



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

“Análisis molecular del exon 2 del gene
MICA en una población mestiza mexicana”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

PRESENTA

ARACELI GARCÍA DEL VALLE

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN

MÉXICO, D. F.

AGOSTO, 2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN FUE REALIZADO CON EL APOYO DE UNA BECA OTORGADA POR EL PROGRAMA DE APOYOS PARA LA SUPERACIÓN DEL PERSONAL ACADÉMICO DE LA UNAM (PASPA).

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL

DR. JORGE FLAVIO MENDOZA RINCÓN
DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
DR. GILBERTO VARGAS ALARCÓN

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN:

LABORATORIO DE ONCOLOGÍA DE LA UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN DIFERENCIACIÓN CELULAR Y CÁNCER DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA DE LA UNAM.

LABORATORIO DE HLA DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA DEL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS.

INDICE

Resumen	I
Abstract	II
Capítulo 1: Antecedentes	
1.1. Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC)	1
1.2. Moléculas clase I	5
1.2.1. Estructura de las moléculas de clase I	5
1.2.2. Estructura tridimensional	6
1.2.3. Productos de los genes clase Ia	8
1.2.4. Genes de la Región Ib	8
1.3. Moléculas clase II	10
1.3.1. Estructura de las moléculas clase II	10
1.3.2. Estructura tridimensional	10
1.3.3. Productos de los genes clase II	12
1.3.4. Distribución	12
Capítulo 2. Genes MIC (Major Histocompatibility Complex Class I Chain-Related Genes)	14
2.1. Características moleculares	16
2.2. Polimorfismo de los genes MICA y MIC	17
2.3. Tipos celulares donde se expresan	43
2.4. MICA y su Asociación con Enfermedades Autoinunes, Inflamatorias e Infecciosas	44
2.5. Estudios del polimorfismo de MICA	45
2.6. MICA y NKG2D	55
Capítulo 3: Objetivos e Hipótesis	
3.1. Objetivo General	57
3.2. Objetivos particulares	57
3.3. Hipótesis	57
3.4. Metas	58
Capítulo 4:	
Justificación	59

Capítulo 5: Metodología

5.1. Población en estudio	61
5.2. Material Biológico	61
5.2.1. Extracción de DNA	62
5.3. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	63
5.3.1. Diseño de "primers"	63
5.3.2. Condiciones para la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR)	64
5.4. Electroforesis para verificar la presencia de los exones amplificados	65
5.4.1. Técnica para electroforesis en gel de agarosa	66
5.5. Caracterización molecular del exon 2 del gen MICA e identificación por medio de hibridación molecular (SSOP).	67
5.5.1. Sondas de oligonucleótidos	67
5.3.2. Hibridación de los productos de PCR	68
5.5.2. Revelado de la hibridación	69
5.6. Análisis de los resultados	70

Capítulo 6: Resultados

6.1. Muestras de DNA	71
6.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	72
6.2.1. Oligonucleótidos (Primers)	72
6.2.2. Condiciones para la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR)	72
6.3. Caracterización molecular del exon 2 del gen MICA e identificación por medio de hibridación molecular (SSOP).	73
6.3.1. Sondas de oligonucleótidos	73
6.3.2. Patrones de hibridación	74

Capítulo 7:

Discusión	78
-----------	----

Capítulo 8:

Conclusiones	81
--------------	----

Capítulo 9:

Bibliografía	82
--------------	----

Tablas

1.1	Descubrimientos históricos más importantes del HLA	3
1.2	Distribución de alelos del sistema HLA	9
2.1	Lista de alelos MICA y MICB asignados hasta julio 2006	18
2.2	Codones polimórficos del gene MICA	19
2.3	Listado de los 61 alelos de MICA descritos hasta julio 2006, indicando nomenclatura, célula donde fue identificado, número de acceso y referencia	22
2.4	Estudios del polimorfismo de MICA en diferentes poblaciones	51
5.1	Localización de los iniciadores usados para la amplificación del exon 2 de MICA	64
5.2	Condiciones de amplificación en el termociclador (M.J. Research PTC-200 Cycler)	65
5.3	Sondas usadas para la determinación de los alelos MICA. Secuencia y ubicación	68
6.1	Secuencia, ubicación, codón polimórfico y aminoácido correspondiente de las sondas empleadas para la determinación de los alelos MICA	73
6.2	Patrón de hibridación para cada uno de los alelos y las sondas	74
6.3	Patrón de hibridación de las sondas de oligonucleótidos para los 7 grupos de alelos de MICA	75
6.4	Patrón de hibridación de las sondas de oligonucleótidos para los alelos de MICA (Heterocigotos)	76
6.5	Frecuencia de alelos MICA identificados en población mestiza mexicana. N=62	77

Figuras

1.1	Mapa molecular del complejo mayor de histocompatibilidad	4
1.2	Vista lateral de la molécula clase I	6
1.3	Orientación de las cadenas laterales de un nona péptido unido a una MHC de clase I	7
1.4	Vista lateral de la molécula clase II	11
2.1	Localización genómica de los genes MIC con respecto a los genes del MHC clase I	15
2.2	MICA, Estructura tridimensional (Li et al. 1999).	17
2.3	Porcentajes de las frecuencias de los alelos de MICA más comunes en seis poblaciones (Collins RW., 2004)	50
2.4	Interacción entre MICA, sobreexpresado bajo estrés o en células cancerosas y su receptor NKG2D en la célula NK. La interacción de ambos activa a la proteína DAP10 con la consecuente destrucción de la célula dañada	55

Gráfica

6.1	Datos demográficos de los familiares (padres y abuelos de los donadores)	71
-----	--	----

RESUMEN

Mucho se ha avanzado en el conocimiento de la biología de los genes MIC (MHC class I Chain related genes) desde su primera descripción hace 12 años, y al igual que los genes de MHC son altamente divergentes. En esta familia, los genes MICA y MICB están estrechamente relacionados y codifican para transcritos de 1382 y 2376 pares de bases (pb) respectivamente. La molécula MICA es codificada por un gene de gran longitud poco común, de 11722 (pb), localizado aproximadamente a 46 kilobases (kb) del centrómero en dirección al locus *HLA-B*. Constituido por 6 exones, los exones 2, 3 y 4 codifican para los tres dominios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) de la proteína madura y presentan un amplio polimorfismo. Inicialmente Bahram y colaboradores identificaron mediante secuenciación del DNA de líneas celulares homocigóticas 16 variantes alélicas para el gene MICA y sólo 5 para el gene de MICB. Actualmente, el número de variantes alélicas se ha incrementado considerablemente hasta llegar a 61 para el caso de MICA y de 25 para MICB. La identificación de nuevos alelos ha estado motivada por el creciente interés de conocer la asociación de esta nueva familia de genes en estudios de poblaciones, así como su vínculo con los genes *HLA-B*, debido a su cercanía, y en consecuencia su participación en diversos padecimientos donde *HLA-B* está involucrado, ya que se ha demostrado una estrecha asociación del gene MICA y del *HLA-B* en ciertas enfermedades inflamatorias, infecciosas, degenerativas o autoinmunes, como la enfermedad de Behcet, la enfermedad autoinmune de Addison, la psoriasis y la Diabetes tipo 1. Como consecuencia de la variedad de métodos empleados y las dificultades técnicas para determinar el polimorfismo de MICA, existe poca información con respecto a la frecuencia de los alelos de MICA en diferentes grupos étnicos. Existen estudios en los que se ha determinado el polimorfismo de los exones 2-5 del gene MICA en Norteamericanos caucásicos, Japoneses, Coreanos, Chinos, Tailandeses, Indios sudamericanos, Africanos-americanos y Brasileños.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue analizar el polimorfismo del exon 2, que representa una de las regiones más polimórficas del gene MICA, de una población mestiza mexicana, empleando plantillas moleculares específicas (SSOP, por sus siglas en inglés), con la finalidad de establecer la frecuencia de los diferentes alelos de este exon, por lo que fue necesario establecer previamente la metodología que emplea las plantillas moleculares específicas.

Se observó que las plantillas moleculares detectaron 6 de los 7 grupos catalogados con base al patrón de hibridación y que el heterocigoto de los grupos MICA*002 y MICA*004 presenta la mayor frecuencia, con una frecuencia génica de 24 %, seguido de MICA*010 y grupo MICA*002 con una frecuencia génica de 19%.

Los resultados obtenidos representan la primera vista de la distribución de estos alelos en la población mexicana y contribuirán a su conocimiento y el de sus relaciones con *HLA* y algunas enfermedades.

ABSTRACT

There has been a great deal of information in the understanding of the biology of genes MIC (MHC class I Chain related genes), since they were first described 12 years ago. Within this family, MICA and MICB genes are closely related and code for transcripts of 1382 and 2376 pair bases respectively. MICA molecule is specified by an unusual large gene of 11722, which is located 46 kilobases (Kb) centromeric to the *HLA-B* gene, formed by 6 exons. Exons 2, 3, and 4 code for the three extracellular domains ($\alpha 1$, $\alpha 2$, and $\alpha 3$) of the protein and which are highly polymorphic. At first Bahram and co-workers identified by DNA sequencing of homozygous cell lines, 16 allelic variants on MICA gene and only five for MICB gene.

Nowadays, the number of allelic variants has increased up to 61 in the case of MICA and 25 for MICB. Clearly, the research about all these new alleles has been motivated by the growing concern of knowing the association of this new gene family in population-based studies and its link to genes *HLA-B*, due to its close relationship, and thus its association with different diseases where *HLA-B* is involved. It has been demonstrated the close link of MICA and *HLA-B* genes in certain inflammatory, infectious, degenerative or autoimmune diseases, as Behcet's disease, autoimmune Addison's disease, Psoriasis and type 1 Diabetes. As a result of the variety of methods and the technical complexity in determining the polymorphism of MICA, there is little information about the frequency of MICA alleles in different ethnic groups. However, studies have determined the polymorphism of exons 3-5 of MICA gene in North American Caucasian, Japanese, Korean, Chinese, Thais, Indians, South American, African-Americans and Brazilians.

Taking into consideration all this information, the goal of this work was to study the polymorphism on exon 2, which represents one of the most polymorphic regions of the MICA gene, in a Mexican mestizo population. By using sequence-specific oligonucleotide probes (SSOP), the frequency of different alleles that are present in this exon was established. Previously, it was necessary to establish the experimental conditions for the sequence-specific oligonucleotide probes (SSOP). These probes recognized that 6 out of 7 cataloged groups based on the hybridization pattern were present and that the heterozygous groups MICA*002 and MICA*004 showed the higher frequency, with a gene frequency of 24%, followed by MICA*10 and MICA*002 with 19% of gene frequency.

The results represent the first outlook of the distribution of this alleles in a Mexican population and will contribute to the understanding of MICA genes and its relationship with the *HLA* genes and some diseases.

ANTECEDENTES

1.1 COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD (MHC)

El complejo principal de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) está constituido por un grupo de genes con funciones inmunológicas y no inmunológicas, localizado en la banda p21.3 (6p21.31 a 6p21.33) del brazo corto del cromosoma 6, que cubre alrededor de 4 megabases (4 millones de pares de bases) de DNA, representando casi el 2.5% de la longitud total del cromosoma (Gruen y Weissman 1997, Shiina T et al., 1999, Fainboim y Geffner 2005, Dorak MT 2006).

Dentro del MHC el llamado HLA (antígenos de leucocitos humanos) en el humano y H-2 en el ratón, está presente en todos los vertebrados superiores estudiados hasta el momento (Radillo 1999). El MHC es un locus genético muy polimórfico que codifica la expresión de una serie de glicoproteínas, el cual fue identificado originalmente por el papel que juega en el rechazo de los trasplantes. Cuando se injertan tejidos de un individuo a otro de la misma especie, la presencia de alelos idénticos o distintos en los productos codificados por el MHC, determina la sobrevivencia del injerto. Sin embargo, puesto que el trasplante no es una condición fisiológica, actualmente se conoce el verdadero papel biológico de las moléculas del HLA, la inducción y regulación de la respuesta inmunológica contra los antígenos extraños y su función central es la presentación de péptidos antigénicos al receptor del linfocito T (TCR) (Janeway et al. 2001, Fainboim y Geffner 2005).

La motivación para su descubrimiento en 1954 fue la investigación de regiones genéticas, cuya compatibilidad era la base para la aplicación clínica en los trasplantes, buscando analogía con los sistemas de grupos sanguíneos. Para la definición inicial de los antígenos HLA se usó serología empleando antisueros que contenían anticuerpos contra dichos antígenos. Los sueros provenían inicialmente de sujetos politransfundidos y un poco después de mujeres multíparas, los cuales

se siguen usando en las técnicas serológicas. Los reactivos definen a la diversidad antigénica que existe entre los individuos y las diferencias se detectan a nivel de las proteínas, pero obviamente, la serología no puede distinguir los polimorfismos sinónimos que se presentan a nivel del DNA y que no se traducen en diferencias de aminoácidos.

El desarrollo explosivo del conocimiento del complejo HLA y sus aplicaciones ha sido el resultado de la organización de los Talleres Internacionales de Histocompatibilidad. En ellos cientos de laboratorios intercambian reactivos, (células, anticuerpos, etc.) y realizan estudios conjuntos, con protocolos estandarizados que permiten identificar nuevos alelos HLA. En la década de los 70 surgieron las primeras evidencias experimentales que mostraron que los linfocitos T requieren para su activación, del reconocimiento simultáneo del antígeno junto a MHC (moléculas de histocompatibilidad) presentes en la superficie de células *presentadoras*. Este fenómeno se denominó restricción en el reconocimiento T por el MHC. En la década de los 80 se demostró que, a diferencia de los anticuerpos, el receptor T interactúa con epítopes secuenciales del antígeno (péptidos cortos de 8 a 20 aminoácidos generados por procesamiento intracelular) acarreados por las moléculas del MHC. Existen dos tipos de moléculas del MHC que cumplen esta función de presentación antigénica, llamadas *moléculas del MHC de clase I y de clase II*, que presentan péptidos antigénicos a los linfocitos T CD8 y a los linfocitos T CD4, respectivamente (Radillo 1999, Janeway et al. 2001).

Los descubrimientos históricos más importantes se enlistan en la tabla 1.1.

Tabla 1.1.- Descubrimientos históricos más importantes del HLA (Radillo 1999).

AÑO	LUGAR, INVESTIGADOR	DESCUBRIMIENTO, AVANCES
1937	Peter Gorer. USA	Bases genéticas del rechazo de trasplantes. Identificación del MHC del ratón (sistema H-2).
1958	George Snell. USA	Generación de cepas congénitas para la localización de Iso genes en el ratón.
1954	Jean Dausset. París Francia	Descubrimiento del complejo HLA. Primera técnica serológica (aglutinación).
1962	Donall Thomas y col. USA	Trasplante de médula ósea en perros.
1964	Bernard Amos. Durham USA	Tipificación de antígenos HLA por serología
	Paul Terasaki. USA	Microcitotoxicidad para la definición serológica HLA.
1965	Jon Van Rood. Holanda	Trasplante de órganos sólidos. Descubrimiento de los antígenos HLA A y B.
1967	Ruggiero Cepellini. Italia	Segregación familiar mendeliana. Leyes de la herencia del complejo HLA.
1970	Paul Terasaki. USA	Asociación HLA y enfermedad. Uso de aloantisueros como reactivos.
1974	Ralph Zinkernagel y Peter Doherty. Australia	Descubrimiento de la restricción MHC para los linfocitos T citotóxicos.
1975	Flemming Kismeyer, Nielsen U. Dinamarca	Tipificación de antígenos clase II por CML; identificación en linfocitos B.
1977	Walter Bodmer. Gran Bretaña	Organización genética de la región de clase II. Cultivo de mezcla de linfocitos secundarios (PLT). Producción de anticuerpos monoclonales.
1980	Paul Terasaki. USA	Tipificación serológica de HLA-DR. Análisis de haplotipos. Estructura bioquímica. Isoelectroenfoque.
1980	Hidde L. Ploegh y col. USA	Clonación y secuenciación de un gen clase I.
1984	Ekkehard A. Wolf Mayr. Alemania/Austria	Análisis bioquímico de proteínas I y II. Tipificación de HLA-D con CML/ células homocigotas. Tipificación de DNA.
1987	Bo Dupont. USA	Mapeo de genes clase I y II por RFLPs. Tipificación de HLA-DP con PLT. Correlación de estructura con función. Tipificación con DNA. Mecanismos moleculares de asociación enfermedad /HLA.
1987	Pamela Bjorkman y col. USA	Cristalografía de la molécula HLA-A2.
1991	Kimiyoshi Tsuji. Japón	PCR para la tipificación de clase II. Mecanismos moleculares de la función HLA; de asociación HLA/ enfermedades del rechazo de trasplantes. Polimorfismo molecular de clase II en poblaciones.
1993	Jerry Brown y col. USA	Cristalografía de la molécula HLA-DR1.
1996	Dominique Charron. Francia	PCR para tipificar clase I. Mecanismos moleculares de asociación HLA/ enfermedad . Polimorfismo de DNA y antropología clase I y II en poblaciones. Implicaciones y función de la diversidad.

El MHC en el humano se divide en tres regiones de acuerdo a las familias de genes presentes en cada una y desde el telómero hacia el centrómero se presentan: La clase I (2Mb) que codifica péptidos transmembranales de 44 kD asociados en la superficie celular con la β 2-microglobulina; los genes de clase III (1 Mb) inmunológicamente relevantes que codifican componentes del complemento relacionados con la formación de C3 convertasa y los genes que codifican las moléculas de clase II (1 Mb) que son heterodímeros transmembranales (Figura 1.1) (Abbas et al. 2002).

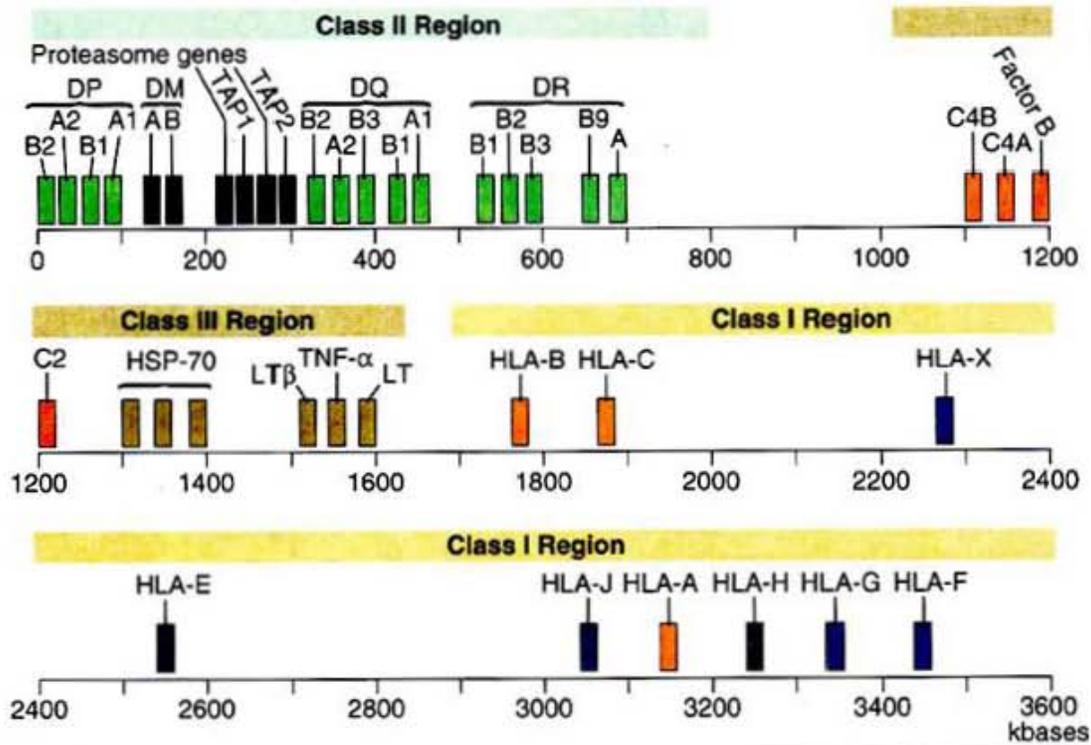


Figura 1.1.- : Mapa molecular del complejo mayor de histocompatibilidad.

<http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/hla.htm> .

En los últimos años el mapa del sistema HLA se ha construido a partir de datos obtenidos con técnicas de diferente resolución, tales como recombinación genética, mapeo físico mediante electroforesis de campo pulsado, y más recientemente a través de secuenciación y clonación (Pérez-Rodríguez 2000).

1.2 Moléculas clase I

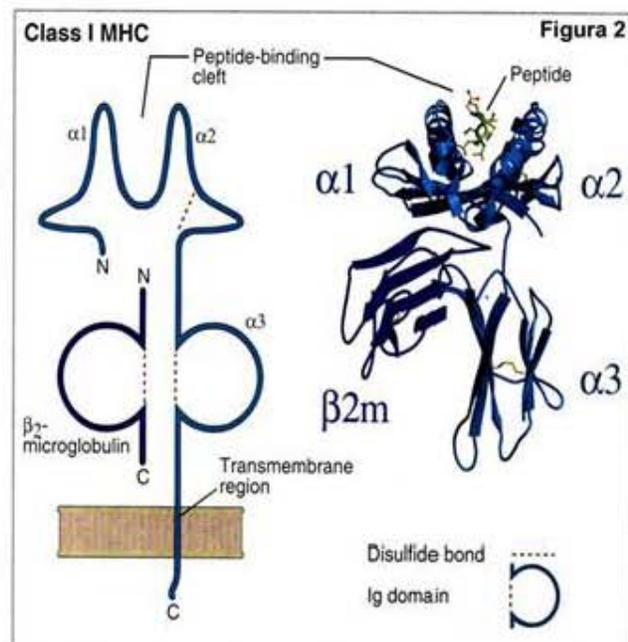
1.2.1 Estructura de las moléculas de clase I

Las MHC de clase I están constituidas por dos polipéptidos: Una cadena pesada α de aproximadamente 340 aminoácidos de longitud, glicosilada, de alrededor de 44 kD de tamaño molecular, asociada no covalentemente a una cadena ligera llamada β 2-microglobulina, no glicosilada, de aproximadamente 12 kD. La cadena α está codificada por genes dentro del MHC mientras que el gen para la β 2-microglobulina está ubicado en un cromosoma distinto (2 en el ratón y 15 en el humano). La cadena pesada posee tres dominios proteicos globulares, llamados alfa 1 (α 1), alfa 2 (α 2) y alfa 3 (α 3), que se exponen en la superficie externa de la membrana plasmática. Cada dominio posee aproximadamente 90 aminoácidos de longitud, siendo el dominio α 1 el que contiene el extremo amino terminal y el dominio α 3 el más cercano a la membrana plasmática. La molécula continúa con un segmento transmembranal hidrofóbico de aproximadamente 30 a 40 aminoácidos de longitud y finalmente termina en el interior de la célula con un segmento hidrofílico de unos 20 a 30 aminoácidos, que contiene el carboxilo terminal. Los dominios globulares α 2 y α 3 poseen su estructura estabilizada por la presencia de puentes disulfuros de cisteínas separadas entre si por aproximadamente 60 aminoácidos, (Figura 1.2). La β 2-microglobulina es un polipéptido globular, estabilizado por puentes disulfuros internos, unido no covalentemente al dominio α 3 de la cadena pesada. No sólo es idéntica en todas las moléculas de clase I, sino que también lo es en todos los individuos de una especie y es muy conservada entre varias especies (Roitt y Delves 2003, Abbas et al. 2002).

