

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

24

ANALISIS DE NUEVOS POLIMORFISMOS
ASOCIADOS AL COMPLEJO PRINCIPAL
DE HISTOCOMPATIBILIDAD

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS
AREA INMUNOLOGIA

P R E S E N T A :

MARTHA ESTHELA PEREZ RODRIGUEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE ARELLANO BLANCO

PROFESSOR J. ALEJANDRO MADRIGAL, MD PhD FRCP MRCPATH

STEVEN G. E. MARSH, BSc PhD ARCS

MEXICO, D. F.

2000

Handwritten signature or mark at the bottom center.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Este trabajo fue realizado en el Anthony Nolan Research Institute, Royal Free Hospital, bajo la dirección y tutoría del Dr. Jorge Arellano Blanco, Professor J. Alejandro Madrigal, MD PhD FRCP MRCPPath y Steven G. E. Marsh, BSc PhD ARCS.

Durante el desarrollo de la tesis la sustentante fue becada de la Coordinación de Investigación Médica del IMSS, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, y The Anthony Nolan Scholarship.

I acknowledge and thank Professor J. Alejandro Madrigal for giving me the opportunity to work in the Anthony Nolan Research Institute, his advice and help me all the time. At the same time I would like to thank Steven G. E. Marsh for his assistance with the papers, his helpful discussions and contributions to the illustrations in this thesis. I would like to thank my colleagues the Anthony Nolan Research Institute for their special help.

De manera especial le doy las gracias al Dr. Jorge Arellano Blanco por apoyarme a lo largo de estos años de estudio y preparación.

Al Dr. Onofre Muñoz Hernández y al Dr. Roberto Kretschmer S. por brindarme su apoyo en mi preparación y en el desarrollo de esta tesis en el Anthony Nolan Research Institute.

A mis queridos amigos que tuve la fortuna de conocerlos en el A.N.R.I. Espero que algún día estemos juntos nuevamente. Nunca importó el cansancio siempre fuimos personas alegres.

A mis amistades que como siempre en ocasiones me es difícil verlas.

A mis queridos padres por su apoyo, cariño y comprensión invaluable que siempre me han brindado.

A mi familia por sus consejos y ánimos.

Por último agradeceré a alguien muy especial en mi vida y que también he sacrificado por mi superación, aunque siempre he tenido su comprensión me he perdido parte de su vida ¡Mi hijo!.

CONTENIDO

| | |
|--|-----|
| RESUMEN | I |
| PUBLICACIONES | II |
| ABREVIATURAS DE USO FRECUENTE | III |
| CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES | 1 |
| SISTEMA HLA | 1 |
| 1.1 Genes | 1 |
| 1.1.1 Región clase I..... | 2 |
| 1.1.2 Región clase II..... | 5 |
| 1.1.3 Región clase III..... | 7 |
| 1.2 Estructura | 8 |
| 1.2.1 Moléculas HLA clase I..... | 8 |
| 1.2.2 Moléculas HLA clase II..... | 11 |
| 1.3 Localización | 12 |
| 1.4 Función | 13 |
| 1.4.1 Presentación y procesamiento del antígeno..... | 13 |
| 1.4.1.1 Moléculas HLA clase I..... | 13 |
| 1.4.1.2 Moléculas HLA clase II..... | 16 |
| 1.5 Polimorfismo del sistema HLA | 17 |
| 1.5.1 Mecanismos de generación de nuevos alelos..... | 19 |
| 1.5.1.1 Conversión génica..... | 19 |

| | |
|---|-----------|
| 1.5.1.2 Recombinación..... | 20 |
| 1.5.1.2.1 Recombinación interalélica..... | 20 |
| 1.5.1.2.2 Recombinación interlocus..... | 21 |
| 1.5.1.3 Mutación de punto..... | 21 |
| 1.6 Nomenclatura del sistema HLA..... | 22 |
| 1.7 Alorreconocimiento..... | 23 |
| | |
| CAPÍTULO 2: HLA Y ENFERMEDAD | 25 |
| 2.1 Mecanismos de asociación..... | 26 |
| 2.1.1 Mimetismo molecular entre antígenos HLA y antígenos de agentes infecciosos..... | 27 |
| 2.1.2 Modificación de la estructura de los antígenos HLA..... | 27 |
| 2.1.3 Antígenos HLA como receptores..... | 27 |
| 2.1.4 Deficiencias en la respuesta inmune..... | 28 |
| 2.1.5 Deficiencias de los antígenos HLA clase III..... | 28 |
| 2.1.6 Falla en la selección..... | 29 |
| 2.2 Enfermedades autoinmunes..... | 28 |
| 2.2.1 Bases genéticas de las enfermedades autoinmunes..... | 29 |
| 2.3 Métodos de estudio..... | 30 |
| 2.3.1 Estudios de población abierta..... | 30 |
| 2.3.2 Estudios familiares..... | 31 |
| 2.4 Desequilibrio de enlace y asociación con marcadores genéticos..... | 31 |
| 2.5 Evaluación estadística de la asociación..... | 33 |

| | |
|--|-----------|
| CAPÍTULO 3: TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA..... | 34 |
| 3.1 Selección del donador..... | 35 |
| 3.2 Falla del Trasplante de Médula Ósea (TMO) | 37 |
| 3.3 Enfermedad injerto contra huésped (GvHD)..... | 38 |
| 3.4 Otros trasplantes..... | 41 |
| 3.5 Antígenos menores de histocompatibilidad (ags mH)..... | 41 |
| 3.5.1 Identificación de los ags mH y sus genes..... | 42 |
| | |
| CAPÍTULO 4: LOS GENES MIC (GENES RELACIONADOS CON LA CADENA I DEL MHC)..... | 45 |
| 4.1 Introducción..... | 45 |
| 4.2 Genes..... | 45 |
| 4.3 Estructura, función y expresión..... | 47 |
| 4.3.1 MIC y las células T $\gamma\delta$ | 49 |
| 4.4 MIC y primates..... | 50 |
| 4.5 Alelos reportados..... | 50 |
| 4.6 MICA y enfermedades..... | 51 |
| | |
| CAPÍTULO 5: OBJETIVOS E HIPÓTEIS..... | 54 |
| Metas y Justificación..... | 55 |
| | |
| CAPÍTULO 6: MATERIAL Y MÉTODOS..... | 57 |
| 6.1 Líneas celulares y extracción del DNA (muestras y controles)..... | 57 |
| 6.2 Fundamento de la técnica RSCA..... | 57 |

| | |
|---|-----------|
| 6.3 Iniciadores (<i>primers</i>) específicos para MICA y MICB..... | 59 |
| 6.3.1 MICA..... | 59 |
| 6.3.2 MICB..... | 60 |
| 6.4 Condiciones para la reacción de la cadena de la polimerasa (PCR)..... | 62 |
| 6.4.1 MICA (RSCA)..... | 62 |
| 6.4.2 MICA (SSOP) y secuenciación..... | 62 |
| 6.4.3 MICB (RSCA)..... | 63 |
| 6.4.4 MICB (SSOP) y secuenciación..... | 63 |
| 6.5 Estudio del polimorfismo de MICA y MICB por RSCA..... | 63 |
| 6.5.1 Producción de las referencias (<i>Fluorescent labelled references (FLR)</i>)..... | 63 |
| 6.5.2 Hibridación de las FLRs con las muestras..... | 64 |
| 6.5.3 Gel de poliacrilamida y condiciones electroforéticas..... | 64 |
| 6.5.4 Código de RSCA de los alelos de MICA..... | 64 |
| 6.5.5 Preparación de los controles de DNA (<i>ladders</i>)..... | 66 |
| 6.5.6 Análisis de los resultados..... | 66 |
| 6.6 Clonación y secuenciación (SBT) de los nuevos alelos de MICA y MICB..... | 66 |
| 6.7 Estudio del polimorfismo de MICA y MICB por SSOP..... | 67 |
| 6.7.1 Sondas de oligonucleótidos..... | 67 |
| 6.7.1.1 MICA..... | 67 |
| 6.7.1.2 MICB..... | 68 |
| 6.7.2 Marcaje de las sondas..... | 70 |
| 6.7.3 Método SSOP..... | 70 |
| 6.7.3.1 MICA..... | 70 |
| 6.7.3.2 MICB..... | 70 |

| | |
|---|---------------|
| 6.7.4 Análisis de los resultados de MICA y MICB por SSOP..... | 71 |
| CAPÍTULO 7: RESULTADOS | 72 |
| 7.1 Estudio de MICA por RSCA..... | 72 |
| 7.1.1 Secuencia idéntica en el exón con diferente movilidad en los controles (DNAs).. | 72 |
| 7.1.2 Selección de las mejores referencias..... | 73 |
| 7.1.3 Secuencias nuevas..... | 73 |
| 7.1.3.1 Exón 2..... | 74 |
| 7.1.3.2 Exón 3..... | 74 |
| 7.1.3.3 Exón 4..... | 75 |
| 7.1.3.4 Exón 5..... | 77 |
| 7.1.4 Alelos nuevos..... | 77 |
| 7.1.5 Análisis del exón 5 microsatélite..... | 78 |
| 7.2 Desequilibrio de enlace entre MICA y HLA-B..... | 79 |
| 7.3 Estudio de MICA por SSOP..... | 79 |
| 7.4 Estudio de MICB por RSCA..... | 80 |
| 7.5 Estudio de MICB por SSOP..... | 81 |
| 7.6 Desequilibrio de enlace entre MICB, MICA y HLA-B..... | 82 |
| 7.7 Resultados de MICA/B en las líneas celulares..... | 82 |
| CAPÍTULO 8: DISCUSIÓN..... | 94 |
| CAPÍTULO 9: BIBLIOGRAFÍA..... | 106 |

ABSTRACT

The MIC (MHC class I chain-related) gene family constitutes a genetic group, which is related to MHC class I genes and has been identified in the MHC class I region. Although there are five members of this family (MICA, MICB, MICC, MICD and MICE) only MICA and MICB are expressed. MIC molecules are expressed in fibroblasts, keratinocytes, epithelial cells and freshly isolated monocytes. Unlike class I MHC molecules MIC expression requires neither β 2-microglobulin nor class I peptide ligands. Furthermore MIC molecules lack a CD8 binding site, and are not responsive to type I and II interferons. In contrast, they do appear to be regulated by heat shock promoter elements. MIC proteins interact with $V_{\delta}1\gamma\delta$ T cells, CD8+ and K cells. Although the exact function of the MIC proteins is still unknown the receptor, NKG2D, of MICA (and probably MICB) has been revealed recently in NK cells. Preliminary studies of MICA have revealed the existence of 20 alleles and 15 alleles for MICB. Thus the studies of polymorphism of MIC genes suggest that this genetic system may be as polymorphic as the HLA system. In order to investigate further the extent of MIC polymorphism we have studied exons 2-5 of the MICA and MICB genes in 264 and 130 B-lymphoblastoid cell lines respectively from the 12th International Histocompatibility Workshop panel. We have developed methodologies to type the published MIC variants, studying the polymorphism by RSCA (Reference Strand Conformational Analysis) and SSOP (Sequence Specific Oligonucleotide Probing). We identified 12 new MICA alleles and report 14 new nucleotide variations: one in exon 2, four in exon 3, four in exon 4, one in exon 5, two in intron 1, and two in intron 4. Eight of the ten exonic variations are non-synonymous. In addition, we identified 4 new MICB alleles: one of them had an eight-nucleotide duplication in intron 4, other one variation in intron 4 and two of these alleles are formed by a non-synonymous nucleotide variation in exon 4. This study confirms previous findings that most of the polymorphisms in the MICA, as in MICB, are coding and suggest that the extent of polymorphism in the two genes might be comparable. In contrast to MHC class I molecules, the polymorphic sites in MICA are predominantly within the α_2 and α_3 domains. The distribution of synonymous and non-synonymous substitutions suggests that there is selection for the polymorphic positions, which therefore define potential functional sites in the protein.

RESUMEN

Recientemente fue descubierta una nueva familia de genes polimórficos en la región I del sistema HLA llamada MIC (MHC class I chain-related). Aunque MIC está constituida por cinco genes (MICA, MICB, MICC, MICTD y MICE) únicamente MICA y MICB son expresados. Las moléculas MIC se expresan en fibroblastos, queratinocitos, células epiteliales y monocitos. A diferencia de las moléculas MHC clase I, las moléculas MIC no se asocian con la β 2-microglobulina, su expresión celular es estable sin la presencia de péptidos citosólicos, carecen de un sitio de unión de CD8, y no son inducibles por interferón I o II. Sin embargo, estas moléculas responden a proteínas de choque térmico las cuales actúan sobre la región promotora. Las proteínas MIC interactúan con las células T $V_{\delta}1\gamma\delta$, CD8+ y células NK. Aunque la función exacta de las proteínas MIC es desconocida, el receptor NKG2D de MICA (y probablemente de MICB) fue descubierto recientemente en las células NK. Estudios preliminares sobre los polimorfismos de MIC han revelado la existencia de 20 alelos MICA y 15 MICB, sugiriendo que este sistema genético puede ser tan polimórfico como el sistema HLA. Con la finalidad de analizar en forma integral el polimorfismo de MIC se estudiaron los exones 2-5 de los genes MICA y MICB en 264 y 130 líneas celulares B-linfoblastoides pertenecientes al panel del 12th International Histocompatibility Workshop, respectivamente. Para ello se empleó la técnica de RSCA (Reference Strand Conformational Analysis) y SSOP (Sequence Specific Oligonucleotide Probing). Se identificaron 12 alelos nuevos en MICA y 14 variaciones nucleótidas: una en el exón 2, cuatro en el exón 3, cuatro en el exón 4, una en el exón 5, dos en el intrón 1 y dos en el intrón 4. Ocho de las diez variaciones exónicas son no-sinónimas. En MICB se identificaron 4 alelos nuevos, uno de ellos presenta una duplicación de ocho nucleótidos en el intrón 4, otro una variación en el intrón 4 y los otros dos alelos presentan una substitución no-sinónima en el exón 4. El estudio confirma que la mayoría del polimorfismo en MICA, como en MICB, son codificados y sugiere que el polimorfismo de ambos genes puede ser comparable. A diferencia de las moléculas MHC clase I, los polimorfismos en MICA se encuentran predominantemente en los dominios α_2 y α_3 y. La distribución de las substituciones sinónimas y no-sinónimas sugiere que los sitios polimórficos de MICA son mantenidos por la selección, por lo que definen los posibles sitios funcionales en la proteína.

PUBLICACIONES

1. Mendoza-Rincon J., Argüello R., Pérez-Rodríguez M., McWhinnie A., Marsh SGE., Fischer G., Madrigal A. (1999) "Characterisation of the MICA polymorphism by sequence specific oligonucleotide probing". *Immunogenetics*, vol. 49: 471-8.
2. Fischer G., Argüello J. R., Pérez-Rodríguez M., Cox S. T., McWhinnie A., Marsh S. G. E., Madrigal J. A.(1999) "Novel intronic variants of MICB (MHC class I chain-related gene B)". *Europea Journal Immunogenetics*, vol.26: 399-404.
3. Fischer G., Pérez-Rodríguez M., Argüello J. R., Cox S. T., McWhinnie A., Travers P. J., Madrigal J. A (2000) "Three novel MICB alleles". *Tissue Antigens*, vol. 55: 166-170.
4. Pérez-Rodríguez M., Corell A., Argüello R., Cox S. T., McWhinnie A., Marsh S. G. E., Madrigal J. A (2000) "A new MICA allele with ten alanine residues in exon 5 microsatellite". *Tissue Antigens*, vol. 55: 162-165.
5. Fischer G., Argüello J. R., Pérez-Rodríguez M., McWhinnie A., Marsh S. G. E, Travers P. J., Madrigal J. A. (2000) "Sequence-specific oligonucleotide probing (SSOP) for MICB alleles reveals associations with MICA and HLA-B". *Immunogenetics*, vol. 51: 591-599.

ORIGINAL PAPER

Jorge Mendoza-Rincon · J. Rafael Argüello
Martha Pérez-Rodríguez · Alasdair McWhinnie
Steven G.E. Marsh · Gaby Fischer
J. Alejandro Madrigal

Characterization of the *MICA* polymorphism by sequence-specific oligonucleotide probing

Received: 16 September 1998 / Revised: 15 December 1998

Abstract A large number of diseases occur in association with specific *HLA-B* or *-C* alleles. Recently a new gene, termed major histocompatibility complex class I chain-related gene *A* (*MICA*), has been identified in close proximity to *HLA-B*. The function of this gene is still unknown, but, it is structurally related to *HLA* class I genes, is polymorphic, and is potentially associated with several diseases. Some DNA-based techniques have previously been described to type for *MICA* including sequencing and single-strand conformational polymorphism. In this paper we describe the application of sequence-specific oligonucleotide probe based typing for the analysis of the *MICA* gene. We used a set of 30 oligonucleotide probes to screen for the polymorphisms in exons 2, 3, and 4, which account for the 16 known alleles. We report here the typing results of *MICA* for 103 B-cell lines that have been well characterized for *HLA* and describe the linkage disequilibrium between *MICA* and *HLA-B*. Unequivocal *MICA* typing was achieved for 85 of the 103 cells tested, 6 cells gave ambiguous *MICA* types, and a further 12 cells showed patterns consistent with them expressing at least one *new MICA* allele.

Key words *MICA* · *HLA* · Polymorphism · Oligonucleotide typing

Introduction

A new family of genes has recently been identified within the major histocompatibility complex (MHC).

The genes have been alternatively called MHC class I chain-related gene (*MIC*) (Bahram et al. 1994) or *PERB11* (Leelayuwat et al. 1994). There are five genes currently identified within this family: *MICA* (*PERB11.1*), *MICB* (*PERB11.2*), *MICC* (*PERB11.3*), *MICD* (*PERB11.4*), and *MICE* (*PERB11.5*) (Bahram and Spies 1996a; Gaudieri et al. 1997). Of these five genes only *MICA* and *MICB* are transcribed into mRNA. *MICC*, *MICD*, and *MICE* are pseudogenes because of point mutations and deletions (Bahram et al. 1996; Bahram and Spies 1996b). In contrast to the classical MHC genes, which have been the subject of extensive investigations in terms of their polymorphism and biological function, relatively little is yet known about the *MIC* genes. In addition to initial reports of the gene structure, there have been investigations into the regulation of *MIC* expression, tissue distribution, and allelic repertoire (Fodil et al. 1996; Groh et al. 1996; Pellet et al. 1997). *MICA* and *MICB* are similar in structure to each other and to MHC class I genes, but only show 19%, 25%, and 35% sequence similarity to the extracellular $\alpha 1$, $\alpha 2$, and $\alpha 3$ domains of other MHC class I genes (Bahram et al. 1994; Leelayuwat et al. 1994). Despite this fact it has been predicted that the encoded proteins fold in a similar way to MHC molecules. However, unlike MHC molecules they do not seem to be associated with β_2 -microglobulin (Groh et al. 1996), do not bind to CD8 (Bahram et al. 1994), and probably do not present peptides on their surface (Groh et al. 1998).

Most of the data generated so far has focused on *MICA*, which is located 46.4 kilobases (kb) centromeric to the *HLA-B* gene. The *MICA* gene has already been shown to be highly polymorphic, with 16 different alleles described so far (Fodil et al. 1996). It appears that the expression of the *MICA* gene product is restricted to proliferating cell lines derived from various tissues, and to specific areas in the gastrointestinal mucosa (Groh et al. 1996). Resting T cells or B cells do not seem to express *MICA* (Zwirner et al. 1998). In contrast to the classical *HLA* gene products, the expression

J. Mendoza-Rincon · J.R. Argüello · M. Pérez-Rodríguez
A. McWhinnie · S.G.E. Marsh · G. Fischer · J.A. Madrigal (✉)
Anthony Nolan Research Institute, The Royal Free Hospital,
Pond Street, Hampstead, London NW3 2QG, UK
E-mail: madrigal@rthsm.ac.uk,
Tel.: +44-171-2848315,
Fax: +44-171-2848331

Novel intronic variants of MICB (MHC class I chain-related gene B)

G. Fischer, J. R. Argüello, M. Pérez-Rodríguez, S. T. Cox, A. McWhinnie, S. G. E. Marsh & J. A. Madrigal

Summary

We report an eight-nucleotide duplication in intron 4 of the MICB allele 01021, which was found in samples from different ethnic backgrounds and in association with several HLA-B alleles. We suggest that this new MICB allele is evolutionarily older than HLA-B alleles.

MICB (MHC class I chain related gene B) is a member of the MIC gene family which is related to MHC class I (Bahram *et al.*, 1994). MICB and its homologue MICA are the only members of a family of five genes that are translated into protein products (Bahram & Spies, 1996). The MIC proteins seem to be similar in structure to HLA molecules, but seem not to bind either peptides or β_2 -microglobulin (Groh *et al.*, 1996, 1998). Both MICB and MICA have recently been shown to interact with gut T cells expressing the $\gamma\delta$ receptor (Groh *et al.*, 1998), but otherwise their physiological role is unclear. For MICA an additional correlation between Behçet disease and a triplet repeat polymorphism in the transmembrane region has been reported (Mizuki *et al.*, 1997). Compared to MICA, which seems to be reasonably polymorphic with over 30 different alleles (Fodil *et al.*, 1996; M. Pérez-Rodríguez, manuscript in preparation), MICB seems to be somewhat less variable. So far less than 20 different variants have been described, with some of them showing intronic or synonymous sequence differences (Ando *et al.*, 1997; Pellet *et al.*, 1997; Visser *et al.*, 1998). The number of protein variants derived from the MICB genes so far amounts to less than 15. The apparent low polymorphism of MICB in comparison with HLA genes may partly be due to its relatively recent discovery.

In order to further investigate possible polymorphisms within the MICB gene, we have performed screening experiments using reference strand mediated conformation analysis (RSCA) (Argüello *et al.*, 1998). To screen for

novel MICB variants we amplified exons 2, 3, 4 and 5 separately. For exons 4 and 5 the primers used were as described in Ando *et al.* (1997). For exon 2 the 5' primer was as described in Ando *et al.* (1997) and the 3' primer was: 5'-CCCTATTCCCTATCCCCACCCCA. For exon 3 the 5' primer was: 5'-TGGAGGAGGGCC-AGGGAGGGTCC, and the 3' primer was as described in Ando *et al.* (1997). A total of 125 DNA samples from the IHW cell line panel (Marsh *et al.*, 1997) and the International Cell Exchange Program (Lau *et al.*, 1994) were analysed in this study. Each amplified exon was hybridized with several fluorescent labelled reference (FLR) DNAs of known MICB type and electrophoresed for the detection of novel peaks.

In our analyses of exon 4 we found an unexpected allele with very slow mobility (Fig. 1). As a general rule, the nucleotide differences that have been reported for the different MICB alleles would be expected to lead to a rather small difference in migration between homoduplex and heteroduplex. As shown in lane 1 of Fig. 1, hybridization of the allele MICB01022 to MICB0105 leads to formation of a heteroduplex due to the presence of two nucleotide variations in their sequences. However, for several samples the heteroduplexes were migrating far behind the homoduplexes (Fig. 1, lanes 2 and 3), suggesting a gross difference in sequence leading to a significantly different conformation of the heteroduplex.

Of the 125 samples analysed we found altogether 18 samples with this allele peak [AT (IHW9221), APA (IHW9237), BM92 (IHW9092), DEU (IHW9025), GRC187 (IHW9363), KIME (IHW9212), KOSE (IHW9056), KY (IHW9222), LATIF (IHW9247), RML (IHW9016), EXT#2, EXT#3, TER#929, TER#931, TER#936, TER#942, TER#948 and VOO (IHW9241)], with five of them [BM92 (IHW9092), DEU (IHW9025), KOSE (IHW9056), KY (IHW9222) and RML (IHW9016)] being homozygous for this variant. We sequenced these five cell lines, and in addition we also sequenced a group of eight cell lines representing some of the MICB alleles without the new mutation [E4181324 (IHW9011), BOLETH (IHW9031), RSH (IHW9021), PLH (IHW9047) and STEINLIN (IHW9087)]. For this we used a novel combination of primers that covers the region from exon 4 to exon 5.

We were able to confirm the previously published sequencing data for the cell lines which lacked the mutation

Anthony Nolan Research Institute, The Royal Free Hospital, Pond Street, Hampstead, London NW3 2QG, UK

Received 19 March 1999, revised 5 July 1999, accepted 14 July 1999

Correspondence: J. Alejandro Madrigal, Anthony Nolan Research Institute, The Royal Free Hospital, Pond Street, Hampstead, London NW3 2QG, UK

Three novel MICB alleles

G. Fischer
M. Pérez-Rodríguez
J.R. Argüello
S.T. Cox
A. McWhinnie
P.J. Travers
J.A. Madrigal

Key words:

HLA, MICB, nucleotide sequence, polymorphism

Acknowledgments:

This work is funded by the Anthony Nolan Bone Marrow Trust. M. P.-R. is the recipient of a fellowship from Instituto Mexicano del Seguro Social.

Abstract: The two members of the MHC class I chain-related (MIC) gene family, MICA and MICB, have been shown by several investigators to be polymorphic. Most of the research effort so far has focussed on MICA, so less is known about the extent of polymorphism in the MICB gene. Here we report three novel MICB alleles, which had been detected in the course of an SSOP typing study on a large cohort of cell lines. Two of these alleles are formed by a non-synonymous nucleotide variation. Our results confirm previous findings that most of the polymorphisms in the MICB gene, as in MICA, are coding and suggest that the extent of polymorphism in the two genes might be comparable.

Authors' affiliation:

G. Fischer,
M. Pérez-Rodríguez,
J.R. Argüello,
S.T. Cox,
A. McWhinnie,
P.J. Travers,
J.A. Madrigal

The Anthony Nolan Research Institute, The Royal Free Hospital, London, United Kingdom

Correspondence to:

J. Alejandro Madrigal
The Anthony Nolan Research Institute
The Royal Free Hospital
Pond Street
London NW3 2QG
United Kingdom
Tel.: +44 20 7284 8315
Fax: +44 20 7284 8331
e-mail:
madrigal@rftsm.ac.uk

Both within the MHC class I region and outside, several genes are found that code for proteins which are highly similar in structure to class I molecules, but different in function. Among these are the so called MHC class I chain-related genes (MIC) (1). The two expressed members of the MIC gene family, MICA and MICB, which are cell surface anchored glycoproteins, have been shown to be highly polymorphic. This is particularly obvious for MICA (1-3) (M. Pérez-Rodríguez unpublished data). MICB, which has not yet been analysed to the same extent, has also been shown to be polymorphic (4-7). Importantly, the majority of polymorphisms for both MICA and MICB were found to be non-synonymous. Apart from the detection of polymorphisms in these molecules, data was generated regarding their tissue distribution, the regulation of their expression, and their three-dimensional structure (8-10). In contrast to MHC molecules, the MIC proteins seem to be mainly expressed in limited areas in the gut, and become upregulated upon heat shock (8). Yet in some immortalised cell lines and specimens of freshly isolated tumour tissue MICA and MICB seem to be constitutively expressed (11). In light of these facts it had been suggested that MIC molecules become upregulated on the cell surface as a reaction to cell stress.

Received 27 August, revised,
accepted for publication 3 November 1999

Copyright © Munksgaard 2000
Issue Antigen ISSN 0001-2815

Issue Antigen 2000 85 166-170
Printed in Denmark All rights reserved

M. Pérez-Rodríguez
A. Corell
J.R. Argüello
S.T. Cox
A. McWhinnie
S.G.E. Marsh
J.A. Madrigal

A new MICA allele with ten alanine residues in the exon 5 microsatellite

Key words:

HLA; MICA; polymorphism; RSCA

Acknowledgments:

This work is funded by the Anthony Nolan Bone Marrow Trust. We thank Dr. Gaby Fischer for technical support and critical reading of this manuscript.

Abstract: The MICA and MICB genes code for protein products that have structural similarities to major histocompatibility complex (MHC) class I genes. These genes are upregulated by heat stress. They have been shown to interact with a common receptor (NKG2D/DAP10) on $\gamma\delta$ T cells, CD8+ T cells and natural killer (NK) cells. The MICA gene has an expressed microsatellite, GCT, within the exon 5 which encodes for alanine. So far, four different repetitions of this short tandem have been reported. Also one non-synonymous, one synonymous substitution and a 1-bp insertion within this region have also been described. An association of Behçet's disease with the microsatellite A9 has been reported. Here we report a novel allele with 10 GCT repetitions (A10) which was detected by reference strand mediated conformation analysis and confirmed by DNA sequencing.

The major histocompatibility complex (MHC) class I chain-related (MIC) gene family was discovered when the region flanking the HLA-B gene was investigated (1, 2). There are five genes in this family MICA to MICE, but only MICA and MICB are expressed. They have a similar structure to MHC class I molecules (2–5), although they do not bind either β_2 microglobulin or peptide ligands for stable expression on the cell surface (6). MIC gene expression is not regulated by interferons I and II (2, 7), however it is regulated by heat shock promoter elements (6). MICA and MICB are known to be expressed in the gut, on fibroblasts, keratinocytes, epithelial cells, freshly isolated monocytes (2, 7) and some tumour tissues (8). The receptor for MICA, and perhaps MICB, is the NKG2D/DAP10 heterodimer, present on NK cells, $\gamma\delta$ T cells and $\alpha\beta$ CD8+ T cells (9). The MICA gene is highly polymorphic and more than 50 MICA alleles have been reported so far (10–12) (Pérez-Rodríguez unpublished data). Unlike MHC class I genes, the polymorphic residues of MICA lie predominantly outside the "peptide-binding groove", being on the periphery of the $\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains and on one face of the $\alpha 3$ domain (Pérez-Rodríguez unpublished data).

Authors' affiliations:

M. Pérez-Rodríguez¹,
A. Corell¹,
J.R. Argüello¹,
S.T. Cox¹,
A. McWhinnie¹,
S.G.E. Marsh^{1, 2},
J.A. Madrigal^{1, 2, 3}

¹Anthony Nolan Research Institute, The Royal Free Hospital, London, United Kingdom.

²Department of Haematology, Royal Free and University College Medical School, London, United Kingdom.

³Imperial College School of Medicine, London, United Kingdom.

⁴Departamento de Pediatría, Ginecología y Obstetricia, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid, Spain

Correspondence to:
J. Alejandro Madrigal
The Anthony Nolan Research Institute
The Royal Free Hospital
Pond Street
London NW3 2QG
UK
Tel: +44 20 7284 8315
Fax: +44 20 7284 8331
e-mail:
madrigal@rftsm.ac.uk

Received 6 October,
accepted for publication 9 November 1999

Copyright © Munksgaard 2000
Issue Antigen ISSN 0001-2815

Issue Antigen 2000 55 162–165
Printed in Denmark All rights reserved

Gaby Fischer · J. Rafael Argüello
 Martha Pérez-Rodríguez · Alasdair McWhinnie
 Steven G.E. Marsh · Paul J. Travers
 J. Alejandro Madrigal

Sequence-specific oligonucleotide probing for *MICB* alleles reveals associations with *MICA* and *HLA-B*

Received: 31 August 1999 / Revised: 20 January 2000
 © Springer-Verlag 2000

Key words *MICA* · *MICB* · *HLA-B* · SSOP · Haplotypes

MICB is a member of the family of *MIC* genes (MHC class I chain-related genes) (Bahram et al. 1994), which are alternatively known as *PerB11* (Leelayuwat et al. 1994). *MICB* and its homologue *MICA* are located close to the *HLA-B* locus, and their gene products have extensive sequence similarities to class I molecules (Bahram et al. 1994). However, *MIC* and *HLA* gene products differ regarding tissue distribution, regulation of expression, association with β_2 -microglobulin (Groh et al. 1996), and most probably function. Upregulation of *MIC* molecules on cell surfaces has been suggested to signal cell stress to the immune system via an interaction with $\gamma\delta$ T cells. In agreement with this, their expression was found to be upregulated in various tumor specimens (Groh et al. 1999), and correlated with a higher frequency of $\gamma\delta$ T cells in these sites. Recently, in addition to interaction with $\gamma\delta$ T cells, *MICA* (and probably *MICB*) has been shown to also interact with CD8⁺ T cells and natural killer (NK) cells via the common receptor NKG2D/DAP10 (Bauer et al. 1999; Wu et al. 1999). Therefore it emerges that the upregulation of *MIC* molecules on a cell surface could activate a wide range of effector cells.

The *MICA* gene has already been shown by several groups to be highly polymorphic (Bahram et al. 1994; Fodil et al. 1996, 1999; M. Pérez-Rodríguez, unpublished data; Visser et al. 1999; Yao et al. 1999). In addition, *MICA* has been shown to be in strong linkage disequilibrium with *HLA-B* (Fodil et al. 1996, 1999; Mendoza-Rincon et al. 1999; M. Pérez-Rodríguez, unpublished data; Visser et al. 1999), and might therefore be involved in diseases that are commonly thought to be associated with certain *HLA-B* alleles (Tiwari and Terasaki 1985). So far, most experimental work has focused on *MICA*, and the extent of *MICB* polymorphism has not been as well defined. However, several *MICB* alleles have been described (Ando et al. 1997; Fischer et al. 1999, 2000; Pellet et al. 1997; Visser et al. 1998), and its level of polymorphism seems considerable, even though lower than that described for *MICA*. The exact extent of linkage disequilibrium between *MICB* and *HLA-B*, and also between the neighboring loci *MICB* and *MICA*, has not been established. Therefore, we undertook to type for *MICB* alleles using sequence-specific oligonucleotide probes (SSOP), a technique already applied successfully to *HLA* and *MICA* typing (Mendoza-Rincon et al. 1999).

