAAGGTCCCTGCTAAGGACAGACCT
 3001 TAGGAGGGCAGTTGGTCCAGGACCCACACTTGCTTTCTCGTGTTTCTG
 ATCCTGCCTTGGGTCTGTAGTCATACTTCTGAAAATTCCTTTTGGGTCCA
 3101 AGACGAGGAGGTTCCCTAAGATCTTAAGGCCCTGCTTCCCTCCAGTCCC
 CTCACAGGACATTTTCTTCCACAGGTGGAAAAGGAGGGAGCTACTCTCA
 exon 6 G G K G G S Y S Q
 3201 GGCTGCGTGAAGTGGTGGGGTGGGAGTGTGGAGGAGCTACCCACCCC
 A A
 ATAATTCTCCTGTCCCACGTCTCCTGCGGGCTCTGACCAGGTCTGTTT
 3301 TTGTTCTACTCCAGCCAGCAGTGCACAGGGCTCTGATGTGTCTCTCA
 exon 7 S S D S A Q G S D V S L
 CAGCTTGAAAAGGTGAGATTCTTGGGGTCTAGAGTGGGCGGGGGGGCGG
 T A U
 3401 GGAGGGGGCAGAGGGGAAAGGCCTGGGTAATGGAGATTCTTTGATTGGGA
 TGTTTCGCGTGTGTCGTGGGCTGTTTCAAGTGTGCATCACTTACCATGACT
 3501 AACCCAGAAATTTGTTTCATGACTGTTGTTTTCTGTAGCCTGAGACAGCTGTC
 TTGTGAGGGACTGAGATGCAGGATTTCTTCACTCCTCCCTTTGTGACTT
 3601 CAAGAGCCTCTGGCATCTCTTTCTGCAAACGGCACCTGAATGTGTCTGCG
 TCCTGTTAGCCTAATGTGAGGAGGTGGAGAGACAGCCACCCCGTGTG
 3701 CACTGTGACCCCTGTTCCCATGCTGACCTGTGTTTCTCCCAAGTCACT
 TTCTTGTCCAGAGAGGTGGGGCTGGATGTCTCCATCTCTGTCTCAACTT
 3801 TATGTGCACTGAGCTGCAACTTCTTACTTCCCTACTGAAAATAAGAACT
 GAATATAAACTTGTCTTCTCAAATATTGCTATGAGAGTTGATGGATTA
 3901 ATTAATAAAGTCAATTCTGGAATTTGAGAGAGCAATAAAGACCTGAGA

el sitio de poliadenilación. En el transcurso de la caracterización de este clon, Ooba y col (1989) documentaron la secuencia exónica de un gen HLA-B35 aislado de un individuo japonés. Dicha secuencia recibió la designación de HLA-B*3501 por el comité de nomenclatura de la Organización Mundial de la Salud para genes HLA. La comparación de la secuencia nucleotídica de B*3501 por aquella del clon 621 reveló 100% de identidad en los exones 1, 2, 4, 5, 6 y 7. El exón 3, en cambio, presentó diferencias en sólo 3 nucleótidos localizados en un tramo de 23 bp. Estos cambios introducen 3 substituciones de aminoácidos, en las posiciones 109 (Leu--> Phe), 114 (Asp --> Asn) y 116 (Ser --> Tyr) (Fig. 26). El comité de nomenclatura de la Organización Mundial de la Salud para productos del sistema HLA designó a este nuevo alelo definido en el clon 621 como B*3502.

Figura 26: Comparación de las secuencias de aminoácidos entre las dos variantes HLA-B35, HLA-B51 y una secuencia consenso para el locus HLA-A (A-con) (Zemmour, 1990). El tramo de secuencias comparadas comprende desde el aminoácido 108 al 118. Rayas y puntos indican identidad con B3501. La secuencia de los alelos HLA-B8, B4002, B41, B42, Bw52 y Bw60 son idénticas en esta región al B51 (Parham, 1989a y Fig. 28). HLA-Bw58 es idéntico en esta región al a HLA-B3501.

	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118
B3501	CGC Arg	CTC Leu	CTC Leu	CGC Arg	GGG Gly	CAT His	GAC Asp	CAG Gln	TCC Ser	GCC Ala	TAC Tyr
B3502	---	T-- Phe	---	---	---	---	A-- Asn	---	-A- Tyr	---	---
B5101	---	---	---	---	---	---	A-- Asn	---	-A- Tyr	---	---
A-con	---	T-- Phe	---	---	---	T-C Tyr	C-- His	---	-A- Tyr	---	---

Análisis de las diferencias entre B3501 y B3502.

Implicancias estructurales

El aminoácido 109 es un residuo relativamente conservado dentro de la familia de genes HLA de clase I. El análisis de más de 60 secuencias HLA-A, -B y -C, realizado recientemente (Fig.27), muestra que el aminoácido Leu está presente en 44 de ellas y Phe en las 27 restantes. Cabe destacar que las 27 secuencias con Phe en esta posición son productos del locus HLA-A (ver Fig. 27) Por lo tanto, la variante que aquí se describe representa el primer alelo que no pertenece al locus HLA-A pero que contiene Phe en posición 109. Esta posición está muy cercana a uno de los "lazos" expuestos (aminoácidos 105 a 108) que fueron identificados por fuera del bolsillo de unión al péptido a través del análisis de la estructura tridimensional de moléculas de clase I. Esta región, que se extiende entre los residuos 95 a 107 posee epitopes reconocidos por anticuerpos monoclonales específicos y por linfocitos T aloreactivos (Salter, 1987; Mattson, 1987). En particular, el aminoácido 107 fue considerado crítico para el reconocimiento por anticuerpos monoclonales en las moléculas HLA-A2 y HLA-A69 (Bjorkman, 1987). Estudio de mutagénesis dirigida sobre estas moléculas mostraron que la simple sustitución de este aminoácido en la molécula HLA-Aw68 es capaz de introducir ciertos epitopes definidos para HLA-A2 por células T y anticuerpos (Salter, 1987). Experimentos con células transfectadas con las dos variantes HLA-B35 permitirían analizar en qué medida el cambio de Leu por Phe puede afectar al reconocimiento serológico de estas moléculas; las sustituciones en 114 y 116, al estar en la base del sitio de unión de péptidos, no debieran afectar la misma.

Los aminoácidos 114 y 116, en cambio, son residuos considerados de muy alta variabilidad dentro del dominio α_2 de las moléculas de clase I (Parham, 1989). La presencia de Asn en posición 114 y Tyr en 116 se encontró también en HLA-B8, B41, B42,

Figura 27: Secuencia de aminoácidos del dominio α_2 de 27 moléculas HLA-A, 31 HLA-B, 14 HLA-C, 6 HLA-H/AR, 3 HLA-E, HLA-F Y HLA-G. Cada secuencia es comparada a una consenso a partir de los aminoácidos más frecuentes en cada posición. Los guiones indican identidad con la secuencia consenso. Los residuos 109, 114 y 116 están señalados con un (♥). Las secuencias aminoácidicas fueron tomadas de los reportes del DNA Component-XI International Histocompatibility Workshop, Japón, 1991.