1.2.2 Estructura tridimensional

Por análisis cristalográfico de rayos X de una molécula de clase I humana se ha obtenido importante información sobre la función del MHC. Tanto la β 2-microglobulina como la región α 3 se asemejan a los clásicos dominios de las Inmunoglobulinas en su esquema de plegamiento. Pero los dominios α 1 y α 2 más distales a la membrana forman una estructura diferente compuesta por dos hélices α extendidas por encima de un piso creado por 8 filamentos peptídicos (cuatro aportaciones por cada dominio) unidos en una lámina plegada β , que en su totalidad forma una cavidad. La conformación de estos dominios es muy notable, similar a la imagen de dos bananas sobre un plato, a esta estructura se le llama *fosa acanalada o surco* y constituye el *sitio de unión de péptidos*. Las dimensiones de esta estructura son 25 Å de largo x 10 Å de ancho y 11 Å de profundidad, que brinda espacio suficiente para acomodar péptidos pequeños de 8 a 10 aminoácidos. Toda esta estructura estaría apoyada sobre un armazón determinado por los dominios más conservados α 3 y β 2-microglobulina (Margni 1996 , Roitt y Delves 2003).

Figura 1.2.-Vista lateral de la molécula clase I, que muestra con claridad la anatomía del surco y el típico plegamiento inmunoglobulínico.



(<http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/hla.htm>)

Los péptidos que se presentan al linfocito T se acomodan en el nicho o cavidad formada por las 2 α hélices y la estructura β plegada; el sitio esta rodeado por sitios aminoacídicos polimórficos que varían entre las diferentes moléculas de clase I. Esto origina variaciones en la superficie química en el sitio de unión a los péptidos, lo que da lugar a diferentes moléculas en clase I capaces de unir a un gran repertorio de péptidos y esto confiere una ventaja selectiva a la especie en la defensa contra los patógenos.

En el nicho de la molécula de clase I se encuentran unas bolsas (pockets) en las cuales se “encajan” las cadenas laterales de algunos de los residuos de aminoácidos del péptido. El extremo amino se ancla muy profundamente dentro del nicho y forma puentes de hidrógeno con los residuos de tirosina y las moléculas de agua. En el péptido la cadena lateral del primer aminoácido apunta hacia arriba (P1), la del segundo y tercer aminoácido (P2 y P3) se encuentran dentro de las bolsas y el extremo carboxiterminal, P9 tiene su cadena lateral dentro de la bolsa, el grupo carboxilo se encuentra superficial. El centro del péptido, con las cadenas laterales de P4, P5 y P8, apunta hacia fuera y la cadena lateral del residuo de aminoácido 7 puede estar hacia fuera o hacia adentro del nicho (figura 1.3). Estas cadenas forman parte del sitio de reconocimiento del receptor de la célula T (TCR) (Margni 1996, Fainboim y Geffner 2005).

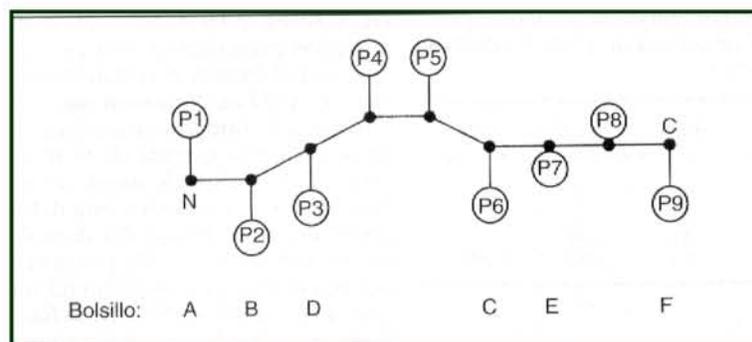


Figura 1.3.-Orientación de las cadenas laterales de un nona péptido unido a una MHC de clase I (Margni 1996).

1.2.3 Productos de los genes clase Ia

El MHC humano contiene, dentro de cerca de 2 Megabases, seis genes clase I, de los cuáles *HLA-A*, *HLA-B* y *HLA-C*, codifican las moléculas polimórficas presentadoras de antígenos a los linfocitos T CD8, estas moléculas reciben también el nombre de moléculas clase I clásicas ó clase Ia (Roitt y Delves 2003). Las tres se expresan simultáneamente en la superficie de casi todas las células con excepción de los glóbulos rojos, las neuronas y el trofoblasto vellosos. Estas moléculas poseen diferentes cadenas pesadas pero comparten la misma cadena β 2-microglobulina. Las cadenas están codificadas por sendos *loci* A, B y C localizados dentro del sistema HLA. Una de las características más sobresaliente de estas moléculas es su enorme polimorfismo poblacional. Se estima que existen más de 450 alelos distintos para la molécula HLA-A, más de 780 alelos diferentes para HLA-B y más de 230 para HLA-C (<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG>), ver tabla 1.2. Teniendo en cuenta que la expresión de estas moléculas es codominante (se expresan simultáneamente las moléculas codificadas por el cromosoma materno y paterno), el multialelismo determina que la mayoría de los individuos sean heterocigotos y exhiban en la superficie celular seis productos de clase I diferentes: dos moléculas HLA-A, dos HLA-B y dos HLA-C (Margni 1996, Fainboim y Geffner 2005).

1.2.4 Genes de la Región Ib

Existen otros genes de clase I denominados no clásicos (o de clase Ib) codificados dentro del HLA y se incluyen *HLA-E*, *-F*, *-G*, *-H* y la familia de genes MIC. Estas moléculas no clásicas se caracterizan por su bajo polimorfismo (con excepción de los genes MICA y MICB). La función biológica de muchas de estas moléculas se ha conocido en los últimos 10 años y el número exacto de genes clase Ib varía según la especie y aún dentro de la misma especie (Dorak 2006, Gruen y Weissman 1997).

Dentro de los genes de clase Ib se ubican genes que mapean dentro del MHC pero también hay otros que por su alta homología con los genes *HLA-A*, *-B* y *-C* se clasifican como de la clase Ib pero que mapean en otros cromosomas del genoma, como los genes para las moléculas CD1 y el que codifica el receptor para la porción Fc de las inmunoglobulinas neonatales (FcRn) (Fainboim y Geffner 2005).

Tabla 1.2.- Distribución de alelos del sistema HLA.

<i>Locus</i>	Alelos	Proteínas	Alelos nulos
HLA-A	451	358	36
HLA-B	782	672	25
HLA-C	238	188	6
HLA-E	9	3	0
HLA-F	20	4	0
HLA-G	23	6	1
HLA-DRA	3	2	0
HLA-DRB	522	430	7
HLA-DQA1	34	25	1
HLA-DQB1	71	55	1
HLA-DPA1	23	14	0
HLA-DPB1	124	111	2
HLA-DMA	4	4	0
HLA-DMB	7	7	0
HLA-DOA	12	3	1
HLA-DOB	9	4	0
TAP1	7	5	1
TAP2	4	4	0
MICA	61	52	0
MICB	25	20	2

Fuente: <http://www.anthonynolan.org.uk/HIG>

Julio de 2006

1.3 Moléculas clase II

1.3.1 Estructura de las moléculas clase II

Las moléculas de clase II también son glicoproteínas transmembranales, están constituidas por dos cadenas polipeptídicas asociadas no covalentemente, una cadena α de 239 aminoácidos (32 a 34 kD) y una β de 237 aminoácidos (29 a 32 kD) ambas codificadas dentro del MHC. Existen grandes similitudes con la molécula de clase I. La región extracelular está formada por 4 dominios 2 de cada cadena, los más próximos a la membrana (α_2 , β_2) pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas y son esencialmente no polimórficos pero tienen algunas variaciones entre los loci de clase II. Estos dominios se encuentran estabilizados por puentes disulfuro intracatenarios (entre cisteínas separadas por aproximadamente 65 residuos) que existen en ambos dominios de la cadena β y en el dominio α_2 (el más próximo a la membrana) de la cadena α . La interacción entre estos dos dominios es importante para la estabilidad de la molécula de clase II (figura 1.4). Ambas cadenas presentan luego del dominio proximal a la membrana citoplasmática, un péptido de conexión de 10 residuos hidrófilos, seguido de un dominio transmembranal de 21 residuos hidrófobos y, en el interior de la célula, una cola citoplasmática de 8 a 18 aminoácidos, según el producto (α o β) en el extremo C-terminal (Roitt y Delves, 2003, Fainboim y Geffner 2005).

El dominio β_2 , interactúa con el CD4 de la célula T durante el reconocimiento del complejo péptido-MHC por su receptor TCR (Janeway et al. 2001, Fainboim y Geffner 2005).

1.3.2 Estructura tridimensional

Recientemente fue establecida la estructura cristalográfica de la molécula HLA-DR1, los dominios α_1 , β_1 , con 90 aminoácidos cada uno, están formados por el extremo amino terminal de cada cadena, e interactúan para formar una plataforma de 8 cadenas β plegadas sobre la cual descansan las dos alfa hélices (figura 1.4).

Esta estructura forma el piso y los lados del nicho de unión al péptido, en donde ambas cadenas participan. Los péptidos clase II sobresalen por los extremos del nicho ya que éste se encuentra abierto, a diferencia de clase I donde los extremos están cerrados y el péptido queda encerrado. Esto determina que las moléculas de clase II acomoden péptidos más largos de 10 a 30 aminoácidos (en promedio de 12 a 18 aminoácidos) unidos por gran cantidad de puentes de hidrógeno, formados entre las cadenas laterales de los residuos de aminoácidos de la molécula y átomos del esqueleto del péptido. Los residuos polimórficos se encuentran en el sitio de unión del péptido.

En un análisis cristalográfico de HLA-DR1 unido a un péptido viral de 13 aminoácidos, se estableció que las cadenas laterales de cinco residuos estaban hundidas en cinco “bolsillos” polimórficos en la molécula HLA-DR; en otras cinco posiciones apuntaban hacia el solvente y por lo tanto eran accesibles al TCR. Estas últimas eran consistentes con estudios funcionales previos, donde se había evaluado la respuesta de células T frente a variantes del péptido antigénico (Fainboim y Geffner 2005).

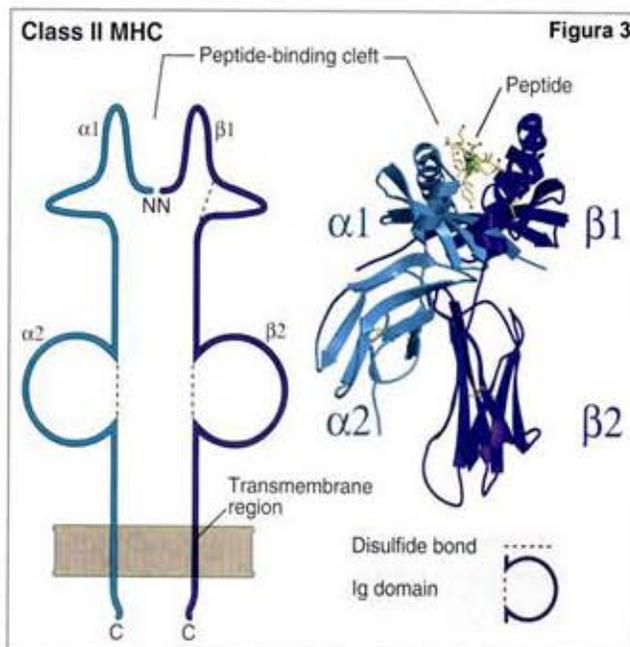


Figura 1.4.-Vista lateral de la molécula clase II, que muestra con claridad la anatomía del surco y el típico plegamiento inmunoglobulínico.

(<http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/hla.htm>)

1.3.3 Productos de los genes clase II

Existe varios productos diferentes de clase II, que se expresan simultáneamente en forma codominante en la superficie celular (la mayoría de los individuos exhibe al menos 6 productos de clase II distintos). Todos los individuos expresan las moléculas *HLA-DR*, *HLA-DQ*, y *HLA-DP*, cada una de ellas constituidas por un dímero: DR α /DR β , DQ α /DQ β , y DP α /DP β . Cada cadena está codificada por un gen respectivo en el sistema HLA, denominados DRA1/DRB1, DQA1/DQB1 y DPA1/DPB1. Algunos individuos expresan un cuarto producto denominado DR52, DR53 ó DRB51, donde la cadena DR α es la misma a la presente en las moléculas HLA-DR y la cadena β es producto de un gen denominado DRB3, DRB4, y DRB5, respectivamente (Marni 1996, Fainboim y Geffner 2005).

Las moléculas de clase II también son muy polimórficas. Los distintos alelos HLA-DR, HLA-DQ y HLA-DP se han identificando y definido a lo largo de los Talleres Internacionales y con la utilización de las técnicas moleculares se conocen a la fecha tres alelos para el gen HLA-DRA, 522 alelos para HLA-DRB, 34 alelos para HLA-DQA1, 71 alelos para HLA-DQB1, 23 alelos para HLA-DPA1 y 124 alelos para HLA-DPB1, ver tabla 1.2 (<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG> Julio 2006, Fainboim y Geffner 2005).

1.3.4 Distribución

Las moléculas clase II poseen una distribución tisular muy restringida, expresándose en la superficie de linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, precursores eritroides, células de Langerhans, epitelio tímico, células de Kupffer y linfocitos T activados, en general la mayoría de las células que no pertenecen al sistema inmunológico no expresan clase II en condiciones normales a no ser que se expongan a niveles altos de INF γ o a estímulos antigénicos; como sucede con los linfocitos T, células NK, células del endotelio vascular, queratinocitos, melanocitos, astrocitos y fibroblastos. Las neuronas son la excepción pues no responden a citocinas y son siempre negativas para clase II. También se hallan en

Complejo Principal de Histocompatibilidad

la superficie de células tumorales, en leucemias, linfomas, melanomas, carcinomas renales, de pulmón, de ovario, de vejiga, de colón y mama (Fainboim y Geffner 2005).

2. GENES MIC (MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS I CHAIN-RELATED GENES)

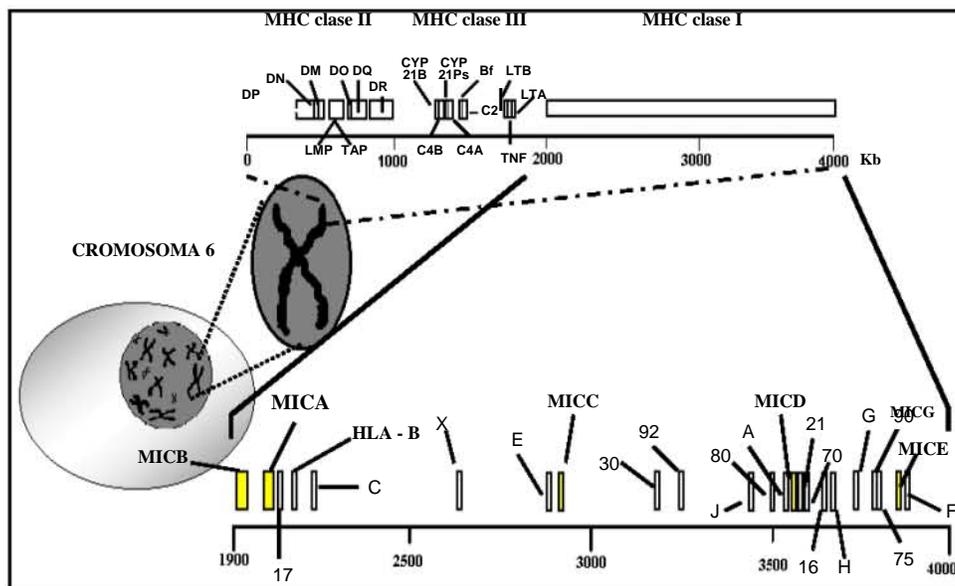
La búsqueda de nuevas secuencias codificadoras en la región cercana al locus HLA-B para dilucidar la asociación entre el HLA-B27 con enfermedades reumatoides e inflamatorias condujo al descubrimiento de una nueva familia, los genes MIC (Major histocompatibility complex class I Chain-related genes, por sus siglas en inglés), conocida también como PERB11 (Bahram et al.1994, Leelayuwat et al. 1994). Estos genes se encuentran en la mayoría de las especies de mamíferos estudiados a la fecha, por lo que se considera que debió de existir (durante la evolución de los genes de clase I) una diversificación temprana que originó a los genes MIC. Por lo tanto, los genes MIC se reconocen actualmente como un segundo linaje del MHC clase I en mamíferos (Bahram et al. 1994).

La familia de los genes MIC se encuentra ubicada a lo largo de las dos megabases de la región clase I del MHC. Esta familia esta formada por siete miembros, MICA (PERB11.1), MICB (PERB11.2), MICC (PERB11.3), MICD (PERB11.4), MICE (PERB11.5), MICE (PERB11.6) y MICG (PERB11.7) (Bahram et al. 1994; Gaudieri et al. 1997a; Gaudieri et al. 1997b; Gaudieri et al. 1997c, Shiina et al. 1999a), de los cuales sólo MICA y MICB codifican para transcritos de RNAm, mientras que MICC, MICD, MICE, MICE y MICG son pseudogenes debido a que presentan varias mutaciones puntuales y deleciones (Bahram et al. 1996a; Ando et al. 1997, Leelayuwat et al. 1995). MICA y MICB se encuentran localizados centroméricamente a 40 kb y 110 kb del locus B, respectivamente, en tanto que MICC, MICD y MICE se encuentran ubicados teloméricamente aproximadamente a 800 Kb, 1400 kb y 1700 kb del locus B (Bahram y Spies, 1996b, Pérez-Rodríguez 2000) (figura 2.1).

En contraste con el amplio conocimiento de los genes clásicos del MHC que han estado bajo intensa investigación, desde hace cerca de 50 años (Stephens 2001), es relativamente poco lo que se conoce de los genes MIC. Ya se ha publicado su

estructura (Bahram et al. 2001, Li et al. 1999) y se han realizado investigaciones en cuanto a la regulación de su expresión, su distribución en los tejidos y su variabilidad alélica (Bahram y Spies, 1996a; Fodil et al. 1996; Groh et al. 1996; 1998, Zwirner et al. 1998, Mendoza et al. 2001). Además parecen tener una importante función en la eliminación de células transformadas, infectadas o dañadas, contribuyendo por lo tanto a la respuesta inmune innata. (Piancatelli et al. 2005).

Figura 2.1.- Localización genómica de los genes MIC con respecto a los genes del MHC clase I



2.1 Características moleculares

Los genes MICA y MICB están estrechamente relacionados y codifican para transcritos de 1382 y 2376 pares de bases (pb) respectivamente (Bahram et al. 1994; Bahram y Spies 1996b). La molécula de MICA es codificada por un gene de gran longitud poco común (si se compara con los 3.5 kb promedio del HLA) de 11722 pb, que se encuentra localizado 46.5 kilobases (kb) centromérico del locus HLA-B; también MICB es codificado por un gene extenso de 12930 pb que está localizado a 83 kb centromérico de MICA (Groh et al. 1996). La organización genómica de MICA y MICB es muy similar y completamente diferente de otros genes de clase I (Bahram y Spies 1996a). En ambos casos un extenso intrón de 6840 pb para MICA y 7352 pb para MICB separa los dos primeros exones. Adicionalmente aparece un sexto exon de 302 pb para MICA y de 1338 para MICB que codifica para la parte citoplasmática y para la secuencia 3' no traducida (3'UT). El exceso en la secuencia 3' UT es por lo tanto responsable de la diferencia de aproximadamente 1 kb de longitud entre los transcritos de MICA y MICB (Bahram et al. 1994; Bahram y Spies 1996b, Fodil et al. 1996). No existe prueba de alguna utilidad de estas singularidades. Como es de esperarse, el alto grado de similitud observado entre las regiones codificadoras de MICA y MICB se extiende a lo largo de ambos genes y se ha encontrado una homología mayor al 90%. (Bahram et al. 1994; Bahram y Spies 1996b).

MICA codifica un transcrito de 1382 pb y MICB uno de 2376 pb, ambos con una región abierta de lectura (open reading frame) de 1149 pb, que da origen a un polipéptido de 383 aa. y 43 kDa sin embargo el mensajero para MICB es un poco más largo debido a su región 3'UT.

Como ya se menciono los genes MICA y MICB son muy similares en estructura, si los comparamos con las moléculas del MHC de clase I sólo comparten una similitud del 19%, 25% y 35% con respecto a los dominios alfa 1 (α 1), alfa 2 (α 2) y alfa 3 (α 3) (Bahram et al. 1994, Bahram y Spies 1996b). A pesar de ello, se ha postulado que sus proteínas se pliegan de manera semejante a las moléculas

MHC de clase I. La proteína madura contiene tres dominios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) precedidos de un segmento transmembranal y una cola citoplasmática relativamente corta. Además, las moléculas de MICA y MICB no se asocian con la Beta₂-microglobulina para su expresión fisiológica en la superficie celular, (Li et al. 1999), sus niveles de RNAm no son afectados por interferón gama, que es un inductor clásico para las moléculas de clase I, son independientes de los transportadores TAP y no presentan antígenos (Bahram 2001).