DNA was extracted by conventional techniques from a total of 130 B-lymphoblastoid cell lines from the International Histocompatibility Workshop cell lines panel (Marsh et al. 1997) and from cell lines available locally. The cells are well characterized for their *HLA* class I and class II alleles, and the majority of them have been typed previously for *MICA* by SSOP and/or reference strand-mediated conformation analysis (RSCA) (Mendoza-Rincon et al. 1999; M. Pérez-Rodríguez, unpublished data). This enabled us to assess possible associations not only between *MICB* and *HLA-B*, but also between *MICA* and *MICB*. *MICB* was amplified using previously published primers (Pellet et al. 1997) and a commercially available PCR kit (Expand Long Template; Boehringer Mannheim, Germany). PCR conditions were according to the manufacturer's

G. Fischer · J.R. Argüello · M. Pérez-Rodríguez
 A. McWhinnie · S.G.E. Marsh · P.J. Travers
 J.A. Madrigal (✉)
 The Anthony Nolan Research Institute,
 The Royal Free Hospital, Pond Street, London,
 NW3 2QG, UK
 e-mail: madrigal@rftsm.ac.uk
 Tel.: +44-20-72848315
 Fax: +44-20-72848331

S.G.E. Marsh · P.J. Travers · J.A. Madrigal
 Department of Haematology, The Royal Free Hospital,
 Pond Street, London NW3 2QG, UK

ABREVIATURAS DE USO FRECUENTE

| | |
|------|---|
| Cy5' | Carbocianina-5 |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| FLR | Referencia marcada con fluorocromo (fluorescent labelled reference) |
| GvHD | Enfermedad injerto contra huésped (graft-versus-host disease) |
| HLA | Antígenos leucocitarios humanos (human leukocyte antigens) |
| IHW | Taller internacional de histocompatibilidad (international histocompatibility workshop) |
| MH | Antígenos menores de histocompatibilidad (minor histocompatibility antigens) |
| MHC | Complejo principal de histocompatibilidad (major histocompatibility complex) |
| MIC | Genes relacionados con la cadena del MHC clase I (MHC class I chain-related) |
| MICA | Gene A de MIC |
| MICB | Gene B de MIC |
| RSCA | Análisis conformacional de referencia de cadena sencilla (reference strand conformation analysis) |
| SSOP | Oligotipificación mediante sondas de secuencia específica (sequence specific oligonucleotide probing) |
| TMO | Trasplante de médula ósea |

CAPÍTULO 1

ANTECEDENTES

SISTEMA HLA

1.1 Genes

El genoma haploide humano contiene alrededor de 222,041 genes diferentes, 36,249 son confirmados, distribuidos en 3200 megabases de DNA cromosómico (<http://www.ensembl.org/>)¹⁻³. En tanto que el sistema de HLA está constituido por 224 genes aproximadamente⁴, genes y pseudogenes, localizados en el brazo corto del cromosoma 6 dentro de la banda 6p21.3 (entre 6p21.31 y 6p21.32) que representa casi el 2.5 % de la longitud total del cromosoma 6 donde abarcan alrededor de 4 megabases (4000 kilobases (kb)) de DNA⁵. Los genes HLA se encuentran distribuidos en 3 regiones clase II (centromérica), clase III y clase I (telomérica) con una densidad génica de 1/20 kb (Fig. 1.1) de acuerdo a su localización, a su característica de ser unidades de recombinación y a las características estructurales y funcionales de las moléculas. HLA-DP representa el locus mas centromérico y HLA-F el más telomérico^{6, 7}.

El mapa del sistema HLA se ha construido en los últimos años a partir de datos obtenidos con técnicas de diferente resolución, tales como recombinación genética, mapeo físico mediante electroforesis de campo pulsado⁸ y más recientemente a través de clonación y secuenciación^{9, 10}. Abderrahim *et al.*

aislaron 53 cromosomas artificiales en levaduras (*yeast artificial chromosome* (YAC)) cuyo tamaño promedio es de 490 kb el cual puede ser organizado dentro de una continuidad que cubre toda la región MHC ¹¹. Es claro que existe un número de nuevos genes de esta región que no han sido identificados, sin embargo, los detalles de la organización genómica de los genes HLA por si mismos, están bien documentados.

1.1.1 Región clase I

La región clase I contiene 1800 kb de DNA y se extiende desde el gen MICB hasta el gen HLA-F en el extremo telomérico del sistema HLA. El análisis con enzimas de restricción y secuencia genómica, ha revelado la existencia de 23 genes clase I. De los cuales tres genes son clásicos (HLA-A, HLA-B y HLA-C), tres no clásicos (HLA-E, HLA-F y HLA-G), dos genes relacionados a cadenas MHC clase I (MIC) MICA y MICB, y 15 pseudogenes. También están incluidos 50 genes no-HLA (un gen cada 28.6 kb) ^{5, 12, 13}. Los genes clase I (A, B y C) se encuentran en una región de un centimorgan en el extremo telomérico del sistema HLA y codifican los antígenos clásicos de trasplante HLA-A, -B y -C; en tanto que los genes E, F y G se expresan como antígenos no clásicos HLA-E, -F y -G en algunas células inmaduras y en la interface materno-fetal ¹⁴.

Los tres dominios extracelulares α_1 , α_2 , y α_3 de la molécula clase I, son codificados separadamente en los exones 2, 3 y 4 de aproximadamente 270 nucleótidos de longitud. El dominio transmembranal es codificado dentro del exón 5 que contiene alrededor de 122 nucleótidos. Existen diferentes arreglos genéticos entre los alelos para la codificación del dominio corto citoplásmico. Algunos expresan este segmento sobre los tres exones 6-8 mientras otros solamente usan dos, 6-7 ¹⁶. Los elementos promotores de los genes de clase I comparten las características comunes de las cajas CAAT y TATA en sentido (*upstream*). La caja CAAT esta localizada en la posición -50, aunque en HLA-Cw3 esto es reemplazado por la secuencia CCGGT. La mayoría de los genes HLA humanos tienen una caja variable TATA, TCTAA ^{17, 18}.

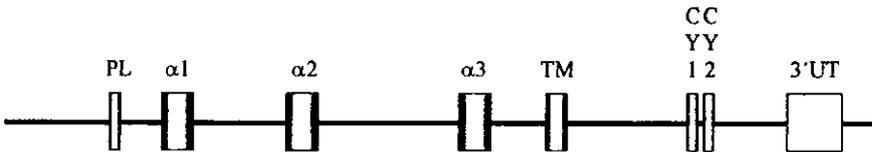


Fig. 1.2 Arreglo genético de las moléculas HLA clase I. Las moléculas clase I se encuentran constituidas por un péptido líder (PL) codificado por el exón 1, los dominios extracelulares α_1 , α_2 y α_3 (exones 2, 3, y 4, respectivamente), el dominio transmembranal (TM) que corresponde al exón 5, el dominio citoplásmico (CY) el cual puede estar codificado por los exones 6 y 7. El exón 8 corresponde a la región 3' no transcrita (3'UT) ¹⁹.

1.1.2 Región clase II

La región clase II posee al menos 23 genes, que se localizan en el extremo centromérico de la región HLA, abarca 1000 kb y codifica los antígenos HLA-DR, -DQ y -DP, los transportadores de péptidos (TAP1 y TAP2) y los proteosomas (LMP2 y LMP7).

La región clase II consta de cinco subregiones:

- 1) La subregión DP contiene los genes DPA y DPB, las moléculas HLA-DP son codificadas por el gen polimorfo DPB1 y por el gen no polimorfo DPA1, mientras que DPA2 y DPB2 son pseudogenes.
- 2) La subregión DN contiene un solo gen (DNA) el cual codifica para una cadena α .
- 3) La subregión DO, contiene el gen DOB, el más divergente de los genes para cadenas β . Dos genes adicionales DMA y DMB se han localizado entre HLA-DNA y DOB. DMA y DMB, son expresados como un solo par de cadenas α y β . Originalmente se consideró DM como una molécula de clase II heterodimérica en base a homología estructural con una localización intracelular y con una función en el transporte del péptido en compartimentos intracelulares más que su presentación en la superficie celular 20, 21.
- 4) La subregión DQ contiene 5 genes, de los cuales un par es polimorfo (DQA1 y DQB1) ambos expresados en una molécula DQ heterodimérica y los genes (DQA2 y DQB2 y DQB3) que pudieran llevar a cabo el proceso de transcripción, sin embargo, no se han identificado productos asociados con estos últimos.

5) En la subregión HLA-DR se han identificado 10 genes, de los cuales cinco se expresan, un DR α (DRA) y cuatro DR β (DRB1, DRB3, DRB4 y DRB5) y cinco son pseudogenes (DRB2, DRB6, DRB7, DRB8 y DRB9). La cadena α , no polimorfa, codificada por DRA se asocia con la cadena polimorfa β codificada por DRB1, DRB3, DRB4 y DRB5 para formar las moléculas de la subregión HLA-DR ¹⁴.

Todos los genes clase II presentan una organización exónica similar (Fig. 1.3). Al igual que los genes de clase I los dominios funcionales de la molécula clase II son codificados por exones separados. La secuencia líder es codificada en el primer exón con los dominios α_1 y α_2 , o dominios β_1 y β_2 , codificados en los exones 2 y 3. La secuencia después del segundo dominio es dividida en tres secciones, una conexión del péptido, un dominio transmembranal y un dominio citoplásmico, todos codificados en un solo exón (DRA), dos exones (DQB1) o tres exones (DPB1). La secuencia 3' no transcrita puede ser contigua a la secuencia codificada del tallo citoplásmico (DQB1) o ser codificada en un exón separado (DRA). La región promotora adyacente a la región 5' de los genes clase II contiene secuencias de DNA conservadas (*motifs*) ²². Hay una caja TATA en las posiciones -25 a -28 del HLA-DR y un octámero, ATTTGCAT, desde -52 a -45 que también se encuentra en el promotor de los genes de inmunoglobulina en la cadena pesada. Hay otros tres *motifs* conservados en las posiciones -74 a -61 (caja Y), -108 a -95 (caja X) y -135 a 117 (caja Z). Las cajas X y Z parecen participar en la especificidad del tejido y en la inducibilidad de IFN γ . La secuencia consenso del IFN γ también aparece en los genes clase I y el promotor de β_2m ^{17, 23, 24}.

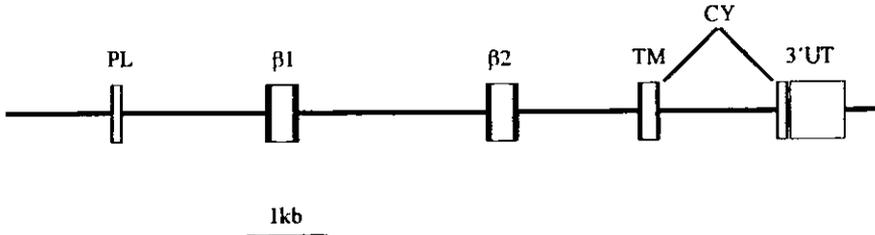


Fig. 1.3 Arreglo genético de las moléculas del HLA clase II. En general el arreglo genético de la cadena alfa o beta es idéntico. En la figura sólo se representa la cadena beta en donde el exón 1, 2 y 3 codifican el péptido líder (PL), el dominio β_1 y β_2 respectivamente. El número de exones que codifica el dominio transmembranal (TM) y el citoplásmico (CY) dependerá de la molécula codificada. El exón de la secuencia 3'UT puede estar unido ó separado del dominio citoplásmico ¹⁹.

1.1.3 Región clase III

La región clase III (Fig.1.4) contiene un grupo heterogéneo de al menos 56 genes, los cuales abarcan unas 1200 kb de DNA, localizadas entre las regiones clase I y clase II. Estos genes codifican para una gran variedad de proteínas importantes en la inmunidad como son los componentes del complemento (C2, C4A, C4B y Bf), los factores de necrosis tumoral (TNF α y TNF β), las proteínas de choque térmico (HSP-70 y GP), la enzima 21-hidroxilasa, transcritos asociados a HLA-B (BATS) y NOTCH ^{25, 26}.

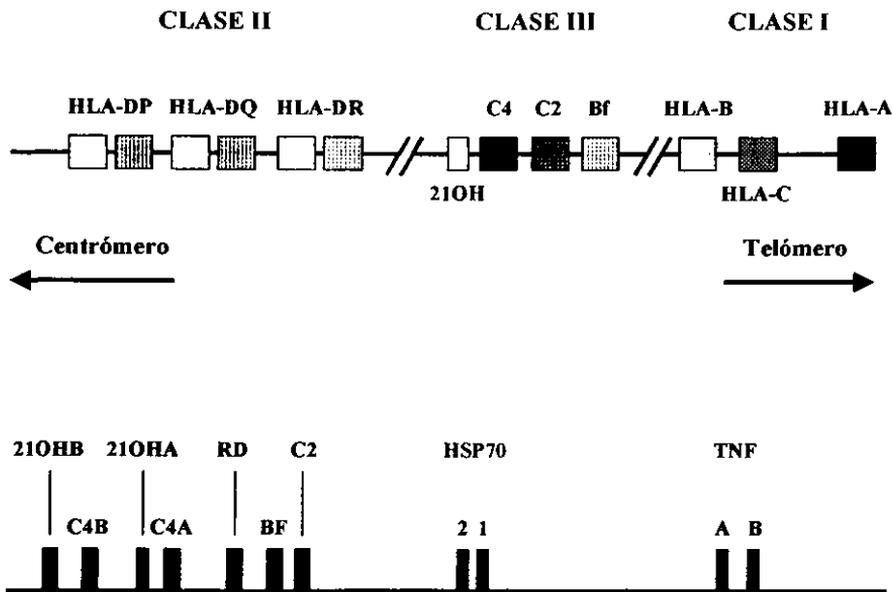


Fig. 1.4 Región clase III. La región clase III incluye genes que codifican complotipos, factor de necrosis tumoral, proteínas de choque térmico y otros genes diversos. Aunque estos genes presentan una organización genómica diferente de las moléculas clásicas del HLA siempre se les considera durante el estudio del MHC ¹⁹.

1.2 Estructura

1.2.1 Moléculas HLA clase I

Los antígenos clase I son moléculas compuestas de dos cadenas polipeptídicas diferentes (Fig. 1.5). La cadena α codificada en el cromosoma 6 es glicoprotéica, polimórfica, transmembranal y con un peso molecular de 45 kDa. Es una proteína constituida por 325 aminoácidos con un dominio transmembranal y un tallo citoplásmico corto de 55 aminoácidos. La cadena α forma la porción extracelular de las

moléculas clase I que contiene tres dominios (α_1 , α_2 , α_3). El más proximal a la membrana es α_3 el cual es plegable como otros miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas y tiene una estructura β -plegada mantenida por una sola unión de disulfuro (Cys25-Cys80). La beta 2-microglobulina (β_2m) codificada en el cromosoma 15 es un polipéptido con un peso molecular de 12 kDa, no posee un dominio transmembranal, sin embargo se encuentra asociada no covalentemente con el dominio α_3 y participa funcionalmente en la unión con moléculas accesorias y con la expresión de las moléculas clase I en la membrana celular.

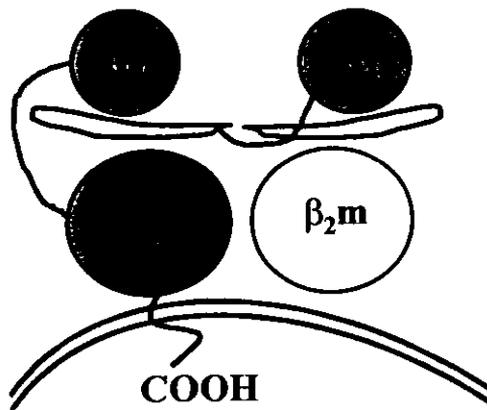


Fig. 1.5 Estructura de la molécula HLA clase I. Las moléculas clase I tienen tres dominios extracelulares, α_1 y α_2 que forman el sitio de unión del péptido y el dominio α_3 que se encuentra unido a la β_2m no covalentemente ¹⁹.

La estructura tridimensional de las moléculas HLA clase I (Fig. 1.6) fue obtenida por cristalografía de rayos X de las moléculas HLA-A2, A68 y B27 y muestra que los dominios α_1 y α_2 forman un nicho, de 10 x 10 x 20 Å integrado por dos alfa hélices paralelas dispuestas sobre una base de 8 bandas plegadas

beta antiparalelas, formando el sitio de unión para péptidos de 8-11 aminoácidos que serán presentados a las células T CD8+. El nicho tiene seis depresiones (*pockets*) formadas por las cadenas laterales del MHC que son polimórficas y que actúan como sitios de unión (*pockets* A-F). El *pocket* B interacciona con un motivo (*motif*) en posición dos de la cadena principal del péptido mientras que el *pocket* F interacciona con un segundo *motif* en el carbono C terminal. Por lo regular estos *pockets* corresponden con las posiciones 2 y 9 (8, 10 y 11) del péptido dependiendo de su tamaño. La unión *motif-pocket* también induce cambios conformacionales en el MHC que dependen de la secuencia del péptido, estos cambios del MHC contribuyen directamente con la particularidad antigénica del sitio de unión del TCR 27-30.



Fig. 1.6 Estructura cristalográfica de la molécula HLA clase I (HLA-A2). En la figura A se representa la cadena α en color azul con sus tres dominios extracelulares α_1 , α_2 y α_3 , este último unido a la cadena β_2m de color rojo en el diagrama *backbone*. La figura B es un diagrama de *ribbons* de una representación del sitio de unión del péptido formado por los dominios α_1 , α_2 y la plataforma β plegada con sus 8 bandas en el cual se observa el péptido 27.

1.2.2 Moléculas HLA clase II

Las moléculas HLA clase II son heterodímeros transmembranales (Fig 1.7) constituidos por una cadena pesada α de 35 kDa y una cadena ligera β de 28 kDa, ambas con dos dominios extracelulares (dominios α_1 y α_2 , y dominios β_1 y β_2 , respectivamente), una región transmembranal y una región citoplásmica.

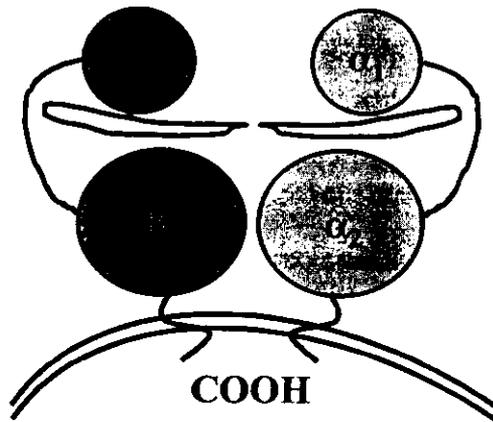


Fig. 1.7 Estructura de la molécula HLA clase II. Todas las moléculas clase II están constituidas por dos cadenas, α y β , ambas con dos dominios extracelulares. Los dominios α_1 y β_1 forman el "nicho" del péptido ¹⁹.

La estructura tridimensional de HLA-DR1 (Fig. 1.8) confirma que los dominios α_1 y β_1 forman un nicho similar al encontrado en las moléculas de clase I aunque con una conformación más flexible y abierta en ambos extremos lo que le permite aceptar péptidos entre 12 y 22 aminoácidos no anclados en sus extremos. El nicho está constituido lateralmente por dos alfa hélices antiparalelas y una base de 8 bandas plegadas β . Aproximadamente en la tercera posición del péptido se lleva a cabo la unión con el *pocket*, los otros son inferidos por la localización de los residuos polimorfos y la forma de la densidad

electrónica. La mayoría de los polimorfismos de las moléculas clase II se encuentran en la secuencia de las hélices α del dominio β_1 , sin embargo, en las moléculas HLA-DP y -DQ también se encuentran polimorfismos asociados a la cadena α_1 ³¹⁻³³. El polimorfismo es identificado en el segundo exón, el cual codifica el primer dominio extracelular, por lo tanto este polimorfismo influye en la conformación exacta del sitio de unión del péptido.

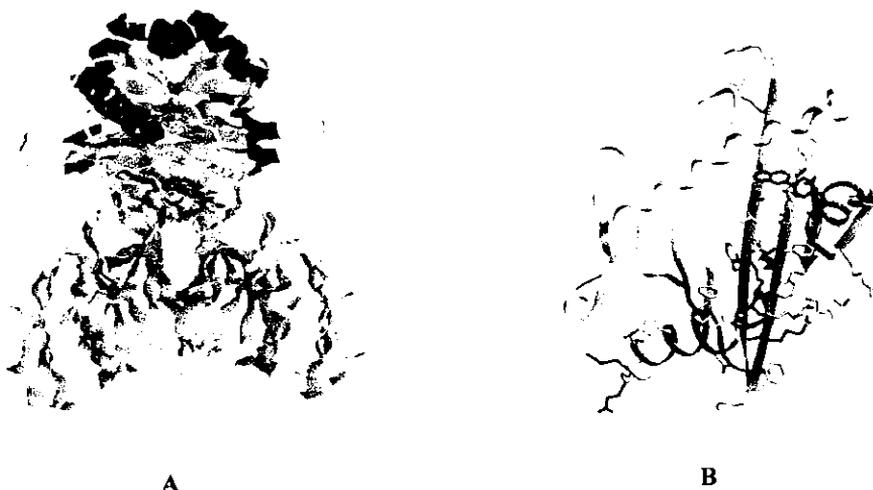


Fig. 1.8 Estructura cristalográfica de la molécula HLA clase II (HLA-DR*0101) en diagrama *ribbons*. En la fig. A las cadenas α y β se encuentran representadas en color amarillo-oro, al igual que la plataforma β plegada. Los dominios α_1 y β_1 en color rosa y el péptido en el “nicho” en color blanco. La fig. B muestra el sitio de unión del péptido en las moléculas clase II, la cadena α en color blanco y la cadena β en color azul. En la cadena β se representan los sitios polimórficos y sus posiciones en colores; amarillo 8, anaranjado 7, rojo 6, rosado 5, morado 4, azul 3, y verde claro 2. Generado en SYBYL (Tripos Associates Inc) usando las coordenadas de Stern *et al.* ³³.

1.3 Localización

Los antígenos HLA clase I se expresan en la membrana citoplásmica de la mayoría de las células nucleadas del individuo, con excepción de neuronas, espermatoцитos, ovocitos, vellosidades

trofoblásticas, células del epitelio corneal, células exocrinas del páncreas y trofoblastos de la placenta 34.

Las moléculas de clase II sólo se expresan en linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, células de Kupffer y células endoteliales 35, aunque su expresión puede ser inducida por interferón gama (IFN γ) o citocinas aun en células que normalmente no las expresan, como en linfocitos T activados, células del endotelio y epitelio del riñón 36.

1.4 Función

La función principal del sistema HLA es la regulación de la respuesta inmune y la discriminación entre lo propio y lo extraño llevada a cabo por linfocitos T (selección negativa y positiva), esta función se asocia con la propiedad de las moléculas MHC de facilitar el desplazamiento de fragmentos peptídicos derivados de antígenos proteicos a la superficie celular en un arreglo tal que permite su reconocimiento por los efectores de la respuesta inmune 37. El concepto de restricción mediada por MHC deriva de la observación de las células T que tienen especificidad para el antígeno y para las moléculas MHC. La interacción entre el HLA y el péptido juega un papel fundamental en el reconocimiento antigénico por células T específicas 38.

1.4.1 Presentación y procesamiento del antígeno

1.4.1.1 Moléculas HLA clase I

Las moléculas HLA clase I presentan, por lo regular, péptidos derivados de la degradación de proteínas endógenas virales, bacterianas o propias (Fig. 1.9) 39, 40. La degradación de las proteínas

intracelulares es iniciada por proteólisis de proteínas ubiquitinadas, en los proteosomas multicatalíticos citosólicos, las cuales son degradadas en fragmentos peptídicos de 4 a 9 aminoácidos ⁴¹. Las dos subunidades de los proteosomas, LMP2 y LMP7, codificadas dentro de la región del MHC ^{42, 43} no son esenciales para el procesamiento del antígeno pero su presencia puede modificar la especificidad del procesamiento proteolítico y puede ayudar a producir antígenos más compatibles con la unión a moléculas HLA ⁴⁴. Subsecuentemente los péptidos producidos en el citosol son transportados al retículo endoplásmico, donde se ensamblan a las moléculas clase I. No se ha aclarado como estos péptidos formados son transportados hacia la membrana exterior del retículo endoplásmico, ni si los proteosomas son arreglados directamente sobre la membrana, pero el transporte de los péptidos a través de la membrana esta bien definido e involucra un transportador de péptidos, donde los componentes TAP1 y TAP2 forman un canal que permite la importación del péptido dentro del retículo endoplásmico en un proceso dependiente de ATP ⁴⁵.

Dentro del retículo endoplásmico se ensamblan las cadenas α y β_2m de los antígenos clase I en asociación con el chaperon calnexina y BiP. Este ensamble parcial de la molécula HLA no puede adoptar una conformación estable hasta la unión del péptido de 8-10 aminoácidos al nicho de enlace peptídico. En la ausencia del péptido, por ejemplo en mutantes negativas de TAP, la molécula HLA vacía es retenida en el retículo endoplásmico, aunque una pequeña cantidad puede ser enviada a la superficie celular. La molécula de clase I con el péptido cargado pasa entonces del retículo endoplásmico al complejo de Golgi y es transferido a la superficie celular donde interacciona con un TCR. Los linfocitos T citotóxicos expresan el correceptor CD8+ y reconocen los antígenos presentados en asociación con moléculas de clase I ^{44, 46, 47}.

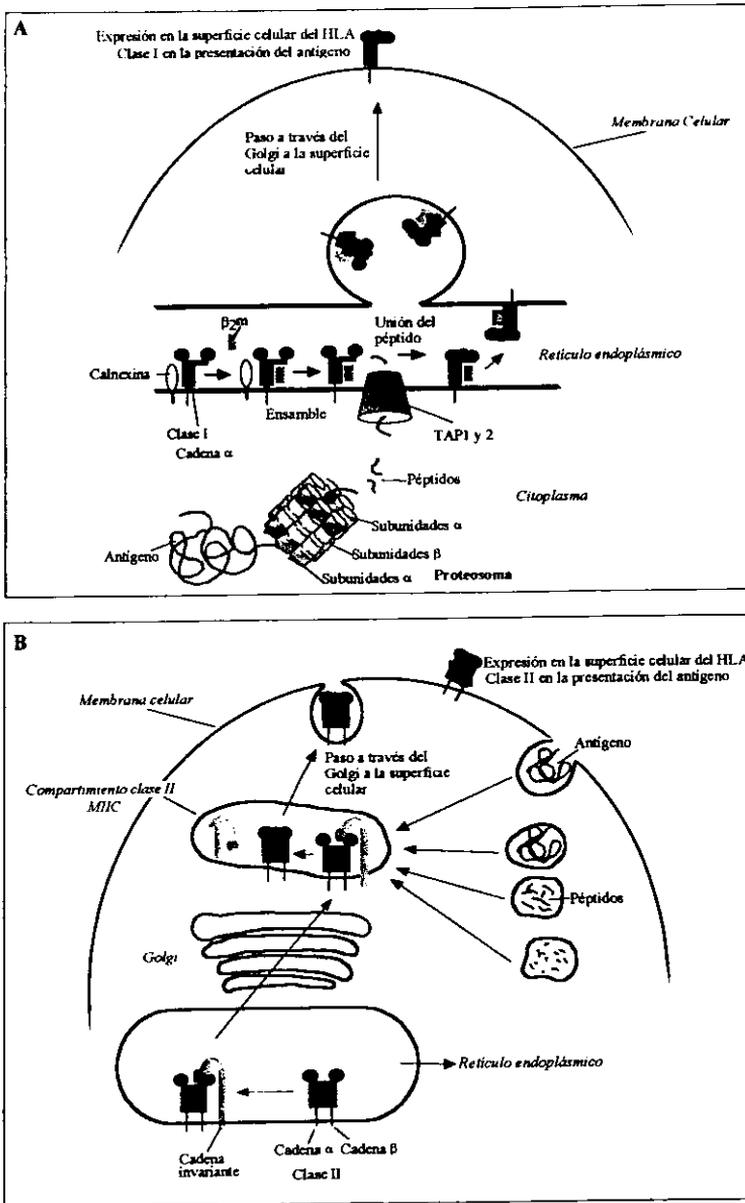


Fig. 1.9 Procesamiento y presentación del antígeno. (A) Moléculas clase I: Las proteínas intracelulares degradadas a péptidos en los proteosomas entran al retículo endoplásmico a través de TAP 1 y 2. Los péptidos ensamblados a las moléculas de clase I son transportados a la superficie celular. (B) Moléculas clase II: Estas moléculas se asocian con la cadena invariante pasando por la red golgi donde interactúan con péptidos exógenos derivados del endosoma. Finalmente el complejo MHC-péptido es transportado a la superficie celular.

1.4.1.2 Moléculas HLA clase II

La vía para la asociación de las moléculas de clase II con el péptido es menos conocida sin embargo. Las proteínas son degradadas en la vía endocítica (Fig. 1.9), la cual internaliza moléculas de la superficie celular que provienen de la pinocitosis, fagocitosis o a través de vesículas cubiertas de clatrina. Posteriormente el proceso continúa a endosomas tempranos, endosomas tardíos y lisosomas, produciéndose fragmentos peptídicos de longitud variable ^{48, 49}. En el retículo endoplásmico se realiza el ensamble de las cadenas α y β de las moléculas de clase II. Tres heterodímeros, de cadenas α y β , son asociados en el retículo endoplásmico con un trimero de la cadena invariable, Ii, el cual es codificado en el humano en el cromosoma 5, dando lugar a un nonámero ⁵⁰⁻⁵². Las cadenas invariables actúan como chaperonas para asistir el ensamble correcto de las cadenas α y β bloqueando el sitio de unión del péptido. El complejo nonamérico se mueve a través de la red posGolgi hacia los endosomas tempranos. La degradación parcial de la cadena invariable por las hidrolasas endosomales permite que el complejo entre a los endosomas tardíos o a compartimentos parecidos a los lisosomas ⁵³. El fragmento de la cadena invariable da lugar a un péptido, CLIP, asociado a las moléculas de clase II en el compartimiento clase II (MIIC). CLIP mantiene una conformación inestable. La molécula HLA-DM remueve al CLIP, permitiendo la exposición del sitio de unión del péptido de las moléculas de clase II, lo cual permite la asociación de otros péptidos generados en la vía endocítica con la molécula de MHC. El complejo péptido-clase II es entonces estable y se dirige a la superficie de la membrana celular, la cadena invariable permanece atrapada en la vía endosomal y es degradada ⁵⁴. El linfocito CD4+, a través de su receptor, reconoce el complejo MHC-péptido y junto con otras moléculas accesorias inicia su activación.

1.5 Polimorfismo del sistema HLA

En una población algunos genes están representados por una única secuencia normal de aminoácidos (genes no polimórficos), aunque existe otro tipo de genes en donde las secuencias pueden variar con una frecuencia relativamente alta entre los individuos normales de la población (genes polimórficos). El sistema de grupo sanguíneo ABO fue el primer polimorfismo descrito en humanos ⁵⁵, sin embargo, su grado de polimorfismo no tiene comparación con el observado en el MHC, un sistema multialélico codominante que contiene genes extremadamente polimorfos involucrados en el mecanismo de vigilancia inmunológica.

Las moléculas de clase I y II presentan un notable grado de polimorfismo en la región que codifica para el sitio de unión del péptido, el cual está relacionado a su función de procesar y presentar diferentes antígenos a los linfocitos T, determinando con ello la especificidad en la presentación del antígeno, independientemente de presentar otros polimorfismos en los sitios de interacción con el receptor de la célula T.

El polimorfismo de los genes HLA-A, -B y -C determina el repertorio de las especificidades del receptor expresados por los linfocitos T CD8 citotóxicos y la respuesta de las células NK. Como consecuencia también modula las interacciones en donde participan estas moléculas ⁵⁶.

En las moléculas clase I, la cadena α contiene dos dominios polimórficos, α_1 y α_2 , los cuales codifican para el sitio de unión del péptido. En las moléculas de clase II los dominios α_1 y β_1 son polimórficos. Dentro de este sitio el número de sustituciones nucleotídicas no sinónimas es mayor que el número de sustituciones sinónimas, demostrando que el polimorfismo es mantenido al menos por dos

componentes: uno que ha sido positivamente seleccionado cambiando la especificidad de la molécula para la presentación del antígeno y otro que es independiente de esta función ⁵⁶. La variación nucleotídica no sinónima da origen a diferentes aminoácidos que influyen directamente en la conformación del sitio de unión del péptido y permiten que diferentes péptidos puedan unirse y ser presentados a los linfocitos T.

El polimorfismo del MHC es generado principalmente por la selección positiva en relación con su función de presentar péptidos extraños a las células T. Dos análisis han revelado este proceso: el primero muestra una notable concordancia entre los residuos HLA que participan en el contacto directo entre el péptido y los receptores de la célula T y los residuos que muestran mayor variabilidad en la secuencia ^{57, 58}. La segunda evidencia proviene de un análisis de los tipos de cambio que distinguen alotipos: variación nucleotídica que resulta en el cambio de diferentes aminoácidos (no-sinónimos) o en cambios que no tiene efecto sobre la secuencia de aminoácidos (sinónimos). Existe un exceso de variaciones no-sinónimas en la región de unión del péptido de la molécula del HLA ⁵⁹. Esta diferencia es estadísticamente significativa, indicando que la selección ha actuado a favor de las variaciones no-sinónimas las cuales han originado diferentes linajes HLA, mientras la variación sinónima se ha mantenido sólo a través del desarrollo genético, produciendo un pequeño número de sitios variable sinónimos. El polimorfismo del loci HLA no está distribuido al azar a través de la secuencia, y la mayoría de las variaciones nucleotídicas codifican a una proteína diferente. Una explicación de tal evento es que la selección para la diversidad funcional ha jugado un papel importante en la evolución del sistema HLA. Los patógenos son probablemente factores selectivos moldeando esta diversidad ^{60, 61}.

El mantenimiento del polimorfismo HLA podría derivar del polimorfismo "trans-específico" que muchos loci exhiben; esto es, linajes alélicos polimórficos compartidos entre especies relacionadas, incluyendo humano y chimpancé ⁶².

1.5.1 Mecanismos de generación de nuevos alelos

Cada variante común de un gen polimórfico presente en la población se llama alelo. En el caso de genes polimórficos un individuo puede tener para un locus genético el mismo alelo o alelos diferentes. Las mutaciones, incluyendo sustituciones nucleotídicas, deleciones, inserciones y otros mecanismos como deleciones de más de un aminoácido y las secuencias palindrómicas pueden dar origen a nuevos alelos.

1.5.1.1 Conversión génica

Una característica del MHC que dio origen a su extenso polimorfismo, es la presencia de residuos y *motifs* compartidos entre loci de la misma especie, así como entre especies distantemente relacionadas, debido a la evolución independiente más que a la existencia de un ancestro común. La conversión génica implica la reposición de una porción de la secuencia de un gen por la de otro gen sin recombinación recíproca, siendo un mecanismo de mutación genética sin pérdida de función más eficaz que la mutación de punto. En este mecanismo se introduce varios cambios cada vez, y los aminoácidos necesarios para el mantenimiento de la estructura de la proteína permanecen inalterados si ambos genes implicados en la conversión codifican, en esas posiciones, aminoácidos idénticos.

En el caso del MHC clase I, no son posibles comparaciones genéticas similares por que los mamíferos de diferentes órdenes no comparten loci clase I ortólogos. En cambio la subregión DR y DQ del MHC clase II humano son ortólogas a las regiones E y A del ratón, respectivamente. Sin embargo, existe un

caso en la participación de loci clase Ib no-ortóloga de primates y roedores. Las moléculas HLA-E clase Ib de humanos y de otros primates antiguos (del viejo mundo) demuestran similitud en la región de unión del péptido a las moléculas del ratón clase Ib H2-Qa-1 ⁶².

1.5.1.2 Recombinación

Mientras que la mayoría del polimorfismo del MHC parece haber surgido por mutación de punto, un mecanismo molecular alternativo que participa en la diversificación es la recombinación. La recombinación genera nuevos alelos a partir de dos alelos ancestrales sin la introducción de nuevas bases. La recombinación del gene puede ser alélica (intralocus) y no alélica (interlocus), participando un segmento corto del DNA ⁶³.