α_2 Domain	100	♥110	♥111	120	130	140	150	160	170	180		
CONSENSUS	GSHTLQRMHYGCDVGFDPGRLLRQYDQYAYDGGKDYIALNEDLRSWTAADTAAGITQRKWEAAKVAEQLRAYLEGTCTVEMLRAYLENGKETLQRA											
A1	I-I	S-F	R-D	K	H	K	VNA	R-V	R	DG	T	A*0101
A2.1	V	S-W-F	N	K	H	T-KH	H	W			T	A*0201
A2.2F	V	S-W-F	N	K	H	T-KH	H	W			T	A*0202
A2.3	V	S-W-F	N	K	H	T-KH	T-HE	W			T	A*0203
A2.2Y	V	S-W-F	N	K	H	T-KH	H	W			T	A*0205
A2.4a	V	S-W-F	N	K	H	T-KH	H	W			T	A*0206
A2-Lee	V	S-W-F	N	K	H	T-KH	H	W			T	A*0210
A3	I-I	S-F	R-D	K	H	K	HE	D			T	A*0301
A3.2	I-I	S-F	R-D	K	H	K	H	Q	D		T	A*0302
A11E	I-I	S-F	R-D	K	H	K	NA	Q	R		T	A*1101
A11K	I-I	S-F	R-D	K	H	K	NA	Q	R		T	A*1102
A23	M-F	S-F	H	K	H			DG			T	A*2301
A24.1	M-F	S-F	H	K	H	K	H	Q	DG		T	A*2401
A24.2	M-F	S-F	H	K	H	K	H	Q	DG		T	A*2402
A9.3	M-F	S-F	H	K	H	K	H	Q			T	A*2403
A25	I	F	Q-D	K	H	K	T-HE	H	R		T	A*2501
A26	I	F	Q-D	K	H	K	T-HE	H	R		T	A*2601
A29	I-M	H-S	F-R-D	K	H						T	A*2901
A30.1	I-I	S-F	E-H	K	H		H				T	A*3001
A31	I-M	S-F	Q-D	K	H						T	A*3101
A32	I-M	S-F	Q-D	K	H						T	A*3201
A33	I-M	S-F	Q-D	K	H		DE		H		T	A*3301
Aw66.1	I	F	Q-D	K	H	K	T-HE	H	R		T	A*6601
Aw66.2	I	F	Q-D	K	H	K	T-HE	H	E		T	A*6602
Aw68.1	I-M	S-F	R-D	K	H	T-KH	H	W			T	A*6801
Aw68.2	I-M	S-F	R-D	K	H	T-KH	H	W			T	A*6802
Aw69	V	S-W-F	H	K	H	T-KH	H	W			T	A*6901
B7.2	S	H					E	R	E		DK-E	B*0702
B8	S	HN					D				D-E	B*0801
B13.1	II	L	HN-L	S		L		E				B*1301
B13	W-T	L	HN-L	S		L		E				B*1302
B14	W	N-F	S				E		H			B*1401
Bw65	W	N-F	S				E		H			B*1402
Bw62	H-S	S					E	W	L			B*1501
Bw75	II	S	S				E		L			B*1502
B18	H-S	S							H			B*1801
B27.2	N	H-D	S				E		H			B*2702
B27.1	N	H-D	S				E		H			B*2705
B35.1	II	L	H-S	S			L					B*3501
B35.2	II	S	L-F	HN	S		L					B*3502
B37	I	S	N-F	S			D					B*3701
B38	I	S	ER	HN-F	S		T		CV			B*3801
B39	I	S	ER	HN-F	S		T		CV			B*3901
Bw60	S	HN				S-L		E	CV		DK-E	B*4001
B405	S	HN						E				B*4002
Bw41	W	HN					D			D-E		B*4101
Bw42	S	HN					D			D-E		B*4202
B44.1	II	L	D	S			D	L	S			B*4401
B44.2	II	L	D	S			D	L	S			B*4402
Bw46	H-S	S					E	H	L			B*4601
Bw47	F	H-D	S				E					B*4701
B49	W	L	HN-L	S			E		L			B*4901
B51	W-T	HN	S				E		L	H		B*5101
Bw52	W-T	HN	S				E		L	H		B*5201
Bw53	II	L	H-S	S					L			B*5301
Bw57.1	II-V	L	H-S	S					L			B*5701
Bw58	II	L	H-S	S					L			B*5801
Bw78	W-T	HN	S				E		L	H		B*7801
Cw1	W-C	L					E	R		S		CW*0101
Cw2.1	L	L	S				E	W	E	K		CW*0201
Cw2.2	L	L	S				E	W	E	K		CW*02021
Cw2.2L	L	L	S				E	W	E	K		CW*02022
Cw3	II	L	H	N			E	W	L	K		CW*0301
Cw5	L	N-F	K				E	R		K		
Cw6	W	L	S				E	W		S		
Cw7	L	S					L	A				CW*0601
JY328	S	L	S				L	A-DE				CW*0701
Cw11	L	N-F	K				T			R		CW*0702
CX52	L	V					E	W				CW*1201
CB2	L	S					E	W				CW*1202
CB1	M-F	L	S				E	R		S		CW*1401
CwBL18	L	S					E	W				
CONSENSUS	GSHTLQRMHYGCDVGFDPGRLLRQYDQYAYDGGKDYIALNEDLRSWTAADTAAGITQRKWEAAKVAEQLRAYLEGTCTVEMLRAYLENGKETLQRA											

B4002, B51, Bw52, Bw60 (Parham, 1989a). Estos residuos, además, son 2 de las 47 posiciones que, por análisis cristalográfico, Bjorkman y col. (1987) juzgan de relevancia funcional. Todas ellas son posiciones que intervienen en la unión al péptido y en la interacción con el receptor de los linfocitos T. Los residuos de las posiciones 114 y 116 están localizados en la base del bolsillo de presentación antigénica, formando parte de una de las dos estructuras en hoja plegada que conforman este sitio (Fig. 28). Con respecto a la secuencia del gen B3501, el cambio del aminoácido Asp por Asn en la posición 114, involucra un cambio en la carga neta de la molécula y el reemplazo de Ser por Tyr introduce un residuo polar más voluminoso. La sustitución de un aminoácido cargado negativamente por uno con carga positiva podría explicar el patrón heterogéneo de bandas de isoelectroenfoque (IEF) que posee HLA-B35; la secuencia descrita aquí podría corresponder a una de las variantes más básicas entre las cuatro descritas para los antígenos HLA-B35 (Neefjers, 1986; Yang, 1989; Lederer, 1989).

Implicancias funcionales

El análisis de la relación entre estructura y función en otras moléculas de clase I, por medio de distintas metodologías, provee fuerte evidencia para suponer que sustituciones en las posiciones 114 y 116 pueden afectar la unión a péptidos y en consecuencia el reconocimiento por parte de los linfocitos T. El análisis cristalográfico comparado de la estructura de las moléculas HLA-A2 y HLA-Aw68, mostró que una sustitución de Tyr por Asp en posición 116 causa una alteración estructural en una de las cavidades internas dentro del bolsillo de presentación antigénica (Garret, 1989). Otros datos acerca del comportamiento de moléculas de clase I que difieren en estos residuos proviene de los estudios sobre distintas variantes del antígeno HLA-B27. Se

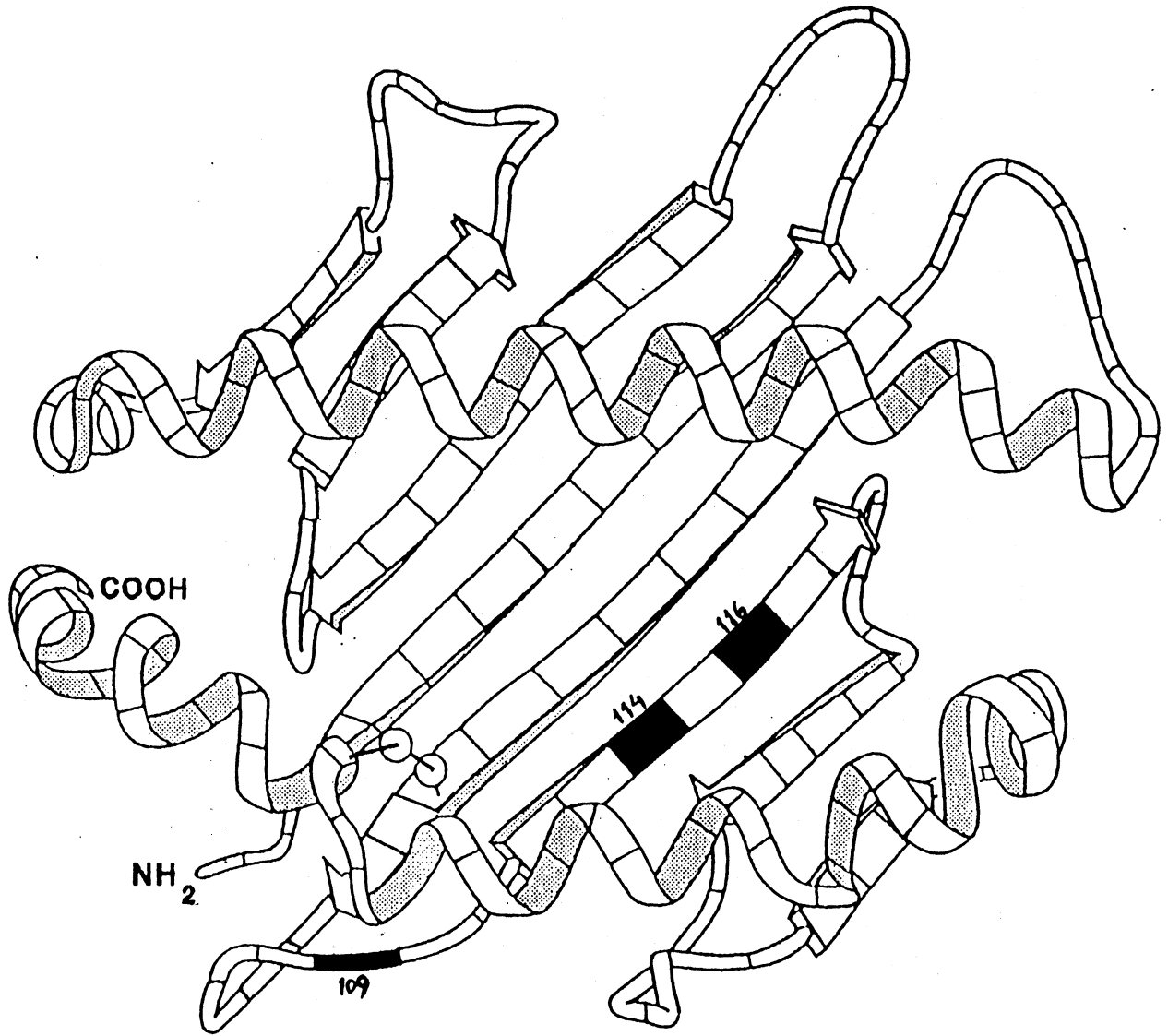
conocen hoy en día 7 subtipos del HLA-B27 que difieren entre sí en 11 aminoácidos (López de Castro, 1989; Choo, 1989). Algunos clones de linfocitos T citotóxicos aloespecíficos pueden distinguir la variante B*2704 de la B*2706. Estos subtipos difieren entre sí sólo en las posiciones 114 (His --> Asp) y 116 (Asp --> Tyr) (Vega, 1986). Del mismo modo, ciertos clones T citotóxicos pueden distinguir entre las variantes HLA-B701 y -B702, las mismas parecen diferir solamente en el residuo 116 (van Seventer, 1986; Taketani, 1984).