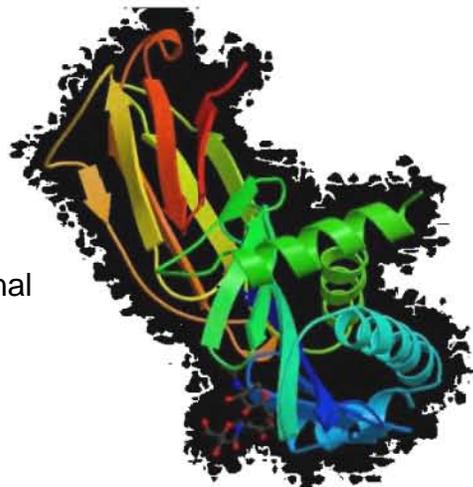


Figura 2.2.- MICA, Estructura tridimensional (Li et al. 1999).

2.2 Polimorfismo de los genes MICA y MICB

Los genes MICA y MICB han resultado ser altamente polimórficos (Bahram et al. 1996a; Bahram et al. 1996b; Fodil et al. 1999). Al principio, mediante secuenciación de líneas celulares homocigotas, se identificaron 16 variantes alélicas para el gene MICA y 5 para el gene MICB (Bahram et al. 1994, Bahram y Spies 1996b, Fodil et al. 1996), posteriormente se registraron 33 alelos para MICA (Visser et al. 1999, Yao et al. 1999) y 11 para MICB (Ando et al. 1997), y en la actualidad se han descrito 61 alelos de MICA y 25 para MICB (Bahram 2001, Zhang et al. 2001, 2002a, 2002b, 2003, Marsh et al. 2002, Quiroga et al. 2006, Gao et al. 2006, <http://www.anthonynolan.com/HIG/lists/otherlist.html>), (tabla 2.1 y 2.3). Estos resultados se han derivado de las investigaciones para determinar las asociaciones de esta familia de genes con diversas poblaciones humanas, pero también, debido a su cercanía con los genes HLA-B, ya que se ha demostrado

estar asociados a éstos en determinados padecimientos (Fodil et al. 1996), tales como la enfermedad de Behcet, (Wallace et al. 1999, Picco et al. 2002, Park SH et al. 2002), la psoriasis (Choi 2002) y la uveitis anterior aguda (Goto et al 1998).

Tabla 2.1.- Lista de alelos MICA y MICB asignados hasta julio 2006

MICA		MICB
MICA*001	MICA*031	MICB*001
MICA*00201	MICA*032	MICB*002
MICA*00202	MICA*033	MICB*003
MICA*004	MICA*034	MICB*004
MICA*005	MICA*035	MICB*00501
MICA*006	MICA*036	MICB*00502
MICA*00701	MICA*037	MICB*00503
MICA*00702	MICA*038	MICB*00504
MICA*00703	MICA*039	MICB*006
MICA*00801	MICA*040	MICB*007
MICA*00802	MICA*041	MICB*008
MICA*00803	MICA*042	MICB*009N
MICA*00804	MICA*043	MICB*010
MICA*00901	MICA*044	MICB*011
MICA*00902	MICA*045	MICB*012
MICA*010	MICA*046	MICB*013
MICA*011	MICA*047	MICB*014
MICA*01201	MICA*048	MICB*015
MICA*01202	MICA*049	MICB*016
MICA*013	MICA*050	MICB*017
MICA*014	MICA*051	MICB*018
MICA*015	MICA*052	MICB*019
MICA*016	MICA*053	MICB*020
MICA*017		MICB*021N
MICA*01801		MICB*022
MICA*01802		
MICA*019		
MICA*020		
MICA*021		
MICA*022		
MICA*023		
MICA*024		
MICA*025		
MICA*026		
MICA*027		
MICA*028		
MICA*029		
MICA*030		

<http://www.anthonynolan.com/HIG/lists/otherlist.html>, <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>

Los estudios del polimorfismo desarrollados con métodos de secuenciación de nucleótidos han revelado que los sitios polimórficos están localizados sobre la molécula (codificados en los exones 2, 3 y 4) y no en dominios particulares como sucede en los genes HLA clásicos (Visser et al. 1999). La mayoría de estos cambios nucleotídicos son no sinónimos (5 de 8 en el exon 2, 15 de 16 en el exon 3 y 10 de 16 en el exon 4, ver tabla No. 2.2) y resultan por lo tanto en el cambio del aminoácido, se ha sugerido que esto sucede probablemente como resultado de alguna forma de selección (selection pressure), (Yao et al. 1999, Pérez-Rodríguez 2000, Collins RW 2004, <http://mhc-x.u-strasbg.fr/human.htm>).

Tabla 2.2.- Codones polimórficos del gene MICA

del exon 2					
Codón					
6	CGT	CCT	Arg	Pro	No sinónimo
14	TGG	GGG	Trp	Gly	No sinónimo
23	<i>CTC</i>	<i>CTT</i>	<i>Leu</i>	<i>Leu</i>	<i>Sinónimo</i>
24	ACT	GCT	Thr	Ala	No sinónimo
26	GTA	GGA	Val	Gly	No sinónimo
36	TGT	TAT	Cys	Tyr	No sinónimo
56	AAT	AAC	<i>Asn</i>	<i>Asn</i>	<i>Sinónimo</i>
64	AGA	AGG	<i>Arg</i>	<i>Arg</i>	<i>Sinónimo</i>
del exon 3					
Codón					
91	CAG	CGG	Gln	Arg	No sinónimo
105	AGG	AAG	Arg	Lys	No sinónimo
112	<i>TAC</i>	<i>TAT</i>	<i>Tyr</i>	<i>Tyr</i>	<i>Sinónimo</i>
114	GGG	CGC	Gly	Arg	No sinónimo
122	CTG	GTG	Leu	Val	No sinónimo
124	ACT	TCT	Thr	Ser	No sinónimo
125	AAG	GAG	Lys	Glu	No sinónimo
129	ATG	GTG	Met	Val	No sinónimo
142	GTC	ATC	Val	Ile	No sinónimo
151	ATG	GTG	Met	Val	No sinónimo
156	CAC	CTC	His	Leu	No sinónimo
156	CAC	CGC	His	Arg	No sinónimo
173	AAA	GAA	Lys	Glu	No sinónimo
175	GGC	AGC	Gly	Ser	No sinónimo
176	GTA	ATA	Val	Ile	No sinónimo
181	ACA	AGG	Thr	Arg	No sinónimo

del exon 4

Codón					
191	AGC	AGT	Ser	Ser	Sinónimo
193	GCC	GCA	Ala	Ala	Sinónimo
198	ATT	ATC	Ile	Ile	Sinónimo
205	TCT	TCC	Ser	Ser	Sinónimo
206	GGC	AGC	Gly	Ser	No sinónimo
210	TGG	CGG	Trp	Arg	No sinónimo
213	ACA	ATA	Thr	Ile	No sinónimo
215	AGC	ACC	Ser	Thr	No sinónimo
221	GTA	CTA	Val	Leu	No sinónimo
247	ACC	ACT	Thr	Thr	Sinónimo
251	CAA	GAA	Gln	Glu	No sinónimo
251	CAA	CGA	Gln	Arg	No sinónimo
255	CAG	CAA	Gln	Gln	Sinónimo
256	AGG	AGT	Arg	Ser	No sinónimo
268	AGC	GGC	Ser	Gly	No sinónimo
271	CCT	GCT	Pro	Ala	No sinónimo

<http://mhc-x.u-strasbg.fr/human.htm>

Por otra parte el exon 5 presenta también polimorfismo, ya que exhibe un número variable de repeticiones del trinucleótido GCT en el dominio transmembranal, las cuales codifican para cuatro, cinco, seis, nueve y 10 residuos de alanina, estas variaciones reciben el nombre de alelos microsatélites A4, A5, A6, A9 y A10 respectivamente. El largo del polipéptido puede variar de 383-393 aminoácidos dependiendo del número de repeticiones de alanina que se presente en la región transmembranal. Una variante del alelo A5 (A5.1) presenta la inserción de un nucleótido (GCT→GGCT), lo que resulta en un codón de terminación (stop) prematuro, y por lo tanto, codifica una molécula carente del dominio intracitoplasmático, (Mizuki et al 1997, Pérez-Rodríguez et al 2000, Bolognesi et al. 2001). Sin embargo la molécula aparentemente no alcanza la superficie y probablemente no se secreta, (Bahram, 2000) o presenta un transporte aberrante hacia la superficie apical de la célula (Collins, 2004). Es interesante notar que la única diferencia entre MICA*008 y MICA*027 es en la región transmembranal (TM), ya que MICA*008 contiene A5.1, codificando para la forma truncada de glicoproteína (Fodil et al. 1999), y MICA*027 tiene el dominio transmembranal

normal A5 (Marin et al. 2004, Collins 2004). Otros alelos que presentan A5.1 son MICA*023 y MICA*028.(Robinson et al. 2001).

Cabe mencionar que también existe el interés por desarrollar estrategias moleculares que puedan emplearse para tipificar a los genes MICA y MICB (Mendoza et al. 1999, Stephens et al. 1999, Zhang Y et al. 2001, Gao X et al. 2006), en los casos en los que su determinación sea indispensable para establecer algún diagnóstico debido a la asociación demostrada de estos genes con el HLA-B, o en estudios de poblaciones en los que la determinación del polimorfismo de estos genes ha manifestado ser importante para un mejor conocimiento de la evolución de las características de esa población y para estudios clínicos, entre otros. Por este motivo el interés de nuestro trabajo se enfoca en desarrollar un sistema para tipificar a los diferentes alelos del gene MICA empleando la determinación de las secuencias del gene MICA por el empleo de plantillas moleculares específicas (PCR-SSOP, por sus siglas en inglés). El sistema basado en esta estrategia ha demostrado ser bastante confiable y reproducible, y a diferencia de la secuenciación directa del ADN, el tiempo de identificación se reduce considerablemente (Mendoza-Rincón et al. 1999, Fischer et al. 2000, Zhang et al. 2001, Zhang et al. 2002a, Gao et al. 2006).

El listado de los 61 alelos de MICA descritos hasta julio 2006, indicando nomenclatura, célula donde fue identificado, número de acceso y referencia se presenta en la tabla 2.3.

Tabla 2.3.- Listado de los 61 alelos de MICA descritos hasta julio 2006, indicando nomenclatura, célula donde fue identificado, número de acceso y referencia

Allele Name	Local Name	Cell ID	Accession Numbers	Authors	Title	Journal	Year	Vol.	Pages	Contact
MICA*001	MICA001	EJ32B IMR90	<u>HLA01013</u>	Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T	<u>A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes</u>	Proc Natl Acad Sci U S A	1994	91	6259-63	Dr Seiamak Bahram
MICA*001	MICA001	DUCAF	<u>HLA01013</u>	Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S	<u>Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene</u>	Immunogenetics	1996	44	351-7	Dr Seiamak Bahram
MICA*001	PERB11.1-18.2	EVA SP	<u>HLA01013</u>	Gaudieri S, Leelayuwat C, Townend DC, Mullberg J, Cosman D, Dawkins RL	<u>Allelic and interlocus comparison of the PERB11 multigene family in the MHC</u>	Immunogenetics	1997	45	209-16	Prof. Roger Dawkins
MICA*001	MICA-EIBA	EJ32B	<u>HLA01013</u>	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	<u>Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes</u>	Immunogenetics	1999	49	561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*001	-	DUCAF	<u>HLA01013</u>	Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura T, Ueda K, Akai J, Ota M, Naruse T, Inoko H, Numano F, Kimura A	<u>Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4</u>	Tissue Antigens	2001	57	520-35	Prof. Akinori Kimura

MICA*001	-	QBL	<u>HLA01013</u>	Traherne JA, Horton R, Roberts AN, Miretti MM, Hurlles ME, Stewart CA, Ashurst JL, Atrazhev AM, Coggill P, Palmer S, Almeida J, Sims S, Wilming LG, Rogers J, de Jong PJ, Carrington M, Elliott JF, Sawcer S, Todd JA, Trowsdale J, Beck S	<u>Genetic analysis of completely sequenced disease-associated MHC haplotypes identifies shuffling of segments in recent human history.</u>	PLoS Genetics	2006	2	e9	Dr. Stephan Beck
MICA*00201	MICA002	YAR	<u>HLA01014</u>	Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T	<u>A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes</u>	Proc Natl Acad Sci U S A	1994	91	6259-63	Dr. Seiamak Bahram
MICA*00201	MICA002	AMAI WT49	<u>HLA01014</u>	Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S	<u>Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene</u>	Immunogenetics	1996	44	351-7	Dr. Seiamak Bahram
MICA*00201	MICA- BEBF	TEM JBUSH 9-2 ZR75-1	<u>HLA01014</u>	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	<u>Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes</u>	Immunogenetics	1999	49	561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*00201	-	YAR	<u>HLA01014</u>	-	-	-	-	-	-	Prof. Akinori Kimura
MICA*00201	-	AMAI	<u>HLA01014</u>	-	-	-	-	-	-	Prof. Akinori Kimura
MICA*00202	MICA- BEE, MICA042	Individual1	<u>HLA01381</u>	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	<u>Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes</u>	Immunogenetics	1999	49	561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus

MICA*004	MICA004	MOU	<u>HLA01015</u>	Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T	<u>A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes</u>	Proc Natl Acad Sci U S A	1994 91 6259-63	Dr Seiamak Bahram
MICA*004	MICA001	BM15 PF97387	<u>HLA01015</u>	Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S	<u>Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene</u>	Immunogenetics	1996 44 351-7	Dr Seiamak Bahram
MICA*004	MICA004	MANN	<u>HLA01015</u>	Bahram S, Mizuki N, Inoko H, Spies T	<u>Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene</u>	Immunogenetics	1996 44 80-1	Dr Seiamak Bahram
MICA*004	MICA-AJCD	RSH Individual2	<u>HLA01015</u>	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	<u>Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes</u>	Immunogenetics	1999 49 561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*005	MICA005	U373	<u>HLA01016</u>	Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE, Spies T	<u>A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes</u>	Proc Natl Acad Sci U S A	1994 91 6259-63	Dr Seiamak Bahram
MICA*005	MICA005	U373	<u>HLA01016</u>	Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S	<u>Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene</u>	Immunogenetics	1996 44 351-7	Dr Seiamak Bahram
MICA*006	MICA006	KAS116	<u>HLA01017</u>	Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S	<u>Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene</u>	Immunogenetics	1996 44 351-7	Dr Seiamak Bahram
MICA*006	MICA-ADCD	KAS116	<u>HLA01017</u>	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	<u>Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes</u>	Immunogenetics	1999 49 561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus

MICA*006	-	KAS116	<u>HLA01017</u>	Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura T, Ueda K, Akai J, Ota M, Naruse T, Inoko H, Numano F, Kimura A	<u>Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4</u>	Tissue Antigens	2001	57	520-35	Prof. Akinori Kimura
MICA*00701	MICA007	JESTHOM BM92	<u>HLA01018</u>	Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S	<u>Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene</u>	Immunogenetics	1996	44	351-7	Dr Seiamak Bahram
MICA*00701	MICA- CEEA	WT24	<u>HLA01018</u>	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	<u>Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes</u>	Immunogenetics	1999	49	561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*00702	MICA- CEB	A34 B27-ci	<u>HLA01382</u>	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	<u>Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes</u>	Immunogenetics	1999	49	561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*00702	MUC-22, MICA023	SchS(child1)- MUC	<u>HLA01382</u>	Yao Z, Volgger A, Helmberg W, Keller E, Fan LA, Chandanayingyong D, Albert ED	<u>Definition of new alleles of MIC-A using sequencing-based typing</u>	Eur J Immunogenet	1999	26	225-32	Prof. Ekkehard D. Albert
MICA*00703	-	U181	<u>HLA02147</u>	-	-	-	-	-	-	Dr. Martin C. N. M. Barnardo
MICA*00801	MICA008	SCHU MGAR SAVC LB JY	<u>HLA01019</u>	Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S	<u>Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene</u>	Immunogenetics	1996	44	351-7	Dr Seiamak Bahram

MICA*00801	PERB11.1- 44.1	R90/7379	<u>HLA01019</u>	Gaudieri S, Leelayuwat C, Townend DC, Mullberg J, Cosman D, Dawkins RL	<u>Allelic and interlocus comparison of the PERB11 multigene family in the MHC</u>	Immunogenetics 1997 45 209- 16	Prof. Roger Dawkins
MICA*00801	PERB11.1- 8.1	REE GD	<u>HLA01019</u>	Gaudieri S, Leelayuwat C, Townend DC, Mullberg J, Cosman D, Dawkins RL	<u>Allelic and interlocus comparison of the PERB11 multigene family in the MHC</u>	Immunogenetics 1997 45 209- 16	Prof. Roger Dawkins
MICA*00801	PERB11.1- 60.3	EMJ	<u>HLA01019</u>	Gaudieri S, Leelayuwat C, Townend DC, Mullberg J, Cosman D, Dawkins RL	<u>Allelic and interlocus comparison of the PERB11 multigene family in the MHC</u>	Immunogenetics 1997 45 209- 16	Prof. Roger Dawkins
MICA*00801	PERB11.1- 47.1	PLH	<u>HLA01019</u>	Gaudieri S, Leelayuwat C, Townend DC, Mullberg J, Cosman D, Dawkins RL	<u>Allelic and interlocus comparison of the PERB11 multigene family in the MHC</u>	Immunogenetics 1997 45 209- 16	Prof. Roger Dawkins
MICA*00801	PERB11.1- 7.1	WAL FD	<u>HLA01019</u>	Gaudieri S, Leelayuwat C, Townend DC, Mullberg J, Cosman D, Dawkins RL	<u>Allelic and interlocus comparison of the PERB11 multigene family in the MHC</u>	Immunogenetics 1997 45 209- 16	Prof. Roger Dawkins
MICA*00801	MICA- AAAC	DKB LBF MGAR SAVC SCHU WT8 JY APD	<u>HLA01019</u>	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	<u>Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes</u>	Immunogenetics 1999 49 561- 6	Dr. Marcel G. J. Tilanus

MICA*00801 -	MADURA	<u>HLA01019</u>	Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura T, Ueda K, Akai J, Ota M, Naruse T, Inoko H, Numano F, Kimura A	<u>Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4</u>	Tissue Antigens	2001	57	520-35	Prof. Akinori Kimura
MICA*00801 -	SAM	<u>HLA01019</u> -	-	-	-	-	-	-	Dr. Gurvinder Kaur
MICA*00801 -	COX	<u>HLA01019</u>	Stewart CA, Horton R, Allcock RJ, Ashurst JL, Atrazhev AM, Coghill P, Dunham I, Forbes S, Halls K, Howson JM, Humphray SJ, Hunt S, Mungall AJ, Osoegawa K, Palmer S, Roberts AN, Rogers J, Sims S, Wang Y, Wilming LG, Elliott JF, de Jong PJ, Sawcer S, Todd JA, Trowsdale J, Beck S	<u>Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping.</u>	Genome Research	2004	14	1176-1187	Dr. Stephan Beck
MICA*00802	MICA- Individual3 AAD	<u>HLA01363</u>	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	<u>Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes</u>	Immunogenetics	1999	49	561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*00802	MICA- GUA-ND AN23	<u>HLA01363</u>	Perez-Rodriguez M, Arguello JR, Fischer G, Corell A, Cox ST, Robinson J, Hossain E, McWhinnie A, Travers PJ, Marsh SG, Madrigal JA	<u>Further polymorphism of the MICA gene</u>	Eur J Immunogenet	2002	29	35-46	Prof. Alejandro Madrigal

MICA*00802	MUC-26, MICA026	BrI(f)-MUC BrID(child1)- MUC MLA-MUC Thai- DCH019	<u>HLA01363</u>	Yao Z, Volgger A, Helmberg W, Keller E, Fan LA, Chandanayingyong D, Albert ED	<u>Definition of new alleles of MIC-A using sequencing-based typing</u>	Eur J Immunogenet	1999 26 225- 32	Prof. Ekkehard D. Albert
MICA*00802	MICA- silent B	01083208 01065930 0183074	<u>HLA01363</u> -	-	-	-	- - -	Dr Yoko Mitsuishi
MICA*00803	MICA- silent C, MICA054	01083082	<u>HLA01402</u> -	-	-	-	- - -	Dr Yoko Mitsuishi
MICA*00804	-	PGF	<u>HLA02488</u>	Stewart CA, Horton R, Allcock RJ, Ashurst JL, Atrazhev AM, Coghill P, Dunham I, Forbes S, Halls K, Howson JM, Humphray SJ, Hunt S, Mungall AJ, Osoegawa K, Palmer S, Roberts AN, Rogers J, Sims S, Wang Y, Wilming LG, Elliott JF, de Jong PJ, Sawcer S, Todd JA, Trowsdale J, Beck S	<u>Complete MHC haplotype sequencing for common disease gene mapping.</u>	Genome Research	2004 14 1176- 1187	Dr. Stephan Beck
MICA*00901	MICA009 AKIBA	RML AKIBA	<u>HLA01020</u>	Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S	<u>Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene</u>	Immunogenetics	1996 44 351-7	Dr Seiamak Bahram
MICA*00901	PERB11.1- 52.1	HARA	<u>HLA01020</u>	Gaudieri S, Leelayuwat C, Townend DC, Mullberg J, Cosman D, Dawkins RL	<u>Allelic and interlocus comparison of the PERB11 multigene family in the MHC</u>	Immunogenetics	1997 45 209- 16	Prof. Roger Dawkins

