

03062
16
24



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE UNA LÍNEA TUMORAL (LR.4), QUE CRECE
A TRAVÉS DE BARRERAS ALOGENICAS.**

Tesis que para optar por el grado de
Maestro en Investigación Biomédica Básica

Presenta

GABRIEL RAMIRO NAVA PINTO

México, D.F.

1990

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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 está 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.

INDICE

Resumen.....	1
Introducción.....	2
Objetivo.....	9
Materiales y Métodos.....	10
Resultados.....	16
Discusión.....	21
Figuras y Tablas.....	28
Apéndice.....	42
Referencias.....	44

RESUMEN

L5178Y es una línea tumoral de origen linfoide, derivada de un ratón DBA/2 (haplotipo d). De ésta se aislaron dos clonas: LR.4 y LW.1. Una de ellas LR.4, posee la capacidad de crecer a través de barreras alógenas. Como en esta línea, se han reportado tumores en los que está disminuida o cesada la expresión de sus moléculas de histocompatibilidad clase I, alterando su reconocimiento por el sistema inmune. Con el propósito de determinar cuales eran las causas de este defecto en LR.4, se analizaron los transcritos para las moléculas b2m y clase I del CMH mediante "Northern", encontrándose carencia de ambas.

Mediante hibridaciones tipo "Southern", no se encontraron mutaciones aparentes en los genes clase I. Sin embargo, los niveles de metilación de los mismos se encontraron elevados, particularmente los de las secuencias CCGG. La expresión de los mismos no pudo ser inducida por el agente hipometilante 5-Aza. Estos datos sugieren la existencia de otros mecanismos, además de la metilación, que regulan la expresión de los genes clase I.

En estas líneas tumorales, LR.4 y LW.1, también se indagó su posible grado de diferenciación, mediante el análisis de los genes α , β y γ del Receptor de Antígeno de la Célula T. Por último se investigó la posibilidad de discriminar a estas células de estirpe común, mediante el uso de electroferotipos proteicos en dos dimensiones.

INTRODUCCION

EL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD (H-2) DEL RATON.

El Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) del ratón esta localizado en una región del cromosoma 17 que codifica por lo menos para tres clases de genes (Fig.1) (1).

En los genes clase I, se han definido dos categorías:

Una que corresponde al complejo H-2, con miembros evolutivamente muy conservados (2) y a su vez extremadamente polimórficos. Estos codifican para moléculas de la superficie celular llamadas antígenos de trasplante, denotados K, D y L, los cuales funcionan como elementos de restricción en reacciones citotóxicas hacia células modificadas o infectadas por virus, así como en ensayos de rechazo a trasplantes.

La otra categoría esta localizada en el complejo Qa/Tla, sus genes poseen un bajo grado de polimorfismo y codifican para moléculas de superficie. Estos estan estructuralmente relacionados a los antígenos H-2, pero difieren en su distribución tisular y posiblemente en su función (3).

Los genes clase II (I_r) codifican para las moléculas Ia, las cuales tienen una distribución celular restringida, primordialmente a células B, macrófagos, células dendríticas, de Langerhans y del epitelio tímico, jugando un papel crítico en la presentación de antígeno a las células T ayudadoras/inductoras.

Los genes clase III poseen algunos componentes del complemento (4). Los genes ubicados en la región S (C4, C2 y factor B) estan relacionados y/o involucrados en la activación clásica o alterna de C3. Además de estos, se encuentran los genes que codifican para la proteína S_{1p} y para la enzima 21 hidroxilasa (c1,c2). A pesar de conocer la localización y función de estos genes, el significado de la relación o unión de estos entre sí, como con miembros de otras regiones del CMH se desconoce.

Debido a que las moléculas clase I del CMH son elementos trascendentales en la aceptación o rechazo de trasplantes, el presente análisis se centra en el estudio de estas moléculas.

MOLECULAS CLASE I DEL CMH

Las moléculas clase I que mas se han caracterizado son los antígenos H-2 del ratón. Estas moléculas son glicoproteínas de un peso molecular aproximado de 45 Kd, las cuales son ancladas en la superficie celular de casi todas las células. Estas proteínas se

encuentran asociadas en forma covalente o no covalente con la beta2-microglobulina (b2m), un polipéptido de 12 Kd, codificado por un gen localizado en el cromosoma 2 del ratón (3-5).

La glicoproteína de 45Kd esta formada por tres dominios extracelulares llamados N, C1 y C2 respectivamente; una región transmembranal y una intracitoplásmica. Por datos bioquímicos y de cristalografía, se sugiere que la molécula de b2m se encuentra asociada con el tercer dominio extracelular de la molécula clase I (6), como se presenta en la Figura 2.

RECONOCIMIENTO DE ANTIGENO/H-2 POR LTCs

El reconocimiento por linfocitos T citotóxicos (LTCs) de células alogénicas así como de antígenos extraños, es mediado por moléculas clase I. Los determinantes que reconocen los LTCs aloespecíficos son aquellos intrínsecos de las moléculas H-2, mientras que los LTCs antígeno específico, deben reconocer a la vez el determinante inmunogénico exógeno y los determinantes de la molécula clase I.

A pesar de la abundante información disponible sobre la estructura primaria de los antígenos H-2, los mecanismos moleculares por los cuales las moléculas clase I actúan como blancos estructurales para los LTCs, son poco conocidos.

Ultimamente se han hecho progresos mediante el análisis de la estructura primaria de los antígenos clase II y de oligopéptidos inmunogénicos a un haplotipo particular. De este modo se han encontrado los residuos aminoácidos que interactúan con el antígeno de histocompatibilidad, y los que interactúan con el receptor de antígeno de la célula T (RACT) (9). Recientemente Ajitkumar et al. (117), han deducido las interacciones que el RACT establece con la molécula clase I y el antígeno. Independientemente, Guillet et al. (10) han encontrado semejanzas entre las secuencias de la molécula inmunogénica y las moléculas clase II, proponiendo que el fragmento inmunogénico compete con una secuencia endógena del de la molécula clase II, de tal forma que esta alteración es reconocida por el receptor para antígeno de la célula T. Por esta fuente de datos, Guermain (11) a su vez propone que los antígenos clase I y los LTCs actúan de una forma análoga.

GENES CLASE I DE CMH

A partir de la construcción de sondas moleculares, fué demostrado que los genes clase I pertenecían a una familia de genes relativamente grande. En los ratones BALB/c, esta familia comprende aproximadamente 36 genes, 7 de los cuales están locali-

zados en las regiones H-2K y H-2D, mientras que los restantes estan en las regiones Qa y T1a (1,12,13).

En el ratón, varios genes clase I han sido completamente secuenciados; algunas de sus características estructurales se muestran en la Figura 3. La organización exonintron de estos genes es muy similar; cada uno esta dividido en ocho exones, algunos de los cuales se correlacionan precisamente con los dominios de los polipéptidos clase I. El primer exon codifica para la secuencia líder, mientras que el 2o, 3o y 4o exon codifican para los dominios N, C1 y C3; el 5o exon codifica para la región transmembranal y el 6o, 7o y 8o lo hacen para la citoplásmica (Fig. 3).

Al igual que muchos genes descritos en organismos eucariontes, los que codifican para moléculas clase I del CMH, poseen en las fronteras de sus intrones las secuencias GT/AG, la región promotora con "cajas" CCAAT y TATA en el extremo 5' del codón de iniciación (Fig.4) y, un sitio de poliadenilación (AATAAA) 3' del codón de terminación (7,14).

Estos genes poseen secuencias particulares (Fig. 4). Una de ellas es la secuencia amplificadora (enhancer) que regula la expresión de estos genes y que funciona de una forma ambivalente, reprimiendo la actividad promotora en células no diferenciadas (embrionarias) y potenciando su expresión en células diferenciadas (16). La otra es una secuencia de respuesta a interferón, la cual eleva la acción del "amplificador", cuando a las células se les estimula con interferón α , β o γ (15,17).

Debido a la gran homología que guardan los miembros de esta familia, la estrategia utilizada para detectar genes particulares, ha sido el uso de sondas específicas para la parte 3' no codificadora de los RNAs mensajeros. El análisis de las secuencias nucleotídicas de la región 3' no traducida (exon 8) de clonas de ratón, ha revelado que esta puede ser dividida en dos subregiones (Fig. 5). Parte de estas subregiones contienen secuencias que son específicas para varios loci clase I, incluyendo H-2D, K, L, Q10 y 27.1. La región 3' no codificadora 1 (NC1), contiene aproximadamente 300 nucleótidos, de las cuales solo el 10-15% son característicos de un locus. La región 3' no codificadora 2 (NC2), esta compuesta de una o dos unidades de 100 y 170 nucleótidos respectivamente. En contraste a NC1, mas del 50% de esas unidades NC2 son características de varios loci (Fig. 5). Así cada subregión contiene secuencias locus específicas, pero NC2 tiende a tener una mayor proporción de las que tiene NC1 (29-31).

En el caso de querer identificar diferentes genes con una sola sonda, se utilizan aquellas que poseen fragmentos del extremo 5' (Fig.3) (29).

DIVERSIDAD EN LOS GENES CLASE I

De las hipótesis que se han generado tratando de elucidar el o los mecanismos involucrados en el proceso de diversificación de los genes clase I, la de Nathenson parece ser la más convincente (18).

Esta hipótesis propone que en el proceso evolutivo de estos genes, los eventos de duplicación así como la acumulación de mutaciones puntuales juegan un papel importante. No obstante, estos hechos no pueden explicar el que los productos de una región no sean más semejantes entre sí, de lo que son con los miembros de otra región. Tomando esto en consideración, junto con los patrones de sustituciones vistos en los mutantes de las moléculas H-2Kb, Nathenson propone que el mecanismo que puede resolver este proceso de diversificación es la conversión génica (19,20).

Los genes involucrados en esta conversión génica residen en las regiones K y Qa, siendo miembros de la primera los aceptores, y de la segunda los donadores, derivándose de aquí la idea de que los genes Qa pudieran servir entre otras cosas como un reservorio de genes donadores (21,22).

Aunque solo hay unos cuantos genes en las regiones K y D, sus productos pueden ser muy diversos; tal diversidad se puede generar durante el proceso de maduración de sus RNAs mensajeros (procesamiento alternado), o bien, por modificaciones postraduccionales: glicosilación, fosforilación y/o uniones de ácidos grasos (23-25).

Es difícil elucidar el papel biológico que juegan las proteínas de clase I derivadas de la traducción de RNAs mensajeros que son producto de un procesamiento alternado (26,27). La alteración en la porción amino terminal de las moléculas clase I podría efectivamente incrementar el repertorio de estas glicoproteínas, y su capacidad para el reconocimiento de células transformadas. Dado que la función intracelular de las moléculas clase I es desconocida, es prematuro especular como este procesamiento alternado en la región carboxilo terminal podría afectarlas. Los intentos para descubrir la función de este dominio, no han dado claridad a este aspecto. Sin embargo el papel funcional del dominio citoplásmico continúa sin esclarecerse (28).

EXPRESION DE MOLECULAS CLASE I

Las moléculas clase I del CMH se expresan en la mayoría de las células del organismo adulto, pero no en la superficie de los óvulos ni en las células no diferenciadas de algunas líneas derivadas de carcinoma embrionario. Su expresión es estimulada por los interferones α , β y γ , por lo menos en parte a nivel

de transcripción. Similarmente, b2m no es expresada en células de carcinoma embrionario y es positivamente regulada por interferones. No obstante estas características similares, su síntesis sigue una activación diferente durante el desarrollo embrionario, por lo que no es claro si hay algún mecanismo regulador común, que controle la expresión de ambas (25).

Varios estudios han mostrado evidencia sugestiva de que la expresión de los antígenos clase I en la superficie celular esta controlada por la expresión de b2m, de una manera análoga al control que ejercen las cadenas pesadas de inmunoglobulinas sobre la expresión de las cadenas ligeras (31). Sin embargo Tanaka et al. (32), utilizando células trofoblásticas, detectó que la expresión de moléculas de clase I y b2m es reducida, pero que los niveles de esta última son mayores, sugiriendo un mecanismo de control independiente para cada molécula. De la misma manera Potter et al. (33), Fraser et al. (34), al igual que el grupo de Flavell (35), cuestionan el requerimiento de b2m para la expresión de los antígenos clase I, pues utilizando líneas celulares deficientes en b2m, pudieron detectar moléculas H-2 en la superficie de éstas.

Recientemente se ha detectado un factor de actividad positiva que funciona en trans, y que se une a las secuencias amplificadoras de los promotores de los genes clase I y b2m; lo cual sugiere un mecanismo similar para la activación de dichos genes. No obstante, sigue sin resolverse como se da la activación de éstos en diferentes etapas del desarrollo embrionario (36-38).

EXPRESION GENICA Y METILACION

Es posible que en la regulación de la expresión génica de los metazoarios superiores intervengan diversos factores. Aunque la regulación de la transcripción es un campo de la investigación de gran auge, aun no se conocen con precisión los mecanismos que la gobiernan. Sin embargo, se sugiere que las interacciones proteicas en el extremo 5' de los genes, constituyan elementos importantes en este proceso(40).

Los mecanismos por los cuales algunos genes son expresados selectivamente en células diferenciadas, estan poco comprendidos. Sin embargo, uno de los factores críticos en la expresión génica, parece ser la estructura de la cromatina; genes transcripcionalmente activos estan aparentemente confinados, a dominios de la cromatina en los cuales la estructura del DNA se encuentra en configuración relajada o relativamente extendida. Esta configuración relajada se caracteriza por una incrementada sensibilidad a la digestión con DNasa I, hipometilación y posiblemente, por una unión diferencial de proteínas cromosomales (41,98,99). Tambien se ha demostrado

que genes que estan siendo activamente transcritos, generalmente contienen un menor número de dinucleótidos CG metilados, en comparación de aquellos que se encuentran inactivos (42).

Mediante técnicas de hibridación y utilizando enzimas que reconocen la misma secuencia (isoesquisómeros), en los que esta involucrado este dinucleótido, se ha podido demostrar que aquellos genes que se estan transcribiendo, muestran un decremento o ausencia de metilación, en sitios que estan metilados cuando estos mismos genes estan inactivos. Los sitios metilables que son criticos para la transcripción parecen estar en las regiones promotoras de la transcripción (103-104).