Hay evidencias que sugieren que cambios en estas posiciones también pueden afectar el reconocimiento de antígenos "convencionales". En ratones, clones de linfocitos T citotóxicos específicos para células de la cepa H-2K^b infectadas con el virus ectromelia, lisan con una eficiencia marcadamente menor a células blanco H-2K^{bmb} infectadas con este virus. H-2K^{bmb} es una mutante de la H-2K^b que difiere sólo en la posición 116 (Nathenson, 1986).

Finalmente, experimentos muy recientes realizados en colaboración con el Dr. Takiguchi (Univ. de Tokio, Japón) muestran que las dos variantes B3501 y 02 son reconocidas diferencialmente por clones de linfocitos T citotóxicos (datos no mostrados).

Como se mencionó en la Introducción, el alelo HLA-B35 muestra asociación a varias enfermedades en distintos grupos étnicos. Tanto hepatitis crónica activa como el riesgo de desarrollar SIDA en pacientes infectados está preferentemente asociado a individuos de background latino. En japoneses se observa asociación a enfermedad de Graves y azoospermia. La presencia de dos alelos que poseen diferente comportamiento funcional apoyaría la hipótesis que esta asociación diferencial pueda deberse a diferencias en la capacidad de presentación antigénica. A partir de la descripción de esta variante HLA-B3502, será interesante analizar la frecuencia de ambas variantes B35 en diferentes grupos étnicos y en diversas patologías, ya que desconocemos la representatividad que tienen B3501 y B3502 en japoneses e hispanos respectivamente.

Figura 28: Diagrama de cintas que representa una molécula HLA de clase I vista desde arriba y mirando dentro del sitio de presentación antigénica, donde se señalan las diferencias encontradas entre las moléculas HLA-B3501 y HLA-B3502.



Datos preliminares de nuestro laboratorio indican que B3501 está presente en otros dos individuos B35 japoneses y que B3502 es la variante presente en dos individuos B35 de ancestros latinos.

Análisis comparativo de las secuencias intrónicas y 3' no traducida

La secuencia nucleotídica de los intrones 1, 2, 3, 4, 5 y 6 de esta variante latina HLA-B35, es idéntica a la publicada para el antígeno HLA-Bw58 (Ways, 1985), con la excepción de un solo nucleótido en el intrón 5 (Fig. 25, Tabla 11). Ambos genes difieren entre sí en 11 nucleótidos en el intrón 7 y en 9 nucleótidos en la región 3' no traducida. Esto es consistente con la estrecha relación evolutiva entre Bw58 y B35 (ver más adelante).

La Tabla 11 muestra los porcentajes de homología para las secuencias intrónicas del B35 respecto de otros genes de clase I. Se observa una mayor homología con los productos de los loci HLA-B y -C que con aquellos que provienen de HLA-A y genes de clase I no clásicos (HLA-E, -F, -G y -H). Estos hallazgos confirman la relación más estrecha que, desde un punto de vista filogenético, mostró el análisis de las secuencias codificantes de los loci -B y -C, similar a la observada entre -A y -H (Zemmour J, 1990).

Comparación de las secuencias 5' flanqueantes con aquella de otros genes de clase I

Las secuencias flanqueantes de la región 5' contienen los elementos regulatorios descritos para otros genes de clase I (Fig. 29). El tracto de polipurinas cercano a la posición -300 (respecto del codón de iniciación) es idéntico al que está presente en HLA-B27 y Cw2, pero difiere de los HLA-A2 y HLA no clá-

Tabla 11: Homología entre los intrones del gen HLA-B3502 y otros genes de clase I.

Comparado con:	INTRONES						
	1	2	3	4	5	6	7
HLA-BW58	100	100	100	100	100	100	94
HLA-B27	96	94	100	97	98	98	91
HLA-A2	84	88	81	85	83	87	67
HLA-Cw3	88	91	89	90	89	91	82
HLA-E	85	83	73	91	85	88	81
HLA-F	88	84	85	90	82	82	65
HLA-AR/H	85	88	78	81	82	66	68
HLA-G	88	76	81	68	84	68	66

Los resultados están expresados como porcentaje de homología. Las secuencias se obtuvieron de las siguientes fuentes: HLA-Bw58 (Ways, 1985), HLA-B27 (Weiss, 1985), HLA-A2 (Koller, 1985), HLA-Cw3 (Sodoyer, 1984), HLA-E (Koller, 1988), HLA-F (Geraghty, 1990), HLA-G (Geraghty, 1990), HLA-H/AR (Chorney, 1990).

Figura 29: Comparación de las secuencias flanqueantes de la región 5' de HLA-B3502 con regiones homólogas en HLA-B27, HLA-Cw2 (Gussow, 1987), HLA-A2, HLA-G, HLA-F, HLA-H/AR, HLA-E. Las líneas indican identidad con HLA-B3502. Los puntos entre paréntesis indican "gaps" introducidos para obtener un mejor alineamiento. El nucleótido G mostrado debajo de la secuencia consenso para interferón de HLA-E, es una inserción respecto de los otros loci HLA. Los números de la izquierda indican la posición de las secuencias relativas al codón de iniciación ATG. El tramo de polipurinas se alineó a la secuencia presente en HLA-F. las secuencias consenso para los enhancer A y B se tomaron de Kimura y col (1986). La secuencia consenso sensible a interferón, de Friedman y Stark (1985) y correspondiente a la TATA box de Koller y Orr (1985). Un cien por ciento de homología se observó en la secuencia CCAAT box de todos los genes listados (no mostrado).

POLYPURINE TRACT

HLA-B3502	-299	TGGTGTAGGAGAAGAGGGATCAGGA
HLA-B27	-301	-----
HLA-Cw2	-301	-----
HLA-A2	-309	ACA(..)-A--C-----G-----G
HLA-G	-289	ACAA-(..)--T--C---G-----G
HLA-F	-314	A--A-GG----GG-GA--GGG---G
HLA-H/AR	-302	---CAC-----G--C---G-----G
HLA-E		alu element

ENHANCER A

IFN CONSENSUS SEQUENCE

HLA-B3502	-198	TGGGGATTCCCCA	-177	AGTTTCACTTCTTC
HLA-B27	-199	-----	-178	-----
HLA-Cw2	-197	--A-----T---	-176	-----
HLA-A2	-209	-----	-189	-----TT--TC--
HLA-G	-191	-----(...)	-178	(.....)--C---
HLA-F	-210	--A-A-----	-188	-----T--TC--
HLA-H/AR	-203	-----G---	-183	-----T-----
HLA-E	-203	--ATTGC-GGGA-	-183	-----C---C---