1.5.1.2.1 Recombinación interalélica (intralocus)

La recombinación interalélica (recíproca) se lleva a cabo cuando la secuencia nucleotídica de un alelo se ensambla en un segmento con una secuencia muy similar a otro alelo, posteriormente se realiza el intercambio de las secuencias de dichos alelos. El punto donde se realiza el cambio se conoce como *crossing-over*. En la mayoría de estas recombinaciones participan segmentos cortos internos, indicando que el mecanismo es semejante a la doble recombinación. Un ejemplo de este procedimiento es el alelo HLA-A*6901 el cual deriva de HLA-A*6801 y HLA-A*0201 ⁶⁴.

1.5.1.2.2 Recombinación interlocus

Es el mecanismo de recombinación en donde participa el cambio de secuencias entre diferentes loci. No es tan frecuente como la recombinación interalélica. El alelo B*4601 es el producto de la conversión entre B*1501 y CW*0102, B*1512 es la conversión entre B*1501 y A*24 ⁵⁶.

El cambio genético entre alelos del mismo locus ha sido un mecanismo más importante en la generación de la diversidad de HLA-A, B y C que el cambio genético entre alelos de diferente loci ⁶⁵. Estudios por Zangenberg ⁶⁶ demostraron que la conversión de genes ocurre en una extremadamente alta frecuencia en el locus clase II DPB.

1.5.1.3 Mutación de punto.

Los alelos generados por este mecanismo difieren en una sola substitución nucleotídica, dando origen a substituciones sinónimas o no sinónimas.

Es poca la probabilidad que las mismas mutaciones ocurran en poblaciones diferentes, aunque la selección favorecería ciertas mutaciones.

En base a estudios de secuencia nucleotídica actualmente se ha identificado un extenso polimorfismo en clase I que incluye 124 alelos HLA-A, 258 HLA-B, 74 HLA-Cw , 5 HLA-E y 14 HLA-G, reconocidos por el Comité de Nomenclatura WHO. En cuanto a los alelos de clase II se han identificado, hasta diciembre de 1998, 221 alelos HLA-DRB1, 19 HLA-DRB3, 9 HLA-DRB4, 14 HLA-DRB5, 3 HLA-DRB6 y 2 HLA-DRB7; 19 alelos HLA-DQA1 y 39 HLA-DQB1; 15 alelos HLA-DPA1 y 84 HLA-DPB1 y 9 HLA-DM (4 DMA, 5 DMB) ⁶⁷.

Por muchos años se ha resaltado el papel de los antígenos determinados serológicamente para evaluar la compatibilidad entre donador y receptor en trasplante de órganos, ahora resulta imperativo evaluar la participación de las especificidades determinadas molecularmente en la aceptación o rechazo de aloinjertos.

1.6 Nomenclatura del Sistema HLA.

La estandarización de la nomenclatura de los genes HLA y alelos es llevada a cabo por el Comité de Nomenclatura de la Organización Mundial de la Salud (WHO) para los factores del sistema HLA, constituido en 1984 (S. Marsh, comunicación personal).

Los primeros antígenos nombrados fueron determinados serológicamente y se identificaron con el prefijo HLA seguido del nombre del locus al cual pertenecen y el número asignado por el comité de nomenclatura (i.e. HLA-A1, -B7, -DR3, etc.). Sin embargo, con el advenimiento de la determinación molecular del HLA el nivel de identificación fue aumentando su complejidad, debido al uso de técnicas moleculares cada vez más avanzadas. Inicialmente, los alelos determinados a nivel molecular también se identificaron con el prefijo HLA seguidos del locus del cual derivan, un asterisco el cual es un separador entre el nombre del locus y la designación del alelo y un número de cuatro dígitos. Los dos primeros identifican su relación con el antígeno determinado serológicamente y los dos siguientes el subtipo específico asignado por el comité de nomenclatura (i.e. HLA-A*0101). El continuo descubrimiento de nuevos alelos secuenciados aumentó la dificultad de mantener la relación entre la secuencia y el perfil serológico del antígeno para asignar el nombre del alelo. Por este motivo, se vio la necesidad de aumentar un quinto dígito el cual fue introducido en 1990. Este número toma en cuenta los alelos que difieren únicamente en sustituciones silenciosas (sinónimos), no codificantes dentro de los exones de un alelo. Otros dos dígitos fueron adicionados en 1995 en el reporte de Nomenclatura ⁶⁸. La introducción de estos dígitos ha permitido nombrar alelos los cuales tienen variación fuera de las regiones expresadas de la secuencia, así como polimorfismo dentro de los intrones y las secuencias 5' o 3' que flanquean. Otros caracteres opcionales también fueron introducidos en 1995, como es el caso de la letra "N". Así una "N" siguiendo una secuencia nombrada indica que el alelo no es expresado, llamado alelo nulo ⁶⁸.

Una "L" fue introducida en el reporte de 1996, indicando que el alelo secuenciado tiene una mutación la cual reduce el nivel de expresión de un alelo, a un nivel significativamente bajo del normal⁶⁹⁻⁷¹. Es de hacerse notar que en esta clasificación se incluyen gran cantidad de alelos pertenecientes a genes no clásicos y pseudogenes sólo identificables por tecnología molecular.

Alorreconocimiento

Los tejidos u órganos trasplantados son rechazados si provienen de un donador que expresa moléculas MHC diferentes a las del receptor. Los injertos pueden ser rechazados aún cuando las moléculas del MHC difieran en un solo aminoácido⁷². Esta rápida y muy potente respuesta inmune celular resulta de la presencia de un gran número de células T en cualquier individuo que son reactivas a moléculas alogénicas del MHC. Los estudios sobre la respuesta de las células T contra moléculas alogénicas MHC, usando el cultivo mixto de linfocitos, han demostrado que del 1-10% de las células T en un individuo responderán a la estimulación a células provenientes de cualquier individuo alogénico⁷³. Este tipo de la respuesta de las células T es llamado alorreactividad, debido a la presencia del reconocimiento del polimorfismo alélico en moléculas del MHC alogénicas⁷⁴⁻⁷⁶.

Antes de que la función de las moléculas del MHC en la presentación del antígeno fuera entendida, era un misterio el porqué muchas células T reconocían moléculas del MHC no propias. Ahora se conoce que esta alorreactividad refleja reactividad cruzada de los receptores de la célula T (TCR) normalmente específicos contra una variedad de péptidos extraños unidos a moléculas propias del MHC⁷⁷⁻⁷⁹. Esta reactividad cruzada resulta, en parte, de los múltiples péptidos unidos a moléculas no propias sobre los tejidos trasplantados, y no a moléculas MHC propias del huésped, complejos a los cuales las células T del huésped no son tolerantes^{76, 80, 81}. Otras células T alorreactivas responden mediante la unión

directa del TCR propio a distintas presentaciones de la molécula MHC no propia ⁷⁵. En el alorreconocimiento indirecto, el péptido unido a moléculas MHC no propias interactúan fuertemente con el TCR normalmente específico para una molécula del MHC propia a la cual se unen diferentes péptidos antigénicos ⁸². En el alorreconocimiento directo, el reconocimiento es independiente del tipo del péptido unido. El TCR se une a moléculas MHC no propias generando una fuerte señal debido a la alta concentración de moléculas MHC no propias sobre la superficie de la célula presentadora. Ambos mecanismos contribuyen a la alta frecuencia de las células T que responden a moléculas MHC no propias sobre el tejido transplantado, lo cual refleja claramente la función del linfocito T en el reconocimiento de las moléculas MHC en general ⁸³.

CAPÍTULO 2

HLA Y ENFERMEDAD

El sistema HLA es el sistema más complejo y polimórfico conocido en el hombre. Además de su reconocida importancia en la aceptación y rechazo de aloinjertos se ha demostrado que el sistema HLA juega un papel importante en la susceptibilidad a varias enfermedades, particularmente aquellas con una base inmunológica o autoinmune. Lilly en 1964 fue el primero en descubrir que el MHC (H-2) del ratón contiene los genes que confieren resistencia al virus de la leucemia murina de Gross (Rgv-1), posteriormente McDevitt, Sela y Benacerraf demostraron en el ratón y en el cobayo que la respuesta inmune estaba genéticamente controlada ⁸⁴.

El primer reporte de asociación entre el sistema HLA y una enfermedad en humanos, fue presentado por Amiel en 1967 durante el tercer *International Histocompatibility Workshop* (IHW) en Turin. Su estudio reveló un aumento débil en la frecuencia del antígeno HLA "4C" (ahora HLA-B5, -B35, -B18) en pacientes con enfermedad de Hodgkin (51%) al compararse con la frecuencia obtenida en testigos sanos (27%) ⁸⁵. Sin embargo, fueron los estudios de Brewerton y Schlosstein en 1973, que revelaron una fuerte asociación entre la espondilitis anquilosante y el antígeno HLA-B27 (clase I), los que iniciaron una avalancha de estudios de asociación entre el sistema de HLA y la susceptibilidad a varios cientos de enfermedades ⁸⁴. Desde entonces, diferentes estudios han demostrado que la asociación del sistema HLA y enfermedad es más fuerte con los antígenos de clase II (principalmente DR), aunque el descubrimiento de otros polimorfismos HLA clase II (DQ y DP), y de otros genes en esta región

genética (TAP y LMP) han hecho necesario investigar su posible participación como genes de susceptibilidad 86, 87.

Las enfermedades asociadas al sistema HLA generalmente son de etiología desconocida, tienen tendencia a la cronicidad y presentan alteración de procesos inmunológicos, además de que pueden presentar un agrupamiento familiar y afectar a más de un caso entre consanguíneos. Dichas enfermedades se han clasificado en dos formas. La primera clasificación se basa en los mecanismos de patogénesis e incluye: a) enfermedades de etiología autoinmune (artritis reumatoide, diabetes mellitus insulino-dependiente, espondilitis anquilosante, etc.), b) enfermedades de etiología no autoinmune (deficiencia de la 21-hidroxilasa) y c) enfermedades de etiología desconocida (narcolepsia). La segunda clasificación se basa en las características de los antígenos HLA responsables de la asociación e incluye: a) enfermedades asociadas con antígenos clase I (principalmente las espondiloartropatías asociadas a HLA-B27), b) enfermedades asociadas con antígenos clase II (principalmente HLA-DR) que incluyen enfermedades de origen autoinmune como el lupus eritematoso, y c) enfermedades asociadas con antígenos clase III que incluyen las deficiencias de C2, C4 y 21-OH 88, 89.

2.1 Mecanismos de asociación

A la fecha se han propuesto varias hipótesis que intentan explicar los mecanismos de asociación entre HLA y enfermedad:

2.1.1 Mimetismo molecular entre antígenos HLA y antígenos de los agentes infecciosos

Ebringer en 1979 encontró que la *Klebsiella sp.* estaba presente en pacientes con espondilitis anquilosante. Posteriormente, Seager descubrió que los anticuerpos dirigidos contra algunas cepas de *Klebsiella sp.* reaccionan sólo con los linfocitos de los pacientes que tuvieran HLA-B27 y espondilitis anquilosante, demostrando con ello la existencia de determinantes antigénicos comunes entre el HLA-B27 y algunas cepas de *Klebsiella sp.* En base a estos resultados es posible explicar la susceptibilidad como debida a una reacción cruzada entre organismos infecciosos y un determinado antígeno del sistema HLA 89, 90.

2.1.2 Modificación de la estructura de los antígenos HLA

Una infección o un agente químico pueden afectar la capacidad del individuo de producir una respuesta inmune. Estos mismos agentes pueden producir alteraciones en las moléculas HLA, detectables por el sistema inmune, y producir una respuesta autoinmune capaz de generar una enfermedad. Esta hipótesis propone que el agente que causa la enfermedad altera moléculas que son constituyentes normales del individuo y las transforma en blancos de una respuesta autoinmune 90.

2.1.3 Antígenos HLA como receptores

Los antígenos HLA pueden actuar como receptores de agentes infecciosos o de sus productos antigénicos, en esta forma, la presencia de las moléculas HLA sobre la célula blanco se considera como un pre-requisito para la penetración del patógeno a nivel celular y para el desarrollo de la enfermedad.

2.1.4 Deficiencias en la respuesta inmune

Los antígenos del sistema HLA participan en la regulación de la respuesta inmune, por lo tanto, cualquier trastorno que se manifieste como aumento o defecto en la respuesta inmune podría implicar a los antígenos HLA y explicar su participación en la predisposición genética a la enfermedad ³⁴.

2.1.5 Deficiencias de los antígenos HLA clase III

Las deficiencias de antígenos clase III, solas o en desequilibrio génico con otro antígeno HLA, pueden asociarse con la susceptibilidad a algunas enfermedades, por ejemplo: la deficiencia del factor C2 del complemento se ha encontrado asociada con DR3 en el lupus eritematoso sistémico, y el defecto en el gen CYP21 de la 21-hidroxilasa se ha asociado con HLA-B47 en la hiperplasia adrenal congénita ⁸⁵.

2.1.6 Falla en la selección

Existe la posibilidad que las moléculas HLA asociadas con la enfermedad participen en la selección de las células T, con un receptor (TCR) particular, durante la selección positiva o negativa en el timo. La selección de linfocitos T auto-reactivos o moléculas deficientes en la presentación de péptidos antigénicos pueden contribuir en la patogénesis de la enfermedad. Dependiendo de los péptidos presentados por las moléculas HLA se originará una respuesta inmune protectora o una deficiencia en la respuesta inmune que pudiera favorecer el desarrollo de una enfermedad ⁸⁵.

2.2 Enfermedades autoinmunes

La presión selectiva, en los vertebrados y en particular en el hombre, ha favorecido el desarrollo de un sistema inmune capaz de reconocer y eliminar agentes infecciosos y ambientales, con riesgo mínimo para

los tejidos propios y con la consecuente selección de los individuos. La autoinmunidad, presencia de linfocitos T o B autorreactivos, aunque puede ser una parte normal y necesaria de la red de regulación inmune, puede también constituir un desorden multifactorial, favorecido por factores genéticos (HLA y otros) y ambientales, capaz producir una enfermedad autoinmune desfavorable para la supervivencia⁹⁰.

2.2.1 Bases genéticas de las enfermedades autoinmunes

La evidencia de factores genéticos involucrados en la etiología de las enfermedades autoinmunes incluye: aumento en la prevalencia e incidencia de enfermedades autoinmunes específicas en ciertas familias y en ciertos grupos étnicos; mayor frecuencia de enfermedades autoinmunes en gemelos monocigotos que en dicigotos y mayor frecuencia en dicigotos que en familiares más lejanos; asociación fuerte de enfermedades autoinmunes con genes específicos o sus productos, y modelos animales en los cuales ocurre transmisión autosómica dominante espontánea de las enfermedades autoinmunes. Estos hechos apoyan al concepto de que las enfermedades autoinmunes son desordenes multifactoriales que resultan de la interacción de 4-10 genes y uno o más factores ambientales.

No se conocen con claridad los mecanismos por los cuales los factores genéticos de riesgo causan enfermedades autoinmunes, sin embargo se ha sugerido que los genes de susceptibilidad codifican productos que procesan y enlazan autoantígenos blanco con alta afinidad; que los productos de genes de enfermedades autoinmunes son incapaces de eliminar patógenos exógenos específicos que estimulan una respuesta inmune crónica, y que los agentes ambientales inducen blancos inmunes en lo propio debido a estructuras compartidas. No obstante, la genética de las enfermedades autoinmunes aún es pobremente entendida, posiblemente debido a la etiología multifactorial de las enfermedades autoinmunes⁹⁰.

Otro mecanismo involucrado en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes es la existencia de células T y B potencialmente autorreactivas en el repertorio de los linfocitos T, debido a que no todas las células T con TCR a antígenos propios son eliminadas durante la selección negativa en el timo, así que otros mecanismos son necesarios para controlar a las células autorreactivas que han escapado a la selección negativa. Entre estos mecanismos se puede incluir la inducción de anergia, mediante la cual las células T ignoran a los antígenos propios. Sin embargo, estas células T pueden ser activadas por exposición a un reto antigénico proveniente de infección, con la consecuente llegada de un agente extrínseco a un órgano blanco o la liberación excesiva de antígenos propios en ganglios linfáticos regionales. Además las células T autorreactivas pueden ser activadas por mimetismo molecular en donde un determinante inmunogénico de un antígeno exógeno es estructuralmente similar a un determinante propio ⁸⁵.

2.3 Métodos de estudio

Existen dos métodos de estudio principales para investigar la relación entre HLA y enfermedad:

2.3.1 Estudios de población abierta

La mayoría de los estudios de asociación entre HLA y enfermedad son estudios de población abierta, en los cuales se comparan las frecuencias antigénicas HLA obtenidas en pacientes y testigos. Ambos grupos deben de estar integrados por individuos pertenecientes al mismo grupo étnico, no consanguíneos y del mismo rango de edad, nivel socioeconómico y sexo.

2.3.2 Estudios familiares

Los estudios familiares investigan la participación de un gen de susceptibilidad que se hereda dentro de la familia ligado a un haplotipo HLA. Los estudios familiares aunque son más informativos y permiten relacionar una enfermedad tanto con genes del sistema HLA como con genes no-HLA, en desequilibrio de enlace con genes HLA, generalmente son más difíciles de efectuar y sólo se realizan una vez que se ha encontrado una asociación por estudios de población abierta.

Resulta esencial en estos estudios establecer con exactitud los criterios de inclusión y exclusión de pacientes y testigos. La prevalencia de la enfermedad usualmente determina el número de pacientes incluidos en el estudio. Para enfermedades comunes las muestras pueden obtenerse rápidamente, en enfermedades más raras resulta necesario incluir pacientes de diferentes regiones. Como regla general al menos 50 pacientes deben de ser incluidos en un estudio, sin embargo, el número puede ser menor para enfermedades raras, particularmente si presentan una fuerte asociación con un antígeno HLA y si existe la posibilidad de efectuar estudios familiares que suelen ser más informativos.

2.4 Desequilibrio de enlace y asociación con marcadores genéticos

Dos enfoques principales permiten identificar los genes que distinguen una enfermedad humana. El primero se basa en el análisis del desequilibrio de enlace (*linkage disequilibrium*) cuyo objetivo es estudiar un conjunto de loci polimórficos sin una razón para considerarlos relacionados a la enfermedad, pero que pueden exhibir una cosegregación familiar con los alelos predisponentes a esta. El desequilibrio de enlace es una relación genética bien definida entre dos loci. Se dice que dos loci están enlazados, uno el locus marcador y otro el locus de la enfermedad, si ellos se encuentran localizados en

el mismo cromosoma y lo suficientemente cercanos para que no segreguen independientemente durante la formación de gametos. Un marcador y una enfermedad están asociados si sus fenotipos aparecen juntos en la población con una frecuencia mayor a la esperada por el azar, independientemente de que se encuentren ubicados en el mismo o diferente haplotipo. Por lo general, los estudios de *linkage* pueden ser realizados usando métodos paramétricos (i.e. *lod score*) o no paramétricos (método de alelos compartidos, i.e. *Sib-pair method*). Los métodos paramétricos requieren que los individuos incluidos sean clasificados sin ambigüedad como afectados o no afectados, que se tenga conocimiento de la forma de herencia de los genes, su frecuencia, la penetrancia de los genotipos relacionados con la enfermedad, y sobre todo de la clasificación sin ambigüedad entre afectados y no afectados, todo lo cual resulta difícil de especificar para algunas enfermedades. El método no paramétrico de estudio de pares de hermanos es un método de análisis de *linkage* libre de modelos que tiende a ser más eficaz en los modelos genéticos ^{91, 92}.

El segundo es el análisis de asociación cuyo objetivo es investigar la relación entre un locus marcador y una característica fenotípica de la población. Los estudios de asociación incluyen la comparación de frecuencias de alelos o genotipos entre casos y controles, análisis de varianza de un fenotipo en relación a los genotipos del locus marcador, y análisis de varianza entre portadores vs no portadores de un alelo dado. Tres factores pueden dar origen a una asociación entre un locus marcador y una condición fenotípica en la población: 1) el alelo del locus marcador es realmente el alelo causante del efecto fenotípico, 2) el desequilibrio entre el alelo marcador y el verdadero alelo causal en loci cercanos, y 3) un artefacto debido a la mezcla de la población en la cual el carácter fenotípico se presenta a una frecuencia mayor en un grupo étnico particular. En ambos enfoques, los loci estudiados marcan los genes de la enfermedad o su posición aproximada en el cromosoma ⁹³.

2.5 Evaluación estadística de la asociación

El método más simple y más eficiente para estudiar la asociación entre una enfermedad y un locus marcador es el de construir una tabla de 2×2 . En este se asume la existencia de dos grupos tomados al azar, uno con enfermedad y el otro un control negativo a dicha enfermedad, cada grupo formado por individuos clasificados por tener un alelo marcador o no. Sin embargo, la asociación de una enfermedad con un marcador genético perteneciente a un sistema altamente polimórfico como el sistema HLA, requiere del análisis de un gran número de especificidades antigénicas, lo cual puede originar asociaciones significativas al azar, por este motivo Svejgaard sugirió reducir el número de inferencias incorrectas mediante la corrección de Bonferoni que consiste en multiplicar el nivel de significancia (p), obtenido por X^2 o mediante p exacta de Fisher, por el número de antígenos evaluados (pc)^{94, 95}.

Se recomienda adicionalmente, determinar la fuerza de la asociación del marcador con la enfermedad calculando el riesgo relativo (RR) y el riesgo relativo combinado de acuerdo a Svejgaard & Ryder⁹⁶, y los valores de la fuerza de asociación delta (δ) de acuerdo a Bengtsson & Thomson⁹⁷ y la relación de momios (OR) para evitar la complicación cuando una de las entradas en la tabla es igual a cero. Si RR es mayor de uno corresponde a una asociación positiva, entre el marcador genético y la enfermedad. Si RR es menor de uno corresponde a una asociación negativa. La frecuencia de gene se calcula mediante la fórmula $p = 1 - t - A$, donde A denota la frecuencia de antígeno y p la frecuencia de gene⁹⁸.

CAPÍTULO 3

TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA

En los últimos 30 años, el trasplante de órganos ha cambiado de ser un procedimiento experimental hasta transformarse en un elemento importante de la práctica clínica rutinaria. Alrededor de 416000 riñones, 46300 corazones y 62500 hígados fueron injertados hasta fines de 1997 en el mundo ^{99, 100}. Este cambio es el reflejo del incremento en la sobrevida del injerto, considerado inicialmente de días a semanas hasta años o décadas en la época actual, con el consecuente beneficio para el paciente. El notable incremento en la sobrevida de los injertos se debe tanto al mejor manejo inmunosupresor del paciente como al mayor conocimiento de los mecanismos inmunológicos asociados con la aceptación y rechazo de injertos ¹⁰¹.

El trasplante de médula ósea (TMO) es ahora aceptado como el tratamiento de elección para muchas enfermedades hematológicas. El primer TMO con éxito se realizó hace 30 años en niños con inmunodeficiencia congénita ^{102, 103}, desde entonces su uso se ha extendido al tratamiento de leucemias, linfomas y anemias aplásticas ^{102, 104-106}, como terapia de rescate posradiación y quimioterapia en enfermedades malignas; y como terapia en desordenes genéticos como inmunodeficiencia combinada, talasemia y anemia de células falciformes. Su utilización terapéutica en otras enfermedades, como el cáncer metastásico de mama y ciertas enfermedades autoinmunes ¹⁰⁷ está siendo explorada recientemente.

El uso clínico del trasplante de médula ósea ha aumentado en años recientes. La mayor supervivencia de los receptores se debe en parte a los avances en el análisis de la histocompatibilidad, y al desarrollo de métodos más efectivos para el tratamiento de la enfermedad injerto contra huésped (GvHD) y de las infecciones virales que plagaron los primeros injertos ¹⁰⁸.

3.1 Selección del donador

El objetivo primario de la tipificación es la selección del donador y receptor más compatibles (Tabla 3.1). Desde este punto de vista el mejor donador sería el propio receptor del injerto (trasplante autólogo) donde la GvHD no ocurre, o un gemelo idéntico (monocigoto) compatible en antígenos HLA y en antígenos menores de histocompatibilidad (mH) (trasplante singénico), el cual tendría menor riesgo (15-50%) de rechazar el injerto o de inducir una GvHD, sin embargo esta selección pudiera ser una desventaja en pacientes leucémicos debido al mayor riesgo de recurrencia de la enfermedad a causa de infundir una clona tumoral, e independientemente de que sólo el 30% de los pacientes que requieren un trasplante tendría un hermano HLA genotípicamente idéntico.

A pesar de que el TMO entre gemelos monocigotos es más exitoso que el trasplante entre hermanos HLA genotípicamente idénticos, el riesgo de recurrencia de la enfermedad en el último grupo ha llevado a diferentes grupos de trasplante a explorar el uso de miembros familiares con identidad parcial del HLA y de donadores voluntarios no relacionados fenotípicamente idénticos en antígenos del HLA con el receptor (todos estos trasplante alogénico) ^{109, 110}. El uso de hermanos HLA fenotípicamente idénticos, en seis antígenos (HLA-A, -B, -DR), como donadores es más frecuente debido a su posible incompatibilidad parcial en antígenos mH, lo cual pudiera ser ventajoso al promover un efecto injerto

contra leucemia (GvL) ¹¹¹, aunque este efecto puede ocurrir en el TMO de donadores HLA fenotípicamente idénticos no relacionados. Sin embargo, estudios han demostrado que los trasplantes de donadores no relacionados tienen mayor riesgo de morbilidad y mortalidad que los trasplantes de donadores relacionados, fundamentalmente al mayor riesgo (65%) de desarrollar GvHD, al aumento en la susceptibilidad a infecciones, y a la falla del injerto alogénico trasplantado ¹¹².

Tabla 3.1
Donadores potenciales de Médula

| Trasplante | Donador |
|------------|--------------------------------------|
| Autólogo | Médula del propio paciente |
| Singénico | Gemelo monocigoto |
| Alogénico | Hermano HLA genotípicamente idéntico |
| | Donador HLA fenotípicamente idéntico |
| | - Hermano |
| | - Padres |
| | - Otro miembro de la familia |
| Xenogénico | - Donador voluntario no relacionado |
| | Donador HLA no idéntico |
| | - Miembro de la familia |
| | - Donador voluntario no relacionado |
| Xenogénico | Donador de diferente especie |

El efecto de la identidad HLA en la sobrevida de trasplantes provenientes de donadores no relacionados ha sido controversial ^{113, 114}, dado que numerosos factores pudieran afectar los resultados, como la existencia de diferencias en antígenos HLA clases I y II no identificadas a causa de la baja resolución de las técnicas de tipificación usadas ^{115, 116}. Debido a limitaciones metodológicas, la selección de donadores voluntarios ha recaído principalmente en la tipificación de los loci HLA-A, -B y -DR ¹¹⁷, ¹¹⁸, por lo cual, la influencia de incompatibilidad en otros HLA loci tales como HLA-DQ y -DP, de la no-identificación de los antígenos mH en el trasplante y otros factores no HLA no han sido evaluados suficientemente. Más aún, aunque anteriormente HLA-Cw no fue considerado importante, algunos

grupos han observado la participación de este antígeno recientemente como otro factor asociado al rechazo de injertos ¹¹⁸⁻¹²¹. Petersdorf ha observado que las diferencias en antígenos HLA clase I predisponen la falla del injerto y que las diferencias en clase II (DR y DQ) aumentan la incidencia de GvHD ¹²¹. Debido a la poca disposición de donadores relacionados, el uso de donadores no relacionados compatibles en seis antígenos es cada vez más frecuente, sin embargo, su uso requiere del acceso a bancos de médula ósea a nivel local o internacional.

3.2 Falla del Trasplante de Médula Ósea

La falla del TMO se ha definido como la incapacidad para recuperar la función de la médula postrasplante o como la recurrencia de la aplasia medular después de una reconstitución hematológica inicial. La mayoría de las veces la falla ocurre en los primeros 50 días, aunque puede ocurrir varios meses postrasplante. La falla del injerto proveniente de donadores no idénticos en HLA puede ocurrir entre 6-28% de los casos dependiendo del grado de incompatibilidad en antígenos HLA ¹²². Por otra parte, la historia transfusional del receptor, la infección por citomegalovirus del donador, el tipo de desorden hematológico o genético, el estado de la enfermedad al tiempo del trasplante, la condición pretrasplante del receptor, la profilaxis inmunosupresiva, y en particular si la médula del donador fue eliminada o no de las células T maduras, han resultado ser de gran importancia clínica¹¹². Así, los factores antes mencionados hacen al injerto más susceptible al rechazo (10-30%) cuando se usan donadores HLA idénticos y 40-50% cuando se usan injertos incompatibles ¹²³⁻¹²⁵.

Las células T CD3+, CD8+ y CD56- específicas contra antígenos del donador han sido implicadas directamente en el rechazo del TMO alogénico a través de la perforina, una proteína destructora de

membrana, estructural y funcionalmente similar al complejo de ataque (C5b-C9) del complemento o por lisis no-específica secundaria a la producción de factores citotóxicos $TNF\alpha$, $IFN\alpha$, $IFN\beta$, $IL1\alpha$, $IL1\beta$ e $IL6$, metabolitos de oxígeno, factores activadores de plaquetas y enzimas. Así, más del 80% de los pacientes que reciben TMO de un hermano compatible muestran un amplio espectro de GvHD que varía desde ausencia total a una enfermedad severa y fatal ¹²⁶.

3.3 Enfermedad injerto contra huésped (GvHD)

A pesar de los avances en la identificación de los antígenos de histocompatibilidad y las drogas inmunosupresoras, existen dos problemas principales cuando se realiza un trasplante hematopoyético. Primero, las células progenitoras hematopoyéticas trasplantadas pueden fallar en reconstituir exitosamente la hematopoyesis del receptor (falla del injerto debido a mecanismos inmunológicos u otros). Segundo, los linfocitos del donador pueden atacar el tejido del receptor desarrollando GvHD. De estos dos factores, la GvHD continúa siendo el problema más frecuente seguido de complicación letal posTMO. La GvHD no ocurre exclusivamente después de este tipo de trasplante, dado que puede manifestarse después del trasplante de órganos sólidos y postransfusión sanguínea. GvHD acontece como consecuencia del reconocimiento, por parte del donador, de los antígenos del HLA y de los antígenos menores de histocompatibilidad (mH) del receptor. El mecanismo inverso, en donde las células del huésped son inmunológicamente competentes y reconocen a los antígenos del donador da inicio a las manifestaciones clínicas de la reacción huésped contra injerto (HvG), lo cual resulta en rechazo del injerto ¹²⁷.

La GvHD es un proceso patofisiológico que ocurre cuando linfocitos T genéticamente diferentes son transferidos a un receptor inmunológicamente comprometido incapaz de rechazar el injerto donado, el cual culmina con una disfunción y destrucción multiorgánica. A pesar de que se ha demostrado que la remoción ex vivo de células T maduras del donador previo a la infusión in vivo puede disminuir considerablemente la incidencia de GvHD, su práctica puede conducir a resultados adversos tales como la mayor incidencia de rechazo, recurrencia de la leucemia y retardo en la reconstitución inmune debido a la falta de interacción de las células B y T. El reconocimiento de las diferencias HLA clase I, clase II y en antígenos mH del receptor presentadas en el contexto de sus moléculas HLA resulta en la activación de los linfocitos T maduros del donador, con la consecuente expansión clonal, expresión de receptores para la interleucina 2 (IL-2) y la secreción de citocinas IFN γ , TNF α , IL 2, IL 3, IL 4, IL 5, IL 6 y IL 9, y otros factores como el factor de estimulación de colonias macrófago-granulocito (GM-CSF) 38, 128. Las citocinas juegan un papel principal en todas las fases de la GvHD. Sin embargo, existe controversia en el papel que juegan las citocinas tipo Th1 (IL-2 e IFN γ) y de tipo Th2 (IL-4, IL-10). Se ha propuesto que las citocinas Th1 son críticas para la inducción de GvHD y que las de tipo Th2 son supresoras, aunque existen datos opuestos en los que se atribuye un papel protector a las citocinas tipo Th1 (IL-12, IL-2, IFN γ). Al parecer las citocinas juegan un papel dual complejo en la GvHD dependiente del tipo del régimen de acondicionamiento del receptor (irradiación corporal total o agentes quimioterapéuticos) 129. En la reacción restringida por MHC los linfocitos cooperadores CD4+ interactúan con antígenos DR vía su receptor (TCR), en tanto que los linfocitos T citotóxicos reconocen moléculas HLA-ABC 38.

La GvHD puede desarrollarse en forma aguda o crónica. La GvHD aguda se manifiesta dentro de los primeros días (20 a 100) o semanas postrasplante y los rangos de incidencia van desde menos del 10%

hasta el 80% dependiendo del grado de histocompatibilidad, el número de células T en el injerto, la alosensibilización del donador, la edad del paciente, el régimen condicional y el régimen profiláctico para GvHD ¹²⁹. La enfermedad GvH aguda no solamente resulta en un síndrome inmediato inflamatorio multiorgánico que afecta la piel, hígado y tracto digestivo, sino que también produce una inmunodeficiencia de largo término y un aumento de la frecuencia de la GvHD crónica. Por su parte, la GvHD crónica se ha definido como un síndrome que se presenta alrededor de los tres meses postrasplante después un intervalo libre de la enfermedad (periodo inactivo), ya sea como una extensión de la GvHD aguda (periodo progresivo), o sin ningún antecedente de la GvHD. Cualquier grado de GvHD aguda aumenta la probabilidad de la GvHD crónica, sobre todo los rangos de incidencia desde el 30% al 60%. En la GvHD los pacientes son altamente susceptibles a infecciones bacterianas, virales, fúngicas e infecciones oportunistas ¹²⁷.

Dos procedimientos se han empleado para la prevención de GvHD, uno incluye la depleción de las células T y el otro la inmunosupresión profiláctica. Sin embargo, los intentos iniciales para prevenir la GvHD a través de la depleción de las células T resultan en un aumento de la falla del injerto y aumento en la recaída del paciente con leucemia. Algunos investigadores argumentan que la falla del injerto es causada por la inmunosupresión insuficiente del receptor. El manejo de la recaída del paciente después del TMO es difícil, desde el punto de vista que las drogas citotóxicas o el interferón- α no son curativas y un segundo TMO esta asociado considerablemente con mayor morbilidad y la mortalidad ¹²⁹.

La incidencia de GvHD puede ser reducida con la identificación cuidadosa de los antígenos HLA y mH entre el donador y el receptor, en tanto que sea posible obtener sobrevida del injerto y del paciente libre de GvHD. Sin embargo, no siempre es posible predecir el éxito del TMO en los casos con tipificación

idéntica, ya que las reacciones GvHD pueden ocurrir entre individuos genéticamente idénticos (gemelos monocigotos) o aun después de la infusión de células progenitoras hematopoyéticas autólogas.