Experimentalmente, también se ha podido demostrar esta relación. Mediante el uso del análogo nucleosídico 5-azacitidina -- el cual contiene un nitrógeno en lugar de un carbono en la posición 5, y por lo tanto es incapaz de ser metilado por la enzima DNA metil transferasa--, en conjunción con células indiferenciadas de ratón, se ha podido inducir la expresión de genes que originalmente se encontraban reprimidos (42).

EXPRESION DE LAS MOLECULAS CLASE I Y CANCER

Como se ha discutido previamente, la expresión de las moléculas clase I confiere a las células la habilidad de funcionar como blancos de los LTCs. Por tal motivo se ha considerado que las células que han perdido la expresión de las moléculas clase I, son potencialmente neoplásicas (44). Sin embargo tal concepto parece circunstancial y controversial.

La posibilidad de que la disminución de la expresión de las moléculas clase I pueda correlacionarse con un estado oncogénico, se ha sugerido por estudios con células infectadas con adenovirus. Células de rata transformadas por adenovirus 12 (Ad12), presentan una reducción en la expresión de los antígenos clase I y son oncogénicas en animales singénicos e inmunocompetentes. Por el contrario, células transformadas con Ad5 expresan antígenos de histocompatibilidad y no tienen potencial oncogénico (43,57). El control negativo de la expresión de estas moléculas en el sistema Ad12 esta asociado con el producto de la región E1a del virus (44). Estos mismos datos se han encontrado en modelos experimentales humano y murino (43,45). Por otra parte, utilizando células humanas y miembros de casi todos los subgeneros de adenovirus, Paabo *et al.* (46) han mostrado que en los subgeneros B,C,D y E, la glicoproteína E19 se asocia en el retículo endoplásmico con los antígenos clase I nacientes, impidiendo su transporte a la superficie celular (47); mientras que los virus del subgénero A (Ad 12) carecen de tal efecto, pero lo reemplazan a través de la disminución específica de los niveles de RNA mensajero para estos antígenos.

Recientemente se ha reportado la obtención de células que fueron transformadas por adenovirus 2 o 5, las cuales expresaban niveles bajos de proteínas clase I y que eran comparables con aquellos presentes en células transformadas por Ad12. Sin embargo estas células transformadas con Ad5 o Ad2 fueron incapaces de inducir tumores cuando fueron inyectadas en animales singénicos (48). Por lo anterior es posible concluir que las alteraciones fenotípicas inducidas por Ad2, 5 o 12 son diversas y consecuentemente resulta difícil establecer una correlación entre los niveles de expresión de moléculas clase I y la transformación maligna.

La disminución en la expresión de los antígenos clase I en otros tipos de células tumorales, también ha sido documentado, encontrándose resultados contradictorios. En el caso de linfomas espontáneos derivados de ratones SJL/J, se ha detectado una correlación inversa entre los niveles de expresión de las moléculas clase I y la agresividad (eficiencia de crecimiento y/o capacidad metastásica) de los tumores (49). En este caso se ha demostrado de una manera directa, al transfectar células carentes de moléculas clase I con los genes H-2Kk, Kb o ambos, generando un fenotipo que provoca la eliminación de su capacidad metastásica o el rechazo total del tumor (50,51).

Apoyando estos resultados y fortalecidos aun más por ser de datos clínicos, se ha detectado la correlación en tumores colorectales, en linfomas de células B y en cáncer de células pequeñas del pulmón, una baja expresión de antígenos de histocompatibilidad clase I (HLA), y una alta malignidad de los tumores (53-54).

Contrastando con estos resultados, se han reportado casos en los cuales al seleccionar clonas deficientes en la expresión de moléculas clase I (H-2-), y compararlas con clonas H-2+ --tomando como parámetro su capacidad en inducir tumores--, se observó que las clonas H-2- son incapaces de generar tumores, mientras que aquellas H-2+ muestran un crecimiento tumoral progresivo (54,55).

OBJETIVO

Dadas las características de la línea tumoral LR.4, de crecer a través de barreras alogénicas, y por ende, la falta de alguno de los marcadores que la definen y/o identifican, el presente trabajo tuvo como fin:

1).- Establecer a nivel molecular, alguno de los factores que determinaban su capacidad de crecer en ratones de diferente haplotipo.

2).- Debido a que las líneas LR.4 y LW.1 fueron derivadas de la línea tumoral L5178Y, pero presentaban características diferentes, se decidió realizar el análisis de los genes que codifican para varias de las subunidades que forman el receptor de antígeno de la célula T. Esto con el propósito de conocer la relación entre ambas líneas (clonalidad), así como para determinar el grado de diferenciación de las mismas.

3).- Por los factores mencionados anteriormente, se indagaría la posibilidad de caracterizar ambas líneas celulares mediante electroferotipos en dos dimensiones de las proteínas intracelulares de éstas.

MATERIALES Y METODOS

Líneas Celulares. L5178Y es una línea celular aislada por I. Parr (60) de un ratón DBA/2 (haplotipo H-2d) mediante el tratamiento con metilcolantreno. LW.1 es una mutante de L5178Y, seleccionada en nuestro laboratorio por su resistencia a 8-azaguanina posterior al tratamiento con etilmetanosulfonato.

LR.4, es una sublínea de L5178Y, en la cual se ha detectado la deficiencia en la expresión de antígenos de histocompatibilidad H-2 (E. Escandón, tesis de postgrado), y que fue seleccionada en el laboratorio por su resistencia a 5-bromodeoxiuridina.

EL4, fue establecida a partir de un cultivo de tejidos derivado de un linfoma inducido en un ratón C57Bl/6 (H-2b) con 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno (87).

Es necesario hacer notar que estas líneas celulares son de estirpe linfoide, y que poseen el antígeno Thy-1.2 (Tabla I).

S180, es un adenocarcinoma aislado de una hembra de ratón suizo (87). Su haplotipo se desconoce; sin embargo, se sabe que transcribe genes clase I, no así B2m (Barrera. R. et al, manuscrito en preparación).

Mantenimiento y/o Propagación de las Líneas Tumorales. Las líneas celulares se mantuvieron mediante la inoculación del tumor en la cavidad peritoneal de ratones singénicos (LW.1 en DBA/2, EL4 en C57Bl/6 y LR.4 en BALB/k. El inóculo varió entre $1-5 \times 10^6$ células crecidas en suspensión en la cavidad peritoneal de un ratón.

Cultivo de Células. Las células se cultivaron en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ a 37 C. El medio de cultivo usado fue RPMI 1640 pH7.2, suplementado con suero bovino fetal (10%), aminoácidos no esenciales (100uM), glutamina (20mM), dextrosa (2.5g/l), anfotericina B y estreptomycin (50ug/ml).

Tratamiento con 5-azacitidina. Las células LR.4, al alcanzar una densidad de 8×10^4 - 2×10^5 , fueron crecidas en presencia de 10uM del análogo 5-azacitidina (61) durante 3 días, posteriormente se lavaron con RPMI 1640 y se transfirieron a medio de cultivo libre del análogo. Se cosecharon las células al llegar a una densidad de 1×10^6 células/ml.

Marcaje Celular con ³⁵[S] Metionina y Preparación de los Extractos Proteicos. Los cultivos con una densidad de 0.3 -

0.7×10^6 células/ml (fase de crecimiento logarítmico), se cosecharon y lavaron en PBS; se resuspendieron en RPMI 1640 libre de metionina, a una densidad de 1×10^6 células/ml. El medio de cultivo se suplementó con 10% de suero bovino fetal y 100 μ Ci/ml de [3 S] metionina, con una actividad específica de 1140 Ci/mmol. EL cultivo se incubó durante 7 horas a 37°C con agitación esporádica. Se cosecharon las células y se lavaron 3 veces en PBS a 4°C; el precipitado celular se resuspendió en 500 μ l de solución de sonicación (61). Posteriormente se rompieron las células en un baño sonicador, detectando la ruptura al microscopio, con azul de metileno. Los fragmentos celulares, y sus sobrenadantes resultantes, se centrifugaron a 2000g/10 min., 12000g/10min. y 100000g/60min. respectivamente.

El sobrenadante final se almacenó a -70°C. hasta el momento de ser utilizado en el análisis electroforético. Se cuantificó la incorporación de [3 S] metionina a proteínas, de la siguiente manera: en un filtro millipore de 0.45 μ m, se aplicó 5 μ l del sobrenadante final, se agregó 1ml de ácido tricloroacético (TCA) al 25%, mas 0.5ml de la mezcla alcalina de lavado; posteriormente se lavó el filtro con TCA al 8%, se secó y se cuantificó en contador de centelleo.

Electroforesis de Proteínas en una Dimensión. El gel concentrador se hizo al 4% y el resolutivo al 10% de acrilamida. Las muestras se corrieron a 20mA/gel, hasta que el colorante llegara a la interfase del gel concentrador y el resolutivo, despues a 30 mA/gel. Todos los experimentos fueron realizados bajo las mismas condiciones (reactivos, tiempo, temperatura, etc.). Los geles fueron calibrados con marcadores de peso molecular en el rango de 14400-200000 daltons. El gel se fijó en una mezcla agua/metanol (7:3) durante 15-30 minutos, secado y puesto a exponer a placas de rayos X. Para cada gel, se aplicó una cantidad constante de isótopo incorporado a proteína (1×10^6 cpm).

Electroforesis de Proteínas en Dos Dimensiones. La electroforesis en poliacrilamida en dos dimensiones, fue realizada de acuerdo al método de O'Farrell (63), con modificaciones mínimas. El gel de la primera dimensión contenía 5% de anfolinas (pH 3-7; Bio-Rad). Las anfolinas generaron un rango de pH de 5-8, determinandose éste con electrodo de superficie, a intervalos de 0.5cm. Los electrolitos de la primera dimensión no fueron desgasificados. El isoelectroenfoco fué formado durante 18hr. a 400V (7200 Vhr.). La segunda dimensión se realizó de la misma manera que los geles de una sola dimensión.

Análisis de Electroferotipos en Dos Dimensiones. El criterio de identidad de un punto en el gel de una línea, con respecto al de la otra, fue la habilidad de localizar el punto en cuestión y los puntos circundantes en ambas placas de rayos X, sin descuidar las variaciones producidas por el tiempo de exposición de las mismas.

Bacterias.

C600 F⁻ thi thr leu lac tonA supE lambda⁻ (65). Esta cepa fue utilizada para transformarla con el plásmido pMHC-1.

JM101 supE thi (lac-proAB) [F' traD proAB lacIqZ] (74). Esta cepa fue utilizada para la transformación con los plásmidos C1432, pBR-mus-hi-H4-Hinf, XP400, pHC2 y RBL-5.

MC1051 araD (ara leu) lacX galU⁻ galk⁻ hsr⁻ hsm⁺ strA (75). A esta cepa se le transformó con pJSB.

Sondas Moleculares

1) pMHC-1, es un cDNA derivado de un linfoma de ratón BALB/c, que corresponde al gen H-2Ld y comprende del codón 66 al 286 (14). La sonda fue clonada en pBR322 en el sitio PstI y obtenida mediante el uso de la enzima HapII.

2) C1432 es un fragmento de DNA genómico derivado de ratones C57Bl/6 que contiene los exones 7, 8 y la región no traducida correspondiente a los genes Q6 y Q8 (64). Este monitor fue clonado en pUC18 en el sitio SstI y escindido con SacI.

3) pJSB es el nombre dado en el laboratorio para una sonda genómica del gen b2m. Esta fue aislada de una línea mielóide de ratón BALB/c; y contiene la secuencia del 2o exón y la región 5' del 2o intrón, del sitio SacI al sitio KpnI (8). Esta sonda fue clonada en pBR322 y fue obtenida mediante el uso de las enzimas EcoRI y KpnI.

4) pBR-mus-hi-H4-Hinf es un monitor genómico que contiene la secuencia 5' del gen que codifica para la histona H4 (73). Este fragmento fue clonado en pBR322 y escindido con EcoRI.

5) RBL-5 es el vector que contiene un cDNA, con la región constante de de la cadena β del RACT de ratón; de 800 bases de longitud, y clonado en el sitio PstI de pBR322 (115).

6) pHC2 es un plásmido que porta un cDNA de la región constante del gen que codifica para la subunidad α del RACT. Posee 370 bases, y esta clonado en el sitio EcoRI de pUC12 (116).

7) XP400 es un monitor con un cDNA que contiene la secuencia 3' de la región contante del gen γ del RACT. La sonda consta de 400 bases y esta clonada en el plásmido pGEM en los sitios XbaI-PstI (72).

Amplificación y Purificación de Plásmidos. Se tomó una colonia bacteriana transformada con el plásmido correspondiente, y se creció durante la noche a 37°C en medio de cultivo infusión cerebro-corazón. Se inocularon 1000ml de medio con el cultivo

anterior, añadiéndoles el antibiótico correspondiente, y se incubaron a 37°C durante 8hr con agitación vigorosa. Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 5000rpm a 4°C por 30min. en el rotor GS3, el paquete celular se resuspendió en 18ml de solución TE. Se lisaron la células agregándoles 36ml de solución sosa-SDS, se dejó en hielo por 10min., y se precipitó el DNA cromosómico junto con los fragmentos celulares con 7ml de solución de acetato, manteniéndose en hielo por 15min; se centrifugó a 16,000rpm 30min. en el rotor SS34. Al sobrenadante se le precipitó a temperatura ambiente con 0.6 volúmenes de 2-propanol durante 20min., y se centrifugó a 10,000rpm por 30min. en el rotor SS34. El precipitado se resuspendió en solución TE, y se trató con RNasa (100ug/ml) a temperatura ambiente y durante 1 hr., se extrajo con fenol, fenol/cloroformo y cloroformo/alcohol isoamílico. A la fase acuosa se le agregaron 2 volúmenes de etanol y se precipitó el DNA a -20°C. La pureza e integridad de los plásmidos, se analizó en geles de agarosa al 0.8% en solución TBE con 0.5ug/ml de bromuro de etidio.

Esta fracción enriquecida de plásmido, fue digerida con las enzimas correspondientes para purificar el fragmento de DNA que serviría de minitor molecular.

Transformación Bacteriana. Para la introducción de los plásmidos en sus hospederos bacterianos, se utilizó el método de cloruro de calcio, tal como lo describe Maniatis *et al.* (65). Este consiste en crecer la cepa bacteriana en fase logarítmica, concentrarla y resuspendirla en solución de cloruro de calcio/-Tris, a 4°C y durante 12-16hr. Posteriormente el DNA (plásmido) se les agrega y se exponen a cambio térmico (42°C), durante 2min. Se suplementa la suspensión con medio de cultivo, y finalmente se siembra en medio selectivo.