MICA*00901	MICA-ABCD	AKIBA BOB C1R JHAF LUY RML Individual2	<u>HLA01020</u>	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	<u>Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes</u>	Immunogenetics	1999 49	561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*00901	-	RML E4181324	<u>HLA01020</u>	Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura T, Ueda K, Akai J, Ota M, Naruse T, Inoko H, Numano F, Kimura A	<u>Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4</u>	Tissue Antigens	2001 57	520-35	Prof. Akinori Kimura
MICA*00902	MICA-AFC	MANIKA	<u>HLA01397</u>	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	<u>Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes</u>	Immunogenetics	1999 49	561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*00902	MICA-TAND	TAA	<u>HLA01397</u>	Petersdorf EW, Shuler KB, Longton GM, Spies T, Hansen JA	<u>Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene</u>	Immunogenetics	1999 49	605-12	Dr. Effie Petersdorf
MICA*00902	MICA020	MANIKA	<u>HLA01397</u>	Fodil N, Pellet P, Laloux L, Hauptmann G, Theodorou I, Bahram S	<u>MICA haplotypic diversity</u>	Immunogenetics	1999 49	557-60	Dr Seiamak Bahram
MICA*00902	MUC-20	AE(F)-MUC AS(Child2)- MUC DZA 97-19	<u>HLA01397</u>	Yao Z, Volgger A, Helmberg W, Keller E, Fan LA, Chandanayingyong D, Albert ED	<u>Definition of new alleles of MIC-A using sequencing-based typing</u>	Eur J Immunogenet	1999 26	225-32	Prof. Ekkehard D. Albert
MICA*00902	-	MANIKA	<u>HLA01397</u>	-	-	-	-	-	Prof. Akinori Kimura

MICA*010	MICA010	AMALA	<u>HLA01021</u>	Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S	<u>Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene</u>	Immunogenetics	1996	44	351-7	Dr Seiamak Bahram
MICA*010	PERB11.1-62.1	BOLETH	<u>HLA01021</u>	Gaudieri S, Leelayuwat C, Townend DC, Mullberg J, Cosman D, Dawkins RL	<u>Allelic and interlocus comparison of the PERB11 multigene family in the MHC</u>	Immunogenetics	1997	45	209-16	Prof. Roger Dawkins
MICA*010	PERB11.1-46.1	T7526	<u>HLA01021</u>	Gaudieri S, Leelayuwat C, Townend DC, Mullberg J, Cosman D, Dawkins RL	<u>Allelic and interlocus comparison of the PERB11 multigene family in the MHC</u>	Immunogenetics	1997	45	209-16	Prof. Roger Dawkins
MICA*010	MICA-DGAB	BSM KAS011 TAB089	<u>HLA01021</u>	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	<u>Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes</u>	Immunogenetics	1999	49	561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*010	MUC-18	EM(M)-MUC EM(Child1)-MUC EK-MUC ES-MUC	<u>HLA01021</u>	Yao Z, Volgger A, Helmberg W, Keller E, Fan LA, Chandanayingyong D, Albert ED	<u>Definition of new alleles of MIC-A using sequencing-based typing</u>	Eur J Immunogenet	1999	26	225-32	Prof. Ekkehard D. Albert
MICA*010	-	T7526	<u>HLA01021</u>	Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura T, Ueda K, Akai J, Ota M, Naruse T, Inoko H, Numano F, Kimura A	<u>Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4</u>	Tissue Antigens	2001	57	520-35	Prof. Akinori Kimura
MICA*011	MICA011	LWAGS	<u>HLA01022</u>	Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S	<u>Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene</u>	Immunogenetics	1996	44	351-7	Dr Seiamak Bahram
MICA*011	PERB11.1-65.1	LWAGS	<u>HLA01022</u>	Gaudieri S, Leelayuwat C, Townend DC, Mullberg J, Cosman D, Dawkins RL	<u>Allelic and interlocus comparison of the PERB11 multigene family in the MHC</u>	Immunogenetics	1997	45	209-16	Prof. Roger Dawkins

MICA*011	MICA-BCGE	LWAGS T47D	<u>HLA01022</u>	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	<u>Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes</u>	Immunogenetics 1999 49 561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*011	-	LWAGS	<u>HLA01022</u>	Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura T, Ueda K, Akai J, Ota M, Naruse T, Inoko H, Numano F, Kimura A	<u>Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4</u>	Tissue Antigens 2001 57 520-35	Prof. Akinori Kimura
MICA*01201	MICA012	LKT3	<u>HLA01023</u>	Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S	<u>Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene</u>	Immunogenetics 1996 44 351-7	Dr Seiamak Bahram
MICA*01201	PERB11.1-54.1	HOKKAIDO	<u>HLA01023</u>	Gaudieri S, Leelayuwat C, Townend DC, Mullberg J, Cosman D, Dawkins RL	<u>Allelic and interlocus comparison of the PERB11 multigene family in the MHC</u>	Immunogenetics 1997 45 209-16	Prof. Roger Dawkins
MICA*01201	-	TA94	<u>HLA01023</u>	Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura T, Ueda K, Akai J, Ota M, Naruse T, Inoko H, Numano F, Kimura A	<u>Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4</u>	Tissue Antigens 2001 57 520-35	Prof. Akinori Kimura
MICA*01202	MICA-silent A, MICA053	01082123	<u>HLA01401</u>	-	-	- - - -	Dr Yoko Mitsuishi

MICA*013	MICA013	PAR1	<u>HLA01024</u>	Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S	<u>Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene</u>	Immunogenetics	1996	44	351-7	Dr Seiamak Bahram
MICA*014	MICA014	PAR2	<u>HLA01025</u>	Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S	<u>Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene</u>	Immunogenetics	1996	44	351-7	Dr Seiamak Bahram
MICA*015	MICA015	OMW	<u>HLA01026</u>	Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S	<u>Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene</u>	Immunogenetics	1996	44	351-7	Dr Seiamak Bahram
MICA*015	MICA-39	OMW	<u>HLA01026</u>	Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura T, Ueda K, Akai J, Ota M, Naruse T, Inoko H, Numano F, Kimura A	<u>Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4</u>	Tissue Antigens	2001	57	520-35	Prof. Akinori Kimura
MICA*015	-	OMW	<u>HLA01026</u>	Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura T, Ueda K, Akai J, Ota M, Naruse T, Inoko H, Numano F, Kimura A	<u>Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4</u>	Tissue Antigens	2001	57	520-35	Prof. Akinori Kimura
MICA*016	MICA016	J0528239 FPAF	<u>HLA01027</u>	Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I, Bahram S	<u>Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene</u>	Immunogenetics	1996	44	351-7	Dr Seiamak Bahram
MICA*016	PERB11.1-35.1	Q85/8086	<u>HLA01027</u>	Gaudieri S, Leelayuwat C, Townend DC, Mullberg J, Cosman D, Dawkins RL	<u>Allelic and interlocus comparison of the PERB11 multigene family in the MHC</u>	Immunogenetics	1997	45	209-16	Prof. Roger Dawkins

MICA*016	MICA-AGFB	J0528239	<u>HLA01027</u>	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	<u>Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes</u>	Immunogenetics	1999	49	561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*016	MUC-19	NR(M)-MUC NR(Child1)-MUC NM(Child2)-MUC	<u>HLA01027</u>	Yao Z, Volgger A, Helmberg W, Keller E, Fan LA, Chandanayingyong D, Albert ED	<u>Definition of new alleles of MIC-A using sequencing-based typing</u>	Eur J Immunogenet	1999	26	225-32	Prof. Ekkehard D. Albert
MICA*016	-	TISI	<u>HLA01027</u>	-	-	-	-	-	-	Prof. Akinori Kimura
MICA*017	MICA-KMCE	KSM	<u>HLA01335</u>	Petersdorf EW, Shuler KB, Longton GM, Spies T, Hansen JA	<u>Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene</u>	Immunogenetics	1999	49	605-12	Dr. Effie Petersdorf
MICA*017	MICA017	DBB DEU WJR076	<u>HLA01335</u>	Fodil N, Pellet P, Laloux L, Hauptmann G, Theodorou I, Bahram S	<u>MICA haplotypic diversity</u>	Immunogenetics	1999	49	557-60	Dr Seiamak Bahram
MICA*017	MICA-AN31	DEM	<u>HLA01335</u>	Perez-Rodriguez M, Arguello JR, Fischer G, Corell A, Cox ST, Robinson J, Hossain E, McWhinnie A, Travers PJ, Marsh SG, Madrigal JA	<u>Further polymorphism of the MICA gene</u>	Eur J Immunogenet	2002	29	35-46	Prof. Alejandro Madrigal

MICA*017	MUC-27	FD(F)-MUC FM(child1)- MUC HF(M)- MUC HS(child1)- MUC HT(child2)- MUC Thai- DCH013 Thai- DCH020 Thai- DCH024	<u>HLA01335</u>	Yao Z, Volgger A, Helmberg W, Keller E, Fan LA, Chandanayingyong D, Albert ED	<u>Definition of new alleles of MIC-A using sequencing-based typing</u>	Eur J Immunogenet	1999 26 225-32	Prof. Ekkehard D. Albert
MICA*017	-	DBB	<u>HLA01335</u>	Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura T, Ueda K, Akai J, Ota M, Naruse T, Inoko H, Numano F, Kimura A	<u>Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4</u>	Tissue Antigens	2001 57 520-35	Prof. Akinori Kimura
MICA*01801	MICA-EEBA	31227ABO BM16	<u>HLA01336</u>	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	<u>Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes</u>	Immunogenetics	1999 49 561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*01801	MICA-GKIT	CBA	<u>HLA01336</u>	Petersdorf EW, Shuler KB, Longton GM, Spies T, Hansen JA	<u>Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene</u>	Immunogenetics	1999 49 605-12	Dr. Effie Petersdorf
MICA*01801	MICA018	31227ABO BM16 DO208915	<u>HLA01336</u>	Fodil N, Pellet P, Laloux L, Hauptmann G, Theodorou I, Bahram S	<u>MICA haplotypic diversity</u>	Immunogenetics	1999 49 557-60	Dr Seiamak Bahram

MICA*01801	MICA-AN22	DO208915	<u>HLA01336</u>	Perez-Rodriguez M, Arguello JR, Fischer G, Corell A, Cox ST, Robinson J, Hossain E, McWhinnie A, Travers PJ, Marsh SG, Madrigal JA	<u>Further polymorphism of the MICA gene</u>	Eur J Immunogenet	2002 29 35-46	Prof. Alejandro Madrigal
MICA*01801	MUC-23	SE(F)-MUC KU(F)-MUC KF(child1)-MUC Thai-DCH036 DZA 97-8 DZA 97-18 DZA 97-20	<u>HLA01336</u>	Yao Z, Volgger A, Helmberg W, Keller E, Fan LA, Chandanayingyong D, Albert ED	<u>Definition of new alleles of MIC-A using sequencing-based typing</u>	Eur J Immunogenet	1999 26 225-32	Prof. Ekkehard D. Albert
MICA*01801	-	BM16 DO208915	<u>HLA01336</u>	Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura T, Ueda K, Akai J, Ota M, Naruse T, Inoko H, Numano F, Kimura A	<u>Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4</u>	Tissue Antigens	2001 57 520-35	Prof. Akinori Kimura
MICA*01802	-	U180	<u>HLA02034</u>	-	-	-	-	Dr. Isabel Quiroga
MICA*019	MICA-AMW	SSA	<u>HLA01334</u>	Komatsu-Wakui M, Tokunaga K, Ishikawa Y, Kashiwase K, Moriyama S, Tsuchiya N, Ando H, Shiina T, Geraghty DE, Inoko H, Juji T	<u>MIC-A polymorphism in Japanese and a MIC-A-MIC-B null haplotype</u>	Immunogenetics	1999 49 620-8	Prof. Katsushi Tokunaga
MICA*019	MICA-AGAB	HSB27 OLL WEWAK1	<u>HLA01334</u>	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	<u>Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes</u>	Immunogenetics	1999 49 561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus

MICA*019	MICA-DPCA	DPCA	<u>HLA01334</u>	Petersdorf EW, Shuler KB, Longton GM, Spies T, Hansen JA	<u>Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene</u>	Immunogenetics	1999	49	605-12	Dr. Effie Petersdorf
MICA*019	MICA019	CF996 DHIF WT51	<u>HLA01334</u>	Fodil N, Pellet P, Laloux L, Hauptmann G, Theodorou I, Bahram S	<u>MICA haplotypic diversity</u>	Immunogenetics	1999	49	557-60	Dr Seiamak Bahram
MICA*019	MICA-AN26	WT51	<u>HLA01334</u>	Perez-Rodriguez M, Arguello JR, Fischer G, Corell A, Cox ST, Robinson J, Hossain E, McWhinnie A, Travers PJ, Marsh SG, Madrigal JA	<u>Further polymorphism of the MICA gene</u>	Eur J Immunogenet	2002	29	35-46	Prof. Alejandro Madrigal
MICA*019	-	WT51	<u>HLA01334</u>	Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura T, Ueda K, Akai J, Ota M, Naruse T, Inoko H, Numano F, Kimura A	<u>Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4</u>	Tissue Antigens	2001	57	520-35	Prof. Akinori Kimura
MICA*020	MICA-AN33	25/1506	<u>HLA01370</u>	Perez-Rodriguez M, Corell A, Arguello JR, Cox ST, McWhinnie A, Marsh SG, Madrigal JA	<u>A new MICA allele with ten alanine residues in the exon 5 microsatellite</u>	Tissue Antigens	2000	55	162-5	Prof. Alejandro Madrigal
MICA*021	MUC-17, MICA021	AA-MUC AM(child1)- MUC AS(child2)- MUC	<u>HLA01337</u>	Yao Z, Volgger A, Helmberg W, Keller E, Fan LA, Chandanayingyong D, Albert ED	<u>Definition of new alleles of MIC-A using sequencing-based typing</u>	Eur J Immunogenet	1999	26	225-32	Prof. Ekkehard D. Albert
MICA*022	MICA-BGA	Individual10	<u>HLA01394</u>	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	<u>Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes</u>	Immunogenetics	1999	49	561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*022	MUC-21, MICA022	Thai-DCH021	<u>HLA01394</u>	Yao Z, Volgger A, Helmberg W, Keller E, Fan LA, Chandanayingyong D, Albert ED	<u>Definition of new alleles of MIC-A using sequencing-based typing</u>	Eur J Immunogenet	1999	26	225-32	Prof. Ekkehard D. Albert

MICA*023	MICA-BEBC	WDV	HLA01396	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes	Immunogenetics	1999 49 561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*024	MICA-AAC	BT594 Individual7	HLA01391	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes	Immunogenetics	1999 49 561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*024	MUC-24, MICA024	DZA 97-17	HLA01391	Yao Z, Volgger A, Helmberg W, Keller E, Fan LA, Chandanayingyong D, Albert ED	Definition of new alleles of MIC-A using sequencing-based typing	Eur J Immunogenet	1999 26 225-32	Prof. Ekkehard D. Albert
MICA*025	MICA-DEB	BT20	HLA01392	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes	Immunogenetics	1999 49 561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*025	MUC-25, MICA025	Thai-DCH032	HLA01392	Yao Z, Volgger A, Helmberg W, Keller E, Fan LA, Chandanayingyong D, Albert ED	Definition of new alleles of MIC-A using sequencing-based typing	Eur J Immunogenet	1999 26 225-32	Prof. Ekkehard D. Albert
MICA*026	MICA-CEED	HOM-2	HLA01393	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes	Immunogenetics	1999 49 561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*027	MICA-AAAB	SWEIG007 HSB27	HLA01371	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes	Immunogenetics	1999 49 561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*027	MICA-AN21	SWEIG007	HLA01371	Perez-Rodriguez M, Arguello JR, Fischer G, Corell A, Cox ST, Robinson J, Hossain E, McWhinnie A, Travers PJ, Marsh SG, Madrigal JA	Further polymorphism of the MICA gene	Eur J Immunogenet	2002 29 35-46	Prof. Alejandro Madrigal

MICA*028	MICA-AABC	DKB	HLA01398	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes	Immunogenetics	1999 49 561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*028	MUC-29, MICA028	KUR-MUC	HLA01398	Yao Z, Volgger A, Helmberg W, Keller E, Fan LA, Chandanayingyong D, Albert ED	Definition of new alleles of MIC-A using sequencing-based typing	Eur J Immunogenet	1999 26 225-32	Prof. Ekkehard D. Albert
MICA*029	MICA-AN27	MFO-ND	HLA01365	Perez-Rodriguez M, Arguello JR, Fischer G, Corell A, Cox ST, Robinson J, Hossain E, McWhinnie A, Travers PJ, Marsh SG, Madrigal JA	Further polymorphism of the MICA gene	Eur J Immunogenet	2002 29 35-46	Prof. Alejandro Madrigal
MICA*029	MUC-30, MICA029	DZA 97-08	HLA01365	Yao Z, Volgger A, Helmberg W, Keller E, Fan LA, Chandanayingyong D, Albert ED	Definition of new alleles of MIC-A using sequencing-based typing	Eur J Immunogenet	1999 26 225-32	Prof. Ekkehard D. Albert
MICA*030	MICA-KWHT, MICA036	WKD	HLA01333	Petersdorf EW, Shuler KB, Longton GM, Spies T, Hansen JA	Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene	Immunogenetics	1999 49 605-12	Dr. Effie Petersdorf
MICA*031	MICA-AIB, MICA037	MCF7	HLA01383	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes	Immunogenetics	1999 49 561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*032	MICA-AKB, MICA038	CAR NS2TA NS2TA1 S2T2	HLA01386	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes	Immunogenetics	1999 49 561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*033	MICA-ALAB, MICA039	WEWAK1	HLA01366	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes	Immunogenetics	1999 49 561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus

MICA*033	MICA-AN24	WEWAK1	HLA01366	Perez-Rodriguez M, Arguello JR, Fischer G, Corell A, Cox ST, Robinson J, Hossain E, McWhinnie A, Travers PJ, Marsh SG, Madrigal JA	Further polymorphism of the MICA gene	Eur J Immunogenet	2002 29 35-46	Prof. Alejandro Madrigal
MICA*034	MICA-BCC, MICA040	Individual18	HLA01395	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes	Immunogenetics	1999 49 561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*035	MICA-BEA, MICA041	SK-BR3	HLA01384	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes	Immunogenetics	1999 49 561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*036	MICA-BHB, MICA043	EHM	HLA01387	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes	Immunogenetics	1999 49 561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*037	MICA-CEA, MICA044	AVE, G GRE, G LS40 LH IHL, AD031 Individual10 B7Qui 8TB	HLA01388	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes	Immunogenetics	1999 49 561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*038	MICA-CEC, MICA045	Individual12 Individual14	HLA01389	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes	Immunogenetics	1999 49 561-6	Dr. Marcel G. J. Tilanus

MICA*039	MICA-CEF, Individual13 MICA046		<u>HLA01390</u>	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	<u>Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes</u>	Immunogenetics	1999	49	561- 6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*040	MICA-CIB, A34 MICA047		<u>HLA01385</u>	Visser CJ, Tilanus MG, Tatari Z, van der Zwan AW, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R, Charron D	<u>Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes</u>	Immunogenetics	1999	49	561- 6	Dr. Marcel G. J. Tilanus
MICA*041	MICA- newA, MICA048	01083098 01083208 01081318 01065894	<u>HLA01367</u>	-	-	-	-	-	-	Dr Yoko Mitsuishi
MICA*041	MICA- AN25	M7	<u>HLA01367</u>	Perez-Rodriguez M, Arguello JR, Fischer G, Corell A, Cox ST, Robinson J, Hossain E, McWhinnie A, Travers PJ, Marsh SG, Madrigal JA	<u>Further polymorphism of the MICA gene</u>	Eur J Immunogenet	2002	29	35- 46	Prof. Alejandro Madrigal
MICA*042	MICA- newB, MICA049	01065869	<u>HLA01399</u>	-	-	-	-	-	-	Dr Yoko Mitsuishi
MICA*043	MICA- newC, MICA050	01084383	<u>HLA01368</u>	-	-	-	-	-	-	Dr Yoko Mitsuishi
MICA*043	MICA- AN32	RB22	<u>HLA01368</u>	Perez-Rodriguez M, Arguello JR, Fischer G, Corell A, Cox ST, Robinson J, Hossain E, McWhinnie A, Travers PJ, Marsh SG, Madrigal JA	<u>Further polymorphism of the MICA gene</u>	Eur J Immunogenet	2002	29	35- 46	Prof. Alejandro Madrigal
MICA*044	MICA- newD, MICA051	01083114	<u>HLA01400</u>	-	-	-	-	-	-	Dr Yoko Mitsuishi

MICA*045	MICA-newE, MICA052	01083268 01065876	<u>HLA01369</u> -	-	-	-	-	-	-	Dr Yoko Mitsuishi
MICA*045	MICA-AN30	DEW-ND	<u>HLA01369</u>	Perez-Rodriguez M, Arguello JR, Fischer G, Corell A, Cox ST, Robinson J, Hossain E, McWhinnie A, Travers PJ, Marsh SG, Madrigal JA	<u>Further polymorphism of the MICA gene</u>	Eur J Immunogenet	2002 29 35- 46	Prof. Alejandro Madrigal		
MICA*046	MICA-AN28	M7	<u>HLA01372</u>	Perez-Rodriguez M, Arguello JR, Fischer G, Corell A, Cox ST, Robinson J, Hossain E, McWhinnie A, Travers PJ, Marsh SG, Madrigal JA	<u>Further polymorphism of the MICA gene</u>	Eur J Immunogenet	2002 29 35- 46	Prof. Alejandro Madrigal		
MICA*047 -		COYA3408	<u>HLA01410</u>	Perez-Rodriguez M, Raimondi E, Marsh SG, Madrigal JA	<u>Identification of a new MICA allele, MICA*047</u>	Tissue Antigens	2002 59 216- 8	Dr. Steven G. E. Marsh		
MICA*047	MICA-055D	KM	<u>HLA01410</u>	Zhang Y, Lazaro AM, Mirbaha F, Lavingia B, Vorhaben R, Stastny P	<u>Characterization of a novel MICA allele, MICA*047</u>	Tissue Antigens	2002 59 308- 10	Prof. Peter Stastny		
MICA*048 -		TA21	<u>HLA01420</u>	Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura T, Ueda K, Akai J, Ota M, Naruse T, Inoko H, Numano F, Kimura A	<u>Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4</u>	Tissue Antigens	2001 57 520- 35	Prof. Akinori Kimura		
MICA*049 -		LUY	<u>HLA01498</u>	Obuchi N, Takahashi M, Nouchi T, Satoh M, Arimura T, Ueda K, Akai J, Ota M, Naruse T, Inoko H, Numano F, Kimura A	<u>Identification of MICA alleles with a long Leu-repeat in the transmembrane region and no cytoplasmic tail due to a frameshift-deletion in exon 4</u>	Tissue Antigens	2001 57 520- 35	Prof. Akinori Kimura		
MICA*050	MICA-GR 1.3C	SMGM- 1.3C	<u>HLA01710</u>	Rueda B, Pascual M, Lopez-Nevot MA, Gonzalez E, Martin J	<u>A new allele within the transmembrane region of the human MICA gene with seven GCT repeats</u>	Tissue Antigens	2002 60 526- 8	Dr. Javier Martin Ibañez		

MICA*051 -	G367	<u>HLA01761</u>	Quiroga I, Sweeney D, Sutton PM, Chapple SD, Souto-Grando JP, Barnardo MC, Fuggle SV	<u>Identification of a novel MICA allele: MICA*051</u>	Tissue Antigens	2004	63	466-	9	Dr. Isabel Quiroga
MICA*052 -	D15	<u>HLA02333</u>	-	-	-	-	-	-	-	Dr Virginia Mas
MICA*053 MICA-U044	U044	<u>HLA02334</u>	-	-	-	-	-	-	-	Dr. Martin C. N. M. Barnardo

<http://www.anthonynolan.org.uk/HIG>; <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>

2.3 Tipos celulares donde se expresan

En contraste con los genes del MHC-I, los genes MIC no están expresados de forma ubicua. Inicialmente fue postulada la expresión de los antígenos de MICA y MICB a través de la detección de su RNAm en células de origen epitelial y en fibroblastos (Bahram y Spies 1996a).