G

ENHANCER B

TATA BOX

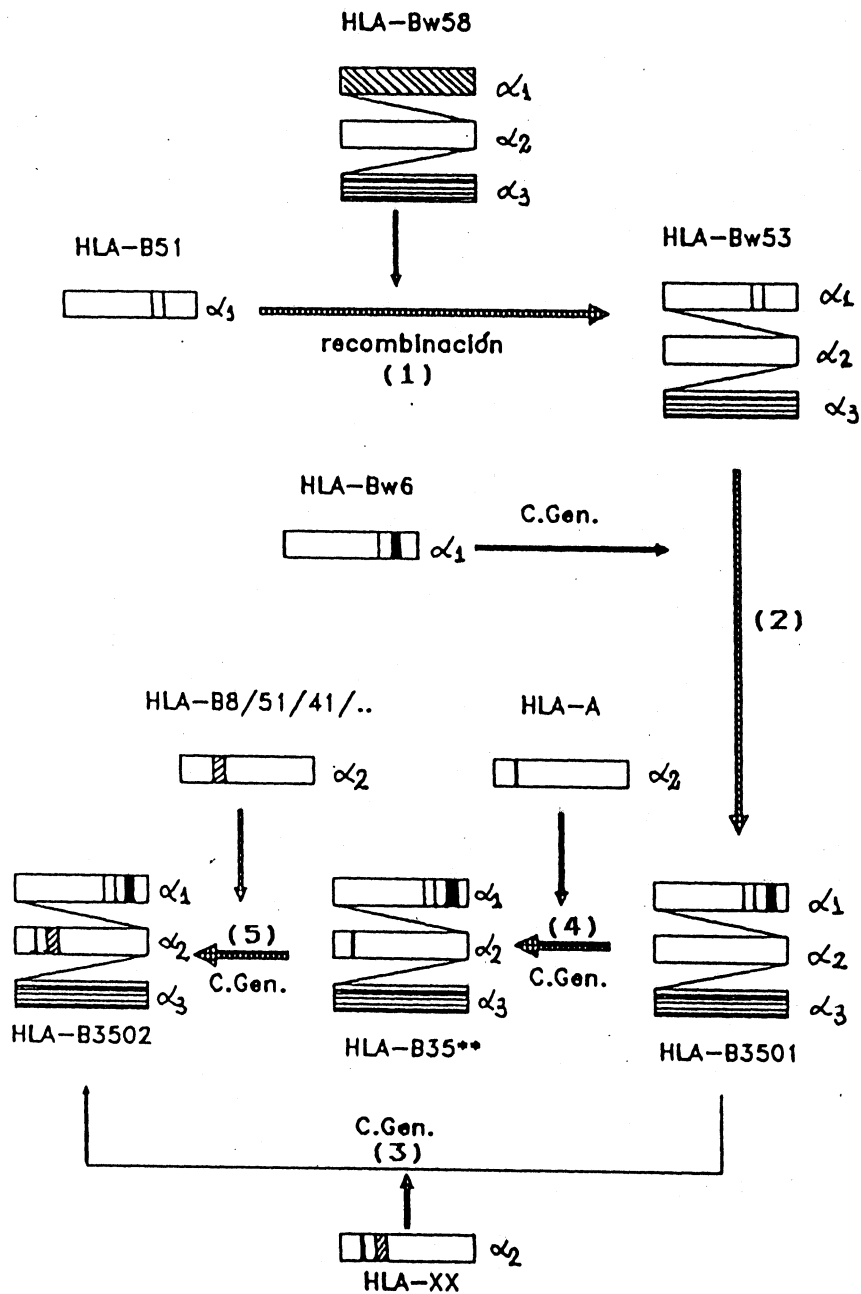
HLA-B3502	-103	CATTGGGTGTC	-51	TCTAAA
HLA-B27	-103	-----	-51	-----
HLA-Cw2	-103	-----	-51	-----
HLA-A2	-104	-----	-52	-----
HLA-G	-110	----A---A-	-59	-----
HLA-F	-113	-----C---	-59	-----
HLA-H/AR	-104	--C-A-----	-52	-----
HLA-E	-105	--A-----	-53	-A----

sicos en 7 a 12 nucleótidos. Se observó también, 100% de homología entre HLA-B3502 y B27 en las regiones "enhancer A", secuencia consenso para interferón (IRE), "enhancer B", CCAAT box y TATAA box (Fig. 29). Recientemente, Hakem y col. (1990) mostraron que el comportamiento de la secuencia consenso sensible a interferón se ve afectado (con un aumento de la respuesta al IFN) por la sustitución de sólo dos nucleótidos en esta secuencia del gen HLA-A3 por aquella presente en B7. Ya que HLA-B7, B35, B27 y Cw2 poseen secuencias IRE idénticas es probable que todos estos genes se comporten de un modo similar ante el estímulo con interferón. De cualquier modo, estas especulaciones deberán esperar la comunicación de nuevas secuencias provenientes de otros clones genómicos y de datos experimentales sobre su respuesta a interferón.

Consideraciones acerca del origen evolutivo de B3502

El subtipo HLA-B3502 aquí descrito difiere de la variante HLA-B3501 en tres posiciones que se extienden en un tramo de 23 bp dentro del tercer exón. Esto genera la sustitución de tres aminoácidos en las posiciones 109, 114 y 116. La proximidad de estos cambios y el hecho que secuencias similares están presentes en otras moléculas de clase I para cada uno de estos residuos, podría sugerir que esta variante surgió por un evento del tipo de conversión génica. Sin embargo, entre los genes HLA de clase I clásicos y no clásicos descritos hasta hoy, ninguno de ellos mostró tener simultáneamente los residuos Phe en posición 109, Asn en 114 y Tyr en 116. Es así que por ahora no se conoce ningún alelo con una secuencia que pudiera haber actuado como donante para generar esta variante. Para responder a este interrogante se deberá investigar la presencia de esta secuencia en el genoma de individuos que carecen del alelo HLA-B35. Para ello podría usarse un oligonucleótido apropiado como sonda sobre el exón 3 amplifi-

Figura 30: Esquema que muestra el posible origen evolutivo del alelo HLA-B3502. El alelo Bw53 se originó a partir de Bw58 por un evento de recombinación con B51* en o alrededor del intrón 2 (paso 1) y B3501 se formó a partir de Bw53 por un evento de conversión génica con algún alelo portador del epítope público Bw6 (paso 2) (descrito previamente por Hagashi, 1990). B3502 pudo haber surgido a partir de B3501 por un único evento de conversión génica con un alelo portador de los tres cambios, aún desconocido (paso 3) o bien por dos eventos de conversión génica independientes, uno de ellos interlocus (paso 4) y otro con alelos del mismo locus HLA-B (paso 5).



cado por la técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR). También es posible que B3502 haya surgido de dos eventos del tipo conversión génica independientes: la Phe 109 pudo ser aportada por un gen del locus HLA-A y los aminoácidos Asn 114 y Tyr 116 de varios donantes potenciales como B8, B41, B51, etc.

Por otro lado, la identidad de la secuencia intrónica con Bw58 confirma las especulaciones acerca de la estrecha relación evolutiva que existiría entre B35 y Bw58 (Ooba, 1989). Estos autores sostienen que B35 pudo haber derivado del HLA-Bw58 en dos pasos evolutivos de conversión génica: HLA-Bw58 --> HLA-B53 --> HLA-B35 (Hayashi, 1990). Sin embargo, no hay evidencias sólidas que sugieran que Bw58 sea ancestral con respecto a B35, por lo que el camino evolutivo bien podría haber sido el inverso. La Figura 30 resume la relación evolutiva entre los genes B51, Bw58, B53 y ambos subtipos de B35.

Arancibia



Conclusiones

El sistema HLA codifica para la expresión de una serie de glicoproteínas superficiales que participan en la presentación de péptidos antigénicos a los linfocitos T. A fin de lograr un desempeño eficiente a nivel poblacional, el sistema ha evolucionado con la creación de decenas de alelos para las moléculas de clase I y clase II. Pero las consecuencias adversas de este notable polimorfismo se reflejan en situaciones clínicas: transplante de órganos y enfermedades asociadas al HLA.

Hasta hace unos pocos años, las reacciones serológicas constituían la única herramienta para la identificación de los alelos HLA. Más recientemente, la biología molecular aportó estrategias de tipificación complementarias. Las mismas fueron utilizadas en este trabajo de Tesis para investigar la complejidad alélica de la especificidad denominada HLA-B35 y tratar de explicar la naturaleza diferencial de su asociación a diversas patologías en distintos grupos étnicos.

Los primeros experimentos fueron realizados a fin de buscar variantes polimórficas de restricción (RFLP) de HLA-B35, no discernibles por serología. Esta estrategia formó parte de un trabajo colaborativo mundial en el marco del X Taller Internacional de Histocompatibilidad. Nuestra participación en el mismo nos permitió contar con reactivos, protocolos y métodos de análisis estandarizados. Para HLA-B35, los resultados obtenidos demostraron la existencia de un RFLP EcoRV 4,6kb, que distingue dos haplotipos extendidos: aquel presente en individuos B35,Cw4 del presente en individuos B35,Cw"otro" (Cw distinto de Cw4).

Este RFLP surge de un sitio de restricción localizado en la región 3' no traducida del gen y no se correlaciona, aparentemente con diferencias funcionales de esta molécula de clase I. La búsqueda de subtipos alélicos de HLA-B35 fue directamente encarada entonces, mediante la preparación de una genoteca, el aislamiento y la caracterización de un clon genómico para HLA-B35. Para la identificación de clones portadores del gen se consideró concluyente la presencia en los mismos del RFLP

EcoRV/4.6kb.