Purificación de Sondas. Se digirieron los plásmidos con las enzimas apropiadas, y se separaron los fragmentos mediante electroforesis en agarosa de bajo punto de fusión, se tiñó el gel con bromuro de etidio y se visualizó el DNA mediante luz ultravioleta. Se separó la banda correspondiente al monitor molecular, a esta se le agragaron cinco volúmenes de solución TE y se disolvió el gel a 65°C durante 5min. Se extrajo el DNA en tres ocasiones con fenol, fenol/cloroformo y cloroformo/isoamilalcohol respectivamente; a la fase acuosa final se le precipitó a -20°C, con dos volúmenes de etanol y 0.1M de NaCl final. Se centrifugó a 16,000rpm por 30min./ 4°C, y al precipitado resultante se le resuspendió en un volumen mínimo de solución TE. La concentración final del DNA se cuantificó mediante el método de bromuro de etidio (65).

Marcaje de Sondas. El DNA de doble cadena se marcó mediante una modificación de la técnica de "Nick Translation" por el método de Meinkoth y Wahl (70); o bien, por el método de "Random Primer" (65,71).

El marcaje por "Nick Translation" se realizó de la siguiente manera: en un vial se depositaron 500-400ng de DNA, desoxinucleótidos trifosfatados: dTTP, dGTP y dCTP (dNTPs), 20uM; solución de nucleótidos NT 4X, 6ul; DNasa 100pg, [³²P] dATP 20uCi, DNA Pol. I 4-6U y aforó a 24ul. Se incubó la solución a 14°C durante 3hr.; se paró la reacción con 1ul de SDS al 10% y 1ul de EDTA 0.5M; se le agregaron 100ul de TE, y se separó el DNA marcado de la marca libre, mediante cromatografía en sephadex G-50.

En el marcaje tipo "Random Primer", se utilizó el siguiente protocolo: en un vial de 0.5ml. se colocó el fragmento de DNA a marcar (100ng.) con 1.25ul. de los hexanucleótidos al azar en un volumen final de 7ul. Se hirvió esta mezcla por 2min. y se colocó en hielo. Posteriormente, a esta mezcla se le agregaron 2 0uM de dNTPs, 10ul. de solución RH 2.5X, 1ul. del fragmento Klenow (3-8U) y 20uCi de [³²P] dATP; se aforó a 25ul. y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se detuvo la reacción por la adición de 2ul. de 0.5M de EDTA pH8. Se separó el DNA marcado de la marca no incorporada de igual forma que el proceso de Nick Translation.

Como paso final y previo a la hibridación molecular, el DNA marcado se desnaturalizó calentándolo a ebullición en baño maría durante 10min., enfriándose rápidamente en hielo para prevenir su renaturalización, y aplicándose posteriormente a la solución de hibridación.

Extracción, Transferencia e Hibridación del RNA. El RNA celular fue preparado por el método de LiCl/Urea de Auffray y Rougeon (68). Se obtuvieron las células tumorales propagadas en ratón, y se lavaron 3 veces en PBS. Al paquete celular se le agregaron 10 volúmenes de una solución 3M LiCl/6M Urea, y se homogenizó durante 45seg. a 4°C.; posteriormente se guardó a -20°C. durante 12hrs para precipitar los ácidos nucleicos. La suspensión se centrifugó 20min., a 16K/g y 4°C, se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 8 vol. de una solución de acetato de sodio, SDS y heparina. A esta mezcla se le extrajo dos veces con fenol saturado con TE, a la fase acuosa resultante se le agregó un volumen igual de una solución 4M LiCl/8M Urea, se mezcló y se dejó durante la noche a -20°C. Nuevamente se centrifugó la mezcla bajo las mismas condiciones que la anterior; el precipitado se disolvió en 7 vol. de una solución de Tris-SDS; se extrajo con fenol, fenol-cloroformo y cloroformo-isoamilalcohol. Al final, a esta fase acuosa, enriquecida en RNA, se le precipitó con dos volúmenes de etanol. El precipitado se resuspendió en un volumen mínimo de agua tratada con dietilpirocabonato y se cuantificó espectrofotométricamente (260nm de L.O.).

Para el análisis del RNA, este se separó mediante electroforesis en agarosa en presencia de formaldehído (69), y se transfirió a papel de nirocelulosa de la siguiente manera: el gel se

preparó al 1.1% de agarosa, 1X de solución Hepes-EDTA y formaldehído al 6% final, siendo la solución de corrida la misma que la del gel. La muestra (10ug) se concentró (por precipitación con etanol), se le agregó 9.2ul de formaldehído/formamida mas 4.8ul de solución A. La mezcla se calentó a 70°C por 10min. y se enfrió inmediatamente en hielo, se le agregó 3ul de solución de aplicación y se corrió a 60V. Al finalizar la corrida, el gel se sumergió en una solución SSC 20X, a temperatura ambiente por 30min. Se transfirió el RNA a un filtro de nitrocelulosa con SSC 10X mediante capilaridad tal como lo indica Perbal (70). La hibridación con cualquiera de las sondas fue en solución de hibridación con formamida al 50% durante 20hr y 42°C. Los lavados se realizaron de la siguiente manera: primero, un lavado a temperatura ambiente, con SSC 2X y 0.1% de SDS, durante 30min.; posteriormente, tres lavados mas con SSC 0.1X a 50°C, y durante 30min. cada uno.

Extracción, Transferencia e Hibridación del DNA. Las células contenidas en el líquido de ascitis se lavaron tres veces con PBS; posteriormente, a las células del precipitado final, se les lisó agregando 10 volúmenes de mezcla lítica e incubando a 50°C durante 3hr. Se extrajo el DNA tres veces con fenol y a la fase acuosa resultante, se le dializó en solución TES. La muestra ya dializada, se trató con 100ug/ml de RNasa a 37 grados centígrados por 3hr, y posteriormente el DNA se extrajo (2x) con fenol/cloroformo. Finalmente, se dializó contra TE, y se cuantificó por espectrofotometría (65).

Para el análisis del DNA, se digirieron 10ug con endonucleasas de restricción, a una concentración de 2U/ug de DNA, 37°C y durante 12-16hrs. El producto de la reacción se aplicó a un gel de agarosa al 0.8% en TE y con 0.5ug/ml de bromuro de etidio; se corrieron las muestras a 30-40V. Al finalizar la corrida, se midió la distancia migrada por los marcadores moleculares (λ /HindIII). Previo a la transferencia, y como forma de desnaturalizar al DNA, éste se sumergió en solución desnaturalizante durante 1hr, despues se sumergió en solución neutralizadora durante otra hora. El DNA se transfirió a un filtro de nitrocelulosa mediante capilaridad con SSC 10X, tal y como se hace con el RNA.

RESULTADOS

ANALISIS DE LOS RNAm DE LAS MOLECULAS CLASE I Y b2m.

Los factores que pudieran afectar la expresión o reconocimiento de los antígenos clase I del CMH podrían ser:

(a) La mutación o represión de los genes clase I y/o b2m (8,17,33,84).

(b) El secuestro intracelular de alguna de estas moléculas (47,108).

Para determinar si la falta de expresión de las moléculas clase I de CMH, se daba a nivel de traducción o transcripción, se fraccionaron mediante electroforesis los RNAs totales de las líneas tumorales LW.1, LR.4 y EL4, y de RNA de hígado de ratón, y por hibridación molecular, se estudiarán sus mensajeros.

Como se muestra en la Fig. 6a, a diferencia de las otras líneas, LR.4 carece de mensajeros para la proteína b2m. El RNA también fué hibridado con una sonda de cDNA del gen H-2Ld, la cual contiene secuencias altamente homólogas a todos los genes clase I del CMH (3,14). En las líneas de control de la Fig. 6b (W, D, E y C) se observó una banda que corrió aproximadamente en la posición del RNA ribosomal 18S, el cual es del tamaño esperado para el mensajero de las moléculas clase I. En la línea LR.4 (R), no se detectaron transcritos para estas moléculas. La posible fragilidad de los mensajeros se descartó mediante la hibridación con el monitor para la Histona H4 (Fig. 6c). La falta de mensajeros para las moléculas b2m y clase I del CMH indicaba que el problema no era a nivel de traducción, por lo que se decidió analizar los genes clase I del CMH.

EXAMEN DE LOS GENES CLASE I DEL CMH

Una posible explicación sobre la falta de expresión de los antígenos clase I del CMH, serían aberraciones cromosómicas tales como inserciones o deleciones. Para determinar si esto había ocurrido, se analizaron los genes clase I del CMH, mediante transferencia de DNA a soporte solido (Southern), sin descartar que con este método, solo se observarían mutaciones gruesas.

Se extrajo DNA de alto peso molecular de las líneas LW.1 y LR.4, así como de hígado de ratón DBA/2. El ácido nucleico se digirió con diferentes enzimas de restricción, y ya inmovilizado,

se hibridó con con la sonda del gen H-2Ld (Fig. 7). El patrón de hibridación en la línea LR.4 fué indistinguible del generado por el tejido normal de ratón y de la línea LW.1, los cuales si expresan moléculas clase I del CMH. No obstante que este monitor no puede identificar específicamente las regiones codificadoras de los genes Kd, Dd y Ld, demostró que no habian ocurrido mutaciones mayores en los genes clase I que hibridaron con nuestra sonda.

Aunque este tipo de análisis en la línea LR.4 no detectó aberraciones dentro o alrededor de los genes clase I del CMH, pequeñas mutaciones podían explicar la falta de expresión de estas moléculas.

Los resultados anteriores sugerían que los genes clase I de LR.4 no tenían mutaciones; o que si las tenían, la sensibilidad del método usado no permitía detectarlas. En consecuencia, no fué posible explicar la falta de transcritos para moléculas clase I del CMH. Sin embargo, en forma independiente, R. Ocádiz y V. Ortega, identificaron deleciones en la región del cromosoma 17 que codifica para los IAs (comunicación personal). Con el propósito de explorar con mayor detalle la integridad del CMH en su extremo 3', se hicieron hibridaciones DNA-DNA, usando una sonda específica para los genes Q4, Q6 y Q8 (C1432), localizados en el extremo telomérico del cromosoma. La hibridación con C1432 no mostró pérdida ni polimorfismo para estos genes en las muestras analizadas (Fig. 8).

NIVELES DE METILACION EN LOS GENES CLASE I DEL CMH

Otras posibles causas que podian modular la expresión de los genes clase I del CMH serían los factores epigenéticos, dentro de los cuales se encuentra la metilación del genoma.

En este grupo de factores, se ha considerado que la metilación del DNA (40-41), juega un papel importante en la regulación de la expresión génica. Por tal motivo, se decidió analizar los niveles de metilación, en los genes clase I/H-2.

Debido a que en los eucariontes, solo la citosina se metila, y que por lo general forma parte del dinucleótido CG (58), el genoma fué estudiado mediante el análisis por digestión, con la endonucleasa de restricción sensible a metilación, Hap II, y su isoesquizomero, Msp I, las cuales reconocen la secuencia CCGG. También se usó la enzima Hha I, que digiere el DNA en la secuencia CCGC, cuando la citosina interna no está metilada. Mediante la digestión de de los DNAs con estas endonucleasas y su hibridación con la sonda para genes clase I, se evaluó el estado de metilación de estos genes.

Los DNAs obtenidos de las fuentes antes citadas, fueron digeridos con las enzimas MspI, HapII y HhaI, y analizados por hibridación en soporte sólido, con la sonda del gen H-2Ld.

Tal como se muestra en la Fig. 9, después de la digestión con MspI, el patrón de restricción de los genes clase I fué semejante en los dos derivados de L5178Y, LW.1 y LR.4 (carriles 1o y 2o). Sin embargo, el patrón generado por la enzima HapII fué diferente entre ambas líneas. En la línea LW.1 (2o carril), se observó una gama de bandas de hibridación en un rango aproximado de 20 Kb a 2 Kb. Por lo que se refiere a LR.4 (4o carril), el número de bandas fué menor y el peso molecular mayor. Como control, se digirió en paralelo, el DNA de la línea S180 con las mismas enzimas. El patrón de restricción fué distinto al de las otras dos líneas (carriles 5o y 6o); no obstante, la gama de tamaños fué similar a la observada en LW.1. Las diferencias encontradas entre LW.1 y S180, pudieran ser consecuencia de las variaciones en los niveles de expresión observadas en diferentes tipos de tejidos (79).

En las digestiones con MspI y HapII, se encontraron fragmentos de hibridación de alto peso molecular y de poca resolución. Para simplificar el análisis de estas bandas, se hicieron digestiones dobles usando MspI o HpaII y EcoRI. Este tipo de análisis reveló nuevamente la similitud que existe en los patrones de restricción entre LR.4 y LW.1 al ser digeridos con MspI, MspI y EcoRI o EcoRI (Fig. 10, carriles 1-3 y 6-8). En el caso de la digestión con HpaII, esta hibridación mostró con claridad, el mayor grado de metilación en LR.4 (comparar los carriles 5 y 10). En el caso de las digestiones dobles con HapII-EcoRI, LW.1 generó mayor número de bandas (carril 9), mientras que LR.4 mostró un patrón de restricción similar al de EcoRI, pero con una movilidad ligeramente mayor (carriles 3 y 4).

Este tipo de experimentos se repitió, empleando las enzimas HapII y HhaI, pero utilizando como control DNA de esperma de ratón, el cual se ha reportado que está altamente metilado (86). En estos experimentos, se corroboraron los datos antes obtenidos en LW.1 y LR.4 con HapII (Fig. 11). Sin embargo, al digerir estos DNAs con la enzima HhaI, se observó un patrón de restricción idéntico (carriles 2 y 3). Los resultados obtenidos con el DNA de esperma de ratón fueron muy interesantes, pues el patrón generado por la enzima HapII, fué diferente al de LR.4, que no expresa moléculas clase I, y semejante al de LW.1 que sí expresa moléculas clase I (carriles 4-6). Por otro lado, la restricción hecha con HhaI, generó un mayor número de bandas hibridables, y el tamaño de las mismas fué diferente al de las líneas tumorales (carriles 1-3). Estos datos indicaban, que las secuencias detectables con nuestra sonda, y sensibles a la digestión de la enzima HapII son las mismas en LW.1 y esperma; mientras que aquellas sensibles a HhaI difieren, quizá por las diferencias de estirpe celular.