3.4 Otros trasplantes

Los trasplantes de otros órganos (riñón, corazón e hígado) se han realizado con más éxito que el TMO, siendo el trasplante de riñón el más común. El éxito del trasplante se debe principalmente al uso frecuente de drogas inmunosupresoras como la ciclosporina A y tacrolaminas ¹³⁰.

Los estudios de sobrevida muestran tasas cercanas al 100% a 3 años para trasplante renal de hermanos HLA idénticos. Las cifras para injertos incompatibles son más bajas (80%). Esta diferencia (100% vs 80%) puede ser una estimación del efecto de la compatibilidad en HLA en los primeros injertos renales ^{131, 132}. La probabilidad de encontrar un órgano HLA idéntico proveniente de un donador cadavérico es baja, por tal motivo los trasplantes con donador cadavérico HLA idénticos sólo se efectúan en un número reducido de casos. Los estudios colaborativos de Opelz en 1991 y Terasaki en 1990 mostraron un efecto benéfico de la compatibilidad HLA en la sobrevida de injertos con donador cadavérico. En una serie de 7,049 injertos, 133 fueron compatibles en 6 antígenos (HLA-A, -B, -DR) mostrando una frecuencia de sobrevida a un año de 91%, comparada con 76% para toda la serie ^{100, 133, 134}.

3.5 Antígenos menores de histocompatibilidad (antígenos mH)

El TMO ideal ocurre cuando la médula ósea del donador y del receptor son genéticamente idénticas. No obstante, los resultados clínicos del TMO revelan que la selección de donadores idénticos en el

sistema HLA no evita el desarrollo de GvHD o la recaída de la leucemia en el TMO alogénico. La participación de los antígenos mH como las blanco en la GvHD ha sido reconocida, principalmente, por sus efectos clínicos in vivo en TMO entre parejas de donador-receptor HLA idénticas, y por el requerimiento de inmunosupresión para evitar el rechazo de órganos vascularizados trasplantados entre las parejas HLA idénticas 135, 136.

Los primeros experimentos de injertos de piel y tumor realizados in vivo por George Snell y Bailey 137, 138 en murinos dieron inicio al estudio de los antígenos mH, estableciéndose que estos antígenos eran codificados por otros genes del locus H-2. La contraparte de los antígenos de trasplante no-MHC, existente en el humano fue establecida con claridad por los trasplantes clínicos. Los resultados han revelado la existencia de un gran número de genes mH autosómicos y en el cromosoma Y, y últimamente en el genoma mitocondrial 139, y han demostrado que los alelos del sistema HLA (clase I y II) son factores importantes en determinar una respuesta a estos antígenos de trasplante. El análisis in vitro de clones de células T aisladas de ratones y humanos que han desarrollado GvHD o HvG postrasplante de órganos o tejidos MHC (H2, HLA) idénticos están conduciendo a un mayor entendimiento de como participan las moléculas propias del sistema HLA 135, 140-142.

3.5.1 Identificación de los antígenos menores H y sus genes

La identificación a nivel molecular de los antígenos mH se ha desarrollado rápidamente. Dos estudios complementarios han sido usados: uno es el estudio bioquímico que permite identificar los péptidos eluidos de las moléculas HLA, mediante el uso de HPLC, los cuales posteriormente se usan en la sensibilización de células blanco que serán lisadas al ponerse en contacto con los linfocitos T citotóxicos específicos para dichos péptidos mH. La secuencia de los péptidos de la fracción positiva se determina

posteriormente y se compara con las secuencias de diferentes proteínas del banco de datos ^{139, 143}. El segundo es el estudio genético, a través de clonación, con la transfección genómica o fragmentos del DNAc y la identificación positiva de los transfectantes usando clonas de células T. El DNA transfectado se identifica como la secuencia mínima que confiere la expresión, seguido por la prueba de síntesis de péptidos candidatos. Este segundo método permite directamente la identificación del gene codificante del péptido polimorfo ^{144, 145}.

Los antígenos mH son péptidos procesados. Así cualquier proteína, independientemente, si es celular o asociada a membrana puede originar péptidos mH. La función fisiológica de los genes que codifican los antígenos mH en la mayoría de los casos es desconocida. Algunos de ellos, como los codificados por el genoma mitocondrial, son enzimas, otros que incluyen algunos genes HY, parecen ser factores de transcripción y algunos son genes de función desconocida. Su función como antígenos del trasplante difiere de su función fisiológica, por tal motivo presentan poco polimorfismo. En varios casos parece que las sustituciones de un péptido pueden realizar la diferenciación entre ellos y es suficiente para la activación de las células T. Existe evidencia de que el repertorio de las células T que responden a péptidos individuales de los antígenos mH es limitado ¹⁴⁶. Una consecuencia indirecta de las variaciones fenotípicas entre individuos de una especie puede ser la generación de péptidos propios que actúan como aloantígenos (mH).

Los genes murinos mitocondriales, NDI y COI, codifican los ags MTF α y MTF β , los cuales originan diferentes péptidos que son presentados por moléculas H-2M3. En la mayoría de los casos los aloantígenos surgen de cambios de un solo aminoácido dentro del péptido, origen de la variación alélica dentro de la secuencia del péptido ^{135, 141, 147}.

Los antígenos H-Y son codificados en el cromosoma Y, y han sido los más estudiados en el ratón, la rata y en el humano. Los diferentes péptidos antigénicos aislados provenientes de la proteína SMCY en el humano son presentados por moléculas HLA-B7 y HLA-A2. El antígeno HA-2, mH, en el humano ha sido asociado con GvHD en asociación con HLA-A2.1. Este antígeno es homólogo a la cadena pesada de la proteína de miosina, sin embargo, el gene que codifica este péptido aún no ha sido identificado. La expresión de los antígenos HA-1 y HA-5 también se encuentra limitada a células hematopoyéticas como HA-2. En cambio la expresión de HA-3 y HA-4 es más amplia ^{135, 141, 147, 148}. Como consecuencia, los linfocitos T CD4+ y T CD8+ son capaces de reconocer los antígenos mH cuando son presentados por las moléculas HLA.

CAPÍTULO 4

GENES RELACIONADOS CON LA CADENA I DEL MHC

MIC

4.1 Introducción

La inexplicable asociación de HLA-B27 con las espondiloartropatías seronegativas condujo a la búsqueda de nuevas secuencias codificadas cerca del locus HLA-B, en genotecas del DNAc obtenidas de diversos tejidos humanos. Recientemente, fue descubierta una nueva familia de genes polimórficos en la región I del sistema HLA llamada MIC (*MHC class I chain-related*, genes relacionados con la cadena del MHC clase I) conocida también como PERB11¹⁴⁹⁻¹⁵¹. Estos genes se encuentran en la mayoría de las especies de mamíferos estudiados a la fecha, por lo que se considera que debió de existir (durante la evolución de los genes de clase I) una diversificación temprana que originó a los genes MIC¹⁴⁹. Por lo tanto, los genes MIC son reconocidos actualmente como un segundo linaje del MHC clase I en mamíferos, los cuales, aunque no se encuentran en el genoma del ratón pudiera haber evolucionado a los antígenos no clásicos (Ib) H-2Q, M y T¹⁴⁹.

4.2 Genes

La familia MIC se encuentra ubicada a lo largo de las dos megabases de la región clase I del MHC. Esta nueva familia esta constituida por 5 genes MICA (PERB11.1), MICB (PERB11.2), MICC (PERB11.3), MICD (PERB11.4) y MICE (PERB11.5) de los cuales MICA y MICB son expresados y MICC, MICD

y MICE actúan como pseudogenes ya que no se transcriben a RNAm debido a que presentan mutaciones de punto o deleciones 149, 152. MICA y MICB se encuentran localizados centroméricamente a 40 kb y 110 kb del locus B, respectivamente, en tanto que MICC, MICD y MICE se encuentran ubicados teloméricamente aproximadamente a 800 kb, 1400 kb y 170 kb del locus B (Fig. 4.1).

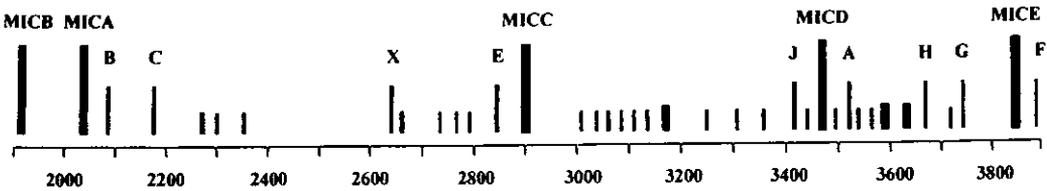
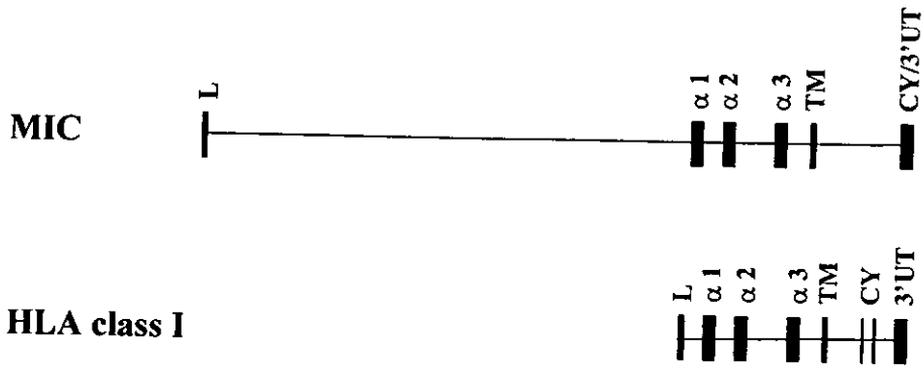


Fig. 4.1 Localización de los cinco genes de la familia MIC (*MHC class I chain-related*) dentro de la región clase I del MHC. Los genes MICA y MICB son los únicos que codifican para una proteína de función desconocida, mientras MICC, MICD y MICE son pseudogenes 149.

La secuencia nucleotídica de MICA esta constituida por 11722 pb los cuales se transcriben en un RNAm de 1382 pb, los cuales se traducen en un polipéptido de 383 aa y un peso molecular de 43 kDa, incluyendo el péptido líder que esta constituido por 23 aa. El gene de MICB se encuentra localizado centroméricamente a 70 kb de MICA y se encuentra constituido por 12930 pb, que se transcriben en un RNAm de 2376 pb y traducen a un polipéptido de 383 aa de igual peso molecular que MICA. La diferencia en longitud entre los RNAm de MICA y MICB se debe a la secuencia no transcrita en MICB. Ambos genes presentan una homología del 90% 153-156. La organización genómica de MICA y MICB

son similares, pero distinta a los genes de clase I, ya que la secuencia líder y el exón 2 están separadas por un largo intrón en los genes MIC, el cual consta de 6840 pb en MICA y 7352 pb en MICB (Fig. 4.2), y el exón 6 en MIC está constituido por 302 pb en MICA y por 1338 pb en MICB, y contiene fusionadas las secuencias del tallo citoplásmico y la región 3' sin traducción. 149, 153-155.

Fig. 4.2 Comparación de la organización genética de MIC y HLA. Las moléculas de MIC poseen la



misma organización genética que las moléculas de HLA clase I, aunque difieren en el tamaño del intrón 1 en MIC, aun mayor en MICB, y en la fusión de las regiones citoplásmica y 3'UT en el exón 6 de MIC.

4.3 Estructura, función y expresión

La estructura de MICA y MICB, es similar a las moléculas de clase I ¹⁴⁹, lo cual fue recientemente confirmado por cristalografía ¹⁵⁷. Estas moléculas contienen también tres dominios extracelulares ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$), un segmento transmembranal (TM) y un tallo citoplásmico carboxiloterminale. Sus dominios extracelulares tienen un 15%, 19% y 32% de homología con los dominios de las moléculas de clase I $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$, respectivamente ^{149, 150}. Sin embargo, se ha observado la expresión celular de MICA en células transfectantes deficientes de $\beta 2$ microglobulina (DAUDI) y en células deficientes de TAP (5.2.4),

indicando con ello que no es necesaria la presencia de la $\beta 2$ microglobulina ni la presencia de péptidos citosólicos, dado que en su ausencia las moléculas MICA se expresan normalmente en la superficie celular 158. Esto representa una gran diferencia con las moléculas de HLA clase I, las cuales no se pueden expresar en la superficie celular en ausencia de péptidos y de $\beta 2$ microglobulina. Otra diferencia de las moléculas MIC con las moléculas HLA clase I es que carecen de un sitio de unión de CD8 y no son inducibles por interferones I o II 149. Las células CIR, DAUDI y 5.2.4 transfectadas con MICA o MICB son reconocidas por linfocitos T $V_{\delta}1\gamma 8$ del epitelio intestinal 159, de la misma forma MICA, y probablemente MICB, interactúan con los linfocitos CD8+ y células NK 158, 160, 161. Recientemente, fue caracterizado el receptor de MIC, NKG2D, el cual al interactuar con MICA origina señales que llevan a la activación de la proteína DAP10 y la cinasa PI3 160, 161 (Fig. 4.3).

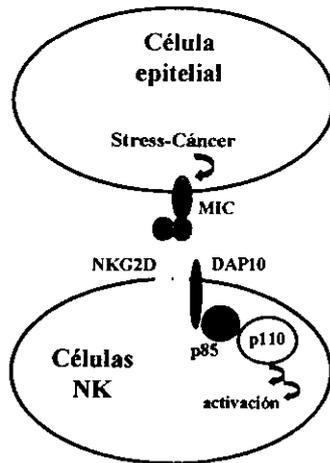


Fig. 4.3 Interacción entre MICA/B, sobrepresados bajo estrés o en células cancerosas, y su receptor NKG2D en la célula NK. La interacción de ambos activa a la proteína DAP10 con la consecuente destrucción de la célula dañada.

Los antígenos MICA y MICB se expresan sólo en algunos tejidos, observándose principalmente en células del epitelio intestinal, queratinocitos, monocitos y fibroblastos ¹⁵⁸ así como en líneas celulares de carcinomas de pulmón, mama, riñón, ovario, próstata y colon ¹⁶². Su expresión no es regulada por el interferón gama, sin embargo, responden a proteínas de choque térmico, las cuales actúan sobre la región promotora ¹⁵⁸.

4.3.1 MIC y las células T $\gamma\delta$

A diferencia de los linfocitos T $\alpha\beta$, las células T $\gamma\delta$ reconocen péptidos que no requieren procesamiento y presentación del antígeno, independiente de la restricción polimórfica de las moléculas del MHC clase I y II ¹⁶³. Existen dos subclases de linfocitos T $\gamma\delta$ en el humano adulto, V γ 2/V δ 2 que predomina en la circulación y responde a infecciones bacterianas reconociendo antígenos solubles no-peptídicos ¹⁶⁴ y V δ 1 que constituye el 70-90% de las células T $\gamma\delta$ del epitelio intestinal, cuya función se desconoce y no se han identificado los antígenos que reconoce ¹⁶⁵. Por el contrario, V δ 1 predomina más en timo que en sangre periférica del neonato y V δ 2 que constituye sólo una pequeña porción en timo y en sangre periférica al momento del nacimiento, es la población que predomina en el adulto ¹⁶⁶. Las células T $\gamma\delta$ constituyen menos del 2% de la sangre periférica en el nacimiento llegando al 10% a los seis años ¹⁶⁶. Aunque todavía no se conoce con exactitud la función de las células T $\gamma\delta$, su región 3 determinante de la complementariedad (CDR3) ha sido estudiada y muestra una mayor similitud con las inmunoglobulinas que con los mismos linfocitos T $\alpha\beta$ ¹⁶³. Otra característica de las células T $\gamma\delta$, es su actividad citolítica llegando a modificar la respuesta inmune celular originada por agentes patógenos ^{163, 167, 168}. Las citocinas producidas por los linfocitos T $\gamma\delta$ influyen en la diferenciación de las células CD4+ en TH1 o TH2 ¹⁶⁹. Se ha considerado que las células T $\gamma\delta$ participan en el enlace entre la inmunidad natural y la

inmunidad adquirida, sugiriendo que los linfocitos T γ δ y MICA/B podrían participar en el proceso de eliminación de células dañadas o infectadas al sobreexpresarse las moléculas MIC bajo estrés ¹⁷⁰.

4.4 MIC y primates

Las secuencias de los genes MIC han sido investigadas en diferentes primates, Popy (orangutan), Gogo (gorila), Ceae (mono verde Africano), Erpa (mono Patas), Papi (babún), Papa (chimpancé pigmeo) y Hyla (gibón), encontrándose una homología entre 86–97% con los genes MIC humanos ^{171, 172}. Así, el gene MICA (PERB11.1) se encuentra presente en Gogo, y MICD (PERB11.4) en Erpa y Papi. Aunque MICD es un seudogen en el humano, existe la posibilidad que algunos pseudogenes pueden ser genes en otras especies ¹⁷¹.

4.5 Alelos reportados

El número de alelos descubierto ha sugerido que la región MIC puede ser altamente polimórfica. Bahram *et al.* ¹⁴⁹ reportaron los primeros cinco alelos de MICA, posteriormente el mismo grupo adicionó otros 11 alelos ¹⁵⁰, en tal forma que entre 1994 y 1996 se conocieron los primeros 16 alelos para MICA. Aunque los polimorfismos de MICA se identificaron a partir de un número limitado de muestras, se encontraron 27 variaciones nucleótídicas en la secuencia codificante de MICA, de las cuales 22 son no-sinónimas. De estas 4/6 nucleótidos se presentan en α 1, 10/10 en α 2 y 8/11 en α 3 ¹⁵⁰. Una sobreposición de MICA y HLA-A2 reveló que el polimorfismo encontrado en esta molécula está localizado fuera del sitio de unión del péptido, presentándose en la periferia del mismo ¹⁵⁰. Con

respecto a MICB en 1997 se reportó la existencia de 7 alelos ¹⁷³, número que fue incrementado posteriormente a 15 alelos ^{174, 175}.

4.6 MICA y enfermedades

Los estudios de población abierta y de familias no han explicado la función exacta de HLA-B27 en el desarrollo de las espondiloartropatías seronegativas, motivo por el cual a la fecha su función sigue siendo especulativa. Estudios en gemelos han indicado la existencia de otros factores genéticos ¹⁷⁶, lo cual llevó al descubrimiento de los genes MIC, especialmente de MICA debido a su cercanía con el locus HLA-B. A la fecha, se han realizado varios estudios para encontrar otros genes asociados a la espondilitis anquilosante, sin embargo los polimorfismos de MICA no han revelado alguna asociación con esta entidad ¹⁷⁷⁻¹⁷⁹. Por otra parte, los estudios de asociación de MICA con uveítis anterior aguda han mostrado una asociación con el microsatélite A4 ^{180, 181}.

La enfermedad de Behçet se ha asociado principalmente con HLA-B51 ^{182, 183}, aunque existe un reporte con HLA-Cw*1602 ¹⁸⁴, en cambio el estudio de asociación con polimorfismos del gene TAP se ha reportado negativo ¹⁸⁵. La enfermedad de Behçet es muy variable y aunque existe evidencia de asociación con ciertos alelos HLA, se ha sugerido la existencia de otros genes cercanos al locus B asociados más fuertemente que los anteriores ^{183, 186-188}. El estudio de la región cercana al locus B mostró una fuerte asociación de MICA con el microsatélite A6 de la region TM ¹⁸⁹⁻¹⁹². Sin embargo, esta asociación no se ha encontrado en la población española ¹⁹³. Con respecto al microsatélite de MICB no se encuentra asociado con la enfermedad de Behçet ¹⁹⁴.

La artritis psoriásica se ha asociado con A9, posiblemente MICA*002 es el alelo involucrado ¹⁹⁵. Por otra parte, la mayor frecuencia de MICA*004 en testigos sanos sugiere que este alelo puede tener un efecto protector ¹⁹⁶. En la enfermedad de Addison se encuentran significativamente aumentado el microsatélite A5.1 y disminuido el microsatélite A6 de MICA, sin embargo, se considera necesaria la presencia de A5.1 y del haplotipo HLA-DR3/DQ2 para conferir un mayor riesgo genético a esta enfermedad ¹⁹⁷. MICA también se ha asociado con la susceptibilidad a enfermedades claramente asociadas con antígenos MHC clase II, como es el caso de la diabetes mellitus dependiente de insulina asociada a HLA-DQ2 y -DQ8, que demuestra una fuerte asociación del microsatélite A5 con incremento en el riesgo de estos pacientes. De igual forma A9 se encontró aumentado en pacientes con diabetes mellitus deficientes de proteína ¹⁹⁸. La enfermedad celiaca asociada con HLA-DQ2 y -DQ8 también se encuentra asociada con el alelo A5.1, mientras que el alelo A4 parece tener un efecto protector ¹⁹⁹. En cambio, no se ha identificado alguna asociación entre MICA y carcinoma cervical intraepitelial asociado con el virus del papiloma humano ²⁰⁰.

A partir de su descubrimiento, los genes MIC despertaron gran interés en diferentes áreas. Así, durante 1994 y 1996 se conocía la existencia de 16 alelos en MICA y 11 en MICB; la expresión en monocitos, queratinocitos, fibroblastos y en células endoteliales del intestino; la expresión estable de las moléculas en la superficie celular en ausencia de la β_2m y del péptido; la falta del sitio de unión de CD8+; la respuesta a proteínas de choque térmico y la interacción con los linfocitos $T\gamma\delta$, C8+ y células NK. Sin embargo, el estudio del polimorfismo de ambos genes estaba poco desarrollado, ya que anteriormente solo se había explorado en un pequeño número de muestras. Por este motivo el interés de nuestro trabajo se enfocó al estudio de nuevos polimorfismos de MIC, utilizando una nueva técnica molecular

llamada RSCA (*Reference Strand Conformation Analysis*) desarrollada en el *Anthony Nolan Research Institute* 201. El análisis por RSCA es tan sensible como la misma secuenciación directa (SBT), y permite detectar mutaciones de punto, con la ventaja de poder estudiar mayor número de muestras. Esta técnica utilizada para la tipificación de HLA, y en otros estudios, es ideal para el estudio del polimorfismo de ambos genes MIC. Posteriormente, al conocer las nuevas mutaciones de ambos genes se aplicó la técnica de SSOP para el estudio de MICA/B las sondas diseñadas abarcaron todo el polimorfismo reportado en su momento.

CAPÍTULO 5

OBJETIVOS

- A) Investigar por métodos moleculares (RSCA, SSOP y secuenciación directa) la existencia de nuevos alelos MICA y MICB, así como la presencia de nuevas substituciones sinónimas y no-sinónimas.
- B) Evaluar el desequilibrio de enlace entre MICA, MICB y HLA-B que pudiera ayudar a identificar haplotipos de riesgo o resistencia.

HIPÓTESIS

El estudio del polimorfismo genético de MICA y MICB en líneas celulares disponibles en repositorios (<http://www.anthonynolan.com/>) ²⁰² revelará la existencia de nuevos alelos MIC, así como la existencia de nuevas substituciones sinónimas y no-sinónimas. Adicionalmente, el análisis de los resultados obtenidos permitirá establecer el desequilibrio de enlace entre los genes MIC y otras regiones clase I (locus B), de uso potencial en estudios de genética básica y clínica.

METAS

1. Estudiar el polimorfismo de MICA y MICB empleando un nuevo método de análisis molecular conformacional (RSCA) de alta resolución, capaz de detectar mutaciones de punto, desarrollado en el Anthony Nolan Research Institute (ANRI) ^{203, 204}.
2. Estudiar las variaciones nucleotídicas de MICA y MICB, previamente reportadas por otros grupos de investigación, mediante la aplicación de SSOP con la finalidad de desarrollar una técnica accesible en cualquier laboratorio.
3. Estudiar el polimorfismo de MICA y MICB en líneas celulares del 12th International Histocompatibility Workshop (IHW) ²⁰² así como otras líneas celulares del ANRI.

JUSTIFICACIÓN

En el trasplante de órganos es necesario buscar el mayor grado de histocompatibilidad entre receptor y donador para evitar el rechazo del injerto. En el trasplante de médula ósea, el desarrollo de una GvHD potencialmente fatal obliga a la identificación de identidad en antígenos HLA. Sin embargo, la identidad en HLA no asegura la compatibilidad en otros genes que codifican moléculas antigénicas, tales como mH y MIC, que pueden participar en el desarrollo de la respuesta inmune. Las moléculas MIC se

expresan principalmente en el tracto gastrointestinal, uno de los blancos principales en la GvHD, y no se descarta su posible participación en el desarrollo de esta enfermedad. Por lo tanto, la identificación precisa de los polimorfismos MIC pudiera ser de gran utilidad como medida de histocompatibilidad en los programas de trasplante de médula ósea.

CAPÍTULO 6

MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Líneas celulares y la extracción del DNA (muestras y controles)

Para el estudio de MICA se utilizó un panel integrado por 264 líneas celulares linfoblastoides B, de estas líneas sólo 130 se utilizaron para MICB. La mayoría de las líneas celulares se obtuvieron del 12th International Histocompatibility Workshop (IHW) ²⁰² y algunas del Anthony Nolan Research Institute. Adicionalmente se utilizaron 12 controles de alelos conocidos para MICA y 8 para MICB. La extracción del DNA de las muestras y controles se realizó por el método de *salting-out* ²⁰⁵.

6.2 Fundamento de la técnica RSCA

RSCA es una técnica capaz de estudiar el polimorfismo de cualquier gene, identificando alelos nuevos que difieren únicamente por una sustitución nucleotídica. El primer paso en RSCA es la amplificación del locus o región que se desea estudiar usando un iniciador marcado, 5' o 3', con Cy5' (carbocianina-5) en la posición 5' del iniciador, en tal forma que sólo una de las cadenas del producto de PCR se encuentra marcada. A este producto se le conoce como FLR (*Fluorescent labelled reference*) (Fig. 6.1).

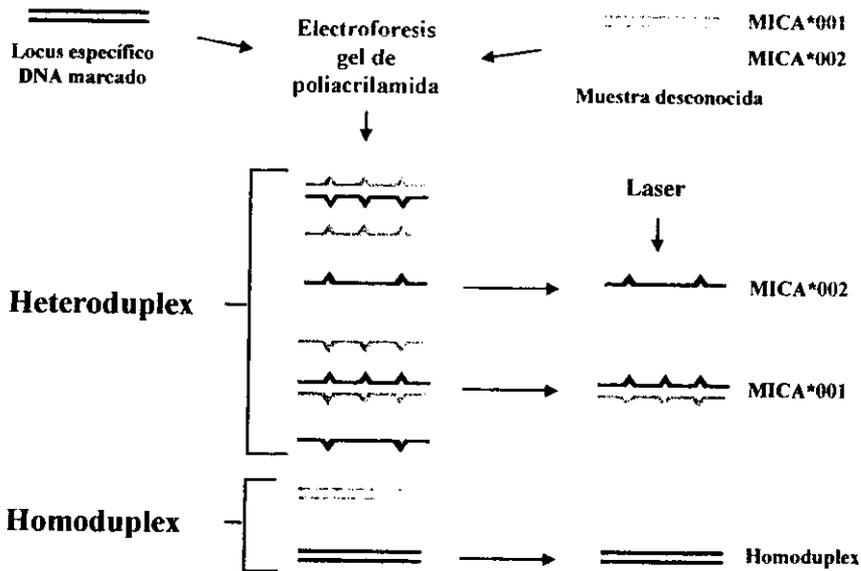


Fig. 6.1 Esquema de RSCA. Al hibridarse una muestra heterocigotica desconocida con el DNA marcado se formaran varias combinaciones de homodúplex y heterodúplex, pero sólo se detectarán las combinaciones marcadas con Cy5 que fueron generadas del DNA de referencia ²⁰¹.

En forma independiente, se realiza una amplificación de la muestra a estudiar usando los mismos iniciadores pero sin marcar. Posteriormente se lleva a cabo la desnaturalización e hibridación de ambas muestras, formándose varios dúplex, homodúplex y heterodúplex. La conformación molecular de los dúplex es única, reflejándose en la movilidad electrofórica. La movilidad del DNA de doble cadena en un gel no desnaturalizante, PAGE, depende únicamente de las condiciones electroforéticas, del peso molecular y de la conformación. Cuando se mantienen constantes las condiciones electroforéticas, la migración de los dúplex dependerá de las diferencias en la conformación molecular. El peso molecular

será el mismo en todos los alelos, sin embargo, pueden presentarse excepciones en caso de existir alelos con inserciones o deleciones.

6.3 Iniciadores (*primers*) específicos para MICA y MICB

Antes de diseñar los iniciadores específicos para MICA y MICB se obtuvo la secuencia de todos los alelos reportados hasta el momento, incluyendo los intrones cuando estos fueron disponibles, a partir de la base de datos del *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank>). Posteriormente se realizó la alineación de todos los alelos utilizando el programa de alineación de EBI (*European Bioinformatics Institute*) (<http://www.ebi.ac.uk>).

6.3.1 MICA

Los iniciadores que se diseñaron para el estudio del gene MICA por RSCA (*Reference Strand mediated Conformation Analysis*) se encuentran incluidos en la Tabla 6.1 A. Únicamente se diseñaron iniciadores para los exones 2, 3 y 4, cuya longitud fue de 24 nucleótidos. Para el estudio del exón 5 se utilizaron los iniciadores MICA5'Ex5 y el MICA3'Ex5¹⁹⁰, también incluidos en la Tabla 6.1 A. En cambio para el análisis de MICA por SSOP los iniciadores fueron de 25 nucleótidos y 26 nucleótidos, Tabla 6.1 B¹⁵⁰. Estos iniciadores amplificaron los exones 2 al 5 y se usaron también para la secuenciación de los alelos nuevos de MICA. La localización de los iniciadores se obtuvo en base a la secuencia del DNAc de MICA reportado por Bahram *et al.*¹⁵³, bajo el número de acceso X92841.

Tabla 6.1 A**Localización de los iniciadores usados para la amplificación de MICA.****Estudio por RSCA.**

| Iniciador | Orientación | Localización | Localización de los iniciadores | Secuenciación (5'-3') |
|-----------|-------------|--------------|---------------------------------|---------------------------|
| MICA5'Ex2 | Sentido | Intrón 1 | 6826-6849 | TCTTGTCCTTTGCCCGTGTGCAT |
| MICA3'Ex2 | Antisentido | Intrón 2 | 7301-7324 | CAGGCTGGGGGTGAGGAATGGGGG |
| MICA5'Ex3 | Sentido | Intrón 2 | 7378-7401 | TGGGGGAGGGCCAGGGAGGCGTAC |
| MICA3'Ex3 | Antisentido | Intrón 3 | 7866-7889 | AAGGCATTTCTGTGTGGCACATCG |
| MICA5'Ex4 | Sentido | Intrón 3 | 8227-8250 | CAGACTTGCAGGTTCAGGGTCCCCG |
| MICA3'Ex4 | Antisentido | Intrón 4 | 8732-8759 | AGTGCTGGTGCTTCAGAGTCATTG |
| MICA5'Ex5 | Sentido | Intrón 4 | 8720-(-9) | CCTTTTTTTCAGGGAAAGTGC |
| MICA3'Ex5 | Antisentido | Intrón 5 | 8999-9023 | TTGGGAAGGGAATGGGGGCAGCATC |

Tabla 6.1 B**Localización de los iniciadores usados para la amplificación de MICA.****Estudio por SSOP y secuenciación.**

| Iniciador | Orientación | Localización | Localización de los iniciadores | Secuenciación (5'-3') |
|-----------|-------------|--------------|---------------------------------|---------------------------|
| 5FMICA2-5 | Sentido | Intrón 1 | 6823-6847 | CGTTCTTGTCCTTTGCCCGTGTGC |
| 3RMICA2-5 | Antisentido | Intrón 5 | 8999-9023 | CTACGACGGGGGTAAGGGAAGGGTT |

6.3.2 MICB

De igual forma, MICB fue estudiado por RSCA amplificando independientemente los exones 2, 3, 4 y 5, la mayoría de los iniciadores usados fueron descritos por Ando *et al.* ¹⁷³ y únicamente se diseñaron los iniciadores 3' del exon 2 y 5' del exon 3, los cuales se encuentran incluidos en la Tabla 6.2 A. Los iniciadores (5FMICB2-5 y 3RMICB2-5) usados para el estudio de MICB por SSOP y secuenciación, amplificaron un fragmento de PCR que incluyó del exon 2 al exon 5, Tabla 6.2 B ¹⁷⁴. Los iniciadores que se utilizaron en la secuenciación de los exones 4 y 5 fueron MICB5'Ex4 y MICB3'Ex5, Tabla 6.2

A. La longitud de los iniciadores varía desde 23 nucleótidos hasta 40 nucleótidos y su localización se determinó en base a la secuencia del DNAC de MICB reportado por Bahram *et al.* 155, bajo el número de acceso U65416.

Tabla 6.2 A
Localización de los iniciadores usados para la amplificación de MICB.

Estudio por RSCA.

| Iniciador | Orientación | Localización | Localización de los iniciadores | Secuenciación (5'-3') |
|-----------|-------------|--------------|---------------------------------|--|
| MICB5'Ex2 | Sentido | Intrón 1 | 7089-7113 | AAGACCTTCCTTCCAACACTGCCTT |
| MICB3'Ex2 | Antisentido | Intrón 2 | 7776-7799 | TGGGGGTGGGGATGAGGAATAGGG |
| MICB5'Ex3 | Sentido | Intrón 2 | 7853-7876 | TGGAGGAGGGCCAGGGAGGGTCCG |
| MICB3'Ex3 | Antisentido | Intrón 3 | 8266-8289 | ACTGTTCCCGCAATTCTGCTAGAG |
| MICB5'Ex4 | Sentido | Intrón 3 | 8753-8782 | AGTGGAGAGGAGCAGCCCTGTTCCCTGC AT |
| MICB3'Ex4 | Antisentido | Intrón 4 | 9140-9179 | CAGGCCAGGGTAGGAACAGGAGGGACGG CTGTGGCTCTCT |
| MICB5'Ex5 | Sentido | Intrón 4 | 9140-9179 | CAGGCCAGGGTAGGAACAGGAGGGACGG CTGTGGCTCTCT |
| MICB3'Ex5 | Antisentido | Intrón 5 | 9373-9375 | GAAAGCTCCTTTCTAGGCAGTAG |

Tabla 6.2 B
Localización de los iniciadores usados para la amplificación de MICB.