Se identificó así un nuevo alelo HLA (denominado B*3502 por el Comité de Nomenclatura de la WHO) aislado de un individuo de ancestros hispanos. B*3501 (aislado de un individuo japonés) y B*3502 definen a dos subtipos alélicos de B35 no discernibles por serología. Ambos alelos difieren en toda su extensión en sólo tres nucleótidos, que se traducen en tres sustituciones aminoácidas; dos de las mismas están localizadas en el bolsillo de presentación antigénica (residuos 114 y 116) en un sitio que está involucrado directamente con el contacto de péptidos antigénicos. Experimentos recientes con células transfectadas con los genes de ambas variantes demostraron directamente su comportamiento inmunológico diferencial.

Teniendo en cuenta que HLA-B35 en individuos japoneses se asocia a un conjunto de patologías y en individuos hispanos, a patologías deferentes, los resultados aquí descritos sugieren que esta asociación diferencial podría deberse a la existencia de variantes alélicas de diferente comportamiento funcional pero idéntico reconocimiento serológico. El análisis de la frecuencia poblacional de estos dos alelos permitirá confirmar esta hipótesis.



Bibliografía

DONACION.....
A.....
Fecha.....
Inv. S..... Inv..... B.....

Albert ED, Baur MP, Mayr WR. Editors. (1984). *Histocompatibility Testing 1984*. Springer-Verlag, Berlin. pp.1-758.

Allen P (1987). Antigen processing at molecular level. *Immunol Today* 8:270.

Andersson M, Bohme J, Andersson G, Moller E, Thorsby E, Rask L, Peterson PA. (1984). Genomic hybridization with class II transplantation antigen cDNA probes as a complementary technique in tissue typing. *Human Immunol* 11:57, 1984.

Angelini G, de Preval C, Ferrara GB, Mach B. Analysis and segregation of HLA-DR by DNA typing: correlation with super typic specificities. (1984). En: ED Albert, MP Baur, WR Mayr, Eds. *Histocompatibility Testing 1984*. Berlin, Springer Verlag, pp.582-584.

Babbitt B, Allen P Matsueda G, Haber E, Unanue E (1985). Binding of immunogenic peptides to the Ia histocompatibility molecules. *Nature* 317:359.

Barnaba V, Musca A, Cordova C, Levrero M, Roucco G, Alberti ni-Petroni V, Balsano F. (1983). Relationship between T cell subsets and suppressor cell activity in chronic hepatitis B virus (HBV) infection.

Baur MP, Neugebauer M, Albert ED. (1984). Reference tables of two locus haplotypes frequencies for all MHC marker loci. En:ED Albert, MP Baur, WR Mayr, Eds.. *Histocompatibility testing 1984*. Berlin, Springer-Verlag, pp. 677-755.

Benton WD, Davis RW (1977). Screening lambda-gt recombinants clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* 196:180.

Bevan M (1987). Class discrimination in the word of immunology. *Nature* 325:192.

Bhayani H, Hedrick S (1991). The role of polymorphic amino acids of the MHC molecules in the selection of the T-cell repertoire. *J Immunol* 146:1093.

Biddison WE, Kostyu DD, Strominger JL, Krangel MS (1982). Delineation of immunologically and biochemically distinct HLA-A2 antigens. *J Immunol* 129:730.

Birnboim HC y Doly J (1979). A rapid alkaline extraccion procedure for screening recombinant plasmids DNA. *Nucl Acids Res* 7:1513.

Bjorkman PJ, Saper MA, Samaraoui B, Bennett WS, Strominger JL, Wiley DC. (1987). Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329:506-512.

- Bodmer WF, Payne R. (1966). Theoretical consideration of leukocyte grouping using multispecific antisera. En: H. Balner et al. Eds. Histocompatibility testing 1966. Copenhagen, Munksgaard, pp. 1941.
- Bodmer JG, Marsh SGE, Parham P, Erlich HA, Albert E, Bodmer WF, Dupont B, Mach B, Mayr WR, Sasazuki T, Schreuder GMTh, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI (1990). Nomenclature for factors of the HLA system, 1989. *Hum Immunol* 28:326.
- Bodmer W, Albert E, Bodmer J, Dupont B et al. Nomenclature for factors of the HLA system, 1987. In Dupont B (ed.): Immunobiology of HLA Vol. I Histocompatibility Testing 1987. New York, Springer-Verlag, 1989, pp 72-79.
- Boehmer von H, Haas W, Jerne N (1978): Major histocompatibility complex linked immune responsiveness acquired by lymphocytes of low responder mice differentiating in thymus of high-responder mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 75:2439.
- Braun W, Ronan J, Schacter B, Gardin J, Isner J, grecek D (1977). HLA antigens in mitral valve prolapse. *Transl Proceed* 9:1869.
- Breathnach R and Chambon P (1981). Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. *Ann Rev Biochem* 50:349.
- Breuning MH, Breur BS, Engelsma MY, Goulmy E, Ivanyi P (1984). Activation of cytotoxic T lymphocytes in HLA-A, -B and -C identical responder-stimulator pairs. II. New subtypes of HLA-Bw35. *Tissue Antigens* 24:90.
- Brown M, Driscoll J, Monaco J (1991). Structural and serological similarity of MHC-linked LPM and proteasome (multicatalytic proteinase) complexes. *Nature* 353:335.
- Buus S, Sette A, Colon S, Jenis D, Grey H (1986). Isolation and characterization of antigen -Ia complexes involved in Tcell recognition. *Cell* 47:1071.
- Carroll M, Katzman P, Alicot E, Koller B, Geraghty D et al (1987). Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:8535.
- Chen B, Parham P (1989). Direct binding of influenza peptides to class I molecules. *Nature* 337:743.
- Chimini G, Pontarotti P, Nguyen C, Toubret A, Boretto J and Jordan B (1988). The chromosome region containing the highly poly-

morphic HLA class I genes display limited large scale variability in the human population. EMBO J 7:395.

Chistinck E, Luscher M, Barber B, Williams D (1991). Peptide binding to class I MHC on living cells and quantitation of complexes required for CTL lysis. Nature 352:67.

Chorney MJ, Sawada I, Gilliespie GA, Srivastava R, Pan J, Weissman SM. Transcription analysis, physical mapping, and molecular characterization of a nonclassical human leukocyte antigen class I gene. Mol Cell Biol 10:243, 1990.

Choo SY, Hannsen J (1989). Human Immunology Program and Abstracts (15th Annual ASHI Meeting). Abs. 42-02, Elsevier.

Cohen D, Dausset J. HLA gene polymorphism. (1983). En: Y Yamamura, T Tada, Eds. Progress in Immunology. Academic Press, Japan, pp 1-12.

Cohen D, Paul P, Font M-P, Cohen O, Sayagh B, Marcadet A, Busson M, Mahouy G, Cann HM, Dausset J. (1983). Analysis of HLA class I genes with restriction endonuclease fragments: implications for polymorphism of the human major histocompatibility complex. Proc Natl Acad Sci USA 80:6289.

Cohen-Haguenaer O, Robbins E, Massart C, Busson M et al (1985). A systematic study of HLA class II- β DNA restriction fragments in insulin-dependent diabetes mellitus. Proc Natl Acad Sci USA 82:3335.

Coligan J 1990. Oral communication at the Third IIGB Workshop on the molecular biology of the MHC genes. October 1990.

Cowan EP, Jordan BR, Coligan JE (1985). Molecular cloning and DNA sequence analysis of genes encoding cytotoxic T lymphocyte-defined HLA-A3 subtypes: the E1 subtype. J Immunol 135:2835.

Cullinan M, Sachs J, Wolf E, Seymour G (1980). The distribution of HLA-A and -B antigens in patients and their families with periodontosis. J Periodont Res 15:177.

Dembic Z, Haas W, Weiss S, McCubrey et al. (1986). Transfer of specificity by murine α and β T-cell receptor genes. Nature 320:232.

Dausset J, Heurotti JG. (1982). HLA and Bw35: Possible influence of Mg metabolism. Tissue Antigens 20:81-85.

Davis MM & Bjorkman P. (1988). T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. Nature 334:395.

Driesel AJ, Romer K, Schunter F, Laryea MD, Scheider EM,

Wernet P, Henke J, Basler M, Kompf J. (1985). DNA polymorphism of the major histocompatibility class I genes and their association with serologically defined haplotypes. *Immunogenetics* 21:529.

Dunham I, Sargent CA, Trowsdale J, Campbell RD. (1987). Mapping of the human major histocompatibility complex by pulse field gel electrophoresis. (Abstract). Tenth International Histocompatibility Conference, N.York.