EL aumento en los niveles de metilación en la región de los genes clase I del CMH podría estar directamente relacionado con la falta de expresión de genes que codifican para moléculas de clase I. Es importante señalar que las secuencias CCGG son frecuentes en el extremo 5' del gen H-2Ld y posiblemente en otros miembros de esta familia génica (113).

TRATAMIENTO CON 5-AZACITIDINA

Para determinar si la metilación del DNA, era la causa determinante de la falta de expresión de los antígenos clase I del CMH, se trataron las células LR.4 con el nucleósido 5-Aza, que inhibe la enzima DNA metiltransferasa, que actúa sobre los residuos de citosina en el DNA de eucariontes (42).

Las células LR.4 fueron tratadas con 5-Aza (10 μ M) durante 72h y posteriormente, subcultivadas en ausencia del análogo. Para probar si 5-Aza disminuyó los niveles de metilación en LR.4, el DNA de ésta, se extrajo y se digirió con la enzima HapII, al igual que el de las líneas LW.1 y LR.4 sin tratar. Estos DNAs fraccionados e inmobilizados en soporte sólido, se hibridaron con la sonda H-2Ld. En este experimento (Fig. 12), se comprobó que la línea tratada con 5-Aza disminuyó sus niveles de metilación, pues el patrón generado fué similar al de LW.1.

Para determinar si al hipometilar el genoma de LR.4 se inducía la expresión de los genes clase I del CMH, se analizaron por "Northern" sus transcritos. En la figura 6c (último carril) se muestra que los genes clase I/H-2, no se expresaron en la línea LR.4 tratada con 5-Aza. Por lo tanto, la reducción en los niveles de metilación, inducida por el análogo 5-Aza, no fué suficiente para activar la expresión de los genes clase I en LR.4.

ANÁLISIS DE LOS GENES α , β Y γ DEL RACT EN LW.1 Y LR.4

Con el objeto de caracterizar con mayor detalle a la célula LR.4, se analizaron los genes que codifican para las subunidades α , β y γ del RACT.

Se realizaron análisis tipo "Southern" con DNA digerido con varias enzimas, de las líneas LR.4, LW.1 y de hígado de ratón DBA/2, usando como sondas de hibridación cDNAs de las regiones constantes α , β y γ (Fig. 13)

En el caso del gen α , se detectó que LR.4 lo mantenía en forma germinal, mientras que en LW.1 se detectó la ausencia parcial o total de las bandas, lo cual indicaba posible rearrreglo genómico (Fig. 13a, Tabla II).

Para el gen β , no se encontró rearrreglo en LW.1, pues su patrón de hibridación fué idéntico al de hígado; llamativo fué el hecho que en LR.4 no hubo material hibridable (Fig. 13b y Tabla II). La falta de detección de bandas de hibridación no fué producto de degradación del DNA, pues estos filtros se hibridaron con otras sondas, corroborándose la presencia e integridad del material analizado.

Por lo que respecta al gen γ , LW.1 mostró ausencia de bandas de hibridación, y solo en la digestión con PstI se detectó una de ellas. En LR.4, al digerir con EcoRI se observó un patrón en forma germinal; sin embargo, con las otras enzimas, el tamaño de los fragmentos fué diferente al de la forma germinal (Fig.13c y Tabla II).

En conclusión, encontramos que LR.4 tenía deletados los genes de la subunidad α , en línea germinal los de α y rearrreglados los de γ . LW.1 tuvo en línea germinal β , y rearrregados α y γ .

CARACTERIZACION DE POLIPEPTIDOS INTRACELULARES DE LAS LINEAS TUMORALES.

Con el fin de comparar las proteínas intracelulares de las líneas tumorales de origen linfóide LW.1 y LR.4, las células fueron incubadas en presencia de [³⁵S]metionina y analizadas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. La Fig. 14 muestra patrones polipeptídicos muy similares en las líneas LW.1 y LR.4. Sin embargo, se observaron diferencias dependiendo del tiempo de marcaje; las diferencias fueron detectadas en una misma línea o entre las distintas líneas investigadas. A pesar de esto, la resolución que brindaba esta metodología era restringida, debido a que proteínas diferentes pudieran comigrar al ser separadas por peso molecular exclusivamente.

Por lo tanto se decidió incrementar el nivel de análisis, mediante electroforesis en dos dimensiones por el procedimiento de O'Farrell (63), que permite la obtención de geles de mayor resolución.

Los electroferotipos en dos dimensiones de los polipéptidos de las líneas LW.1 y LR.4 se muestran en las Fig. 15. Se encontraron 10 polipéptidos diferenciables entre las líneas (Tabla III). El aspecto más relevante de la comparación polipeptídica entre las líneas, fué la ausencia en LW.1 de los polipéptidos 2, 3, 4, 5 y 10.

Dentro de las diferencias encontradas en estos 10 polipéptidos, 5 de ellas mostraron variaciones cuantitativas y 5 variaciones cualitativas.

DISCUSION

En el presente trabajo se demuestra que la línea tumoral LR.4, no expresa determinantes antigénicos clase I en su superficie, y que este hecho, por lo menos en parte, es el responsable de que la línea crezca en ratones de diferente haplotipo.

En el análisis de los transcritos, se encontró que LR.4 no contenía RNAm para moléculas clase I del CMH, ni para b2m. Los datos señalaban, que posiblemente la expresión defectuosa de las moléculas clase I en LR.4 residía a nivel de transcripción. Esta característica hacía a esta línea interesante, ya que hasta ahora, los datos bibliográficos indicaban la falla en la expresión de una molécula o de la otra, pero no de ambas (8,17,33-35,44-46).

Mediante el análisis de "Southern", no pudieron detectarse mutaciones aparentes en los genes clase I, pues utilizando varias enzimas de restricción, no se observaron cambios con respecto al tamaño de los fragmentos. No obstante este aspecto, no se pudo descartar la presencia de mutaciones que no fuesen detectables por el método usado.

Estos datos sugerían que LR.4 podía tener defectos en los mecanismos de regulación, dando como resultado la represión de los genes clase I y/o b2m. Tales defectos podían deberse a: (a) mecanismos que actúan en trans (activadores específicos o represores que regulan la transcripción); (b) mecanismos que actúan en cis (tales como mutaciones en regiones reguladoras, generando fallas en la transcripción o provocando degradación rápida del mensaje); (c) factores epigenéticos que influyen en la transcripción de estos genes; y (d) una combinación de estas alternativas.

La primera de estas posibilidades se descartó, ya que en experimentos de fusión entre las células LR.4 y EL4.4, no se pudo inducir la expresión de los antígenos de histocompatibilidad clase I derivados de LR.4, expresándose exclusivamente los de haplotipo b, derivados de EL4 (E. Escadon, comunicación personal). Estos hallazgos sugerían que los elementos que actúan en trans, no eran los responsables absolutos, de la falta de expresión de las moléculas de histocompatibilidad clase I.

Con respecto a la segunda posibilidad, se detectaron alteraciones en algunos sitios de restricción del gen b2m (V. Ortega y R. Ocadiz, comunicación personal); lo cual parece ser un evento común (8), ya que se ha encontrado en el seno de este gen, una región de alta frecuencia de mutación (59, 88). Esta característica por sí misma, podría generar la falta de detección celular de la línea tumoral en cuestión, no obstante, no esclarecía el hecho de la falta de expresión de las moléculas clase I. Debido a limitaciones tecnoeconómicas, no se indagó la

posible existencia de mutaciones puntuales en los genes H-2K, D o L. Por lo tanto se abordó la tercera posibilidad.

Como se aprecia en la Fig. 1, se han detectado 7 genes clase I en el complejo H-2, haplotipo d. Si consideráramos (de manera aleatoria) que 3 fueran pseudogenes, y conociendo que la tasa de mutación en linfocitos malignos es de 4.17×10^{-4} (89), necesitaríamos 2.97×10^{14} células, para encontrar una clona que tuviera mutados los 4 genes restantes, lo cual es poco probable. Tomando en consideración estos datos se pensó que el defecto en la expresión de los genes clase I, se debía a factores epigenéticos, tales como la metilación de sus genes (40-42).

Mediante el uso de los isoesquizómeros HpaII y MspI, al evaluar el grado de metilación que guardan los genes clase I, se pudo detectar que en todos los casos estudiados, (LW.1, LR.4 y S180) los fragmentos de restricción generados por la enzima HpaII y específicos de genes clase I, fueron de mayor peso molecular que aquellos generados por MspI. Tal situación puede comprenderse si consideramos que: (a) la mayoría de los genes clase I corresponden al complejo Tla, de los cuales se les conoce producto proteico solo a unos cuantos, mientras que otros son pseudogenes (7); y (b) muchos de estos genes restringen su expresión a células T (91). Por tal motivo, si tomamos en consideración la correlación que se ha establecido entre la expresión génica y su grado de metilación (58), resulta congruente encontrar tal patrón en los tamaños de los fragmentos de restricción. En términos generales, los datos indican que el CMH del ratón se encuentra altamente metilado.

En el caso específico de la línea LR.4, es evidente que el nivel de metilación es mayor al de los otros casos analizados (LW.1, y S180). Esta característica genética de la línea LR.4 se demostró al detectarse un número menor de bandas y un mayor peso molecular de las mismas, al digerir el DNA con la enzima HpaII. Tal aspecto está íntimamente relacionado con las secuencias CCGG reconocidas por las enzimas antes mencionadas, ya que al digerir el DNA con la enzima HhaI, no se pudo hallar polimorfismo en los patrones de restricción entre las líneas LR.4 y LW.1 (Fig.16 B). Tales datos sugieren que la desmetilación en el dinucleótido CpG en los genes clase I, se da en secuencias específicas, y que si hay metilación en las secuencias que reconoce HhaI, estas no están involucradas en la regulación de la expresión de los genes H-2K, D y L.

Conociendo que los genes clase I se encontraban hipermetilados y que posiblemente los factores de activación en trans no eran los responsables de la falta de expresión de estos antígenos, se decidió tratar a las células LR.4, con 5-Aza y de esta manera desmetilar el DNA, para tratar de inducir la expresión de los genes H-2. Sin embargo, posterior al tratamiento con 5-Aza, no se encontró señal positiva para los RNAm de los genes clase I. Esto nos indica que la condición

estricta de hipometilar al DNA, no es suficiente para la activación génica, sino que requiere de otros factores.

En otros casos en los que se ha analizado la relación metilación/expresión génica, los resultados indican que la hipometilación está ligada con la expresión de los genes clase I (94-96), tal como en nuestros resultados. No obstante estos hallazgos, la evidencia indica que intervienen otros factores. A este respecto, Alberti y Herzenberg (97) han reportado datos similares al nuestro. Ellos mencionan que el tratamiento con 5-Azacitidina en células de trofoblasto carentes de antígenos H-2, no induce la expresión de estos antígenos, pero sí es capaz de inducir tales antígenos en células L transformadas con este DNA; lo cual no es posible con el DNA de células no tratadas.

Keeney et al. (84.85) utilizando sublíneas del linfoma S49, indican que la falta de expresión de estas moléculas es de una manera locus específica, y que probablemente no es el resultado de la metilación, ya que el agente desmetilante 5-Aza no tuvo efecto en la expresión de los antígenos clase I en estas sublíneas.

En oposición a estos datos, Tanaka et al. (92) demostraron que dicha relación es inversa, señalando que la activación del gen H-2Kb está ligada con el incremento en la metilación del DNA. Sin embargo, esta correlación parece ser exclusiva de este gen.

Estos datos nos señalan que la ausencia de expresión de los antígenos H-2 en la línea linfóide LR.4 no se debe a mutaciones evidentes en sus genes, ni a la falta de factores de activación. Sabemos que los niveles de metilación en esos genes son elevados, pero no si la metilación en estos genes y en otros ya reportados, sea la causa o el efecto de la represión génica. En los avances que se han realizado para conocer los mecanismos de la regulación de los genes, se ha encontrado entre otros aspectos que: (a) el estado de condensación de la cromatina esta relacionado con la transcripción génica (99); (b) que los elementos de las regiones promotoras de los genes (IRS, TATA y CAAT box) regulan la transcripción (15,16,31,32,47,76-78); y (c) que factores difusibles que actúan en trans, pueden influir en la regulación génica (36-38,100-102).

Es por esto que se considera que la multiplicidad de elementos que actúan en cis, en combinación con factores que actúan en trans, determinan de fondo el nivel de expresión de los mismos (76).

Si a lo anterior se suman los datos en que la metilación interfiere en la interacción de los factores de activación con los elementos de regulación (36,37,100), se puede especular, que la falla en la expresión de los antígenos clase I/H-2 en la línea tumoral LR.4, se debe a la falta de factores de activación, y a la metilación de sus elementos reguladores.

Como un aspecto particular e interesante, fueron los datos obtenidos al analizar los genes clase I del CMH, en las líneas LR.4, LW.1 y en esperma de ratón. Se utilizó el DNA de esperma, dado que se encuentra altamente metilado, con excepción de los genes constitutivos y los de expresión específica, ambos en su región promotora (86). Al examinar los genes clase I con la enzima HpaII se encontró que el patrón de restricción en LW.1 era indistinguible del de esperma; por otro lado, el patrón generado por la enzima HhaI fue diferente en número y tamaño de las bandas entre el DNA extraído de esperma o de las líneas celulares LW.1 y LR.4. Con estos datos se corroboraba una vez más que los niveles bajos de metilación no son la causa de la actividad transcripcional. Si bien la metilación en las secuencias CCGG están relacionadas con la expresión de moléculas clase I en LW.1 y LR.4, esta característica no se puede extrapolar a todo tipo celular ni a diferentes etapas de diferenciación o especialización. Así también, los patrones generados por las diferentes enzimas usadas, al comparar esperma con las líneas tumorales, pueden ser consecuencia de la diferenciación celular y/o de las interacciones DNA-proteínas (protaminas), importantes en la condensación del núcleo de esperma (86,99).