Estudio por SSOP y secuenciación.

| Iniciador | Orientación | Localización | Localización de los iniciadores | Secuenciación (5'-3') |
|-----------|-------------|--------------|---------------------------------|---------------------------|
| 5FMICB2-5 | Sentido | Intrón 1 | 7089-7113 | AAGACCTTCCTTCCAACACTGCCTT |
| 3RMICB2-5 | Antisentido | Intrón 5 | 9373-9375 | GAAAGCTCCTTTCTAGGCAGTAG |

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

6.4.1 MICA (RSCA)

Las moléculas MICA fueron amplificadas del exón 2 al 5. Cada exón fue amplificado individualmente cuando el estudio se llevó a cabo por RSCA. La reacción de PCR para los exones 2, 3 y 5 se realizó a una concentración final de 0.5 µg de DNA, 12.5 pmol de cada primer, 0.2 mM de deoxinucleótidos (dNTPs), 16 mM (NH₄)₂SO₂ del buffer PCR, 1 mM de MgCl₂ y 0.75 unidades de Taq polimerasa (Bioline, London, U.K.) en un volumen final de 25 µl. El exón 4 fue amplificado de la misma forma, excepto que la concentración del MgCl₂ fue de 2 mM. Las condiciones de la reacción de PCR fueron realizadas de la misma forma para los exones 2 al 4, iniciándose con una desnaturalización a 95 °C durante 5 min; 33 ciclos de 95 °C/30 seg, 65 °C/50 seg y 72 °C/30 seg; y un ciclo final de 8 min a 72 °C. Para el exón 5 las condiciones incluyeron un ciclo a 95 °C/5 min; 33 ciclos de 95 °C/1 min y 60 °C/1 min y un ciclo final de 8 min a 60 °C. Los fragmentos obtenidos de cada reacción fueron de 499, 512, 533 y 185 pares de base para los exones 2, 3, 4 y 5, respectivamente.

6.4.2 MICA (SSOP) y secuenciación

Un fragmento de PCR que incluyó los exones 2-5 (2201 pb) fue amplificado usando un kit comercial (Expand Long Template, Boehringer Mannheim, Germany) para el estudio de MICA mediante el uso de la técnica de SSOP y para la secuenciación de los alelos nuevos. Para ello se inició con un ciclo de 94 °C/2 min; 10 ciclos de 94 °C/10 seg, 65 °C/30 seg y 68 °C/2 min; 16 ciclos de 94 °C/10 seg, 65 °C/30 seg, 68 °C/2 min 20 seg, incrementando 20 seg por cada ciclo, y una extensión final a 68 °C por 7 min.

6.4.3 MICB (RSCA)

La reacción de PCR fue idéntica a la usada en el exón 5 excepto que la concentración de la Taq polimerasa (Bioline, London, U.K.) fue de 0.60 unidades. Las condiciones de PCR también fueron las mencionadas anteriormente para el exón 5 de MICA. Los fragmentos obtenidos estuvieron compuestos por 300, 320, 427 y 256 pares de base para los exones 2, 3, 4 y 5, respectivamente.

6.4.4 MICB (SSOP) y secuenciación

El kit comercial Expand Long Template (Boehringer Mannheim, Germany) fue también usado para la amplificación de un fragmento de 4.2 kb de MICB, que incluye los exones 2 a 5, así como un fragmento de 510 pares de bases de los exones 4 y 5. Las condiciones de PCR de ambos fragmentos fueron las mismas que se utilizaron durante la amplificación de MICA para su estudio por SSOP.

6.5 Estudio del polimorfismo de MICA y MICB por RSCA

6.5.1 Producción de las referencias (Fluorescent labelled reference (FLR))

Las referencias (FLRs) fueron generadas a partir de líneas celulares homocigotas en alelos conocidos MICA y MICB. Para ello, se utilizaron los mismos iniciadores diseñados para la amplificación de cada exón y las condiciones de la reacción para el PCR que fueron las descritas anteriormente, excepto que alguno de los iniciadores, ya sea 5' o 3', se marca con fluorocromo Cy5 (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) en la posición 5'final. De esta forma al realizarse la reacción de PCR una de las cadenas del producto generado resulta con marca fluorescente. Antes de utilizar las FLRs cualquier actividad existente de la Taq polimerasa en el producto de PCR (100 µl) se inactiva adicionando 4 µl

EDTA 0.5M. Varias FLRs fueron probadas para cada exón con la finalidad de encontrar la combinación de diferentes FLRs que diera la mejor resolución.

6.5.2 Hibridación de las FLRs con las muestras

Para hibridar las FLRs con las muestras problema, se adicionó un μl del producto de PCR de la FLR a 3 μl del producto de PCR de la muestra, posteriormente la mezcla de reacción fue desnaturalizada a 95°C/4 min e hibridada a 55°C durante 5 min y al menos 3 min a 15°C. Inmediatamente después de la hibridación, 1 μl del buffer de carga 6X (15% Ficoll y 1.2% de azul dextran) fue adicionado a la mezcla de reacción para su posterior evaluación electroforética.

6.5.3 Gel de poliacrilamida y condiciones electroforéticas

Los dúplex (homodúplex y heterodúplex) fueron separados por electroforesis en un secuenciador automatizado ALFexpress (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). Un μl de cada muestra preparada fue cargada en un gel no desnaturalizante de 0.25X MDETM (FMC BioProducts, Rockland, Maine USA). El tamaño del gel fue 21 cm de largo y 0.5 mm de espesor. La electroforesis se llevó a cabo a 30W a una temperatura de 40°C, mantenida con un sistema de enfriamiento externo (Grant LTD). Los geles fueron corridos en buffer TBE 1X y reutilizados hasta cinco veces con buffer nuevo. Cada corrida fue de 6 horas, variando de acuerdo al tamaño del fragmento de PCR.

6.5.4 Código de RSCA de los alelos de MICA

La diferencia entre algunos alelos MICA puede representar el cambio de un sólo nucleótido en un exón, por este motivo, varios alelos pueden presentar la misma secuencia en varios exones y diferir en un solo exón, por ejemplo MICA*004 y MICA*006 tienen la misma secuencia en el exón 2. Por esta razón, y debido a que los exones de MICA fueron estudiados individualmente por RSCA, fue necesario diseñar

un código que asignara la secuencia única del exón, i.e. en el exón 2 existen reportes de seis secuencias diferentes 149, 150, las cuales fueron llamadas 2A, 2B, 2C, 2D, 2E y 2F. El número 2 proviene del exón y la letra indica la secuencia. La nomenclatura del exón 5, reportada por Mizuki y colaboradores 190, esta relacionada al número de alaninas (A) codificadas por el triplete (GCT). Así cada alelo presenta un código único que es la combinación de los cuatro exones, i.e MICA*004 está representado por la combinación de los exones 2E-3H-4F-5A6 (Tabla 6.3).

Tabla 6.3
Código asignado a cada alelo de MICA

| Alelo | exón 2 | exón 3 | exón 4 | exón 5 |
|----------|--------|--------|--------|--------|
| MICA*001 | 2A | 3A | 4A | 5A4 |
| MICA*002 | 2B | 3C | 4A | 5A9 |
| MICA*003 | 2D | 3H | 4E | 5A6 |
| MICA*004 | 2E | 3H | 4F | 5A6 |
| MICA*005 | 2E | 3K | 4G | 5A4 |
| MICA*006 | 2E | 3J | 4F | 5A6 |
| MICA*007 | 2C | 3C | 4B | 5A4 |
| MICA*008 | 2E | 3G | 4H | 5A5.1 |
| MICA*009 | 2E | 3I | 4F | 5A6 |
| MICA*010 | 2F | 3L | 4H | 5A5 |
| MICA*011 | 2B | 3E | 4C | 5A6v† |
| MICA*012 | 2A | 3B | 4A | 5A4 |
| MICA*013 | 2B | 3G | 4D | ? |
| MICA*014 | 2B | 3F | 4A | ? |
| MICA*015 | 2B | 3D | 4A | 5A9 |
| MICA*016 | 2E | 3L | 4I | 5A5 |

† Posición reportada por Vitiani *et al.* 206 y nomenclatura asignada por nosotros.

6.5.5 Preparación de los controles internos de DNA (*ladders*)

Con la finalidad de controlar las variaciones entre todos los geles se diseñaron conjuntos de dos a cuatro controles de DNA (*ladders*) para cada FLR y exón. Cada conjunto estuvo formado de uno a tres alelos conocidos de MICA o MICB según el caso. Las *ladders* fueron preparadas por hibridación independiente de los controles de MICA y MICB con la correspondiente FLR como se describió anteriormente. Posteriormente los heterodúplex formados fueron mezclados a volúmenes iguales, en tal forma que cada conjunto de *ladders* contenía todos los alelos disponibles de MICA y MICB.

6.5.6 Análisis de los resultados

La movilidad de cada dúplex fluorescente fue analizada usando el programa de Allele Links (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). La corrección del gel y el análisis de los datos se realizó asignando al pico del iniciador fluorescente el valor de uno y al homodúplex el valor de 1000, logrando alinear de esta forma todos los homodúplex ²⁰¹. Así los alelos de MICA y MICB fueron asignados al compararse los valores de sus movilidades con los controles internos (*ladders*).

6.6 Clonación y secuenciación (SBT) de los nuevos alelos de MICA y MICB

La secuenciación de la muestra, de los exones 2 al 5, se realizó cuando el resultado provenía de una nueva movilidad o discrepancia con las otras referencias del mismo exón. En caso de ser una línea celular homocigota se llevo a cabo directamente la secuenciación en un secuenciador automatizado (377 ABI Prism™, Foster City, USA). Cuando la muestra fue una línea celular heterocigota se realizó la clonación antes de la secuenciación. En el caso de MICA se utilizó el kit comercial de Invitrogen, TA

Cloning, (Groningen, The Netherlands) que comprende el vector pCR[®]2.1. Para MICB el vector fue el mismo pero de diferente kit comercial, TOPO TA Cloning de Invitrogen.

6.7 Estudio del polimorfismo de MICA y MICB por SSOP

6.7.1 Sondas de oligonucleótidos

6.7.1.1 MICA

Un conjunto de 30 sondas fue usado para estudiar la mayoría de las posiciones polimórficas reportadas hasta el momento para los exones 2, 3 y 4 de MICA ^{149, 150}. Un ejemplo de identificación del exón 2 es dado en la Fig.6.2. El exón 5, debido a la presencia del microsatélite, se siguió estudiando por RSCA. La posición de las sondas y su secuencia se encuentra reportada en la Tabla 6.4.

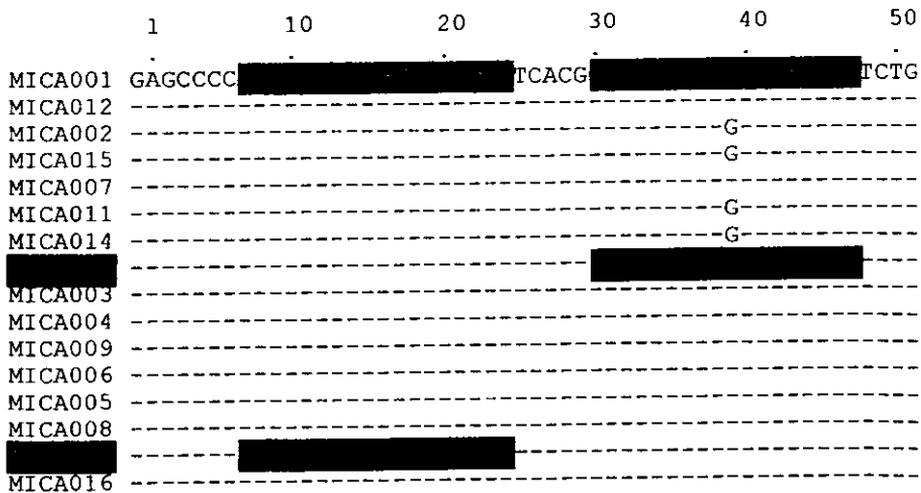


Fig. 6.2 Detección del polimorfismo de MICA por SSOP. Las sondas MICA-ANP00 y -ANP01 ubicadas en la posición 7-24 del exón 2, y MICA-ANP02 y -ANP03 en la posición 30-47 del mismo exón son un ejemplo de las sondas diseñadas para el estudio de las variaciones nucleotídicas de MICA.

Tabla 6.4

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

| Sonda* | Ubicación# | Secuencia |
|------------|-----------------------|---------------------|
| MICA-ANP00 | Exón 2 (7-24) | ACAGTCTTCCTTATAACC |
| MICA-ANP01 | Exón 2 (7-24) | ACAGTCTTCGTTATAACC |
| MICA-ANP02 | Exón 2 (30-47) | GTGCTGTCTCTGGGATGGA |
| MICA-ANP03 | Exón 2 (30-47) | GTGCTGTCCGGGGATGGA |
| MICA-ANP04 | Exón 2 (60-77) | GGGTTTCTCACTGAGGTA |
| MICA-ANP05 | Exón 2 (60-77) | GGGTTTCTCGCTGAGGTA |
| MICA-ANP06 | Exón 2 (60-77) | GGGTTTCTTGCTGAGGTA |
| MICA-ANP07 | Exón 2 (97-114) | TCCTGCGCTGTGACAGGC |
| MICA-ANP08 | Exón 2 (97-114) | TCCTGCGCTATGACAGGC |
| MICA-ANP09 | Exón 3 (331-348) | TACTACGATAGGGAGCTC |
| MICA-ANP10 | Exón 3 (365-382) | TGGAGACTAAGGAATGGA |
| MICA-ANP11 | Exón 3 (365-382) | TGGAGACTGAGGAATGGA |
| MICA-ANP12 | Exón 3 (355-372) | TCCCAAACCTGGAGACT |
| MICA-ANP13 | Exón 3 (355-372) | TCCCAAACCTGGAGACT |
| MICA-ANP14 | Exón 3 (442-459) | GAAGATGCCGTGAAGACC |
| MICA-ANP15 | Exón 3 (458-475) | CCAAGACACTCTATCAGC |
| MICA-ANP16 | Exón 3 (511-528) | TATCTAGAATCCGGCGTA |
| MICA-ANP17 | Exón 3 (517-534) | GAATCCAGCATAGTCCTG |
| MICA-ANP18 | Exón 3 (508- 525) | CGATATCTAAAATCCGGC |
| MICA-ANP19 | Exón 3 (511-528) | TATCTAGAATCCAGCGTA |
| MICA-ANP20 | Exón 3 (534) Intrón 3 | GAGGAGAAGAGGTACGGA |
| MICA-ANP21 | Exón 4 (563-580) | CACCCGCAGTGAGGCCTC |
| MICA-ANP22 | Exón 4 (584-601) | GGGCAACATTACCGTGAC |
| MICA-ANP23 | Exón 4 (607-624) | AGGGCTTCTGGCTTCTAT |
| MICA-ANP24 | Exón 4 (607-624) | AGGGCTTCCAGCTTCTAT |
| MICA-ANP25 | Exón 4 (629-646) | GGAATATCATACTGACCT |
| MICA-ANP26 | Exón 4 (652-669) | CAGGATGGCTATCTTTG |
| MICA-ANP27 | Exón 4 (742-759) | GGATTTGCCGAGGAGAGG |
| MICA-ANP28 | Exón 4 (793-810) | GGAATCACGGCACTCAC |
| MICA-ANP29 | Exón 4 (802-819) | AGCACTCACGCTGTGCC |

* El número de identificación de la sonda contiene el nombre del locus, MICA, y un código institucional, ANP00 – ANP29.

La ubicación de la sonda es en base a la secuencia del DNAC de MICA reportado por Bahram *et al.* 153, bajo el número de acceso X92841.

6.7.1.2 MICB

Un conjunto de 42 sondas fue incluido para el estudio de MICB, abarcando todas las variaciones nucleotídicas (intrónicas y exónicas) reportadas en su momento. En la Tabla 6.5 se presentan estas sondas.

Tabla 6.5

Sondas usadas para la determinación de los alelos MICB. Secuencia y ubicación.

| Sonda* | Ubicación# | Secuencia |
|------------|-------------------|--------------------|
| MICB-ANP01 | Exón 2, 38-55 | CCAGGATGGATCTGTGCA |
| MICB-ANP02 | Exón 2, 38-55 | CCAGGATGAATCTGTGCA |
| MICB-ANP03 | Exón 2, 125-142 | GGCAAAGCCCCAGGGACA |
| MICB-ANP04 | Exón 2, 125-142 | GGCAAAGCACCAGGGACA |
| MICB-ANP05 | Exón 2, 160-177 | TGGGAGCTAAGACCTGGG |
| MICB-ANP06 | Exón 2, 160-177 | TGGGAGCTGAGACCTGGG |
| MICB-ANP07 | Exón 2, 145-162 | GGGCAGAAGATGTCTGG |
| MICB-ANP08 | Exón 2, 145-162 | GGGCAGAAAATGTCTGG |
| MICB-ANP09 | Exón 2, 236-253 | TATCAAGGACCAGAAAGG |
| MICB-ANP10 | Exón 2, 236-253 | TATCAAGGGCCAGAAAGG |
| MICB-ANP11 | Exón 3, 30-47 | TGTGAGATCCATGAAGAC |
| MICB-ANP12 | Exón 3, 30-47 | TGTGAGATGCATGAAGAC |
| MICB-ANP13 | Exón 3, 72-89 | TTCTACTACGATGGGGAG |
| MICB-ANP14 | Exón 3, 72-89 | TTCTACTACAATGGGGAG |
| MICB-ANP15 | Exón 3, 244-261 | AACTACAGCGATATCTGA |
| MICB-ANP16 | Exón 3,244-261 | AACTACAGTGATATCTGA |
| MICB-ANP17 | Exón 4, 14-31 | GTGAATGTACCTGCAGC |
| MICB-ANP18 | Exón 4, 14-31 | GTGAATGTATCTGCAGC |
| MICB-ANP19 | Exón 4, 22-39 | CTGCAGCGAGGTCTCAGA |
| MICB-ANP20 | Exón 4, 22-39 | CTGCAGCAAGGTCTCAGA |
| MICB-ANP21 | Exón 4, 78-95 | TATCCCCGAATATCACA |
| MICB-ANP22 | Exón 4, 78-95 | TATCCCCGAAATATCACA |
| MICB-ANP23 | Exón 4, 177-194 | TACCAGACCTGGGTGGCC |
| MICB-ANP24 | Exón 4, 177-194 | TACCAGACGTGGGTGGCC |
| MICB-ANP25 | Exón 4, 215-232 | GGAGCAGAGGTTACCTG |
| MICB-ANP26 | Exón 4, 215-232 | GGAGCAGAAGTTCACCTG |
| MICB-ANP27 | Exón 4, 248-265 | CGGGAATCACGGCACTCA |
| MICB-ANP28 | Exón 4, 248-265 | CGGGAATCATGGCACTCA |
| MICB-ANP29 | Exón 5, -2-16 | AGGGAAGGCCTGGTGCT |
| MICB-ANP30 | Exón 5, -2-16 | AGGGAAGGTGCTGGTGCT |
| MICB-ANP31 | Intrón 2, 73-90 | TCTCTCCCGCTGGATCT |
| MICB-ANP32 | Intrón 2, 73-90 | TCTCTCCCACTGGATCT |
| MICB-ANP33 | Intrón 2, 89-106 | CTGGCTGGGGGTGGGGAT |
| MICB-ANP34 | Intrón 2, 89-106 | CTGGCTGGGAGTGGGGAT |
| MICB-ANP35 | Intrón 2, 177-194 | AGGGGTCGCCGCTGGGCT |
| MICB-ANP36 | Intrón 2, 177-194 | AGGGGTCGCTGCTGGGCT |
| MICB-ANP37 | Intrón 4, 3-20 | GAGCCTGGGGTGACCCTG |
| MICB-ANP38 | Intrón 4, 3-20 | CTGGGTTGATGGGGTGAC |
| MICB-ANP39 | Intrón 4, 41-58 | GGAACAGCAGGGACGGCT |
| MICB-ANP40 | Intrón 4, 41-58 | GGAACAGCAAGGACGGCT |
| MICB-ANP41 | Intrón 4, -4-14 | TCTGGTGAGCCTGGGGTG |
| MICB-ANP42 | Intrón 4, -4-14 | TCTGGTGAACCTGGGGTG |

* El número de identificación de la sonda contiene el nombre del locus, MICB, y un código institucional, ANP01 - ANP42.

La ubicación de la sonda es en base a la secuencia del DNAC de MICB reportado por Bahram y Spies 154, bajo el número de acceso X91625.

6.7.2 Marcaje de las sondas

Las sondas fueron marcadas con digoxigenina, 3' DIG, siguiendo las instrucciones del kit comercial Boehringer Mannheim, Germany.

6.7.3 Método SSOP

6.7.3.1 MICA

Dos μ l del producto de MICA desnaturalizado obtenido por PCR fue depositado en una membrana de nylon cargada positivamente (Boehringer Mannheim, Germany), posteriormente el DNA se fijo por exposición a la luz UV. Cada membrana fue incubada 30 min a temperatura ambiente en 15 ml de solución de bloqueo (4x SSPE, 0.1% Sodium lauroylsarcosine y 1% del reactivo de bloqueo) y 90 min a 58°C en 5 ml de solución de hibridación (3M tetramethylammonium, 50mM de Tris-HCl pH 8.0 y 2mM de EDTA pH 8.0) conteniendo 2 pmol/ml de la sonda de MICA marcada. Enseguida las membranas fueron lavadas dos veces en una solución de 2x SSPE y 0.1% SDS por 10 min a temperatura ambiente, y dos lavados más en solución de hibridación a 58°C durante 10 min. Las sondas MICA-ANP09, -ANP12, -ANP16 y -ANP29 recibieron un lavado extra de 10 min a 60°C y las sondas MICA-ANP15 y -ANP27 un lavado extra a 62°C / 10 min. Finalmente los puntos de reacción (*dots*) fueron desarrollados con anti-DIG (Fab) y CSPD (Boehringer Mannheim, Germany), y visualizados en película de rayos X Kodak.

6.7.3.2 MICB

La metodología para MICB fue idéntica a la de MICA cambiando únicamente la temperatura de hibridación y los lavados en solución de hibridación. Las temperaturas de hibridación de las sondas de MICB fueron 45°C (MICB-ANP13-16, 21-22, 31-33, 35, 37, 39, 42) o 58°C (MICB-ANP1-12, 17-20,

23-30, 34, 36, 38, 40-41) durante 90 min. Después de los dos lavados a temperatura ambiente en solución 2x SSPE y 0.1% SDS por 10 min, se efectuaron tres lavados en solución de hibridación a 50°C para MICB-ANP14, -ANP15, -ANP16, -ANP37, -ANP42; a 52°C para MICB-ANP13; a 56°C para MICB-ANP22, -ANP32; a 58°C para MICB-ANP2, -ANP5, -ANP9, -ANP17, -ANP19-21, -ANP23-26, -ANP31, -ANP33, -ANP35, -ANP38, -ANP41; a 60°C para MICB-ANP6-8, -ANP11, -ANP28, -ANP29; y a 62°C para MICB-ANP1, -ANP3, -ANP4, -ANP10, -ANP12, -ANP18, -ANP27, -ANP30, -ANP34, -ANP36, -ANP39, -ANP40.

6.7.4 Análisis de los resultados de MICA y MICB por SSOP

Los resultados fueron analizados usando un scanner y el programa Typetool (LabScan Systems Inc., Scarsdale, N. Y.) para la asignación de los alelos.

CAPÍTULO 7

RESULTADOS

7.1 Estudio de MICA por RSCA

7.1.1 Secuencia idéntica en el exón con diferente movilidad en los controles (DNAs)

Durante la estandarización de las condiciones para el análisis del exón 2 de MICA por RSCA, con la finalidad de encontrar las referencias (FLR) óptimas, se probaron todos los DNAs de alelos conocidos, los cuales incluyeron las diferentes secuencias de este exón. Cuando se llevó a cabo la hibridación de los alelos de MICA *004, *006, *008 y *009 con la FLR MICA*001 (línea celular EJ32B, código 2A), se dividieron en dos grupos de diferente movilidad electroforética a pesar de que todos los alelos poseen la misma secuencia en su exón 2,. El primer grupo estuvo formado por MICA*006 y MICA*009 y el segundo por MICA*004 y MICA*008. Dado que los productos amplificados abarcaron secuencias intrónicas (intrón 1 e intrón 2) adyacentes al exón 2, la diferencia en movilidad entre los dos grupos pudiera deberse a variaciones en los intrones, hecho que fue posteriormente comprobado mediante SBT (*sequencing based typing*). Los alelos de MICA*004 (línea celular PF97387), MICA*006 (línea celular KAS116) y MICA*008 (línea celular MGAR) fueron secuenciados con esta finalidad. MICA*004 y MICA*006 presentaron dos variaciones nucleotídicas ($C_{6858} \rightarrow T$ y $G_{6931} \rightarrow A$) y una variación ($C_{6858} \rightarrow T$) en el intrón 1, respectivamente, cuando se compararon con MICA*008 que fue idéntica a la secuencia reportada anteriormente por Bahram *et al.* 153. Siguiendo con el código asignado a MICA, estas secuencias fueron llamadas 2E4 (MICA*004) y 2E6 (MICA*006).

En forma similar a lo observado en el exón 2, al comparar el exón 4 de los alelos MICA*001 y *002, estos mostraron movilidad diferente al alelo MICA*015 con todas las FLRs probadas. Nuevamente, cuando MICA*002 (WT49) y MICA*015 (OMW) fueron secuenciadas por SBT mostraron una secuencia idéntica en el exón pero diferente en secuencia en los intrones. En el intrón 4 de MICA*015 ocurrieron dos variaciones nucleótidas (delección de G₈₆₃₃ y G₈₆₆₄ → A), y la secuencia nueva fue llamada 4A15.

7.1.2 Selección de las mejores referencias

Todas las FLRs que se probaron fueron hibridadas con los controles de MICA, excepto para los alelos MICA*005, *012, *013, *014 y *016 por no contar con los DNAs. Los valores de movilidad obtenidos en cada exón con cada FLR fueron combinados independientemente con los valores de cada una de las otras FLRs con la finalidad de seleccionar una combinación de FLRs que promovieran la mejor resolución. De esta forma, las FLRs seleccionadas para el exón 2 fueron MICA*001 (EJ32B), MICA*004 (PF97387), MICA*008 (MGAR) y MICA*010 (AMALA); para el exón 3 MICA*001 (EJ32B), MICA*006 (KAS116) y MICA*002 (WT49); para el exón 4 MICA*001 (EJ32B), MICA*004 (PITOUT) y MICA*008 (MGAR); y finalmente para el exón 5 MICA*001 (EJ32B) y MICA*004 (PF97387).

7.1.3 Secuencias nuevas

Después de establecerse las FLRs óptimas y las condiciones experimentales para cada exón, se estudiaron 224 líneas celulares linfoblastoides B por RSCA, en busca de nuevas secuencias.

7.1.3.1 Exón 2

El análisis del exón 2 reveló un pico con una movilidad original, por lo que la línea celular M7 fue clonada y secuenciada. Nuestros resultados demostraron la existencia de una nueva mutación de punto ($T_{76} \rightarrow G$) asignado 2G (Tabla 7.1).

7.1.3.2 Exón 3

Al comparar los resultados obtenidos para el exón 3 con los controles internos (*ladders*), cinco muestras dieron valores originales de movilidad, un ejemplo es presentado en la Fig. 7.1. Las cinco muestras fueron clonadas, en caso de ser heterocigotas, y analizadas por SBT.

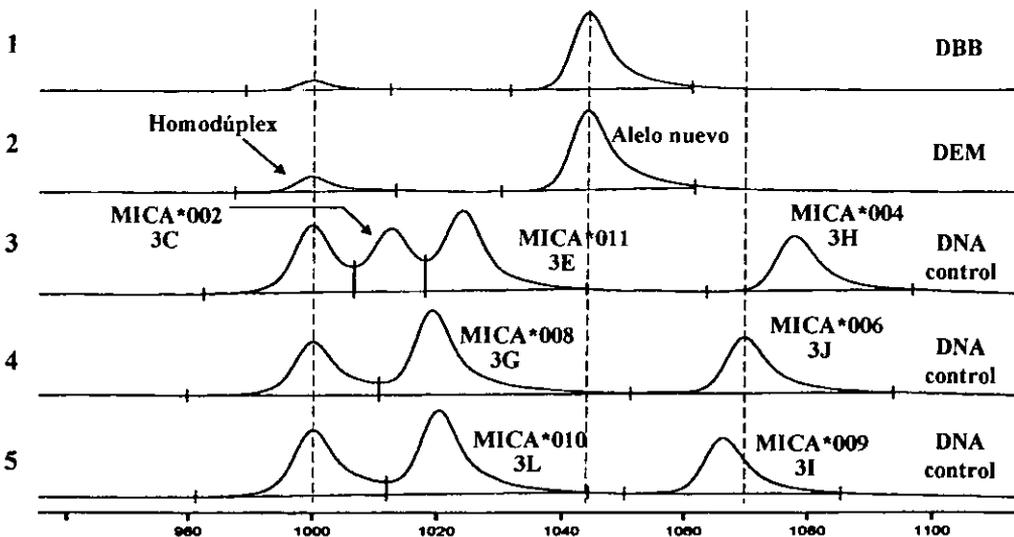


Fig 7.1 Análisis del exón 3 de MICA usando RSCA. La figura muestra los resultados obtenidos en las líneas celulares DBB y DEM usando la FLR (*Fluorescent labelled reference*) MICA*001 (3A) marcada con Cy5. En las líneas 3, 4 y 5 aparecen los controles internos de DNA, los cuales incluyen todas las movilidades presentes en este exón con esta FLR. Al compararse los controles con las muestras se puede ver claramente una nueva movilidad. La secuencia de la línea celular DEM comprobó la existencia de una nueva mutación de punto.

Una de las muestras presentó el código 3B (MICA*012) el cual no había sido incluido en los controles. En cambio las otras muestras resultaron ser secuencias nuevas. Una de las secuencias se parece al código 3C pero uno de los nucleótidos es diferente (A₂₇₁ → G), esta secuencia fue llamada 3M y se encontró en la línea celular homocigota DEM (Tabla 7.1). Otras mutaciones de punto fueron encontradas en las líneas celulares WEWAK1 (A₃₆₉ → T), MFO-ND (G₄₂₃ → A) y RB22 (A₄₆₇ → G), las cuales fueron llamadas 3N, 3O y 3P respectivamente (Tabla 7.1).

Tabla 7.1

Nuevos alelos encontrados con el método de RSCA y confirmados por SBT.

| Alelo | exón 2 | exón 3 | exón 4 | exón 5 | Línea celular | No. de acceso. |
|------------|--------|--------|--------|--------|---------------|--------------------|
| MICA-AN#21 | 2E | 3G | 4H | 5A5 | SWEIG007† | AJ250802 |
| MICA-AN#22 | 2A | 3C | 4A | 5A4 | DO208915‡ | AJ250805 |
| MICA-AN#23 | 2E | 3G | 4K† | 5A5.1 | GUA-ND | AJ250499, AJ250500 |
| MICA-AN#24 | 2E | 3N† | 4H | 5A5 | WEWAK1 | AJ250505 |
| MICA-AN#25 | 2G† | 3C | 4A | 5A9 | M7 | AJ271789 |
| MICA-AN#26 | 2E | 3L | 4H | 5A5 | WT51‡ | AJ250804 |
| MICA-AN#27 | 2C | 3O† | 4A | 5A4 | MFO-ND | AJ250503, AJ250504 |
| MICA-AN#28 | 2B | 3C | 4L† | 5A9 | M7 | AJ250501, AJ250502 |
| MICA-AN#30 | 2C | 3C | 4J† | 5A4 | DEW-ND | AJ250506, AJ250507 |
| MICA-AN#31 | 2B | 3M† | 4A15 | 5A9 | DEM‡ | AJ250803 |
| MICA-AN#32 | 2C | 3P† | 4M† | 5A4v† | RB22 | AJ250990, AJ250991 |
| MICA-AN#33 | 2B | 3C | 4A | 5A10 | 25/1506 | AJ249394 |

† = Código original no descrito anteriormente.

‡ = Líneas celulares homocigotas.

7.1.3.3 Exón 4

El análisis del exón 4 mostró picos con moviidades originales en cinco líneas celulares. Los DNAs de 3 alelos (MICA*005 (código 4G), MICA*013 (código 4D) y MICA*016 (código 4I)) no fueron

disponibles para este análisis. La línea celular homocigota T1S1 fue secuenciada encontrándose el alelo MICA*016 (código 4I). Las cuatro líneas celulares heterocigotas restantes fueron clonadas y secuenciadas, presentando también mutaciones de punto. Estas líneas celulares, DEW-ND (C₇₅₁ → G), GUA-ND (C₇₄₁ → T), M7 (A₆₂₂ → G) y RB22 (G₇₆₇ → T), fueron designadas 4J, 4K, 4L y 4M, respectivamente (Tabla 7.1).

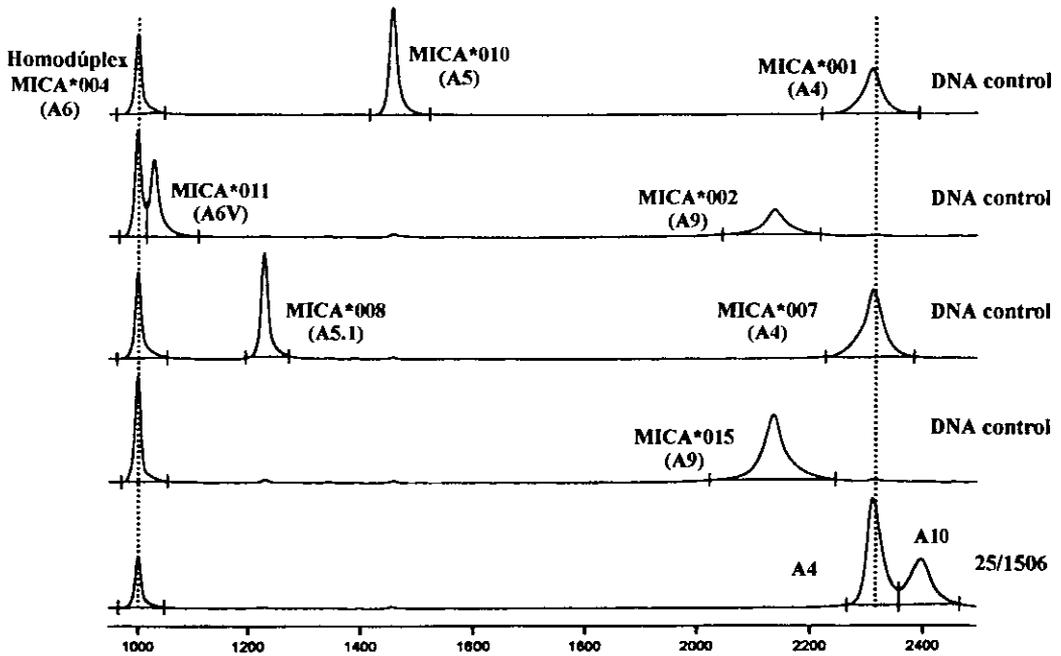


Fig. 7.2 Análisis del exón 5 de MICA por RSCA. Los controles de DNA abarcan todas las repeticiones del microsatélite GCT (A_x). Cuando la línea celular 25/1506 fue analizada con la FLR MICA*004 (PF97387) originó una nueva movilidad no presente en los controles. Esta muestra fue clonada y secuenciada, dando como resultado 10 alaninas (A10).