De particular interés es la demostración de que células epiteliales gastrointestinales expresan estos antígenos y que dicha expresión está regulada por la participación del promotor de proteínas de choque térmico que codifica el gene respectivo conocido como HSP70 (Groh et al. 1996). Con el desarrollo de anticuerpos policlonales para MICA, que es el más polimórfico de los genes de esta familia, se ha puesto en evidencia la expresión de estos antígenos en otros tipos celulares, tanto en células normales como en algunas líneas celulares. También existen anticuerpos policlonales para MICB.

Otro aspecto que llama la atención es que la expresión de MICA no se registra en células del linaje linfohematopoyético, aunque si son estimuladas con el activador de proliferación fitohemaglutinina se induce su expresión (Zwirner et al. 1998). Además, recientemente se ha demostrado que la expresión de este gene no se restringe sólo a células de tejido conectivo y epitelial, sino que también se puede inducir su expresión en linfocitos T CD4+ y CD8+ activados a proliferar.

Se ha demostrado que el producto de MICA es reconocido por una subpoblación de células T intestinales que portan el receptor $V\delta 1 \gamma/\delta$ (Groh et al. 1998) por lo que se cree que puede estar involucrado en la vigilancia inmunológica del intestino, jugando un papel importante en la enfermedad injerto contra huésped (GVHD, por sus siglas en inglés) después de los trasplantes de médula ósea, dado que el intestino es una de los principales sitios de tal padecimiento (Bahram y Spies, 1996b; Pellet et al. 1997).

Por otra parte, Bauer y colaboradores (1999) demostraron que hay un receptor de células NK conocido como NKG2D, de 42 kDa, que interactúa con MICA. Este receptor se expresa ampliamente en células T (CD 8+, α/β y γ/δ) y células NK; sin embargo se ha descubierto que este receptor no se asocia exclusivamente a MICA, ya que se expresa también en ratón.

Además, es de considerar la elevada expresión de MICA en monocitos, lo que puede implicarla en un posible circuito de respuesta inmune donde la interacción de esta importante célula efectora contribuya a desempeñar alguna función en la que esté involucrada la molécula de MICA (Zwirner et al. 1998, Mendoza et al. 2001).

2.4 MICA y su Asociación con Enfermedades Autoinmunes, Inflamatorias e Infecciosas

Esta demostrado que el gene MICA esta asociado con ciertas enfermedades como la espondilitis anquilosante, la psoriasis, el síndrome de Reiteris y la enfermedad de Behcet (Mizuki et al. 1997). Incluso, se ha encontrado cierta especificidad alélica particularmente relacionada con alelos HLA-B o HLA-C en algunas enfermedades inflamatorias, infecciosas, degenerativas o autoinmunes, como la enfermedad autoinmune de Addison (Gambelunghe 1999), la psoriasis y la Diabetes tipo 1 (Gambelunghe 2001, Wallace et al. 1999, Lee et al. 2000, Nejentsev et al. 2000, Choi et al. 2000, Picco et al. 2002, Tica 2003). En todas estas enfermedades existe un daño del tejido conectivo o epitelial, lo que sugiere la participación de algún agente tejido específico adicional a la asociación con el HLA postulada. Recientemente, un grupo de trabajo japonés y de otro griego muestran de manera independiente la asociación de MICA con la enfermedad de Behcet más que con el alelo B51 que generalmente se asume como el componente de este tipo de enfermedad (Fodil et al. 1996, Yabuki et al. 1999). De manera adicional a los estudios en la enfermedad de Behcet, datos recientes han mostrado la presencia de éste en otras enfermedades inflamatorias crónicas como

la uveítis aguda (Goto et al. 1998), la psoriasis y artritis psoriática (González et al. 1999, 2002, 2003). De hecho, la localización de los genes MIC, su estructura y la expresión de las moléculas de estos genes en ciertos tipos celulares son una base importante para suponer alguna susceptibilidad a enfermedades dependiendo del alelo expresado.

2.5 Estudios del polimorfismo de MICA

Se han realizado gran número de reportes del polimorfismo de MICA y MICB en líneas celulares homocigotas y heterocigotas (Bahram et al. 1994, Bahram y Spies 1996b, Fodil et al. 1996, Fodil et al. 1999, Visser et al. 1999, Mendoza-Rincón et al. 1999, Yao et al. 1999, Fischer et al. 2000, Bahram 2001, Pérez-Rodríguez et al. 2002), sin embargo no se tienen suficientes estudios poblacionales.

En 1999 Petersdorf y colaboradores realizaron un estudio de la diversidad alélica de una población principalmente americana-caucásica (88%), aunque incluye algunos individuos no caucásicos (12%), de los cuales el 3% eran hispano-americanos, los resultados confirmaron la presencia de 12 de los 16 alelos hasta ese momento reportados e identificaron cinco nuevos, encontrando en la población caucásica principalmente el alelo MICA*008 (55%) y después MICA*002 (13%), *004 (6%), *010 (5%), MICA-KMCE (4%), *001 y *009 (3%), la frecuencia de los alelos MICA-DPCA, *007, *012, *016, MICA-GKIT y *011 fue del 2%, MICA-TAND (1%) y no observándose los alelos MICA *015, MICA-KWHT y MICA*006; por otro lado la población no caucásica presenta principalmente MICA*008 (40%) seguido de MICA*004 (20%) y MICA*002 (17%), siendo los demás alelos (MICA*010, MICA-KMCE, MICA*001, MICA*009, MICA-TAND, MICA-GKIT y MICA*015) del 3%. Asimismo se confirma el conocimiento de la fuerte relación de MICA con HLA-B, lo que tiene una importante implicación en los estudios de enfermedades relacionadas con MHC y en trasplantes. También en 2001, Zhang y colaboradores confirman estos resultados reportando los alelos MICA*008, MICA*002, MICA*010 y MICA*004 como los más frecuentes con los porcentajes de 66.9, 28.3, 13.6 y 10.7 respectivamente en individuos

norteamericanos caucásicos no relacionados, también se reporta el importante desequilibrio de enlace entre MICA*008 y B*08, B*07 y B*44; MICA*002 y B*35 y B*27 así como entre MICA*010 y B*15.

En la determinación de la frecuencia de MICA entre 201 donadores Africano-americanos (Zhang 2003), de los 51 alelos previamente conocidos hasta ese momento, se observó la presencia de 18 alelos, a diferencia de los 16 alelos encontrados en población norteamericana-caucásica (Petersdorf 1999) y 9 alelos reportados en población indio sudamericana. Siendo MICA*00201 y MICA*00801 los más frecuentes. Asimismo, se reporta un alto "linkage disequilibrium" (desequilibrio de enlace) entre ciertos alelos de MICA y los HLA-B en esta población. También, Tian y colaboradores en 2001 ya habían reportado los alelos MICA*008 (28.2%), MICA*004 (26.4%) y MICA*002 (25.5%) como los más frecuentes, con desequilibrio de enlace entre MICA*002- B*5301, MICA*002- B*3501 y MICA*004- B*4201 (Collins 2004).

Nuevamente en el 2003 Tian y colaboradores estudian cinco grupos de poblaciones de origen africano (tribus de Nigeria, residentes africano-americanos en Boston, donadores africano-americanos), encontrando MICA*002, MICA*004 y MICA*00801 como los más frecuentes en todos los grupos con combinaciones promedio entre 71.6 y 80.4%, sin embargo es importante hacer notar que existe una clara diferencia entre el repertorio de alelos de MICA entre las poblaciones derivadas de africanos subsharianos.

Recientemente (Gao et al. 2006) se han vuelto a estudiar dos poblaciones de norte América: europea y africana y se reporta la detección de 29 alelos de los 58 conocidos y la presencia en las dos poblaciones del mismo grupo de alelos comunes MICA*00201, *004 y *00801, con una frecuencia de 64 y 74 % respectivamente. Entre la población europeo-americana MICA*00801 presenta la más alta frecuencia (43.05%) seguido por MICA*00201 (14.1%) y MICA*004 (7.47%), los alelos MICA*00901 y MICA*010 tienen frecuencias superiores al 5%. Entre los africano-americanos MICA*00801 y MICA*00201 presentan frecuencias

parecidas, 26.61% y 25.37% respectivamente y MICA 004 (19.09%). Los alelos de MICA mostraron un fuerte desequilibrio de enlace con HLA-B. La distribución de los haplotipos entre las dos poblaciones muestra una gran variación dependiente de la distribución de los alelos HLA-B, por ejemplo, MICA*00801-B*0702, es el haplotipo más común en europeos-americanos (12.2%) y segundo en africano-americanos (6.67%) y MICA*00201-B*5301, es el haplotipo más común en africano-americanos (9.49%), y tiene una frecuencia muy baja en europeos-americanos (0.65%). Esta diferencia esta basada en la frecuencia de B*5301, el cual es predominante en población de origen africano.

Se han reportado en población japonesa (Komatsu-Wakui et al. 1999) ocho diferentes alelos de MICA, en donde MICA*008 presentó la frecuencia más alta (25.2%), seguido de MICA*009 (18.4%), MICA*002 (12.5%), MICA*010 (12.5%), MICA*004 (11.1%), MICA*012 (10.9%) y MICAMW fue observado con una frecuencia de 1.8%. Asimismo se reportó la existencia de un haplotipo nulo MICA-MICB, asociado principalmente con HLA-B*4801. Confirmándose más tarde este haplotipo nulo y observándose un amplia distribución en la población japonesa (Komatsu 2001). Existe otro reporte similar al de Komatsu en donde se observan frecuencias parecidas del polimorfismo de los exones 2, 3, y 4 (Katsuyama 1999).

Durante el análisis del polimorfismo en tres tribus de indios sudamericanos de la frontera argentino-brasileña (Zhang 2002a), se observaron únicamente 9 de los 55 alelos previamente conocidos, que comparando con los 16 que habían sido encontrados en norteamericanos caucásicos, sugieren una distribución alélica restringida. De los alelos reportados, tres de ellos MICA*00201, MICA*027 y MICA*010 abarcan el 90% de todos los genes I, siendo MICA*00201 el alelo con mayor frecuencia (35-45%) (tabla 1.5). También se observó un alto grado de relación entre ciertos alelos de MICA y HLA-B. Por otro lado los resultados obtenidos en referencia al polimorfismo de la región transmembranal del gene, proporcionaron información que junto con otros estudios previos sirvió para construir un árbol filogenético.

Con respecto a las poblaciones orientales, se tiene un estudio que analiza tres provincias chinas (Gong 2002), en donde se encontraron 10, 7 y 9 alelos de MICA en las provincias Han, Dai y Uygur respectivamente, siendo MICA*008 el más común en Han y Uygur y MICA*010 en Dai, por lo que concluyen que existen diferentes alelos en diferentes poblaciones. Existen otros estudios como los realizados con una población coreana en donde se observaron los siguientes ocho alelos: MICA*010, MICA*00201, MICA*027, MICA*004, MICA*012, MICA*00801, MICA*00901 y MICA*00701 con una frecuencia de 18.3%, 17.8%, 13.6%, 12.3%, 11.1%, 10.8%, 10.6% y 3.3% respectivamente, de igual manera se observó una fuerte relación entre MICA y genes de HLA-B, pudiéndose identificar el haplotipo nulo para MICA asociado con HLA-B48 (Pyo et al. 2003). Mientras en población tailandesa se identificaron 13 alelos de los ya reportados, MICA*008, MICA*010, MICA*002 y MICA*019 fueron altamente predominantes con las frecuencias de alelos de 21.4%, 18.2%, 17.6% y 15.3 % respectivamente. Cinco de estos 13 alelos de MICA mostraron diferencias significativas en las frecuencias encontradas en Japoneses y Caucásicos, asimismo MICA*052 es un alelo encontrado muy raramente en otras poblaciones y en este estudio fue prevalente con una frecuencia de 8.2%, encontrándose generalmente asociado con HLA-*B13 (Romphruk et al. 2001).

Marin y colaboradores en el 2004 reportaron el estudio del polimorfismo en la población de Sao Pablo Brasil, encontrando 18 alelos de los 54 conocidos y siendo MICA*008, MICA*002, MICA*004 y MICA* 009 y MICA*010 los más frecuentes con 47%, 28.5%, 27%, 23.5% y 11% respectivamente, también se confirma el conocimiento de la fuerte relación de MICA con HLA-B encontrándose como principales los haplotipos MICA*008-B*7; MICA*002-B*35; MICA*004-B44 y MICA*009-B*50. Cabe comentar que el sistema utilizado por ellos no detecta los cambios polimórficos transmembranales y por lo tanto no identifican todos los alelos, quedando algunos de ellos en grupos, como es el caso de MICA*008 que incluye también *027 y *048.

En el 2005 Piantatelli y sus colaboradores estudiaron la población blanca de Marruecos, observando 16 de los 58 alelos conocidos, detectándose MICA*00801, MICA*004 y MICA*00902 como los alelos más frecuentes con valores de 26.8%, 23.2% y 14% respectivamente, cabe comentar que se reporta una frecuencia de 22.6% del alelo MICA009 [MICA*00902 (14%) y MICA*00901 (8.5%)], muy alta comparada con otras poblaciones, los haplotipos más comunes fueron MICA*004-B*4403 y MICA*00902-B*50.

La relativa alta frecuencia de MICA*008 y su representación en múltiples haplotipos pudiera indicar que se trata de un alelo ancestral, con subsecuentes recombinaciones y mutaciones puntuales, eventos que han producido una gran diversidad alélica.

Por otro lado existen otros estudios que revelan una alta frecuencia de un haplotipo nulo para MICA: HLA-B48-MICA-del-MICB*0107 N, en una comunidad amerindia de Paraguay (Aida et al. 2002) y la presencia de isoformas MICA y MICB carentes de exon 3 en diferentes líneas celulares (Zou y Stastny, 2002).

Se presentan en la figura 2.3 y en la tabla 2.4 las frecuencias de los alelos de MICA más comúnmente encontrados en diferentes poblaciones.

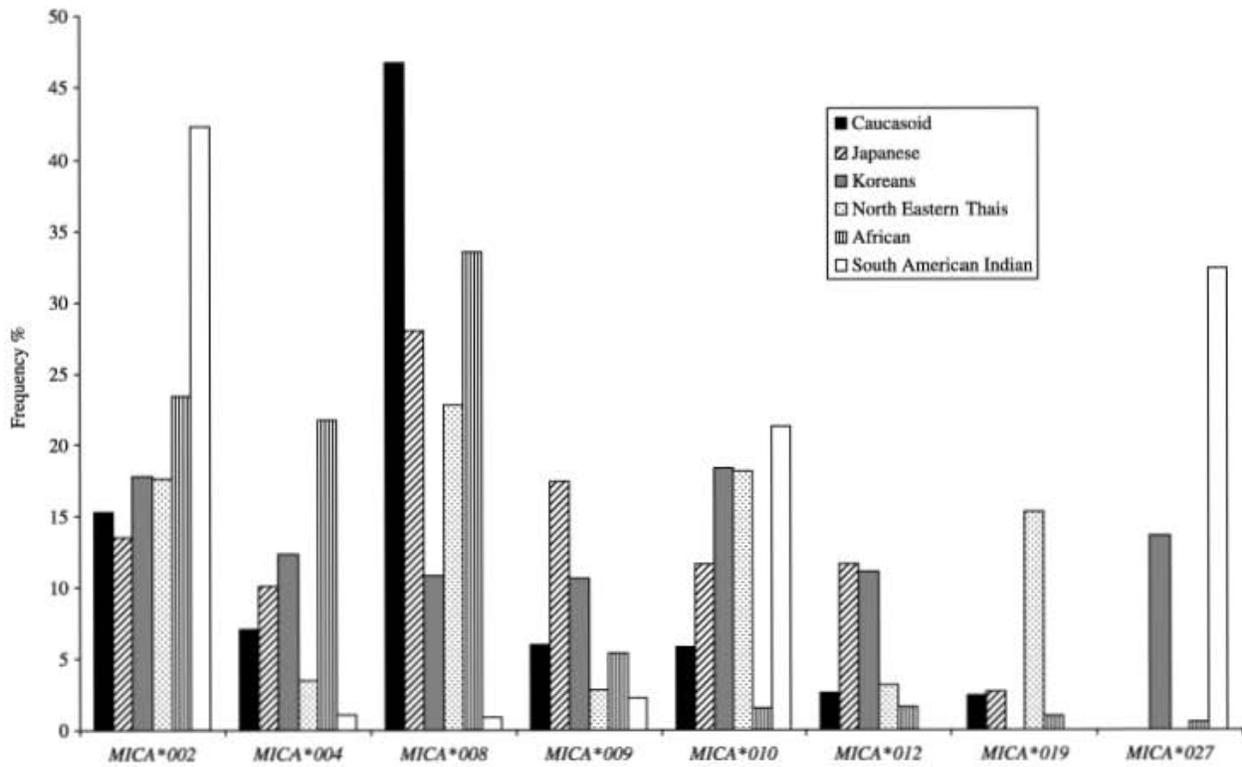


Figura 2.3.- Porcentajes de las frecuencias de los alelos de MICA más comunes en seis poblaciones (Collins RW., 2004)

Tabla 2.4.- Estudios del polimorfismo de MICA en diferentes poblaciones

Población	Encontrados/ Reportados	Nuevos	Alelos	Observaciones	Referencia
Americana Caucásica (88%)	12/16	5	MICA*008 (55%), MICA*002 (13%), *004 (6%), *010 (5%), MICA-KMCE (4%), *001 y *009 (3%)	Fuerte relación de MICA con HLA-B	Petersdor et al 1999
No caucásica (12%) Hispano-americanos (3%)			MICA*008 (40%), MICA*004 (20%), MICA*002 (17%), los demás alelos *010, MICA-KMCE, *001, *009, MICA-TAND, MICA-GKIT y MICA*015 (3%).		
Americana Caucásica	15/54	1	MICA*008 (66.9%), MICA*002 (28.3%), MICA*010 (13.6%) y MICA*004 (10.7%).	Importante desequilibrio de enlace entre MICA*008 y B*08, B*07 y B*44; MICA*002 y B*35 y B*27 así como entre MICA*010 y B*15	Zhang et al 2001
	25/58		MICA*00801 (43.05%) MICA*00201 (14.1%) y MICA*004 (7.47%), MICA*00901 (7.11%) y MICA*010 (5.78%)	MICA*00801-B*0702, haplotipo más común	Gao et al. 2006

Japonesa	8	MICA*008 (25.2%), MICA*009 (18.4%), *002 (12.5%), *010 (12.5%), *004 (11.1%), *012 (10.9%) y MICAMW fue observado con una frecuencia de 1.8%.	Haplotipo nulo MICA-MICB, Asociado con HLA-B *4801	-Komatsu-Wakui et al. 1999
			haplotipo nulo para MICA HLA-B48/MICA-del/MICB*0107 N con Frecuencia del 3.7 5%	-Komatsu et al 2001
	8	MICA*008 (30.8%), MICA*009 (16.5%), raro MICA*007 (1.2%)	Fuerte relación de MICA con HLA-B	- Katsuyama 1999
Tribus de indios sudamericanos	9/55	MICA*00201, MICA*027 y MICA*010 abarcan el 90%. MICA*00201 el alelo con mayor frecuencia (35-45%),	Distribución alélica restringida	Zhang et al. 2002a
Africanos-americanos	12/19	MICA*008 (28.2%), MICA*004 (26.4%)y MICA*002 (25.5%)	"linkage disequilibrium" MICA y los HLA-B. MICA*002- B*5301 MICA*002- B*3501 MICA*004- B*4201	Tian et al 2001
	18/ 51	MICA*00201 y MICA*00801 los más frecuentes	"linkage disequilibrium" MICA y los HLA-B.	Zhang et al 2003

	26/58	MICA*00801 (26.61%) MICA*00201 (25.37%) MICA 004 (19.09%).	MICA*00201-B*5301 haplotipo más común	Gao et al. 2006
China		MICA*008 y MICA*010 los más frecuentes	Se estudiaron tres provincias teniendo dos de ellas como principal MICA*008 y una MICA*010	Gong et al 2002
Coreana	ocho	MICA*010 (18.3%), MICA*00201(17.8%), MICA*027 (13.6%), MICA*004 (12.3%), MICA*012 (11.1%) MICA*00801 (10.8%) MICA*00901 (10.6%) MICA*00701 (3.3%)	Fuerte relación de MICA y genes de HLA-B haplotipo nulo para MICA asociado con HLA-B48	Pyo et al. 2003
Tailandes	13	MICA*008 (21.4%), *010 (18.2%), *002 (17.6%), y 019 (15.3 %)	MICA 052 (8.2%), raro en otras poblaciones, generalmente asociado con HLA-B13	Romphruk et al 2001
Brasileña	18/54	MICA*008, MICA*002, MICA*004 y MICA* 009 y MICA*010 los más frecuentes con 47%, 28.5%, 27%, 23.5% y 11% respectivamente	Fuerte relación de MICA y genes de HLA-B: MICA*008-B*7; MICA*002- B*35; MICA*004-B44 y MICA*009-B*50.	Marin et al 2004

Norte de África (Población blanca de Marruecos)	16/58	*00801, MICA*004 y MICA*00902 alelos más frecuentes con valores de 26.8%, 23.2% y 14% respectivamente MICA*00901 (8.5%) MICA*00201 (7.3%)	Frecuencia de 22.6% del alelo MICA009 muy alta comparada con otras poblaciones. Los haplotipos más comunes fueron MICA*004-B*4403 y MICA*00902-B*50.	Piancatelli D et al. 2005
Comunidad amerindia de Paraguay			Alta frecuencia de haplotipo nulo para MICA HLA-B48-MICA-del-MICB*0107 N	Aida K. et al 2002
Líneas celulares: - Carcinoma de colón HCT 116 -Células monocnuclear es periféricas: Monocítica U 937 Celulas B: YAR, BM15 y PBMC			"Isoformas" MICA y MICB carentes de exon 3"	Zou Y. Stastny P. 2002

2.6 MICA y NKG2D

Bauer y colaboradores (1999) demostraron que hay un receptor de células NK conocido como NKG2D, de 42 kDa, que interactúa con MICA. Este receptor se expresa ampliamente en células T (CD 8+, α/β y γ/δ) y células NK; sin embargo se ha descubierto que este receptor no se asocia exclusivamente a MICA, ya que se expresa también en ratón.