Los hallazgos con esperma respecto a la metilación y la expresión génica, aunque preliminares, establecen directrices para estudios posteriores, dirigidos a analizar de una manera más profunda las secuencias involucradas en metilación y su relación con genes constitutivos y tejido específico, así como el papel que puedan jugar estas secuencias/regiones hipometiladas en la activación génica durante procesos de diferenciación.

Por lo que corresponde al análisis de los genes del RACT, se encontró que LW.1 poseía rearrreglos en en RACT γ y α , y en línea germinal β ; LR.4, con los genes rearrreglados para RACT γ , en línea germinal α y deletado β .

Sabemos que durante el desarrollo murino, los primeros genes del RACT que se rearrreglan son los β y γ , entre los días 14 y 15 de edad fetal. Aproximadamente un día después se empieza a rearrreglar el gen de la subunidad α , pero con una expresión muy baja (105,106). En animales adultos, se ha detectado que en células T inmaduras hay abundante expresión de los genes que codifican para las subunidades β y γ , mientras que la expresión de α es muy baja (106-107). Si consideramos exclusivamente estos datos, se pensaría que la línea LR.4 se derivó en etapas muy tempranas del desarrollo del ratón que la generó; o bien, que se obtuvieron de células T inmaduras, dado que no se observó rearrreglo de los genes de la subunidad α .

Al igual que en estas células inmaduras, entre el 0.5% y 10% de los linfocitos T maduros expresan receptores $\gamma\delta$ en su superficie. Ya que la localización preferencial de estas células se encuentra en los epitelios (107), se ha sugerido que estos linfocitos tienen un papel en la diferenciación celular

epitelial, o como la primera línea de defensa en este tejido (108-110). Por tal motivo, también es factible que la línea LR.4 corresponda a células T maduras, cuya distribución topográfica principal fueran los tejidos epiteliales.

En el caso particular de LW.1, es más difícil deducir su estado de diferenciación. El hecho de que en esta línea se haya rearrreglado α sin haber ocurrido el arreglo en β , puede indicar que no hay una restricción en el orden de rearrreglo de las subunidades del RACT; o bien, que la condición de neoplasia fuera la causante de tal situación. Cualquiera que sea el caso, es aventurado establecer si LW.1 se derivó de células T inmaduras, o con compromiso a expresar el RACT $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$.

Por los diferentes patrones de rearrreglo en las subunidades de RACT entre las líneas LR.4 y LW.1, se deduce que éstas no comparten el mismo origen; sin embargo, el dato más relevante, fué hallar en la línea celular LR.4, daños en varios de los genes que codifican para moléculas involucradas en la comunicación celular y en la detección de antígenos extraños.

Los experimentos diseñados para profundizar en la caracterización de las líneas celulares LW.1, y LR.4 mediante el análisis de proteínas solubles en gels de dos dimensiones permitió identificar cambios en los patrones electroforéticos que sugieren diferencias en la expresión génica de las células en estudio. En este proceso se lograron identificar 10 proteínas que diferenciaban las líneas entre sí (Tabla III). Sin embargo, se debe considerar, que la carencia o la presencia exclusiva de alguna de las proteínas, pudiera ser el efecto de modificaciones de las mismas, provocando cambios en el peso molecular y/o el punto isoeléctrico, generando la migración de esas proteínas a posiciones distintas de las nativas.

Las moléculas que difieren entre las líneas analizadas, puede ser consecuencia de que las células neoplásicas se aislaron en distintas etapas de su diferenciación (24); a la obtención de éstas, mediante diferentes agentes carcinogénicos (60, 87); a la progresión tumoral de las mismas (118); recambio metabólico, procesamiento postraduccional o regulación a nivel de transcripción o traducción (62); o a la combinación de algunas de éstas.

Estos resultados, se pueden considerar como datos que enriquecen la información que se tiene, sobre las características fenotípicas de las líneas establecidas en cultivo; y sobre todo, que las células, aun siendo de una misma estirpe, y tener un alto grado de coincidencia en sus patrones proteicos, pueden ser individualizadas.

Los datos así obtenidos nos dan información valiosa sobre las células estudiadas; no solo sobre características particulares de su genotipo, sino también de su fenotipo. Con este análisis se puede especular sobre el comportamiento biológico

de células tumorales carentes de antígenos de histocompatibilidad clase I, como en el caso de la línea LR.4.

A este respecto, existen estudios en los cuales la habilidad de formar tumores, o la agresividad de los mismos, parece estar inversamente correlacionada con la expresión de los antígenos clase I (111,119). Sobre este tema, la línea tumoral K36.16 ha sido estudiada en detalle. Estas células no expresan antígenos H-2Kk y son resistentes a LTCs *in vitro* (114), siempre forman tumores en ratones AKR inmunocompetentes. Hui et al (51) transfectaron estas células con el gen H-2Kk para rescatar su expresión. Estas células transfectadas, en contraste con las parentales, fueron incapaces de inducir tumores en ratones inmunocompetentes. Los datos demostraron la relevancia biológica del antígeno Kk, en el control del crecimiento tumoral en ratones AKR. No obstante, la falta de rechazo de la línea K36.16, puede ser la consecuencia de la incapacidad del hospedero de responder inmunológicamente contra el tumor en el contexto H-2Dk (112), que sí expresa la línea.

Otro ejemplo es el sarcoma T10. Wallich *et al.* (50) utilizaron una clona metastásica de este (IE7), carente de antígenos H-2K. A esta la transfectoron con los genes H-2Kk y H-2Kb para restaurar la expresión de los mismos. La expresión de cualquiera de las moléculas Kb o Kk en la superficie de las células IE7, resulto en la pérdida de su potencial metastásico. Es posible que en caso de IE7, las moléculas H-2D no puedan actuar como elementos de restricción para su reconocimiento por células T. En contraste, un "posible" antígeno tumoral en IE7, pudiera ser reconocido eficientemente en el contexto H-2K, dando como resultado la eliminación o el control del tumor.

Contrastando con las observaciones anteriores, Karre *et al.* (54-56), han mostrado que las células tumorales linfoides carentes de antígenos H-2, son menos malignas en hospederos singénicos, en comparación con células que sí presentan dichos antígenos. Ellos sugieren que las células asesinas naturales (NKs) son efectoras del rechazo, en un sistema de defensa adaptado para detectar la falta o la reducción de las moléculas clase I del CMH.

Una propuesta alternativa a este modelo, es la expuesta por Ostrand-Rosenberg *et al.* (81,82). Este grupo tiene como modelo experimental a células de carcinoma embrionario. En su sistema, estos tumores son rechazados cuando son inoculados en hospederos inmunocompetentes, no obstante que no expresan antígenos clásicos de histocompatibilidad. Los estudios de trasplante con esas células, sugieren que el rechazo es mediado por moléculas clase I del CMH. Estas células transcriben genes alélicos a la región Qa/Tla. Por tal motivo, ellos especulan que los antígenos Qa/Tla pudieran haber evolucionado para servir como elementos de restricción en el reconocimiento de antígenos tumorales de origen embrionario.

Todos estos datos demuestran la complejidad del sistema inmune en los procesos de control y eliminación de células neoplásicas o transformadas. Ahora existe evidencia de que la supresión de las moléculas clase I del CMH, son las responsables del escape de algunas células tumorales de la detección inmune (111). En conclusión, la línea tumoral LR.4, al igual que otras que son deficientes en la expresión de moléculas clase I puede ser el resultado de la expansión clonal de células que evaden el sistema inmune.

FIGURAS Y TABLAS

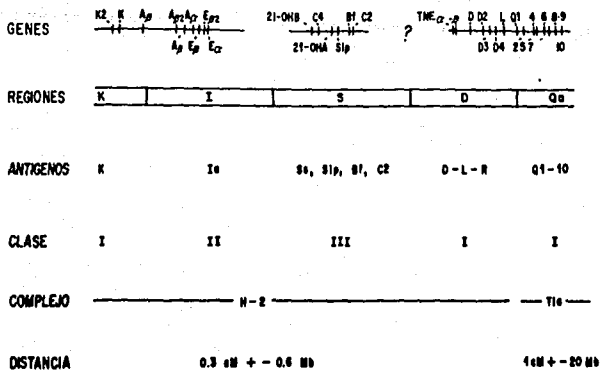


FIG. 1.- MAPA DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN EL RATON, MOSTRANDO LOS GENES PRESENTES EN EL HAPLOTIPO H-2d.

CLASE I

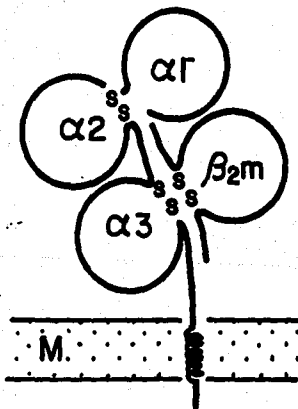


FIG. 2.- DIAGRAMA QUE ESQUEMATIZA LA ORGANIZACION EN DOMINIOS DE LAS MOLECULAS CLASE I DEL CMH. β_2m ES β_2 MICROGLOBULINA; LAS RESTANTES LETRAS GRIEGAS INDICAN LOS DOMINIOS INDIVIDUALES DE LOS ANTIGENOS H-2; M ES MEMBRANA.

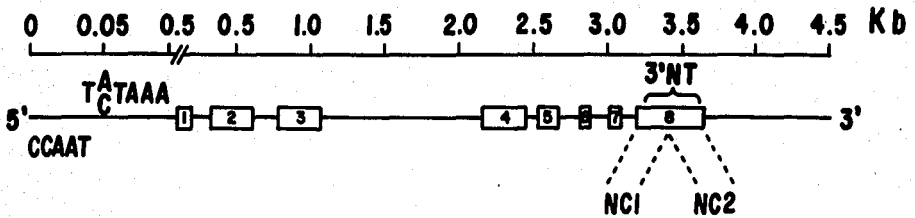


FIG. 3.- ESTRUCTURA DE LOS GENES CLASE I, INDICANDO LA ORGANIZACION EXON-INTRON, LAS SECUENCIAS CAAT Y TATA EN EL EXTREMO 5' NO TRADUCIDO; LA REGION NO CODIFICADORA 1 (NC1) Y LA REGION NO CODIFICADORA 2 (NC2), EN EL EXTREMO 3' NO TRADUCIDO.

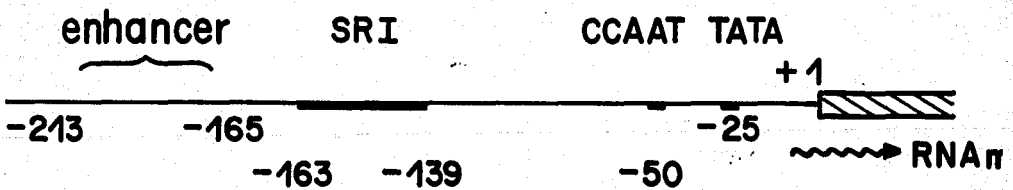


FIG. 4.- ELEMENTOS REGULADORES DE LA REGION PROMOTORA DE LOS GENES CLASE I. SRI, SECUENCIA DE RESPUESTA A INTERFERON.

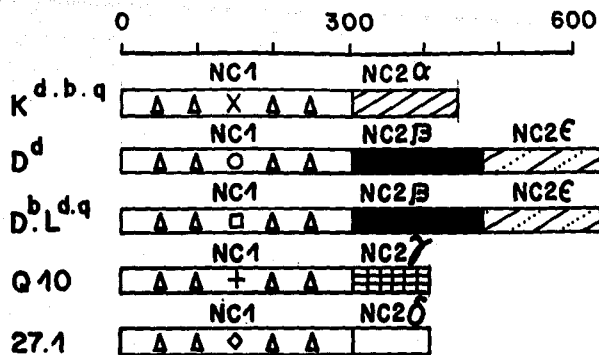


FIG. 5.- COMPARACION DE LOS EXTREMOS 3' NO TRADUCIDOS DE GENES DE LAS REGIONES K, D, L y Qa DEL CMH DEL RATON.

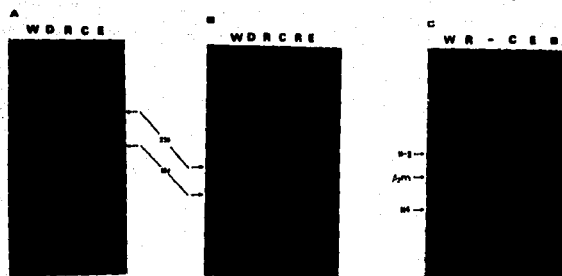


FIG. 6.- ANALISIS DEL RNA. DIEZ MICROGRAMOS DE RNA TOTAL, EXTRAIDO DE LINEAS TUMORALES Y DE HIGADO DE RATON, FUERON FRACCIONADOS MEDIANTE ELECTROFORESIS Y TRANSFERIDOS A NITROCELULOSA. a) FILTRO HIBRIDADO CON UNA SONDA ESPECIFICA PARA b2M (pJSB), LA CUAL FUE MARCADA CON [³²P] MEDIANTE "NICK TRANSLATION". b) FILTRO HIBRIDADO CON UNA SONDA QUE RECONOCE GENES CLASE I (pMHC1) LA SONDA FUE MARCADA POR "NICK TRANSLATION". c) FILTRO HIBRIDADO CON LAS SONDAS QUE APERCEN EN EL EXTREMO IZQUIERDO DEL PANEL, MARCADAS POR "RANDOM PRIMER. W, LW.1; R, LR.4; E, EL4; D, HIGADO DE DBA/2; C, HIGADO DE C57bl/6; 5, LR.4 TRATADA CON 5-AZA.

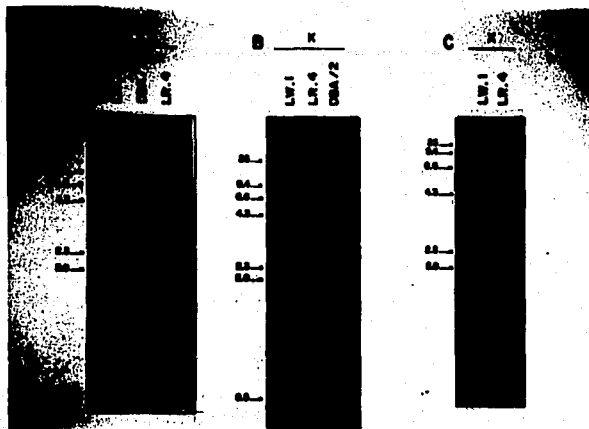


FIG. 7.- ANALISIS POR "SOUTHERN" DEL DNA GENOMICO DE LW.1, LR.4 E HIGADO DE DBA/2, MONITOREADO CON pmhcl. EL DNA FUE DIGERIDO CON LAS ENZIMAS Eco RI(E), KpnI (K) Y XbaI (X); FRACCIONADO POR ELECTROFORESIS EN AGAROSA Y TRANSFERIDO A NITROCELULOSA. HIBRIDADO CON LA SONDA INDICADA, MARCADA CON $[^{32}\text{P}]$ POR EL METODO DE "RANDOM PRIMER". LOS ESTANDARES DE PESO MOLECULAR SON EN KILOBASES.