Egel R (1981). Intergenic conversion and reiterated genes. *Nature* 290:191.

Ehrlich R, Maguire J, Singer D (1988). Identification of negative and positive regulatory elements associated with a class I major histocompatibility complex gene. *Mol Cell Biol* 8:695.

Ennis P, Zemmour J, Salter R and Parham P (1990). Rapid cloning of HLA-A, -B cDNA by using polymerase chain reaction: frequency and nature of errors produced in amplification. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 87:2833.

Fainboim L, Jaraquemada D, Festenstein H, Sachs JA. (1981). MHC specified lymphocyte activating and suppressor determinants in human mixed lymphocyte reactions. *Scand. J. Immunol.* 14:655-675.

Feinberg A, Vogelstein B (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6.

Flavel R, Allen H, Burkly L, Sherman D, Waneck G, Widera G (1986). Molecular biology of the H-2 histocompatibility complex. *Science* 233:437-443.

Flavell RA, Allen H, Huber B, Wake C, Widera G. (1985). Organization and expression of the MHC of the C57 Black/10 mouse. *Immunol. Rev* 84:29.

Friedman R and Stark G (1985). Alpha-interferon-induced transcription of HLA and metallothionein genes containing homologous upstream sequences. *Nature* 314: 637.

Friedman-Birnbaum R, Haim S, Gideone O, Barzilai A (1978). Histocompatibility antigens in granuloma annulare. *Br J Dermatol* 98:425.

Gallina G, Cumbo V, Messina P, et al. (1987). MHC linked factors (HLA-B35) influencing recurrent herpetic diseases. *Disease Markers* 5:91.

Garret TPJ, Saper MA, Bjorkman PJ, Strominger JL, Wiley

DC. Specificity pockets for the side chains of peptide antigens in HLA-Aw68. *Nature* 342:692, 1989.

Geraghty DE, Koller BH, Orr HT. A human histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:9145, 1987.

Geraghty DE, Wei X, Orr HT, Koller BH (1990). Human leukocyte antigen F (HLA-F). An expressed HLA gene composed of a class I coding sequence linked to a novel transcribed repetitive element. *J Exp Med* 171:1.

Germain R (1986). The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature* 322:687.

Glynn R, Powis S, Beck S, Kelly A et al. (1991). A proteasome related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC. *Nature* 353:357.

Goudemand J, Defrenne C, Desmonds F (1977). HLA antigens and atopic dermatitis. *Monogr Allergy* 11:24.

Grey H, et al. (1973). The small subunit of HLA-A antigens is β 2-microglobulin. *J. Exp. Med.* 138:1608.

Grunstein M, Hogness D (1975). Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNA's that contain a specific gene. *Proc Natl Acad Sci.* 72:396.

Guillemot F, Auffray C, Orr H, Strominger J. in *Molecular Immunology*, ed. Hames B, Glover D, IRL Press Limited 1988, pag. 81-143.

Guillet J, Lai M, Briner T, Smith J, Geffer M (1986). Interaction of peptide antigens and class II major histocompatibility complex antigens. *Nature* 324:260.

Gussow D, Rein RS, Meijer I, de Hoog W, Seemann GHA, Hochstenbach FM, Ploegh HL (1987). Isolation, expression, and the primary structure of the HLA-Cw1 and HLA-Cw2 genes: evolutionary aspects. *Immunogenetics* 25:313.

Hakem R, LeBouteiller P, Jezo Bremond A, Campese D, Lemonnier F. Two nucleotide differences between HLA-A3 and HLA-B7 interferon regulatory sequences explain their differential response to interferons. (Abstract). 7th International HLA/H-2 Workshop. Castle of Elmau, Bavaria, Germany, 1990.

Handy D, Burke P, Ozato K, Coligan J (1989). Site specific mutagenesis of the class I regulatory element of the Q10 gene allows expression in non liver tissues. *J Immunol* 142:1015.

Hannahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166:557-580.

Hayashi H, Ennis PD, Ariga H, Salter RD, Parham P, Kano K, Takiguchi M (1989). HLA-B51 and HLA-Bw52 differ by only two amino acids which are in the helical region of the a1 domain. *J Immunol* 142:306.

Hayashi H, Ooba T, Nakayama S, Sekimata M, Kano K, Takiguchi M. (1990). Allospecificities between HLA-Bw53 and HLA-B35 are generated by substitution of residues associated with HLA-Bw4/Bw6 public epitopes. *Immunogenetics* 1180.

Henson V, Maclaren N, Riley W, Weakland EK. (1987). Polymorphisms of DQB β genes in HLA-DR4 haplotypes from healthy and diabetic individuals. *Immunogenetics* 25: 152-160.

Hirata, HA, Terasaki PI (1970). Cross reactions between Streptococcal M proteins and human transplantations antigens. *Science* 168:1095.

Hiwatashi N, Kukichi T, Masamune O, et al (1980). HLA antigens in colorectal cancers and adenomas. *Tohoku J Exp Med* 131:257.

Holmes N, Ennis P, Wan A, Denney D, Parham P (1987). Multiple genetic mechanisms have contributed to the generation of the HLA-A2/Aw2B family of the class I MHC molecules. *J Immunol* 139:936.

Holmes N, Parham P (1985). Exon shuffling in vivo can generate novel HLA class I molecules. *EMBO J.* 4:2849.

Howell MD, Smith JR, Austin RK, Kelleher D, Nepom GT, Volk B, Kagnoff MF. (1988). An extended HLA-D region haplotype associated with celiac disease. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 85:222-226.

Hughes A, Nei M (1988). Pattern of nucleotides substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature* 335:167.

Hui K, Festenstein H, de Klein A, Grosveld G, Grosveld F. (1985). HLA-DR genotyping by restriction fragment length polymorphism analysis. *Immunogenetics* 22:231.

Inoko H, Tsuji K, Groves V, Trowsdale J (1989). In B Dupont (ed). *Immunobiology of HLA vol II. Histocompatibility testing 1987.* New York, Springer Verlag. pp 83-86.

Israel A, Kimura A, Fournier M et al (1986). Interferon response sequence potentiates activity of an enhancer in the promoter region of a mouse H-2 gene. *Nature* 322:743.

Jaulin C, Perrin A, Abastado J et al. (1985). Polymorphism in mouse and human class I H-2 and HLA genes is not the result of random independent point mutations. *Immunogenetics* 22:453.

Jeannot MJ, Carpentier NA, Sztajzel R, Male PJ, Hirschel B. (1987). B35 and Cw4 are risk factors for development of AIDS. X International Histocompatibility Conference. Abstract A3, No.116. N.York.

Jordan BR, Caillol D, Damotte M, Delovitch T, Ferrier P, Kahan-Perles B, Kourilsky F, Layet C, Le Bouteiller P, Lemonnier FA, Malissen M, N'Guyen C, Sire J, Sodoyer R, Strachan T, Trucy J. (1985). HLA class I genes: from structure to expression, serology and function. *Immunol. Rev.* 84:73.

Kachru R, Telischi M, Cruz J, Patel R, Towne (1979). The HLA antigens and ABO blood groups in American black population with mitral valve prolapse. *Tissue Antigens* 14:256.

Kamidono S, Matsumoto O, Ishigami J, Nakao Y, Tsuji K (1980). Infertility and HLA antigen-male infertility and infertile couples. *Andrologia* 12:317.

Kappler J, Rohem M, Marrack P (1987). T-cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49:273.

Kato K, Dupont B, Yang SY (1989). Localization of nucleotide sequences which determine the mongoloid subtype of B13. *Immunogenetics* 29:117.

Kimura A, Israel A, Le Bail O, Kourilsky P (1986). Detailed analysis of the mouse H-2K^b promoter: enhancer-like sequences and their role in the regulation of class I gene expression. *Cell* 44:261.

Klar D and Hammerling G (1989). Induction of assembly of MHC class I heavy chains with beta-2 microglobulin by interferon gamma. *EMBO J* 8:475.

Kohonen MRJ, Serjeantson SW. (1986). RFLP analysis of HLA-DR and -DQ genes and their linkage relationship in the Pacific. *Am. J. Hum. Genet.* 39:751.

Koller BH, Orr HT (1985). Cloning and complete sequence of an HLA-A2 gene: Analysis of two HLA-A alleles at the nucleotide level. *J Immunol* 134:2727.

Koller BH, Sidwell B, DeMars R, Orr HT. (1984). Isolation of HLA locus-specific DNA probes from the 3' untranslated region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:5175.

Koller BH, Geraghty DE, Shimizu Y, DeMars R, Orr HT. HLA-E (1988). A novel HLA class I gene expressed in resting T lymphocytes. *J Immunol* 141:897, 1988.