7.1.3.4 Exón 5

En el exón 5 se encontró una mutación de punto, (C₉₁₅ → T) en la línea celular RB22, la cual se encuentra presente en A6v y A9. De acuerdo con la nomenclatura usada previamente para este exón ¹⁹⁰, esta secuencia fue designada c 5A4v en base a la presencia de cuatro repeticiones del tandem GCT que codifica para el aminoácido alanina (A). Otra nueva movilidad se observó en la línea celular 25/1506 (IHW 9252) (Fig. 7.2), la cual presentó una nueva repetición del tandem, consistiendo en 10 repeticiones, denominada A10 (Tabla 7.1).

7.1.4 Alelos nuevos

Los resultados obtenidos en los exones 2 a 5 fueron combinados para determinar los alelos de cada línea celular. En esta forma, la mayoría de las combinaciones de los códigos obtenidos fueron idénticas a los alelos descritos anteriormente (Tabla 6.3). Sin embargo, en varios casos estas combinaciones fueron diferentes, surgiendo la existencia de alelos nuevos. Las cuatro líneas celulares homocigotas fueron secuenciadas (SBT) confirmando los alelos nuevos detectados por RSCA, por lo que las líneas celulares restantes fueron clonadas y secuenciadas posteriormente. Mediante el análisis por RSCA en total se detectaron 12 alelos MICA nuevos (Tabla 7.1). Para evitar cualquier confusión con la numeración descrita previamente ^{149, 150} los alelos nuevos fueron designados MICA-AN#21 a MICA-AN#33. De los 12 alelos nuevos, ocho fueron generados por mutación de punto, 3 por recombinación de las secuencias existentes y uno por nueva repetición en el microsatélite.

7.1.5 Análisis del exón 5 microsatélite

El análisis previo del exón 5, usando diferentes técnicas, se ha efectuado por separado del análisis de los exones 2-4 ^{190, 206}, el uso de RSCA en nuestro estudio permitió el análisis simultáneo de los cuatro exones. La secuencia previamente reportada del alelo de MICA*016 ²⁰⁷ no incluyó el resultado del exón 5. Nuestros resultados demostraron que en las líneas celulares homocigotas para MICA*016 TISI, RAFF-T, y FPF, se encuentran asociadas con el microsatélite 5A5. En forma similar, el microsatélite 5A4 se encuentra asociado con los alelos MICA*001, *007, *012, -AN#22, -AN#27, y -AN#30; el microsatélite 5A5 con los alelos MICA*010, *016, -AN#21, -AN#24 y -AN#26; la secuencia 5A5.1 con los alelos MICA*008 y -AN#23; el microsatélite 5A6 con MICA*004, *006 y *009; y el microsatélite 5A9 con MICA*002, *015, -AN#25, -AN#28 y -AN#31.

La variante 5A6 reportada por Vitiani *et al.* ²⁰⁶ y nombrada por nosotros como 5A6v fue encontrada en MICA*011, lo cual se confirmó por SBT. Este microsatélite 5A6 se ha asociado con la enfermedad de Behçet ¹⁹⁰, aunque no se ha reportado a cual alelo de MICA corresponde.

Los resultados obtenidos en el exón 5 nos permitieron confirmar la existencia de los microsatélites de MICA descritos previamente en algunas líneas celulares ¹⁹⁰, además de contribuir con la identificación del segundo alelo de las líneas heterocigotas CGM1 y PE117. Así, los resultados del exón 5 en estas dos líneas celulares fueron 5A5.1/5A6v y 5A5.1/5A5, respectivamente.

Por primera vez el exón 5 es incluido en la tipificación de MICA. Dado que algunos alelos poseen la misma secuencia en los exones 2 a 4 y sólo difieren en el exón 5, i.e. MICA*008 vs MICA-AN#21, resulta indispensable estudiar los exones 2-5 para evitar errores en la tipificación de los alelos MICA.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

7.2 Desequilibrio de enlace entre MICA y HLA-B

En nuestro estudio, el desequilibrio de enlace entre los loci MICA y HLA-B fue establecido en base a la comparación con el haplotipo extendido ancestral de las líneas celulares homocigotas²⁰⁸ y mediante el índice de inclusión (INC) que mide el número de veces, expresado como porcentaje, que un alelo HLA-B aparece junto con otro alelo de MICA. Las líneas celulares heterocigotas fueron incluidas en este análisis, siempre que fueran homocigotas para MICA (Tablas. 7.2 y 7.2 A).

Nuestros resultados confirmaron los desequilibrios de enlace, reportados previamente, entre microsatélites y HLA-B (5A4 con B18, 5A5 con B62, 5A5.1 con B7 y B8, 5A6 con B51 y B44, y 5A9 con B35)²⁰⁹, y fueron extendidos con los resultados obtenidos para los alelos MICA.

7.3 Estudio de MICA por SSOP

En el estudio de MICA por SSOP, se usó un conjunto de 30 sondas para detectar los 16 alelos previamente reportados^{149, 150} mediante el análisis de los exones 2-4. El patrón de hibridación de los 16 alelos MICA se encuentra representado en la Tabla 7.3.

A diferencia de los resultados reportados anteriormente ^{149, 150} nuestros resultados obtenidos por SSOP no detectaron la presencia del alelo de MICA*003 en la línea celular homocigota PITOUT, en su lugar identificamos MICA*004 Fig. 7.3. La diferencia entre estos alelos radica en los exones 2 y 4 en donde existe un cambio de nucleótidos en las posiciones 106 y 801, respectivamente. Este resultado fue confirmado por RSCA, indicando que la secuencia del alelo de MICA*003 previamente reportada podría ser errónea.

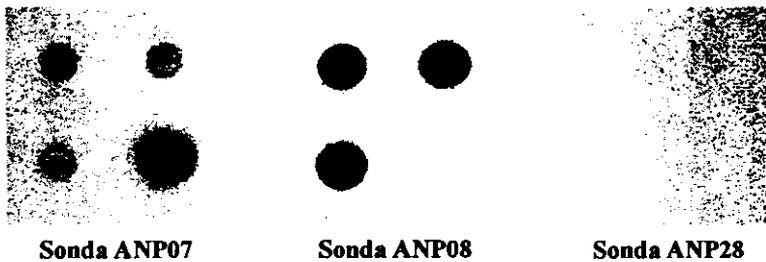


Fig. 7.3 Resultados de MICA*003 usando SSOP. En el primer y tercer cuadro las tres primeras muestras deberían de ser positivas con las sondas ANP07 y ANP28. En cambio, el resultado con la sonda ANP08 debería de ser negativo en caso de que las muestras fueran positivas para MICA*003.

7.4 Estudio de MICB por RSCA

El análisis del exón 4 de MICB por RSCA reveló la existencia de una nueva movilidad en diferentes líneas celulares, indicando la presencia de un nuevo alelo de MICB. Por este motivo secuenciamos algunas muestras (KOSE, RML, KY, DEU y BM92) en el fragmento que comprende el exón 4, intrón 4 y exón 5. Además de secuenciar este grupo de líneas celulares con la nueva movilidad se incluyeron

otras líneas celulares (BM21, E4183124, BOLETH, RSH, PLH, DEM y STEINLIN) de alelos MICB conocidos. Los resultados de la secuenciación mostraron una duplicación de ocho nucleótidos (TGGGGTGA) en la posición 9119-9126 del intrón 4 del alelo de MICB01021 que se encuentra ausente en la secuencia reportada originalmente ¹⁷³, su localización se efectuó en base a la secuencia del DNAC de MICB reportado por Bahram *et al.* ¹⁵⁵ bajo el número de acceso U65416. Este nuevo alelo fue designado MICB01021v. Por su parte, la línea celular RML reportada anteriormente como MICB01023 ¹⁷³ no correspondió a esta secuencia, encontrándose en su lugar el alelo nuevo (MICB01021v). Además, el alelo MICB0104 reportado en la línea celular PLH presentó una mutación de punto adicional en el intrón 4 (G₉₁₆₁ → A).

7.5 Estudio de MICB por SSOP

Para nuestro estudio de MICB por SSOP se usó un conjunto de 42 sondas para detectar las variaciones nucleótidas reportadas al momento, así que cualquier patrón de hibridación inesperado pudiera ser el resultado de una nueva sustitución nucleótida que revele un nuevo alelo MICB. El patrón de hibridación de los 16 alelos de MICB se encuentra representado en la Tabla 7.4. De las 130 muestras analizadas, seis líneas celulares (EMJ, SWEIG007, STEPH, WT49, 32511 y GEE018) no se pudieron definir, sugiriendo la presencia de un alelo nuevo para MICB. Las muestras homocigotas (EMJ, SWEIG007, STEPH y WT49) fueron secuenciadas directamente, y las otras fueron clonadas y secuenciadas. La línea celular WT49 presentó la secuencia de MICB0106 pero con una variación nucleótida en el intrón 2 (A₇₇₈₀ → G), el número corresponde a la secuencia del DNAC de MICB reportado por Bahram *et al.* ¹⁵⁵ bajo el número de acceso U65416. Este alelo fue nombrado

MICB0106v. Las líneas celulares EMJ, SWEIG007 y STEPH también presentaron una nueva mutación de punto ($G_{258} \rightarrow A$) en el exón 4, Fig. 7.3. SWEIG007 mostró una variación nueva del alelo MICB01022 y las líneas celulares EMJ y STEPH una variación en el alelo MICB0103101. Motivo por el cual fueron designadas MICB01022v y MICB0103101v, respectivamente. Las líneas celulares 32511 y GEE018 mostraron los alelos MICB01021 y MICB0106v.

7.6 Desequilibrio de enlace entre MICB, MICA y HLA-B

A partir de los resultados obtenidos en MICB fue posible evaluar el desequilibrio de enlace con MICA y HLA-B (Tabla 7.5) y comparar nuestros resultados con los haplotipos extendidos ancestrales presentes en las líneas celulares homocigotas ²⁰⁸.

7.7 Resultados de MICA/B en las líneas celulares

Al finalizar el estudio se recabaron los resultados de MICA y MICB obtenidos por RSCA y SSOP. En la Tabla 7.6 se muestran algunos ejemplos de estos resultados.

↓ exón 2

MICB01022v agccccacagcttcgttacaaacctcatggtgctgtcccaggatggatctgtgcagtcagggttctcgtgaggacac-tc
MICB0103101v agccccacagcttcgttacaaacctcatggtgctgtcccaggatggatctgtgcagtcagggttctcgtgaggacacatct
MIB0106v agccccacagcttcgttacaaacctcatggtgctgtcccaggatggatctgtgcagtcagggttctcgtgaggacacatct
cons. -----

MICB01022v tggtcagcccttcctgcgctatgacagggcagaacacagggcaaacccccaggcaagccccaggacagtgggcagaagaatgtcctgggagct
MICB0103101v tggtcagcccttcctgcgctatgacagggcagaacacagggcaaacccccaggacagtgggcagaagaatgtcctgggagct
MIB0106v tggtcagcccttcctgcgctatgacagggcagaacacagggcaaacccccaggacagtgggcagaagaatgtcctgggagct
cons. -----

MICB01022v acctgggacacagagaccgaggaacttgacagagaaatgggcaagaccctcaggaggaccctgaactcatatcaaggaccagaaga
MICB0103101v acctgggacacagagaccgaggaacttgacagagaaatgggcaagaccctcaggaggaccctgaactcatatcaaggaccagaaga
MIB0106v acctgggacacagagaccgaggaacttgacagagaaatgggcaagaccctcaggaggaccctgaactcatatcaaggaccagaaga
cons. -----

↓ intrón 2

MICB01022v gtgaggtcggcagggcagaagtaatggggccctctccaggaaagtgggacagagagcaggggacctgtctctcccg
MICB0103101v gtgaggtcggcagggcagaagtaatggggccctctccaggaaagtgggacagagagcaggggacctgtctctcccg
MIB0106v gtgaggtcggcagggcagaagtaatggggccctctccaggaaagtgggacagagagcaggggacctgtctctcccg
cons. -----



MICB01022v gatctggctgggggtggggtgaggaatagggtcagggaggtcagcaggtggtgagccggaaactcagcccacacagggag
MICB0103101v gatctggctgggggtggggtgaggaatagggtcagggaggtcagcaggtggtgagccggaaactcagcccacacagggag
MIB0106v gatctggctgggggtggggtgaggaatagggtcagggaggtcagcaggtggtgagccggaaactcagcccacacagggag
cons. -----

MICB01022v tggagggggccagggaggggtcgcgctgggctgagttcctcactgggtggaaggtgatgggttcgggaaatggagaagt
MICB0103101v tggagggggccagggaggggtcgcgctgggctgagttcctcactgggtggaaggtgatgggttcgggaaatggagaagt
MIB0106v tggagggggccagggaggggtcgcgctgggctgagttcctcactgggtggaaggtgatgggttcgggaaatggagaagt
cons. -----

↓ exón 3

MICB01022v tgcctgggtggggcaggttgcattccctccaggagattagggtctgtgagatccatgaagacagcagcaccaggggtccc
MICB0103101v tgcctgggtggggcaggttgcattccctccaggagattagggtctgtgagatccatgaagacagcagcaccaggggtccc
MIB0106v tgcctgggtggggcaggttgcattccctccaggagattagggtctgtgagatgcatgaagacagcagcaccaggggtccc
cons. -----

```

MICB01022V      atttctacagatggggagctcttccctcctcccaaaacctggagactcaagaatgacagtgccccagtccccagtgctca
MICB0103101V   atttctacaatggggagctcttccctcctcccaaaacctggagactcaagaatgacagtgccccagctccctccagagtca
MICB0106V      atttctacaatggggagctcttccctcctcccaaaacctggagactcaagaatgacagtgccccagctccctccagagtca
cons.          -----*-----

MICB01022V      cttggctatgaecgtcacaaaatttctggaaggaagatgccatgaagaccaagacacaciatcgggctatgcagggcagactgc
MICB0103101V   cttggctatgaacgtcacaaaatttctggaaggaagatgccatgaagaccaagacacaciatcgggctatgcagggcagactgc
MICB0106V      cttggctatgaacgtcacaaaatttctggaaggaagatgccatgaagaccaagacacaciatcgggctatgcagggcagactgc
cons.          -----

MICB01022V      cagaaactacagcgatattctgaaatccgggggtggccatcagggaaacag.....
MICB0103101V   cagaaactacagcgatattctgaaatccgggggtggccatcagggaaacag.....
MICB0106V      cagaaactacagcgatattctgaaatccgggggtggccatcagggaaacag.....
cons.          -----

MICB01022V      ↓ exon 4
MICB0103101V   tgcccccatggtgaatgtcacctgcagcgaggtctcagaggggcaaacataccogtgacatgcaggggttccagcttctatcc
MICB0106V      tgcccccatggtgaatgtcacctgcagcgaggtctcagaggggcaaacataccogtgacatgcaggggttccagcttctatcc
cons.          -----

MICB01022V      aaatatcacaactgacctggcgtcaggatgggggtatctttgagccaacacaccccagtcagtggggggatgtcctcctgatggg
MICB0103101V   gaatatcacaactgacctggcgtcaggatgggggtatctttgagccaacacaccccagtcagtggggggatgtcctcctgatggg
MICB0106V      gaatatcacaactgacctggcgtcaggatgggggtatctttgagccaacacaccccagtcagtggggggatgtcctcctgatggg
cons.          -----*-----

MICB01022V      ggaacctaccagacctgggtggccaccagattcgccaaggagagagagaggttcaccgtctacatggaacacagcggga
MICB0103101V   ggaacctaccagacctgggtggccaccagattcgccaaggagagagagaggttcaccgtctacatggaacacagcggga
MICB0106V      ggaacctaccagacctgggtggccaccagattcgccaaggagagagagaggttcaccgtctacatggaacacagcggga
cons.          -----

MICB01022V      #
MICB0103101V   acagcactcaccctgtgcccctctggtgagcctggggtgacccctggagaggtcagccagggtaggaaacagcaggggagcgct
MICB0106V      acagcactcaccctgtgcccctctggtgagcctggggtgacccctggagaggtcagccagggtaggaaacagcaggggagcgct
cons.          -----*-----

```

```

MICB01022v      gctctgtgccagtgataacaagaagtccttttttcagggaagcgctggtgcttcagagtcacacggacagactttccatat
MICB0103101v   gctctgtgccagtgataacaagaagtccttttttcagggaagcgctggtgcttcagagtcacacggacagactttccatat
MIB0106v       gctctgtgccagtgataacaagaagtccttttttcagggaagcgctggtgcttcagagtcacacggacagactttccatat
cons.          -----

MICB01022v     tctgctgtctatgccatgttttggttattattattattctctgtgtcccttgttgcaagaagaacacatcagcggcagagggtc
MICB0103101v   tctgctgtctatgccatgttttggttattattattattctctgtgtcccttgttgcaagaagaacacatcagcggcagagggtc
MIB0106v       tctgctgtctatgccatgttttggttattattattattctctgtgtcccttgttgcaagaagaacacatcagcggcagagggtc
cons.          -----

```

Fig. 7.4 Secuencia de alelos nuevos de MICB encontrados en el estudio por SSOP. Las siguientes líneas celulares presentaron un patrón diferente durante el análisis por SSOP. Los datos de secuenciación indicaron la presencia de 3 alelos nuevos MICB01022v (SWEIG007), MICB0103101v (EMJ, STEP) y MICB0106v (WT49). ↓ indica el inicio de los exones e intrones; ♦ indica la posición de las variaciones nucleótidas en MICB0106 que se encuentran ausentes en MICB0106v; # indica la nueva mutación de punto en MICB01022v y MICB0103101v.

Tabla 7.2

Desequilibrio de enlace entre los alelos de MICA y HLA-B en base haplotipos extendidos ancestrales

| Haplotipo† | HLA-DQB1 | HLA-DQA1 | HLA-DR | MICA* | HLA-B | HLA-C | HLA-A | No.‡ |
|------------|--------------|----------------|-----------------|------------|---------------|---------------|---------------|--------------|
| 18.2 | *0201 | *0501 | 17(3) | 001 | 18 | 5 | *3002 | 2 |
| | *0201 | *05011 | *0301 | 001 | *1801 | *0501 | *2601 | 2 |
| | *0301 | *0505 | *1102 | 001 | *1801 | *0501 | *0201 | 2 |
| | <i>*0201</i> | <i>*0501</i> | <i>3</i> | <i>001</i> | <i>18</i> | <i>5</i> | - | <i>4/6</i> |
| 35.3 | *0501 | *0101 | *0101 | 002 | 35 | 4 | 11 | 2 |
| | ? | *0101 | *0101 | 002 | 35 | 4 | *0201 | 1 |
| | ? | *0101 | *0103 | 002 | 35 | 4 | 03 | 1 |
| | - | <i>*0101</i> | <i>1</i> | <i>002</i> | <i>35</i> | <i>4</i> | - | <i>4/4</i> |
| 7.1 | *0602 | *0102 | 15(2) | 008 | 7 | 7 | *0301 | 1 |
| | *0602 | *01021 | *1501 | 008 | *0702 | *0702 | *0301 | 2 |
| | ? | ? | 15(2) | 008 | 7 | 7 | *0201 | 1 |
| | ? | ? | 2 | 008 | 7 | 7 | *0201 | 2 |
| | *0302 | *03 | *0401 | 008 | *0702 | *0702 | *0301 | 2 |
| | *0603 | *0103 | *1301(6) | 008 | *0702 | *0702 | *0301 | 2 |
| | ? | ? | ? | 008 | 7 | 7 | *0301 | 1 |
| | *0201 | ? | *0305 | 008 | 7 | 7 | *0301 | 1 |
| | *0402 | ? | *0801 | 008 | 7 | 7 | *0101 | 1 |
| | - | - | - | <i>008</i> | <i>7</i> | <i>7</i> | <i>*0301</i> | <i>9/13</i> |
| 8.1 | *0201 | *0501 | *0301 | 008 | *0801 | *0701 | *0101 | 2 |
| | ? | *0501 | 17(3) | 008 | *0801 | 7 | *0101 | 6 |
| | ? | ? | 17(3) | 008 | *0802 | 7 | *0101 | 2 |
| | ? | ? | 103 | 008 | 8 | 7 | *0101 | 1 |
| | ? | ? | ? | 008 | 8 | 7 | *0101 | 1 |
| | *0602 | *01021 | *1501(2) | 008 | *0801 | *0701 | *2601 | 2 |
| | - | <i>*0501</i> | <i>3</i> | <i>008</i> | <i>*0801</i> | <i>7</i> | <i>*0101</i> | <i>8/14</i> |
| 37.1 | *0501 | *0104 | *1001 | 008 | 37 | 6 | 1 | 2 |
| | ? | *0102 | 15 | 008 | 37 | 6 | *0101 | 2 |
| | - | - | - | <i>008</i> | <i>37</i> | <i>6</i> | <i>1</i> | <i>4/4</i> |
| 13.1 | *0201 | *0201 | *0701 | 008 | *1302 | 6 | *3001 | 2 |
| | <i>*0201</i> | <i>*0201</i> | <i>*0701</i> | <i>008</i> | <i>*1302</i> | <i>6</i> | <i>*3001</i> | <i>2/2</i> |
| 62.1 | *0302 | *0300/1 | 4 | 010 | 62(15) | 3 | 2 | 4 |
| | ? | ? | *4011 | 010 | 15 | *0304 | *0201 | 2 |
| | *0402 | *0401 | *8022 | 010 | *1501 | *0304 | *31012 | 1 |
| | *0301 | *0503 | *1402 | 010 | *1501 | *0303 | *0217 | 4 |
| | ? | ? | 16 | 010 | *1504 | *03031 | *0201 | 1 |
| | ? | ? | ? | 010 | *1512 | 3 | *2403 | 1 |
| | - | - | - | <i>010</i> | <i>15</i> | <i>3</i> | <i>2</i> | <i>11/13</i> |
| 35.4 | *0301 | *0501 | *1103 | 016 | 35 | *0401 | *2402 | 2 |
| | ? | ? | 11 | 016 | 35 | 4 | *0101 | 2 |
| | *0603 | *0103 | 11 | 016 | 35 | *0401 | *0101 | 2 |
| | - | - | <i>11</i> | <i>016</i> | <i>35</i> | <i>4</i> | - | <i>6/6</i> |

El haplotipo extendido en algunos alelos de MICA se encuentra interrumpido del lado del locus HLA-A o HLA-DR, sin embargo se conservan dentro de la región HLA-B y HLA-C. En realce: se presentan las partes conservadas dentro del haplotipo extendido. En itálicas: el segmento mínimo conservado. † = No. del haplotipo extendido tomado de Dawkins R. *et al.* 208‡ = No. de cromosomas con el haplotipo extendido.

Tabla 7.2 A**Desequilibrio de enlace entre los alelos de MICA y HLA-B en base al índice de inclusión (INC).**

| MICA | HLA-B | INC | No. de muestras |
|---------|-------|------|-----------------|
| *004 | 44031 | 0.5 | 11/22 |
| *009 | 51 | 0.5 | 8/16 |
| *011 | 14 | 0.66 | 4/6 |
| -AN#021 | 40 | 0.6 | 6/10 |
| -AN#022 | 18 | 0.83 | 5/6 |
| -AN#026 | 1401 | 0.5 | 4/8 |
| -AN#031 | 5701 | 0.6 | 6/10 |

Tabla 7.5.
Desequilibrio de enlace entre los alelos de MICB, MICA y HLA-B en base haplotipos extendidos ancestrales

| Haplotipo † | HLA-DQA | HLA-DQB | HLA-DR | MICB | MICA* | HLA-B | HLA-C | HLA-A | No‡ |
|-------------|---------------|---------------|---------------|--------------|--------------|---------------|---------------|---------------|------------|
| 7.1 | *01021 | *0602 | *1501 | 0104 | *008 | *0702 | *0702 | *0301 | 2 |
| | *01021 | *0602 | *1501 | 0104 | *008 | *0702 | *0702 | *0301 | 2 |
| | 3 | *0302 | *0401 | 0104 | *008 | *0702 | *0702 | *0301 | 2 |
| | *0103 | *0603 | *1301 | 0104 | *008 | *0702 | *0702 | *0301 | 2 |
| | *03011 | | 4 | 0104 | *008 | *0702 | *0702 | *02011 | 2 |
| | | | 13 | 0104 | *008 | *0702 | *0702 | *02011 | 2 |
| - | - | - | <i>0104</i> | <i>*008</i> | <i>*0702</i> | <i>*0702</i> | - | <i>12/12</i> | |
| 8.1 | *05011 | *0201 | *0301 | 0106 | *008 | *0801 | *0701 | *0101 | 2 |
| | | | 17 | 0106 | *008 | *0801 | 7 | 1 | 1 |
| | | | 17 | 0106 | *008 | *0802 | 7 | 1 | 1 |
| | - | - | - | <i>0106</i> | <i>*008</i> | <i>*0801</i> | <i>7</i> | <i>1</i> | <i>4/4</i> |
| 13.1 | *0201 | *0201 | *0701 | 01021 | *008 | *1302 | *0602 | *3001 | 2 |
| | *0201 | *0202 | *0701 | 01021 | *008 | *1302 | *0602 | *0201 | 2 |
| | *0201 | *0201 | *0701 | <i>01021</i> | <i>*008</i> | <i>*1302</i> | <i>*0602</i> | - | <i>4/4</i> |
| 18.2 | *05011 | *0201 | *0301 | 01021 | *001 | *1801 | *0501 | *3002 | 2 |
| | *05011 | *0201 | *0301 | 01021 | *001 | *1801 | *0501 | 3 | 2 |
| | *0501 | | 3 | 01021 | *001 | *1801 | *0501 | *3002 | 2 |
| | | | *0301 | 01021 | *001 | *1801 | *0501 | *2402 | 2 |
| | - | - | 3 | <i>01021</i> | <i>*001</i> | <i>*1801</i> | <i>*0501</i> | - | <i>8/8</i> |
| 44.2, 44.3 | *0201 | *0202 | *0701 | 01021 | *004 | *44031 | *1601 | *2902 | 1 |
| | *0201 | *0202 | *0701 | 01021 | *004 | *44031 | *1601 | *2902 | 1 |
| | 03 | | 4 | 01021 | *004 | *44031 | *1601 | *2902 | 2 |
| | - | - | - | <i>01021</i> | <i>*004</i> | <i>*4403</i> | <i>*1601</i> | <i>*2902</i> | <i>4/4</i> |
| 46.2 | *0103 | *06011 | *08032 | 01021 | *010 | *4601 | *0102 | *0207 | 2 |
| | *0103 | | *0801 | 01021 | *010 | *4601 | *0102 | 2 | 2 |
| | | | 9 | 01021 | *010 | *4601 | *0102 | *0207 | 1 |
| | | | 12 | 01021 | *010 | *4601 | *0102 | *0207 | 1 |
| | | | 8.1 | 01021 | *010 | 46 | 1 | *0215N | 2 |
| | - | - | - | <i>01021</i> | <i>*010</i> | <i>46</i> | <i>1</i> | - | <i>8/8</i> |
| 52.1 | *0103 | *06011 | *1502 | 01022 | *009 | *5201 | *12022 | *2402 | 2 |
| | *0103 | *06011 | *15021 | 01022 | *009 | *52011 | *1202 | *0101 | 2 |
| | - | - | - | <i>01022</i> | <i>*009</i> | <i>52</i> | <i>*1202</i> | - | <i>4/4</i> |

El haplotipo extendido en algunos alelos se encuentra interrumpido del lado del locus HLA-A o HLA-DR, sin embargo se conservan dentro de la región de MICB y HLA-C. En realce: se presentan las partes conservadas dentro del haplotipo extendido. En itálicas: el segmento mínimo conservado. † = No. del haplotipo extendido tomado de Dawkins R. *et al.* 208 ‡ = No. de cromosomas con el haplotipo extendido.

Tabla 7.6
Resultados de MICA y MICB†

| Cell Names | HLA-DR | MICB | MICA | HLA-B | HLA-Cw | HLA-A | Ethnic origin |
|------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-----------------|
| 22658 | 13, 17 | 01021, 0106 | *008, *011 | 8 Jon , 14 | 7, 8 | 1, 3 | Welsh Caucasoid |
| AKIBA | *1502 | 01022 | *009 | *5201 | *12022 | *2402 | Japanese |
| AM | 4 | 0104 | *004, *008 | *4901, *4001 | *0701, *0304 | *0205, *3201 | English |
| BER | *0701 | 01021 | *008 | *1302 | *0602 | *0201 | German |
| BM15 | *1102 | 01021 | *004 | *4901 | *0701 | *0101 | Italian |
| BOB | *1104 | 0103101 | *009 | *5101 | *1502 | *2402 | German |
| BON14-CT | 0103, 14 | 01021 | *002, *004 | *44031, *35 | *1601, *04 | *03, *01 | French |
| BRIP | *1101 | 01021, 0104 | *008, *009 | *5101, *1517 | *0701, *1504 | *2402 | Italian |
| BTB | *0801 | 01021 | *007 | *27052 | *0102 | *0201 | Scandinavian |
| CALOGERO | *1601 | 01021 | -AN#21 | *4002 | *02022 | *0201 | Italian |
| CEM-CCRF | - | 0104, 0106 | *008 | 8, 40 | 7, 9 | 1, 31 | Caucasoid |
| CF996 | *0701 | 01021 | -AN#26 | *1401 | *0802 | *0201, *0301 | French |
| CJO-A | - | 0103101 | *002 | *35 | *0401 | *11011 | Unknown |
| COR-NF | 2, 0103 | 01021, 0104 | *008 | 7, 8 | 7 | 1, 2 | Caucasoid |
| DEM | *0401, *1602 | 0105 | -AN#31 | *5701 | *0602 | *0201 | German |
| DHIF | 11 | 0104 | -AN#26 | *3801 | *1203 | *3101 | English |
| DKB | *09012 | 01021, 0106 | *008 | *4001 | *0304 | *2402 | Dutch |
| DUCAF | *0301 | 01021 | *001 | *1801 | *0501 | *3002 | French |
| EA | *1501 | 0104 | *008 | *0702 | *0702 | *0301 | Scandinavian |
| EC | *0411 | 01021 | *011, -AN#21 | 14, 61 | - | 2, 68 | Hispanic |

| | | | | | | | |
|---------|--------------|----------------|--------------|------------|-------------|--------------|---------------|
| H0301 | *1302 | 01021 | *008 | *1402 | *0802 | *0301 | Caucasoid |
| HHKB | *1301 | 0104 | *008 | *0702 | *0702 | *0301 | Dutch |
| HOR | *1302 | 01021 | *004 | *44031 | *1403 | *3303 | Japanese |
| IBW9 | *0701 | 01021 | *011 | *1402 | *0802 | *3301 | Sardinian |
| JY | 4, 13 | 0104 | *008 | *0702 | *0702 | *02011 | Amish |
| KGU | *1404 | 01021v | *002 | 35 | 4 | 11 | Caucasoid |
| KOSE | *1302, *1401 | 01021v | *002 | *3503 | *1203 | *0201 | German |
| KT11 | 13 | 01021 | *004 | *44031 | *1403 | *33 | Japanese |
| KY | - | 01021v | *012 | *5901 | 1 | *0206, *2402 | Oriental |
| L7901 | *4, *11 | 01021, 0104 | *008 | *0706 | *06, *15052 | 3, 30 | Spanish |
| LB2F2 | - | 01021, 0105 | *008, -AN#31 | *13, *57 | *06 | *30, *31 | Unknown |
| LBF | *0701 | 01021 | *008 | *1302 | *0602 | *3001 | English |
| LUY | *08032 | 01021 | *009 | *5101 | *14021 | *0201 | Dutch |
| MOU | *07011 | 01021 | *004 | *44031 | *1601 | *2902 | Danish |
| NALM-6 | 3, 7 | 01021, 0106 | *008, *010 | 8, 62 | 4, 7 | 1, 2 | Unknown |
| OMW | *1301 | 0103101 | *015 | *4501 | *1601 | *0201 | African Black |
| PA | - | 0103102 | *002, *011 | *38, *14 | *08, *1203 | *6802, *2601 | Unknown |
| PF97387 | 4 | 01021 | *004 | *44031 | *1601 | *2902 | French |
| PLH | *0701 | 0104 | *008 | *4701 | *0602 | *0301 | Scandinavian |
| S11 | 2, 17 | 0104, 0106 | *008 | 7, 8 | 7 | 1, 2 | Caucasoid |
| SHIM | *0801 | 01021 | *010 | *4601 | *0102 | 2 | Unknown |
| SLUGEO | 1 | 01021, 0103101 | *002, *008 | *4402, *35 | *0501, *04 | *0213, *1101 | Caucasoid |
| SPO010 | *1101 | 01021 | *008 | *4402 | *0501 | *0201 | Italian |

| | | | | | | | |
|--------|--------|----------------|--------------|------------|------------|--------------|-----------|
| T7527 | 9, 12 | 01021 | *010 | *4601 | *0102 | *0207 | Chinese |
| TAB089 | *08032 | 01021 | *010 | *4601 | *0102 | *0207 | Japanese |
| TEM | *1401 | 0103102 | *002 | *3801 | *1203 | *6601 | Jewish |
| TSU | 8.1 | 01021 | *010 | 46 | 1 | *0215N | Oriental |
| VAVY | *0301 | 0106 | *008 | *0801 | *0701 | *0101 | French |
| VOO | - | 01021v, 0106 | *008, *012 | *5601 | 1 | *0101, *0301 | Caucasoid |
| WIN | *0701 | 0105 | *002 | *5701 | *0602 | *0101 | German |
| WT47 | *1302 | 01021 | *008 | *4402 | *0501 | *3201 | Italian |
| XLI-ND | 7, 9 | 01021, 0103101 | *008, -AN#21 | *13, *4006 | *0602, *08 | *0210, *3001 | Chinese |

†Sólo se incluyeron algunos resultados

CAPÍTULO 8

DISCUSIÓN

A pesar de que la función de las moléculas MIC no ha sido establecida con claridad, en los últimos años se ha incrementado el interés por el estudio de los genes MIC. La mayoría de los estudios se han enfocado a MICA, en parte por que es una molécula más polimórfica que MICB. Existen numerosos estudios sobre la asociación de polimorfismos MICA con diferentes enfermedades ^{149, 150, 177, 178, 180, 190, 206, 209}, y sobre la interacción de las moléculas MIC con las células T $\gamma\delta$ y más recientemente con el receptor de MIC, NKG2D/DAP10 ^{160, 161}. Estos últimos estudios han llevado a sugerir que la sobreexpresión de las moléculas MIC en la superficie celular podría ser una señal de estrés para las células que poseen este receptor.