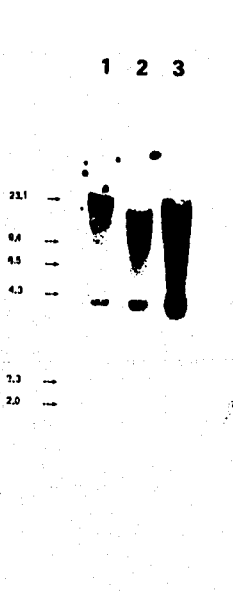


FIG. 8.- ANALISIS POR "SOUTHERN" CON DNA GENOMICO DIGERIDO CON KpnI E HIBRIDADO CON LA SONDA ESPECIFICA DE LOS GENES Q6 Y Q8. CARRIL 1 LW.1, CARRIL 2 LR.4 Y CARRIL 3 HIGADO DE DBA/2.

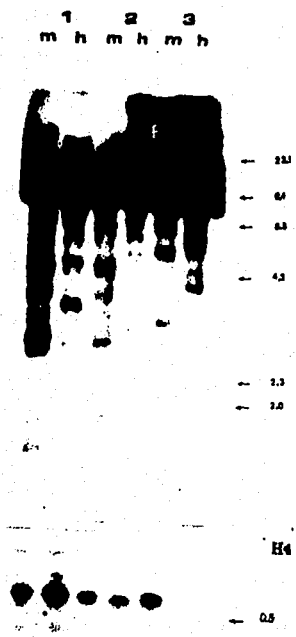


FIG. 9.- ANALISIS DE METILACION DE LOS GENES CLASE I MEDIANTE "SOUTHERN" 10 ug DE DNA DE LAS LINEAS LW.1 (1), LR.4 (2) Y S180 (3) FUE DIGERIDO CON LAS ENZIMAS HpaII (h) O MspI (m). TRANFERIDO NITROCELULOSA E HIBRIDADO CON LA SONDA pMHC-1, TAL COMO EN LA FIG. 7. EL PANEL INFERIOR CORRESPONDE AL CONTROL DE DIGESTION, EN EL CUAL, EL FILTRO FUE HIBRIDADO CON LA SONDA QUE IDENTIFICA EL GEN DE LA HISTONA H4.

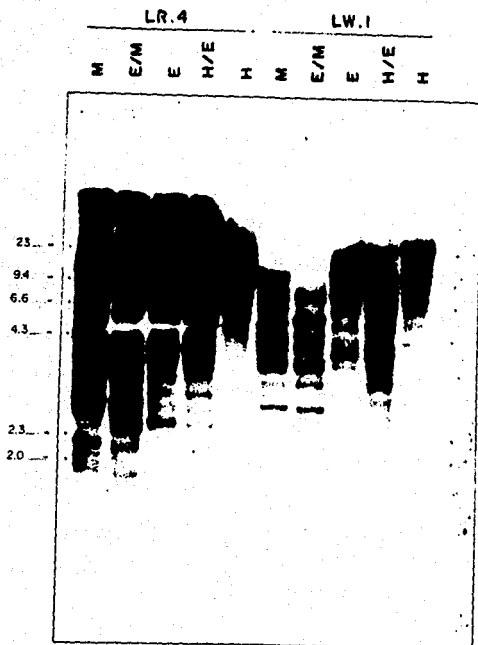


FIG. 10.- PERFILES DE METILACION DE LOS GENES CLASE I MEDIANTE DIGESTIONES DOBLES. EL DNA DE LAS LINEAS TUMORALES, SE DIGIRIO CON LAS ENZIMAS *MspI*, *EcoRI-MspI*, *EcoRI*, *EcoRI-HapII* Y *HapII*, COMO SE INDICA EN LA FIGURA. EL MATERIAL FUE PROCESADO TAL COMO EN LAS FIGURAS 7 Y 9.

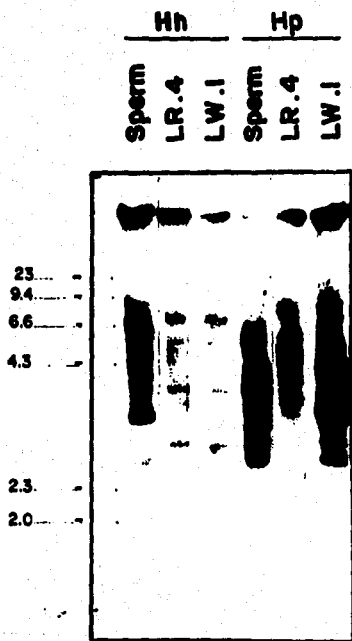


FIG. 11.- ANALISIS DE LOS NIVELES DE METILACION EN LW.1, LR.4 EN COMPARACION CON EL DNA DE ESPERMA. EL DNA DE LAS CELULAS INDICADAS FUE DIGERIDO CON LAS ENZIMAS HhaI Y HpaII. SE ANALIZO MEDIANTE "SOUTHERN" CON LA SONDA pmHC-1.

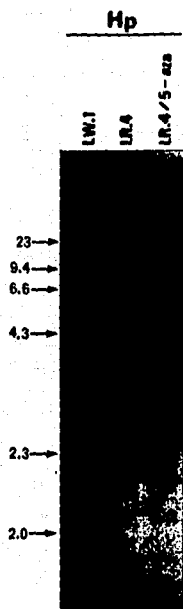


FIG. 12.- EFECTO DEL TRATAMIENTO CON 5-AZA EN LOS NIVELES DE METILACION DE LA LINEA LR.4. LR.4 FUE TRATADA DURANTE 3 DIAS CON 10 μ g DE 5-AZA. EL DNA DE ESTA Y DE LAS LINEAS SIN TRATAR LW.1 Y LR.4 SE DIGIRIO CON LA ENDONUCLEASA *Hpa*II Y ANALIZADOS POR "SOUTHERN" LOS GENES CLASE I.

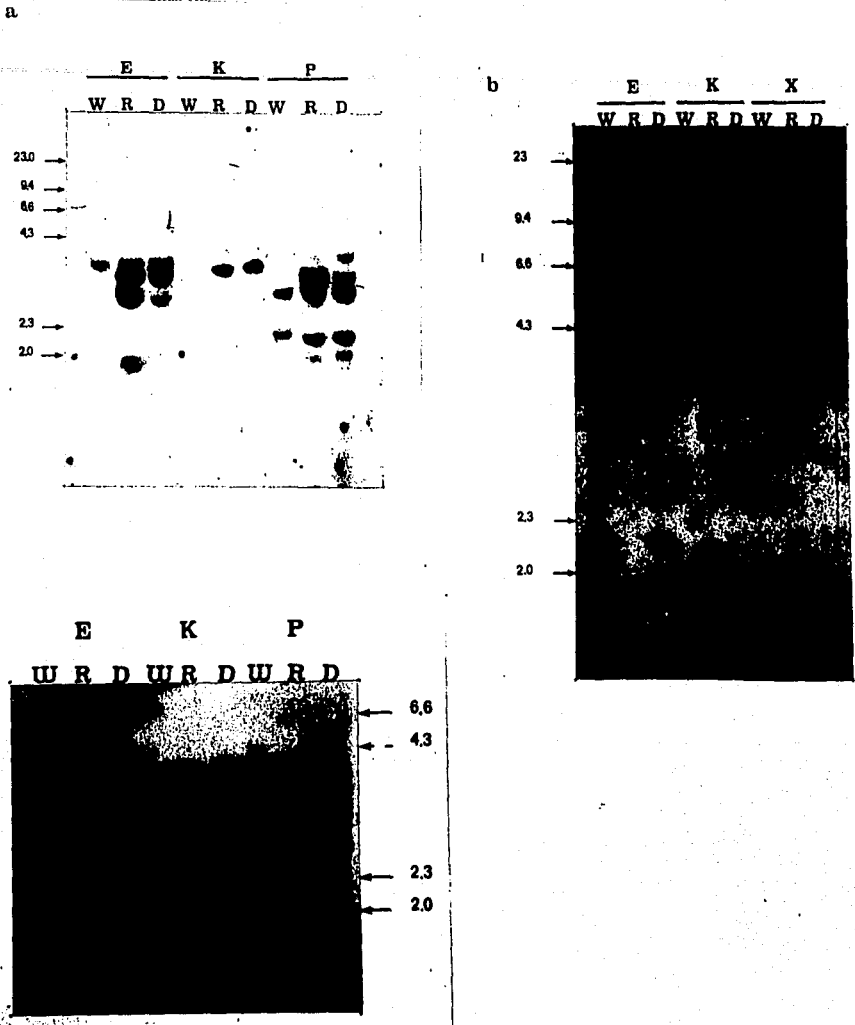


FIG. 13.- ANALISIS POR "SOUTHERN" DE LOS GENES A, B, Y G DEL RACT. 10 ug DE DNA/ CARRIL DE LAS LINEAS LW.1 (W), LR.4 (R) E HIGADO DE DBA/2 (D) FUERON DIGERIDOS CON LAS ENZIMAS EcoRI (E), KpnI (K), PstI (P) O XbaI (X). (a) EL DNA DIGERIDO FUE FRACCIONADO POR ELECTROFORESIS TRANSFERIDO A FILTROS DE NITROCELULOSA E HIBRIDADO CON LA REGION CONSTANTE DEL GEN α DEL RACT. (b) HIBRIDADO CON LA REGION CONSTANTE DEL GEN β DEL RACT. (c) HIBRIDADO CON LA REGION γ DEL RACT. LAS SONDAS FUERON MARCADAS CON [32 P] POR "NICK TRANSLATION".



FIG. 14.- ELECTROFORESIS EN EL GEL DE POLIACRILAMIDA EN UNA SOLA DIMENSION. LAS LINEAS CELULARES SE MARCARON METABOLICAMENTE A 4 Y 6 (') HORAS Y LISADAS POR SONICACION. LAS MUESTRAS FUERON REDUCIDAS POR EBULLICION EN 2-MetOH PREVIO A LA ELECTROFORESIS EN POLIACRILAMIDA AL 10%. LW.1 (1), LR.4 (2).

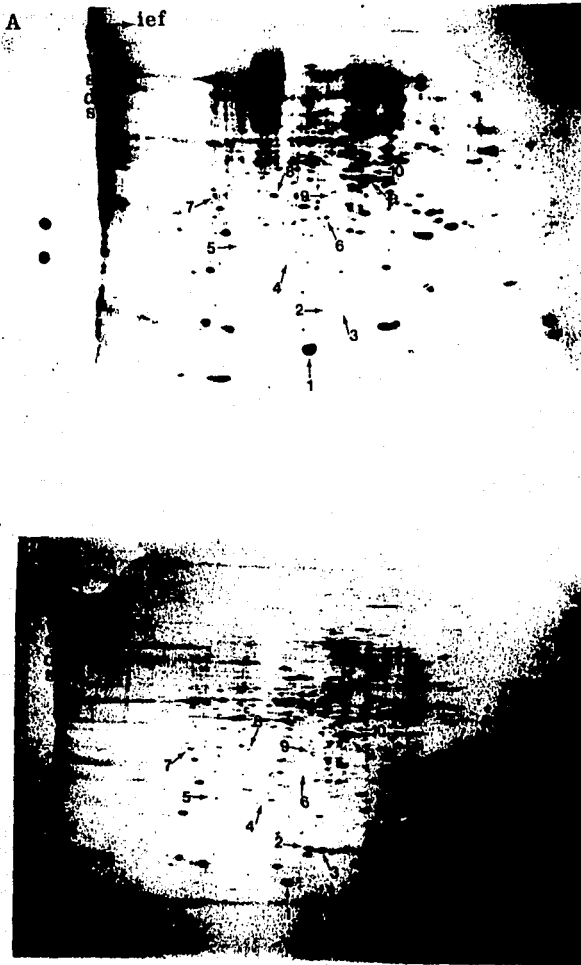


FIG. 15.- ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES BIDIMENSIONALES DE EXTRACTOS CELULARES DE LAS LINEAS TUMORALES LW.1 (A) Y LR.4 (B), MARCADAS CON [35 S] METIONINA DURANTE 7 HORAS. EN AMBOS CASOS, SOLO LAS PROTEINAS DIFERENCIABLES ESTAN MARCADAS. IEF, SEPARACION POR ISOELECTROENFOQUE. SDS, SEPARACION POR PESO MOLECULAR. a, ACTINA.

TABLA I. MARCADORES DE LAS CELULAS USADAS EN ESTE ESTUDIO

Línea	Antígenos			Cepa en que se propaga
	H-2d	H-2b	Thy 1.2	
LW.1	+	-	+	Balb/c
LR.4	-	-	+	Balb/k
EL4	-	+	+	C57bl/6
S180	?	?	?	C57bl/6

TABLA III. POLIPEPTIDOS CUYAS VARIACIONES FUERON MAS CONSPICUAS EN EL ANALISIS DE LOS ELECTROFEROTIPOS DE LAS LINEAS TUMORALES

Polipéptidos	Líneas		P.M. aprox.
	LW.1	LR.4	
1	++	+	17
2	-	+	20
3	-	+	20
4	-	+	27
5	-	+	28
6	++	+	34
7	+	++	37.5
8	++	+	38
9	+	++	38
10	-	+	46

TABLA II. SUMARIO DEL TAMANO DE LOS REARREGLOS GENOMICOS DE LOS GENES α , β Y γ DEL RACT

Enzima	LW.1	DBA/2	LR.4	Gen
<u>EcoRI</u>	3.5	3.5 3.2 2.8	F.G.	
<u>KpnI</u>	N.D.	3.7 3.4	F.G.	α
<u>PstI</u>	2.9 2.2 2.0	3.8 3.2 2.9 2.2 2.0	F.G.	
<u>EcoRI</u>	F.G.	3.0 2.1	-	
<u>KpnI</u>	F.G.	5.2	-	β
<u>XbaI</u>	F.G.	1.7	-	
<u>EcoRI</u>	N.D.	3.2 2.7	F.G.	
<u>KpnI</u>	N.D.	3.4	3.3	γ
<u>PstI</u>	3.4	3.4 3.1	3.6 3.1	

N.D. = No se detectó banda de hibridación.