El reconocimiento de MICA por células que expresan NKG2D induce la citotoxicidad de las células que expresan MIC y la secreción de IFN γ por las células que expresan NKG2D. Por lo tanto MICA actúa como detector de estrés y su expresión aumentada constituye una señal de alarma para el sistema inmune, que pone en marcha mecanismos de destrucción de las células que han sufrido estímulos de estrés (es decir, que han aumentado la expresión de MICA en la superficie) por parte de células citotóxicas (NK o linfocitos T). Al interactuar MICA con NKG2D origina señales que llevan a la activación de la proteína DAP10 y la cinasa P13 (Wu 1999, Bauer 1999, Pérez-Rodríguez 2000) (figura 2.4).

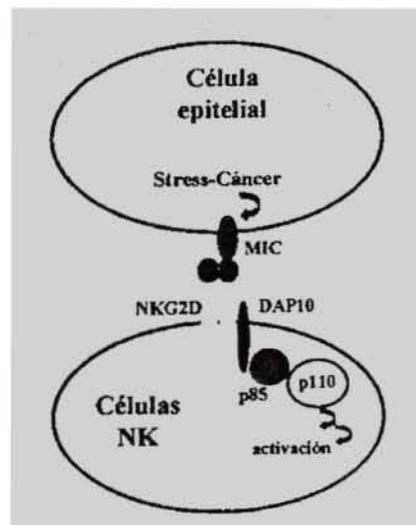


Figura 2.4.- Interacción entre MICA, sobre expresado bajo estrés o en células cancerosas y su receptor NKG2D en la célula NK. La interacción de ambos activa a la proteína DAP10 con la consecuente destrucción de la célula dañada.

Asimismo se ha demostrado *in vitro* que la diversidad alélica del locus MICA afecta el enlace entre MICA y el receptor NKG2D de las células NK, afectando potencialmente la activación de las células NK y la modulación de la respuesta de las células T (Steinle et al. 2001). Los alelos del locus MICA pueden ser definidos como fuertes o débiles con base a su capacidad para unir NKG2D, se ha atribuido que los alelos que producen enlaces fuertes de MICA con NKG2D comparten la presencia de metionina en la posición 129, mientras que los alelos débiles para enlazarse presentan valina en esa misma posición 129 (Gao 2006). Cabe comentar que un alelo presente en las poblaciones en frecuencia alta MICA*008 presenta valina.

3.1 OBJETIVO GENERAL

Analizar molecularmente el polimorfismo del exon 2 del gene MICA en una población mestiza mexicana.

3.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Obtener DNA de individuos mestizo mexicanos.
2. Diseñar y utilizar "primers" específicos del gene MICA para el exon 2 y amplificar el DNA mediante PCR.
3. Estandarizar la caracterización molecular empleando plantillas moleculares específicas (SSOP).
4. Caracterizar molecularmente el exon 2 en las muestras amplificadas.
5. Determinar la frecuencia de los alelos del exon 2 del gene MICA, en una población mestiza mexicana.

3.3 HIPÓTESIS

En estudios realizados en poblaciones no mexicanas, se ha determinado que existe polimorfismo del gene MICA principalmente en los exones 2, 3 y 4, por lo que se espera que exista polimorfismo molecular del exon 2 del gene MICA, en una población mestiza mexicana.

3.4 METAS

1. Obtener DNA a partir de sangre periférica de individuos sanos no relacionados mestizos mexicanos.
2. Optimizar las condiciones de PCR que permitan la amplificación independiente de los exones 2, 3 y 4 del gene MICA.
3. Utilizar la información obtenida de las bases de datos EMBL y GenBank para la generación de las sondas de oligonucleótidos que reconozcan las regiones más polimórficas del gene MICA y que se utilizarán en su caracterización molecular.
4. Estandarizar las condiciones experimentales para realizar la hibridación molecular utilizando las sondas de oligonucleótidos diseñadas.
5. Asignar los alelos correspondientes a las muestras y determinar la frecuencia de los alelos del exon 2 del gene MICA en una población mestiza mexicana.

4. JUSTIFICACIÓN

MICA es un gen altamente polimórfico muy atractivo para su estudio porque puede estar asociado con desórdenes multi-factoriales tales como inflamación, enfermedades infecciosas, autoinmunes, así como en la enfermedad del injerto contra huésped. De hecho, la localización de los genes MIC, su estructura y la expresión de las moléculas de estos genes en ciertos tipos celulares son una base importante para suponer cierta susceptibilidad a enfermedades dependiendo del alelo expresado.

Las implicaciones de la diversidad de MICA con respecto a su función biológica han comenzado a esclarecerse una vez que su estructura ha sido definida y se ha conocido de sus interacciones con receptores γ/δ TCRs por lo que su potencial como molécula ligando y coestimuladora ha sido definido. Asimismo se ha demostrado que hay un receptor de células NK conocido como NKG2D, que interactúa con MICA. Este receptor se expresa ampliamente en células T (CD 8+, α/β y γ/δ) y células NK lo que sugiere el importante papel que tiene MICA en la respuesta inmune innata. De igual manera se ha confirmado el conocimiento de la fuerte relación de MICA con HLA-B lo que tiene una importante implicación en los estudios de enfermedades relacionadas con MHC y en trasplantes.

Se ha demostrado que el simple cambio de un aminoácido en el exon tres de MICA (M129V), reduce significativamente la capacidad de enlace de MICA con NKG2D, receptor presente en las células NK y células T, lo que puede tener efectos significativos en la respuesta inmune; por lo que el polimorfismo de los exones 2, 3 y 4 del gene resulta muy interesante.

Como consecuencia de la variedad de métodos empleados y las dificultades técnicas para determinar el polimorfismo de MICA, existe poca información con respecto a la frecuencia de los alelos de MICA en diferentes grupos étnicos. No obstante existen estudios en los que se ha determinado el polimorfismo de los

exones 2-5 del gene MICA en Norteamericanos caucásicos, Japoneses, Coreanos, Chinos, Tailandeses, Indios sudamericanos, Africanos-americanos y Brasileños. Sin embargo, es necesario un mayor número de análisis que permitan clarificar la distribución de los alelos de los genes MIC en poblaciones de diferentes orígenes, incluyendo la mexicana.

Dentro de este marco, el objetivo de este estudio fue analizar el polimorfismo del exon 2, que representa una de las regiones más polimórficas del gene MICA, de una población mestiza mexicana. Con la finalidad de establecer la frecuencia con que se presentan los diferentes alelos de este exon, por lo que fue necesario establecer previamente la metodología que emplea las plantillas moleculares específicas (SSOP, por sus siglas en inglés).

Estos estudios contribuirán, en primer lugar al análisis de población y estudios de diversidad humana, así como a un mejor entendimiento del papel que juega el gene MICA en la compatibilidad de trasplantes y en la asociación de enfermedades (relación enfermedad-susceptibilidad).

5. METODOLOGÍA

5.1 Población en estudio.

El estudio incluyó a 103 individuos sanos no relacionados de una población mestiza mexicana que vive en la Ciudad de México.

Criterio de inclusión:

1. Sujetos sanos sin antecedentes de enfermedades asociadas al sistema HLA.
2. Mestizos mexicanos* de 18 a 50 años de edad, de ambos sexos.

* Un mestizo mexicano se define como alguien nacido en México, quién es descendiente de los habitantes autóctonos de la región y de individuos principalmente españoles, de origen caucásicos, y/o negro, quienes llegaron a América durante el siglo XVI (Vargas-Alarcón et al. 2002, De Leo et al. 1997).

En la población mestiza mexicana se considera a aquellos individuos que por dos generaciones incluyendo la suya, han nacido en México.

La población de estudio puede ser representativa de los habitantes mexicanos, debido a que la ciudad de México ha sido un importante sitio geográfico de inmigración.

5.2 Material Biológico.

Muestras de DNA genómico obtenidas de sangre venosa anticoagulada con EDTA, procesadas por técnicas convencionales empleando DNAzol como reactivo principal para la extracción del DNA (Mendoza-Rincón, et al. 1999).

La extracción de DNA esta basada en el empleo de una solución detergente-sales de guanidina que permite la precipitación selectiva con etanol del DNA a partir de lisado celular (Cox, 1968, Ausubel et al.1990).

5.2.1 Extracción de DNA

Técnica para la extracción de DNA

- ❖ Extraer 5 ml de sangre venosa con tubo Vacutainer utilizando EDTA como anticoagulante.
- ❖ Centrifugar la muestra a 3500 rpm durante 10 minutos para separar el plasma y obtener el paquete celular.
- ❖ Lavar el paquete celular con solución salina estéril al 0.9 % y centrifugar 10 minutos a 3500 rpm, retirar el sobrenadante
- ❖ De la superficie del paquete celular extraer la capa de glóbulos blancos y colocarla en un tubo cónico de 50 ml.
- ❖ Adicionar 20 ml de solución hipotónica estéril (solución de lisis de glóbulos rojos), agitar y esperar 20 minutos.
- ❖ Centrifugar a 4000 rpm, 4° C durante 10 minutos, desechar el sobrenadante y repetir la operación dos veces más (lavados necesarios hasta lograr un sobrenadante claro).
- ❖ Desechar el sobrenadante y al botón de células blancas que queda adicionar un mililitro de DNAzol* y homogenizar.
- ❖ Transferir a un tubo eppendorf y centrifugar a 10 000 rpm a 4° C durante 10 minutos.
- ❖ Transferir 500 µL por duplicado a un eppendorf, adicionar 1 ml de etanol absoluto frío e invertir el eppendorf para precipitar el ADN.
- ❖ Centrifugar cada eppendorf a 10 000 rpm 4° C durante 10 minutos, desechar el sobrenadante y adicionar 1 ml de etanol al 70 %.
- ❖ Resuspender el DNA y centrifugar a 10 000 rpm durante 5 minutos a 4° C. Desechar el sobrenadante, repetir la operación una vez más.
- ❖ Decantar el alcohol y pasar los tubos al liofilizador (Speed Vac: Savant Automatical Enviromental AES2000) durante 10 minutos para eliminar el exceso de etanol. Si es necesario repetir la operación.
- ❖ Resuspender en 1 mL de agua nanopura estéril, guardar a 20° C bajo cero.

5.3 La reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction), inicialmente descrita por Kary B. Mullis en 1985, (ganador del premio Nóbel de Química en 1993), es una técnica que imita la forma en que la naturaleza lleva a cabo la replicación del ADN. Se sabe que la polimerasa de ADN de especies bacterianas que viven en fuentes termales es estable a temperaturas de 90° C, muy por encima de la temperatura que destruye la actividad de otras polimerasas de ADN. Mullis y colaboradores aprovecharon esta enzima para desarrollar la técnica de PCR (Campbell M y Farell S 2004, Karp G 1998).

La PCR es un método enzimático *in vitro* para la síntesis de secuencias específicas de DNA. Esta técnica utiliza dos oligonucleótidos (oligos) cebadores que hibridizan a las cadenas opuestas y flanquean la región de interés en el DNA blanco. Posteriormente una serie de ciclos repetitivos, involucran la desnaturalización del DNA molde, alineación de los oligos y la extensión de los mismos por la DNA polimerasa, esto da como resultado una acumulación exponencial de un fragmento específico cuyo punto terminal esta definido por los extremos 5' de los oligos. Dado que el producto de la extensión de los oligos sintetizados en un ciclo, sirve como molde en el próximo, el número de copias de DNA blanco se duplica en cada ciclo. Por ejemplo, al final de 30 ciclos un único fragmento de DNA se ha amplificado 1000 millones de veces. (McKee T y McKee J 2003, Campbell M y Farell S 2004).

5.3.1 Diseño de "primers"

Los iniciadores específicos "primers" para el exon 2 del gene MICA fueron diseñados utilizando la secuencia de los alelos reportados en la base de datos EMBL y GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>).

La localización de los iniciadores se obtuvo en base a la secuencia del DNAC de MICA reportado por Bahram *et al.* (1996a), bajo el número de acceso X92841.

Los primers seleccionados fueron de 24 nucleótidos:

Tabla 5.1 .-Localización de los iniciadores usados para la amplificación del exon 2 de MICA.

Primer	Orientación	Longitud	Ubicación	Localización*	Secuencia
MICA5'Ex2	sentido	24	Intrón 1	6826-6849	5'-TCTTGTCCCTTTGCCCGTGTGCAT-3'
MICA3'Ex2	antisentido	24	Intrón 2	7324-7301	5'-CCCCATTTCCTACCCCCAGCCTG-3'

5.3.2. Condiciones para la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR)

Debido a la relación que el gene MICA guarda con los genes del MHC de clase I, se decidió iniciar con un protocolo de PCR similar al que se utiliza para este grupo de genes, llegando después de algunas modificaciones experimentales a las concentraciones de reactivos siguientes: 1µg de ADN, 12.5 pmol de cada primer, 0.2 mM de desoxinucleótidos (dNTP's) (Fermentas, Life Sciences), amortiguador de reacción 1 X (KCl 50 mM, TRIS-HCl pH 8.3, 10 mM), 2 mM de MgCl₂ y 0.75 UI de *Taq* polimerasa (Amplificasa, Biotecnologías Universitarias) en un volumen total de 25 µl.

Tabla 5.2.- Condiciones de amplificación en el termociclador (M.J. Research PTC-200 Cyclor).

Paso	Temperatura °C	Tiempo
1(desnaturalización)	95	4 min.
2(desnaturalización)	95	30 s
3(alineamiento)	65	50 s
4(duplicación)	72	30 s
5	repetir pasos 2 - 4, 32 Veces	
6(extensión)	72	8 min.
7	15	por siempre

Los fragmentos obtenidos del exon 2 son de 499 pares de bases.

5.4. Electroforesis para verificar la presencia de los exones amplificados

La electroforesis es un método para separar moléculas cargadas que migran en respuesta a la aplicación de un campo eléctrico. En una electroforesis en gel, una muestra con moléculas de tamaño heterogéneo se separa a través de una matriz inerte, la agarosa, avanzando en función de su tamaño.

La electroforesis en gel de agarosa es un método utilizado en la separación, identificación y purificación de fragmentos de ADN, esta técnica es rápida y simple y es capaz de separar fragmentos de ADN que por otros procedimientos no se pueden definir adecuadamente. Los geles de agarosa pueden ser revelados mediante la adición de una sustancia como el bromuro de etidio que se intercala con los fragmentos de ADN y los hace visibles a la luz ultravioleta. Los geles de

agarosa usualmente se corren de manera horizontal en un campo eléctrico en una dirección y voltaje constante (Sambrook 1989).

Los productos de las reacciones de PCR se sometieron a electroforesis en una cámara de electroforesis horizontal (Owl*), en geles de agarosa (Invitrogen*) al 1% en amortiguador TBE 0.5X, teñidos con 2 μ l de Bromuro de etidio (Promega*).

5.4.1 Técnica para electroforesis en gel de agarosa

- ❖ Preparar agarosa al 1% en TBE 0.5X, calentar hasta que se disuelva por completo.
- ❖ Adicionar a la solución anterior 3 μ L de bromuro de etidio y homogenizar perfectamente.
- ❖ Verter en la cámara de electroforesis la solución de agarosa, la cual ya tiene puestos los peines, tapar la cámara y dejar solidificar por espacio de 30 minutos.
- ❖ Una vez solidificado el gel adicionar TBE 0.5X hasta cubrir por completo el gel, retirar los peines con cuidado.
- ❖ Colocar en el pozo número uno el marcador de pesos moleculares (Invitrogen*) y en el pozo 2 colocar el blanco, y a partir del tercer pozo colocar las muestras amplificadas. Las muestras se mezclan con el buffer de carga (Promega Corporation) conforme se van colocando en los pozos (4 μ L de amplificado y 4 μ L de buffer).
- ❖ Aplicar una corriente de 80 Volts durante 1 h 10 minutos.
- ❖ Observar la presencia de las bandas en el transiluminador
- ❖ Tomar las fotografías necesarias (Software UVP) y guardarlas.

5.5. Caracterización molecular del exon 2 del gen MICA e identificación por medio de hibridación molecular (SSOP).

La amplificación de secuencias específicas de DNA por PCR seguida por la hibridación con oligonucleótidos secuencia específica (SSO ó SSOP) ha sido una poderosa técnica para el análisis detallado de variaciones genéticas (Argüello *et al.* 1996, Aquino G.A. 2004). Tradicionalmente la técnica se inicia con el extremo 5' radiomarcado (usualmente con P³²) del SSO; sin embargo desde que se descubrió que el marcaje radiactivo tiene muchas desventajas, se reemplazo por una prueba no radioactiva utilizando marcaje con digoxigenina (DIG), el cual se utilizo en este estudio.

5.5.1 Sondas de oligonucleótidos.

Con las secuencias obtenidas de la búsqueda en las bases de datos EMBL y GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>, <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>, Robinson *et al.* 2001), se diseñaron sondas de oligonucleótidos que abarcan secuencias específicas (motifs) que se encuentran localizados a lo largo del exon 2 (Mendoza-Rincón *et al.* 1999, Pérez-Rodríguez 2000). Un conjunto de 9 sondas fue usado para estudiar las posiciones polimórficas del exon 2 de 61 alelos reportados de MICA. La posición de las sondas y su secuencia se encuentra reportada en la tabla 5.3.

Posteriormente, las sondas de oligonucleótidos fueron marcadas con digoxigenina 3'DIG de acuerdo a las instrucciones facilitadas por el proveedor (Oligonucleotide 3' –End Labeling Kit, Cat. No 1362372 Roche Molecular Biochemicals)

Tabla 5.3.- Sondas usadas para la determinación de los alelos MICA. Secuencia y ubicación.

Sonda*	Ubicación #	Secuencia
MICA-ANP00	Exon 2 (7–24)	ACAGTCTTCCTTATAACC
MICA-ANP01	Exon 2 (7–24)	ACAGTCTTCGTTATAACC
MICA-ANP02	Exon 2 (30–47)	GTGCTGTCCTGGGATGGA
MICA-ANP03	Exon 2 (31–48)	TGCTGTCCGGGGATGGAT
MICA-ANP04	Exon 2 (60–77)	GGGTTTCTCACTGAGGTA
MICA-ANP05	Exon 2 (60–77)	GGGTTTCTCGCTGAGGTA
MICA-ANP06	Exon 2 (60–77)	GGGTTTCTTGCTGAGGTA
MICA-ANP07	Exon 2 (97–114)	TCCTGCGCTGTGACAGGC
MICA-ANP08	Exon 2 (97–114)	TCCTGCGCTATGACAGGC

*El número de identificación de la sonda contiene el nombre del locus, MICA y un código institucional, ANP00-AN08 (Anthony Nolan Research Institute).

#La localización de la sonda es con base a la secuencia del DNAC de MICA reportado por Bahram *et al.* 1996, bajo el número de acceso X92841

5.5.2 Hibridación de los productos de PCR

El DNA de las diferentes muestras amplificadas se desnaturalizó por calor a 95° por 5 minutos. Seguido de su colocación en membranas de nylon cargadas positivamente, de dimensiones 7 x 11 cm (Cat. No 1 209 272 Roche Molecular Biochemicals), utilizando para tal fin un aparato Hydra dot-blot (Robbins Scientific Corporation). Posteriormente, el DNA se inmovilizó en las membranas utilizando un aparato Cross linker (Hoefer Scientific) que emplea luz ultravioleta (UV) 254nm durante 2 minutos.

La hibridación de las membranas se llevó a cabo de la siguiente manera: las membranas primero fueron incubadas a 58° C durante 60 minutos en solución de prehibridización (DIG easy Hyb Cat. No 1 209 272 Roche Molecular Biochemicals). Se continuó con la hibridación utilizando una solución de hibridación (DIG easy Hyb Cat. No 1 209 272 Roche Molecular Biochemicals), que contenía 2 pmol/ml de la sonda de oligonucleótidos marcadas con DIG durante 90 minutos a 58° C. Enseguida las membranas fueron lavadas dos veces en una solución de SSC (citrato de sodio, cloruro de sodio) 2X-0.1% SDS (dodecilsulfato de sodio) por 10 minutos a temperatura ambiente y un lavado adicional más empleando SSC 0.5X-0.1% SDS por 10 minutos a temperatura ambiente.