Korber B, Mermod N, Hood L, Stroynowski (1988). Regulation of gene expression by interferons: control of H-2 promoter responses. *Science* 239:1302.

Korber B, Hood L, Stroynowski L (1987). Regulation of murine class I genes by interferons is controlled by regions located both 5' and 3' to the transcription initiation site. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:3380.

Kvist S, Hamann U (1990). A nucleoprotein of Influenza A Virus stimulates assembly of HLA-B27 Class I heavy chains and β_2 -microglobulin translated *in vitro*. *Nature* 348:446-448.

Lawlor D, Zemmour J, Ennis P, Parham P (1990). Evolution of class I MHC genes and proteins: from natural selection to thymic selection. *Ann Rev Immunol* 8:23-63.

Lawlor D, Ward F, Ennis P, Jackson A, Parham P (1988). HLA-A, B polymorphisms predate the divergence of humans and chimpanzees. *Nature* 335:268.

Lawrence S, Smith C, Srivastava R, Cantor C, Weissman S (1987). Mega-scale mapping of the HLA gene complex by pulse field gel electrophoresis. *Science* 235:1387.

Lederer E, Noßner E, Wank R, Schendel DJ (1989). Analysis of HLA-B35 variants and B35 haplotypes by isoelectric focusing and Southern blot analysis. *Immunogenetics* 30:63.

Lemm G, Salzer K, Warantz H. (1983). Studies on immunoregulatory mechanisms in acute and chronic hepatitis B. *Clin. Exp. Immunol.* 52: 250-258.

López de Castro JA (1989). HLA-B27 and HLA-A2 subtypes: structure, evolution and function. *Immunol Today* 10:215.

Madden DR, Gorga JC, Strominger JL, Wiley DC (1991). The structure of HLA-B27 reveals nonamer self peptides binds in an extended conformation. *Nature* 353:321.

Malissen M, Malissen B, Jordan B (1982). Exon/intron organization and complete nucleotide sequence of an HLA gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:893.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J (1982). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

- Marche P, Tykocinski M, Max E, Kindt T. (1985). Structure of a functional rabbit class I MHC gene: similarity to human class I genes. *Immunogenetics* 21:71.
- Marrack P, Kappler J (1987). The T cell receptor. *Science* 238:1073
- Mattson DH, Handy DE, Bradley D, Coligan J et al (1987). DNA sequences of the genes that encoded CTL-defined HLA-A2 variations M7 and DK1. *Immunogenetics* 26:190.
- Matzinger P (1981). A one-receptor view of T-cell behaviour. *Nature* 292:497.
- Mayer W, Jonker M, Klein D, Ivanyi P (1988). Nucleotide sequences of chimpanzee MHC class I alleles: evidence for trans-species mode of evolution. *EMBO J* 7:2765.
- Mazzilli MC, Trabace S, DiRaimondo F, Visco G, Gandini E. (1977). HLA and chronic active hepatitis. *Digestion* 15:278-285.
- Michaelson J (1983). Genetics of β 2-microglobulin in the mouse. *Immunogenetics* 17:219.
- Miyada C and Wallace B (1986). Liver-specific expression of a Qa encoded class I gene is associated with DNA hypomethylation. *Mol Cell Biol* 6:315.
- Miyazaki J, Appella E, Ozato K (1986). Negative regulation of the MHC class I gene in undifferentiated embryonal carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:9537.
- Moller E, Bohme J, Valuggeri MA et al (1990). Speculations on mechanisms of HLA associations with autoimmune diseases and the specificity of autoreactive T lymphocytes. *Immunological Rev.* 118:5.
- Moller G. Editor. (1985). Molecular genetics of class I and class II MHC antigens. *Immunol. Rev.* 84: pp.7-168.
- Morahan G, Allison J, Miller J (1989). Tolerance of class I histocompatibility antigens expressed extrathymically. *Nature* 339:622.
- Mota A, Fainboim H, Terg R, Fainboim L. (1987). Association of chronic active hepatitis and HLA-B35 in patients with hepatitis B virus. *Tissue Antigens* 30:238-240.
- Nakao Y, Kishihara M, Baba Y, Kuma K et al (1978). HLA antigens in autoimmune thyroid diseases. *Arch Inter Med* 138:567-570.

Nathenson SG, Geliebter J, Pfaffenbach GM, Zeff RA (1986). Murine major histocompatibility complex class-I mutants: molecular analysis and structure-function implications. *Ann Rev Immunol* 4:471.

Neefjers JJ, Breur-Vriesendorp BS, van Seventer GA, Ivanyi P, Ploegh HL (1986). An improved biochemical method for the analysis of HLA class I antigens. Definition of new class I subtypes. *Hum Immunol* 16:169.

Ness DB, Grumet FC. (1986). New polymorphisms of HLA-B27 and other B locus antigens detected by RFLP using a locus-specific probe. *Human. Immunol.* 18:65.

Ooba T, Hayashi H, Karaki S, Tanabe M, Kano K, Takiguchi M (1989). The structure of HLA-B35 suggests that it is derived from HLA-Bw58 by two genetic mechanisms. *Immunogenetics* 30:76.

Parham P, Lawlor DA, Lomen CE, Ennis PD (1989)a. Diversity and diversification of HLA-A,B,C alleles. *J Immunol* 142:3937.

Parham P, Lawlor DA, Salter RD, Lomen CE, Bojorkman PJ, Ennis PD. HLA-A,B,C: patterns of polymorphism in peptide-binding proteins. In: Dupont B (ed.): *Immunobiology of HLA Vol.II Histocompatibility Testing 1987*. New York, Springer-Verlag, 1989, pp 10-32.

Parham P, Lomen C, Lawlor D, et al (1988)a. Nature of polymorphism in HLA-A, -B and -C molecules. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4005.

Parham P. (1988)b. Presentation and processing of antigens in Paris. *Immunol. Today* 9:65-68.

Parnes J (1989). Molecular biology and function of CD4 and CD8. *Adv Immunol.* 44:265-311.

Peterson P, Cunningham B, Berggard I, Edelman G (1972). β 2-microglobulin. A free immunoglobulin domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 69:1697.

Pullen A, Marrack P, Kappler J (1988). The T-cell repertoire is heavily influenced by tolerance to polymorphic self-antigens. *Nature* 335:796.

Reith W, Satola S, Herrero Sanchez C, Amaldi I et al. (1988). Congenital immunodeficiency with a regulatory defect in MHC class II gene expression lacks a specific HLA-DR promoter binding protein, RF-X. *Cell* 53:897-906.

Roith I, Brostoff J, Male D (1985). *Immunology*, Grover Medical Publishing Ltd pag 45.

Rosenthal A, Shevach E (1973). Function of macrophages in antigen recognition by guinea pig. I Requirement for histocompatible macrophages and lymphocytes. J. Exp. Med 138:1194.

Rosina O, Troy K, Tabrizi D et al (1991). Increased frequency of HLA class I antigens A24, B35 and Cw4 in patients with chronic lymphocytic leukemia (Abstract 303). Human Immunol 32:98.

Rothbard J and Taylor W (1988). A sequence pattern common to T cell epitopes. EMBO J 7:93

Rubinstein P, Walker M. (1984). Antigen report: HLA-B35. En: ED Albert, MP Baur, WR Mayr. Histocompatibility Testing 1984. Berlin, Springer-Verlag, pp. 144-145.

Ryder L, Andersen E, Svejgaard A (1979). HLA and disease registry, 3rd Report, Munksgaard, Copenhagen.

Sachs D. En Fundamental Immunology, ed Paul W. Raven Press N Y pag 303-346, 1984.

Salter R, Benjamin R, Wesley et al. (1990). A binding site for the T-cell-co-receptor CD8 on α_3 domain of HLA-A2. Nature 345:41.

Salter R, Nroment A, Chen B, Clayberger et al (1989). Polymorphism in the α_3 domain of HLA-A molecules affects binding to CD8. Nature 338:345

Salter RD, Clayberger C, Lomen CE, Krensky AM, Parham P. In vitro mutagenesis at a single residue introduces B and T cell epitopes into a class I HLA molecule. J Exp Med 166:283, 1987.

Satz ML, Singer DS. (1983). Differential expression of porcine major histocompatibility DNA sequences introduced into mouse L cells. Mol. Cell. Biol. 3: 2006-2016.

Scorza-Smeraldi R, Fabio G, Lazzarini A, et al (1988). HLA-associated susceptibility to AIDS: HLA-B35 is a major risk factor for Italian HIV infected drug addicts. Hum Immunol 22:73.

Shirayoshi Y, Burke P, Appella E, Ozato K (1988). Interferon induced transcription of a major histocompatibility class I gene accompanies binding of inducible nuclear factors to the interferon consensus sequence. Proc Natl Acad Sci USA 85:5884.