F.G. = Forma germinal.

- = Deletado.

APENDICE

Solución de Sonicación.- 5mM $MgCl_2$, 5mM $CaCl_2$, 100mM Tris pH 7.5 y 1mM PMSF.

Mezcla Alcalina de Lavado.- 1N NaOH, 1.8% H_2O_2 y 1% Met.

Solución Reductora-SDS. -62.5mM Tris pH6.8, 8mM 2-MetOH y 3% SDS.

Solución $CaCl_2$ -Tris.- 50mM $CaCl_2$ y 10mM tris pH 8.

TE. 10mM Tris pH 8 y 1mM EDTA.

Solución Sosa-SDS. 0.2N NaOH y 1% SDS.

Solución de Acetato .- 3M CH_3CO_2K y 11.5% CH_3COOH .

TBE. 89mM Tris base, 89mM H_3BO_3 y 0.2mM EDTA

PBS.- 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 4.3mM Na_2HPO_4 y 1.4 mM KH_2PO_4 , pH 4.

Solución Acetato-Heparina.- 10mM CH_3CO_2Na pH5, 0.5% SDS y 100ug/ml heparina.

Solucion Tris-SDS.- 10mM Tris pH 7.5 y 0.5% SDS.

Solucion HEPES-EDTA.- 50mM Hepes pH 7.8 y 1mM EDTA.

Solución A. - 294ul de solución Hepes-EDTA (10X) mas 706ul H_2O .

Formaldehido-Formamida.- 89ul formaldehido (37%) y 250ul formamida.

Solucion de Aplicación.- 322ul de solución A, 5mg azul de bromofenol, 400mg sacarosa, 178ul formaldehido y 500ul formamida.

SSC 20X.- 3M NaCl y 0.3M Citrato de Na pH7.

Denhart 50X.- 2% ficoll 400, 2% polivinilpirrolidona (PVP), 2% albumina de suero bovino (BSA) y 0.2% NaN_3 .

Mezcla Lítica.- 0.5M EDTA pH 8, 100ug/ml proteinasa K y 0.5% sarkosil.

TES. 10mM Tris pH 7.5, 10mM NaCl y 1mM EDTA.

Solución Desnaturalizadora. .- 1.5M NaCl y 0.5N NaOH.

Solucion de Nucleótidos.- dCTP, dGTP y ttp 10mg/ml (en agua), ajustando a pH7 con 50mM de Tris base.

Solucion RH 2.5X.- 500mM Hepes, 12.5mM MgCl_2 , 28.8mM 2-MetOH, 125mM Tris-HCl pH8 y 1mg/ml BSA.

Solucion NT 4X.- 200mM Tris-HCl pH7.5, 20mM MgCl_2 y 20mg/ml BSA.

REFERENCIAS

1. Steinmetz, M., A. Winoto, K. Minard, and L. Hood. Cluster of genes encoding mouse transplantation antigens. *Cell* 28: 489-498, 1982.
2. Maziarz, R., H. Allen, J.L. Strominger, R. Falvell, P.A. Biro, and S.J. Burakoff. Recognition of interspecies hybrid class I histocompatibility antigens by antigen-specific cytolytic lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 6276-6280, 1985.
3. Hood, L., M. Steinmetz, and B. Malissen. The major histocompatibility complex of the mouse. *Ann. Rev. Immunol.* 1: 529-568, 1984.
4. Hansen, T.H., D.G. Spinella, D.R. Lee, and D.C. Shreffler. The immunogenetics of the mouse major histocompatibility gene complex. *Ann. Rev. Genet.* 18: 99-129, 1984.
5. Bushkin, Y., T.S. Taung, A. Pinter, J. Michaelson, and E.A. Boyse. Unusual association of B2-microglobulin with certain class I heavy chains of the major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 432-436, 1986.
6. Flavell, R.A., H. Allen, B. Huber, C. Wake, and G. Widera. Organization and expression of the MHC of the C57 black/10 mouse. *Immunol. Rev.* 84: 29-50, 1985.
7. Steinmetz, M., K.W. Moore, J.G. Frelinger, B.T. Sher, F-W. Shen, E.A. Boyse, and L. Hood. A pseudogene homologous to mouse transplantation antigens: Transplantation antigens are encoded by eight exons that correlate with protein domains. *Cell* 25: 683-692, 1981.
8. Parnes, J.R., and J.G. Seidman. Structure of wild type and mutant B2-microglobulin genes. *Cell* 29: 661-669, 1982.
9. Unanue, E.R., and P.M. Allen. The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science* 236: 551-557, 1987.
10. Guillet, J-G., M-Z. Lai, T.J. Briner, S. Buus, A. Stte, H.M. Grey, J.A. Smith, and M.L. Gefter. Immunological self, and nonself discrimination. *Science* 235: 865-870, 1987.

11. Germain, R.N. The ins and outs of antigen processing and presentation. *Nature* (London) 322: 687-689, 1986.
12. Margulies, D.H., G.A. Evans, L. Flaherty, and J.G. Seidman. H-2 like genes in the Tla region of mouse chromosome 17. *Nature* (London) 295: 168-170, 1982.
13. Muller, D., D. Stephan, P. Philippsen, and M. Steinmetz. Orientation and molecular map position of the complement genes in the mouse MHC. *EMBO J.* 6: 369-373, 1987.
14. Evans, G.A., D.H. Margulies, R.D. Camerini-Otero, K. Ozato, and J.G. Seidman. Structure and expression of a mouse major histocompatibility antigen gene, H-2Ld. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 1994-1998, 1982.
15. Israel, A., A. Kimura, A. Fournier, M. Fellous, and P. Kourilsky. Interferon response sequence potentiates activity of an enhancer in the promoter region of the mouse H-2 gene. *Nature* (London) 322: 743-746, 1986.
16. Miyazaki, J., E. Apella, and K. Ozato. Negative regulation of the major histocompatibility class I gene in undifferentiated embryonal carcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 9537-9541, 1986.
17. Bahler, D.W., J.G. Frelinger, L.W. Harwell, and E.M. Lord. Reduced tumorigenicity of a spontaneous mouse lung carcinoma following H-2 gene transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 4562-4566, 1987.
18. Nairn, R., K. Yamaga, and S.G. Nathenson. Biochemistry of the gene products from murine MHC mutants. *Ann. Rev. Genet.* 14: 241-278, 1980.
19. Pease, L.R., D.H. Schulze, G.M. Pfaffenbach, and S.G. Nathenson. Spontaneous H-2 mutants provide evidence that a copy mechanism analogous to gene conversion generates polymorphism in the major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 242-246, 1983.
20. Nathenson, S.G., J. Geliebort, M. Pfaffenbach, and R. Zeff. Murine major histocompatibility complex class I mutants: molecular analysis and structure function implications. *Ann. Rev. Immunol.* 4: 471-478, 1986.
21. Geliebort, J., R.A. Zeff, D.H. Schulze, L.R. Pease, E.H. Weiss, A.L. Mellor, R.A. Flavell, and S.G. Nathenson. Interaction between Kb and Q4 gene sequences generates the Kbm6 mutation. *Mol. Cell. Biol.* 6: 645-652, 1986.

22. Geliebort, J., R.A. Zeff, R.W. Melvold, and S.G. Nathenson. Mitotic recombination in germ cells generated two major histocompatibility complex mutants genes shown to be identical by RNA sequence analysis: Kbm9 and Kbm6. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 3371-3375, 1986.
23. Hansen, T.H., D.G. Spinella, D.R. Lee, and D.C. Schreffler. The immunogenetics of the mouse major histocompatibility gene complex. Ann. Rev. Genet. 18: 99-129, 1984.
24. Mintz, B., and R.A. Fleischman. Teratocarcinomas and other neoplasms as developmental defects in gene expression. Adv. Cancer Res. 34: 211-278, 1981.
25. Lew, A.M., E.P. Lillehoj, E.P. Cowan, W.L. Maloy, M.R. Schravendijk, and J.E. Coligan. Class I genes and molecules: An update. Immunol. 57: 3-18, 1986.
26. Cochet, M., W.M. Kast, A. Kummer, K. Transy, C.J.M. Melief, and P. Kourilsky. Alternative splicing in the mouse H-2Kd gene is not necessary for the classical Kd antigen function. Immunogenetics 24: 267-274, 1986.
27. McCluskey, J., R.N. Germain, and D.H. Margulies. Cell surface expression of and in vitro recombinant class II/class I major histocompatibility complex gene product. Cell 40: 247-257, 1985.
28. Murre, C., C.S. Reiss, C. Bernabeu, L.B. Chen, S.J. Burakoff, and J.G. Seidman. Construction, expression and recognition of an H-2 molecule lacking its carboxil terminus. Nature (London) 307: 432-436, 1984.
29. Lalanne, J.L., C. Trancy, S. Guerin, S. Darche, P. Meulien, and P. Kourilsky. Expression of class I genes in the major histocompatibility complex: Identification of eight distinct mRNAs in DBA/2 mouse liver. Cell 41: 469-478, 1985.
30. Reyes, A.A., and R.B. Wallace. A comparison of the coding and 3'-noncoding DNA sequences of several murine transplantation antigens. Immunogenetics 16: 265-268, 1982.
31. Ozato, K., Y.J. Wan, and B.M. Orrison. Mouse major histocompatibility class I gene expression begins at midsomite stage and is inducible in earlier stage embryos by interferon. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 2427-2431, 1985.
32. Tanaka, K., K. Ozato, G. Jay, J.R. Parnes, L. Ramathan, J.G. Seidman, K.S. Chang, and E. Appella. Control of H-2 antigen and b2-microglobulin gene expression in mouse trophoblast cell clones. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 5597-5601, 1983.

33. Potter, T.A., C. Boyer, A.M. Shmitt-Verhulst, P. Goldstein, and T.V. Rajan. Expression of H-2Db on the cell surface in the absence of detectable B2-microglobulin. *J. Exp. Med.* 160: 317-322, 1984.
34. Fraser, J.D., H. Allen, R.A. Flavell, and J.L. Strominger. Cell-surface expression of H-2Db requires N-linked glycans. *Immunogenetics* 26: 31-35, 1987.
35. Allen, H., J. Fraser, D. Flyer, S. Calvin, and R. Flavell. B2-microglobulin is not required for cell surface expression of the murine class I histocompatibility antigen H-2Db or of a truncated H-2Db. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83: 7447-7451, 1986.
36. Israel, A., A. Kimura, M. Kieran, O. Yano, J. Kanellopoulos, O. Le Bail, and P. Kourilsky. A common positive trans-actin factor binds to enhancer sequences in the promoters of mouse H-2 and B2-microglobulin genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 2653-2657, 1987.
37. Baldwin, A., and P.A. Sharp. Binding of a nuclear factor to a regulatory sequence in the promoter of the mouse H-2Kb class I major histocompatibility gene. *Mol. Cell. Biol.* 7: 305-313, 1987.
38. Schlockat, U., D. Bohmann, H. Schooler, and P. Gruss. Nuclear factors binding specific sequences within the immunoglobulin enhancer interact differentially with other enhancer elements. *EMBO J.* 5: 3251-3258, 1986.
39. Baldwin, A.S., and P.A. Sharp. Two transcription factors, NF-kB and H-2TF1, interact with a single regulatory sequence in the class I major histocompatibility complex promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 723-727, 1988.
40. Busslinger, M., J. Hurst, and R.A. Flavell. DNA methylation and the regulation of globin gene expression. *Cell* 34: 197-206, 1983.
41. Mather, E.L., and R.P. Perry. Methylation status and DNase I sensitivity of immunoglobulin genes: changes associated with rearrangement. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 4689-4693, 1983.
42. Darnell, J., H. Lodish, and D. Baltimore. Gene control in eukaryotes. *Mol. Cell. Biol.* pp. 510-512, 1st Ed. Scientific American Books, NY.

43. Eager, K.B., J. Williams, D. Breiding, S. Pan, B. Knowles, E. Appella, and R.P. Ricciardi. Expression of histocompatibility antigens H-2K, -D and -L is reduced in adenovirus 12 transformed mouse cells and is restored by interferon g. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5525-5529, 1985.
44. Bernards, R., P.I. Schrier, A. Houweling, C.J. Bos, A.J. van der Eb, M. Zijlstra, and C.J.M. Melief. Tumorigenicity of cells transformed by adenovirus type 12 by evasion of T-cell immunity. Nature (London) 305: 776-779, 1983.
45. Vaessen, R.T.M.J., A. Houweling, E. Israel, P. Kourilsky, and A.J. van der Eb. Adenovirus E1A-mediated regulation of class I MHC expression. EMBO J. 5: 335-341, 1986.
46. Paabo, S., T. Nilsson, and P.A. Peterson. Adenoviruses of subgenera B, C, D, and E modulate cell-surface expression of major histocompatibility complex class I antigens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9665-9669, 1986.
47. Burget, H.G., J.L. Maryanski, and S. Kvist. "E3/19K" protein of adenovirus type 2 inhibits lysis of cytolytic T lymphocytes by blocking cell-surface expression of histocompatibility class I antigens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 1356-1360, 1987.
48. Haddada, H., A.M. Lewis, J.A. Sogn, J.E. Coligan, J.L. Cook, and T.A. Walker. Tumorigenicity of hamster and mouse cells transformed by adenovirus types 2 and 5 is not influenced by the level of class I major histocompatibility antigens expressed on the cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9684-9688, 1986.
49. Rosloniec, E.F., M.H. Kuhn, C.A. Genyea, A.H. Reed, J.J. Jennigs, A.A. Giraldo, K.W. Beisel, and S.P. Lerman. Aggressiveness of SJL/J lymphomas correlates with absence of H-2Ds antigens. J. Immunol. 132: 945-952, 1984.
50. Wallich, R., N. Bulbuc, G.J. Hammerling, S. Katzav, S. Segal, and M. Feldman. Abrogation of metastatic properties of tumor cells by the novo expression H-2k antigens following H-2 gene transfection. Nature (London) 315: 301-305, 1985.
51. Hui, F., F. Grosveld, and H. Festenstein. Rejection of transplantable AKR leukemia cells following MHC DNA-mediated cell transformation. Nature (London) 311: 750-752, 1984.