Dado que las diferencias entre los alelos de MICA podrían influenciar en la interacción con el receptor, consideramos de gran importancia investigar con mayor precisión el extenso polimorfismo de MIC. Para ello, en este estudio usamos RSCA como una técnica molecular de alta sensibilidad para un rápido tamiz de 224 y 130 líneas celulares homocigotas y heterocigotas, para el análisis de todos los alelos conocidos al momento y la identificación de nuevas variantes de MICA y MICB, además de aplicar la técnica de SSOP usando un conjunto de sondas que cubren todas las posiciones polimórficas conocidas al momento.

Aplicando dicha metodología, fue posible revelar un extenso polimorfismo en el gene MICA, confirmando que el locus MICA podría ser tan polimórfico como los loci HLA. Así, en nuestro estudio se detectaron 14 nuevas variaciones nucleotídicas en el gene MICA, 10 de las cuales aparecen en los exones, y en total se describieron 12 alelos MICA nuevos (Tabla 7.1). El extenso polimorfismo de los alelos MICA parece estar basado principalmente en mutaciones de punto con subsecuente recombinación de los exones. Este mecanismo puede aumentar la variabilidad sin introducir mutaciones potencialmente deletéreas. Se ha asumido que un mecanismo similar participa en la generación del polimorfismo del MHC 64, 210.

Con respecto a MICB, se encontraron cuatro nuevas variaciones nucleótidas, localizándose una en el exón cuatro, dos en el intrón 4 (una de las cuales es la duplicación de 8 nucleótidos) y una en el intrón 2, originando así cuatro alelos nuevos. A la fecha se han descrito para MICB 21 variaciones nucleótidas en los exones 2 a 5 e intrones 173-175, 211. De éstos, 15 sustituciones se encuentran en los exones y 12 son no-sinónimas.

Conjuntando las variaciones nucleótidas encontradas en este trabajo con los datos previamente reportados 149, 150, 190, 206, podemos concluir que existen un total de 44 variaciones nucleótidas en MICA comprendidas entre los exones 2 y 5, excluyendo el microsatélite del exón 5, de las cuales 32 son no-sinónimas (5/8 en α_1 , 15/16 en α_2 , 10/17 en α_3 y 2/3 in TM) y 12 sinónimas.

Una característica del polimorfismo del gene de MICA es la predisposición en la distribución de los codones sinónimos y no-sinónimos. En las secuencias nucleotídicas al azar, dentro de una secuencia codificante, la proporción de cambio de sitios sinónimos (dS) debería ser la misma que la de sitios no-

sinónimos (dN). La selección para mantener la secuencia de la proteína resulta en una relación dN/dS menor que 1.0, mientras la selección para variación resulta en una relación dN/dS mayor a 1.0 ²¹². Esta evaluación para los alelos MICA muestra una relación dN/dS considerablemente mayor a 1 (1.1857 - 1.7785) para el dominio α_2 , mientras que para el dominio α_1 es menos que 1 (0.2836 - 0.2858). Esta predisposición en la relación entre sustituciones sinónimas y no-sinónimas, en los diferentes alelos, está enfocada en el dominio α_2 y argumenta en contra de variaciones que surgen por fijación de eventos de mutación al azar, y sugiere que el polimorfismo de MICA es mantenido por la selección.

La distribución de los residuos polimórficos en MICA es diferente a la encontrada en las moléculas del MHC clase I, donde la mayoría de los sitios polimórficos se encuentran en los dominios α_1 α_2 y en los residuos del sitio de unión del péptido. Un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de MICA*001 con HLA-B*2704 adaptada de Li *et al.* ¹⁵⁷, basado en la comparación de ambas estructuras primaria y terciaria, nos permitió localizar las posiciones polimórficas encontradas en MICA y compararlas con las observadas en HLA-B (Fig. 8.1).

El dominio α_1 presenta en la plataforma β plegada 5 sustituciones no-sinónimas, de las cuales dos posiciones (6 y 14) se encuentran dirigidas hacia abajo de la plataforma. Los residuos 24 y 26 son dimórficos y se encuentran dirigidos al interior de la plataforma. Es de interés resaltar que el residuo 36 es dimórfico, la cisteína encontrada en esta posición forma un enlace disulfuro con la cisteína de la posición 41, formando así un lazo (*loop*) de cuatro residuos en la estructura de MICA*001 ¹⁵⁷ y que el cambio de este aminoácido por tirosina en algunos alelos, podría tener implicaciones en la rigidez de la estructura de esta región entre los diferentes alelos de MICA.

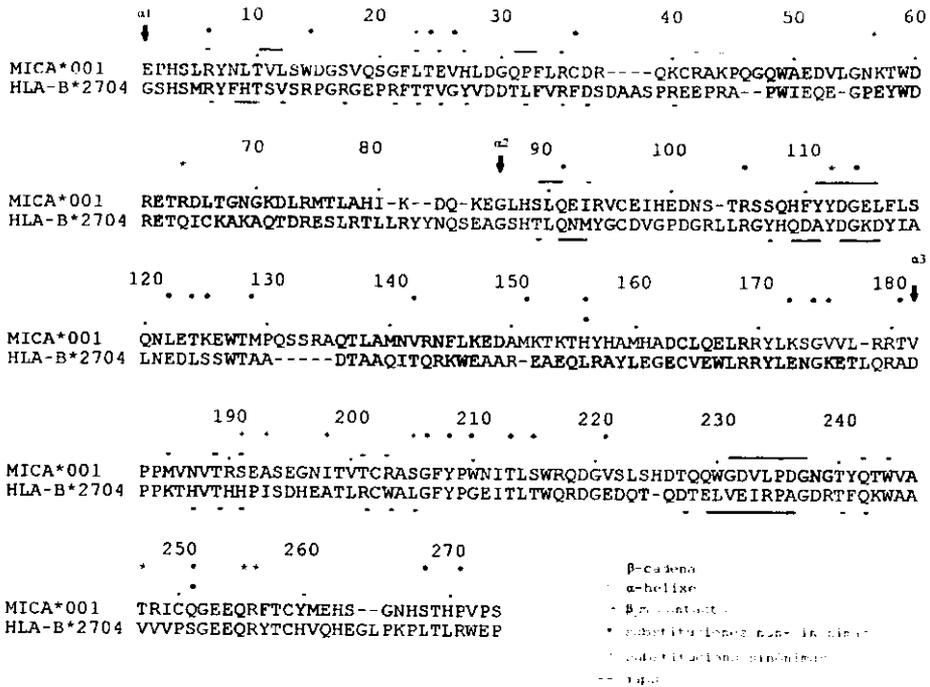


Fig. 8.1 Comparación de los sitios polimórficos en la secuencia de MICA y HLA-B27. La localización de los sitios polimórficos se muestra en la secuencia de la molécula de MICA*001 157. Los aminoácidos 142-147 son la inserción reportada por Bahram *et al.* 149. Los aminoácidos 152-161 forman la región del desorden y 147-151 son el lazo (*loop*) reportado por Li *et al.* 157.

El dominio $\alpha 2$ presenta otras dos sustituciones no-sinónimas en las posiciones 91 y 105, nuevamente ambas se encuentran dirigidas hacia abajo de la plataforma β plegada. Las sustituciones de 10 aminoácidos (114, 122, 124, 125, 129, 151, 173, 175, 176 y 181) se localizan dentro de las regiones de lazo de la molécula de MICA y el aminoácido de la posición 142 se encuentra en la α hélice, en todos estos casos las posiciones son dimórficas, sin embargo, el residuo 156 es polimórfico con tres diferentes aminoácidos en esta posición. En el dominio $\alpha 3$ existen seis sustituciones en la cadena β , los residuos

206, 213, 215, 221, 268 y 271, y dos en el lazo (residuos 208 y 210) siendo todas las posiciones dimórficas. El residuo 251 localizado en el lazo es también polimórfico y presenta tres diferentes aminoácidos en esta posición.

Los residuos polimórficos en MICA están distribuidos principalmente en la porción extracelular de la molécula, a diferencia del patrón de polimorfismo observado en las moléculas de HLA clase I donde las sustituciones no-sinónimas predominan en los dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$. En MICA la mayoría de las sustituciones no-sinónimas están localizadas dentro de $\alpha 2$ y en menor extensión en el dominio $\alpha 3$, en tanto que en MICB la mayoría de las sustituciones no-sinónimas se encuentran en el dominio $\alpha 1$.

Una comparación de la estructura cristalográfica de MICA y HLA clase I revela diferencias importantes entre las dos estructuras, principalmente en el dominio $\alpha 2$ (Fig. 8.2). En el dominio $\alpha 2$ de MICA se encuentra una inserción de 6 aminoácidos en las posiciones 142-147¹⁴⁹, la cual se encuentra unida por un lazo a los residuos 147-151, y continua a una región de desorden de 10 aminoácidos 152-161. Se ha sugerido que estos residuos (152-161) forman la estructura de una plataforma y son libres de moverse en solución, posiblemente creando un *pocket* en la superficie de la molécula¹⁵⁷ y se ha considerado que este *pocket* puede ser el sitio de unión de un ligando no peptídico aún no identificado¹⁵⁷.



Fig. 8.2 Localización de los sitios polimórficos en la molécula MICA. Los sitios polimórficos en los dominios $\alpha_1\alpha_2$ se encuentran en la periferia de los dominios o debajo de la plataforma de la cadena β . En el dominio α_3 los sitios polimórficos se encuentran casi exclusivamente en un lado del dominio α_3 . Los aminoácidos de la cadena β plegada del dominio α_1 están en verde, α_2 en rojo y α_3 en azul cyan. Los aminoácidos en el loop de α_2 están en negro y α_3 en violeta. El aminoácido de la hélice α en α_2 es magenta

El papel de las moléculas MIC como ligando del receptor de la célula NK (NKG2D/DAP10) ha sido descubierto recientemente ^{160, 161}. El sitio preciso donde interactúan los miembros de esta familia de receptores y las moléculas relacionadas a clase I no se ha identificado. En el dominio α_3 los sitios polimórficos de MICA se encuentran localizados fuera del sitio que correspondería a la unión con la β_2m y son por lo tanto expuestos en las moléculas de clase I como HLA-E, que también interactúa con la familia de receptores NKG2 ²¹³. Los sitios debajo de la plataforma de los dominios $\alpha_1\alpha_2$ en MICA no se encuentran ocluidos por la β_2m y por lo tanto pudieran constituir a un sitio de unión con la familia del

receptor NKG2. Sin embargo, el reconocimiento de la estructura de la molécula HLA-E unida al péptido influye en el reconocimiento CD94/ NKG2 por los miembros de la familia del receptor NK y por lo tanto pudieran participar los residuos cercanos al sitio de unión del péptido ²¹⁴. Si este es el caso, entonces podemos especular que esta región constituye un sitio potencial para la interacción con el receptor NKG2D. Li *et al.* ¹⁵⁷ ha propuesto dos parches (*patches*) de residuos conservados para la interacción con el receptor NKG2D localizados en la parte inferior de la plataforma.

En nuestro estudio de MICA por RSCA el fragmento de PCR de cada exón analizado incluyó, independientemente de las regiones exónicas, parte de los intrones por lo que logramos detectar cuatro variaciones intrónicas nuevas (dos en intrón 1 y dos en intrón 4), una de las cuales pudiera estar implicada en la expresión del producto genético de MICA. La guanina en la posición 8633 del intrón 4 se encuentra ausente en los alelos de MICA*015 y -AN#31. Este nucleótido es el primero en el intrón 4 y, por lo tanto, participa en el empalme (*splicing*) del RNAm, por lo que se esperaría que la ausencia de este nucleótido pudiera interferir con el proceso de la traducción de la proteína.

El exón 5 de MICA únicamente ha sido analizado en base al polimorfismo de las repeticiones del microsatélite (GCT) que codifica el aminoácido alanina (A), las cuales han sido denominadas 5A4, 5A5, 5A6 y 5A9 ¹⁹⁰. Se ha publicado la existencia de otras dos variaciones nucleótidas, 5A5.1 ¹⁹⁰ y 5A6 nuevo ²⁰⁶, la cual nosotros nombramos 5A6v. Hasta ahora el polimorfismo del triplete se ha estudiado separadamente del resto del gene. De hecho, en nuestro estudio se demostró por primera vez el enlace entre el exón 5 y los otros exones, incluyendo los alelos anteriormente reportados (MICA*001-MICA*016).

En el exón 5, la secuencia 5A5.1, pudiera codificar una molécula secretoria, dado que la ausencia del dominio transmembranal podría causar que la molécula no fuera retenida en la membrana ¹⁹⁰. Alternativamente, la proteína pudiera estar asociada a la membrana uniéndose vía el lípido fosfatidil inositol ²¹⁵. Nuestro análisis detectó esta variante de MICA en los alelos MICA*008 y -AN#23, lo cual sugiere que la variación es relativamente frecuente. Además dos de los alelos MICA descritos en este reporte, MICA*015 y -AN#31, pudieran no codificar para una proteína MICA debido a una mutación en el sitio de empalme. En las muestras analizadas se identificaron 36 líneas celulares homocigotas para estos alelos, lo que implicaría la existencia de alelos nulos y no necesariamente la pérdida completa o deletérea de la expresión de MICA. Se puede especular que en estos casos otras proteínas, i.e MICB, pueden tomar la función de MICA. Sin embargo, la pérdida de la expresión de MICA pudiera conferir alguna ventaja al individuo i.e. reduciendo la activación no específica de las células T $\gamma\delta$. No obstante, se requieren numerosos estudios adicionales para establecer con claridad el significado funcional de las variantes de MICA.

A la fecha, se han efectuado varios estudios de asociación entre la enfermedad de Behçet y el microsatélite A6 del exón 5 de MICA. En un estudio reciente se reportó el desequilibrio de enlace entre HLA-B51 y MICA*009, aunque también se observó con HLA-B52, en pacientes con la enfermedad de Behçet, concluyendo que HLA-B51 es el alelo asociado y que la presencia de A6 (MICA*009) se debe al desequilibrio de enlace ²¹⁶. Nuestros resultados revelaron la existencia del microsatélite A6 con los alelos de MICA*004, *006 y *009. Sin embargo, en estos resultados MICA*004 y *009 se encuentran en desequilibrio de enlace con HLA-51 y MICA*009 con HLA-52 ²¹⁷. Por esto, consideramos necesario realizar estudios más amplios para confirmar que MICA*009 es el único alelo asociado con esta enfermedad y que se encuentra en desequilibrio de enlace con HLA-B51. La patología de la

enfermedad de Behçet se ha tratado de explicar considerando que una infección microbiana aumenta la expresión (*upregulate*) de HSP65 por estrés ¹⁸⁸, y teniendo en cuenta que MICA responde a las proteínas de choque térmico y al estrés ésta podría estimular a las células T γ δ a generar células T efectoras y/o supresoras.

En nuestro estudio sobre los polimorfismos MIC, los alelos MICA encontrados con mayor frecuencia fueron MICA*008 (24.7%), seguido por MICA*002 (10.9%), *010 (10.9%), *004 (9.8%), *009 (8.0%) y -AN#21 (4.4%). Ningún alelo de MICA*005, *013 y *014 fue identificado, sugiriendo que estos alelos son raros o que pudieran representar artefactos en la secuencia. Por otra parte, los alelos MICB01021 (44%), MICB01021v (10%) y MICB0103101 (14.2%) fueron los más frecuentes, lo cual concuerda con lo reportado anteriormente ^{173, 211}. Como ocurrió con MICA, no se encontró ningún representante de los alelos MICB0101, MICB01023, MICB0107N, MICB-005 y MICB-006; previamente Fischer *et al.* sugirieron que MICB01023 podría ser un error de secuencia ²¹¹. Dado que nuestros resultados son generados a partir del estudio de líneas celulares, no fue posible establecer las frecuencias de población exactas y nuestras cifras pudieran no reflejar la distribución de los alelos de MICA/B en la población general.

A partir de nuestros resultados, fue posible establecer el desequilibrio de enlace entre diferentes alelos MICB, MICA y HLA-B, incluyendo en MICA los datos del exón 5, y confirmar los reportados previamente con MICA ^{178, 218} como adicionar otros, i.e. MICA*001 que se encontró en desequilibrio de enlace con B*1801. Los alelos HLA-B pueden encontrarse en desequilibrio con diferentes alelos de MICA por ejemplo HLA-B35 se encuentra en desequilibrio con MICA*002 y *016 (Tabla 7.2).

MICB01021 se encontró asociado con diferentes alelos de MICA (*001, *004, *008 y *010) y HLA-B (*4601, *1801, *4431 y *1302) (Tabla 7.5).

Nuestros resultados de desequilibrio de enlace pudieran ser relevantes en la enfermedad injerto contra huésped (GvHD), una complicación grave en el trasplante de médula ósea. En las parejas donador-receptor, haplo idénticas en HLA-A, -B y -DR, la incidencia de GvHD es mayor cuando el injerto proviene de un donador no relacionado que cuando proviene de un hermano. Se ha considerado que estas diferencias en incidencia de GvHD pudieran deberse a incompatibilidad en antígenos menores de histocompatibilidad. Más aún, si consideramos que las moléculas MICA/B se expresan principalmente en las células epiteliales de intestino ¹⁵⁸, uno de los sitios principales de GvHD, no se descarta la posible participación de MIC en el desarrollo de la GvHD ¹⁵⁰.

A diferencia de las moléculas de clase I, en donde el polimorfismo se encuentra preferencialmente ubicado en el exón 2, el polimorfismo en MICA y MICB se localiza en los exones 2, 3, 4 y 5. Por este motivo resulta indispensable estudiar todos esos exones para asignar correctamente el alelo. Durante el desarrollo de este trabajo diferentes grupos iniciaron el estudio del polimorfismo en MICA, no obstante, la mayoría de estos grupos únicamente estudiaron los exones 2-4. Nuestros resultados demuestran con claridad que algunas diferencias entre alelos se encuentran exclusivamente en el exón 5 i.e MICA*008 y MICA- AN#21, por lo que consideramos que es indispensable efectuar el estudio integral de los diferentes exones en los alelos MICA antes de poder comparar las frecuencias de los alelos en diferentes poblaciones. Sin embargo, considerando esta limitación y con la finalidad de estimar el número de alelos de MICA, se realizó una búsqueda en el GeneBank de todas las secuencias reportadas de MICA y presentamos aquí una tabla comparativa (Tabla 8.1) de nuestros resultados con los reportados en

estudios previos. Dado que la estimación del número de alelos se hizo comparando los exones 2-4, el número de alelos podría ser aun mayor.

Tabla 8.1
Comparación de resultados de MICA entre diferentes grupos

| Grupo | Alelos reportados | Alelos verdaderos |
|------------------------------|-------------------|-------------------|
| Fodil <i>et al.</i> 150, 219 | 20 | 15 |
| ANRI | 12 | 12 |
| Visser <i>et al.</i> 220 | 33 | 19 |
| Petersdorf <i>et al.</i> 221 | 5 | 1 |
| Yao <i>et al.</i> 222 | 20 | 8 |
| Hirose <i>et al.</i> 223 | 8 | 4 |
| Obuchi <i>et al.</i> 224 | 1 | 0 |
| Total | | 59 |

En conclusión, nuestro estudio presenta por vez primera las secuencias de MICA y MICB de los exones 2 al 5 así como parte de las secuencias intrónicas, empleando una técnica de alta resolución (RSCA) para la búsqueda de nuevas substituciones nucleótidas, y la aplicación posterior de SSOP para el análisis de ambos genes en un gran número de líneas celulares, homocigotas y heterocigotas para MICA y MICB, lo cual nos permitió determinar el desequilibrio de enlace entre ambas moléculas y con HLA-B. Nuestros resultados no sólo nos permitieron confirmar la existencia de los alelos MICA y MICB reportados previamente, con la excepción de MICA003 y MICB01023, sino que revelaron también nuevas mutaciones de punto y combinaciones entre los exones. Como se había informado previamente, MICA resultó más polimórfico que MICB, revelándose la existencia de 12 alelos nuevos MICA y 4 MICB. Algunos de los sitios polimórficos de MICA se encuentran por debajo de los dominios $\alpha_1\alpha_2$, en

la periferia del dominio α_2 , y en la parte lateral del dominio α_3 , sugiriendo que el polimorfismo del gene MICA pudiera tener un significado funcional, aunque llama la atención el polimorfismo del dominio α_2 , justamente donde se encuentra una región de desorden de aminoácidos; lo cual nos permite especular que esta sería la región de interacción con las células $T\gamma\delta$, sin embargo son necesarios estudios adicionales para conocer la función exacta de estas proteínas y su participación exacta entre la inmunidad natural y adquirida.

CAPÍTULO 9

BIBLIOGRAFÍA

1. Botstein D. (1999) Of genes and genomes. *Ann N Y Acad Sci*, **882**, 32.
2. Cooper D.N. (1994) Mapping the human genome. *Ann Genet*, **37**, 101.
3. Collins F.S. (1999) The human genome project and the future of medicine. *Ann N Y Acad Sci*, **882**, 42.
4. Beck S., Geraghty D., Inoko H. & Rowen L. (1999) Complete sequence and gene map of a human major histocompatibility complex. The MHC sequencing consortium [see comments]. *Nature*, **401**, 921.
5. Shiina T., Tamiya G., Oka A., Takishima N. & Inoko H. (1999) Genome sequencing analysis of the 1.8 Mb entire human MHC class I region. *Immunol Rev*, **167**, 193.
6. Campbell R.D. & Trowsdale J. (1993) Map of the human MHC. *Immunol Today*, **14**, 349.
7. Klein J., Takahata N. & Ayala F.J. (1993) MHC polymorphism and human origins. *Sci Am*, **269**, 78.
8. Carroll M.C. & Alper C.A. (1987) Polymorphism and molecular genetics of human C4. *Br Med Bull*, **43**, 50.
9. Beck S., Kelly A., Radley E., Khurshid F., Alderton R.P. & Trowsdale J. (1992) DNA sequence analysis of 66 kb of the human MHC class II region encoding a cluster of genes for antigen processing. *J Mol Biol*, **228**, 433.

10. Rastan S. & Beeley L.J. (1997) Functional genomics: going forwards from the databases. *Curr Opin Genet Dev*, **7**, 777.
11. Abderrahim H., Sambucy J.L., Iris F., Ougen P., Billault A., Chumakov I.M., Dausset J., Cohen D. & Le Paslier D. (1994) Cloning the human major histocompatibility complex in YACs. *Genomics*, **23**, 520.
12. Koller B.H., Geraghty D., Orr H.T., Shimizu Y. & DeMars R. (1987) Organization of the human class I major histocompatibility complex genes. *Immunol Res*, **6**, 1.
13. Malissen M., Malissen B. & Jordan B.R. (1982) Exon/intron organization and complete nucleotide sequence of an HLA gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **79**, 893.
14. Bodmer J.G., Marsh S.G., Albert E.D., Bodmer W.F., Dupont B., Erlich H.A., Mach B., Mayr W.R., Parham P. & Sasazuki T. (1994) Nomenclature for factors of the HLA system, 1994. *Tissue Antigens*, **44**, 1.
15. Trowsdale J. & Campbell R.D. (1997) The 12th international MHC map. In: *HLA. Genetic diversity of HLA Functional and Medical Implication*. (ed. D. Charron), Vol. II, p. 8. EDK, Medical and Scientific International Publisher., Paris, France.
16. Strachan T. (1987) Molecular genetics and polymorphism of class I HLA antigens. *Br Med Bull*, **43**, 1.
17. Gobin S.J., van Zutphen M., Woltman A.M. & van den Elsen P.J. (1999) Transactivation of classical and nonclassical HLA class I genes through the IFN-stimulated response element. *J Immunol*, **163**, 1428.
18. Gobin S.J., Peijnenburg A., van Eggermond M., van Zutphen M., van den Berg R. & van den Elsen P.J. (1998) The RFX complex is crucial for the constitutive and CIITA-mediated transactivation of MHC class I and beta2-microglobulin genes. *Immunity*, **9**, 531.

19. So A. (1994) Genetics, polymorphism and regulation of expression of HLA region genes. In: *HLA and disease* (ed. R. Lechler), p. 1. Academic Press Limited, London, U. K.
20. Kelly A.P., Monaco J.J., Cho S.G. & Trowsdale J. (1991) A new human HLA class II-related locus, DM. *Nature*, **353**, 571.
21. Morris P., Shaman J., Attaya M., Amaya M., Goodman S., Bergman C., Monaco J.J. & Mellins E. (1994) An essential role for HLA-DM in antigen presentation by class II major histocompatibility molecules. *Nature*, **368**, 551.
22. Kelly A. & Trowsdale J. (1985) Complete nucleotide sequence of a functional HLA-DP beta gene and the region between the DP beta 1 and DP alpha 1 genes: comparison of the 5' ends of HLA class II genes. *Nucleic Acids Res*, **13**, 1607.
23. Andersen L.C., Beaty J.S., Nettles J.W., Seyfried C.E., Nepom G.T. & Nepoom B.S. (1991) Allelic polymorphism in transcriptional regulatory regions of HLA-DQB genes. *J Exp Med*, **173**, 181.
24. Singal D.P. & Qiu X. (1996) Polymorphism in both X and Y box motifs controls level of expression of HLA-DRB1 genes. *Immunogenetics*, **43**, 50.
25. Spies T., Bresnahan M. & Strominger J.L. (1989) Human major histocompatibility complex contains a minimum of 19 genes between the complement cluster and HLA-B. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 8955.
26. Spies T., Blanck G., Bresnahan M., Sands J. & Strominger J.L. (1989) A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science*, **243**, 214.
27. Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoui B., Bennett W.S., Strominger J.L. & Wiley D.C. (1987) Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, **329**, 506.

28. Bjorkman P.J. (1997) MHC restriction in three dimensions: a view of T cell receptor/ligand interactions. *Cell*, **89**, 167.
29. Madden D.R., Gorga J.C., Strominger J.L. & Wiley D.C. (1991) The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature*, **353**, 321.
30. Madden D.R., Garboczi D.N. & Wiley D.C. (1993) The antigenic identity of peptide-MHC complexes: a comparison of the conformations of five viral peptides presented by HLA-A2 [published erratum appears in *Cell* 1994 Jan 28;76(2):following 410]. *Cell*, **75**, 693.
31. Brown J.H., Jardetzky T.S., Gorga J.C., Stern L.J., Urban R.G., Strominger J.L. & Wiley D.C. (1993) Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1 [see comments]. *Nature*, **364**, 33.
32. So A. (1994) Structure and assembly of class I and class II molecules. In: *HLA and Disease*. (ed. R. Lechler). Academic Press,.
33. Stern L.J., Brown J.H., Jardetzky T.S., Gorga J.C., Urban R.G., Strominger J.L. & Wiley D.C. (1994) Crystal structure of the human class II MHC protein HLA-DR1 complexed with an influenza virus peptide. *Nature*, **368**, 215.
34. Andersson M., Paabo S., Nilsson T. & Peterson P.A. (1985) Impaired intracellular transport of class I MHC antigens as a possible means for adenoviruses to evade immune surveillance. *Cell*, **43**, 215.
35. Daar A.S., Fuggle S.V., Fabre J.W., Ting A. & Morris P.J. (1984) The detailed distribution of MHC Class II antigens in normal human organs. *Transplantation*, **38**, 293.
36. Arenzana-Seisdedos F., Mogensen S.C., Vuillier F., Fiers W. & Virelizier J.L. (1988) Autocrine secretion of tumor necrosis factor under the influence of interferon-gamma amplifies HLA-DR gene induction in human monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 6087.

37. Chapman H.A. (1998) Endosomal proteolysis and MHC class II function. *Curr Opin Immunol*, **10**, 93.
38. Chien Y.H. & Davis M.M. (1993) How alpha beta T-cell receptors 'see' peptide/MHC complexes. *Immunol Today*, **14**, 597.
39. Spies T., Cerundolo V., Colonna M., Cresswell P., Townsend A. & DeMars R. (1992) Presentation of viral antigen by MHC class I molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer. *Nature*, **355**, 644.
40. Townsend A. (1992) Antigen processing. A new presentation pathway? [news; comment]. *Nature*, **356**, 386.
41. Elliott T.J., Cerundolo V., Ohlen C., Ljunggren H.G., Karre K. & Townsend A. (1991) Antigen presentation and the association of class-I molecules. *Acta Biol Hung*, **42**, 213.
42. Carmichael P., Kerr L.A., Kelly A., Lombardi G., Zeigler B.U., Ziegler A., Trowsdale J. & Lechler R. (1996) The TAP complex influences allorecognition of class II MHC molecules. *Hum Immunol*, **50**, 70.
43. Glynne R., Powis S.H., Beck S., Kelly A., Kerr L.A. & Trowsdale J. (1991) A proteasome-related gene between the two ABC transporter loci in the class II region of the human MHC [see comments]. *Nature*, **353**, 357.
44. Bacik I., Cox J.H., Anderson R., Yewdell J.W. & Bennink J.R. (1994) TAP (transporter associated with antigen processing)-independent presentation of endogenously synthesized peptides is enhanced by endoplasmic reticulum insertion sequences located at the amino- but not carboxyl-terminus of the peptide. *J Immunol*, **152**, 381.

45. Powis S.H., Tonks S., Mockridge I., Kelly A.P., Bodmer J.G. & Trowsdale J. (1993) Alleles and haplotypes of the MHC-encoded ABC transporters TAP1 and TAP2 [published erratum appears in *Immunogenetics* 1993;37(6):480]. *Immunogenetics*, **37**, 373.
46. Purcell A.W., Kelly A.J., Peh C.A., Dudek N.L. & McCluskey J. (2000) Endogenous and exogenous factors contributing to the surface expression of HLA B27 on mutant APC. *Hum Immunol*, **61**, 120.
47. de la Salle H., Hanau D., Fricker D., Urlacher A., Kelly A., Salamero J., Powis S.H., Donato L., Bausinger H., Laforet M. & et al. (1994) Homozygous human TAP peptide transporter mutation in HLA class I deficiency [published erratum appears in *Science* 1994 Dec 2;266(5190):1464]. *Science*, **265**, 237.
48. Pieters J. (1997) MHC class II restricted antigen presentation. *Curr Opin Immunol*, **9**, 89.
49. Nuchtern J.G., Biddison W.E. & Klausner R.D. (1990) Class II MHC molecules can use the endogenous pathway of antigen presentation. *Nature*, **343**, 74.
50. Bertolino P. & Rabourdin-Combe C. (1996) The MHC class II-associated invariant chain: a molecule with multiple roles in MHC class II biosynthesis and antigen presentation to CD4+ T cells. *Crit Rev Immunol*, **16**, 359.
51. Roche P.A., Teletski C.L., Karp D.R., Pinet V., Bakke O. & Long E.O. (1992) Stable surface expression of invariant chain prevents peptide presentation by HLA-DR. *Embo J*, **11**, 2841.
52. Hammerling G.J. & Moreno J. (1990) The function of the invariant chain in antigen presentation by MHC class II molecules [news]. *Immunol Today*, **11**, 337.
53. Teyton L., O'Sullivan D., Dickson P.W., Lotteau V., Sette A., Fink P. & Peterson P.A. (1990) Invariant chain distinguishes between the exogenous and endogenous antigen presentation pathways. *Nature*, **348**, 39.

54. Krensky A.M. (1997) The HLA system, antigen processing and presentation. *Kidney Int Suppl*, **58**, S2.
55. Avent N.D. & Reid M.E. (2000) The Rh blood group system: a review [published erratum appears in *Blood* 2000 Apr 1;95(7):2197]. *Blood*, **95**, 375.
56. Parham P., Adams E.J. & Arnett K.L. (1995) The origins of HLA-A,B,C polymorphism. *Immunol Rev*, **143**, 141.
57. Hughes A.L. & Nei M. (1988) Pattern of nucleotide substitution at major histocompatibility complex class I loci reveals overdominant selection. *Nature*, **335**, 167.
58. Hughes A.L. & Nei M. (1989) Nucleotide substitution at major histocompatibility complex class II loci: evidence for overdominant selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 958.
59. Takahata N., Satta Y. & Klein J. (1992) Polymorphism and balancing selection at major histocompatibility complex loci. *Genetics*, **130**, 925.
60. Hill J.S., Hayden M.R., Frohlich J. & Pritchard P.H. (1991) Genetic and environmental factors affecting the incidence of coronary artery disease in heterozygous familial hypercholesterolemia. *Arterioscler Thromb*, **11**, 290.
61. Hill A.V., Allsopp C.E., Kwiatkowski D., Anstey N.M., Twumasi P., Rowe P.A., Bennett S., Brewster D., McMichael A.J. & Greenwood B.M. (1991) Common west African HLA antigens are associated with protection from severe malaria [see comments]. *Nature*, **352**, 595.
62. Yeager M. & Hughes A.L. (1999) Evolution of the mammalian MHC: natural selection, recombination, and convergent evolution. *Immunol Rev*, **167**, 45.
63. Ohta T. (1999) Effect of gene conversion on polymorphic patterns at major histocompatibility complex loci. *Immunol Rev*, **167**, 319.

64. Holmes N. & Parham P. (1985) Exon shuffling in vivo can generate novel HLA class I molecules. *Embo J*, **4**, 2849.
65. Parham P., Lomen C.E., Lawlor D.A., Ways J.P., Holmes N., Coppin H.L., Salter R.D., Wan A.M. & Ennis P.D. (1988) Nature of polymorphism in HLA-A, -B, and -C molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 4005.
66. Zangenberg G., Huang M.M., Arnheim N. & Erlich H. (1995) New HLA-DPB1 alleles generated by interallelic gene conversion detected by analysis of sperm [see comments]. *Nat Genet*, **10**, 407.
67. Bodmer J.G., Marsh S.G., Albert E.D., Bodmer W.F., Bontrop R.E., Dupont B., Erlich H.A., Hansen J.A., Mach B., Mayr W.R., Parham P., Petersdorf E.W., Sasazuki T., Schreuder G.M., Strominger J.L., Svejgaard A. & Terasaki P.I. (1999) Nomenclature for factors of the HLA system, 1998. *Tissue Antigens*, **53**, 407.
68. Bodmer J.G., Marsh S.G., Albert E.D., Bodmer W.F., Bontrop R.E., Charron D., Dupont B., Erlich H.A., Mach B. & Mayr W.R. (1995) Nomenclature for factors of the HLA system, 1995. *Tissue Antigens*, **46**, 1.
69. Bodmer J.G., Marsh S.G., Albert E.D., Bodmer W.F., Bontrop R.E., Charron D., Dupont B., Erlich H.A., Fauchet R., Mach B., Mayr W.R., Parham P., Sasazuki T., Schreuder G.M., Strominger J.L., Svejgaard A. & Terasaki P.I. (1997) Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. *Tissue Antigens*, **49**, 297.
70. Bodmer J.G., Marsh S.G., Albert E.D., Bodmer W.F., Bontrop R.E., Charron D., Dupont B., Erlich H.A., Fauchet R., Mach B., Mayr W.R., Parham P., Sasazuki T., Schreuder G.M., Strominger J.L., Svejgaard A. & Terasaki P.I. (1997) Nomenclature for factors of the HLA system, 1996. *Vox Sang*, **73**, 105.