Singer D and Maguire J (1990). Regulation of the expression of class I MHC genes. Critical Rev in Immunol 10:235.

Singer DS, Camerini-Otero RD, Satz ML, Osborne B, Sachs D,

Rudikoff S. (1982). Characterization of a porcine genomic clone encoding a major histocompatibility antigen: expression in mouse L cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:1403.

Sissons JGP, Oldstone MBA. (1985). Host responses to viral infections. En: "Virology", BN Fields y col. eds. Raven-Press, N.York, pp. 265-279.

Smeaton I, Summers CW, Harris R, Strachan T. (1987). Restriction fragment length polymorphism at the HLA-C locus. Immunogenetics 25:179.

Snell GD (1968). The H-2 locus of the mouse: Observations and speculations concerning its comparative genetics and its polymorphism. Folia biol 14:335.

Snell D (1981). Studies in histocompatibility. Science 213:172.

Sodoyer R, Damotte M, Delovitch TL, Trucy J, Jordan BR, Strachan T (1984). Complete nucleotide sequence of a gene encoding a functional human class I histocompatibility antigen (HLA-Cw3). EMBO J 3:879.

Sood A, Pereyra D, Weissman SM. (1981). Isolation and partial nucleotide sequence of a cDNA clone for human histocompatibility antigen HLA-B by use of an oligodeoxynucleotide primer. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6161.

Southern E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J.Mol.Biol. 98:503.

Spies T, Bresnahan M, Strominger J (1989). Human histocompatibility complex contains a minimum of 19 genes between the complement cluster and HLA-B. Proc Natl Acad USA 86:8955.

Spits H, Breuninger M, Ivanyi P, Russo C, de Vries J (1982). In vitro-isolated human cytotoxic T lymphocyte clones detect variations in serologically defined HLA antigens. Immunogenetics 16:503.

Sprent J, Lo D, Gao E, Ron Y (1988). T cell selection in the thymus. Immunol Rev. 101:173.

Srivastava R, Chorney M, Lawrence S, Pan J et al (1987). Structure, expression, and molecular mapping of divergent member of the class I HLA gene family. Proc Natl Acad Sci USA 84:4224.

Steere K, Sidwell B, Leach R, Ward FE, Taurog JD, Orr HT. (1987). Use of DNA probes from 5' flanking region of the HLA-B gene to examine polymorphism at the HLA-B locus. Human. Immunol. 16:137.

- Steinmetz M, Moore K, Frelinger J, Taylorsher B et al (1981). A pseudogene homologous to mouse transplantation antigens: transplantation antigens are encoded by eight exons that correlate with protein domains. *Cell* 25:683.
- Strachan T, Dodge AB, Smillie D, Dyer PA, Sodoyer R, Jordan, B.R., Harris, R. (1986). An HLA-C specific DNA probe. *Immunogenetics* 23:115.
- Szots H, Riethmuller G, Weiss E, Meo T. (1986). Complete sequence of HLA-B27 cDNA identified through the characterization of structural markers unique to the HLA-A, -B and -C allelic series. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83:1428.
- Taketani S, Krangel MS, Spits H, DeVries J, Strominger JL. (1984). Structural analysis of an HLA-B7 antigen variant detected by cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 133:815.
- Takiguchi S, Krangel MS, Spits H, deVries J, Strominger JL (1984). Structural analysis of an HLA-B7 variant detected by cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 133:816.
- Tanaka K, Yoshioka T, Bieberich C, Jay G (1988). Role of the major histocompatibility complex class I antigens in tumor growth and metastasis. *Ann Rev Immunol* 6:359-380.
- Teh H, Kisielow P, Scott B, Kishi H, Uematsu Y et al (1988). Thymic major histocompatibility complex antigens and the $\alpha\beta$ T cell receptor determine the CD4/CD8 phenotype of T cells. *Nature* 335:229.
- Terasaki PI, McClelland JD. (1964). Microdroplet assay of human serum cytotoxins. *Nature* 204: 998-1000.
- Tiwari JL, Terasaki, PI. Editors. (1985). "HLA and Disease Associations". Springer-Verlag, N. York.
- Tonelle C, de Mars R, Long E (1985). DO β : a new β chain gene in HLA-D with a distinct regulation of expression. *EMBO J* 4:2839.
- Tood J, Bell J, Mc Devitt H (1987). HLA-DQ β gene contributes to susceptibility and resistance to insulin-dependent diabetes mellitus. *Nature* 335:229.
- Townsend A, Ohlen C, Bastin J et al (1989). Association of class I major histocompatibility heavy and light chains induced by viral peptides. *Nature* 340:443.
- Townsend A, Rothbard J, Gotch F, et al. (1986). The epitopes of influenza nucleoprotein recognized by cytotoxic T lymphocytes can be defined with short synthetic peptides. *Cell* 44:959.

- Townsend A, Bodmer H (1989). Antigen recognition by class I restricted T lymphocytes. *Annu.Rev. Immunol.* 7:601.
- Tragardh L, Lars L, Wiman K, Fohlman J, Peterson P (1979). Amino acid sequence of an immunoglobulin-like HLA-antigen heavy chain domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:5839.
- Trowsdale J, Young J (1985). Structure, sequence and polymorphism in the HLA-D region. *Immunological Reviews* 85: 5-43.
- Trucco M, Rosenshine S, Cascino I, Duquesnoy RJ. (1986). HLA-DQ polymorphism analyzed by sequential restriction endonuclease DNA digestion. *Immunogenetics* 24:184.
- Unanue E, Allen P (1987). The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 236:551.
- van Hattum J, Schreuder GTh, Schlam SW (1987). HLA antigens in patients with various courses after hepatitis B infection. *Hepatology* 7:11.
- van Seventer GA, Huis B, Melief CJM, Iványi P (1986). Fine specificity of human HLA-B7-specific cytotoxic T lymphocyte clones. Identification of HLA-B7 subtypes and histotopes of the HLA-B7 cross-reacting group. *Hum Immunol* 16:375.
- van Schravendijk M, Biddison W, Berger A, Coligan J (1985). Comparative structural analysis of HLA-A3 antigens distinguishable by cytotoxic T lymphocytes:variant E1. *J Immunol* 134:410.
- Van Eden W, Thole JER, van der Zee R et al (1988). Cloning of mycobacterial epitope recognized by T lymphocytes in adjuvant arthritis. *Nature* 331:171.
- Vega MA, Bragado R, Ivanyi P, Peláez JL, López de Castro JA (1986). Molecular analysis of a functional subtype of HLA-B27. A possible evolutionary pathway for HLA-B27 polymorphism. *J Immunol* 137:3557.
- Ways JP, Coppin HL, Parham P. (1985). The complete primary structure of HLA-Bw58. *J Biol Chem* 260:11924.
- Wei X, Orr H (1990). Differential expression of HLA-E, Hla-F and HLA-G transcripts in human tissue. *Human Immunol* 29:131.
- Weiss EH, Kuon W, Dorner C, Lang M, Riethmuller G (1985). Organisation, sequence and expression of the HLA-B27 gene: A molecular approach to analyze HLA and disease associations. *Immunobiol* 170:367.
- Weiss E, Golden L, Zakut R, et al (1983). The structure of a

mutant H-2 gene suggest that the generation of polymorphism in H-2 genes may occur by gene conversion events. Nature 301:671.

Weissman J and Singer D (1991). Striking similarities between the regulatory mechanisms governing yeast mating type genes and mammalian major histocompatibility complex genes. Mol Cell Biol 11:4228.

Weissman J and Singer D (1991). A complex regulatory DNA element associated with a major histocompatibility complex class I gene consists of both a silencer and an enhancer. Mol Cell Biol 11:4217.

White P, New M, Dupont B (1986). Structure of the human steroid 21-hydroxylase genes. Proc Natl Acad Sci USA 83:5111.

Wu T, Kabat E (1970). An analysis of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. J Exp Med 132:211.

Yamamoto KR, Alberts BM, Benzinger R, Lawhorne L et al (1970). Virology 40:374.

Yang SY. Population analysis of HLA class I antigens by one-dimensional isoelectric focusing gel electrophoresis: Workshop summary report. In Dupont B (ed.): Immunobiology of HLA Vol. I Histocompatibility Testing 1987. New York, Springer-Verlag, 1989, pp. 309.

Zemmour J, Koller BH, Ennis PD, Geraghty DE, Lawlor DA, Orr HT, Parham P (1990). HLA-AR, an inactivated antigen-presenting locus related to HLA-A. Implications for the evolution of the MHC. J Immunol 144:3619.

Zinkernagel R, Doherty P (1974). Nature 248:701.