52. Moller, P., B. Herrmann, G. Moldenhauer, and R. Monburg. Defective expression of MHC class I antigens is frequent in B-cell lymphomas of high-grade malignancy. *Int. J. Cancer* 40: 32-39, 1987.
53. Momburg, F., T. Degener, E. Bacchus, G. Holdenauer, G.J. Hammerling, and P. Moller. Loss of HLA-A, B, C, and the novel expression of HLA-D in colorectal cancer. *Int. H. Cancer* 37: 179-184, 1986.
54. Ljunggren, H.G., and K. Karre. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. *J. Exp. Med.* , 1985.
55. Doyle, A., W.H. Martin, K. Funo, A. Gazdar, D. Carney, S.E. Martin, I. Linnoila, F. Cuttitta, J. Mulshine, P. Bunn, and J. Minna. Markedly decreased expression of class I histocompatibility antigens, protein, and mRNA in human small-cell lung cancer. *J. Exp. Med.* 161: 1135-1151, 1985.
56. Karre, K., H.G. Ljunggren, G. Piontek, and R. Kiessling. Selective rejection of H-2 deficient lymphoma variants suggests alternative immune defence strategy. *Nature (London)* 319: 675-678, 1986.
57. Schrier, P.I., R. Bernards, R.T.M.J. Vaessen, A. Howeling, and A.J. van der Eb. Expression of class I major histocompatibility antigens switched off by highly oncogenic adenovirus 12 in transformed rat cells. *Nature (London)* 305: 771-775, 1983.
58. Bird, A.P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature (London)* 321: 209-213, 1986.
59. Parnes, J.R., K.C. Sizer, J.G. Seidman, V. Stallings, and R. Hyman. A mutational hot-spot within an intron of the mouse beta2-microglobulin gene. *EMBO J.* 5: 103-111, 1986.
60. Weinhold, K.J., L.T. Goldstein, and E.F. Wheelock. Tumor-dormant states established with L5178Y lymphoma cell in immunised syngenic murine host. *Nature (London)* 270: 59-61, 1977.
61. Gambari, R., L. del Senno, R. Barbierii, L. Viola, M. Tripodi, G. Raschella, and A. Fantoni. Human leukemia K-562 cells: induction of erythroid differentiation by 5-azacytidine. *Cell Dif.* 14: 87-97, 1984.

62. Hoffman-Lieberman, B., D. Lieberman, and L. Sachs. Control mechanism regulating gene expression during normal differentiation of myeloid leukemic cells: Differentiation defective mutants blocked in mRNA production and mRNA translation. *Develop. Biol.* 81: 255-265, 1981.
63. O'Farrel, P.H., High resolution two-dimensional electroforesis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250: 4007-4021, 1975.
64. O'Neill, A.E., K. Reid, J.C. Garberi, M. Karl, and L. Flaherty. Extensive deletion in the Q region of the mouse major histocompatibility complex. *Immunogenetics* 24: 368-373, 1986.
65. Maniatis, T., E.F. Fritsch, and J. Sambrook. Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Lab. pp. 403-405, 1982.
66. Feimberg, A.P., and B. Vogelstein. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13, 1983.
67. Feimberg, A.P., and B. Vogelstein. Addendum. *Anal. Biochem.* 137: 266-267, 1984.
68. Auffray, Ch., and F. Rougeon. Purification of mouse immunoglobulin heavy-chain messenger RNAs from total myeloma tumor RNA. *Eur. J. Biochem.* 107: 303-314, 1980.
69. Fragments: Formaldehyde gel conditions. *FOCUS* 8: 14, 1986.
70. Perbal, B. A practical guide to molecular cloning. Wiley-Interscience Publications. pp. 403-405, 1984.
71. Meinkoth, J., and G. Wahl. Hibridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Ann. Biochem.* 138: 267-284, 1984.
72. Jones, B., S. Mjolsness, C. Janeway Jr, and A.C. Hayday. Transcripts of functionally rearranged gamma genes in primary T cells of adults immunocompetent mice, *Nature (London)* 323: 635-638, 1986.
73. Seiler-Tuyns, A., and M.L. Birnstiel. Structure and expression in L-cells of a cloned H4 histone gene of the mouse. *J. Mol. Biol.* 151: 607-625, 1981.

74. Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119, 1985.
75. Casadaban, M. J., and S.N. Cohen. Analysis of gene control signals by DNA fusion and cloning in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 138: 179-207, 1980.
76. Korber, B., N. Mermod, L. Hood, and I. Stroynowsky. Regulation of gene expression by interferons: control of H-2 promoter responses. *Science* 239: 1302-1306, 1988.
77. Korber, B., L. Hood, and I. Stroynowsky. Regulation of murine class I genes by interferons is controlled by regions located 5' and 3' to the transcription initiation site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 3380-3384, 1987.
78. Ehrlich, P., J.E. Maguire, and D.S. Singer. Identification of negative and positive regulatory elements associated with a class I major histocompatibility complex. *Mol. Cell. Biol.* 8: 695-703, 1988.
79. Harris, H.W., and T.J. Gill. Expression of class I transplantation antigens. *Transplantation* 42: 109-117, 1986.
80. Eisenbach, L., N. Greenfield, H. Yakor, S. Segal, and L.M. Feldman. The differential expression of H-2K versus H-2D antigens, distinguishing high-metastatic from low-metastatic clones, is correlated with the immunogenic properties of the tumor cells. *Int. J. Cancer* 34: 567-573, 1984.
81. Ostrand-Rosenberg, S., T.M. Rider, and A. Twarowski. Susceptibility of allogenic mice to teratocarcinoma 402 Ax. *Immunogenet.* 10: 607-612, 1980.
82. Ostrand-Rosenberg, S., D.A. Nickerson, V.K. Clements, E.P. Garcia, E. Lamouse-Smith, L. Hood, and I. Stroynowski. Embryonal carcinoma cells express Qa and T1a class I genes of the major histocompatibility complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 5084-5088, 1989.
83. Nichols, E.A., T. Krakauer, and T.H. Hansen. Two-dimensional gel comparisons of murine H-2D region-associated antigens of different H-2 haplotypes. *J. Immunol.* 131: 2440-2444, 1983.

84. Keeney, J.B., and T.H. Hansen. Cis-acting elements determine the locus-specific shutoff of class I major histocompatibility genes in murine S49 lymphoma sublines. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 6288-6292, 1989.
85. Keeney, J.B., M. Hedayat, N.M. Myers, J.M. Connolly, and T.H. Hansen. Locus-specific regulation of Kd, Dd, and Ld class I genes in the BALB/c S49 lymphoma sublines. J. Immunol. 143: 2364-2373, 1989.
86. Groudine, M., and K.F. Conkin. Chromatin structure and de novo methylation of sperm DNA: Implications for activation of the paternal genome. Science 228:1061-1068, 1985.
87. Catalogue of cell lines and hybridomas. American Type Culture Collection.
88. Potter, T.A., W. Frankel, R.A. Jeff, and T.V. Rajan. Spontaneous deletion at the b2-m locus. Evidence for site-specific genetic rearrangement. J. Immunol. 138: 1270-1274, 1987.
89. Seshadri, R., R.J. Kutlaca, K. Trainor, C. Matthews, and A.A. Morley. Mutation rate of normal and malignant human lymphocytes. Cancer Res. 47: 407-409, 1987.
90. Storb, U., and B. Arp. Methylation patterns of immunoglobulin genes in lymphoid cells: Correlation of expression and differentiation with undermethylation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80: 6642-6646, 1983.
91. Transy, C., S.R. Nash, B. David-Watine, M. Cochet, S.W. Hunt, III, L.E. Hood, and P. Kourilsky. A low polymorphic mouse H-2 class I gene from the Tla complex is expressed in a broad variety of cells types. J. Exp. Med. 166: 341-361, 1987.
92. Carrington, M.N., R.D. Salter, P. Cresswell, and J.P.-Y. Ting. Evidence for methylation as a regulatory mechanism in HLA-DR gene expression. Immunogenetics 22: 219-229, 1985.
93. Baldacci, P., F. Pozo, S. Gisselbrecht, and P. Kourilsky. Altered transcription of genes coding for class I histocompatibility antigens in murine tumor cells. J. Exp. Med. 158: 1294-1306, 1983.
94. Tanaka, K., E. Appella, and G. Jay. Developmental activation of the H-2k gene is correlated with an increase in DNA methylation. Cell 35: 457-465, 1983.

95. Barra, Y., K. Tanaka, K.J. Isselbacher, G. Khoury, and G. Jay. Stable transfer and restricted expression of a cloned class I gene encoding a secreted transplantation-like antigen. *Mol. Cell. Biol.* 5: 1295-1300, 1985.
96. Young, P.R., and S.M. Tilghman. Induction of a-fetoprotein synthesis in differentiating F9 teratocarcinoma cells is accompanied by a genome-wide loss of DNA methylation. *Mol. Cell. Biol.* 4: 898-907, 1984.
97. Alberti, S., and L.A. Herzenberg. DNA methylation prevents transfection of genes for specific surface antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8391-8394, 1988.
98. Salomon, M.J., P.L. Larsen, and A. Varshavsky. Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: Evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell* 53: 937-947, 1988.
99. Loidl, P. Towards an understanding of the biological function of histone acetylation. *FEBS Lett* 227: 91-95, 1988.
100. Chodosh, L.A., A.S. Baldwin, R.W. Carthew, and P.A. Sharp. Human CCAAT-binding proteins have heterologous subunits. *Cell* 53: 11-24, 1988.
101. Santoro, C. N. Mermod, P.C. Andrews, and R. Tjian. A family of human CCAAT-box-binding proteins active in transcription and DNA replication: Cloning and expression of multiple cDNAs. *Nature (London)* 334: 218-224, 1988.
102. Blonar, M., A. Baldwin, R.A. Flavell, and P.A. Sharp. A gamma-interferon-induced factor that binds the interferon response sequence of the MHC class I gene H-2Kb. *EMBO J.* 8: 1139-1144, 1989.
103. Toth, M., U. Lichtenberg, and W. Doerfler. Genomic sequencing reveals a 5-methylcytosine-free domain in active promoters and the spreading of preimposed methylation patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3728-3732, 1989.
104. Lindsay, S., and A.P. Bird. Use of restriction enzymes to detect potential gene sequences in mammalian DNA. *Nature (London)* 327: 336-338, 1987.
105. Adkins, B., C. Mueller, C.Y. Okada, R.A. Reichert, I.L. Weissman, and G.J. Spangrude. Early events in T-cell maturation. *Ann. Rev. Immunol.* 5: 325-365, 1987.
106. Raulat, D.H., R.G. Garman, H. Saito, and S. Tonegawa. Developmental regulation of T-cell receptor gene expression. *Nature (London)* 314: 103-107, 1985.

107. Strominger, J.L., M. Fabbi, M. Prendergast, R.T. Maziarz, S.T. Burakoff, and V. Groh. Novel subsets of human T cells (CD4+ CD8- TCR gd and CD4- CD8- TCRab) and T-cell development. *Int. J. Cancer: Supplement 4: 43-47, 1989.*
108. Ito, K., M. Bonneville, Y. Takagaki, N. Nakanishi, O. Kanagawa, E.G. Krecko, and S. Tonegawa. Different gd T-cell receptors are expressed on thymocytes at different stages of development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 631-635, 1989.*
109. Bonneville, M., K. Ito, E. Krecko, S. Itohara, D. Kappes, I. Ishida, O. Kanagawa, C.A. Janeway, D.B. Murphy, and S. Tonegawa. Recognition of a self major histocompatibility complex TL region product by gd T-cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5928-5932, 1989.*
110. Agustin, A., R. T. Kubo, and G-K. Sim. Resident pulmonary lymphocytes expressing the g/d T-cell receptor. *Nature (London) 340: 239-241, 1989.*
111. Tanaka, K., T. Yoshioka, C. Bieberich, and G. Jay. Role of the major histocompatibility complex class I antigens in tumor growth and metastasis. *Ann. Rev. Immunol. 6: 359-380, 1988.*
112. Kappler, J.W., N. Roehm, and P. Marrack. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell 49: 273-280, 1987.*
113. Tykocinski, M.L. and E.E. Max. CG Dinucleotide Clusters in MHC genes and in 5' demethylated genes. *Nucl. Acids Res. 12: 4385-4396, 1984.*
114. Schmidt, W., and H. Festenstein. Resistance to cell-mediated cytotoxicity is correlated with reduction of H-2K gene products in AKR leukemia. *Immunogenetics 16: 257-264, 1982.*
115. Caccia, N., M. Kronenberg, D. Saxe, R. Haars, G. Bruns, J. Goverman, M. Malissen, H. Willard, Y. Yoshikai, M. Simon, L. Hood, and T. Mak. The T-cell receptor b chain genes are located on chromosome 6 in mice and chromosome 7 in humans. *Cell 37: 1091-1099, 1984.*
116. Iwamoto, A., R.S. Ohashi, H. Pircher, C. L. Walker, E.E. Michalopoulos, F. Rupp, H. Hengartner, and T.W. Mak. T cell receptor variable gene usage in a specific cytotoxic T cell response. Primary structure of the antigen-MHC receptor of four hapten-specific cytotoxic T cell clones. *J. Exp. Med. 165: 591-600, 1987.*

117. Ajitkumar, P., S.S. Geier, K.V. Kesari, F. Boriello, M. Nakagawa, J.A. Bluestone, M.A. Saper, D.C. Wiley, and S. G. Nathenson. Evidence that multiple residues on both the α -helices of the class I MHC molecule are simultaneously recognized by the T cell receptor. *Cell* 54: 47-56, 1988.
118. Fidler, I.J., and I. R. Hart. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* 217: 998-1003, 1982.
119. Goodenow, R.S., J.M. Vogel, and R.L. Linsk. Histocompatibility Antigens on murine tumors. *Science* 230: 777-783, 1985.
120. Maschek, U., W. Pulm, S. Segal, and G.J. Hammerling. Major histocompatibility complex class I genes in murine fibrosarcoma IC9 are down regulated at the level of the chromatin structure. *Mol. Cell Biol.* 9: 3136-3142, 1989.