71. Bodmer W.F. (1997) HLA: what's in a name? A commentary on HLA nomenclature development over the years. *Tissue Antigens*, **49**, 293.
72. Fleischhauer K., Kernan N.A., O'Reilly R.J., Dupont B. & Yang S.Y. (1990) Bone marrow-allograft rejection by T lymphocytes recognizing a single amino acid difference in HLA-B44. *N Engl J Med*, **323**, 1818.
73. Ford W.L. & Atkins R.C. (1973) The proportion of lymphocytes capable of recognizing strong transplantation antigens in vivo. *Adv Exp Med Biol*, **29**, 255.
74. Lombardi G., Sidhu S., Daly M., Batchelor J.R., Makgoba W. & Lechler R.I. (1990) Are primary alloresponses truly primary? *Int Immunol*, **2**, 9.
75. Lechler R.I., Lombardi G., Batchelor J.R., Reinsmoen N. & Bach F.H. (1990) The molecular basis of alloreactivity. *Immunol Today*, **11**, 83.
76. Lombardi G., Sidhu S., Lamb J.R., Batchelor J.R. & Lechler R.I. (1989) Co-recognition of endogenous antigens with HLA-DR1 by alloreactive human T cell clones. *J Immunol*, **142**, 753.
77. Sherwood R.A., Brent L. & Rayfield L.S. (1986) Presentation of alloantigens by host cells. *Eur J Immunol*, **16**, 569.
78. Shoskes D.A. & Wood K.J. (1994) Indirect presentation of MHC antigens in transplantation. *Immunol Today*, **15**, 32.
79. Auchincloss H., Jr., Lee R., Shea S., Markowitz J.S., Grusby M.J. & Glimcher L.H. (1993) The role of "indirect" recognition in initiating rejection of skin grafts from major histocompatibility complex class II-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, **90**, 3373.
80. Fangmann J., Dalchau R., Sawyer G.J., Priestley C.A. & Fabre J.W. (1992) T cell recognition of donor major histocompatibility complex class I peptides during allograft rejection. *Eur J Immunol*, **22**, 1525.

81. Benichou G., Takizawa P.A., Olson C.A., McMillan M. & Sercarz E.E. (1992) Donor major histocompatibility complex (MHC) peptides are presented by recipient MHC molecules during graft rejection. *J Exp Med*, **175**, 305.
82. Liu Z., Braunstein N.S. & Suciú-Foca N. (1992) T cell recognition of allopeptides in context of syngeneic MHC. *J Immunol*, **148**, 35.
83. Sayegh M.H., Watschinger B. & Carpenter C.B. (1994) Mechanisms of T cell recognition of alloantigen. The role of peptides. *Transplantation*, **57**, 1295.
84. de Vries R.R. (1994) HLA and disease: past, present and future. *Neth J Med*, **45**, 302.
85. Thorsby E. (1997) Invited anniversary review: HLA associated diseases. *Hum Immunol*, **53**, 1.
86. Svejgaard A., Platz P. & Ryder L.P. (1983) HLA and disease 1982--a survey. *Immunol Rev*, **70**, 193.
87. Batchelor J.R. & McMichael A.J. (1987) Progress in understanding HLA and disease associations. *Br Med Bull*, **43**, 156.
88. Vargas-Alarcón G. & Granados J. (1993) El sistema principal de histocompatibilidad. *Rev. Mex. Reumat.*, **8**, 251.
89. Lechler R. (1994) Mechanisms of HLA and disease associations. In: *HLA and disease* (ed. R. Lechler), p. 83. Academic Press Limited, London, U.K.
90. Heard R. (1994) HLA and autoimmune disease. In: *HLA and disease*. (ed. R. Lechler), p. 123. Academic Press Limited, London, U.K.
91. Haseman J.K. & Elston R.C. (1972) The investigation of linkage between a quantitative trait and a marker locus. *Behav Genet*, **2**, 3.
92. Perusse L. & Chagnon Y.C. (1997) Summary of human linkage and association studies. *Behav Genet*, **27**, 359.

93. Elston R.C. (1995) Linkage and association to genetic markers. *Exp Clin Immunogenet*, **12**, 129.
94. Hawkins B.R. (1981) Table of critical chi-square values for investigations involving multiple comparisons. *Tissue Antigens*, **17**, 243.
95. Svejgaard A. & Ryder L.P. (1994) HLA and disease associations: detecting the strongest association. *Tissue Antigens*, **43**, 18.
96. Svejgaard A. & Ryder L.P. (1979) HLA markers and disease. *Prog Clin Biol Res*, **32**, 523.
97. Bengtsson B.O. & Thomson G. (1981) Measuring the strength of associations between HLA antigens and diseases. *Tissue Antigens*, **18**, 356.
98. Lamm L.V. & Degos L. (1979) Introduction to HLA genetics. In: *Histocompatibility techniques* (ed. H. M. Dick & F. Kissmeyer-Nielsen), p. 131. Elsevier North Holland Biomedical Press., New York, USA.
99. Dyer P.A. & Claas F.H. (1997) A future for HLA matching in clinical transplantation. *Eur J Immunogenet*, **24**, 17.
100. Terasaki P.I., Cecka J.M., Gjertson D.W. & Cho Y.W. (1997) Spousal and other living renal donor transplants. *Clin Transpl*, 269.
101. Bushell A., Niimi M., Morris P.J. & Wood K.J. (1999) Evidence for immune regulation in the induction of transplantation tolerance: a conditional but limited role for IL-4. *J Immunol*, **162**, 1359.
102. Bortin M.M., Bach F.H., van Bekkum D.W., Good R.A. & van Rood J.J. (1994) 25th anniversary of the first successful allogeneic bone marrow transplants. *Bone Marrow Transplant*, **14**, 211.

103. Buckley R.H., Schiff S.E., Sampson H.A., Schiff R.I., Markert M.L., Knutsen A.P., Hershfield M.S., Huang A.T., Mickey G.H. & Ward F.E. (1986) Development of immunity in human severe primary T cell deficiency following haploidentical bone marrow stem cell transplantation. *J Immunol*, **136**, 2398.
104. Thomas E.D., Sanders J.E., Flournoy N., Johnson F.L., Buckner C.D., Clift R.A., Fefer A., Goodell B.W., Storb R. & Weiden P.L. (1983) Marrow transplantation for patients with acute lymphoblastic leukemia: a long-term follow-up. *Blood*, **62**, 1139.
105. Thomas E.D. (1983) Bone marrow transplantation in leukemia. *Hamatol Bluttransfus*, **28**, 11.
106. Goldman J.M., Apperley J.F., Jones L., Marcus R., Goolden A.W., Batchelor R., Hale G., Waldmann H., Reid C.D., Hows J. & et al. (1986) Bone marrow transplantation for patients with chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*, **314**, 202.
107. Dupont B. (1997) Immunology of hematopoietic stem cell transplantation: a brief review of its history. *Immunol Rev*, **157**, 5.
108. VanBuskirk A.M., Pidwell D.J., Adams P.W. & Orosz C.G. (1997) Transplantation immunology. *Jama*, **278**, 1993.
109. Hows J.M., Yin J.L., Marsh J., Swirsky D., Jones L., Apperley J.F., James D.C., Smithers S., Batchelor J.R., Goldman J.M. & et al. (1986) Histocompatible unrelated volunteer donors compared with HLA nonidentical family donors in marrow transplantation for aplastic anemia and leukemia. *Blood*, **68**, 1322.
110. Bortin M.M. & Rimm A.A. (1989) Increasing utilization of bone marrow transplantation. II. Results of the 1985-1987 survey. *Transplantation*, **48**, 453.

111. Gale R.P., Horowitz M.M., Ash R.C., Champlin R.E., Goldman J.M., Rimm A.A., Ringden O., Stone J.A. & Bortin M.M. (1994) Identical-twin bone marrow transplants for leukemia. *Ann Intern Med*, **120**, 646.
112. Madrigal J.A., Scott I., Arguello R., Szydlo R., Little A.M. & Goldman J.M. (1997) Factors influencing the outcome of bone marrow transplants using unrelated donors. *Immunol Rev*, **157**, 153.
113. Bacigalupo A., Gualandi F., Van Lint M.T., Sessarego M., Frassoni F., Occhini D., Lamparelli T., Oneto R., Vitale V., Corvo R. & et al. (1993) Multivariate analysis of risk factors for survival and relapse in chronic granulocytic leukemia following allogeneic marrow transplantation: impact of disease related variables (Sokal score). *Bone Marrow Transplant*, **12**, 443.
114. Gale R.P., Bortin M.M., van Bekkum D.W., Biggs J.C., Dicke K.A., Gluckman E., Good R.A., Hoffmann R.G., Kay H.E., Kersey J.H. & et al. (1987) Risk factors for acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol*, **67**, 397.
115. Tiercy J.M., Djavad N., Rufer N., Speiser D.E., Jeannet M. & Roosnek E. (1994) Oligotyping of HLA-A2, -A3, and -B44 subtypes. Detection of subtype incompatibilities between patients and their serologically matched unrelated bone marrow donors. *Hum Immunol*, **41**, 207.
116. Rufer N., Breur-Vriesendorp B.S., Tiercy J.M., Slavcev A.S., Lardy N.M., Francis P., Kressig R., Speiser D.E., Helg C., Chapuis B. & et al. (1993) High-resolution histocompatibility testing of a group of sixteen B44- positive, ABDR serologically matched unrelated donor-recipient pairs. Analysis of serologically undisclosed incompatibilities by cellular techniques, isoelectrofocusing, and HLA oligotyping. *Hum Immunol*, **38**, 235.

117. Petersdorf E.W., Longton G.M., Anasetti C., Martin P.J., Mickelson E.M., Smith A.G. & Hansen J.A. (1995) The significance of HLA-DRB1 matching on clinical outcome after HLA-A, B, DR identical unrelated donor marrow transplantation. *Blood*, **86**, 1606.
118. Petersdorf E.W., Smith A.G., Mickelson E.M., Longton G.M., Anasetti C., Choo S.Y., Martin P.J. & Hansen J.A. (1993) The role of HLA-DPB1 disparity in the development of acute graft-versus-host disease following unrelated donor marrow transplantation. *Blood*, **81**, 1923.
119. Bishara A., Brautbar C., Cohen I. & Nagler A. (1999) Positivity in a modified mixed leukocyte reaction test correlates with molecular HLA-C disparity in prediction of unrelated bone marrow transplantation outcome. *Hum Immunol*, **60**, 833.
120. Nagler A., Brautbar C., Slavin S. & Bishara A. (1996) Bone marrow transplantation using unrelated and family related donors: the impact of HLA-C disparity. *Bone Marrow Transplant*, **18**, 891.
121. Petersdorf E.W., Mickelson E.M., Anasetti C., Martin P.J., Woolfrey A.E. & Hansen J.A. (1999) Effect of HLA mismatches on the outcome of hematopoietic transplants. *Curr Opin Immunol*, **11**, 521.
122. Anasetti C., Amos D., Beatty P.G., Appelbaum F.R., Bensinger W., Buckner C.D., Clift R., Doney K., Martin P.J., Mickelson E. & et al. (1989) Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma. *N Engl J Med*, **320**, 197.
123. Marmont A.M. (1989) T cell depletion in allogenic bone marrow transplantation. Progress and problems. *Bone Marrow Transplant*, **4 Suppl 1**, 229.
124. Kerman R.H., Flechner S.M., Van Buren C.T., Lorber M.I. & Kahan B.D. (1987) Role of suppressor cells in cyclosporine-treated allograft recipients. *Transplant Proc*, **19**, 1580.

125. Blazar B.R., Korngold R. & Vallera D.A. (1997) Recent advances in graft-versus-host disease (GVHD) prevention. *Immunol Rev*, **157**, 79.
126. Voogt P.J., Goulmy E., Veenhof W.F., Hamilton M., Fibbe W.E., Van Rood J.J. & Falkenburg J.H. (1988) Cellularly defined minor histocompatibility antigens are differentially expressed on human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med*, **168**, 2337.
127. Deeg H.J. (1993) Graft-versus-host disease: host and donor views. *Semin Hematol*, **30**, 110.
128. Kaminski E., Sharrock C., Hows J., Ritter M., Arthur C., McKinnon S. & Batchelor J.R. (1988) Frequency analysis of cytotoxic T lymphocyte precursors--possible relevance to HLA-matched unrelated donor bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, **3**, 149.
129. Murphy W.J. & Blazar B.R. (1999) New strategies for preventing graft-versus-host disease. *Curr Opin Immunol*, **11**, 509.
130. Aultman D.F., Sawaya D.E., Zibari G.B., McMillan R.W., Lynn M.L., Work J. & McDonald J.C. (1999) Are all successful renal transplants really successful? *Am J Kidney Dis*, **34**, 61.
131. Maruya E., Takemoto S. & Terasaki P.I. (1993) HLA matching: identification of permissible HLA mismatches. *Clin Transpl*, 511.
132. Cecka J.M. (1997) The role of HLA in renal transplantation. *Hum Immunol*, **56**, 6.
133. Morris P.J. (1994) Factors influencing outcome in cadaveric renal transplantation. *Br J Surg*, **81**, 635.
134. Cecka J.M. (1997) The UNOS Scientific Renal Transplant Registry--ten years of kidney transplants. *Clin Transpl*, 1.
135. Goulmy E. (1997) Human minor histocompatibility antigens: new concepts for marrow transplantation and adoptive immunotherapy. *Immunol Rev*, **157**, 125.

136. Martin P.J., Gooley T., Anasetti C., Petersdorf E.W. & Hansen J.A. (1998) HLAs and risk of acute graft-vs.-host disease after marrow transplantation from an HLA-identical sibling. *Biol Blood Marrow Transplant*, **4**, 128.
137. Bailey B.J. (1975) Glottic reconstruction after hemilaryngectomy: bipedicle muscle flap laryngoplasty. *Laryngoscope*, **85**, 960.
138. Snell G.I., Rabinov M., Griffiths A., Williams T., Ugoni A., Salamonsson R. & Esmore D. (1996) Pulmonary allograft ischemic time: an important predictor of survival after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*, **15**, 160.
139. Loveland B., Wang C.R., Yonekawa H., Hermel E. & Lindahl K.F. (1990) Maternally transmitted histocompatibility antigen of mice: a hydrophobic peptide of a mitochondrially encoded protein. *Cell*, **60**, 971.
140. Goulmy E., Schipper R., Pool J., Blokland E., Falkenburg J.H., Vossen J., Grathwohl A., Vogelsang G.B., van Houwelingen H.C. & van Rood J.J. (1996) Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation [see comments]. *N Engl J Med*, **334**, 281.
141. Goulmy E. (1997) Minor histocompatibility antigens: from T cell recognition to peptide identification [editorial]. *Hum Immunol*, **54**, 8.
142. Bevan M.J. (1975) The major histocompatibility complex determines susceptibility to cytotoxic T cells directed against minor histocompatibility antigens. *J Exp Med*, **142**, 1349.
143. Falk K., Rotzschke O., Stevanovic S., Jung G. & Rammensee H.G. (1991) Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature*, **351**, 290.
144. Goulmy E. (1996) Human minor histocompatibility antigens. *Curr Opin Immunol*, **8**, 75.

145. Brochu S., Baron C., Hetu F., Roy D.C. & Perreault C. (1995) Oligoclonal expansion of CTLs directed against a restricted number of dominant minor histocompatibility antigens in hemopoietic chimeras. *J Immunol*, **155**, 5104.
146. Berger M.A. & Korngold R. (1997) Immunodominant CD4+ T cell receptor Vbeta repertoires involved in graft-versus-host disease responses to minor histocompatibility antigens. *J Immunol*, **159**, 77.
147. Simpson E. & Roopenian D. (1997) Minor histocompatibility antigens. *Curr Opin Immunol*, **9**, 655.
148. den Haan J.M., Meadows L.M., Wang W., Pool J., Blokland E., Bishop T.L., Reinhardus C., Shabanowitz J., Offringa R., Hunt D.F., Engelhard V.H. & Goulmy E. (1998) The minor histocompatibility antigen HA-1: a diallelic gene with a single amino acid polymorphism. *Science*, **279**, 1054.
149. Bahram S., Bresnahan M., Geraghty D.E. & Spies T. (1994) A second lineage of mammalian major histocompatibility complex class I genes [see comments]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 6259.
150. Fodil N., Laloux L., Wanner V., Pellet P., Hauptmann G., Mizuki N., Inoko H., Spies T., Theodorou I. & Bahram S. (1996) Allelic repertoire of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics*, **44**, 351.
151. Leelayuwat C., Townend D.C., Degli-Esposti M.A., Abraham L.J. & Dawkins R.L. (1994) A new polymorphic and multicopy MHC gene family related to nonmammalian class I [published erratum appears in *Immunogenetics* 1995;41(2-3):174]. *Immunogenetics*, **40**, 339.
152. Bahram S. & Spies T. (1996) The MIC gene family. *Research in Immunology*, **147**, 328.

153. Bahram S., Mizuki N., Inoko H. & Spies T. (1996) Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics*, **44**, 80.
154. Bahram S. & Spies T. (1996) Nucleotide sequence of a human MHC class I MICB cDNA. *Immunogenetics*, **43**, 230.
155. Bahram S., Shiina T., Oka A., Tamiya G. & Inoko H. (1996) Genomic structure of the human MHC class I MICB gene. *Immunogenetics*, **45**, 161.
156. Bahram S., Fodil N., Mayers C. & Wanner V. (1998) MIC genes. *ESH*, **May**, 22.
157. Li P., Willie S.T., Bauer S., Morris D.L., Spies T. & Strong R.K. (1999) Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a gammadelta T cell ligand. *Immunity*, **10**, 577.
158. Groh V., Bahram S., Bauer S., Herman A., Beauchamp M. & Spies T. (1996) Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12445.
159. Groh V., Steinle A., Bauer S. & Spies T. (1998) Recognition of stress-induced MHC molecules by intestinal epithelial gammadelta T cells. *Science*, **279**, 1737.
160. Wu J., Song Y., Bakker A.B.H., Bauer S., Spies T., Lanier L.L. & Phillips J.H. (1999) An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*, **285**, 730.
161. Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J.H., Lanier L.L. & Spies T. (1999) Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA [see comments]. *Science*, **285**, 727.
162. Groh V., Rhinehart R., Secrist H., Bauer S., Grabstein K.H. & Spies T. (1999) Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6879.

163. Chien Y.H., Jores R. & Crowley M.P. (1996) Recognition by gamma/delta T cells. *Annu Rev Immunol*, **14**, 511.
164. Kabelitz D., Bender A., Schondelmaier S., Schoel B. & Kaufmann S.H. (1990) A large fraction of human peripheral blood gamma/delta + T cells is activated by *Mycobacterium tuberculosis* but not by its 65-kD heat shock protein. *J Exp Med*, **171**, 667.
165. Koning F., Knot M., Wassenaar F. & Van den Elsen P. (1989) Phenotypical heterogeneity among human T cell receptor gamma/delta- expressing clones derived from peripheral blood. *Eur J Immunol*, **19**, 2099.
166. Parker C.M., Groh V., Band H., Porcelli S.A., Morita C., Fabbi M., Glass D., Strominger J.L. & Brenner M.B. (1990) Evidence for extrathymic changes in the T cell receptor gamma/delta repertoire. *J Exp Med*, **171**, 1597.
167. Maziarz R.T., Groh V., Prendergast M., Fabbi M., Strominger J.L. & Burakoff S.J. (1991) Non-MHC-restricted target-cell lysis by a CD4-CD8- TCR alpha beta T-cell line, as well as by TCR gamma delta T-cell lines, results from lymphokine-activated killing. *Int J Cancer*, **48**, 142.
168. Schild H., Mavaddat N., Litzenger C., Ehrich E.W., Davis M.M., Bluestone J.A., Matis L., Draper R.K. & Chien Y.H. (1994) The nature of major histocompatibility complex recognition by gamma delta T cells. *Cell*, **76**, 29.
169. Ferrick D.A., Schrenzel M.D., Mulvania T., Hsieh B., Ferlin W.G. & Lepper H. (1995) Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature*, **373**, 255.
170. Mak T.W. & Ferrick D.A. (1998) The gammadelta T-cell bridge: linking innate and acquired immunity [news]. *Nat Med*, **4**, 764.

171. Cattley S.K., Longman N., Dawkins R.L., Gaudieri S., Kulski J.K. & Leelayuwat C. (1999) Phylogenetic analysis of primate MIC (PERB11) sequences suggests that the representation of the gene family differs in different primates: comparison of MIC (PERB11) and C4. *Eur J Immunogenet*, **26**, 233.
172. Pellet P., Vaneensberghe C., Debré P., Sumyuen M.H. & Theodorou I. (1999) MIC genes in non-human primates. *Eur J Immunogenet*, **26**, 239.
173. Ando H., Mizuki N., Ota M., Yamazaki M., Ohno S., Goto K., Miyata Y., Wakisaka K., Bahram S. & Inoko H. (1997) Allelic variants of the human MHC class I chain-related B gene (MICB). *Immunogenetics*, **46**, 499.
174. Pellet P., Renaud M., Fodil N., Laloux L., Inoko H., Hauptmann G., Debré P., Bahram S. & Theodorou I. (1997) Allelic repertoire of the human MICB gene. *Immunogenetics*, **46**, 434.
175. Visser C.J.T., Tilanus M.G.J., Schaeffer V., Tatari Z., Tamouza R., Janin A. & Charron D. (1997) Sequencing-based typing reveals six novel MHC class I chain-related gene B (MICB) alleles. *Tissue Antigens*, **51**, 649.
176. van der Linden S.M., Valkenburg H.A., de Jongh B.M. & Cats A. (1984) The risk of developing ankylosing spondylitis in HLA-B27 positive individuals. A comparison of relatives of spondylitis patients with the general population. *Arthritis Rheum*, **27**, 241.
177. Goto K., Ota M., Ohno S., Mizuki N., Ando H., Katsuyama Y., Maksymowych W.P., Kimura M., Bahram S. & Inoko H. (1997) MICA gene and ankylosing spondylitis: linkage analysis via a transmembrane-encoded triplet repeat polymorphism. *Tissue Antigens*, **49**, 503.
178. Tsuchiya N., Shiota M., Moriyama S., Ogawa A., Komatsu-Wakui M., Mitsui H., Geraghty D.E. & Tokunaga K. (1998) MICA allele typing of HLA-B27 positive Japanese patients with seronegative spondylarthropathies and healthy individuals. *Arthritis & Rheumatism*, **41**, 68.

179. Yabuki K., Ota M., Goto K., Kimura T., Nomura E., Ohno S., Mizuki N., Katsuyama Y., Makysymowych W.P., Bahram S., Kimura M. & Inoko H. (1999) Triplet repeat polymorphism in the MICA gene in HLA-B27 positive and negative caucasian patients with ankylosing spondylitis. *Hum Immunol*, **60**, 83.
180. Goto K., Ota M., Maksymowych W.P., Mizuki N., Yabuki K., Katsuyama Y., Kimura M., Inoko H. & Ohno S. (1998) Association between MICA gene A4 allele and acute anterior uveitis in white patients with and without HLA-B27. *Am J Ophthalmol*, **126**, 436.
181. Goto K., Ota M., Ando H., Mizuki N., Nakamura S., Inoue K., Yabuki K., Kotake S., Katsuyama Y., Kimura M., Inoko H. & Ohno S. (1998) MICA gene polymorphisms and HLA-B27 subtypes in Japanese patients with HLA-B27-associated acute anterior uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **39**, 634.
182. González-Escribano M.F., Rodríguez M.R., Walter K., Sanchez-Roman J., García-Lozano J.R. & Núñez-Roldán A. (1998) Association of HLA-B51 subtypes and Behçet's disease in Spain. *Tissue Antigens*, **52**, 78.
183. Mizuki N. & Ohno S. (1996) Immunogenetic studies of Behcet's disease. *Rev Rhum Engl Ed*, **63**, 520.
184. Sanz L., González-Escribano F., de Pablo R., Núñez-Roldán A., Kreisler M. & Vilches C. (1998) HLA-Cw*1602: a new susceptibility marker of Behçet's disease in southern Spain. *Tissue Antigens*, **51**, 111.
185. Gonzalez-Escribano M.F., Morales J., Garcia-Lozano J.R., Castillo M.J., Sanchez-Roman J., Nunez-Roldan A. & Sanchez B. (1995) TAP polymorphism in patients with Behcet's disease. *Ann Rheum Dis*, **54**, 386.

186. Mizuki N., Inoko H. & Ohno S. (1997) Molecular genetics (HLA) of Behcet's disease. *Yonsei Med J*, **38**, 333.
187. Mizuki N., Inoko H. & Ohno S. (1997) Pathogenic gene responsible for the predisposition of Behcet's disease. *Int Rev Immunol*, **14**, 33.
188. Lehner T. (1999) Immunopathogenesis of Behcet's disease. *Ann Med Interne (Paris)*, **150**, 483.
189. Ota M., Mizuki N., Katsuyama Y., Tamiya G., Shiina T., Oka A., Ando H., Kimura M., Goto K., Ohno S. & Inoko H. (1999) The critical region for Behçet disease in the human major histocompatibility complex is reduced to a 46-kb segment centromeric of HLA-B, by association analysis using refined microsatellite mapping. *Am J Hum Genet*, **64**, 1406.
190. Mizuki N., Ota M., Kimura M., Ohno S., Ando H., Katsuyama Y., Yamazaki M., Watanabe K., Goto K., Nakamura S., Bahram S. & Inoko H. (1997) Triplet repeat polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene: a strong association of six GCT repetitions with Behcet disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94**, 1298.
191. Yabuki K., Mizuki N., Ota M., Katsuyama Y., Palimeris G., Stavropoulos C., Koumantaki Y., Spyropoulou M., Giziaki E., Kaklamani V., Kaklamani E., Inoko H. & Ohno S. (1999) Association of MICA gene and HLA-B*5101 with Behçet's disease in Greece. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, **40**, 1921.
192. Amoura Z., Caillat-Zucman S., Wechsler B., Cacoub P., Piette J.C. & Bahram S. (1998) Strong association between MICA 6 allele and Behcet disease (BD) in caucasoids. *Arthritis Rheum*, **41**, S124.
193. Gonzalez-Escribano M.F., Rodriguez M.R., Aguilar F., Alvarez A., Sanchez-Roman J. & Nunez-Roldan A. (1999) Lack of association of MICA transmembrane region polymorphism and Behcet's disease in Spain. *Tissue Antigens*, **54**, 278.

194. Kimura T., Goto K., Yabuki K., Mizuki N., Tamiya G., Sato M., Kimura M., Inoko H. & Ohno S. (1998) Microsatellite polymorphism within the MICB gene among Japanese patients with Behçet's disease. *Hum Immunol*, **59**, 500.
195. Gonzalez S., Martinez-Borra J., Torre-Alonso J.C., Gonzalez-Roces S., Sanchez del Rio J., Rodriguez Perez A., Brautbar C. & Lopez-Larrea C. (1999) The MICA-A9 triplet repeat polymorphism in the transmembrane region confers additional susceptibility to the development of psoriatic arthritis and is independent of the association of Cw*0602 in psoriasis. *Arthritis Rheum*, **42**, 1010.
196. Allen M.H., Kondeatis E., Jones A.B., Clough L., Vaughan R.W., Powis S.H., Trembath R.C. & Barker J.N.W. (1999) Allelic association of the MICA gene with psoriasis. *Br J Dermatol*, **140**, 790.
197. Gambelunghe G., Falorni A., Ghaderi M., Laureti S., Tortoioli C., Santeusanio F., Brunetti P. & Sanjeevi C.B. (1999) Microsatellite polymorphism of the MHC class I chain-related (MIC-A and MIC-B) genes marks the risk for autoimmune Addison's disease. *J Clin Endocrinol Metab*, **84**, 3701.
198. Lee Y.J., Huang F.Y., Wang C.H., Lo F.S., Tsan K.W., Hsu C.H., Huang C.Y., Chang S.C. & Chang J.G. (2000) Polymorphism in the transmembrane region of the MICA gene and type 1 diabetes. *J Pediatr Endocrinol Metab*, **13**, 489.
199. Naipal A., Hanifi P., Crusius J.B.A., Peña A.S., Koning F., Mulder C.J.J., Claas F.H.J. & Doxiadis I.I.N. (1999) Positive and negative associations of MICA polymorphism with coeliac disease. *Hum Immunol*, **60**, S67.

200. Ghaderi M., Hjelmstrom P., Hallmans G., Wiklund F., Lenner P., Dillner J. & Sanjeevi C.B. (1999) MICA gene polymorphism and the risk to develop cervical intraepithelial neoplasia. *Hum Immunol*, **60**, 970.
201. Argüello J.R., Little A.M., Pay A.L., Gallardo D., Rojas I., Marsh S.G., Goldman J.M. & Madrigal J.A. (1998) Mutation detection and typing of polymorphic loci through double-strand conformation analysis. *Nat Genet*, **18**, 192.
202. Marsh S.G.E., Packer R., Heyes J.M., Bolton B., Fauchet R., Charron D. & Bodmer J.G. (1997) The 12th International Histocompatibility Workshop cell lines panel. In: *Genetic diversity of HLA functional and medical implication* (ed. D. Charron), Vol. 1, p. 26. EDK, Medical and Scientific International Publisher., Paris, France.
203. Arguello R., Pay A.L., McDermott A., Ross J., Dunn P., Avakian H., Little A.M., Goldman J. & Madrigal J.A. (1997) Complementary strand analysis: a new approach for allelic separation in complex polyallelic genetic systems. *Nucleic Acids Res*, **25**, 2236.
204. Argüello J.R., Little A.M., Bohan E., Goldman J.M., Marsh S.G. & Madrigal J.A. (1998) High resolution HLA class I typing by reference strand mediated conformation analysis (RSCA). *Tissue Antigens*, **52**, 57.
205. Miller S.A., Dykes D.D. & Polesky H.F. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, **16**, 1215.
206. Vitiani L.R., Potolicchio I., D'Amato M., Baricordi O.R. & Sorrentino R. (1998) MICA exon 5 microsatellite typing by DNA heteroduplex analysis: a new polymorphism in the transmembrane region. *Tissue Antigens*, **51**, 309.
207. Fodil N., Laloux L., Wanner V., Pellet P., Hauptmann G., Spies T., Theodorou I. & Bahram S. (1997) MIC-A allelic variants. In: *HLA. Genetic diversity of HLA Functional and Medical*

- Implication*. (ed. D. Charron), Vol. II, p. 215. EDK, Medical and Scientific International Publisher., Paris, France.
208. Dawkins R., Leelayuwat C., Gaudieri S., Tay G., Hui J., Cattley S., Martinez P. & Kulski J. (1999) Genomics of the major histocompatibility complex: haplotypes, duplication, retroviruses and disease. *Immunol Rev*, **167**, 275.
209. Ota M., Katsuyama Y., Mizuki N., Ando H., Furihata K., Ono S., Pivetti-Pezzi P., Tabbara K.F., Palimeris G.D., Nikbin B., Davatchi F., Chams H., Geng Z., Bahram S. & Inoko H. (1997) Trinucleotide repeat polymorphism within exon 5 of the MICA gene (MHC class I chain-related gene A): allele frequency data in the nine population groups Japanese, Northern Han, Hui, Uygur, Kazakhstan, Iranian, Saudi Arabian, Greek and Italian. *Tissue Antigens*, **49**, 448.
210. Holmes N., Ennis P., Wan A.M., Denney D.W. & Parham P. (1987) Multiple genetic mechanisms have contributed to the generation of the HLA-A2/A28 family of class I MHC molecules. *J Immunol*, **139**, 936.
211. Fischer G., Arguello J.R., Perez-Rodriguez M., Cox S.T., McWhinnie A., Marsh S.G. & Madrigal J.A. (1999) Novel intronic variants of MICB (MHC class I chain-related gene B). *Eur J Immunogenet*, **26**, 399.
212. Nei M. & Gojobori T. (1986) Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Mol Biol Evol*, **3**, 418.
213. Posch P.E., Borrego F., Brooks A.G. & Coligan J.E. (1998) HLA-E is the ligand for the natural killer cell CD94/NKG2 receptors. *J Biomed Sci*, **5**, 321.
214. Llano M., Lee N., Navarro F., Garcia P., Albar J.P., Geraghty D.E. & Lopez-Botet M. (1998) HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer. *Eur J Immunol*, **28**, 2854.

215. Dustin M.L., Selvaraj P., Mattaliano R.J. & Springer T.A. (1987) Anchoring mechanisms for LFA-3 cell adhesion glycoprotein at membrane surface. *Nature*, **329**, 846.
216. Mizuki N., Ota M., Katsuyama Y., Yabuki K., Ando H., Goto K., Nakamura S., Bahram S., Ohno S. & Inoko H. (1999) Association analysis between the MIC-A and HLA-B alleles in Japanese patients with Behcet's disease. *Arthritis Rheum*, **42**, 1961.
217. Mendoza-Rincon J., Arguello J.R., Perez-Rodriguez M., McWhinnie A., Marsh S.G., Fischer G. & Madrigal J.A. (1999) Characterization of the MICA polymorphism by sequence-specific oligonucleotide probing. *Immunogenetics*, **49**, 471.
218. Stephens H.A., Vaughan R.W., Collins R., Kondeatis E., Theron J. & Payne A. (1999) Towards a molecular phototyping system for allelic variants of MICA, encoded by polymorphisms in exons 2, 3 and 4 of MHC class I chain-related genes. *Tissue Antigens*, **53**, 167.
219. Fodil N., Pellet P., Laloux L., Hauptmann G., Theodorou I. & Bahram S. (1999) MICA haplotypic diversity. *Immunogenetics*, **49**, 557.
220. Visser C.J., Tilanus M.G., Tatari Z., van der Zwan A.W., Bakker R., Rozemuller E.H., Schaeffer V., Tamouza R. & Charron D. (1999) Sequencing-based typing of MICA reveals 33 alleles: a study on linkage with classical HLA genes. *Immunogenetics*, **49**, 561.
221. Petersdorf E.W., Shuler K.B., Longton G.M., Spies T. & Hansen J.A. (1999) Population study of allelic diversity in the human MHC class I-related MIC-A gene. *Immunogenetics*, **49**, 605.
222. Yao Z., Volgger A., Helmberg W., Keller E., Fan L.A., Chandanayingyong D. & Albert E.D. (1999) Definition of new alleles of MIC-A using sequencing-based typing. *European Journal of Immunogenetics*, **26**, 225.
223. Hirose T., Mitsuishi Y. & Young C. (1998) New alleles of human non-classical class I MICA gene. *unpublished, AF106647 GeneBank*.

224. Obuchi N., Arimura T. & Kimura A. (1999) MICA analysis by SSCP and sequence based typing. *unpublished, AF136157 GeneBank.*