5.5.3 Revelado de la hibridación

Los puntos de reacción (dots) fueron desarrollados empleando el kit de lavado, bloqueo y detección “DIG Wash and Block Buffer Set” (Cat. No 1 585 762 Roche Molecular Biochemicals) junto con el anticuerpo específico para DIG (anti-DIG: cat. No 1 093 274 Roche Molecular Biochemicals) y el sustrato NBT/BCIP (cat. No 1 681 451 Roche Molecular Biochemicals), con las siguientes indicaciones: después de los lavados en soluciones de SSC, las membranas fueron lavadas en solución amortiguadora (buffer) de lavado durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se sometieron a la solución de bloqueo durante 35 minutos y se incubaron por 40 minutos en 5 ml de solución de bloqueo que contenía el anticuerpo (anti DIG) en dilución 1:5000; nuevamente se realizaron dos lavados de 15 minutos en solución amortiguadora de lavado, con la finalidad de remover enlaces inespecíficos del anticuerpo y finalmente se equilibraron las membranas colocándolas durante 3 minutos en amortiguador de detección, para revelarlas por último con el sustrato NBT/BCIP. Las membranas son incubadas a temperatura ambiente y en la oscuridad para realizar la primera observación de los resultados después de una hora y a las 14-16 horas. Se tomaron fotografías de las membranas para el posterior análisis de resultados.

5.6 Análisis de los resultados

Con la finalidad de realizar la asignación de los alelos se utilizaron las fotografías de las membranas y un programa de cómputo que fue diseñado específicamente para este trabajo por la profesora de la FES Zaragoza M en C Margarita Cruz Millán. En los casos que no fue posible la asignación con el programa, se realizó manualmente la revisión de las señales obtenidas con la ayuda del Q.F.B. Ángel Camarena O. y la asignación fue dada a través de la comparación con los patrones de hibridación (Tablas 6.3, 6.4 y 6.5).

Con los datos obtenidos se determinó la frecuencia génica de los diferentes alelos encontrados.

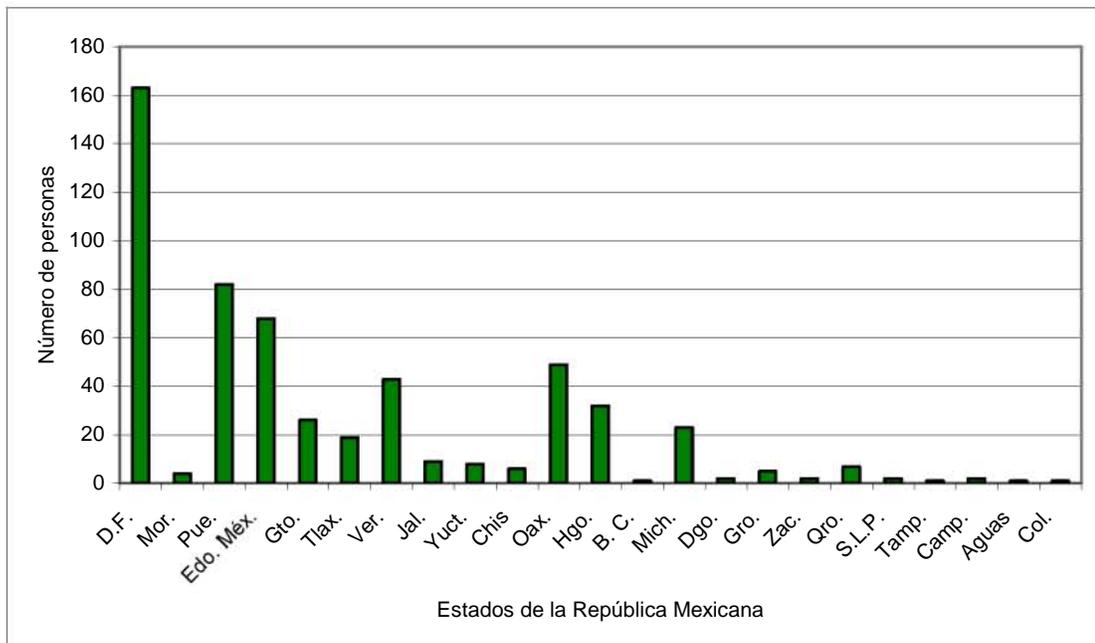
6. RESULTADOS

6.1 Muestras de DNA

Se obtuvieron por el método de salting-out, 103 muestras de DNA de individuos, mestizos mexicanos no relacionados, nacidos en la Ciudad de México. En la población mestiza mexicana se considera a aquellos individuos que por dos generaciones incluyendo la suya, han nacido en México (Vargas et al 2002).

De los donadores el 63% fueron mujeres y el 37% hombres, con una edad promedio de 23 años. Al analizar los datos demográficos de los familiares (padres y abuelos) de los donadores se observó que la mayoría son del centro del país (Distrito Federal, Estado de México, Puebla, Oaxaca, Hidalgo, Veracruz, (gráfica 6.1).

Grafica 6.1.- Datos demográficos de los familiares (padres y abuelos de los donadores).



6.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

6.2.1 Oligonucleótidos (Primers)

La localización de los iniciadores (primers) se obtuvo con base a la secuencia del DNAC de MICA reportado por Bahram *et al* (1996a), bajo el número de acceso X92841, de tal forma que se obtuviera el exon 2 completo, por lo que se localizan en los intrones 1 y 2. Los primers seleccionados fueron de 24 nucleótidos y su secuencia, ubicación, localización y orientación se encuentran en la tabla 5.1

6.2.2 Condiciones para la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR)

Debido a la relación que el gene MICA guarda con los genes del MHC de clase I, se decidió iniciar con un protocolo de PCR similar al que se utiliza para este grupo de genes, llegando después de algunas modificaciones experimentales a las concentraciones de reactivos siguientes: 1 µg de ADN, 12.5 pmol de cada primer, amortiguador de reacción 1 X (KCl 50 mM, TRIS-HCl pH 8.3, 10 mM), 0.2 mM de desoxinucleótidos (dNTPs'), 2 mM de MgCl₂ y 0.75 UI de *Taq* polimerasa en un volumen total de 25 µl. Iniciándose con una desnaturalización a 95° C durante 5 min.; 33 ciclos de 95° C/30 seg., 65° C/50 seg. y 72° C/30 seg. y un ciclo final de 8 min. a 72° C. Los fragmentos obtenidos fueron de 499 pares de bases.

Se obtuvo el 72% de amplificadas del fragmento del exon 2 de las 103 muestras, el 28% restantes no fue posible amplificarlo, por lo que se recomendaría incluir un control de beta actina para descartar, que la no amplificación sea debida a alguna falla del sistema o de la muestra, o a la presencia de alguna carencia real de exon.

6.3 Caracterización molecular del exon 2 del gen MICA e identificación por medio de hibridación molecular (SSOP).

6.3.1 Sondas de oligonucleótidos

En el estudio del exon 2 por SSOP se empleo un conjunto de 9 sondas para detectar las posiciones polimórficas en ese exon, en los 61 alelos previamente reportados. La sonda ANP00 y ANP01 detectan el cambio polimórfico del codón 6, la sondas ANP02 y ANP03 detectan el cambio del codón 14, las sondas ANP04, ANP05 y ANP06 permiten observar el cambio de los codones 23 y 24, y finalmente las sondas ANP07 y ANP08 detectan la variación del codón 36.

En la tabla 6.1 se indica la secuencia de la sondas, su ubicación, el codón polimórfico y el aminoácido correspondiente.

Tabla 6.1.- Secuencia, ubicación, codón polimórfico y aminoácido correspondiente de las sondas empleadas para la determinación de los alelos MICA.

Sonda*	Ubicación #	Secuencia	Codón	aa
MICA-ANP00	Exon 2 (7–24)	ACAGTCTT CCT TATAACC	6	Pro
MICA-ANP01	Exon 2 (7–24)	ACAGTCTT CGT TATAACC	6	Arg
MICA-ANP02	Exon 2 (30–47)	GTGCTGTCC TGG GATGGA	14	Trp
MICA-ANP03	Exon 2 (31–48)	TGCTGTCC GGG GATGGAT	14	Gly
MICA-ANP04	Exon 2 (60–77)	GGGTTTCTC ACT GAGGTA	24	Thr
MICA-ANP05	Exon 2 (60–77)	GGGTTTCTC GCT GAGGTA	24	Ala
MICA-ANP06	Exon 2 (60–77)	GGGTTT CTT GCTGAGGTA	23	Leu
MICA-ANP07	Exon 2 (97–114)	TCCTGCGC TGT GACAGGC	36	Cys
MICA-ANP08	Exon 2 (97–114)	TCCTGCGC TAT GACAGGC	36	Tyr

*El número de identificación de la sonda contiene el nombre del locus, MICA y un código institucional, ANP00-ANP08 (Anthony Nolan Research Institute).

#La localización de la sonda es con base a la secuencia del DNAC de MICA reportado por Bahram *et al.* 1996, bajo el número de acceso X92841

6.3.2 Patrones de hibridación

6.3.2.1 Fue necesario investigar las secuencias de los 61 alelos y elaborar los patrones de hibridación para cada uno de ellos, con las 9 sondas empleadas. (<http://www.anthonynolan.com/HIG/lists/otherlist.html>) (tabla 6.2).

MICA	00	01	02	03	04	05	06	07	08
001	-	+	+	-	+	-	-	+	-
002	-	+	-	+	-	+	-	+	-
003	-	+	+	-	-	-	+	+	-
004	-	+	+	-	-	-	+	-	+
005	-	+	+	-	-	-	+	-	+
006	-	+	+	-	-	-	+	-	+
007	-	+	+	-	-	+	-	+	-
008	-	+	+	-	-	-	+	-	+
009	-	+	+	-	-	-	+	-	+
010	+	-	+	-	-	-	+	-	+
011	-	+	-	+	-	+	-	+	-
012	-	+	+	-	+	-	-	+	-
013	-	+	-	+	-	+	-	+	-
014	-	+	-	+	-	+	-	+	-
015	-	+	-	+	-	+	-	+	-
016	-	+	+	-	-	-	+	-	+
017	-	+	-	+	-	+	-	+	-
018	-	+	+	-	+	-	-	+	-
019	-	+	+	-	-	-	+	-	+
020	-	+	-	+	-	+	-	+	-
021	-	+	+	-	+	-	-	+	-
022	-	+	-	+	-	+	-	+	-
023	-	+	-	+	-	+	-	+	-
024	-	+	+	-	-	-	+	-	+
025	+	-	+	-	-	-	+	-	+
026	-	+	+	-	-	+	-	+	-
027	-	+	+	-	-	-	+	-	+
028	-	+	+	-	-	-	+	-	+
029	-	+	+	-	-	+	-	+	-
030	-	+	-	+	-	+	-	+	-
031	-	+	+	-	-	-	+	-	+
032	-	+	+	-	-	-	+	-	+
033	-	+	+	-	-	-	+	-	+
034	-	+	-	+	-	+	-	+	-
035	-	+	-	+	-	+	-	+	-
036	-	+	-	+	-	+	-	+	-
037	-	+	+	-	-	+	-	+	-
038	-	+	+	-	-	+	-	+	-
039	-	+	+	-	-	+	-	+	-
040	-	+	+	-	-	+	-	+	-
041	-	+	-	+	-	+	-	+	-
042	-	+	+	-	-	-	+	-	+
043	-	+	+	-	-	+	-	+	-
044	-	+	-	+	-	+	-	-	+
045	-	+	+	-	-	+	-	+	-
046	-	+	-	+	-	+	-	+	-
047	-	+	-	+	-	+	-	+	-
048	-	+	+	-	-	-	+	-	+
049	-	+	+	-	-	-	+	-	+
050	-	+	-	+	-	+	-	+	-
051	-	+	+	-	-	-	+	-	+
052	-	+	-	+	-	+	-	+	-
053	-	+	-	+	-	+	-	+	-

Tabla 6.2.- Patrón de hibridación para cada uno de los alelos y las sondas.

6.3.2.2 Como varios de los alelos presentaban resultados similares con las 9 sondas, se formaron 7 grupos de ellos. El patrón de hibridación empleado, que indica las reacciones entre las 9 sondas utilizadas y los 7 grupos se encuentra representado en la tabla 6.3.

Tabla 6.3.- Patrón de hibridación de las sondas de oligonucleótidos para los 7 grupos de alelos de MICA.

Grupo #	Alelos MICA	Sondas								
		ANP00	ANP01	ANP02	ANP03	ANP04	ANP05	ANP06	ANP07	ANP08
1	MICA*001, *012, *018, *021	-	+	+	-	+	-	-	+	-
2	MICA*002, *011, *013, *014, *015, *017, *020, *022, *023, *030, *034, *035, *036, *041, *046, *047, *050, *052, *053	-	+	-	+	-	+	-	+	-
3	MICA *003	-	+	+	-	-	-	+	+	-
4	MICA *004, *005, *006, *008, *009, *016, *019, *024, *027, *028, *031, *032, *033, *042, *048, *049, *051	-	+	+	-	-	-	+	-	+
5	MICA*007, *026, *029, *037, *038, *039, *040, *043, *045	-	+	+	-	-	+	-	+	-
6	MICA*010, *025	+	-	+	-	-	-	+	-	+
7	MICA*044	-	+	-	+	-	+	-	-	+

Los alelos fueron agrupados de acuerdo al patrón de reactividad con las 9 sondas

6.3.2.3 Se elaboro un patrón de hibridación de los cambios polimórficos con las 9 sondas utilizadas, considerando la posibilidad de que las muestras resultaran heterocigotos, encontrándose 28 posibilidades que se muestran en la tabla 6.4.

Tabla 6.4.- Patrón de hibridación de las sondas de oligonucleótidos para los alelos de MICA (Heterocigotos).

Combinación	Alelos MICA		Sondas								
	Grupo [#]	Grupo [#]	ANP00	ANP01	ANP02	ANP03	ANP04	ANP05	ANP06	ANP07	ANP08
1	MICA*001 ^a	MICA*001 ^a	-	+	+	-	+	-	-	+	-
2	MICA*001 ^a	MICA*002 ^a	-	+	+	+	+	+	-	+	-
3	MICA*001 ^a	MICA*003	-	+	+	-	+	-	+	+	-
4	MICA*001 ^a	MICA*004 ^a	-	+	+	-	+	-	+	+	+
5	MICA*001 ^a	MICA*007 ^a	-	+	+	-	+	+	-	+	-
6	MICA*001 ^a	MICA*010 ^a	+	+	+	-	+	-	+	+	+
7	MICA*001 ^a	MICA*044	-	+	+	+	+	+	-	+	+
8	MICA*002 ^a	MICA*002 ^a	-	+	-	+	-	+	-	+	-
9	MICA*002 ^a	MICA*003	-	+	+	+	-	+	+	+	-
10	MICA*002 ^a	MICA*004 ^a	-	+	+	+	-	+	+	+	+
11	MICA*002 ^a	MICA*007 ^a	-	+	+	+	-	+	-	+	-
12	MICA*002 ^a	MICA*010 ^a	+	+	+	+	-	+	+	+	+
13	MICA*002 ^a	MICA*044	-	+	-	+	-	+	-	+	+
14	MICA*003	MICA*003	-	+	+	-	-	-	+	+	-
15	MICA*003	MICA*004 ^a	-	+	+	-	-	-	+	+	+
16	MICA*003	MICA*007 ^a	-	+	+	-	-	+	+	+	-
17	MICA*003	MICA*010 ^a	+	+	+	-	-	-	+	+	+
18	MICA*003	MICA*044	-	+	+	+	-	+	+	+	+
19	MICA*004 ^a	MICA*004 ^a	-	+	+	-	-	-	+	-	+
20	MICA*004 ^a	MICA*007 ^a	-	+	+	-	-	+	+	+	+
21	MICA*004 ^a	MICA*010 ^a	+	+	+	-	-	-	+	-	+
22	MICA*004 ^a	MICA*044	-	+	+	+	-	+	+	-	+
23	MICA*007 ^a	MICA*007 ^a	-	+	+	-	-	+	-	+	-
24	MICA*007 ^a	MICA*010 ^a	+	+	+	-	-	+	+	+	+
25	MICA*007 ^a	MICA*044	-	+	+	+	-	+	-	+	+
26	MICA*010 ^a	MICA*010 ^a	+	-	+	-	-	-	+	-	+
27	MICA*010 ^a	MICA*044	+	+	+	+	-	+	+	-	+
28	MICA*044	MICA*044	-	+	-	+	-	+	-	-	+

^a Son grupos de alelos MICA *001, *002, *004, MICA* 010 sólo es *010 y *025

6.3.4 Los resultados de cada una de las muestras fueron comparados con los patrones de hibridación (Tablas 6.2, 6.3 y 6.4), ya sea con el programa de cómputo o manualmente para dar la asignación de los alelos. En la tabla 6.6 se presentan las frecuencias de mayor a menor, de los alelos identificados, se observa que se detectaron 6 de los 7 grupos catalogados con base al patrón de hibridación y que el heterocigoto de los grupos MICA*002 y MICA*004 presenta la mayor frecuencia, con una frecuencia génica de 24 %, seguido de MICA*010 y grupo MICA*002 con una frecuencia génica de 19%.

Tabla 6.5.- Frecuencia de alelos MICA identificados en población mestiza mexicana. N=62.

alelos	n	f.g.
*002 ^a - *004 ^a	15	0.24
*010 ^b	12	0.19
*002 ^a	12	0.19
*002 ^a - *003	4	0.064
*001 ^a - *044	3	0.048
*001 ^a - *002 ^a	3	0.048
*004 ^a - *044	2	0.032
*002 ^a - *044	1	0.016
*004 ^a	1	0.016
Ambiguos	9	0.14

f. g. = frecuencia génica

^a Son grupos de alelos MICA *001, *002, *004,

^b MICA*010 sólo es *010 y *025

7. DISCUSIÓN

En el presente estudio para la caracterización molecular del exon dos del gene MICA por SSOP, se utilizó un conjunto de 9 sondas marcadas con digoxigenina, que localizan los principales cambios polimórficos que se presentan en este exon. Se formaron 7 grupos de alelos de acuerdo al patrón de reactividad con las 9 sondas. Los alelos MICA encontrados con mayor frecuencia fueron MICA*002^a-*004^a con 24%, seguido por MICA*010 (19%), MICA*002^a (19%), MICA*002^a - *003 (6.4%), *001^a-*044 (4.8%), *001^a - *002^a (4.8%), *004^a - *044 (3.2%), *002^a - *044 (1.6 %), *004^a (1.6%).

Los resultados obtenidos concuerdan con lo hasta ahora reportado para otras poblaciones en la literatura, en donde MICA*002, MICA*004, MICA*008 y MICA*010 presentan las mayores frecuencias aunque con porcentajes diferentes (Petersdorf 1999, Tian 2001, 2003, Zhang 2003, Gao 2006), es importante hacer notar que nuestro grupo MICA*004^a incluye a MICA*008 y MICA*027, ya que se tiene el reporte en indios sudamericanos en donde MICA*002, MICA*027 y MICA*010 abarcan el 90% del total de los alelos encontrados (Zhang 2002a).

Para la inclusión en el presente estudio se definió mestizo mexicano a individuos cuyos padres y abuelos hayan nacido en la Republica Mexicana (Vargas *et al.* 2002), esta población ha sido estudiada y presenta un 56% de genes amerindios 40% genes caucásicos y 4% genes negros.

De las 62 muestras, 9 (14%) mostraron resultados ambiguos que no permitieron su identificación.

Es importante resaltar que éstos resultados contribuyen a la determinación del polimorfismo de la población mestiza mexicana, pero también, contribuirán a aclarar su vínculo con los genes HLA-B, debido a su cercanía, y en consecuencia su participación en diversos padecimientos donde HLA-B está involucrado ya que

se ha demostrado una estrecha asociación del gene MICA y del HLA-B en ciertas enfermedades inflamatorias, infecciosas, degenerativas o autoinmunes (Fodil et al. 1996), como la enfermedad de Behcet (Mizuki 1997, Wallace et al. 1999, Picco et al. 2002, Park SH et al. 2002), la enfermedad autoinmune de Addison (Gambelunghé 1999), la psoriasis (Choi 2002), la artritis psoriática (González et al. 1999, 2002, 2003), la uveítis anterior aguda (Goto et al 1998) y la Diabetes tipo 1 (Lee 2000, Gambelunghé 1999, 2001, Nejentsev 2000).

De hecho, la localización de los genes MIC, su estructura y la expresión de las moléculas de estos genes en ciertos tipos celulares son una base importante para suponer cierta susceptibilidad a enfermedades dependiendo del alelo expresado.

Por otro lado, conociendo que los alelos *HLA-B* más frecuentemente encontrados en la población mestiza mexicana son B*05, B*15, B*35, B*39, B*40 y B*48 (Granados J y Camarena A, comunicación personal) y uniéndolo con los resultados del presente trabajo respecto a los alelos MICA identificados MICA*002, MICA*004, MICA*008, MICA*010 y MICA*027 y con lo reportado al respecto en la literatura (Collins RW., 2004), podríamos suponer que los haplotipos más comunes en nuestra población de estudio serían: MICA*002/HLA-B*35, MICA*002/HLA-B*39, MICA*008/HLA-B*40, MICA*010/HLA-B*15, MICA*027/HLA-B*40, MICA*027/HLA-B*48.

Cabe mencionar que también existe el interés por desarrollar nuevas estrategias moleculares que puedan emplearse para tipificar a los genes MICA y MICB (Mendoza et al. 1999, Stephens et al. 1999, Zhang Y et al. 2001, Gao X et al. 2006), en los casos en los que su determinación molecular sea indispensable para establecer algún diagnóstico debido a la asociación demostrada de estos genes con el HLA-B, o en estudios de poblaciones en los que la determinación del polimorfismo de estos genes ha manifestado ser importante tanto para un mejor conocimiento de la evolución de las características de esa población como para diversos estudios clínicos. Por lo que el método utilizado en este estudio pudiera

usarse, ya que en este sentido se confirmó que la técnica ya estandarizada en este trabajo puede ser empleada utilizando las bases establecidas, realizando mejoras en el software y utilizando controles que mejoren la detección y faciliten la interpretación.

Actualmente no se utilizan en clínica las pruebas de compatibilidad en los trasplantes de médula ósea que consideren los alelos de MICA, sin embargo se ha visto que esta molécula juega un papel importante en el mecanismo de rechazo, por lo que el conocimiento del polimorfismo de este gene MICA permitirá una mejor definición de la compatibilidad donador-receptor en los trasplantes de médula ósea.

En el presente trabajo se analizó el polimorfismo del exon dos empleando 9 plantillas moleculares (sondas), lo que permitió su identificación en 7 grupos de alelos que presentaron el mismo patrón de reactividad, sin embargo se sugiere utilizar sondas para los exones 3 y 4 de tal manera que se llegue a la identificación individual de los alelos, asimismo, es necesario un mayor número de análisis que permitan clarificar la distribución de los alelos de los genes MIC en poblaciones de diferentes orígenes, incluyendo la mexicana.

En conclusión esta es la primera descripción en población mexicana del extraordinario polimorfismo genético de los genes MICA.

8. CONCLUSIONES

1. Los alelos MICA encontrados con mayor frecuencia fueron MICA*002^a - *004^a con 24%, seguido por MICA*010 (19%), MICA*002^a (19%), lo que coincide con las poblaciones estudiadas hasta la fecha.
2. Esta es la primera descripción en población mexicana del extraordinario polimorfismo genético de los genes MICA.
3. Los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento del gene MICA y el de sus relaciones con HLA y algunas enfermedades en la población mestiza mexicana.
4. Se ha presentado un método para la detección molecular de los cambios polimórficos del gene MICA, accesible y razonablemente más rápido que los utilizados convencionalmente.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas et al. 2002. *Inmunología Celular y Molecular*. 4ª ed. Madrid, Esp.: Ed. Mc Graw Hill-Interamericana.
- Aida K, Russomando G, Kikuchi M, Candia N, Franco L, Almiron M, Ubalee R, Hirayama K. 2002. High frequency of MIC null haplotype (HLA-B48-MICA-del-MICB*0107N) in the Angaité Amerindian community in Paraguay. *Immunogenetics* 54:439-441.
- Ando H, Mizuki N, Ota M, Yamazaki M, Ohno S, Goto K, Miyata Y, Wakisaka K, Bahram S and Inoko H. 1997. Allelic variants of the human MHC class I chain-related B gene (MICB). *Immunogenetics*. 46:499-508.
- Aquino G A. 2004. Polimorfismo de los genes TAP en población mexicana con neumonitis por hipersensibilidad. Tesis de Maestría. México: Fac. de Ciencias, UNAM.
- Argüello E, Avakian H, Goldman J, Madrigal J A. 1996. A novel method for simultaneous high resolution identification of HLA-A, HLA-B and HLA-Cw alleles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 10961-10965.
- Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, Moore D D, Seidmann JG and Struhl K. 1990. *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol 2. NY, USA: John Wiley& Sons, INC.
- Bahram S and Spies T. 1996a. The MIC gene family. Non- polymorphic antigen presentation molecules. *Res Immunol*. 147:328-332.
- Bahram S and Spies T. 1996b. Nucleotide sequence of a human MHC class I MICB cDNA. *Inmunogenetics*. 43:230-33.
- Bahram S, Bresnahan M, Geraghty DE and Spies T. 1994. A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 91:6259-63.
- Bahram S, Mizuki N, Inoko H and Spies T. 1996a. Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics*. 44:80-1.
- Bahram S, Shiina T, Oka A, Tamiya G and Inoko H. 1996b. Genomic structure of the human MHC class I MICB gene. *Inmunogenetics*. 45:161-2.
- Bahram S. 2001. MIC genes: from genetics to biology. *Advances in Immunology*. 76:1-60.
- Bauer S, Groh V, Wu J, Steinle A, Phillips JH, Lanier LL and Spies T. 1999. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*. 285:727-9.

- Bolognesi E, D'Alfonso S, Rolando V, Fasano ME, Practico L, Momigliano-Richiardi P. 2001. MICA and MICB microsatellite alleles in HLA extended haplotypes. *Eur J Immunogenet.* 28: 523-530.
- Campbell M y Farell S. *Bioquímica*. 2004. 4^a ed. D.F. México: International Thomson Editores S.A.
- Cavalli-Sforza L.L., Bodmer W.F. 1981. *Genética de las poblaciones humanas*. Barcelona, Esp.: ediciones Omega, S.A.
- Choi HB, Han H, Youn JI, Kim TY, Kim TG. 2000. MICA 5.1 allele is a susceptibility marker for psoriasis in the Korean population. *Tissue Antigens* 56(6):548-50
- Collins RW. 2004. Human MHC class I chain related (MIC) genes: their biological function and relevance to disease and transplantation. *Eur J Immunogenet.* 31(3):105-14.
- Cox, RA 1968. *Methods in Enzymology* (Grossmann L, And Moldave E. Eds). Vol. 12, Part B. Orlando, FL. USA: Academic Press.
- De Leo C, Castelan N, López M, González N, Weckmann AL, Melin-Aldana H, Vargas-Alarcón G, Bordes J, Alarcón-Segovia D, Granados J, Ramírez E, Lisker R. 1997. HLA class I and class II alleles and haplotypes in mexican mestizos established from serological typing of 50 families. *Human Biology.* 69(6): 809-818.
- Dorak MT. 2006. Major Histocompatibility Complex. <http://dorakmt.tripod.com/mhc/mhc.html>, Last updated on 23 June 2006
- Fainboim L y Geffner J. 2005. *Introducción a la Inmunología Humana*. 5^a ed. Madrid Esp.: Editorial Médica Panamericana.
- Fischer G, Argüello JR, Pérez-Rodríguez M, McWhinnie A, Marsh SGE, Travers PJ and Madrigal JA. 2000. Sequence-specific oligonucleotide probing for MICB alleles reveals associations with MICA and HLA-B. *Immunogenetics.* 51:591-9.
- Fischer G, Perez-Rodriguez M, Arguello JR, Cox ST, McWhinnie A, Travers PJ, Madrigal JA. 2002. Three novel MICB alleles. *Tissue Antigens.* 55(2):166-70.
- Fodil N, Laloux L, Wanner V, Pellet P, Hauptmann G, Mizuki N, Inoko H, Spies T, Theodorou I and Bahram S. 1996. Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics.* 44:351-7.
- Fodil N, Pellet P, Laloux L, Hauptmann G, Theodorou I and Bahram S. 1999. MICA haplotypic diversity. *Immunogenetics.* 49:557-60.

- Gambelungho G, Falorni A, Ghaderi M, Laureti S, Tortoioli C, Santeusano F, Brunetti P, Sanjeevi C. Microsatellite Polymorphism on the MHC Class I Chain-Related (MIC-A and MIC-B) Genes Marks the Risk for Autoimmune Addison' Disease. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1999; 10: 3701-3707.
- Gambelungho G, Hhaderi M, Tortoioli C, Falorni A, Santeusano F, Brunetti P, Sanjeevi C, Falorni A. Two Distinct MICA Gene Markers Discriminate Major Autoimmune Diabetes Types. *The Journal of Endocrinology and Metabolism* 2001; 8: 3754-3760.
- Gao X, Single RM, Karacki P, Marti D, O'Brien S and Carrington M. 2006. Diversity of MICA and linkage disequilibrium with HLA-B in two north american populations. *Hum Immunol.* 67: 152-158.
- Gaudieri S, Giles KM, Kulski JK and Dawkins RL. 1997b. Duplication and polymorphism in the MHC: Alu generated diversity and polymorphism within the PERB11 gene family. *Hereditas.* 127:37-46.
- Gaudieri S, Leelayuwat C, Townend DC, Kulski JK and Dawkins R. 1997c. Genomic Characterization of the regio between HLA-B and TNF: Implications for the evolution of multicopy gene families. *J Mol Evol.* 44(suppl I): S147-S154.
- Gaudieri S, Leelayuwat C, Townend DC, Mullberg J; Cosman D and Dawkins RL. 1997a. Allelic and interlocus comparison of the PERB11 multigene family in the MHC. *Immunogenetics.* 45:209-16.
- Gong W, Fan L, Yang J, Xu L, Yao F. 2002. Analysis on polymorphism in exons 2,3 and 4 of the MICA gene in three different Chinese populations. *Zhonghua Yi Xue Yi Chuan Xue Za Zhi.* 19(4):336-9.
- González S, Martínez-Borra J, López-Vázquez A, García Fernández S, Torre-Alonso JC, L, López-Larrea C. 2002. MICA rather than MICB, TNFA, or HLA-DRB1 is associated with susceptibility to psoriatic arthritis. *J Reumatol* 29: 973-978.
- González S, Martínez-Borra J, Torre-Alonso JC, Gonzáles-Roces S, Sánchez del Río J, Rodríguez-Pérez A, Brautbar C, López-Larrea C. 1999. The MICA-A9 triplet repeat polymorphism in the transmembrane region confers additional susceptibility to develop psoriatic arthritis, and is independent of the association of cw*0602 in psoriasis. *Arthritis Rheum* 42: 1010-1016.
- González S, Rodríguez-Rodero S, Martínez-Borra J, López-Vázquez A, Rodrigo L, López-Larrea C. 2003. MICB typing by PCR amplification with séquence specific primers. *Immunogenetics.* 54(12): 850-5.

- Goto K, Ota M, Ohno S, Mizuki N, Ando H, Katsuyama Y, Maksymowych WP, Kimura M, Bahram S, Inoko H. 1998. MICA gene polymorphisms and HLA-B27 subtypes in Japanese patients with HLA-B27 associated acute anterior uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39: 634-637.
- Groh V, Bahram S, Bauer S, Herman A, Beauchamp M and Spies T. 1996. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93:12445-50.
- Groh V, Steinle A, Bauer S and Spies T. 1998. Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science.* 279:1737-40.
- Gruen JR, Weissman S. 1997. Evolving views of the major histocompatibility complex. *Blood.* 90(11): 4252-4265
- <http://dorakmt.tripod.com/mhc/mhc.html>
- <http://med.unne.edu.ar/catedras/bioquimica/hla.htm>
- <http://mhc-x.u-strasbg.fr/human.htm>
- <http://www.anthonynolan.com/HIG/lists/otherlist.html>, Julio 2006
- <http://www.anthonynolan.org.uk/HIG>
- http://www.anthonynolan.org.uk/HIG/seq/nuc/text/mica_nt.txt
- <http://www.ebi.ac.uk/imgt/hla/>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>
- Janeway Ch, Travers P, Walport M, Shlomchik M .2001. *Immunobiology*. Fifth edition. USA: Garland Publishing.
- Karp G. *Biología Celular y Molecular*. 1998. 1ª ed. D.F. México: Mc Graw Hill-Interamericana.
- Katsuyama Y, Ota M, Ando H, Saito S, Mizuki N, Kera J, Bahram S, Nose Y, Inoko H. 1999. Sequencing based typing for genetic polymorphisms in exons, 2, 3 and 4 of the MICA gene. *Tissue Antigens.* 54(2):178-84.
- Komatsu-Wakui M, Tokunaga K, Ishikawa Y, Kashiwase K, Moriyama S, Tsuchiya N, Ando H, Shiina T, Geraghty DE, Inoko H, Juji T. 1999. MICA polymorphism in Japanese and a MICA-MIC-B null haplotype. *Immunogenetics.* 49(7-8):620-8.

- Komatsu-Wakui M, Tokunaga K, Ishikawa Y, Leelayuwat C, Kashiwase K, Tanaka H, Moriyama S, Nakajima F, Park MH, Jia GJ, Chinge NO, Sideltseva EW, Juji T. 2001. Wide distribution of the MICA-MICB null haplotype in East Asians. *Tissue Antigens*. 57(1):1-8.
- Lee YJ, Huang FY, Wang CH, Lo FS, Tsan KW, Hsu CH, Huang CY, Chang SC and Chang JG. 2000. Polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene and type 1 diabetes. *J Pediatr Endocrinol Metab* 13(5):489-496.
- Leelayuwat C, Pinelli M and Dawkins RL. 1995. Clustering of diverse replicated sequences in the MHC. *J. Immunol*. 155:692-8
- Leelayuwat C, Towned DC, Degli-Esposti MA, Abraham LJ and Dawkins RL. 1994. A new polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I. *Immunogenetics*. 40:339-351
- Li P, Willie ST, Bauer S, Morris DL, Spies T and Strong RK. 1999. Crystal structure of the MHC class I homolog MICA, a gd T cell ligand. *Immunity*. 10:577-84.
- Margni Ricardo Anibal. 1996. *Inmunología e Inmunología*. 5ª ed. Buenos Aires, Argentina: Editorial Médica Panamericana.
- Marin ML, Savioli CR, Yamamoto JH, Kalil J, Goldberg AC. 2004. MICA polymorphism in a sample of the Sao Paulo population, Brazil. *Eur J Immunogenet*. 31(2):63-71.
- Marsh SGE, Albert ED, Bodmer WF, Bontrop RE, Dupont B, Erlich HA, Geraghty DE, Hansen JA, Mach B, Mayr WR, Parham P, Petersdorf EW, Sasazuki T, Schreuder GM, Strominger JL, Svejgaard A, Terasaki PI. 2002. Nomenclature for factors of the HLA system, 2002. *Eur J Immunogenet*. 29: 463-515.
- McKee T y Mckee J. *Bioquímica*. 2003. 3ª ed. Madrid, Esp.: Mc Graw Hill-Interamericana.
- Mendoza Rincon JF, Partida Rodríguez O, Soto Cruz I, Corona Ortega MT, Rangel Corona R, García del Valle A, Weiss Steider B. 2001. *Vertientes* 4:11-18.
- Mendoza-Rincón J, Argüello JR, Pérez-Rodríguez M, McWhinnie A, Marsh SGE, Fischer G and Madrigal JA. 1999. Characterization of the MICA polymorphism by sequence-specific oligonucleotide probing. *Immunogenetics*. 49:471-8.

- Mizuki N, Ota M, Kimura M, Ohno S, Ando H, Katsuyama Y, Yamasaki M, Watanabe K, Goto K, Nakamura S, Bahram S, Inoko H. 1997. Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: A strong association of six GCT repetitions with Behcet's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:1298-1303.
- Nejentsev S, Gombos Z, Laine AP, Veijola R, Knip M, Simell O, Vaarala O, Akerblom HK and Ilonen J. 2000. Non-class II HLA gene associated with type 1 diabetes maps to the 240-kb region near HLA-B. *Diabetes* 49(12) 2217-2221.
- Park SH, Park KS, Seo Y, Min DJ, Kim WU, Kim TG, Cho ChS, Mok JW, Park KS, Kim HY. 2002. Association of MICA polymorphism with HLA-51 and disease severity in Korean patients with Behcet's disease. *J Korean Med Sci.* 17: 366-370.
- Pellet P, Renaud M, Fodil N, Laloux L, Inoko H, Hauptmann G, Debre P, Bahram S and Theodorou I. 1997. Allelic repertoire of the human MICB gene. *Inmunogenetics.* 46:434-6.
- Perez-Rodriguez M, Arguello JR, Fischer G, Corell A, Cox ST, Robinson J, Hossain E, McWhinnie A, Travers PJ, Marsh SG, Madrigal JA. 2002. Further polymorphism of the MICA gene. *Eur J Immunogenet.* 29(1):35-46.
- Perez-Rodriguez M, Corell A, Arguello JR, Cox ST, McWhinnie A, Marsh SG, Madrigal JA. 2000. A new MICA allele with ten alanine residues in the exon 5 microsatellite. *Tissue Antigens.* 55:162-165
- Pérez-Rodríguez ME. 2000. Análisis de nuevos polimorfismos asociados al complejo principal de histocompatibilidad. Tesis de Doctorado. México: Fac. de Medicina, UNAM.
- Petersdorf EW, Shuler KB, Longton GM, Spies T, Hansen JA. 1999. Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MICA gene. *Inmunogenetics.* 49(7-8):605-12.
- Piancatelli D, Del Beato T, Oumhani K, El Aouad R, Adorno D. 2005. MICA polymorphism in a population from north Morocco, Metalsa Berbers, using séquence-based typing. *Hum Immunol.* 66: 931-936.
- Picco P, Porfirio B, Gattorno M, Buoncompagni A, Falcini F, Cusano R, Bordo D, Pistoia V, Ravazzolo R, Seri M. 2002. MICA gene polymorphisms in an Italian paediatric series of juvenile Behcet's disease. *Int J Mol Med.* 10(5):575-8.
- Pyo CW, Hur SS, Kim YK, Choi HB, Kim TY, Kim TG. 2003. Distribution of MICA alleles and haplotypes associated with HLA in the Korean population. *Hum Immunol* 64(3):378-84

- Quiroga I, Sweeney D, Sutton PM, Ahmad T, Walton R, Barnardo MC, Fuggle SV. 2006. The identification of three novel MICA alleles by sequence-based typing. *Tissue Antigens*. Apr;67(4):321-325.
- Radillo González Alfredo. 1999. *Medicina Transfusional*. México, D.F.: Editorial Prado.
- Robinson J, Pérez-Rodríguez M, Waller MJ, Cuillerier B, Bahram S, Yao Zhu, Albert ED, Madrigal JA, Marsh SGE. 2001. MICA Sequences 2000. *Immunogenetics*. 53:150-169.
- Roitt I y Delves P. 2003. *Inmunología Fundamentos*. 10a ed. Madrid Esp.: Editorial Médica Panamericana.
- Romphruk AV, Naruse TK, Romphruk A, Kawata H, Puapairoj C, Kulski JK, Leelayuwat C, Inoko H. 2001. Diversity of MICA (PERB11.1) and HLA haplotypes in Northeastern Thais. *Tissue Antigens*. 58(2):83-9.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. NY USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shiina T, Tamiya G, Oka A, Takishima N, Inoko H. 1999. Genomic sequencing analysis of the 1.8 Mb entire human MHC class I region. *Immunol Rev*. 167: 193-
- Shiina T, Tamiya G, Oka A, Takishima N, Yamagata T, Kikkawa E, Iwata K, Tomizawa M, Okuaki N, Kuwano Y, Watanabe K, Fukuzumi Y, Itakura S, Sugawara Ch, Ono A, Yamazaki M, Tashiro H, Ando A, Ikemura T, Soeda E, Kimura M, Bahram S and Inoko H. 1999a. Molecular dynamics of the MHC genesis unraveled by sequence analysis of the 1,796,938-bp HLA class I region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 96(23): 13282-7.
- Steinle A, Li P, Morris DL, Groh V, Lanier LL, Spies T. 2001. Interactions of human NKG2D with its ligands MICA, MICB, and homologs of the mouse RAE-1 protein family. *Immunogenetics* 53(4): 279.
- Stephens HA, Vaughan RW, Collins R, Kondeatis E, Theron J and Payne A. 1999. Towards a molecular phototyping system for allelic variants of MICA, encoded by polymorphism in exons 2, 3 and 4 of MHC class I chain-related genes. *Tissue Antigens*. 53(2):167-74.
- Stephens HA. 2001. MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved?. *TRENDS Immunol*. 15 (4): 23-31.
- Stephens HA. 2002. MHC haplotypes, MICA genes and the "wonderland" of NK receptor polymorphism. *TRENDS Immunol*. 23 (8): 385-386.

- Tamarin R.H. 1996. Principios de genética. 4^a ed. Barcelona, Esp.: Editorial Reverté S.A.
- Tian, W., Boggs, D.A., Ding, W.Z., Chen, D.F. & Fraser, P.A. (2001) MICA genetic polymorphism and linkage disequilibrium with HLA-B in 29 African-American families. *Immunogenetics*, 53, 724.
- Tica V, Nikitina-Zake L, Donadi E, Sanjeevi CB. 2003. MIC-A genotypes 4/5.1 and 9/9 are positively associated with 1 diabetes mellitus in Brazilian population. *Ann N Y Acad Sci*. Nov;1005:310-3
- Vargas-Alarcón G, Gamboa R, Vergara Y, Rodríguez-Zepeda JM, de la Peña A, Izaguirre R, Zuñiga J, Ruíz-Morales JA and Granados J. 2002. LMP2 and LMP7 polymorphism in Mexican populations: Mestizos and Amerindians. *Genes and Immunity* 3:373-377
- Visser CJT, Tilanus MGJ, Tatari Z, Wil van der Zwan A, Bakker R, Rozemuller EH, Schaeffer V, Tamouza R and Charron D. 1999. Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes. *Immunogenetics*. 49:561-6.
- Wallace GR, Verity DH, Delamaine LJ, Ohno S, Inoko H, Ota M, Mizuki N, Yabuki K, Kondiatis E, Stephens HA, Madanat W, Kanawati CA, Stanford MR, Vaughan RW. 1999. MICA allele profiles and HLA class I associations in Behcet's disease. *Immunogenetics*. 49(7-8):613-7.
- Yabuki K, Mizuki N, Ota M, Katsuyama Y, Palimeris G, Stavropoulos C, Koumantaki Y, Spyropoulou M, Giziaki E, Kaklamani V, Kakalmani E, Inoko H and Ohno S. 1999. Association of MICA gene and HLA-B*5101 with Behcet's disease in Greece. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 40:1921-1926.
- Yao Z, Voigger A, Heimberg W, Keller E, Fan LA, Chandanayingyong D, Albert ED. 1999. Definition of new alleles of MIC-A using sequencing-based typing. *Eur J Immunogenet*. 26:225-232.
- Zhang Y, Han M, Vorhaben R, Giang C, Lavingia B, Stastny P. 2003. Study of MICA alleles in 201 African Americans by multiplexed single nucleotide extension (MSNE) typing. *Hum Immunol*. 64(1):130-6.
- Zhang Y, Lazaro AM, Lavingia B and Stastny P. 2001. Typing for all known MICA alleles by group-specific PCR and SSOP. *Hum Immunol*. 62(6):620-31.
- Zhang Y, Lazaro AM, Mirbaha F, Lavingia B, Vorhaben R, Stastny P. 2002b. Characterization of a novel MICA allele, MICA*047. *Tissue Antigens*. 59(4):308-10.

- Zhang Y, Lazaro AM, Zou Y, Lavingia B, Moraes EM, Moraes RJ, Stastny P. 2002a. MICA polymorphism in South American Indians. *Immunogenetics*. 53(10-11):900-6.
- Zou Y, Stastny P. 2002. Alternatively spliced forms of MICA and MICB lacking exon 3 in a human cell line and evidence of presence of similar RNA in human peripheral blood mononuclear cells. *Immunogenetics* 54:671-674.
- Zwirner NB, Fernández-Viña MA and Stastny P. 1998. MICA, a new polymorphic HLA-related antigen, is expressed mainly by keratinocytes, endothelial cells and monocytes. *Inmunogenetics*. 47:139-48.